

Aus dem Pathologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Löhrs

**Vergleichende funktionelle und molekulare Charakterisierung humaner
Zelllinienmodelle aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut bezüglich
deren Stammzellpotenz und Plastizität**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Claudius Conrad
aus Landsberg am Lech

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Löhrs

2. Berichterstatter: Prof. Dr. S. K. Bohlander

Mitberichtersteller: Prof. Dr. M. Schliwa
Priv. Doz. Dr. G. Meinhardt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. R. Huss

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Dezember 2004

*meiner Mutter
und
meinem Vater*

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
I. EINLEITUNG.....	1
1.1. Historischer Überblick	1
1.2. Der Marker für Hämatopoese CD34	8
1.3. Der mesenchymale Marker Endoglin (CD105)	10
1.4. Das P-Glykoprotein.....	15
1.5. Die Farbstoffe Rhodamin 123 und Hoechst 33342	17
1.5.1. <i>Rhodamin 123</i>	17
1.5.2. <i>Hoechst 33342</i>	18
1.6. Transkriptionsfaktor Netzwerk	19
1.7. Die verwendeten Zelllinien V54/1, V54/2, L87/4 und L88/5	24
1.7. Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen	25
II. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1. Material	27
2.1.2. <i>Verwendete Zelllinien</i>	27
2.1.2. <i>Medium</i>	29
2.1.3. <i>Antikörper</i>	30
2.1.4. <i>Farbstoffe</i>	32
2.1.5. <i>Hemmstoff der P-Glykoproteinpumpe</i>	32
2.1.6. <i>Durchflußzytometrie</i>	33
2.1.7. <i>Colony forming Units (CFU)</i>	33
2.1.8. <i>Zytozentrifugationspräparate</i>	33
2.1.9. <i>Immunhistochemie</i>	33
2.1.10. <i>Differenzierung</i>	34
2.1.11. <i>RNA-Isolierung</i>	34
2.1.12. <i>RT-PCR</i>	35
2.1.13. <i>RT-PCR der Transkription der alkalischen Phosphatase</i>	35
2.2. Methoden.....	37
2.2.1. <i>Durchflußzytometrische Untersuchungen (Fluorescent Activated Cell Scan, FACS)</i> .	38
2.2.2. <i>Rhodamin 123-Färbung</i>	40
2.2.3. <i>Hoechst 33342-Färbung</i>	41
2.2.4. <i>Antikörper-Färbung</i>	42
2.2.5. <i>Zytozentrifugationspräparate</i>	42
2.2.6. <i>Färbungen der Zytozentrifugationspräparate</i>	42
2.2.6.1. <i>PAS- Färbung (Perjod Schiff'sche Säure)</i>	42
2.2.6.2. <i>POX-Färbung (Peroxidase)</i>	43
2.2.6.3. <i>ANAE-Färbung (α-Naphthylacetatesterase)</i>	43
2.2.6.4. <i>Sudan Schwarz B Färbung</i>	43
2.2.6.5. <i>Immunhistochemische LSAB-Methode (Labeled-Streptavidin-Biotin)</i>	44
2.2.6.6. <i>Immunhistochemische APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase)</i> ..	44
2.2.7. <i>RNA-Isolierung</i>	45
2.2.8. <i>RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion)</i>	46
2.2.9. <i>PCR der Expression alkalischer Phosphatase</i>	47
III. ERGEBNISSE.....	48
3.1. Rhodamin 123-Färbung.....	49

3.1.1. Zelllinie L87/4	50
3.1.1.1. Rh123 Färbung	50
3.1.1.2. Verapamilzugabe	51
3.2.1.3. Statistik	52
3.2.2. Zelllinie L88/5	54
3.2.2.1. Rhodamin-Zugabe	54
3.2.2.2. Verapamilzugabe	54
3.2.2.3. Statistik	55
3.2.3. Zelllinie V54/1	55
3.2.3.1. Rhodamin-Zugabe	55
3.2.3.2. Verapamilzugabe	56
3.2.3.3. Statistik	56
3.2.4. Zelllinie V54/2	57
3.2.4.1. Rhodamin-Zugabe	57
3.2.4.2. Verapamilzugabe	58
3.2.4.3. Statistik	58
3.2.5. Kontrollzelllinie KG1a	59
3.2.5.1. Rhodamin und die Hemmung des Effluxes durch Verapamil	59
3.2.5.2. Statistik	60
3.3. Hoechst 33342-Färbung	62
3.3.1. Untersuchungen des Zellzyklus	62
3.3.2. Statistik	63
3.3.3. Side-Population (SP)	63
3.4. Antikörperfärbung gegen P-Glykoprotein	66
3.4.1. Zelllinie L87/4	66
3.4.1.1. Antikörper gegen P-Glykoprotein	66
3.4.1.2. Statistik	69
3.4.2. Zelllinie L88/5	69
3.4.2.1. Antikörper gegen P-Glykoprotein	69
3.4.2.2. Statistik	70
3.4.3. Zelllinie V54/1	71
3.4.3.1. Antikörper gegen P-Glykoprotein	71
3.4.3.2. Statistik	72
3.4.4. Zelllinie V54/2	73
3.4.4.1. Antikörper gegen P-Glykoprotein	73
3.4.4.2. Statistik	74
3.4.5. Kontrollzelllinie HL60/Dox	74
3.4.5.1. Antikörper gegen P-Glykoprotein	74
3.5. Nachweis definierter Oberflächenantigene	77
3.5.1. Zelllinie L87/4	77
3.5.2. Zelllinie L88/5	78
3.5.3. Zelllinie V54/1	79
3.5.4. Zelllinie V54/2	80
3.5.5. SH3 und CD105	81
3.5.5.1. SH3	81
3.5.5.2. CD105	81
3.5.5.3. CD105 und CD34	82
3.5.5.4. Statistik	83
3.5.6. Kontrollzelllinie KG1a	83
3.5.7. Mel-Juso	85
3.5.7. Statistik	85
3.6. CD34-Antigen Nachweis	88

3.6.1. <i>Rh123 und CD34</i>	88
3.6.2. <i>Statistik</i>	91
3.6.2.1. <i>Statistik zu V54/2</i>	91
3.6.2.2. <i>Statistik zu L87/4, L88/5, V54/1</i>	91
3.7. <i>Differenzierung</i>	92
3.7.1. <i>Neuronale Differenzierung</i>	92
3.7.2. <i>Osteogene Differenzierung</i>	94
3.8. <i>Zellsortierung</i>	94
3.8.1. <i>Morphologie</i>	96
3.8.1.1. <i>Licht- und Elektronenmikroskopie</i>	96
3.8.1.2. <i>Vergleichende Morphologie der Rh123^{low} und Rh123^{high} Population</i>	96
3.8.2. <i>Methylcellulose</i>	97
3.9. <i>Expression von Funktionseinheiten von Transkriptionsfaktor Netzwerken</i>	98
3.10. <i>Die Plastizität der Zelllinie V54/2</i>	101
IV. DISKUSSION	103
V. SYNOPTISCHE	113
ZUSAMMENFASSUNG	113
VI. LITERATURVERZEICHNIS	I
DANKSAGUNG	XXIX
LEBENS LAUF	XXX

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	Antigene Binding Cassette
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMV	Avian Leukämie Virus
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
BMP	Bone Morphogenic Protein
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony Forming Unit
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
c-myb	Hämatopoetischer Transkriptionsfaktor
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Elf	Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie
Ets	Transkriptionsfaktorenfamilie
FAB	French-American-British-Klassifikation der Leukämien
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Flouresceinisothiocyant
FSC	Forward Scatter im FACScan
GATA	Transkriptionsfaktorenfamilie
G-CSF	Granulocytes-Colony Stimulating Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (Astrozytenmarker)
GM-CSF	Granulocytes/Makrophages-Colony Stimulating Factor
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LSAB	Labeled Streptavidin-Biotin (Immunhistochemie)

LTC-IC	Long-term-culture-initiating cell
mdr	Multi Drug Resistance
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minute
NBD	Nukleotidbindenden Domänen
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B-cell
NGF	Neuronal Growth Factor
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBMNC	Peripheres Blut Mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet-Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule-1 (CD31)
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
P-Gp	Multi Drug Resistance P-Glykoprotein
PJ	Propidiumjodid
Rh123	Farbstoff Rhodamin 123
Rh123 ^{high}	Subpopulation, die Rhodamin nicht aus der Zelle pumpen kann
Rh123 ^{low}	Subpopulation, die Rhodamin aus der Zelle pumpt
RLT-Puffer	RNA Lysis and Tissue Puffer (Guanidinthioisozyanat)
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
SA	Standartabweichung
Sec.	Sekunde
SSC	Sidewards Scatter im FACScan
TGF	Transforming Growth Factor
Tie	Rezeptor Tyrosin Kinase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

I. EINLEITUNG

1.1. Historischer Überblick

Die Zelle sei „das letzte eigentliche Form-Element aller lebendigen Erscheinungen, sowohl im Gesunden und im Kranken, von welcher alle Tätigkeit des Lebens ausgehe“, schrieb Rudolf Virchow in seiner 1858 publizierten Arbeit über „Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre“. Mit seinem bekannten Ausspruch „Omnis cellula e cellula“ begründete er die Zellularpathologie und erklärte damit die von François-Xavier Bichat vertretene Idee der Gewebepathologie für nichtig.

Virchow schuf die konzeptionelle Grundlage für die Stammzellforschung. Er erkannte die Zelle

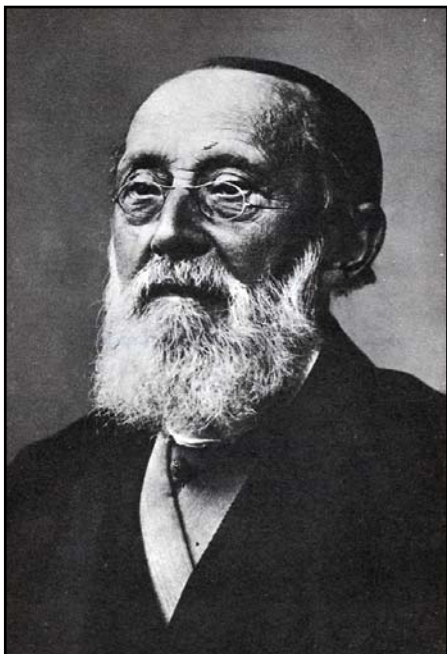


Abb. 1: *Professor Rudolph Virchow*

als die kleinste morphologische und selbständige Einheit des Organismus und proklamierte die „Cellula“, „von welcher alle Tätigkeit des Lebens ausgehe“. Diese Entdeckung hat bis heute nichts von ihrer Gültigkeit verloren und ist noch immer theoretische Grundlage sowohl der angewandten Medizin, als auch grundlegender Forschungsfelder wie der Stammzellforschung. Während Diskussionen über Stammzellen (deren wissenschaftliche Implikationen sich sicherlich an denen der Zellularpathologie zu Virchows Zeiten messen lassen können) bis vor wenigen Jahren nur in naturwissenschaftlichen Fachgremien geführt wurden, nimmt heutzutage eine breite Öffentlichkeit Anteil an diesen Diskussionen. Die Gesellschaft hat bemerkt, dass die

Brisanz der Stammzellforschung es notwendig macht, den Rahmen der Fachwelt von Biologie und Medizin zu sprengen und das Thema „Stammzellforschung“ der wissenschaftlichen Betrachtung von Politik, Religion, Ethik, Jura und Philosophie zuzuführen. Für eine fundierte Diskussion braucht man jedoch wissenschaftliche Argumente, die weiterhin nur die Naturwissenschaft liefern kann.

Die vorliegende Arbeit über die vergleichende funktionelle und molekulare Charakterisierung von humanen Zelllinienmodellen aus dem peripheren Blut und aus dem Knochenmark bezüglich deren Stammzellpotenz und Plastizität, will einen weiteren Baustein zum Verständnis der Biologie von Stammzellen liefern. Sie soll die derzeitige wissenschaftliche und ethische Diskussion um die Stammzelle, genauer gesagt um die Zelllinien von sogenannten adulten, humanen Stammzellen, bereichern.

Nachdem die Stammzellforschung bei ihren Untersuchungen auf Spendermaterial angewiesen ist, ist besonders die Erforschung von humanen Stammzellen limitiert. Aus diesem Grund wäre es wünschenswert, dass humane Zelllinien mit Stammzellfunktionen als Modell für in vivo Stammzellen fungieren könnten, wodurch eine Unabhängigkeit von Spendern erreicht würde.

Die vergleichende Charakterisierung von aus dem Knochenmark und aus dem peripheren Blut etablierten humanen Zelllinien, die einen zentralen Punkt dieser Arbeit darstellt, könnte neue Aufschlüsse über den Unterschied zwischen diesen beiden Stammzellgruppen geben. Die Charakterisierung von humanen Zelllinien hat eine ganz besondere, weitreichende Bedeutung. Denn die sehr allgemein gefassten Konzepte von Lorenz et al. und Ford et al. wie „proliferatives Potential“, „Selbsterneuerung“ und die „Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Linien“ aus den 50er Jahren reichen als Definition der Stammzelle für die angewandte Medizin und Forschung kaum noch aus. Die Ergebnisse der derzeit sehr intensiv betriebenen Charakterisierung von Stammzellen lässt die zwar allgemein noch gültige, aber doch sehr weit gefasste Definition an ihre Grenzen stoßen.

Dieses erste einleitende Kapitel soll den Weg der Erforschung von Stammzellen nachzeichnen, beginnend mit Untersuchungen an blutbildenden Stammzellen. Blutbildende Zellen sind besonders leicht zugänglich und haben deshalb bis heute die größte praktische Bedeutung für die angewandte Medizin.

Die Blutbildung findet während der menschlichen Embryogenese in Blutinseln des Dottersacks statt. Mesenchymale Zellen werden zu Angioblasten, die sich später in Endothelzellen umwandeln. Kapillaren werden dadurch gebildet, dass sich die Angioblasten um sogenannte Spalträume gruppieren, wodurch endothelausgekleidete Kanäle entstehen. Durch Aussprossung der Kapillaren und Konfluenz von unabhängig voneinander im Dottersack entstandenen Inseln bildet sich das Kapillarbett. Blutzellen entstehen zu diesem Zeitpunkt aus dem Endothel, sobald sich die ersten Gefäße auf dem Dottersack und Allantois entwickelt haben. Beim Embryo beginnt

die Blutbildung nicht vor dem 2. Monat in der Leber, später ist dann die Milz und zum Zeitpunkt der Geburt das Knochenmark Ort der Blutbildung (Moore, 1980). Bis heute konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die hämatopoetische Stammzelle klonalen Ursprungs ist, also sich nur selbst erneuert (Spermatozytenmodell), oder ob es eine limitierte Anzahl von Stammzellen gibt, die konsekutiv im Laufe des Lebens ausdifferenzieren (Oozytenmodell) (Oshima et al., 2001).

Die Charakterisierung von Stammzellen mit hämatopoetischen Eigenschaften begann im Jahre 1924 mit Maximow, der das Konzept der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (HSC) eingeführt hat. Er postulierte, dass sich alle Blutzellen von einer einzigen Klasse von Vorläuferzellen ableiten. Zwischen 1949 (Jakobsen et al.) und 1951 (Lorenz et al.) wurde durch den praktischen Beweis, dass letal bestrahlte Mäuse durch die Injektion von Knochenmark gerettet werden können, die Basis für das Konzept der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle gelegt. Dieses Konzept wurde fünf Jahre später durch Ford et al. dadurch gefestigt, dass ein einziger chromosomal markierter Zellklon in der Lage war, das hämatopoetische System einer ebenso letal bestrahlten Maus repopulieren zu können. 1961 zeigten Till und McColluch, dass nach strahleninduziertem Knochenmarksversagen auch hämatopoetische Stammzellen aus der Milz die Hämatopoese rekonstruieren können. Dadurch wurde das bis heute gültige Konzept der HSC geprägt, das auf den drei Säulen „Selbsterneuerung“, „Differenzierung in alle Zelllinien“ und „Repopulierung von Knochenmark“ beruht.

1963 zeigte Becker zusammen mit den Autoren Till und McColluch, dass eine einzelne klonogene Zelle zur Bildung einer einzigen Milzkolonie („spleen colony“) führt. Diese Milzkolonie wurde als das früheste und homogene Kompartiment der Hämatopoese angesehen. Grundlagenbiologisch musste dieses Konzept zwar in vielen Punkten ergänzt und auch korrigiert werden, doch klinisch ist es die Grundlage für die Knochenmarkstransplantation (Vos & Ploemacher 1991).

Die Charakterisierung von hämatopoetischen Zellen gemäß Größe, Dichte und Efflux eines Farbstoffs wie z. B. Rhodamin 123 oder Hoechst 33342 führte zur Erstbeschreibung der HSC in einer Maus. Diese Zelle trägt das Oberflächenantigen Sca-1 und hat eine geringe Expression des Antigens Thy-1. Wie allen blutbildenden Stammzellen fehlen auch ihr hämatopoetische Oberflächenantigene (Lineage negative = lin-) (Muller-Sieburg et al. 1986). Solche Zellen

kommen ungefähr mit einer Frequenz von 0,05% im Knochenmark vor (Uchida & Weisman, 1992).

Die zunächst in der Maus beschriebene hämatopoetische Stammzelle ist im Menschen durch das Vorhandensein des Glykosaminoglykans CD34 definiert (siehe Kapitel 1.2.). Weitere charakteristische Eigenschaften dieser hämatopoetischen Stammzelle sind einerseits das Fehlen von HLA-DR, einem Klasse II Molekül des „Major Histocompatibility Complexes“ (MHC), andererseits das Fehlen von anderen Oberflächenmolekülen (lin^-). Während der hämatopoetischen Differenzierung kommt es allerdings sehr bald zur Expression des Oberflächenproteins DR, wobei diese DR^+ Zellen noch in der Lage sind, alle Zellreihen zu generieren (Srouf et al. 1991). In der Vergangenheit konnte generell eine Vielzahl von Antigenen identifiziert werden, die mit reifen hämatopoetischen Zellen assoziiert sind, doch die Tatsache, dass hämatopoetische Vorläuferzellen lin^- sind, also kein bekanntes Oberflächenmolekül besitzen, machte es schwierig, Stammzellen oder deren Vorläufer zu finden. Es musste also ein Oberflächenmolekül gefunden werden, das eine positive Selektion für hämatopoetische Stammzellen ermöglichen würde. Das Ergebnis dieser Suche war das Epitop CD34. Civin et al. gelang schließlich im Jahre 1984 mit der Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen CD34 auf der Leukämiezelllinie KG1a ein großer Durchbruch. Es war nun möglich, hämatopoetische Stammzellen mittels einfacher molekularbiologischer Methoden zu finden. Die Funktion des Sialomucins CD34 ist bis heute nicht bis ins Detail verstanden (siehe Kapitel 1.2.).

1988 konnten Berenson et al. durch die positive Selektion auf Knochenmarkszellen, die das Sialomucin CD34 tragen, letal bestrahlte Affen retten. Damit war das viele Jahre gültige Konzept, dass die Hämatopoese mit CD34 assoziiert sein müsse, etabliert. Der Möglichkeit einer positiven Selektion für hämatopoetische Stammzellen kommt auch eine wichtige praktische Bedeutung zu. Bei der Transplantation von komplettem Knochenmark ist es notwendig, eine relativ große Menge an Zellen zu transplantieren, um ein Anwachsen des Spenderknochenmarks zu gewährleisten (Areman et al., 1992). Die hohe Zellzahl von bis zu $1,2 \times 10^8$ kann vor allem für Patienten der Pädiatrie ein Problem darstellen, wäre man nicht in der Lage, durch positive Selektion das Volumen des Transplantats gering zu halten. Ein weiterer Vorteil der positiven Selektion für hämatopoetische Stammzellen durch CD34 ist die Reduktion der Gefahr einer Spender-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Reaktion). Nachdem eine Kontamination des Transplantats mit T-Lymphozyten die Gefahr der Spender-gegen-Wirt-Reaktion steigen lässt

(Deeg et al., 1990; Hood et al., 1987), ist eine gezielte Isolation von $CD34^+$ HSC von großem Vorteil. Dennoch kann man die Kontamination des Transplantats mit T-Lymphozyten bis heute nicht ganz verhindern. Dank verschiedener therapeutischer Konzepte gegen die Graft-versus-Host-Disease war jedoch trotzdem schon bald der routinemäßige Einsatz der Knochenmarkstransplantation möglich (Storb et al., 1986).

Der größte Prozentsatz an $CD34^+$ Zellen herrscht im Knochenmark vor, doch können $CD34^+$ Zellen auch aus dem peripheren Blut nach Mobilisation mit Wachstumsfaktoren gewonnen werden. Da die Zellphärese die Prozessierung einer großen Menge Blut ermöglicht, kann heutzutage mit Hilfe von Chemotherapie und Wachstumsfaktor eine größere Menge an $CD34^+$ Zellen aus dem peripheren Blut gewonnen werden als früher (Bender et al., 1994). Diese Zellen des peripheren Blutes sind ebenso zur hämatopoetischen Rekonstitution geeignet wie die des Knochenmarks, was sowohl an Ratten (Brecher & Conkrite, 1951), als auch am Hund (Storb et al. 1968) gezeigt werden konnte.

Das Postulat, dass nur $CD34^+$ Zellen mit der Hämatopoese assoziiert sind, musste korrigiert werden, als Baumheuter et al. 1993 entdeckten, dass CD34 auch auf vaskulärem Endothel und Stromazellen vorhanden ist und dass es L-Selectin von Leukozyten in vitro bindet.

Huang und Terstappen publizierten 1992, dass eine einzige fetale $CD34^+$, DR^- , $CD38^-$ Stammzelle in eine $CD34^-$ stromale Zelle und eine $CD34^+$ hämatopoetische Zelle differenzieren könne. 1994 mussten sie ihre Beobachtung zwar korrigieren, doch Huss et al. zeigten ein Jahr später, dass eine aus dem Knochenmarksstroma abgeleitete monoklonale $CD34^-$ Zelle in eine $CD34^+$ Zelle differenzieren kann. Diese hatte hämatopoetische Eigenschaften und besaß die Fähigkeit, Kulturen mit Wachstum über einen langen Zeitraum zu bilden.

Ogawas Konzept von 1993, dass hämatopoetische Stammzellen (HSC) nach der Geburt im Knochenmark verbleiben und nur in niedriger Konzentration im peripheren Blut zirkulieren, wurde durch Baum et al. im selben Jahr dadurch ergänzt, dass die klassisch definierten HSC nur einen Teil der zur Hämatopoese befähigten Zellen darstellen. 1996 konnte Ogawa zeigen, dass eine Langzeitrepopulation durch eine einzige *stromale* $CD34^{low}$ Vorläuferzelle möglich ist.

Lange et al. beobachteten 1999, dass die hämatopoetische Rekonstitution in einem Mausmodell durch einen aus dem peripheren Blut etablierten $CD34^-$ (negativen) Stammzellklon möglich ist. Im selben Jahr entdeckten Satt und seine Kollegen, dass die Expression von CD34 auf

hämatopoetischen Stammzellen reversibel ist. Im Jahr 2000 legten Huss und seine Mitarbeiter dar, dass CD34^{-/low} hämatopoetische Stammzellen aus dem peripheren Blut mit der Fähigkeit zur Plastikadhärenz auch Charakteristika von mesenchymalen Stammzellen besitzen.

Die mesenchymale Stammzelle wurde lange Zeit der hämatopoetischen Stammzelle konzeptionell gegenüber gestellt, was mit dieser Absolutheit nun nicht mehr so gesehen werden kann. Aber was sind mesenchymalen Stammzellen?

Friedenstein beschrieb 1980, dass mesenchymale Stammzellen sich erneuern können und Zellen hervorbringen, die in die verschiedenen Linien des Bindegewebes differenzieren können. 1985 beschrieb Maureen Owen als erste das stromale Zellsystem, welches aus den die Hämatopoese unterstützenden stromalen Zellen des Knochenmarks und aus den mesenchymalen Stammzellen besteht. Zu den letztgenannten werden die Vorläuferzellen von Osteozyten, Chondrozyten, Tenozyten, Adipozyten und glatten Muskelzellen gezählt (vgl. **Abb. 2**).

Huang und Terstappen beschrieben 1992, wie schon erwähnt, mittels Durchflußzytometrie einen gemeinsamen Vorläufer von mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen, was durch die Ergebnisse von Waller et al. modifiziert werden musste. Gemäß Huang et al. ist die gemeinsame Vorläuferzelle CD34⁺, CD38⁻ und HLA-DR⁻. Waller et. al konnten jedoch diese Zellpopulation in CD34⁺/CD50⁻ Zellen, die mesenchymalen Vorläuferzellen und in CD34⁺/ CD50⁺ Zellen, die hämatopoetischen Vorläuferzellen unterteilen. Somit war bewiesen, dass in vivo auch mesenchymale Stammzellen CD34 exprimieren können. Pittenger et al. zeigten 1999, dass ex vivo expandierte mesenchymale Stammzellen CD34 nicht auf der Oberfläche tragen. Simmons et al. entdeckten 1994 den Stro-1 Antikörper, dessen Substrat bisher aber noch nicht aufgeklärt werden konnte. Genannter Antikörper bindet an Zellen, die mit CFU-F Aktivität im adulten Knochenmark assoziiert sind (Simmons et al., 1991a und b). Diese Zellpopulation kann mit den von Huang und Terstappen beschriebenen fetalen, stromalen Leber-Vorläuferzellen verglichen werden. Im adulten Knochenmark ist Stro-1 und CFU-F Aktivität mit reduzierter Expression von CD34 verbunden. Geringe CFU-F Aktivität wurde auch bei Zellen gefunden, die CD34 nicht auf der Oberfläche tragen.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass CD34 nicht als ein eindeutiger Marker für mesenchymale Stammzellaktivität bei adulten, humanen Stammzellen dienen kann. Auch die lange Zeit postulierte absolute Assoziation von CD34 mit der Hämatopoese kann, wie beschrieben, nun nicht mehr gelten. Die Beziehung zwischen mesenchymalen und

hämatopoetischen Stammzellen ist trotz intensiver Forschung noch nicht eindeutig geklärt (Deans et al., 2001). Diese Arbeit soll einige Aspekte dieser Fragestellung aufgreifen. Das nächste Kapitel beschäftigt sich mit verschiedenen Aspekten des in der Stammzellforschung so bedeutenden Epitops CD34.

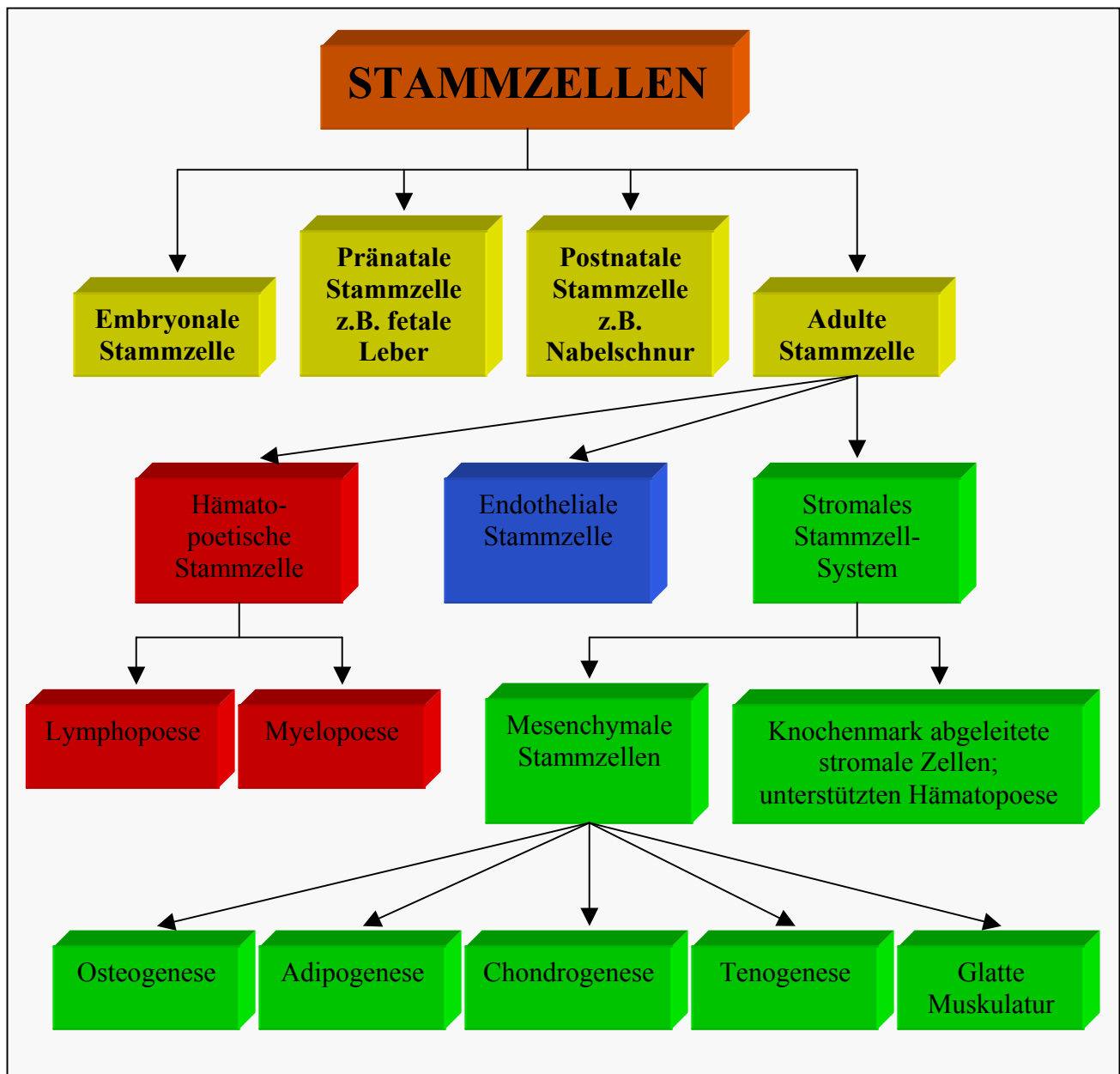


Abb. 2: Übersicht über die Einteilung von Stammzellen

1.2. Der Marker für Hämatopoese CD34

CD34 ist ein Oberflächenglykoprotein, das von frühen lymphohämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, Endothelzellen und embryonalen Fibroblasten exprimiert wird (Civin et al. 1984, Katz et al. 1985, Andrews et al. 1986, Krause et al. 1994). CD34⁺ (positive) Knochenmarkszellen stellen einen Anteil von nur 1,5% der mononukleären Zellen im Knochenmark dar (Loken et al., 1987). Durch den Nachweis ihrer Eigenschaft, alle lymphohämatopoetischen Linien in Mäusen, Primaten und Menschen nach myeloablativer Therapie rekonstituieren zu können, konnte bewiesen werden, dass CD34⁺ Zellen die Vorläufer der Hämatopoese und Lymphopoese sind (Berenson et al. 1988, Wagemaker et al. 1990). Die CD34⁺ Fraktion des Knochenmarks besteht bezüglich der Morphologie vor allem aus blastären Zellen, während die CD34⁻ Fraktion hämatopoetische Vorläuferzellen in verschiedenen Stadien der Reifung enthält (Krause et al. 1996). CD34⁺ Zellen haben ihre klinische Anwendung in der Transplantation und limitiert auch in der Gentherapie (Baumhueter et al., 1993, 1994; Sutherland et al., 1992).

Trotz der Bedeutung von CD34 ist dessen Funktion noch nicht vollständig verstanden. Es ist aber nachgewiesen, dass CD34-angereicherte Zellen aus Knochenmark oder Nabelschurblut, im Gegensatz zu nichtangereicherten Zellen, bis zu hundertfach mehr Kolonie-bildende Einheiten (Colony forming units, CFU) besitzen (Strauss et al. 1986). 200 CD34⁺ Zellen reichen aus, um eine letal bestrahlte Maus erfolgreich zu repopulieren (Krause et al. 1994). Auch bei anderen Spezies wurden Transplantationen mit CD34⁺ Zellen durchgeführt (Wagemaker et al., 1990). Die Gene für humanes, canines und für CD34 von Mäusen wurden entschlüsselt (Simmons et al. 1995, McSweeney et al., 1998).

Sicherlich nur ein Teilaspekt der Funktion von CD34 ist bei endothelialen Zellen das „Homing“ von Leukozyten bei Entzündung, aber auch die Lokalisation und Adhäsion von Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark (Delia et al., 1993; Fackler et al., 1992). Vermutlich ist es auch von Bedeutung bei der Konservierung des Stammzellphänotyps von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Würden alle Zellen ausdifferenzieren, wäre der Stammzellpool bald aufgebraucht und somit keine Stammzellen, sondern nur noch reife Zellen vorhanden (Majdic et al., 1994).

Obwohl die genaue Funktion von CD34 noch nicht geklärt ist, kommt es klinisch schon zu einer breiten Anwendung. CD34 wird als Marker für die Leukämiediagnostik und deren Klassifikation verwendet. CD34 wird darüber hinaus bei der Quantifizierung von Stamm- und Vorläuferzellen

in Blut und Knochenmark genutzt, sowie als Ziel für die immunologische Purifikation von Stamm- und Vorläuferzellen für die klinische Transplantation. Die positive Selektion für Zellen mit CD34, auch unter der Berücksichtigung weiterer Antigene wie CD38 oder CD138, bietet die Möglichkeit, die Wahrscheinlichkeit der Reinfusion okkulten Krebszellen aus dem Knochenmark des autologen Spenders zu reduzieren. Die positive Selektion für Zellen mit CD34, auch unter der Berücksichtigung weiterer Antigene wie CD38 oder dem Plasmazellmarker CD138, bietet die Möglichkeit die Wahrscheinlichkeit der Reinfusion okkulten Krebszellen aus dem Knochenmark des autologen Spenders zu reduzieren. Dies wurde zum Beispiel an Patienten, die am Multiplen Myelom erkrankt waren, mit dem Ziel der Reduktion von Verunreinigung durch Plasmazellen untersucht (Patriarca et al. 2000; Silvestri et al., 1993).

Ob eine Dysregulation der Expression von CD34 eine Rolle in der Leukämogenese spielt, ist nicht genau geklärt. Ungefähr 40% der akuten myeloischen Leukämien (AML) exprimieren CD34 (Soligo et al. 1991, Vaughan et al. 1988, Geller et al. 1990). Bei der AML korreliert die Expression von CD34 mit bestimmten biologischen Eigenschaften. Fast alle AML Fälle mit t(8/21) Translokation [French-American-British (FAB) M2] exprimieren CD34, HLA-DR und zu einem geringen Grad CD19. Die AML-Fälle mit dem t(8/21) Karyotyp haben eine relativ gute Prognose. Ein weiterer Subtyp der AML mit relativ guter Prognose ist die FAB M4Eo mit dem Inversion 16 Karyotypus (inv16), die CD2 und CD34 koexprimiert. CD34 wird auch zu einem hohen Prozentsatz bei der AML mit myelodysplastischen Eigenschaften und Karyotypus, sowie bei der AML, die durch alkylierende Substanzen verursacht wurde, exprimiert. Ein Anstieg von CD34⁺ Zellen im Knochenmark von Patienten mit Myelodysplasie kann als objektives Maß für die Prognose einer Blastenkrise genutzt werden (Guyotat et al. 1990). Die Subtypen der AML, die mit Myelodysplasie einhergehen, haben eine schlechte Prognose. Da CD34 bei AML Subtypen mit guter und mit schlechter Prognose einhergeht, kann man bei CD34 nicht von einem unabhängigen Prognosefaktor reden.

Bei AML-Fällen mit einem unreifen Phänotypus, wie z. B. der FAB M1 und der terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase-positiven AML, ist eine Assoziation zu CD34 vorhanden. Weiterhin ist CD34 zu etwa 70% mit der kindlichen B-Linien ALL assoziiert und korreliert mit einer guten Prognose (Pui et al. 1993). Dagegen hat aber nur ein kleiner Teil der T-Linien ALL eine Expression von CD34. Bei chronisch lymphoproliferativen Erkrankungen und malignen Lymphomen lässt sich CD34 nicht auf den malignen Zellen nachweisen (Silvestri et al. 1992).

Bei der AML korreliert die Expression von CD34 sehr stark mit der Expression des „multiple drug resistance“ (MDR) P-Glykoproteins (Campos et al. 1992). Sowohl normale CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen als auch CD34⁺ Leukämiezellen (AML) haben ein höheres Apoptoseresistenzprofil, bedingt u.a. durch die Expression von P-Glykoprotein und der Aldehyd-Dehydrogenase, die dem Schutz vor antineoplastischer Chemotherapie dienen (van Stijn et al., 2003; Wang et al., 2001).

Im nächsten Kapitel wird ein weiteres Oberflächenprotein besprochen, das Endoglin (CD105), dem derzeit eine besondere Bedeutung in der Stammzellforschung und der angewandten Medizin zukommt.

1.3. Der mesenchymale Marker Endoglin (CD105)

Endoglin (CD105) ist ein Zellmembranglykoprotein und wird in proliferierenden endothelialen Zellen in der Kultur und auf den endothelialen Zellen angioneogenetischer Blutgefäße benigner und maligner Tumoren überexprimiert. CD105 bindet Faktoren der Wachstumsfaktorenfamilie „Transforming Growth Factor“ (TGF)- β , wobei eine Überexpression von Endoglin die zelluläre Antwort auf TGF- β 1 moduliert. CD105 hat also eine entscheidende Bedeutung als Marker der Angiogenese, in der Pathogenese von vaskulären Erkrankungen und für die Tumorprogression (Fonsatti et al. 2001).

TGF- β , der Effektor an Endoglin, ist ein pleiotropes Zytokin, das zelluläre Funktionen reguliert wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Synthese extrazellulärer Matrix und Hämatopoese (Massagué, 1990; Derynck et Feng, 1997). Zusätzlich steuert es die Funktionen der Vaskulogenese und der Wundheilung. TGF- β besteht aus drei verwandten dimeren Proteinen: TGF- β 1, - β 2, und - β 3. Zu deren Superfamilie gehören auch Moleküle wie Activine, Inhibine und Bone Morphogenic Protein (BMP) (Massagué, 1990). Ihre intrazelluläre Signalkaskade wird durch transmembrane Serin-/Threoninkinase Rezeptoren Typ I und II vermittelt (Derynck und Feng, 1997).

Endoglin ist ein homodimeres transmembranöses Glykoprotein (180 kDa), bestehend aus durch Disulfid-Brücken verbundene Untereinheiten (95 kDa) (Gougos und Letarte, 1988), welches eine

akzessorische Komponente des TGF- β -Rezeptor-Komplexes darstellt (Lastres et al., 1996; Barbara et al., 1999). Es binden nur 1% der Endoglin Moleküle auf endothelialen Zellen TGF- β (Cheifetz et al., 1992), weil Endoglin mit den weiteren Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie Activin-A, BMP-7 und BMP-2 interagiert (Barbara et al., 1999).

Man weiß, dass TGF- β einige zelluläre Funktionen moduliert (Lastres et al., 1996; Guerrero-Esteo et al., 1999; Li et al., 2000a). Zu diesen Funktionen gehört die Regulierung der c-myc-mRNA auf ein niedrigeres Niveau und die homotypische Aggregation. Die homotypische Aggregation ist die Adhäsion von Leukozyten oder Tumorzellen an schon an die Gefäßwand angeheftete Leukozyten oder Tumorzellen. TGF- β stimuliert die Fibronektinsynthese, zelluläre Adhäsion und die Phosphorylierung des Platelet-Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule-1 (PECAM-1) (Lastres et al., 1996). Dies wurde durch stabile Transfektion von U-937 monozytischen Leukämiezellen mit cDNA erkannt, die für L- oder S-CD105 kodieren. Es stellt sich nun die Frage, auf welchen Zellen CD105 physiologisch exprimiert wird.

CD105 ist vor allem im vaskulären System und im Bindegewebe präsent. Darüber hinaus ist es stark auf Synzythiotrophoblasten der Plazenta (Lastres et al., 1992; Wang et al., 1993) und auf vaskulären Endothelzellen vorhanden (Gugos und Letarte, 1988; Wang et al., 1993; Burrows et al., 1995; Miller et al., 1999). So wird es auch nur schwach auf hämatopoetischen Zellen (Lastres et al., 1992; O'Connell, et al., 1992; Rokhlin et al., 1995; Robledo et al., 1996), stromalen Zellen (Rokhlin et al., 1995), Fibroblasten (Gougos und Letarte, 1988; Robledo et al., 1996) und auf vaskulären glatten Muskelzellen (Adam et al., 1998) exprimiert. Bei näherer Betrachtung der Verhältnisse in hämatopoetischen Zellen ist Endoglin auf Pro-B- und Prä-B- Leukämiezellen vorhanden. Hingegen fehlt es auf reifen B- und T-Zellen. Endoglin scheint auf aktivierten Monozyten, einigen myeloiden und erythroiden Zelllinien vorhanden zu sein (Gougos und Letarte, 1988; Lastres et al., 1992), hingegen fehlt es auf Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten und Plättchen des peripheren Bluts. Rokhlin vertritt die Hypothese, dass Endoglin eine physiologische Rolle in der Stroma-Hämatopoese- Interaktion während der Entwicklung spielt (Rokhlin et al., 1995). Pierelli konnte durch Untersuchungen von Endoglin im mobilisierten Spenderblut einen weiteren Baustein zum Verständnis der physiologischen Rolle von Endoglin liefern. 1999 zeigte er, dass im stammzellmobilisierten Spenderblut eine CD34⁺/CD105⁺ Zellpopulation vorhanden ist. Diese Zellen befinden sich vorwiegend in der G₀-Phase des Zellzyklusses und weisen weitere Stammzeleigenschaften auf, wie z.B. die erhöhte Potenz zur Initiierung von Langzeitkulturen (Long-term-culture-initiating cell (LTC-IC)). Diese

CD34⁺/CD105⁺ Zellen haben laut Pierelli et al. die biologischen Eigenschaften von primitiven Vorläuferzellen (Pierelli et al. 1999).

Solide Tumore verschiedenster Histotypen reagieren mit Anti-Endoglin-Antikörpern fast ausschließlich in deren venösen und arteriellen Endothel, sowohl des peritumoralen als auch des intratumoralen Gefäßsystems (Wang et al., 1993; Burrows et al., 1995; Seon et al 1997a; Bodey et al., 1998a und b.). Besonders die Blutgefäße im Gewebe um den Tumor färben sich mit einem anti-CD105- Antikörper stark an, wohingegen sich große Blutgefäße und Gefäße in normalem Gewebe nicht anfärben. Somit ist CD105 auch ein starker Indikator für die Tumorneoangiogenese.

Das nichttumorale Gefäßsystem färbt sich nicht mit einem anti-CD105-Antikörper an. Die Antikörper gegen Endoglin färben nur schwach das Stroma von Ovarialkarzinomen (Henriksen et al., 1995), von Mammakarzinomen (Fonsatti et al., 2000) und die Tumorstromakomponente von ovariellen endometrioiden Karzinomen an. Immunohistochemische Untersuchungen von intradermalen Nävi, sowie primären und sekundären Melanomen zeigten eine Positivität für den anti-CD105 mAb MAEND3 Antikörper in den jeweiligen Tumoren zu 50%, 25% und 34% (Altomonte et al., 1996).

Tumor Histotyp	Expression (positiv/getestet)	
	Vasculär	Zellulär
Angiosarkom	2/2	1/2
Astrozytom	9/9	0/9
Colorektales Karzinom	6/6	0/6
Endometriumkarzinom	3/3	0/3
Fibrosarkom	2/2	1/2
Magenkarzinom	6/6	0/6
Leiosarkom	3/3	1/3
Leberkarzinom	4/4	0/4
Mammakarzinom	30/30	0/30
Meningiom	2/2	1/2
Neurofibrosarkom	3/3	0/3
Nicht-kleinzell. Lungenkarzinom	9/9	0/9
Osteosarkom	6/6	0/6
Ovarialkarzinom	10/10	0/10
Nierenkarzinom	9/9	0/9
Synoviakarzinom	2/2	0/2

Tab. 1: Übersicht über die in vivo Verteilung von CD105 auf primär soliden Tumoren verschiedener Histotypen nach (Fonsatti et al., 2001)

Was die Leukämien anbelangt wurde gezeigt, dass CD105 immer auf stammzellabgeleiteten Erkrankungen wie refraktäre Anämie mit Blastenexzess (Myelodysplastisches Syndrom) und chronisch myeloischen Leukämien zu finden ist (LoPardo et al., 1997). CD105 wird zu 47% in der de novo AML, zu 82% in der B-ALL und zu 7% in der T-ALL exprimiert. Zusammenfassend lässt sich, begründet durch morphologische und immunophänotypische Studien sagen, dass CD105 immer von den unreiferen AML-Subtypen und nie von den reiferen AML Subtypen exprimiert wird. Dabei stützt sich die Aussage, dass CD 105 auf den unreifen AML-Subtypen exprimiert wird, auf folgende drei Erkenntnisse (Fonsatti et al., 2001):

1. Nach der FAB Klassifikation ist das Fehlen von CD105 auf die Promyelozytenleukämie beschränkt, ein Subtyp, der klassischer Weise durch seine CD34-Negativität bestimmt wird.
2. CD105 ist nach immunophänotypischen Untersuchungen eher auf dem CD7 Subtyp (50%), als auf den CD14-positiven Fällen vorhanden (12%).
3. Die Expression von CD105 korreliert in AMLs mit sehr frühen Antigenen wie CD34, CD117 (c-kit) und CD126 (Il-6 Rezeptor).

77% der Pro-B-ALLs tragen CD105. In der gewöhnlichen ALL sind es 84%. In Prä-T-ALLs konnte in 27% der Fälle CD105 nachgewiesen werden, wohingegen die reife T-Zell-ALL das Antigen nicht trägt (Fonsatti et al., 2001).

Typ	Subtyp	Positiv/Getestet
AML		97/207
	AML-M1	23/65
	AML-M2	40/85
	AML-M3	0/43
	AML-M4	22/82
	AML-M5	6/19
	AML-M6	3/6
	AML-M7	3/4
B-ALL		190/239
	Pro-B	14/18
	common	176/208
	B	0/13
T-ALL		3/46
	Prä-T	3/11
	T	0/35

Tab. 2: Übersicht über die CD105 Positivität bei Leukämien nach FAB Klassifikation (Fonsatti et al., 2001)

CD105 kann auch in löslicher Form (sCD105) in den Seren Gesunder und in den von Krebspatienten nachgewiesen werden (Wang et al., 1994a). Die Quantifizierung des sCD105 in Gesunden und Brustkrebspatientinnen lässt den Schluss zu, dass die Messung von sCD105 dazu dienen kann, das Risiko der Metastasenbildung zu bestimmen. sCD105 ist in Krebspatientinnen mit Metastasen erhöht (Li et al., 2000). Auch können erhöhte Spiegel von sCD105 bei einem metastasierten Melanom nachgewiesen werden (Fonsatti et al., 2001).

Tumorstadium und Metastasierung sind zwingend abhängig von der Angiogenese (Folkman, 1989; Bouck et al., 1996). Endothel in normalem Gewebe exprimiert eine viel geringere Intensität von CD105 als vaskuläres Endothel von sich regenerierendem und entzündetem Gewebe oder Tumoren (Wang et al., 1994b; Seon et al., 1997a; Bodey et al., 1998a und b; Miller et al., 1999).

CD105 spielt auch eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von Stammzellen. So konnten Cho et al. in embryonalen Stammzellen (ES) zeigen, dass in vitro die hämatopoetische Kommitierung von Flk⁺ mesodermalen Vorläuferzellen durch die Expression von CD105 charakterisiert ist (Cho et al. 2001). Pierelli et al. zeigten hingegen schon 1999, dass zwar CD34⁺/CD105⁺ Zellen eine viel geringere Kapazität zur Bildung von GM-CFU und BFU-E haben als CD34⁺/CD105⁻ Zellen, aber ein viel effizienteres Klonen ermöglichen. Auch waren signifikant mehr LTC-IC zu finden. Als man entdeckte, dass der seit langer Zeit etablierte Marker für mesenchymale Stammzellen SH-2 identisch mit CD105 war, musste man die Rolle von Endoglin in der Stammzellentwicklung überdenken.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei weitem noch nicht alle Funktionen von Endoglin aufgeklärt sind. Doch scheinen einige experimentelle Ergebnisse vielversprechend für eine klinische Anwendung zu sein. Deshalb wird Endoglin derzeit intensiv beforscht, um diagnostische, prognostische und bioimmunotherapeutische Möglichkeiten bei malignen Erkrankungen zu erkennen und diese Erkenntnisse in der angewandten Medizin einzusetzen.

1.4. Das P-Glykoprotein

Die Entwicklung einer Multiresistenz (Multi Drug Resistance, MDR) ist ein großes Problem in der chemotherapeutischen Krebsbehandlung des Menschen. Davon betroffen ist die Behandlung von Kolon-, Nieren- und Brustkrebs sowie Leukämien und multiplen Myelomen. Neoplasien des Kindes werfen das Problem der Multiresistenz häufig auf. Die Tumoren zeigen eine Kreuzresistenz gegen ein breites, aber gut definiertes Spektrum von strukturell nicht verwandten zytotoxischen Medikamenten wie Vinca Alkaloide, Anthracycline, Epipodophyllotoxine und Taxane (Sharom, 1997). Die Untersuchung dieser Mechanismen wird durch die Forschung an Zelllinien stark vorangebracht, die für MDR selektiert werden. MDR⁺ Zellen zeigen einen energieabhängigen Medikamentenefflux. Eine Multiresistenz kann durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden. Eine zentrale Rolle kommt hierbei einem 170 kDa Plasmamembran-Glykoprotein zu, welches unter dem Namen P-Glykoprotein bekannt ist. Seit Anfang der 90er Jahre weiß man von einem zweiten Protein, das unter anderem als Transporter für bestimmte Stoffe aus der Zelle in seiner Funktion dem P-Glykoprotein ähnelt: es heißt „multidrug-resistance-associated protein“ (MRP) (Zaman et al. 1994). Hierbei besteht eine Substratspezifität für bestimmte Stoffe, wobei z.B. der Farbstoff Rhodamin 123 nur von dem P-Glykoprotein, nicht aber vom MRP transportiert werden kann (Feller et al. 1995).

Das P-Glykoprotein, das als ATP-abhängige Efflux-Pumpe für hydrophobe Medikamente wirken soll, ist auch als Multiresistenztransporter bekannt. Die Expression dieses Proteins in Tumoren geht mit einer schlechten Gesamtprognose und mangelndem Ansprechen auf eine Chemotherapie einher. Sogenannte „Chemosensitizer“ sollen diesen Effekt aufheben und werden mit Chemotherapeutika kombiniert.

Das P-Glykoprotein wird in vielen gesunden menschlichen Geweben gefunden, darunter in der apikalen Oberfläche vieler epithelialer und endothelialer Zellen und in der Blut-Hirn-Schranke. Die physiologische Funktion ist bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. Doch scheint das P-Glykoprotein in den Schutz vor natürlich vorkommenden Toxinen involviert zu sein.

Durch Sequenzanalyse des P-Glykoproteins konnte man das Protein zu der Superfamilie der ABC (ATP-Binding Cassette) Transporter zuordnen, die auch als „Traffic“ ATPasen bezeichnet werden. Der typische ABC-Transporter besteht aus vier Einheiten: zwei membrangebundenen Domänen mit je sechs transmembranösen (TM) Segmenten sowie zwei nukleotidbindenden Domänen (NBD), die ATP binden und es hydrolysieren. Das typische Substrat dieses Transporters sind große, hydrophobe und amphipatische Stoffe mit einem planaren Ringsystem,

welche oft eine positive Ladung bei physiologischen pH haben. Doch weiß man, dass viele ungeladene Stoffe, wie zum Beispiel Colchizin oder lineare Stoffe dem P-Glykoprotein als Substrat dienen können. Mögliche Erklärungen sind, dass das P-Glykoprotein sein Substrat nicht direkt ausschleusen kann, sondern dass durch Änderung des pH-Wertes oder der Membranladung der multiresistenten Zellen sich indirekt die Verteilung zwischen Intra- und Extrazellularraum verändert. Da es sich bei dem Substrat des P-Glykoproteins hauptsächlich um hydrophobe Stoffe handelt, die sich nicht in der wässrigen externen Phase sondern in der Lipid-Doppelmembran der Zelle verteilen, schlugen Higgins und Gotesman ein Modell vor, bei dem eine relativ unspezifische Seite des P-Glykoproteins Fremdstoffe in der Lipid-Doppelmembran in Abhängigkeit von ihrer Lipidlöslichkeit erkennen und dann ausschleusen kann. Die fettlöslichen Fremdstoffe reichern sich in der Membran an und können somit im Vergleich zu Stoffen in der wässrigen Phase einen günstigeren Verteilungskoeffizienten aufweisen und somit leichter ausgeschleust werden. Dieses Modell wird durch den Nachweis von spezifischen Bindungskurven des P-Glykoproteins mit Fremdstoffen kontrovers diskutiert.

Trotz verschiedener Modelle zur Wirkungsweise des P-Glykoprotein ist eindeutig geklärt, dass das P-Glykoprotein durch aktiven Transport einen Plasmagradienten bildet. Dies konnte an Membranvesikeln von Ovarien chinesischer Hamster nachgewiesen werden (Doige et al., 1992).

Zusammenfassend kann man sagen, dass das P-Glykoprotein eine atypische ATPase mit niedriger Affinität für ATP und hoher konstitutiver ATPase Aktivität darstellt. Es hat eine ungewöhnlich breite Spezifität für hydrophobe Substanzen, darunter sind viele Chemotherapeutika. Die Transportstudien haben gezeigt, dass der Transport, welcher die Hydrolyse von ATP benötigt, aktiv ist und einen Substanzgradienten herstellt. Die Bindung von ATP verursacht eine Konformationsänderung im Protein. Es besteht eine direkte Interaktion von unpolaren Substanzen innerhalb der Membran mit dem Transporter, die dieser mit seiner Flippase Funktion von der inneren Seite der Lipid-Doppelmembran zur Außenseite befördert (Sharom et al., 1997).

Das P-Glykoprotein hat eine besondere Bedeutung bei der Charakterisierung von Stammzellen. So wird sein Expressionmuster im Laufe der Differenzierung engmaschig kontrolliert und bietet dadurch einen Ansatz zur Erforschung von Stammzellfunktionen (Bunting et al., 2002). Am stärksten wird P-Glykoprotein und ein weiteres Mitglied der ABC-Transporter-Familie, das „Breast Cancer Resistance Protein“ (BCRP), in primitiven Knochenmarksstammzellen exprimiert, die CD34^{low} oder CD34⁻ sind. In Blasten der AML wurden hohe Spiegel an P-

Glykoprotein gefunden, während es in normalen myelomonozytischen Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Man vermutet die physiologische Funktion des P-Gp bei der Differenzierung darin, dass P-Gp die Apoptose so lange verhindert, bis Zytokine zur Wirkung kommen können und eine Differenzierung eintreten kann. Dies wurde an Untersuchungen durch UV-Bestrahlung, ionisierende Strahlung und Behandlung mit Tumornekrosefaktor nachgewiesen. Behandelt man P-Gp⁺ Zellen mit PSC-833, einem potenten Inhibitor von P-Gp, so wird die Apoptose verstärkt (Bezombes et al., 1998). Weitere Untersuchungen zeigen in P-Gp⁺ AML Zellen, dass die Effekte der P-Gp Expression durch einen reduzierten Gehalt von Sphingomyelin zustande kommen. Dies könnte bedeuten, dass Ceramid ein nachgeschaltetes Intermediat ist, das durch die P-Gp-Aktivität reguliert wird (Pallis et al., 2000). Ceramid ist ein gut untersuchter Mediator der Apoptose und reguliert die Differenzierung in primitiven hämatopoetischen Stammzellen (Maguer-Satta et al., 2000).

Retinoide sind exogene fettlösliche Vitamine, die Substrate von P-Gp darstellen und eine wesentliche Bedeutung in der terminalen Differenzierung von myeloischen Zellen haben. Vitamin A-deprivierte Mäuse entwickeln eine Expansion von myeloischen Zellen und haben niedrigere Spiegel an Apoptose (Kuwata et al., 2000). Die Umkehrbarkeit der Retinsäure-resistenten Proyelozytenleukämie durch Inhibitoren der P-Gp weist darauf hin, dass P-Gp den Metabolismus von Retinsäure beeinflussen kann (Matsushita et al., 1998).

Eine weitere Hypothese basiert auf der Tatsache, dass P-Gp durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden kann, wodurch eine modulierende Rolle der P-Gp Signaltransduktionskaskade möglich wird. Zu dieser Hypothese finden sich derzeit noch widersprüchliche Angaben, die z. B. besagen, dass die Phosphorylierung eine Rolle im Effluxmechanismus von P-Gp spielt.

1.5. Die Farbstoffe Rhodamin 123 und Hoechst 33342

1.5.1. Rhodamin 123

Rhodamin 123 (Rh123) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich selektiv in den mitochondrialen Membranen von vitalen Zellen ansammelt. Die Ursache ist das negative Membranpotential der inneren mitochondrialen Membran. Zellen mit einer hohen Rhodamin 123-Anfärbbarkeit haben größere Mitochondrien (Mulder et Visser, 1985). In Bezug zur

Stammzellforschung spielt Rhodamin 123 eine entscheidende Rolle, denn Studien an humanen Knochenmarkszellen und an Knochenmarkzellen von Mäusen haben gezeigt, dass diese Subpopulationen aufweisen, die eine niedrigere Rh123-Konzentration enthalten. Diese als Rhodamin 123^{low} bezeichnete Subpopulation soll die primitivsten Vorläuferzellen enthalten (Spangrude & Johnson, 1990; Li et al., 1992; Udomsakdi et al., 1991; Srour et al., 1993).

Man unterscheidet zwei Konzepte für die Erklärung der geringeren Anfärbbarkeit der Rhodamin 123^{low} Subpopulationen:

Durch das Anfärben mit Rhodamin 123 wird die mitochondriale Aktivität und damit die gesamte zelluläre Aktivität angezeigt (Johnson et al., 1980). Aus diesem Grund kann Rh123 dazu verwendet werden, Vorläuferzellen zu identifizieren, weil diese per definitionem ruhende Zellen sind (Ploemacher et al., 1988). Es färben sich also Vorläuferzellen weniger mit Rh123 an, denn ihre mitochondriale Aktivität ist im Vergleich zu einer weiter entwickelten Population geringer (Kim et al., 1998).

Das zweite Konzept der geringen Rh123-Anfärbbarkeit beruht auf der Tatsache, dass Rh123 ein Substrat des P-Glykoproteins ist, was man, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, bei Vorläuferzellen finden kann. Dieser zweite Mechanismus erklärt die geringerer Rh123 - Farbstoffkonzentration in Vorläuferzellen (Bertoncello et al., 1985; Chaudhary & Robinson, 1991).

1.5.2. Hoechst 33342

Hoechst 33342 ist ein Farbstoff, der von hämatopoetischen Stammzellen aus der Zelle gepumpt wird. Er hat eine ähnliche Bedeutung, wie das im vorherigen Kapitel beschriebene Rhodamin 123 (Jones et al., 1996; Goodell et al., 1996; Goodell et al., 1997; Goodell et al., 2000). Der Efflux von Hoechst 33342 macht es möglich, eine kleine Subpopulation mit der Bezeichnung „Side-Population“ (SP) zu finden. Hierbei weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass Hoechst 33342 in frühen humanen Stammzellen auch von ABC Transporter ABCG2 aus der Zelle transportiert wird (Scharenberg et al., 2002; Kim et al., 2002).

In Mäusen hatten diese durch den Hoechst 33342 Efflux definierten SP-Zellen phänotypisch und funktional die Eigenschaft von hämatopoetischen Stammzellen. Diese Zellen konnten eine Langzeitrekstitution des Blutes bewirken, obwohl sie nur eine geringe oder keine Expression von CD34 zeigten (Goodell et al., 1996). Die durch Hoechst 33342 identifizierbaren SP-Zellen wurden bei Primaten, aber auch bei Menschen im Knochenmark und in Nabelschnurblut

gefunden (Goodell et al., 2000). Auch in Muskelgewebe sind Zellen vorhanden, die zu einem Efflux von Hoechst 33342 fähig sind (Goodell et al., 1999). Dies sind unter anderem die ersten Hinweise, dass SP-Zellen eine wichtige Rolle bei der Plastizität von Stammzellen spielen.

Das Konzept, dass Hoechst 33342 ein geeignetes Mittel zur Identifikation von Zellen mit Stammzeleigenschaften ist, wird kontrovers diskutiert. Fleming konnte 1993 zeigen, dass eine funktionelle Heterogenität mit dem Zellzyklusstatus von murinen hämatopoetischen Stammzellen assoziiert ist.

1.6 Transkriptionsfaktor Netzwerk

Transkriptionsfaktoren sind Kontrolleinheiten der Transkription, die typischer Weise in zwei Funktionseinheiten unterschieden werden: die basalen Transkriptionsfaktoren und die regulatorischen Transkriptionsfaktoren.

Die basalen Transkriptionsfaktoren sind die kleinsten Funktionseinheiten, die dazu notwendig sind fehlerfreie Transkription von einem minimalen Promoter (z.B. TATA Element) zu garantieren. Von ihnen werden die regulatorischen Transkriptionsfaktoren unterschieden, die an die DNA-Sequenz weiter von der Initiationstelle entfernt binden und das Niveau der Transkription modulieren. Der Effekt ist entweder die Inhibition oder die Initiation der Transkription durch die RNA Polymerase, aber auch die Unterhaltung der Funktion.

Transkriptionsfaktoren arbeiten als Mediatoren in einem Verbund, der als Transkriptionsfaktor Netzwerk bezeichnet wird. Dieses Netzwerk bedarf Eingaben (z.B. VEGF, BMP-4), Rezeptoren (z.B. tie-1), vernetzte Transkriptionsfaktoren (z.B. GATA, ETS) und letztendlich Ausgaben (z.B. PECAM).

Im folgenden Abschnitt werden Mitglieder von Transkriptionsfaktor Netzwerken dargestellt, die für eine Funktionalität von Stammzellen von besonderer Bedeutung sind.

Die **GATA-Transkriptionsfaktorenfamilie** wird in zwei Gruppen eingeteilt: GATA-1, -2, -3 und GATA-4, -5, -6. Erstere wird vorwiegend in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, wo sie die differenzierungsspezifischen Gene für die T-Zell-Reihe, erythroide Zellen und

Megakaryozyten reguliert. GATA-4, -5, -6 ist in verschiedenen mesodermal und endodermal abgeleiteten Geweben vorhanden, zu denen Herz, Leber, Lunge, Gonaden und der Magen gehören (Molkentin, 2000).

Der am besten untersuchte Transkriptionsfaktor mit Bezug zur hämatopoetischen Stammzellforschung ist GATA-1 (Onodera et al., 1997). GATA-1 wurde als erster Transkriptionsfaktor entschlüsselt, der für die terminale Differenzierung von sowohl primitiven als auch definitiven erythroiden Zelllinien notwendig ist (Tsai et al., 1989; Evans et al., 1990). GATA-1 wird sowohl in der erythropoetischen als auch in einigen anderen hämatopoetischen Linien gefunden (Martin et al., 1990; Romeo et al., 1990; Yamamoto et al., 1990). Es ist auch in den Sertoli-Zellen des Hodens vorhanden (Ito et al., 1993; Yomogida et al., 1994).

Die anderen Mitglieder der GATA-Familie sind noch nicht so intensiv beforscht wie GATA-1. Man weiß aber, dass sich GATA-3-defiziente embryonale Stammzellen verstärkt in Adipozyten differenzieren. Mangel an Expression von GATA-2 und GATA-3 ist mit Fettsucht assoziiert (Tong et al., 2000). Eine besonders wichtige Funktion von GATA-3 ist sein essentiell notwendiges Vorhandensein für eine normale Entwicklung von T-Zellen (Taghon et al., 2001).

Die Funktion von GATA-4, -5 und -6 liegt nicht in der Hämatopoese sondern in der Differenzierung von meso- und endodermalen Geweben. GATA-4 wird im Herz, im proximalen und distalen Verdauungstrakt, im Hoden, im Ovar, in der Leber, sowie im viszeralem und parietalem Endoderm gefunden (Arceci et al., 1993; Morrisey et al., 1996). Das Gen von GATA-5 kann bei Erwachsenen im Dünndarm, im Magen und in der Blase gefunden werden. In der embryonalen Entwicklung spielt es eine Rolle in Allantois, Herz, Ausflussbahn, Lungenknospe, Urogenitalkamm, Blase und Verdauungsepithel (Morrisey et al., 1997). Die mRNA von GATA-6 kann im Primitivstreifen, im Allantois, im visceralem Endoderm, im Herz, in den Lungenknospen im Urogenitalkamm, in glatten Gefäßmuskelzellen, in der Epithelialauskleidung des Magens sowie des Dün- und Dickdarms gefunden werden (Morrisey et al. 1996; Suzuki et al., 1997; Narita et al., 1996; Huggon et al., 1997; Davis et al., 2001).

Das „**Bone Morphogenetic Protein-4**“ (**BMP-4**) ist eines von neun strukturell verwandten BMPs, die zur Superfamilie der „Transforming growth factor- β “ (TGF- β) gehören. Das in unserer Arbeit untersuchte BMP-4 ist ein Dimer, welches an einen multichimeren Transmembranrezeptor mit Serine/Threonine-Kinase Aktivität bindet. Obwohl es als Stimulator des Knochenwachstums in erwachsenen Säugetieren entdeckt wurde, hat es weitere wichtige

Funktionen als Signalmolekül in der embryonalen Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystem, der Muskulatur und des Skeletts (Leong und Brickell, 1996). Das klinische Potential von BMP liegt in der Stimulation der Knochenheilung, was sowohl bei Säugetieren (Lindholm et al., 1994), als auch beim Menschen nachgewiesen wurde (Sun et al., 1995). In *Xenopus laevis* konnte nachgewiesen werden, dass die hämatopoetische Stammzelle in diesem Organismus ein durch BMP-4 und weitere Transkriptionsfaktoren getriggertes Derivat des ventralen Mesoderms darstellt (Huber und Zon, 1998). Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen mit Bezug zu humanen Stammzellen, die sich v. a. auf neuronale Differenzierung und Fibroblasten beziehen (Shou et al., 2000; Mohan et al., 1998).

E26 Transformation Specific Proteine (Ets) ist eine Proteinfamilie von evolutionär konservierten Transkriptionsfaktoren, die Gene für zelluläres Wachstum und für zelluläre Differenzierung regulieren. Besonders Makrophagen-, B-Zell- und T-Zell-spezifische Gene werden durch Ets-Faktoren reguliert. Ein Mitglied der Ets Familie ist das DNA-bindende, lymphoid-spezifische Elf-1, das hier untersucht wird. Elf-1 ist involviert in die Embryonalentwicklung (Janknecht et al., 1989; Burtis et al., 1990), in die mitogenen Aktivierung von Zellen (Janknecht et al., 1995), in die Onkogenese (Moreau-Gachelin et al., 1988; Seth et al., 1989) und in die Aktivierung von viralen Genen (Wasylyk et al., 1990).

Eine hohe Konzentration von c-myb wird in unreifen Vorläufern von myeloischen und lymphatischen Zellen beobachtet, während herunterreguliertes c-myb mit terminaler Differenzierung zu einem reifen Stadium einhergeht (Sicurella et al., 2001). Unreife hämatopoetische Vorläuferzellen von Menschen und Affen zeigen eine starke Expression von c-myb (Weston, 1998). Lymphozyten des Thymus und erythroide Zellen weisen ebenfalls hohe Spiegel an c-myb auf, welche aber bei der Ausreifung dieser Zellen wieder fallen (Sheiness & Gardinier, 1984). Behandelt man hämatopoetische Zellen aus dem menschlichen Knochenmark mit c-myb Antisense-Oligonukleotiden kommt es zu einer Inhibition der zellulären Proliferation (Gewirtz & Calabretta, 1988). Aus der Funktion von c-myb kann auch die Funktion des zellulären Homologon v-myb abgeleitet werden (Gonda, 1998). Das v-myb ist ein Onkogen, dass von dem Virus AMV (Avian Leukämie Virus) und E26 getragen wird. AMV ruft eine AML hervor, wohingegen E26 eine erythroide Neoplasie verursacht (Gonda, 1991).

Porphobilinogen Deaminase [(PBGD), auch Hydroxymethylbilan Synthase genannt] ist das dritte Enzym in der Synthese des Tetrapyrrolrings Häm, wobei das Gen in zwei Isoformen exprimiert wird. Die eine Form wird als „housekeeping“ Form bezeichnet und ist in allen Zellen vorhanden, die andere kommt nur in erythroiden Zellen vor (Raich et al., 1986; Grandchamp et al., 1987; Sassa et al., 1990; Chretien et al., 1988). Bei einer Mutation im PBGD-Gen kommt es zur autosomal dominant vererbten Krankheit „akute intermittierende Porphyrie“ (Deybach und Puy, 1995). Die Krankheit äußert sich in gelegentlichen Attacken von Abdominalschmerz und verschiedenen neuropsychiatrischen Symptomen (Kauppinen & Mustajoki, 1992; Kappas et al., 1995). Da es sich bei PBGD um ein hochkonserviertes Gen handelt, wird es in der sogenannten „Taqman RT-PCR“ als „housekeeping“-Gen verwendet. Weil das PBGD Gen nicht transkriptional und translational reguliert wird, lässt es sich als Referenz RNA Menge verwenden, die dann eine semiquantitative Aussage erlaubt (Fink et al., 1998; Mensink et al., 1998).

Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 [(PECAM-1), oder CD31] ist ein 130-kDa Protein der Ig-Familie, das auf der Oberfläche von zirkulierenden Plättchen, Monozyten, Neutrophilen und einigen T-Zell-Untergruppen exprimiert wird. Es ist außerdem ein wichtiger Bestandteil bei der interzellulären Verbindung von Endothelzellen. Wegen seines Expressionsmusters werden PECAM-1 Funktionen wie transendotheliale Migration von Leukozyten, Angiogenese und Integrinaktivierung zugeschrieben (Newman, 1990, 1997, 1999). Eine weitere Funktion mit klinischer Relevanz ist die Tatsache, dass PECAM-1 Tyrosin phosphoryliert, sobald Endothelzellen physiologischem Stress durch Flüssigkeitsscherkräfte ausgesetzt sind (Fujiwara et al. 2001). Watt und Gschmeisser haben 1995 gezeigt, dass PECAM-1 neben diesen genannten Eigenschaften auch eine Bedeutung in den hämatopoetischen Vorläuferzellen bezüglich deren Reifung und Differenzierung zukommt. Diese liegt in der Reifung und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen. PECAM-1 ist darüber hinaus für das sogenannte „homing“ von hämatopoetischen Vorläuferzellen zuständig, die mit Hilfe von PECAM-1 das spezielle Mikromilieu des Knochenmarks finden. Nur dort sind sie in der Lage, die Hämatopoese rekonstituieren zu können (Yong et al., 1998; Chan & Watt, 2001).

Tyrosinkinase Tie-1 (Tie-1) ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase und wird vor allem in endothelialen Zellen exprimiert (Tsiami et al., 2000). Sie dient der Angiogenese und der Reifung

von Gefäßen (Merenmies et al., 1997). Dabei wird Tie-1 vor allem in den späteren Stadien der Angiogenese aktiv. Kommt es zu einer Schädigung des Tie-1-Gens, resultiert ein letaler Phänotyp mit schwer gestörtem Gefäßsystem, der durch ausgeprägte Hämorrhagien und defekter Integrität der Mikrogefäße gekennzeichnet ist (Puri et al., 1995; Sato et al., 1995).

„**Vascular Endothelial Growth Factor**“ (VEGF) ist ein Mitogen für endotheliale Zellen in Venen, Arterien und dem lymphatischen System (Ferrara und Davis-Smyth, 1997). Die biologischen Effekte von VEGF gehen über ihre Wirkung auf das Endothel hinaus. Denn VEGF reguliert auch andere Zellen wie z.B. Blutzellen. Es stimuliert die Chemotaxis von Monozyten und die Bildung von „Colony Forming Units“ von Granulozyten und Makrophagen Vorläuferzellen (Clauss et al, 1990, Broxmeyer et al., 1995). Eichmann et al. konnten den Beweis erbringen, dass VEGF ein wichtiger Regulator bei der Differenzierung von Hämangioblasten, den gemeinsamen Vorläufern von endothelialen und hämatopoetischen Zellen, ist (Eichman et al., 1997). In der Gegenwart von VEGF differenzieren solche Zellen in Endothelzellen. Fehlt VEGF, differenzieren sich Hämangioblasten in die Hämatopoese.

VEGF wird von den meisten Tumoren produziert, wobei die Wirkung von VEGF besonders auf dendritische Zellen abzielt (Gabilovich et al., 1998). VEGF inhibiert unreife dendritische Zellen ohne eine bedeutende Funktion bei reifen dendritischen Zellen zu haben. Gleichzeitig wird die Produktion von B-Zellen und unreifen Gr-1⁺ myeloischen Zellen erhöht. Dies wird durch die Inhibition der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Knochenmarksvorläuferzellen vermittelt. Diese Tatsache spielt in der Tumorbilogie eine wichtige Rolle, denn VEGF scheint das Tumorwachstum dadurch zu ermöglichen, dass es die Induktion einer Immunantwort verhindert.

Zukünftige klinische Anwendungen von VEGF werden zum Beispiel durch die Ergebnisse von Experimenten impliziert, die zeigen, dass nach Ligatur der distalen Arteria iliaca externa eines Hasens und kompletter Entfernung der Arteria femoralis die intraarterielle oder intramuskuläre VEGF-Gabe die Perfusion in der betroffenen Extremität stark erhöhte und die Bildung von Kollateralgefäßen anregte (Takeshita et al., 1994).

1.7. Die verwendeten Zelllinien V54/1, V54/2, L87/4 und L88/5

Thalmeier et al. beschrieben 1994 die Etablierung zweier Simian virus 40 (SV 40)-transformierter humaner stromaler Zelllinien mit Namen L87/4 und L88/5. In der Kultur zeigen diese Zelllinien ein fibroblastoides Aussehen. Die Antigenexpression der Zelllinien ist in **Tab. 3** dargestellt. Laut Thalmeier unterscheidet sich L87/4 von L88/5 in der Expression des Makrophagenmarkers CD68. Auch die Zytokinproduktion von L87/4 ist höher als bei L88/5. In der hier vorliegenden Arbeit werden die Zelllinien L87/4 und L88/5 als Modelle für Zelllinien aus dem Knochenmark mit möglichen Stammzellfunktionen untersucht. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sollen dazu beitragen, die von Thalmeier et al. zuerst beschriebenen Zelllinien noch genauer zu charakterisieren.

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit ist der Vergleich dieser aus dem Knochenmark etablierten Stammzelllinien mit Zelllinien aus dem peripheren Blut. Hierbei wurden die Zelllinien V54/1 und V54/2 verwendet. Im Folgenden soll nun auf die speziellen Charakteristika der verwendeten Zelllinien und deren Kontrollzelllinien eingegangen werden, soweit diese für die Untersuchungen relevant sind. Auf die methodische Durchführung der Etablierung wird genau im Kapitel „Material und Methoden“ eingegangen.

Die Zelllinien **V54/1 und V54/2** wurden 1998 in einer Zusammenarbeit zwischen den Arbeitsgemeinschaften Professor Kolb (Medizinische Klinik III, LMU) und Privatdozent Huss (Pathologisches Institut, LMU) aus dem peripheren Blut nach Stammzellmobilisierung und CD6 Depletion durch Zugabe eines Faktorgemisches aus IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, IL-8 und IL-11 erzeugt. Die Zelllinie wurde zum ersten Mal von Conrad et al., 2002 publiziert. Diese Arbeit soll dazu beitragen, Merkmale dieser Zelllinien aufzuklären.

L87/4 und L88/5 wurden aus dem Knochenmark eines hämatologisch gesunden Mannes etabliert und haben die Eigenschaft, als adhärente und wachstumsarretierte Stromazellen, die Erhaltung und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen durch Mediatoren zu ermöglichen (Thalmeier et al., 2000). Die beiden Zelllinien sind in der Lage die Proliferation von humanen CD34⁺ Blutzellen aus der Nabelschnur über einen langen Zeitraum zu ermöglichen. Außerdem sind sie in der Lage das klonale Wachstum der humanen Burkitt-Lymphom-B-Zelllinie BL70 zu unterstützen (Thalmeier et al., 1994).

Besonders wichtige Mediatoren für die Kommunikation dieser stromalen Zellen mit den hämatopoetischen Vorläuferzellen, die deren kontrollierte Differenzierung bedingen, sind die Cytokine Interleukin-1, Interleukin-6 und Kolonie-stimulierende-Faktoren (Kaushansky et al., 1988; Fibbe et al., 1988; Lee et al., 1987; Yang et al., 1988; Nemunaitis et al., 1989). Durch Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) der mRNA zeigten Thalmeier et al. 1996 das Vorhandensein der mRNA für die Zytokine G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, Kit Ligand (KL), LIF, M-CSF, MIP-1 α , TGF- β und TGF- α .

Schon 1990 demonstrierten Verfaillie et al., dass hämatopoetische Vorläuferzellen mit der Fähigkeit der Langzeitpopulation in vitro selektiv an bestrahlte Knochenmarksstromazellen adhären können (Verfaillie et al., 1990). Neuere Daten deuten darauf hin, dass Integrine eine wichtige Rolle in der selektiven Adhärenz und Migration von Vorläuferzellen in das Knochenmark spielen (Katayama et al., 2004; Konakahara et al., 2004).

1.7. Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen

Bis dato ist die Funktion und die Bedeutung von CD34⁺ Stammzellen noch nicht eindeutig geklärt. Das liegt zum Teil daran, dass kein geeignetes humanes Modell existiert, bei dem diese Vorgänge in der Zellkultur untersucht werden könnten. Die Untersuchung von CD34⁺ Stammzellen bedarf dabei immer einer vorherigen aufwendigen Gewinnung dieser Stammzellen aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut oder der Nabelschnur. Der zentrale Punkt dieser Arbeit ist die Charakterisierung der aus dem peripheren Blut gewonnenen Zelllinien V54/1 und V54/2. Dabei soll eine vergleichende Untersuchung zu den von Thalmeier et al. etablierten Zelllinien L87/4, L88/5 aufzeigen, welche Unterschiede zwischen humanen aus dem peripheren Blut und aus dem Knochenmark gewonnenen humanen Zelllinien bestehen. Folgende Fragen, die auch in dieser Reihenfolge im Ergebnisteil und in der Diskussion abgehandelt werden, sollen beantwortet werden:

1. Welche antigenen Oberflächenstrukturen können bei humanen CD34 negativen Zelllinien mit stromaler Herkunft und mit Herkunft aus dem peripheren Blut gefunden werden, die eine Einordnung der Zellen erlauben?

2. Gibt es *Unterschiede* zwischen den Zelllinien aus dem peripheren Blut und denen, die aus dem Knochenmark etabliert wurden, bezüglich ihrer antigenen Oberflächenstrukturen?
3. Kann man unterschiedliche Expressionsmuster von Oberflächenantigenen *innerhalb* der einzelnen Zelllinien finden. Da die untersuchten Zelllinien monoklonalen Ursprungs sind, können Unterschiede innerhalb der jeweiligen monoklonalen Zellpopulationen Hinweise auf die Plastizität geben. Plastizität ist ein Merkmal von Stammzellen.
4. Wie verhalten sich die Zelllinien bei der Färbung mit den charakterisierenden Farbstoffen Rhodamin 123 und Hoechst 33342? Durch den Farbstoff-Efflux können mögliche Stammzeleigenschaften erkannt werden (Ploemacher et al 1988).
5. Kann durch Induktion die Differenzierung der Zelllinien besonders in die neuronale und osteogene Richtung angeregt werden?
6. Bestehen bei den durch Rhodamin 123 unterscheidbaren Subpopulationen der Linie V54/2 Unterschiede hinsichtlich Morphologie, zellulären Transport-Funktionen und Transkriptionsfaktoren? Dabei liegt das Interesse besonders bei den Transkriptionsfaktoren, die für Stammzellen eine wichtige Rolle spielen.

II. M A T E R I A L und M E T H O D E N

2.1. Material

2.1.2. Verwendete Zelllinien

Zur Charakterisierung von humanen Zelllinien mit möglichen Stammzeleigenschaften wurden für die folgenden Versuche die aus peripherem Blut etablierten humanen Zelllinien V54/1 und V54/2 verwendet. Ihnen wurden die aus dem Knochenmark etablierten Stammzelllinien L87/4 und L88/5 gegenüber gestellt. Die Einleitung ist schon auf die Bedeutung der Zelllinien für diese Arbeit eingegangen. Dieses Kapitel beschreibt die Etablierung der Zelllinien und die in dieser Arbeit verwendeten Kontrollzelllinien.

V54/1 und V54/2 werden aus dem Ficoll Gradienten von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMNC) eines gesunden Stammzellspenders nach Mobilisierung mit Colony Stimulating Factor (G-CSF) und nachfolgender CD6 Depletion gewonnen. Dabei werden die Zellen gründlich mit PBS und Thrombowash® gewaschen, bevor sie für 5 min. bei 200 x g zentrifugiert werden. 2×10^7 Zellen des resuspendierten Überstands werden in 10 cc Zellkulturflaschen gegeben, die mit humanem Fibronectin (Sigma Aldrich) benetzt sind. Das Wachstumsmedium besteht aus RPMI 1640 (Gibco) mit HEPES, 15% inaktiviertem fötalem Kälberserum (PAN-Systems), 10^{-6} M Hydrocortison (Sigma) und 1% NaHCO_3 . Die Cytokine sind IL-1 β 10 ng/ml (Genzyme), IL-3 100 ng/ml (Sandoz), IL-6 10 ng/mg (Genzyme), IL-7 1 ng/ml (Boehringer Mannheim), IL-8 10 ng/ml (Boehringer Mannheim) und IL-11 10 ng/ml (Becton Dickinson). Der zellfreie Überstand der bestrahlten humanen Knochenmarkszelllinie L88/5 wurde beim Mediumwechsel hinzugefügt (Thalmeier et al. 1996). Die adhärent wachsenden fibroblastenartigen Zelllinien werden mit SV40 large-T Antigen immortalisiert. Die Zellen werden dann mit 5 μ l pUC IN-1 wt DNA (Superfect® Qiagen) nach dem Manual des Herstellers transfiziert. Immortalisierte und ausgewählte fibroblastenartige Zellen werden entsprechend standardisierten Lösungsreihen geklont und subgeklont. Die Klonalität der etablierten Zelllinien wird durch die einzigartige Insertionsstelle der SV40 large T-Sequenz nachgewiesen. Nach diesem Schritt wurden zwei fibroblastenartigen Zellklone mit den Namen V54/1 und V54/2 etabliert.

L87/4 und L88/5 sind Simian Virus 40-transformierte humane Stromazelllinien aus dem Knochenmark eines hämatologisch gesunden männlichen Patienten (Thalmeier et al., 1994). Als Stromazelllinien unterstützen sie die Differenzierung von reifen Blutzellen aus hämatopoetischen CD34⁺ Stammzellen.

Als Kontrollzelllinien für die im Nachfolgenden dargestellten Experimente wurden die Zelllinien KG1a, HL60/Dox und MelJuso verwendet.

KG1a ist eine undifferenzierte Variante von KG1 (Koeffler et al., 1980). KG1 wurde aus dem Knochenmark eines 59 Jahre alten Mannes mit AML-Rezidiv etabliert (Koeffler & Golde, 1978). In diesen Experimenten gilt diese Zelllinie als Kontrolle für CD34-Positivität. Durch die Expression der P-Glykoproteinpumpe auf ihrer Oberfläche, wird KG1a auch als Kontrolle für die Rhodaminversuche verwendet.

HL60/Dox ist ein Subklon der humanen Leukämiezelle HL60. HL60 wurde aus dem peripheren Blut einer 35 Jahre alten Frau mit akuter Leukämie (AML FAB M2) gewonnen (Collins et al., 1977). HL60/DOX hat eine dreizehnfache Resistenz gegen Doxorubicin (Wada et al., 1999). Diese Resistenz kommt durch eine funktionell hoch aktive P-Glykoproteinpumpe zustande. Somit konnte HL60/DOX als Kontrollpopulation für einen Efflux durch die P-Glykoproteinpumpe dienen.

Mel-Juso ist eine humane Melanomzelllinie, die 1977 aus dem primär malignen Melanom einer 58 Jahre alten Frau etabliert wurde (Ziegler-Heitbrock et al., 1985; Johnson et al., 1981). In unseren Untersuchungen verwenden wir diese Zelllinie als Positivkontrolle für den Antigennachweis von CD117.

Die folgende Tabelle ist eine Zusammenfassung der Daten zu den einzelnen Zelllinien. Sie gibt an, woraus die Zelllinien etabliert wurden und welche Eigenschaften sie besitzen.

Zelllinie	Isolierung	Antigene
L87/4	Simian Virus transformierte humane Stroma-Zelle aus dem Knochenmark eines hämatopoetisch gesunden Mannes	CD 68 ⁺ (Makrophagen-Marker), c-kit ⁻ , CD11a,b ⁻ , CD14 ⁻ , CD23 ⁻ , CD32 ⁻ , CD33 ⁻ , CD34 ⁻ , CD36 ⁻ , CD38 ⁻ , CD56 ⁻ , CD61 ⁻ , CD64 ⁻ , CD10 ⁺ , CD13 ⁺ , CD71 ⁻ ;
L88/5	Simian Virus transformierte humane Stroma-Zelle aus dem Knochenmark eines hämatopoetisch gesunden Mannes	CD68 ⁻ , c-kit ⁻ , CD11a,b ⁻ , CD14 ⁻ , CD23 ⁻ , CD32 ⁻ , CD33 ⁻ , CD34 ⁻ , CD36 ⁻ , CD38 ⁻ , CD56 ⁻ , CD61 ⁻ , CD64 ⁻ , CD10 ⁺ , CD13 ⁺ , CD71 ⁻ ;
KG1a	Humane Akute Myeloische Leukämie Zelle ist der Subklon von KG1, gilt als undifferenzierte Variante	CD3 ⁻ , CD13 ⁺ , CD14 ⁻ , CD19 ⁺ , CD33 ⁺ , CD34 ⁺ ;
HL60	Humane Akute Myeloische Leukämie Zelle (AML FAB M2) aus dem peripheren Blut	Amplifiziertes c-myc Gen, CD3 ⁻ , CD4 ⁺ , CD13 ⁺ , CD14 ⁻ , CD15 ⁺ , CD19 ⁻ , CD33 ⁺ , CD34 ⁻ ;
Mel-Juso	Humane Zelllinie, etabliert aus dem primären Tumor einer 58 Jahre alten Frau mit malignem Melanom, 1977	Cytokeratin ⁻ , Desmin ⁻ , Endothel ⁻ , GFAP ⁻ , HMB-45 ⁺ , Neurofilament ⁻ , Vimentin ⁺ , CD117 ⁺ ;

Tab. 3: Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien. Die Spalte „Isolierung“ zeigt wie die Zelllinien entstanden sind. Die Spalte „Antigene“ zeigt welche Epitope durchflußzytometrisch und immunhistochemisch untersucht wurden.

2.1.2. Medium

Die Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1, V54/2, HL60/DOX wachsen in RPMI 1640 (GibcoBRL Life Technology) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälber Serum (FCS) (Biotech GmbH), 1% L-Glutamine (GibcoBRL Life Technology) und 1% Penicillin-Streptomycin (GibcoBRL Life Technology).

KG1a wurde in ISCOVE (Biochrom) mit 20% FCS (Biotech GmbH), 1% L-Glutamine (GibcoBRL Life Technology) & 1% Penicillin-Streptomycin (GibcoBRL Life Technology) gezüchtet.

Die Methylcellulose-Experimente wurden mit dem Medium MethoCult GF⁺ H4435 von Stem Cell Technologies (Vancouver, BC, Canada) durchgeführt.

2.1.3. Antikörper

CD34 (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) ist ein Einzelstrangglykoprotein, das u.a. mit humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen assoziiert ist. Es ist ein für dieses Differenzierungsstadium spezifisches Leukozytenantigen. Der Antikörper gegen CD34 stammt von dem Klon My10 und wurde durch Hybridisation von Maus SP2/0-Ag14 Zellen und Milzzellen von BALB/c Mäusen, die mit KG1a immunisiert wurden, hergestellt. Die Immunglobulinkettenkomponente besteht aus IgG₁ schweren Ketten und Kappa Leichtketten (Landsdorp et al., 1989; Loken et al., 1987).

CD117 (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) ist der Tyrosinkinase-Rezeptor für Stammzellfaktor (SCF, oder auch c-kit Ligand), der durch das humane c-kit Gen kodiert wird. Der Klon des Antikörpers gegen die CD117 ist 104D2 und stammt von der Fusion von Sp2/0 Melomzellen mit Splenozyten von BALB/c Mäusen, die mit der Megakaryozytenzelllinie MOLM-1 immunisiert wurden (Civin et al., 1984).

CD45 (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems), auch Hle-1 genannt, erkennt das humane Pan-Leukozytenantigen (MG 180 bis 220 kDa), welches zur T200 Familie gehört. Es ist auf allen humanen Leukozyten vorhanden. Der Klon dieses Antikörpers 2D1 stammt von der Verschmelzung einer Maus-NS-1 Myelomzelle mit Splenozyten von BALB/c-Mäusen, die mit humanen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) immunisiert wurden (Jackson, 1990).

P-Glykoprotein (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) ist ein transmembranöses Glykoprotein, das als ATP-abhängige Effluxpumpe für eine Vielzahl von Medikamenten wirkt. Der Klon15D3 wurde durch die Verschmelzung von Sp2/0 Myelomzellen mit Splenozyten (BALB/c Mäuse) hergestellt, die mit BA3T3 Fibroblastenlinien (BATV.2) immunisiert wurden, welche mit dem humanen MDR1 Gen transfiziert (Shi et al., 1995) sind.

CD105 (Ancell) Endoglin (CD105) ist als TGF- β Rezeptor III auf endothelialen Zellen, Synzytiotrophoblasten, Makrophagen und Bindegewebs-Stromazellen vorhanden. Es spielt u.a. eine Rolle in der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (Haruta &

Seon, 1986; Barry et al., 1999). Der Klon SN6/N1-3A1 wurde von humanen B-Leukämie Zellen hergestellt und erkennt ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 160 kDa. Der Isotyp ist murines IgG1 kappa.

SH3 (Osiris Therapeutics Inc.) ist ein Antigen, das auf mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird. In der Massenspektroskopie und auch in der Aminosäuresequenz wurde nachgewiesen, dass SH3 mit dem Epitop CD73 identisch ist, dessen Funktion unter anderem in der Aktivierung von Lymphozyten liegen soll (Barry et al., 2001). Der Klon wurde durch die Fusion von murinen Milzzellen mit Sp2/0-Ag14 murinen Myelomzellen hergestellt, nachdem die Erzeugermaus mit humanen mesenchymalen Stammzellen immunisiert wurde. Der primär nicht markierte Antikörper gegen SH3 wurde mit dem FITC markierten Zweitantigen gegen IgG_{2b} (Klon R12-3, Ratte (Lou), IgG_{2aκ}) dargestellt.

CD10 [(CALLA) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems)] erkennt ein verbreitetes humanes Antigen der akuten Lymphoblasten Leukämie (CALLA), MG 100 kDa. Es ist identisch mit der humanen membranassoziierten neutralen Endopeptidase (NEP), die auch als Enkephalinase bekannt ist. Der Klon von CD10 W8E7 stammt aus der Hybridisation von Maus-Myelom Zellen P3-X63-Ag8.653 mit Splenozyten BALB/c, die mit Blasten eines Patienten mit einer nicht-T-Zell lymphoblastischen Leukämie (ALL) immunisiert wurden (Le Bien et al., 1989).

CD14 ist auf der Mehrzahl normaler Monozyten aus dem peripheren Blut vorhanden. CD14 reagiert schwach mit Granulozyten aus dem peripheren Blut. Anti-CD14 erkennt das menschliche Monozyten-/Makrophagen-Antigen mit 55 kDa. Der Klon MΦP9 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), wurde durch Hybridisation von SP2/O Myelomzellen der Maus mit Milzzellen von BALB/c-Mäusen gewonnen, die mit Monozyten aus dem peripheren Blut eines Patienten mit rheumatoider Arthritis immunisiert wurden (Ziegler-Heithbrock & Ulevitch, 1993).

HLA-DR ist ein Klasse II Antigen des „Major Histocompatibility Complex“ (MHC). Das Antigen ist ein transmembranes Glykoprotein, bestehend aus α - und β -Untereinheiten, die ein Molekulargewicht von 36 bzw. 27 kDa haben. Anti-HLA-DR reagiert mit einem nichtpolymorphen HLA-DR Epitop, das nicht kreuzreagiert mit HLA-DQ- oder HLA-DP-

Molekülen. Der Klon L243 von Anti-HLA-DR (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) stammt von der Fusion von Maus NS-1/1-Ag4 Myelomzellen mit Splenozyten BALB/c, die mit der humanen lymphoblastoiden B-Zelllinie RPMI 8866 immunisiert wurden.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Antigene mit ihrer Funktion zusammengefasst (Lampson & Levy, 1980).

Antikörper	Funktion
CD34	Einzelstrangglykoprotein, das u.a. mit humanen hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen assoziiert ist; Leukozytenantigen spezifisch für Differenzierungsstadium
CD117	Tyrosinkinaserzeptor für Stammzellfaktor, wird durch das humane c-kit Gen kodiert
CD45 (Hle-1)	humanes Leukozytenantigen, auf allen Leukozyten vorhanden
P-Glykoprotein	transmembranes Glycoprotein, wirkt als ATP-abhängige Effluxpumpe u.a. für Medikamente
SH2,3,4	SH2, als CD105 bekannt, TGF- β Rezeptor III, Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen
CD10	CALLA, Endopeptidase, erkennt ein verbreitetes Antigen der akuten Lymphoblasten Leukämie
CD14	auf Monozyten im peripheren Blut vorhanden
HLA-DR	Klasse II des MHC

Tab. 4: Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Funktion der aufgelisteten Epitope

2.1.4. Farbstoffe

Als Substrat der P-Glykoproteinpumpe verwenden wir Rhodamin 123 (Sigma-Aldrich Co., R 8004) und Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Co, B 2261). Sowohl das HBSS, als auch der HEPES Puffer stammen von Gibco Life Technology.

2.1.5. Hemmstoff der P-Glykoproteinpumpe

Die kalziumabhängige P-Glykoproteinpumpe kann durch den Kalziumkanalblocker Verapamil-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich V 4629) gehemmt werden.

2.1.6. Durchflußzytometrie

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen werden mit dem Fluorescent Activated Cell Scan (FACScan) von Becton-Dickinson Immunocytometry Systems durchgeführt. Der FACS-Puffer von Becton-Dickinson Immunocytometry Systems besteht aus PBS + 2% FCS + 0.05% Natriumacid (Kat. Nr. 342003). CellQuest™ Version 3.2.1fl. von BD Biosciences wurde als Analyseprogramm verwendet.

Die Zellsortierung wird mit Modular Flowcytometer (MoFlow) von Cytomation Bioinstruments GmbH durchgeführt. Die Analyse der Hoechst 33342 Färbung erfolgt durch „Beta 4.0.2. Scion Image“ von Scion Corporation, Maryland, USA.

2.1.7. Colony forming Units (CFU)

Zum Wachstum von Zellen als „Kolonie formierende Einheit“ (CFU- Colony Forming Unit) wird Methylcellulose von Cell Systems Biotechnologie Vertrieb GmbH Methocult GF+ H4435 verwendet.

2.1.8. Zytozentrifugationspräparate

Die Präparate werden mit der Zentrifuge „Cytospin 3“ von Shandon (74000201) hergestellt. Die Zellen werden mit dem Aufsatzröhrchen „Cytofunal“ von Shandon (Kat. Nr. 5991040) auf die Objektträger „Super Frost Plus“ (Art. Nr. 041300) pipettiert. Die Aufsatzröhrchen werden mit dem Cytoclip™(5991052) von Shandon an den Objektträgern befestigt.

2.1.9. Immunhistochemie

Hierfür werden Antikörper gegen CD34 von Serotec (MCA 547) und gegen c-kit (CD117) von DAKO (A4502) verwendet. Die adhärenen Zellen werden zum Fixieren in eine Mischung aus Methanol (Merck 106009-2500) und Aceton (Merck 100014-1011) im Verhältnis 1:1 gegeben. Das LSAB-kit (K0681), Mäuse-IgG (APAAP-Methode, Z0259) und APAAP-Maus stammen von DAKO.

Für die Färbung werden 3-Amino-7-Ethyl-Carbazole (AEC, Sigma, A5754) und Fast Red (Sigma, F4648) verwendet. Die AEC-Farbe besteht aus 20mg AEC in 12ml DMSO von Merck (8.02912.1000) gelöst mit 100 ml PBS Puffer. Der PBS Puffer für die AEC Farbe für z.B. 1l besteht aus 8,5g NaCl (Appllichem A1149.1000), 1,27g Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 0,39g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat. Die Salzlösung wird auf 1l H₂O aufgefüllt und auf pH 5,0-5,5 eingestellt. Die gesamte Lösung für die AEC Farbe wird auf 200 ml H₂O aufgefüllt. Als Katalysator dient 10 µl H₂O₂. Daraufhin wird gemischt, filtriert und die Lösung sofort verwendet.

Zur Gegenfärbung wird Hematoxylin (Hämalaun) von Vector (H3401) verwendet. Der Trispuffer für 5l besteht aus 34,25g Trisma Hydrochlorid (Sigma, T3253), 4,5g Trisma Base (Sigma, T1503) und 43,9g NaCl (AppliChem A1149.1000) gelöst in 5l H₂O.

Der immunhistochemische Nachweis des Glial-Fibrillary-Proteins (GFAP) erfolgt mit dem anti-GFAP-Antikörper von DAKO (Z-334). Der Detektionsantikörper ist F(ab)₂H, bestehend aus Hasen IgG und dem F(ab)₂ Fragment vom Schwein. (DAKO E-0431).

Zur Detektion des Systems wird Streptavidin (DAKO P-0397) verwendet. Das Färben wird mit 3-Amino-9-Ethylcarbazole (Kat. Nr. A-5754) durchgeführt.

2.1.10. Differenzierung

Zur Induktion der Osteogenen Differenzierung werden die Zellen in ein stimulierendes Medium gegeben, das Dulbecos MEM 10% FCS von Biochrom (Kat. Nr. F0415), Penicillin-Streptomycin (1%), Glutamin (1%), 10⁻⁸ M Dexamethason (Sigma D-8893), 0,2 mM Ascorbinsäure (Sigma A-4034), 10 mM β-Glycerolphosphat (Sigma 50020), 1ng/ml BMP2 (RD Systems 355-BM) und 10⁻⁸ Vitamin D3 (Sigma, H4014) enthält.

Zur Induktion der neuronalen Differenzierung wird für 6h mit 200 ng/ml „Nerve Growth Factor β (NGF-β)“ von Sigma (Kat. Nr. N1408) und 1:1000 Mercaptoethanol (Sigma, M3148) inkubiert.

2.1.11. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wird mit dem „RNeasy Mini Kit (50)“ von QIAGEN durchgeführt (Kat. No. 74104). Die Homogenisierung der RNA führten wir mit dem „QIA Shredder (50)“ von QIAGEN

(Kat. No. 79654) durch. Der in dem RNeasy Mini Kit (50) enthaltene Puffer ist der RNA-Lysis- and-Tissue-Puffer (RLT-Puffer, Kat. No. 79216).

2.1.12. RT-PCR

Für die Umschreibung der RNA in cDNA werden Random-Hexamer-Primer von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Der Puffer für den ersten Strang, das Dithiothreitol und die Reverse Transkriptase stammen aus dem Gibco Kit (Kat. Nr. 28025-013). Die d-Nukleotidtriphosphate (dNTP) sind von Amersham Pharmacia Biotech und der RNA-Inhibitor (Rnasin) von Promega Corporation (Kat. Nr. N2111). Die Amplitaq gold stammt von Applied Biosystems.

2.1.13. RT-PCR der Transkription der alkalischen Phosphatase

Für die PCR werden Dig easy Hyb (Kat. Nr. 1796895), die Taq Polymerase (Kat. Nr. 1146165) und die Oligo p(dT)₁₅ (Kat. Nr. 814 270) von Boehringer verwendet. Von Promega stammen die M-MLV (Kat. Nr. M 1701), die Nukleotide (Kat. Nr. C1141) und Rnasin (Kat. Nr. N 2511). Der Sense Primer (Kat. Nr. OR140403-1) hat die Sequenz 5'-CGA GCT GAA CAG GAA CAA CGT G-3' und der Antisense Primer (Kat. Nr. OR140403-2) die Sequenz 5'-CGC CCA CCA CCT TGT AGC C-3'. Beide Produkte stammen von Thermo Hybaid Interactiva Division.

Die für die RT-PCR verwendeten „Primer“ werden in der nachfolgenden Tabelle mit ihrer Sense- und Antisensesequenz aufgeführt. Diese Primer wurden im Labor von Professor Antony Green, Department of Hematology, University of Cambridge, von Eric Delabesse hergestellt.

Genprodukt	Sense	Sequenz	Antisense	Sequenz
BMP4	HsBMP4/229U17	CGCCCAGGTTCACTGCA	HsBMP4/431L22	CGGTTACCAGGAATCATGGTGT
BMP Rez.1A	HsBMPR1A/1012U19	CAGATGGTCCGGCAAGTTG	HsBMPR1A/1144L20	TGGCGCATTAGCACAGTTT
CD34	HsCD34/781U19	CTGCTCCTTGCCAGTCTG	HsCD34/930L21	GAATAGCTCTGGTGGCTTGCA
Cadherin5	HsCDH5/1052L21	TCATGTATCGAGGTCGATGG	HsCDH5/922U19	GGGACTACCAGGACGCTT
Elf-1	HsELF1/404U19	CCCCAGTCACCCATGTGTC	HsELF1/541L21	GGAACTCTGGTCGTGGTGGTTT
Fli 1	HsFLI1/795U20	CCGACCAATCCTCACGATTG	HsFLI1/926L21	GGGCCGTTGCTCTGTATTCTT
Flt 1	HsFLT1/2687U21	TCCCTTATGATGCCAGCAAGT	HsFLT1/2902L20	ACGTTACAGATGGTGGCCAAT
Flt 3	HsFLT3/757U20	AGAAATGAACTGGGCAGGGA	HsFLT3/893L19	CAGGTGAGCCCGAATCCAT
GATA 1	HsGATA1/643U19	GAGCCCCCTCAATTCAGCA	HsGATA1/776L21	GCAGGCGTTGCATAGGTAGTG
GATA 2	HsGATA2/1238U20	ACAACCACCACCTTATGGCG	HsGATA2/1420L20	GCATGCACTTTGACAGCTCC
GATA 3	HsGATA3/1048U21	CCTCATTAAGCCCAAGCGAAG	HsGATA3/1227L21	GGTTTCTGGTCTGGATGCCTT
GATA 4	HsGATA4/1185U20	CCAAACCAGAAAACGGAAGC	HsGATA4/1319L20	CGTCTTGATGGGACGCATCT
GATA 5	HsGATA5/740U19	ACACGACCAACACCACGCT	HsGATA5/872L19	ATGGTCTTTGGCTTCCGCT
GATA 6	HsGATA6/1277U18	CAGAAACGCCGAGGGTGA	HsGATA6/1450L25	TTAGAAGAGGTGGAAGTTGGAGTCA
alpha globin	HsHBA1/164L20	AGGTGCAAGTGCGGGAAGTA	HsHBA1/4U21	CTTCTGGTCCCCACAGACTCA
beta globin	HsHBB/104U21	GGTGAACGTGGATGAAGTTGG	HsHBB/251L21	TCACTAAAGGCACCGAGCACT
KDR	HsKDR/2352U20	CATCGAAGTCTCATGCACGG	HsKDR/2501L19	GCCTGGCAGGTGTAGAGGC
cKIT	HsKIT/1869U20	GGCCATGACTGTCGCTGTAA	HsKIT/2013L20	CTGTAATGACCAGGTGGGC
KLF1	HsKLF1/124U21	CCGGACACACAGGATGACTTC	HsKLF1/280L19	GGAGGAGATCCAGGTCCCA
LMO2	HsLMO2/1200U19	TGAGCTGCGACCTCTGTGG	HsLMO2/1346L21	CACCCGATTGTCATCTCATA
Myb	HsMYB/666U21	TGGAATTCTACAATGCGTCGG	HsMYB/800L20	CAGTGGCAGGGAGTTGAGCT
PBGD	HsPBGD/162L20	CAAACCTGCAGGCCAGGTAC	HsPBGD/30U19	GTCTGGTAACGGCAATGCG
PECAM1	HsPECAM1/1078L19	CCACGATGCTGCTGACCTT	HsPECAM1/925U19	CACCTGGCCCAGGAGTTTC
SCL	HsSCL/1056U21	TGTTACCACCAACAATCGAG	HsSCL/1231L19	GCTGAGCTTCTTGCCGGG
Spi1	HsSPI1/272U20	CTATACCAACGCCAAACGCA	HsSPI1/440L19	CCATGTGGCGGTAGAGCTG
Tek=Tie2	HsTEK/2462U20	TTGAAGAGGGCAAATGTGCA	HsTEK/2654L19	GCGCCTTAAGAACTTGGCC
Tie1	HsTIE1/1013L21	AACCACTGAACCGGTACAAG	HsTIE1/877U21	CTCACCTTCTGCCTCCAGAC
VEGF	HsVEGF/300U19	TGCCCACTGAGGAGTCCAA	HsVEGF/432L20	AGGCCACAGGATTTTCTT
vWF	HsVWF/397U17	GTCATCCACGGCCGAT	HsVWF/606L20	CCCCTGTGTCACGGTACCAT

Tab. 5: Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Primer, die für die RT-PCR verwendet wurden.

2.2. Methoden

In diesem Teil werden die bei der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden dargestellt. Die Materialien, die dafür verwendet wurden, wurden im vorherigen aufgeführt. Es wird besonders auf folgende Methoden eingegangen:

- 2.2.1. Durchflußzytometrische Untersuchungen (Fluorescent Activated Cell Scan, FACS)
- 2.2.2. Rhodamin 123-Färbung
- 2.2.3. Hoechst 33342-Färbung
- 2.2.4. Antikörper-Färbungen
- 2.2.5. Zytozentrifugationspräparate
- 2.2.6. Färbung der Zytozentrifugationspräparate
- 2.2.7. RNA-Isolierung
- 2.2.8. RT-PCR
- 2.2.9. PCR der Expression der alkalischen Phosphatase

2.2.1. Durchflußzytometrische Untersuchungen (Fluorescent Activated Cell Scan, FACS)

Am Beispiel der Rh123 Färbung wird im Folgenden kurz auf die Analyse am Durchflußzytometer eingegangen. Die Abbildung 3 gibt einen Überblick über die durchflußzytometrische Analyse der Fluoreszenzkanäle, der Gates, dem Livegate und der Vitalfärbung durch Propidiumjodid. Dies soll anhand eines sogenannten Dotplots der rhodamingefärbten Zelllinie L87/4 geschehen. Er ist exemplarisch für die durchflußzytometrische Untersuchungstechnik dieser Arbeit und gilt in gleicher Weise für die untersuchten Zelllinien L88/5, V54/1 und V54/2.

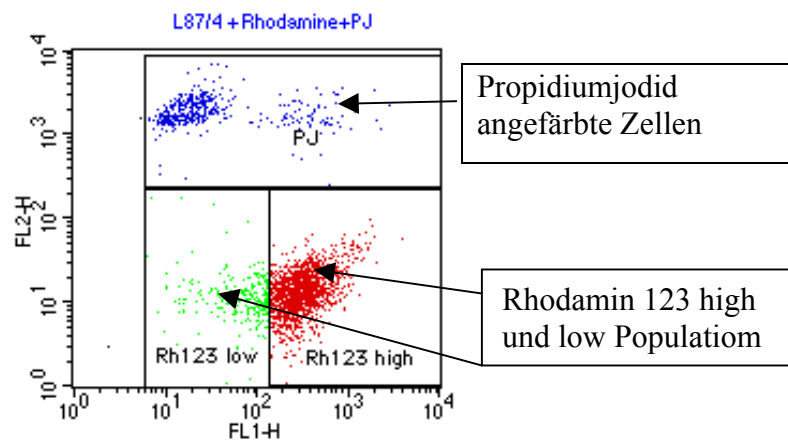
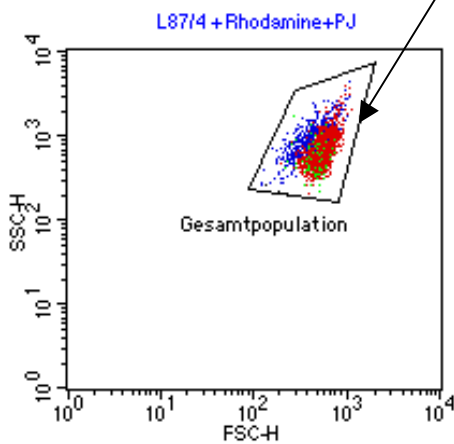
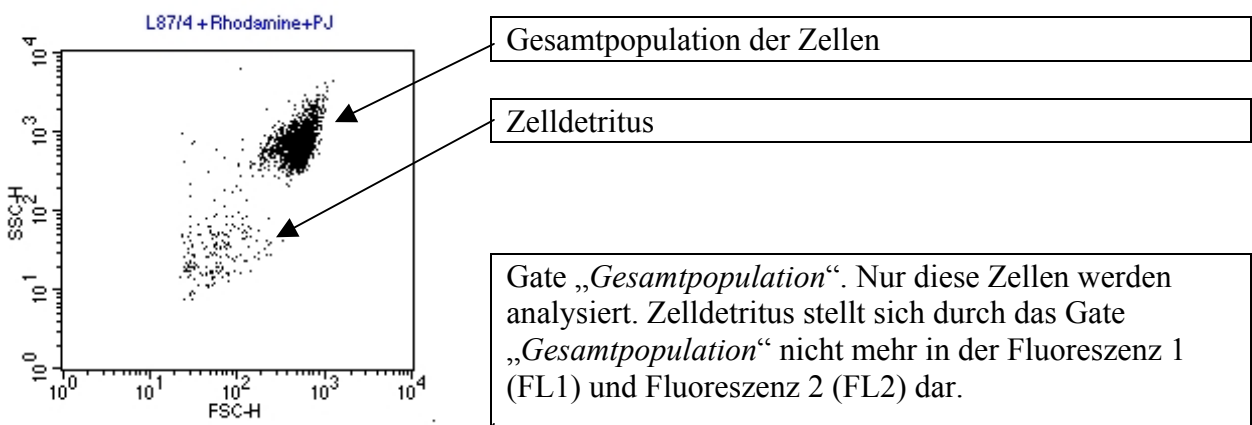


Abb. 3: Exemplarische Darstellung der durchflußzytometrischen Untersuchungstechnik anhand von L87/4 nach Färbung mit Rh123. Abb. a zeigt die L87/4 in FSC und SSC. Das Gate „Gesamtpopulation“ gibt die analysierte Zellpopulation an. Abb. c Diese stellt sich nach Färbung mit Rh123 und PJ in den Kanälen FL1 und FL2 dar.

In der Abbildung 3a sieht man zuerst die Darstellung der Zelllinie L87/4 im FACS (Fluorescent Activated Cell Scan, Durchflußzytometer), bei der noch kein Gate gesetzt wurde, um Zelltrümmer aus der Untersuchung auszuschließen. Diese Abbildung analysiert die Zellpopulation L87/4 in dem Kanal „Forwardscatter“ (FSC), der die Größe der Zelle wiedergibt und dem Kanal „Sidewardscatter“ (SSC), der der Granularität der Zelle entspricht. In der Abb. 3a stellen sich somit noch alle Ereignisse dar, also Zellen und auch Zellfragmente.

Anhand der Zelllinie L87/4 wird in Abb. 3b das sogenannte „Livegate“ gezeigt. Im Gate „Gesamtpopulation“ liegen die kohärenten Zellen. Der Zelldetritus hingegen, welcher außerhalb des Gates liegt, wird nicht mehr als Ereignis gewertet. Aber auch die in Abb. 3c gezeigte Darstellung von Fluoreszenz 1 (FL1) gegen Fluoreszenz 2 (FL2) analysiert nun ausschließlich intakte Zellen. Denn auch hier gehen nur noch die Ereignisse ein, die in Abb. 3b im Gate „Gesamtpopulation“ liegen.

Die Rhodaminfärbung und ihre Darstellung werden in den Fluoreszenzkanälen Fluoreszenz 1 (FL1, FITC) und Fluoreszenz 2 (FL2, PE) gezeigt. Die FL1 zeigt in Abb. 3c die Intensität des Rh123 – Gehalts der Zelle an. Je höher die Rh123-Intensität der Zelle ist, desto höher ist der Wert in der FL1. Man erkennt, dass sich in der FL1 zwei Populationen darstellen. Die eine ist stark mit Rh123 gefärbt und wird durch das gesetzte Gate „ $Rh123^{high}$ “ umschlossen. Sie wird als $Rh123^{high}$ Population bezeichnet. Die Zellen, die sich längs der FL1 kaum mit Rh123 anfärben, werden mit dem Gate „ $Rh123^{low}$ “ eingerahmt und als $Rh123^{low}$ Population bezeichnet. Die Farbkodierungen der Zellen im Gate $Rh123^{high}$ (rot) und $Rh123^{low}$ (grün) stellen sich als rote und grüne Ereignisse in der FSC und SSC dar. Man erkennt durch diese Farbkodierung, dass sich die $Rh123^{low}$ Population bei der durchflußzytometrischen Untersuchung im Vorwärtsscatteer und Seitwärtsscatteer dadurch von der $Rh123^{high}$ Population unterscheidet, dass sie kleiner ist und eine geringere Granularität als die Rhodamin123^{high} Population aufweist.

Die Abszisse (FL2) zeigt in Abb. 3c die Aufnahmeintensität eines weiteren Farbstoffes. Der Farbstoff Propidiumjodid, der bei Desintegration der Zellwand in die Zelle diffundiert, wird in der FL2 analysiert. Somit können tote Zellen selektiv dargestellt werden. Deutlich sieht man nach der Propidiumjodidzugabe, dass der größte Teil der toten Zellen aus dem Bereich stammt, der eine ähnliche Fluoreszenz wie die $Rh123^{low}$ Population hat.

2.2.2. Rhodamin 123-Färbung

Aus einem angelegten Vorrat mit je 1 mg Rhodamin/1 ml Ethanol bei -20°C wird ein Aliquot aufgetaut. Durch Zugabe von PBS wird eine Lösung mit der Endverdünnung $0,1\mu\text{g Rh123/ml}$ hergestellt, die dann zur Färbung der Zellen verwendet werden kann.

Verapamil wird zur Hemmung der P-Glykoproteinpumpe verwendet. Dazu wird eine Stocklösung Verapamil mit einer Konzentration von 1 mM verwendet, wovon $100\mu\text{l}$ zu den Proben gegeben werden. Die Endkonzentration von Verapamil in der Probe beträgt somit $100\mu\text{M}$.

Zu 1×10^6 Zellen, die in 1 ml PBS mit 2% FCS gelöst sind, wird $10\mu\text{l}$ der Rhodamin 123-Lösung zugegeben und für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach werden die Zellen gewaschen, indem man sie mit 1 ml PBS für 5 Min. bei 1200 Umdrehungen zentrifugiert. Dann wird der Überstand verworfen. Das Pellet wird nochmals für 5 Min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet nun in $900\mu\text{l}$ PBS aufgenommen.

Die $100\mu\text{l}$ Verapamil einer 1 mM Verapamilösung werden zu den Zellen gegeben. Um den Zellen, deren P-Glykoproteinpumpe nicht mit Verapamil gehemmt wird, Zeit zu geben das Rh123 aus der Zelle zu pumpen, wird die zu hemmende Population für 40 Min. bei 37°C mit der Verapamilösung inkubiert.

Danach erfolgt wieder ein Waschschrift nach dem gleichen Schema wie oben. Die Zellen werden für 5 Min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Das Pellet wird nach Auffüllen mit 1 ml PBS und vortexen für weitere 5 Min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird nochmals durch Dekantieren verworfen und das Pellet in $400\mu\text{l}$ FACS Puffer aufgenommen.

Als nächster Schritt erfolgt die durchflußzytometrische Untersuchung im FACScan.

Rh123 hat sein Emissionsmaximum zwischen 500 nm und 550 nm.

Die Abb. 4 soll einen Überblick über den Ansatz der Rhodamin Färbung geben. Nach Gewinnung der Zellen für den Ansatz aus der Zellkultur werden die Zellen in drei Parallelansätze aufgeteilt. Diese sind die Rhodaminfärbung ohne Verapamil, dann die Rhodaminfärbung mit anschließender Verapamilinkubation und eine Kontrollpopulation, die nicht gefärbt wird.

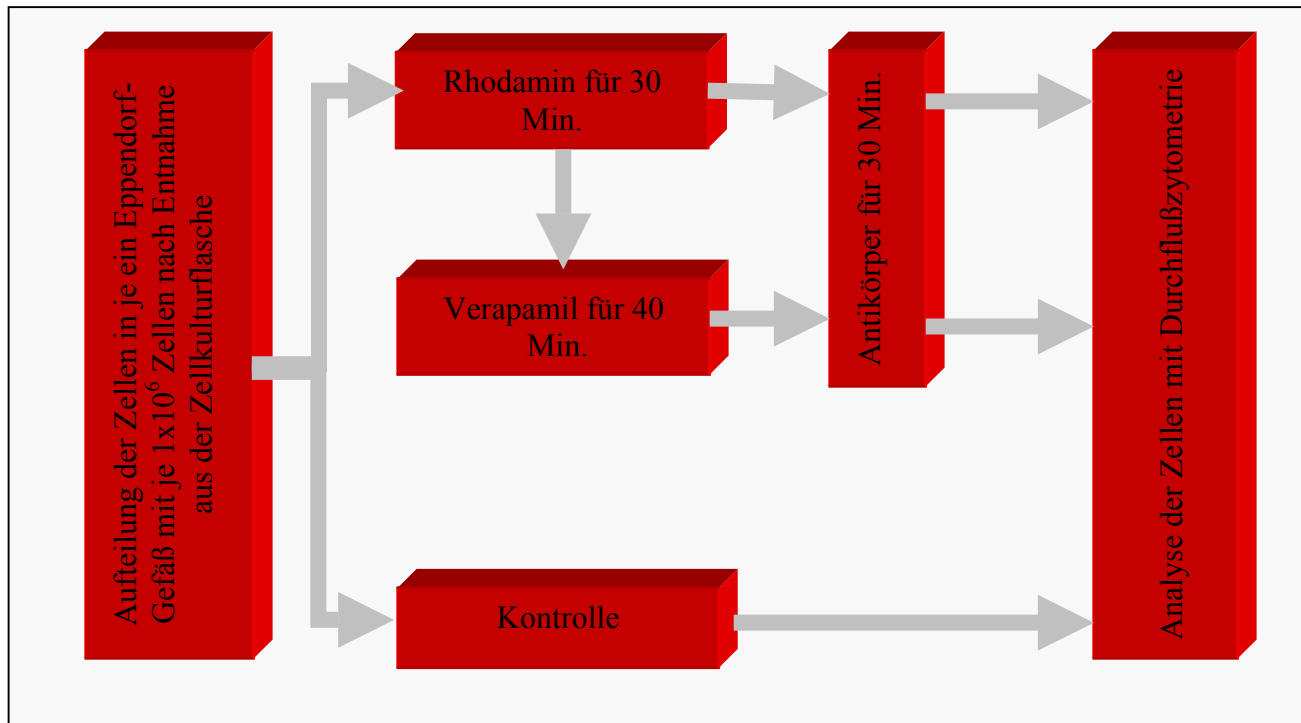


Abb. 4: Übersicht über den Ablauf der Rh123 Färbung.

2.2.3. Hoechst 33342-Färbung

Es wird eine Stammlösung 1mg Hoechst 33342 pro 1 ml Aqua dest. angelegt. Zur Färbung der Zellen werden 5 µl der Stocklösung zu 1×10^6 Zellen in 1 ml RMPI gegeben. Die Endkonzentration ist 5 µg/ml. Die Zellen werden 120 Min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei ist das genaue Einhalten der Inkubationsdauer und Temperatur essentiell, da kleinste Abweichungen in Temperatur und Inkubationsdauer den Efflux von Hoechst 33342 in den gesuchten „Side Population“ Zellen (SP-Zellen) verhindern (Goodell et al., 1996).

Während der Inkubation muß die Probe aufgeschüttelt werden. Nach der Inkubation werden die Zellen abzentrifugiert und in 4 °C kalten HBSS mit 2% FCS und HEPES aufgenommen. Die FACS Analyse erfolgt bei 4 °C mit einem Zellsortierer MoFlow von Cytomation. Hoechst wird mit einem UV Laser bei 350 nm angeregt und mit einem 450/20 BP Filter (Hoechst Blue) und einem 675 EFLP optischen Filter [(Hoechst Red) (Omega Optical, Brattleboro VT)] gemessen. 610 DMSP wird dazu verwendet, die Emissionswellenlängen zu separieren.

Die Analyse der Zellzyklusstudien erfolgt durch „Beta 4.0.2. Scion Image“ von Scion Corporation.

2.2.4. Antikörper-Färbung

Zur Darstellung der unterschiedlichen Antigene auf den verwendeten Zelllinien werden je 20 µl des Antikörpers gegen CD10, CD34, CD45, CD117, CD14, HLA-DR und 10 µl bei dem Antikörper gegen P-Gp zu jeweils 10^6 Zellen zugegeben. CD10, CD45 und CD14 sind PE markiert, stellen sich also im Phycoerytrin-Kanal (PE) bei 530,30 nm dar. CD117, CD34 und HLA-DR sind mit Fluorescein (FITC, 595,25nm) markiert. Beides wird in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Kühlschrank für 30 Min. inkubiert. Danach erfolgt zweimaliges Waschen durch Zentrifugation für 5 Min. bei 1200 rpm. Die Zellen werden zur durchflußzytometrischen Untersuchung in 400 µl FACS Puffer aufgenommen.

2.2.5. Zytozentrifugationspräparate

Die Zytozentrifugationspräparate werden mit einer Zellzahl von jeweils 1×10^4 Zellen hergestellt. Dazu werden die Zellen in das Aufsatzröhrchen pipettiert, das mit dem Cytoclip an den Objektträgern fixiert wird. Anschließend werden die Zellen mit 300 rpm für 5 Min. auf die Objektträger zentrifugiert.

2.2.6. Färbungen der Zytozentrifugationspräparate

2.2.6.1. PAS- Färbung (Period Schiffsche Säure)

Zur PAS-Färbung werden Zytozentrifugationspräparate mit je 1×10^4 Zellen eingedeckt. Diese werden 10 Min. in 1% Perjodsäure inkubiert. Danach wird mit Leitungswasser die Perjodsäure ausgewaschen. Das Schiffsche Reagenz wird für 5 Min. zugegeben. Es wird 10 Min. fließend gewässert und 10 Min. mit Hämalaun gefärbt. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe werden die Zytozentrifugationspräparate in Xylol getaucht und mit Eukitt eingedeckt.

2.2.6.2. POX-Färbung (Peroxidase)

Die Zytozentrifugationspräparate mit jeweils 1×10^4 Zellen werden 30 Min. mit Äthanol-Formol fixiert. Das Gemisch besteht aus 90 ml unvergälltem Äthanol und 10 ml 37% Formol. Die Ausstriche werden 1-2 Min. fließend gewässert und luftgetrocknet. Die Zytozentrifugationspräparate werden 15 Min. im Inkubationsgemisch (10 mg Benzidin gelöst in 6 ml Dimethylsulfoxid + 100 ml Puffer und 0,5 ml einer 0.3% Peroxidlösung) gespült. Die Pufferlösung besteht aus 30 ml 0.1 M Veronal-Na, 20 ml 0.1 M HCL und 50 ml Aqua dest. bei pH 7,4. Danach wird mit Leitungswasser 2 Min. fließend gewässert. Nach 15 Min. Gegenfärbung mit Hämalaun werden die Objektträger nochmals 10 Min. unter fließendem Wasser gewässert und mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

2.2.6.3. ANAE-Färbung (α -Naphtylacetatesterase)

Die Zytozentrifugationspräparate werden erst 60 Min. mit Äthanol-Formol entfettet. Nach 1-2 Min. Wässern unter fließendem Wasser, werden die Zytozentrifugationspräparate luftgetrocknet. Die Präparate werden nun 60 Min. mit folgendem Reaktionsgemisch inkubiert: 20 mg α -Naphtylacetat, 0.6 ml Aceton, 50 ml 0.2 M Phosphatpuffer pH 7,0, 0.1 ml 4% Natriumnitritlösung und 0.1 ml 4% Parosanilin. Nach 2 Min. fließend Wässern und 15 Min. Färben mit Hämalaun wird nochmals 10 Min. fließend gewässert. Schließlich werden die Zytozentrifugationspräparate an der Luft getrocknet.

2.2.6.4. Sudan Schwarz B Färbung

Die auf den Objektträgern gewachsenen Zellen werden mit PBS gewaschen, getrocknet und mit Zytospray fixiert. Danach erfolgt die Inkubation für 3h bei 37 °C mit filtriertem Sudanschwarz. Die Sudanschwarzlösung besteht aus 0,1g Sudanschwarz und 100ml 70% Alkohol und wird durch aufkochen, erkalten lassen und filtrieren hergestellt wurde. Die Objektträger werden nach der Sudanschwarzfärbung mit Aqua dest. gewaschen und mit Kernechtrot für 10 Min. gegengefärbt. Abschließend werden die Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.6.5. Immunhistochemische LSAB-Methode (Labeled-Streptavidin-Biotin)

Die Zytozentrifugationspräparate werden für 2 Min. in einem Gemisch aus Aceton und Methanol 1:1 bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden die Objektträger für 10 Min. fließend gewässert und für 2 x 5 Min. in Tris-Puffer bei pH 7,5 gewaschen. Der Antikörper gegen CD117 wird in einer Verdünnung von 1:800 eingesetzt. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Objektträger werden erneut zweimal für 5 Min. in Tris-Puffer gewaschen. Nun wird mit dem systeminternen Link für 30 Min. inkubiert. Anschließend wird abermals gewaschen. Als Detektion erfolgt die Inkubation des Streptavidinkomplexes ebenfalls für 30 Min. Am Ende wird nochmals zweimal für 5 Min. im Tris-Puffer gewaschen. Es folgt die Färbung mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) für 15 Min. bei Raumtemperatur.

Die Objektträger werden 10 Min. fließend gewässert und in Hämalaun gegengefärbt (20-60 Sec.). Nach erneutem Wässern (10 Min.) werden die Objektträger mit Aquatex oder Glyceringelatine eingedeckt.

Das immunhistochemische Protokoll zu der Färbung mit dem Antikörper gegen Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) besteht aus Fixierung der Schnitte in Formalin, 10 Min. fließendem Wässern und anschließender Inkubation in Tris-Puffer für 2 x 5 Min. Anschließend wird der primäre Antikörper für 30 Min. zugegeben und dann wieder 2 x 5 Min. mit dem Tris-Puffer inkubiert. Nach Zugabe des Zweitantikörpers für 30 Min. wird wiederum für 2 x 5 Min. mit Tris-Puffer inkubiert. Zum Waschen wird Streptavidin für 30 Min. zugegeben und anschließend 2 x 5 Min. mit Tris-Puffer gewaschen. Zum Färben wird 3-Amino-9-Ethylcarbazole verwendet. Vor der abschließenden Färbung mit Hämalaun wird nochmals für 10 Min. fließend gewässert.

2.2.6.6. Immunhistochemische APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase)

Auch bei dieser Methode werden die Zytozentrifugationspräparate wie schon beschrieben fixiert und gewässert. Die Objektträger werden für 2 x 5 Min. in Tris-Puffer gewaschen, anschließend für eine Stunde mit dem Antikörper (CD34) in einer Verdünnung von 1:40 inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Tris-Puffer wird für 30 Min. das Maus IgG für die Bindung zugegeben. Abermals wird gewaschen und nun der APAAP-Komplex für 30 Min. auf die Präparate gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit Tris-Puffer werden die Inkubationen mit Maus IgG und APAAP-Komplex wie schon beschrieben wiederholt. Dabei handelt es sich um eine

Systemverstärkung, weswegen eine Inkubationszeit für 10 Min. ausreichend ist. Am Ende wird auch hier mit Tris-Puffer gewaschen und für 10 Min. mit Fast Red gefärbt.

Die Objektträger werden anschließend für 10 Min. fließend gewässert und in Hämalaun gegengefärbt (20-60 Sec.). Nach erneutem Wässern (10 Min.) werden die Objektträger mit Aquatex oder Glyceringelatine eingedeckt.

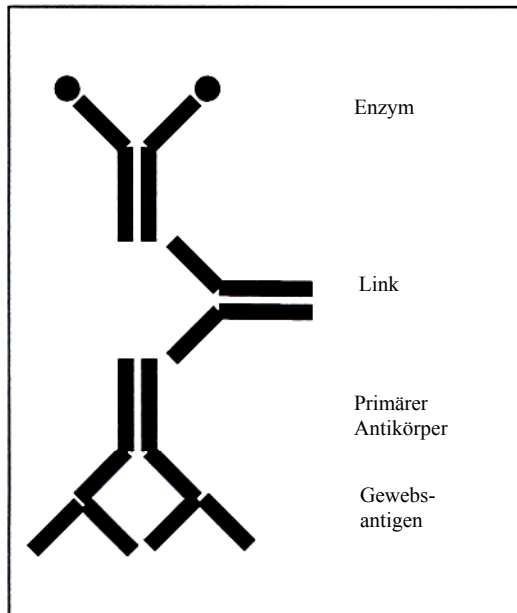


Abb. 5: Schematisch wird auf der nebenstehenden Abbildung der APAAP-Komplex gezeigt. Der primäre Antikörper greift auf dem Gewebsantigen. Durch einen Link (Antikörper) wird das Enzym an den primären Antikörper gekoppelt.

2.2.7. RNA-Isolierung

Nach dem Zellsortierexperiment konnten zwei Populationen isoliert werden, aus denen die Gesamt-RNA für eine Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) extrahiert wurde.

Zuerst werden die Zellen nach der Zellsortierung für 5 Min. bei 500 rpm aus ihrem Medium abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Um die Zellen zu lysieren, werden 350µl RNA-Lysis-Tissue-(RLT)-Puffer zugegeben. Nach kräftigem Mischen bis keine Zellklumpen mehr sichtbar sind, werden die Proben homogenisiert. Hierfür wird das Lysat in die QIA Shredder Säule pipettiert, die sich in einem 2 ml Sammelgefäß befindet und für 2 Min. bei 14000 rpm zentrifugiert.

Danach erfolgt als Waschschrift die Zugabe von 350 µl 70% Ethanol zum homogenisierten Lysat. Durch mehrmaliges Auf- und Absaugen der Probe mit der Pipette wird das Lysat gemischt. Die Probe gibt man dann in eine „RNeasy Minizentrifugationssäule, die sich in einem 2 ml Sammelgefäß befindet. Man zentrifugiert die Probe bei 10000 rpm für 15 Sec., die nun durch Zugeben von 700 µl RW1 Puffer aus dem RNeasy Kit gewaschen und wieder für 15 Sec. bei 10000 rpm zentrifugiert wird. Die RNeasy-Säule überführt man nun in ein neues 2ml Sammelgefäß und gibt 500 µl RPE Puffer zu. Danach wird wieder für 15 Sec. bei 10000 rpm zentrifugiert um die Probe zu waschen. Nachdem man 500 µl RPE-Puffer auf die RNeasy Säule gegeben hat, eluiert man die Säule durch Zentrifugation bei 14000 rpm.

Zum Schluß wird die RNeasy Säule in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß eingefüllt und 30-50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die RNeasy Säule gegeben. Am Schluß zentrifugiert man ein letztes Mal für 1 Min. bei 10000 rpm, um die RNA zu eluieren.

2.2.8. RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion)

Bei der RT-PCR wird zuerst RNA in cDNA umgeschrieben; anschließend folgt in einem zweiten Schritt die klassische PCR.

Für die Umschreibung der RNA in cDNA werden 2 µg RNA in 9,7 µl Aqua dest. gegeben. Die RNA stammt aus dem Zellsortierungsexperiment. 2 µl von verschiedenen Hexameren (Random Hexamers) werden aus einem 100 µM Vorrat zugegeben und bei 65 °C für 20 Min. inkubiert. Danach erfolgt ein Zentrifugationsschritt für 10 Sec., bevor man die Lösung auf Eis gibt.

Nach diesem vorbereitenden Schritt erfolgt die Zugabe von 4 µl fünffach konzentriertem „Puffer für den ersten Strang“ (first strand buffer), 2 µl 0,1M Dithiothreitol, 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase, 0,8 µl 25 mM d-Nukleotidtriphosphate und 0,5 µl Rnasin. Nun wird für 90 Min. bei 37 °C und anschließend für 10 Min. bei 70 °C inkubiert.

Als nächster Schritt folgt die PCR Reaktion. In dünnwandigen Reaktionsgefäßen werden 18,3 µl Aqua dest. vorgelegt und folgende Substanzen dazugegeben: 1,5 µl MgCl₂, 2,5 µl zehnfach konzentrierter „Puffer für den zweiten Strang“, 0,5 µl d-Nukleotriphosphate, 1µl von jedem Sense und Antisense Primer als Kontrolle, 1 µl Wasser oder Einzelstrang cDNA als Negativkontrolle und 0,2 µl Amplitaq gold.

Das PCR-Programm sieht einen aktivierenden Zyklus für 8 Min. bei 95 °C vor. Danach erfolgen 30 Zyklen von 10 Sec. bei 95 °C, 30 Sec. bei 56 °C und 30 Sec. bei 70 °C. Am Ende führt man

noch einen Elongationsschritt für 10 Min. bei 70 °C durch. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch Abkühlung auf 4 °C. Die Proben werden dann auf einem zweiprozentigen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.9. PCR der Expression alkalischer Phosphatase

Die Zellen wurden für 14 Tage in einem Medium, dem Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 10% FCS, Penicillin/Streptomycin, Glutamin, Dexamethason 10^{-8} M, Ascorbinsäure 0,2 mM, β -Glycerolphosphat 10mM, BMP2 1ng/ml, Vitamin D3 10^{-8} M inkubiert. Anschließend erfolgte die PCR.

Für die reverse Transkription werden pro Reaktion 1 μ l dNTPs (1mM), 2 μ l 5x RT-Puffer, 1 μ l Oligo(dT)₁₅ (100 ng/ μ l), 0,25 μ l Rnasin (40 U/ μ l) und 0,05 μ l M-MLV (200 U/ μ l) verwendet. Der PCR-Mix besteht aus 0,5 μ l Sense Primer der alkalischen Phosphatase (10 μ M) und 0,5 μ l Antisense Primers der alkalischen Phosphatase (10 μ M). 4 μ l des 10 x Puffers und 0,3 μ l der Taq Polymerase (5 U/ μ l) werden zugegeben und mit 16, 85 μ l H₂O aufgefüllt. Das PCR-Programm besteht aus folgenden Durchläufen: 2 Min. bei 94 °C, dann folgen 35 Zyklen von 30 Sec. bei 94 °C, 30 Sec. bei 58 °C und 45 Sec. bei 72 °C. Der abschließende Schritt ist 7 Min. bei 72°C. Die Reaktion wird gestoppt, indem auf 4 °C abgekühlt wird.

III. E R G E B N I S S E

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente zu den aus dem peripheren Blut etablierten Zelllinien V54/1 und V54/2 dargelegt. Ihnen werden die Ergebnisse der Versuche mit den aus dem Knochenmark etablierten Zelllinien L87/4 und L88/5 gegenübergestellt. Dabei werden zu jedem Experiment die Ergebnisse in der Reihenfolge L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 präsentiert. Am Ende der Darstellung der Ergebnisse jedes Experiments werden die Kontrollzelllinien, z.B. KG1a, HL60/Dox oder Mel Ju gezeigt. Zunächst wird ein kurzer Überblick über die in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse gegeben.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht die durchflußzytometrische Untersuchung der Zelllinien mit dem Farbstoff Rhodamin 123. Eine Subpopulation (Rh123^{low} Population) innerhalb der gesamten Zelllinie war in der Lage Rh123, nachdem es in die Zelle diffundiert war, über die mdr-kodierte P-Glykoproteinpumpe herauszupumpen. Der Rest der Zelllinie konnte das nicht (Rh123^{high} Population). Eine Hemmung dieser kalziumabhängigen Pumpe mit dem Kalziumantagonisten Verapamil soll die Funktionalität der P-Glykoproteinpumpe belegen. Durch eine Antikörperfärbung gegen das P-Glykoprotein soll der morphologische Beweis erbracht werden, ob P-Glykoprotein auf den Zelllinien vorhanden ist oder nicht.

Nach einem ähnlichen Prinzip wie die Rh123 Färbung funktioniert die Färbung mit Hoechst 33342. Dieser an die DNA bindende Farbstoff kann eine Aussage über den Anteil der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus geben. Hoechst 33342 kann aber auch von einer bestimmten Subpopulation aus der Zelle gepumpt werden, die nach Goodell et al. 1996 als SP-Zellen bezeichnet werden. SP-Zellen haben Stammzeleigenschaften, so z.B. eine hohe Repopulationskapazität in vivo.

Die Charakterisierung der Zellen wurde auch mit einer Reihe von Antikörpern gegen Oberflächenantigene durchgeführt. Hierbei wurden Antikörper gegen CD10, CD45, CD14, CD117, CD34, HLA-DR, SH2 und SH3 verwendet. Antikörperfärbungen *nach* Färbung mit Rh123 sollen Unterschiede zwischen den durch Rh123 unterscheidbaren Subpopulationen innerhalb der einzelnen Zelllinien verdeutlichen.

Die Rh123 Färbung ist die Basis für eine Zellsortieruntersuchung. Die Zellen, die in der Lage sind Rh123 aus der Zelle zu pumpen werden von denen die dies nicht können (Rh123^{high} Population) getrennt. Durch diese Zellsortieruntersuchung soll geklärt werden, ob Unterschiede in der Morphologie aber auch in der Expression von Funktionseinheiten innerhalb stammzellrelevanter Transkriptionsfaktor Netzwerke zwischen den durch Rh123 Färbung unterscheidbaren Subpopulationen bestehen.

3.1. Rhodamin 123-Färbung

Durch Charakterisierung von Zellpopulationen auf der Basis des Rh123 Effluxes können Zellen mit sich stark unterscheidenden biologischen Eigenschaften gefunden werden (Uchida et al., 1996). Uchida et al. zeigten, daß Rh123^{low} Zellen in vivo proliferieren und kopfsteinpflasterartige Areale (Cobblestone Area Forming Cells, CAFC) bilden können. Das CAFC-Wachstum ist offenbar mit Stammzeleigenschaften assoziiert. Rh123^{high} Zellen haben diese Eigenschaft nicht.

Die Färbung mit Rh123 an den von Thalmeier et al. als Stromazelllinien beschriebenen Linien L87/4, L88/5 und den bis dato uncharakterisierten Zelllinien V54/1, V54/2 ergab bei allen Klonen zwei Subpopulationen von Zellen. Die als Rh123^{low} bezeichnete Subpopulation ist in der Lage Rhodamin123 aus der Zelle zu pumpen. Ihr Anteil beträgt nach Abzug der toten Zellen, die in der Durchflußzytometrie eine ähnliche Absorption haben wie die Rh123^{low} Population, um die 10%. Die genauen Prozentsätze der einzelnen Subpopulationen werden in den folgenden Kapiteln zu den einzelnen Zelllinien dargestellt.

Die restlichen Zellen einer Zelllinie, die nicht zum Rhodamin Efflux befähigt sind, werden als Rh123^{high} Population bezeichnet.

Die Anfärbung der toten Zellen mit Propidiumjodid, das bei nicht intakter Zellmembran in die Zelle diffundiert, läßt eine Unterscheidung zwischen Zelldetritus und lebender Rh123^{low} Population zu. Durch die nachträgliche Färbung der mit Rh123 gefärbten Zellen mit Propidiumjodid (PJ) können tote Zellen erkannt und so von den lebenden Zellen getrennt werden. Das Problem, dass Rh123^{low} Zellen und tote Zellen eine ähnliche Absorption im Fluoreszenzkanal 1 (FLT1) haben, konnte somit gelöst werden. Die Hemmung des Rh123

Effluxes durch Verapamil weist darauf hin, dass es sich bei der Rh123^{low} Population um lebende Zellen handelt. Tote Zellen, die eine ähnliche Absorption wie die Rh123^{low} Population haben, zeigen keine Hemmung des Efflux-Mechanismus durch Verapamil. Ein weiterer Beweis dafür, dass die Rh123^{low} Population eine eigenständige, vitale Subpopulation ist, lässt sich aus dem Fehlen der Rh123^{low} Population ableiten, wenn die Zelllinie unmittelbar nach der Färbung mit Rh123 im Durchflußzytometer analysiert wird. Der Subpopulation Rh123^{low} wird nach der Färbung mit Rh123 30 Min. Zeit gegeben, Rh123 aus der Zelle zu pumpen. Verhindert man dies durch Abstoppen der Pumpfunktion durch Eis und sofortige FACS-Analyse nach der Färbung mit Rh123, dann stellt sich die Rh123^{low} Population nicht dar.

Die Tatsache, daß der Efflux durch die P-Glykoproteinpumpe oder einen anderen intrazellulären Mechanismus aktiv geschehen muß, konnte durch die Hemmung der P-Glykoproteinpumpe in der Rh123^{low} Population mit Verapamil bewiesen werden (Uchida et al., 1996).

Es wird nun die Rh123 Färbung, die Rh123^{high} und^{low} Population und die Hemmung des Effluxes durch Verapamil an den als Stromazelllinien beschriebenen Zelllinien L87/4 und L88/5 und den uncharakterisierten Zelllinien aus dem peripheren Blut V54/1 und V54/2 gezeigt. Als Kontrolle der Rh123 Färbung dient die Zelllinie KG1a.

3.1.1. Zelllinie L87/4

3.1.1.1. Rh123 Färbung

Die nun im Nachfolgenden geschilderten Ergebnisse zu der Zelllinie L87/4, wurden schon im Kapitel 2.2.1. kurz gezeigt. Dort wurde anhand dieser Abbildungen exemplarisch die durchflußzytometrische Untersuchung erklärt.

In der Abbildung FSC gegen SSC liegen im Gate „Gesamtpopulation“ die kohärenten Zellen. Inhaltlich erkennt man in der Abbildung 7 drei Subpopulationen, die durch die gesetzten Gates „Rh123^{high}“ (rot), „Rh123^{low}“ (grün) und „PJ“ (blau) eingerahmt werden. Diese Zellen stammen aus dem Gate „Gesamtpopulation“, das in dem Dotplot FSC gegen SSC eingetragen ist. Die statistische Auswertung der Ereignisse aus den Gates erfolgt im Kapitel 3.1.1.2..

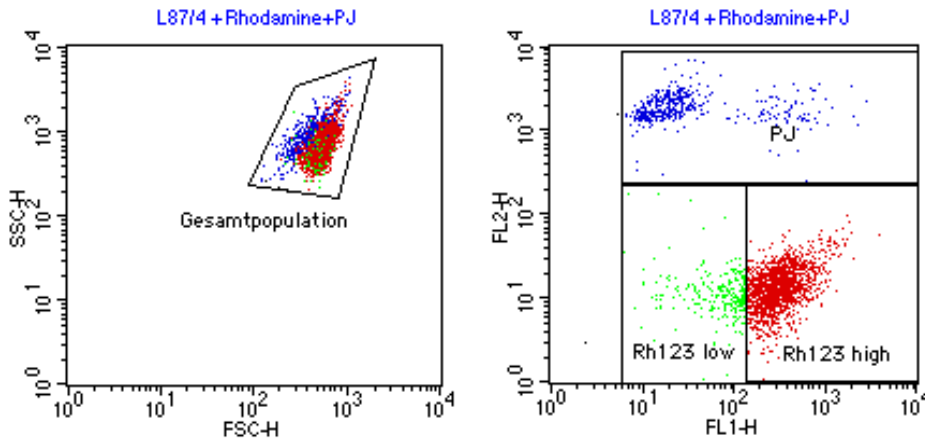


Abb. 7: Darstellung der durchflußzytometrischen Untersuchung von L87/4 nach Färbung mit Rh123. Das Gate „Gesamtpopulation“ gibt die analysierte Zellpopulation an. Der Dotplot FL1 gegen FL2 stellt L87/4 nach Färbung mit Rh123 und PJ dar.

3.1.1.2. Verapamilzugabe

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Darstellung im Durchflußzytometer nach Zugabe von Verapamil, das den Efflux von Rh123 hemmt, zu der mit Rh123 gefärbten Zellpopulation. Die Rh123 gefärbte Zellpopulation wurde schon im vorherigen Kapitel behandelt. Es zeigt sich, dass, sobald die Probe nach Rh123 Färbung mit Rh123 mit Verapamil inkubiert wird, die Rhodamin123^{low} Population nicht mehr in der Lage ist, Rhodamin123 aus der Zelle zu pumpen.

In der nächsten Abb. erkennt man die Hemmung der P-Glykoproteinpumpe nach Zugabe von Verapamil. Verapamil ist ein Kalziumantagonist und blockiert die kalziumabhängige P-Glykoproteinpumpe. In dem Gate „Rh123^{low}“ sieht man eine Abnahme nach Verapamilzugabe von 11,46% auf 0,89%, also um 10,57% in „%-Gated“ im Vergleich zur Rh123 Färbung ohne Verapamil. Diese Abnahme kommt durch die Hemmung des Effluxes von Rh123 durch Verapamil zustande. Die Zellen stellen sich in der Rh123^{high} Population dar, da sie Rh123 nicht aus der Zelle pumpen können.

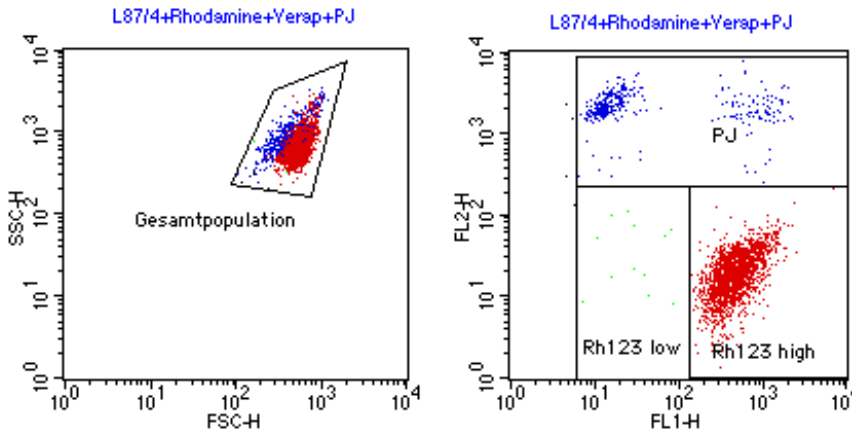


Abb. 8: Das rechte Punktdiagramm zeigt kaum noch Zellen im Gate „Rh123^{low}“ nach Verapamilzugabe.

3.2.1.3. Statistik

Die Tabelle zeigt die Statistik zu der Rh123 Färbung von L87/4 vor und nach Verapamilzugabe. In „%-Gated“ sieht man eine Zunahme der Zellen nach Verapamilzugabe, was durch die Hemmung des Rh123 Effluxes bedingt ist. Die Rh123^{low} Zellen stellen sich nach Verapamilzugabe im Gate Rh123^{high} dar. Der Wert von %-Gated nimmt von 71,01% auf 82,73% zu, dagegen nimmt der Wert in dem Rh123^{low} Gate nach Gabe von Verapamil von 11,46% auf 0,89% ab. Die Zellen der Rh123^{low} Population werden gehemmt und stellen sich nun im Gate der Rh123^{high} Population dar.

In der Tabelle 6 sieht man eine Statistik zu der FACS-Analyse der Zelllinie L87/4 vor und nach Verapamilzugabe. Die Statistik ist nach den Gates „Gesamtpopulation“, „Rh123^{high}“, „Rh123^{low}“ und „PJ“ getrennt. Diese Gates sind in den Abb. 7 und 8 dargestellt.

Als erstes wird die Anzahl der Zellen als Ereignisse dargestellt. Jedes Ereignis entspricht der Analyse einer Zelle im Laser des Durchflußzytometers nach Größe (FSC, Forwardscatter), Granularität (SSC, Sidewardscatter), FL1 (Rhodamin 123) und FL2 (Propidiumjodid). Das „%-Gated“ gibt an, wie viel Prozent der im Gate „Gesamtpopulation“ liegenden Zellen sich auf die einzelnen Gates verteilen. Das „Diff. %-Gated“ ist die Differenz der Werte von „%-Gated“ vor und nach Verapamilzugabe. Aus diesen Werten lässt sich erkennen, ob die Zellzahl innerhalb eines Gates nach Verapamilzugabe zunimmt oder abnimmt. Bei Abnahme der Zellzahl hat der Wert ein negatives Vorzeichen. Besondere Bedeutung hat die Abnahme des Wertes im Gate „Rh123^{low}“ nach Verapamilzugabe, denn er spiegelt die Hemmung der P-Glykoproteinpumpe wieder. Anhand der Werte in „Diff %-Gated“ lässt sich beweisen, dass die Abnahme der Zellen

im Gate „Rh123^{low}“ nicht durch tote Zellen bedingt sein kann. Denn diese würden sich im Gate „PJ“ als Propidiumjodid gefärbte Zellen darstellen, was eine Abnahme der Zellen im Gate „Rh123^{low}“ erklären könnte. Der Anteil der Zellen im Gate „Rh123^{high}“ nimmt nach Verapamilzugabe zu, was durch eine Verlagerung der Rh123^{low} Zellen in das Gate „Rh123^{high}“ bedingt ist.

„%-Gesamt“ gibt an, wie viel Prozent der Zellen aller gemessenen Ereignisse, also Gesamtpopulation plus Zelldetritus, sich auf die einzelnen Gates aufteilen. „X-MW“ ist der Mittelwert der Ordinatenwerte. Er ist die Summe der Ordinatenwerte der einzelnen Ereignisse geteilt durch die Anzahl der Ereignisse. „Y-MW“ ist der Mittelwert der Abszisse. Man erhält ihn durch Addition der Y-Werte geteilt durch ihre Anzahl. Zum Beispiel ist der Mittelwert der Fluoreszenz1 (Kanal der Rhodaminfärbung) der Rh123^{high} Population 365,27 und der der Rh123^{low} Population nur 79,88. Dies macht den Unterschied im Rh123-Gehalt zwischen den Zellen der Rh123^{high} und der Rh123^{low} Population deutlich. Der „X-Geo MW“ und „Y-Geo MW“ sind die geometrischen Mittelwerte der X- und Y- Werte. Der geometrische Mittelwert ist der Faktor der n Einzelwerte durch die n-te Wurzel. Px und Py stehen für die Parameter der einzelnen Gates.

Region	Verapamil	Ereignisse	%Gated	diff. %Gated	%Gesamt	X MW	X Geo MW	Y MW	Y Geo MW	Px,Py
Gesamt-Population	kein V.	9164	100.00	0.00	91.64	290.07	177.01	372.17	31.72	1,2
	Verapamil	9362	100.00		93.62	478.93	309.13	408.79	39.32	1,2
Rh123 high	kein V.	6507	71.01	11.72	65.07	365.27	320.12	15.91	13.37	3,4
	Verapamil	7745	82.73		77.45	526.93	468.57	21.65	17.89	3,4
Rh123 low	kein V.	1050	11.46	- 10.57	10.50	79.88	66.79	14.75	10.93	3,4
	Verapamil	83	0.89		0.83	60.65	44.13	41.77	20.94	3,4
PJ	kein V.	1640	17.90	- 1.69	16.40	123.95	32.83	2005.62	1865.86	3,4
	Verapamil	1525	16.29		15.25	259.79	42.63	2378.10	2168.18	3,4

Tab. 6: Die statistischen Variablen der Rh123 und der PJ Färbung vor und nach Verapamilzugabe werden demonstriert. L87/4 hat eine Population, die durch die Zugabe von Verapamil am Efflux von Rh123 gehindert wird. Diese Population beträgt 10,57% der Gesamtpopulation.

3.2.2. Zelllinie L88/5

3.2.2.1. Rhodamin-Zugabe

Die Zelllinie L88/5 verhält sich, was die Rh123 Färbung anbelangt, ähnlich wie L87/4. Die Daten wurden nach dem Prinzip erhoben, wie es für die Zelllinie L87/4 beschrieben wurde.

Ein Unterschied zwischen den Zelllinien L88/5 und L87/4 besteht jedoch darin, dass weniger Zellen vorhanden sind, die zum aktiven Efflux von Rh123 befähigt sind. Der Anteil der Rh123^{low} Population beträgt in „%-Gated“ 7,97%.

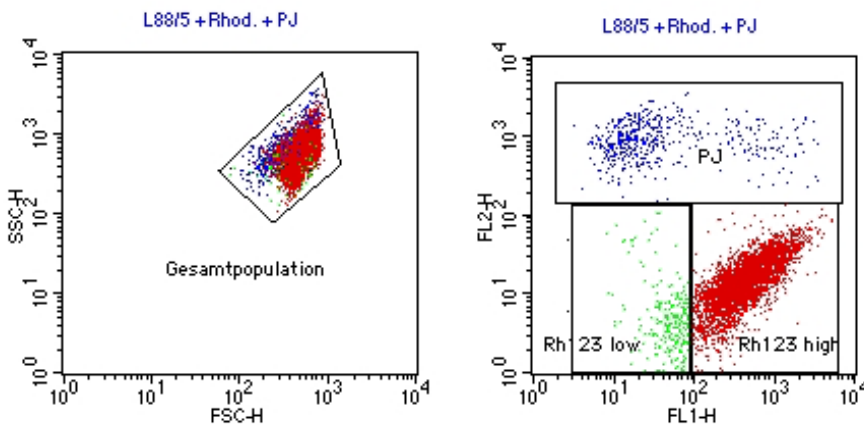


Abb. 9: Die Abbildung zeigt die Zelllinie L88/5 nach Färbung mit Rh123 und PJ. Im „Rh123^{low}“ Gate sind 11,46% der Zellen der Gesamtpopulation.

3.2.2.2. Verapamilzugabe

Bei der Inkubation der Zelllinie L88/5 mit Rh123 und Verapamil verringert sich der Prozentsatz der Zellen in der Rh123^{low} Population um 5,8% auf 2,17% in %-Gated.

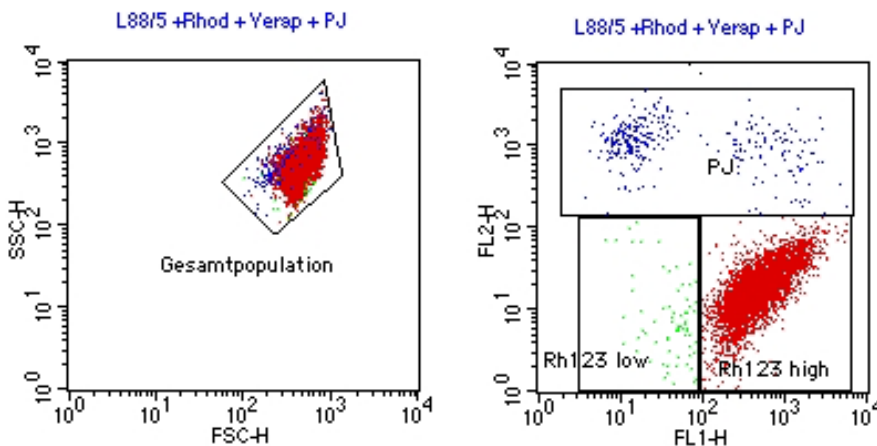


Abb. 10: Die Abbildung zeigt die mit Rh123 gefärbte Zelllinie L88/5 nach Verapamilzugabe. Der Anteil der Zellen im Gate „ Rh123^{low}“ hat durch die Verapamilzugabe um 5,8% abgenommen.

3.2.2.3. Statistik

Die Tabelle gibt die Statistik der Rh123 Färbung vor und nach Verapamilzugabe an. Aus der Tabelle lassen sich anhand der Werte von „Diff. %Gated“ die Zellverschiebungen zwischen den Gates vor und nach Verapamilzugabe erkennen. Besonders wichtig ist hierbei die Abnahme der Zellzahl im Gate „Rh123^{lowcc}“ um 5,8% durch Verapamil.

Region	Verapamil	Ereignisse	%Gated	Diff. %-Gated	%Gesamt	X MW	X Geo MW	Y MW	Y Geo MW	Px,Py
Gesamt- Population	kein V.	19603	100.00	0.00	98.02	489.99	293.61	113.47	19.51	1, 2
	Verapamil	19611	100.00		98.06	585.44	399.08	105.00	22.60	1, 2
Rh123 high	kein V.	16089	82.07	9.3	80.45	569.33	444.55	36968	14.27	3, 4
	Verapamil	17918	91.37		89.59	612.46	482.56	22.47	17.71	3, 4
Rh123 low	kein V.	1563	7.97	-5.8	7.82	62.41	53.32	11.27	5.21	3, 4
	Verapamil	426	2.17		2.13	58.37	47.13	17.10	7.37	3, 4
PJ	kein V.	1876	9.57	-3.36	9.38	181.19	36.13	1021.22	894.04	3, 4
	Verapamil	1243	6.34		6.22	385.77	55.32	1309.78	1127.36	3, 4

Tab. 7: Die statistischen Variablen der Rh123 und der PJ Färbung vor und nach Verapamilzugabe werden demonstriert. L88/5 hat eine Population, die durch die Zugabe von Verapamil am Efflux von Rh123 gehindert wird. Diese Population beträgt 5,8% der Gesamtpopulation.

3.2.3. Zelllinie V54/1**3.2.3.1. Rhodamin-Zugabe**

Nach der Färbung der Zelllinie V54/2 mit Rh123 beträgt der Anteil der Zellen im „Rh123^{lowcc}“ Gate 6,71%. Die Daten wurden nach dem Prinzip erhoben, wie es bei der Zelllinie L87/4 exemplarisch beschrieben wurde.

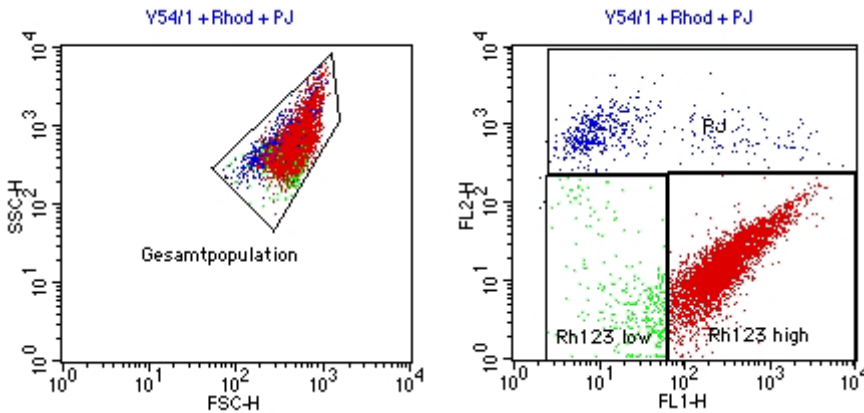


Abb. 11: Die Abbildung zeigt die Zelllinie L88/5 nach Färbung mit Rh123 und P.J. In dem Gate „Rh123^{low}“ sind 11,46% der Zellen der Gesamtpopulation.

3.2.3.2. Verapamilzugabe

Bei der Inkubation der mit Rh123 gefärbten Zellen von V54/1 mit Verapamil nimmt die Rh123^{low} Population um 3,02% auf 3,69% in %-Gated ab.

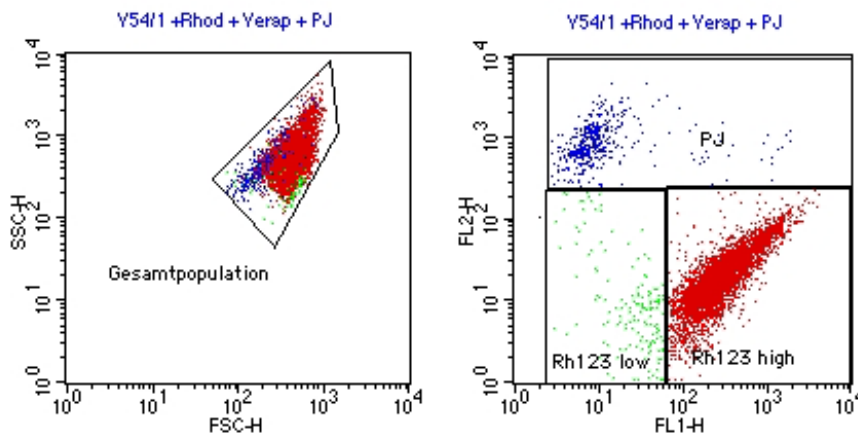


Abb. 12: Die Abbildung zeigt die mit Rh123 gefärbte Zelllinie V54/1 nach Verapamilzugabe. Der Anteil der Zellen im Gate „Rh123^{low}“ hat durch die Verapamilzugabe abgenommen.

3.2.3.3. Statistik

Die Statistik für die Zelllinie V54/1 wird in der nachfolgenden Tabelle angegeben. Nach Verapamilzugabe nimmt der Anteil der Zellen im Gate „Rh123^{low}“ um 3,02% ab. Der Anteil der Zellen im Gate „Rh123^{high}“ nimmt nach Verapamilzugabe zu. Dies kommt zwingend durch eine Hemmung des Effluxes von Rh123 aus der Zelle und nicht durch eine Verlagerung von Zellen aus

dem Gate „Rh123^{lowcc}“ in das Gate „PJ“ zustande. Denn nach Verapamilzugabe nimmt die Zellzahl im Gate „PJ“ ab. Es ist also zu einer Zellverschiebung vom Gate „Rh123^{lowcc}“ zum Gate „Rh123^{highcc}“ gekommen.

Region	Verapamil	Ereignisse	%Gated	diff. %Gated	%Gesamt	X MW	X Geo MW	Y MW	Y Geo MW	Px,Py
Gesamt- Population	kein V.	19391	100.00	0.00	96.96	367.61	187.66	114.53	21.96	1, 2
	Verapamil	19489	100.00		97.45	335.74	196.11	118.11	25.39	1, 2
Rh123 high	kein V.	15956	82.29	4.62	79.78	424.68	300.50	22.18	15.58	3, 4
	Verapamil	16937	86.91		84.69	379.05	290.32	24.99	18.43	3, 4
Rh123 low	kein V.	1302	6.71	-3.02	6.51	31.95	25.27	18.18	5.84	3, 4
	Verapamil	720	3.69		3.69	31.66	25.07	22.65	8.26	3, 4
PJ	kein V.	2052	10.58	-1,39	10.26	156.23	18.67	896.81	779.22	3, 4
	Verapamil	1773	9.19		8.87	61.52	11.52	1036.46	880.54	3, 4

Tab. 8: Die statistischen Variablen der Rh123 und der PJ Färbung vor und nach Verapamilzugabe werden demonstriert. V54/1 hat eine durch die Zugabe von Verapamil hemmbare Rh123^{low} Population von 3.02%.

3.2.4. Zelllinie V54/2

3.2.4.1. Rhodamin-Zugabe

Das anhand der Zelllinie L87/4 beispielhaft erklärte Prinzip der Rh123 Färbung und die Hemmung des Effluxes der Rh123^{low} Population mit Verapamil wurde auch an V54/2 durchgeführt. Diese Zelllinie hat einen Anteil von 5,69% in der Rh123^{low} Population. Deutlich sieht man auch durch die Propidiumjodidzugabe, dass der größte Teil der toten Zellen aus dem Bereich stammt, der eine ähnliche Fluoreszenz hat, wie die Rh123^{low} Population.

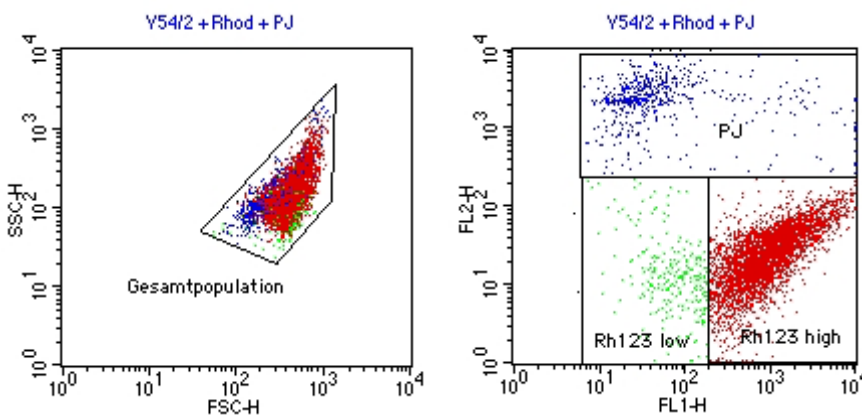


Abb. 13: Die Abbildung zeigt die Zelllinie V54/2 nach Färbung mit Rh123 und PJ. In dem Gate „Rh123^{low}“ sind 5,7% der Zellen der Gesamtpopulation.

3.2.4.2. Verapamilzugabe

Die Zellen wurden erst mit Rh123 inkubiert und dann Verapamil zugegeben um die P-Glykoproteinpumpe zu hemmen. Nach Verapamilzugabe kommt es zu einer Hemmung der Rh123^{low} Population um 1,88% auf 3,81% in %-Gated. Wie sich auch bei den anderen Zelllinien erkennen lässt, kommt der größte Anteil der toten Zellen aus dem Absorptionsbereich, in dem sich auch die Rh123^{low} Population darstellt.

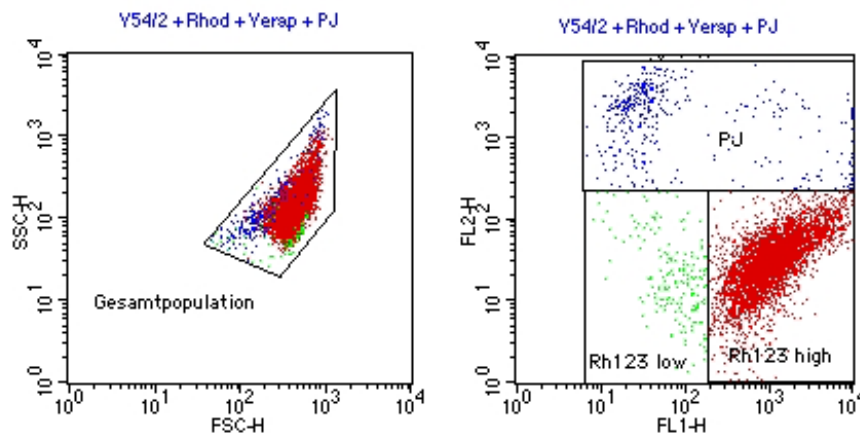


Abb. 14: Die Abbildung zeigt die mit Rh123 gefärbte Zelllinie V54/1 nach Verapamilzugabe. Der Anteil der Zellen im Gate „Rh123^{low}“ hat durch die Verapamilzugabe abgenommen.

3.2.4.3. Statistik

Die nachfolgende Tabelle demonstriert die Statistik zur Rh123 Färbung. Für die einzelnen Gates sind jeweils die Werte vor und nach Verapamilzugabe gezeigt. Das „Diff. %-Gated“ unterstreicht die Hemmbarkeit der P-Glykoproteinpumpe der Rh123^{low} Population.

Region	Verapamil	Ereignisse	%Gated	diff. %Gated	%Gesamt	X MW	X Geo MW	Y MW	Y Geo MW	Px,Py
Gesamt- Population	kein V.	19439	100.00	0.00	97.20	1209.28	611.44	368.62	39.38	1, 2
	Verapamil	19512	100.00		97.56	1463.62	823.51	271.22	42.29	1, 2
Rh123 high	kein V.	16002	82.32	4.97	80.01	1383.19	988.37	31.71	23.58	3, 4
	Verapamil	17032	87.29		85.16	1559.53	1152.39	39.93	29.81	3, 4
Rh123 low	kein V.	1106	5.69	-1.88	5.53	95.43	76.44	25.69	21155	3, 4
	Verapamil	744	3.81		3.72	96.72	78.52	33.41	16.91	3, 4
PJ	kein V.	1720	11.78	-2.96	11.45	554.01	60.95	2724.28	2229.98	3, 4
	Verapamil	2289	8.82		8.60	1127.01	85.06	2526.34	1852.59	3, 4

Tab. 9: Die statistischen Variablen der Rh123 und der PJ Färbung vor und nach Verapamilzugabe werden demonstriert. V54/1 hat eine durch die Zugabe von Verapamil hemmbare Rh123^{low} Population von 3,02%

3.2.5. Kontrollzelllinie KG1a

3.2.5.1. Rhodamin und die Hemmung des Effluxes durch Verapamil

Als Kontrollpopulation für die Versuche mit Rh123 wurde die Zelllinie KG1a verwendet. Sie eignet sich deswegen für die Rh123 Färbung mit anschließender Verapamilhemmung, weil diese Zelllinie positiv für die P-Glykoproteinpumpe ist. Nach Aufnahme von Rh123 pumpt die Zelle Rh123 mit einer sehr hohen Geschwindigkeit aus der Zelle. Dies zeigen unsere Kinetikstudien der Pumpe. Die Zelle erscheint trotz Inkubation mit Rh123 in der FACS-Untersuchung ungefärbt, da sie den Farbstoff aus der Zelle pumpt. Gibt man den Hemmstoff Verapamil zur Inkubation mit Rh123, so wird der Efflux durch die P-Gp gehemmt und die gesamte Zelllinie KG1a erscheint mit Rh123 gefärbt, da alle Zellen eine funktionell aktive P-Glykoproteinpumpe haben.

Für das Experiment der Effluxhemmung von Rh123 dient KG1a als Positivkontrolle. Zur genauen Analyse eines Farbstoffs wird die Darstellung im Histogramm gewählt. Das Histogramm bietet die Möglichkeit, die Zahl von Ereignissen und deren Verteilung innerhalb eines Fluoreszenzkanals sehr genau aufzuzeigen. Bei den anderen Zelllinien wurde nicht nur mit Rh123 gefärbt, sondern auch mit Propidiumjodid, das die toten Zellen darstellt. Deswegen wurde die Darstellung im Punktdiagramm gewählt. Die Anzahl der toten Zellen ist bei der Kontrolle nicht relevant, sondern die genaue Darstellung der Färbung mit Rh123 und die Hemmung der P-Glykoproteinpumpe mit Verapamil.

In Abb. 15a erkennt man die ungefärbte KG1a Zelle. Abb. 15b zeigt KG1a nach Zugabe von Rh123. Da das Rh123 sehr schnell aus der Zelle gepumpt wird, stellt sich KG1a ungefärbt dar.

Das Histogramm in Abb. 15c ist eine Darstellung mit einem sogenannten „Overlay“. Grün stellt sich KG1a ungefärbt dar, wie schon in Abb. 15a. Das Blaue Histogramm in Abb. 15c zeigt die

deutliche Rh123-Anfärbung von KG1a, wenn man den Rhodamin-Efflux durch die Zugabe von Verapamil nach Färbung mit Rh123 hemmt.

Abb. 15a:

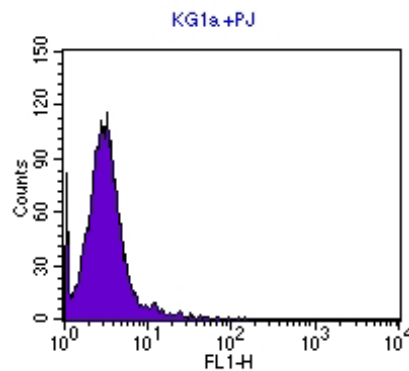


Abb. 15b:

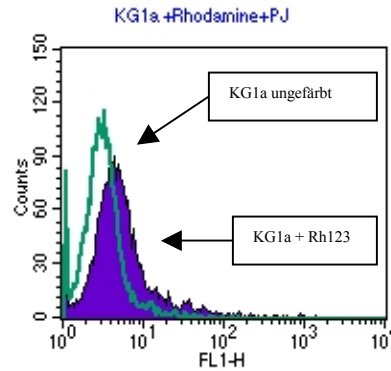


Abb. 15c:

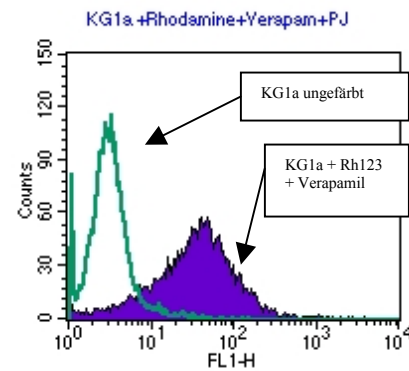


Abb. 15: In 15a sieht man die ungefärbte Zelllinie KG1a. 15b zeigt KG1a nach Rh123-Zugabe. Die Zellen pumpen Rh123 durch die P-Glykoproteinpumpe heraus, weswegen sich die Zellen ungefärbt darstellen. 15c demonstriert die Anfärbung von KG1a nach Rh123-Zugabe und Verapamil-Inkubation.

3.2.5.2. Statistik

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Rh123 Färbung vor und nach Verapamilzugabe der Kontrollzelllinie KG1a an. Die in der Tabelle gezeigten Spalten „Linke Grenze“ und „Rechte Grenze“ geben den Bereich an, von dem Werte in die Statistik eingehen. Es wurde keine Abgrenzung vorgenommen und daher fallen alle Ereignisse in den Analysebereich. Die Spalte „Ereignisse“ gibt die Zahl der gemessenen Zellen an, der „Geo-MW“ steht für den geometrischen Mittelwert, „SA“ steht für Standardabweichung und „VK“ gibt den Variationskoeffizient an. Der „Peak“-Wert gibt die Zahl der Ereignisse am höchsten Punkt innerhalb des gemessenen Bereiches an.

Färbung	Linke Grenze	Rechte Grenze	Ereignisse	MW	Geo MW	SA	VK	Median	Peak
KG1a ungefärbt	1	9910	10000	3.46	3.01	3.29	95.28	2.94	115
KG1a Rh123	1	9910	10000	8.01	5.11	26.11	325.87	4.61	89
KG1a Rh123 Verapamil	1	9910	10000	51.88	32.66	82.07	158.20	36.52	57

Tab. 10: Die Tabelle zeigt die statistischen Variablen zu den Histogrammen, in denen die Kontrollzelllinie KG1a dargestellt wird. Die starke Zunahme der Werte in der FL1 nach Verapamilzugabe beweist, dass die Hemmung des Effluxes von Rh123 durch Verapamil funktioniert.

Die in diesem Kapitel dargelegte Färbung mit Rh123 und die Aufklärung einer Subpopulation von Zellen, die in der Lage ist, Rh123 aus der Zelle zu pumpen, war die Grundlage für das im nächsten 7. Kapitel dargestellte Zellsortierungsexperiment.

Zusammenfassung der Rhodamin123- Färbung:

- Mit Hilfe der Rh123 Färbung lassen sich innerhalb der Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 zwei Subpopulationen unterscheiden:
 1. Die Rh123^{low} Population kann Rh123 aus der Zelle pumpen.
 2. Die Rh123^{high} Population kann Rh123 **nicht** aus der Zelle pumpen.
- Ursache des Effluxes von Rh123 aus der Zelle ist die P-Glykoproteinpumpe, die durch Verapamil hemmbar ist.
- Durch Propidiumjodidgabe und Untersuchung der Zellverschiebungen innerhalb der Gates konnte die Vitalität der Subpopulationen bewiesen werden.
- KG1a ist eine geeignete Positivkontrolle für die Rh123 Färbung und deren Hemmung durch Verapamil.

3.3. Hoechst 33342-Färbung

3.3.1. Untersuchungen des Zellzyklus

Durch Färbungen mit Hoechst 33342 kann man, bedingt durch die Eigenschaft des Farbstoffes an DNS zu binden, die sich in Abhängigkeit vom Stadium des Zellzyklus quantitativ verändert, den Anteil einer Zellpopulation in den Phasen G_1 , S und G_2M erkennen. In der G_1 -Phase haben die Zellen einen diploiden Chromosomensatz, in der S-Phase wird die DNS synthetisiert und schließlich ist in der G_2M -Phase ein tetraploider Chromosomensatz vorhanden. Auf der Basis der unterschiedlichen DNA Menge kommt es zur unterschiedlichen Anfärbung der Zellen. In der nachfolgenden Graphik wird die Hoechstoffärbung an L87/4, L88/5, V54/1, V54/2 und der Kontrollzelllinie HL60/Dox demonstriert.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die G_1 Phase bei einer niedrigen Fluoreszenz. Danach folgt die SPhase und mit der höchsten Fluoreszenz die G_2M Phase. Bei den Stromazelllinien L87/4 und L88/5 ist der Anteil der Zellen in der G_1 Phase größer und in der G_2M Phase kleiner im Gegensatz zu den Zelllinien V54/1 und V54/2, die aus dem peripheren Blut isoliert wurden. Der Anteil der Zellen von L88/5 und V54/1, die sich in der SPhase befinden, ist geringer als bei L87/4 und V54/2. Ein geringer Anteil von Zellen in der SPhase spricht für ruhende Zellen.

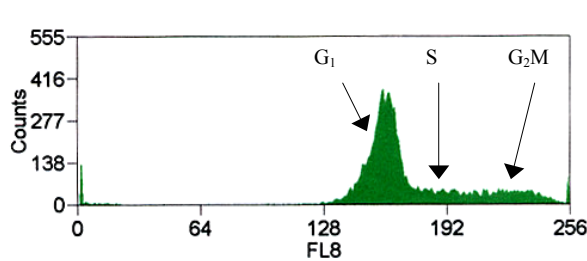


Abb. 16.

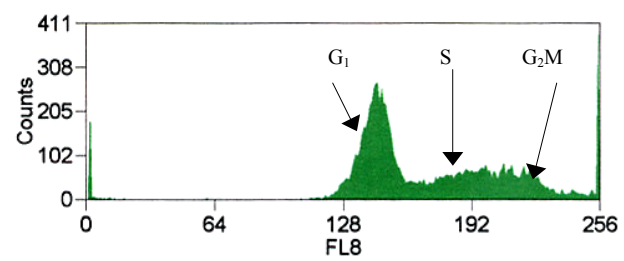


Abb. 16b.

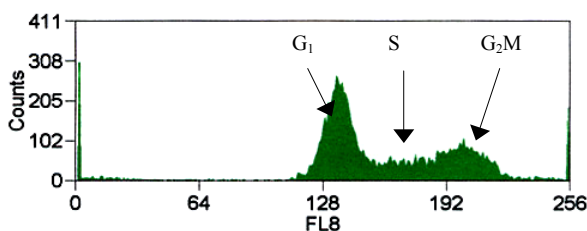


Abb. 16c.

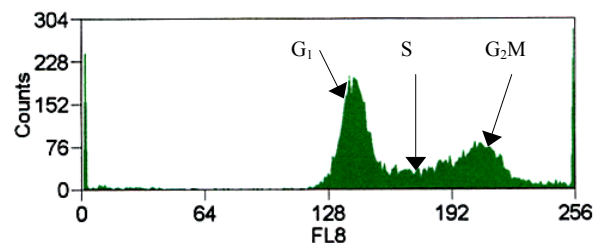


Abb. 16d.

Abb. 16: Die Bilder zeigen die Zelllinien in einer Färbung mit Hoechst 33342. FL8 ist der Kanal, in dem sich Hoechst 33342 darstellt. Die Abszisse gibt mit „Counts“ die gemessenen Ereignisse an. Hoechst stellt den Anteil in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus dar. In a. erkennt man L87/4, in b. L88/5, in c. V54/1 und in d. V54/2.

3.3.2. Statistik

Die nachfolgende Tabelle beinhaltet die Statistik der Hoechstfärbung. Man erkennt einen größeren Zellanteil der Zelllinien L87/4 und L88/5 in der G₁-Phase und einen kleineren Anteil in der G₂M-Phase. Im Gegensatz dazu zeigen die aus dem peripheren Blut gewonnenen Zelllinien V54/1 und V54/2 eine geringere G₁-Phase und eine größere G₂M-Phase.

Die S-Phase ist bei L88/5 und V54/1 kleiner als bei den Zelllinien L87/4 und V54/2. Wenn sich viele Zellen einer Zelllinie in der S-Phase befinden, dann sind die Zellen aktiv und mit DNS-Synthese beschäftigt. Ein kleiner Anteil von Zellen in der S-Phase spricht für ruhende Zellen. „SA“ steht in der nachfolgenden Tabelle für Standardabweichung.

Zelllinie	G1		S		G2M	
	Anteil %	SA	Anteil %	SA	Anteil %	SA
L87/4	64	22.87	28	21.15	6	27.29
L88/5	54	40.07	35	33.04	10	24.11
V54/1	37	28.04	32	21.52	14	17.16
V54/2	47	23.98	36	28.36	15	12.77

Tab. 11: Die Tabelle zeigt die Statistik der Zellzyklusstudien mit Hoechst 33342. L87/4 und L88/5 haben im Gegensatz zu den Zelllinien V54/1 und V54/2 mehr Zellen in der G₁-Phase und weniger in der G₂M-Phase. L87/4 und V54/1 haben weniger Zellen in der S-Phase als die Zelllinien L88/5 und V54/2. SA steht für Standardabweichung.

3.3.3. Side-Population (SP)

Hoechst 33342 bietet nicht nur die Möglichkeit, den Anteil der Zellen einer Population in den einzelnen Phasen des Zellzyklus darzustellen, sondern es können auch Subpopulationen von Zellen identifiziert werden, die Eigenschaften von Stammzellen haben. Goodell et al. zeigten 1996, dass allein durch die Eigenschaft, Hoechst 33342 aus der Zelle zu pumpen, Zellen innerhalb einer Gesamtpopulation isoliert werden können, die eine tausendfache Repopulationskapazität in tödlich bestrahlten Mäusen haben. Diese Zellen werden als Side-Population-Zellen (SP-Zellen) bezeichnet.

In allen untersuchten Zelllinien konnte ein kleiner Anteil von SP-Zellen durch Hoechstfärbung gefunden werden. Als Kontrolle wurde die Zelllinie HL60/Dox verwendet, die zu 91,97 % in der Lage war, Hoechst 33342 aus der Zelle zu pumpen (siehe Abb. 17).

In der nachfolgenden Tabelle wird der Anteil an SP-Zellen an der Gesamtpopulation prozentual angegeben.

	L87/4	L88/5	V54/1	V54/2	HL60/Dox
SP-Anteil %	0.16	0.15	0.96	0.43	91.97

Tab. 12: Die Tabelle zeigt den Anteil an Zellen der einzelnen Zelllinien, die als Side Population bezeichnet werden.

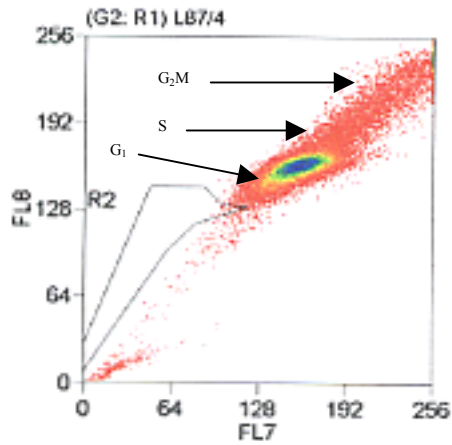


Abb. 17a.

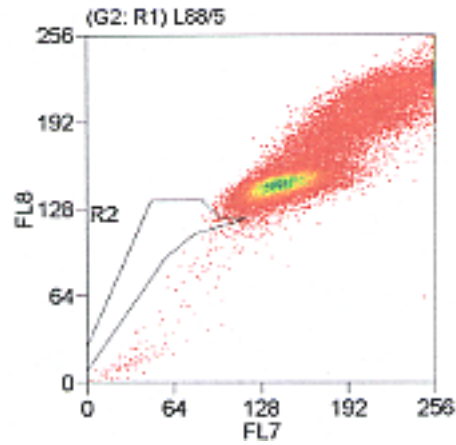


Abb. 17b.

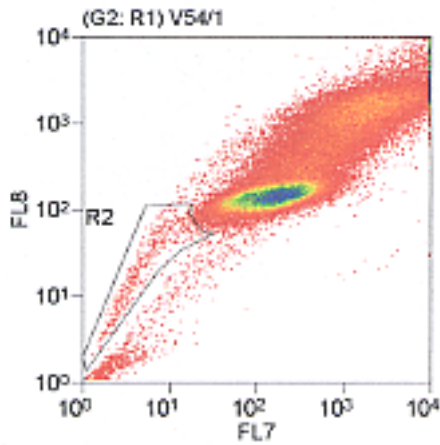


Abb. 17c.

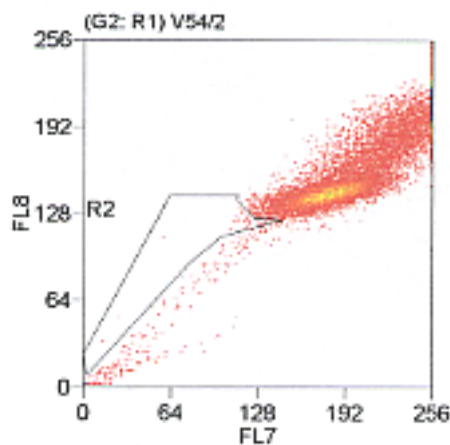


Abb. 17d.

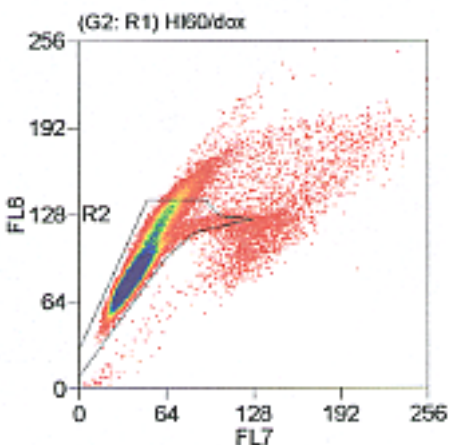


Abb. 17e.

Abb. 17: Die Abb.17 zeigt die Zelllinie L87/4 in Abb. 17a, L88/5 in Abb. 17b, V54/1 in Abb. 17c.; V54/2 in Abb. 17d: und als Positivkontrolle HL60/Dox in Abb. 17e nach der Färbung mit Hoechst 33342. In Abb. 17a sind die Ereignisse die den Zellzyklusstudien aus Kapitel 3.2. entsprechen eingetragen. Das als R4 bezeichnete Gate beinhaltet die SP-Zellen. Zu beachten ist, dass bei der Zelllinie V54/2 um den Faktor10 weniger Zellen gezählt wurden, als bei den anderen Zelllinien.

Zusammenfassung der Hoechst 33342- Färbung:

- Die aus dem peripheren Blut etablierten Zelllinien V54/1 und V54/2 zeigen einen kleineren Anteil an Zellen in der G₁-Phase als L87/4 und L88/5.
- Ihr Anteil an der G₂M-Phase ist ebenfalls kleiner.
- Die Zelllinien V54/1 und V54/2 weisen einen drei- bis siebenfach höheren Anteil an SP-Zellen auf.

3.4. Antikörperfärbung gegen P-Glykoprotein

Nach dem Nachweis ein funktionierenden P-Glykoproteinpumpe durch die Rh123 Färbung wurde als nächster Schritt der direkte Nachweis der Pumpe auf der Oberfläche der Zellen angestrebt. Auch hierzu diente die durchflußzytometrische Untersuchung. Zuerst wurde eine Rh123 Färbung der Zelle vorgenommen, danach eine Färbung mit einem Antikörper gegen das P-Gp. Der P-Gp Antikörper war Pycoerytrin (PE) markiert, d.h. er stellte sich in der FL2 dar und ermöglichte somit eine gleichzeitige Darstellung der Funktionalität des Effluxes in Form der Rh123 Färbung (FL1).

3.4.1. Zelllinie L87/4**3.4.1.1. Antikörper gegen P-Glykoprotein**

In den nächsten Abbildungen sieht man eine Färbung der Zelllinie L87/4 mit Rh123. Es wurde das Prinzip der Rh123 Färbung angewendet, wie es schon im 2. Kapitel „Rhodamin 123-Färbung“ beschrieben wurde. Zusätzlich wurde mit einem PE markierten Antikörper gegen das P-Glykoprotein gefärbt. Da sich Rhodamin in zwei unterschiedlichen Kanälen darstellt, kann man gleichzeitig die Rhodamin-Färbung und die Antikörperfärbung gegen das P-Glykoprotein ablesen.

Die Abb. 18 zeigt die mit Rh123 gefärbte Zelllinie L87/4. Es wurde noch kein Antikörper gegen die P-Glykoproteinpumpe eingesetzt. Man erkennt zwei Gates. Das eine Gate ist als „Rh123^{lowcc}“ und das andere als „P-Gp“ für das P-Glykoprotein bezeichnet. Die Rh123^{high} Population ist mit ihrer Farbkennung grün gefärbt; ihr Gate wird nicht gezeigt. Die Abbildung belegt die Situation vor der Antikörperfärbungen gegen P-Glykoprotein.

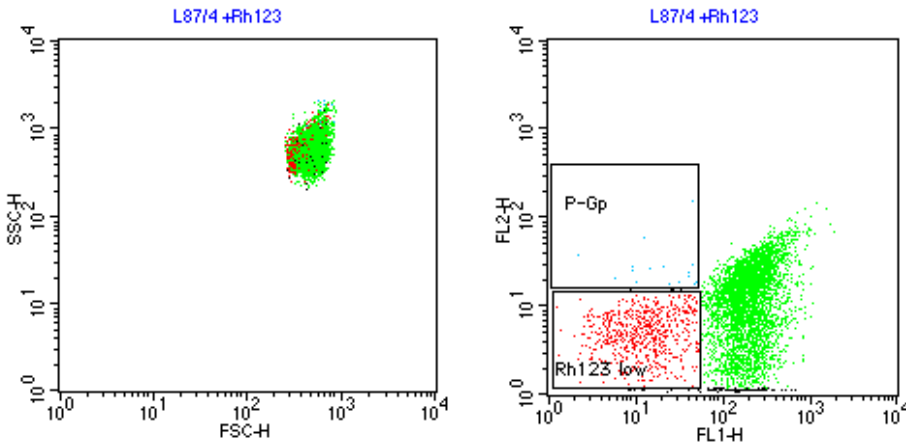


Abb. 18: L87/4 nach Färbung mit Rh123, aber vor Färbung mit dem Antikörper gegen P-Glykoprotein. Im Gate „P-Gp“ befinden sich nur wenige Ereignisse, die durch unspezifische Färbung zustande kommen.

Als nächstes wird die Darstellung der Rh123-gefärbten Zelllinie L87/4 nach Zugabe des PE-markierten Antikörpers gegen P-Glykoprotein gezeigt. In der folgenden Abb. 19 beobachtet man, dass die Ergebnisse mit dem PE markierten Antikörper gegen P-Gp nur aus der Rh123^{low} Population stammen. Über der Rh123^{high} Population (grün) stellen sich keine PE markierten Zellen dar. Daraus lässt sich schließen, dass die Rh123^{low} Population im Gegensatz zur Rh123^{high} Population P-Gp auf seiner Oberfläche exprimiert. Das stellt eine weitere Bestätigung für die Unterschiedlichkeit zwischen der Rh123^{low} und der Rh123^{high} Population dar. Die Tatsache, dass sich die Rh123^{low} Population durch Hemmung der Efflux-Pumpe durch Verapamil mit Rh123 anfärbt, wurde schon im 2. Kapitel über die Rh123 Färbung als Beweis für eine durch Verapamil hemmbare Efflux-Pumpe beschrieben. Der direkte Nachweis von P-Glykoprotein auf der Oberfläche als Beweis eines Effluxmechanismus ist also in Kohärenz mit dem durch Verapamil hemmbaren Rh123-Efflux.

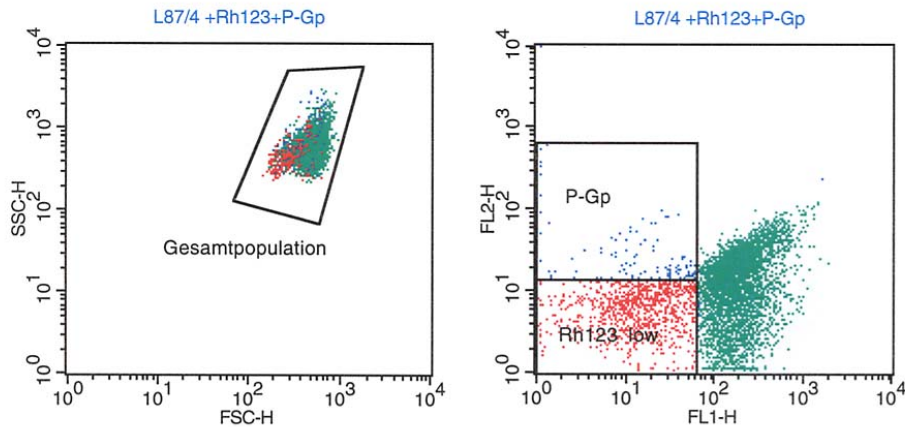


Abb. 19: Man erkennt die Zelllinie L87/4 nach Färbung mit Rh123 und dem Antikörper gegen P-Glykoprotein. Im Gate „P-Gp“ befinden sich 2,40% der Zellen.

Als nächstes wurde versucht, den Rh123-Efflux mit Verapamil zu hemmen und dann den Antikörper gegen P-Glykoprotein zuzugeben. Nach der Zugabe von Verapamil zu den mit Rh123 gefärbten Zellen und der Färbung mit dem Antikörper gegen P-Gp stellt sich bei L87/4 ein fast identischer Anteil an P-Gp im Vergleich zu der Darstellung der nicht mit Verapamil gehemmten Rh123^{low} Population dar.

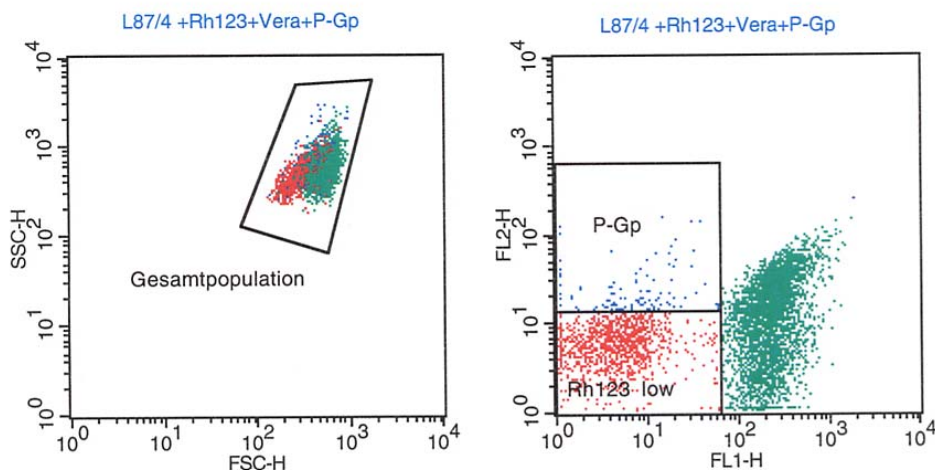


Abb. 20: Es wird die Zelllinie L87/4 nach Rh123 Färbung, Verapamilzugabe und Antikörper-Färbung gegen P-Glykoprotein gezeigt.

3.4.1.2. Statistik

Die Tabelle gibt die Statistik zu den Gates „P-Gp“ vor und nach Antikörperzugabe gegen das P-Glykoprotein an. Die mit Antikörpern gegen P-Glykoprotein gefärbten Zellen wurden nochmals in „mit“ und „ohne“ Verapamilzugabe unterschieden. Gegenüber der Darstellung von L87/4 ergibt sich eine Zunahme der Ereignisse von 140 auf 480 im Gate „P-Gp“.

Die Abb. 18 zeigt L87/4 vor der Färbung mit G-Gp. Im Gate „P-Gp“ sind nur 140 Ereignisse verzeichnet.

Antikörper	Region	Ereignisse	%Gated	%Gesamt	X MW	X Geo MW	Y MW	Y Geo MW	Px,Py
kein Antikörper gegen P-Gp	nur Rh123-Färbung	140	0.70	0.70	29.28	21.46	21.75	19.42	3, 4
Antikörper gegen P-Gp	P-Gp vor Verapamil Zugabe	480	2.40	2.40	26.84	17.47	29.12	21.73	3, 4
	P-Gp nach Verapamil Zugabe	483	2.42	2.42	10.47	6.08	29.59	22.94	3, 4

Tab. 13: Die Tabelle zeigt die Statistik zu den P-Gp gefärbten Zellen vor und nach Zugabe von Verapamil.

3.4.2. Zelllinie L88/5

3.4.2.1. Antikörper gegen P-Glykoprotein

Bei der Zelllinie L88/5 kann man einen Anteil von P-Gp positiven Zellen nachweisen. Auch hier sind diese Zellen nur in der Rh123^{low} Population zu finden.

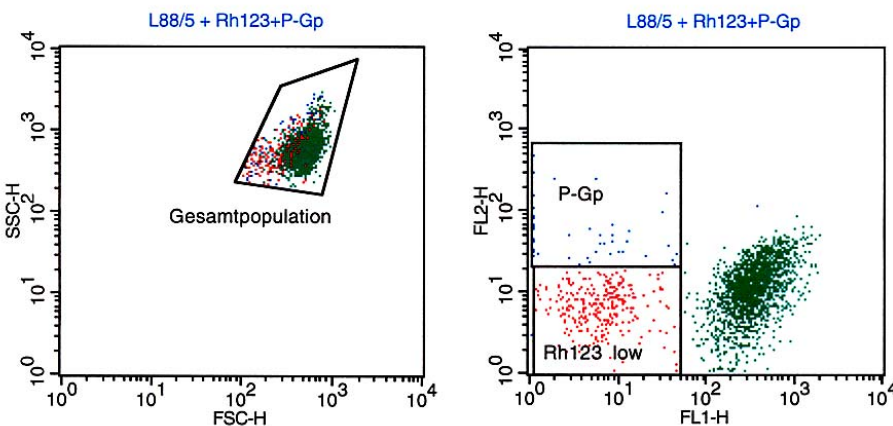


Abb. 21: Die Abbildung zeigt L88/5 nach Zugabe des Antikörpers gegen P-Glykoprotein. 1,63% der Zelllinie befinden sich im Gate „P-Gp“.

Bei der Zelllinie L88/5 kann man nach Gabe von Verapamil eine Abnahme im P-Gp Gate erkennen. Nach der Zugabe von Verapamil verlagern sich die Zellen der Rh123^{low} Population in den Bereich der Rh123^{high} Population, denn sie sind nicht mehr in der Lage Rh123 aus der Zelle zu pumpen. Die folgende Darstellung zeigt, dass nach Verapamilhemmung der P-Glykoproteinpumpe und gleichzeitigem Antikörpernachweis an der Pumpe, sich die Zellen aus dem Gate „P-Gp“ verlagern. Dies spricht dafür, dass sich diese Zellen nach Hemmung des Rh123 Effluxes in der Rh123^{high} Population darstellen. Dadurch nimmt die Zahl der Ereignisse im „P-Gp“-Gate ab.

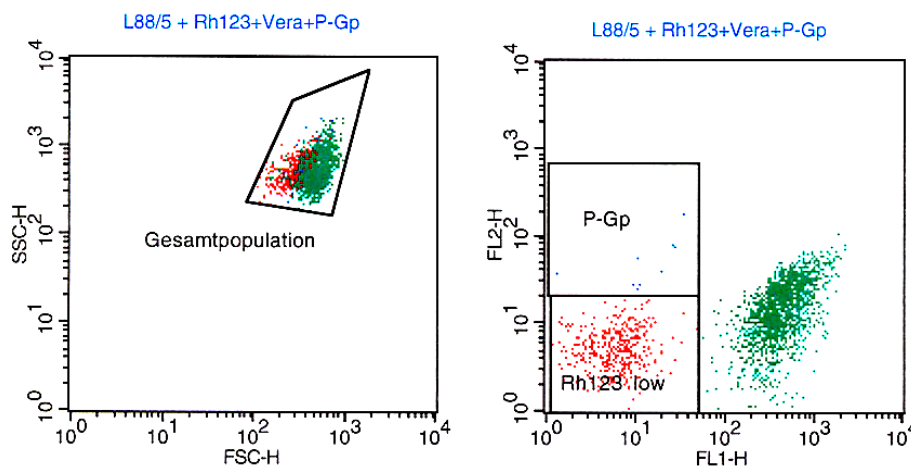


Abb. 22: Die Abbildung zeigt die Verringerung der Zellzahl im Gate „P-Gp“ nach Verapamilzugabe.

3.4.2.2. Statistik

Die nachfolgende Tabelle gibt die Statistik zu dem P-Gp-Gate für L88/5 an. Sie zeigt die Abnahme der Ereignisse im Gate „P-Gp“ nach Verapamilzugabe. Prozentual nehmen in diesem Gate die Zellen von 1,63% auf 0,57% ab.

Region	Ereignisse	%Gated	%Gesamt	X MW	X Geo MW	Y MW	Y Geo MW	Px,Py
P-Gp vor Verapamil Zugabe	159	1.63	1.62	8.56	3.92	65.69	47.34	3, 4
P-Gp nach Verapamil Zugabe	51	0.57	0.56	12.78	10.20	46.63	39.17	3, 4

Tab. 14: Die Tabelle zeigt, dass sich die Anzahl der Zellen im Gate „P-Gp“ verringert, wenn man die mit Rh123 gefärbten Zellen mit Verapamil inkubiert. Die P-Glykoprotein positive Rh123^{low} Population bleibt durch die Verapamilzugabe angefärbt und verlagert sich in die Rh123^{high} Population.

3.4.3. Zelllinie V54/1

3.4.3.1 Antikörper gegen P-Glykoprotein

Bei der V54/1 Population stellen sich die Verhältnisse ähnlich dar wie bei der Zelllinie L88/5. Es kommt nach Zugabe von Verapamil zu einer Abnahme der Zellen im „P-Gp“-Gate.

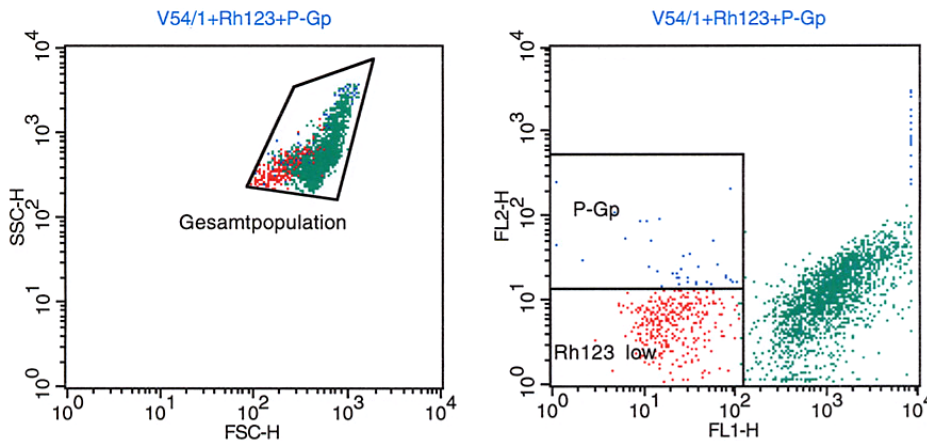


Abb. 23: Die Zelllinie V54/1 hat einen Anteil von 1.08% Zellen, die sich mit dem Antikörper gegen P-Glykoprotein anfärben lassen.

Gibt man zu der Rh123-gefärbten V54/1-Zelllinie Verapamil, dann wird die Rh123^{low} Population an dem Efflux von Rh123 gehindert. Die Zugabe eines Antikörpers gegen P-Glykoprotein bedingt die Darstellung der P-Gp-positiven Zellen innerhalb der Rh123^{high} Population. Nach Verapamilzugabe stellen sich die Zellen wie folgt dar:

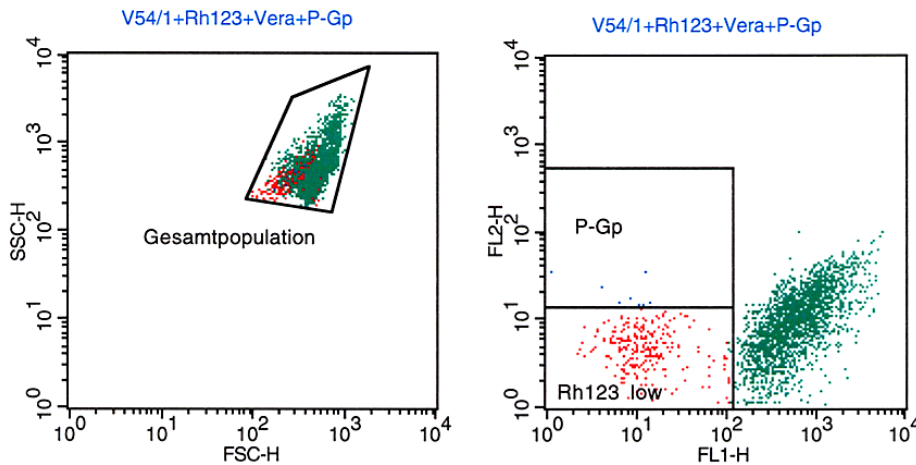


Abb. 24: Nach Färbung der Zelllinie V54/1 mit Rh123 und Hemmung der P-Glykoproteinpumpe wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen P-Glykoprotein inkubiert. Die P-Glykoprotein-tragenden Zellen verlagern sich nach Verapamilzugabe in die Rh123^{high} Population.

3.4.3.2. Statistik

Die nachfolgenden Tabelle zeigt eine Abnahme der Ereignisse im Gate „P-Gp“, nachdem der Efflux von Rh123 aus der mit einem Antikörper gegen P-Gp gefärbten Rh123^{low} Population mit Verapamil gehemmt wurde. In dem Gate „P-Gp“ nimmt der Anteil von P-Gp positiven Zellen von 1.08% auf 0.45% ab.

Region	Ereignisse	%Gated	%Gesamt	X MW	X Geo MW	Y MW	Y Geo MW	Px,Py
P-Gp vor Verapamil Zugabe	106	1.08	1.06	36.72	25.34	39.70	27.81	3, 4
P-Gp nach Verapamil Zugabe	45	0.45	0.45	15.82	10.06	27.09	22.21	3, 4

Tab. 15: Durch Verapamilhemmung nimmt in dem Gate „P-Gp“ die Zellzahl von 1.08% auf 0.45% um 0.63% ab.

3.4.4. Zelllinie V54/2

3.4.4.1 Antikörper gegen P-Glykoprotein

Bei der Zelllinie V54/2 sind die P-Gp-positiven Zellen nach Färbung mit dem PE markierten Antikörper gegen P-Gp nur bei Zellen nachweisbar, die aus der Rh123^{low} Population stammen. Der Anteil der P-Gp-positiven Zellen ist größer als bei den anderen Zelllinien.

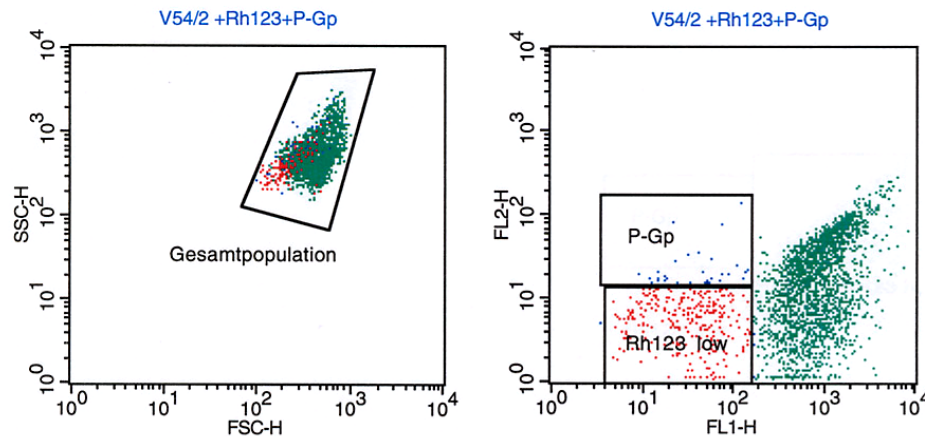


Abb. 25: Die Abbildung zeigt die Zelllinie V54/2 nach Rh123 Färbung und Zugabe eines Antikörpers gegen das P-Glykoprotein.

Nach Verapamilzugabe kommt es zu keiner Abnahme der P-Gp-positiven Zellen.

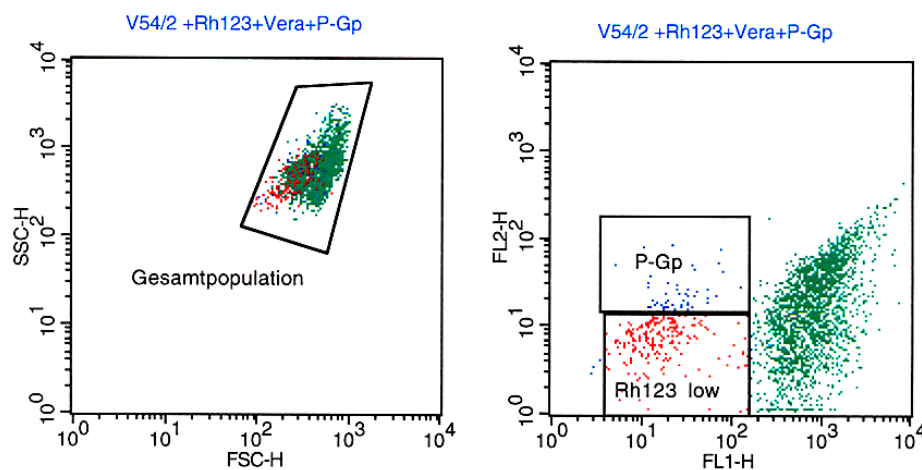


Abb. 26: Durch die Hemmung der Rh123^{low} Population kann man keine wesentliche Abnahme der Zellzahl im Gate „P-Gp“ erkennen.

3.4.4.2. Statistik

Die Tabelle zeigt die Statistik einer leichten Zunahme an Ereignissen im „P-Gp“-Gate nach Verapamilzugabe.

Region	Ereignisse	%Gated	%Gesamt	X MW	X Geo MW	Y MW	Y Geo MW	Px,Py
P-Gp vor Verapamil Zugabe	153	1.53	1.53	60.01	45.69	25.43	21.73	3, 4
P-Gp nach Verapamil Zugabe	162	1.62	1.62	34.26	27.38	24.75	22.30	3, 4

Tab. 16: Die Zellzahl im Gate „P-Gp“ der mit Rh123-gefärbten Zelllinie V54/2 zeigt nach Verapamilzugabe keine wesentliche Zellverschiebung aus dem Gate „P-Gp“.

3.4.5. Kontrollzelllinie HL60/Dox

3.4.5.1. Antikörper gegen P-Glykoprotein

Als Kontrolle diente die Zelllinie HL60/Dox, eine humane Leukämiezelle mit einer besonders aktiven P-Gp.

Die unten stehende Graphik zeigt den Nachweis von P-Gp mit dem PE markierten Antikörper. Links befindet sich die Darstellung von HL60/Dox mit Rh123 und rechts die Darstellung von HL60/Dox mit Rh123 und dem Antikörper gegen P-Gp. Als sogenanntes „Overlay“ wurde zum Vergleich die ungefärbte Zelllinie HL60/DOX als grünes Histogramm eingefügt.

Es kommt nach Zugabe des Antikörpers gegen P-Gp zu einer deutlichen Positivität, die sich in der FL2 darstellt. Da alle Zellen der Zelllinie HL60/Dox die P-Glykoproteinpumpe haben und sich alle Zellen mit dem Antikörper gegen P-Glykoprotein färben, ist bewiesen, dass die Antikörperfärbung mit P-Gp funktioniert.

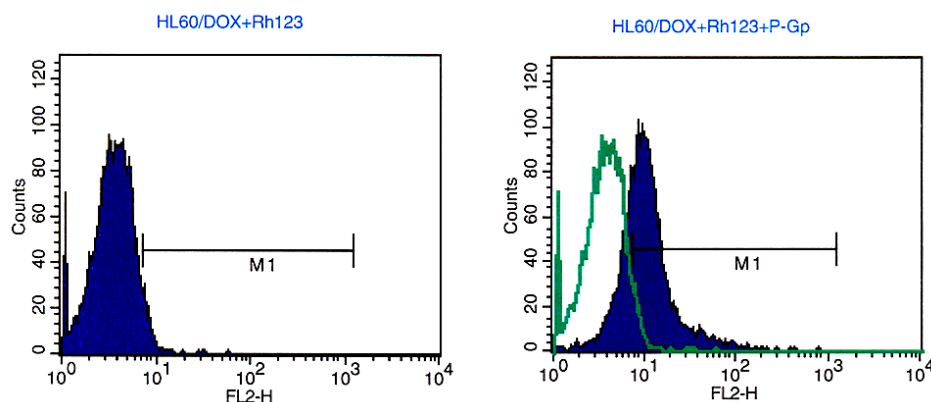


Abb. 27: Nach der Zugabe des Antikörpers gegen P-Glykoprotein färben sich alle Zellen an, was der Beweis für das Funktionieren des Antikörpers gegen P-Glykoprotein ist.

Die nachfolgende Abbildung zeigt bei gleicher Einstellung wie in Abb. 27 die Darstellung der Färbung Rh123 mit Verapamil und dem Antikörper gegen P-Gp. Bei der obigen Untersuchung wurde kein Verapamil zugegeben. Auch hier färben sich die P-Gp-tragenden Zellen nach Zugabe des sich in der FL2 darstellenden Antikörpers gegen P-Gp an. Wir nutzten dieses Experiment als Kontrolle dafür, dass auch nach Verapamilzugabe die Antikörperfärbung gegen P-Gp weiterhin funktioniert.

Nach Verapamilzugabe kommt es bei den Zelllinien L88/5 und V54/1 im Gegensatz zu den Zelllinien L87/4 und V54/2 zu einer Abnahme der Zellen im Gate „P-Gp“, in dem sich die P-Glykoprotein-positiven Zellen der Rh123^{low} Population befinden. Diese Abnahme ist nicht durch ein vermindertes Ansprechen des Antikörpers gegen P-Gp nach Verapamilzugabe bedingt. Dies konnte durch das Experiment HL60/DOX plus Rh123 und Verapamil eindeutig gezeigt werden. Denn nach Verapamilzugabe kann bei der Kontrollzelllinie HL60/Dox das P-Glykoprotein gleich gut wie ohne Verapamilzugabe nachgewiesen werden.

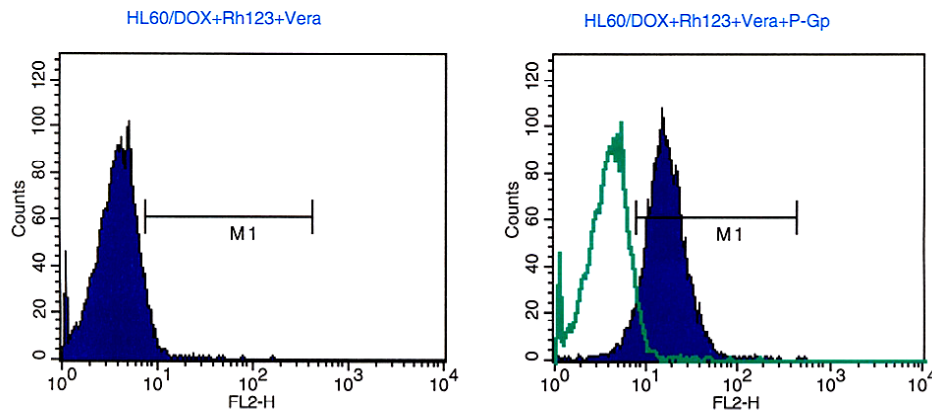


Abb. 28: Auch nach Verapamilzugabe färben sich alle Zellen der Kontrollzelllinie an. Die Antikörperfärbung funktioniert auch nach Verapamilzugabe.

3.4.4.2. Statistik

Die Tabelle gibt die Statistik zur Kontrollzelllinie HL60/Dox an. Die Spalte „Marker“ entspricht in der Tabelle den eingesetzten Grenzen. In „Alle“ sind alle Ereignisse erfasst, ohne eine Abgrenzung durch den im weiteren gezeigten als „M1“ bezeichneten Grenzbereich. In der Statistik zeigt „M1“ die Ereignisse an, die innerhalb des mit „M1“ bezeichneten Grenzbereichs in der obigen Abbildung liegen. Die Eckpunkte dieses Grenzbereichs sind als „Linke Grenze“ und

„Rechte Grenze“ angegeben. Die restlichen statistischen Variablen entsprechen den, der schon in Abb. 8 erklärten Variablen .

Zelllinie und Färbung	Marker	Linke Grenze	Rechte Grenze	%Gated	Ereignisse	MW	Geo W	SA	VK	Median	Peak
HL60 Rh123	Alle	1	9910	100.00	10000	33664	20515	29587	46.16	23802	95
	M1	7	1219	43.92	420	20302	11902	45352	37.93	33420	30
HL60 Rh123 P-Gp	Alle	1	9910	100.00	10000	17502	37052	14.79	118.60	20699	102
	M1	7	1219	74.90	7490	14.81	17137	16.42	110.91	36992	102
HL60 Rh123 Verapamil	Alle	1	9910	100.00	9687	41730	26359	23774	64.02	31107	101
	M1	8	426	29.65	369	37205	44075	19603	94.28	12997	22
HL60 Rh123 Verapamil P-Gp	Alle	1	9910	100.00	10000	17.45	15.47	36962	68.93	15.26	107
	M1	8	426	94.34	9434	37121	16.40	35339	60.63	15.75	17

Tab. 17: Die Tabelle zeigt die Rh123 gefärbte Zelllinie HL60/Dox vor und nach Antikörperzugabe gegen P-Glykoprotein. Danach wird die Rh123 gefärbte Population mit Verapamil inkubiert. Es folgt deren Darstellung mit und ohne Antikörper gegen P-Gp.

Zusammenfassung der Antikörperfärbung gegen P-Glykoprotein:

- Der Antikörper gegen P-Glykoprotein weist P-Glykoprotein tragende Zellen nur in der Rh123^{low} Population nach.
- Bei den Rh123 gefärbten Zelllinien L88/5 und V54/2 kommt es nach Verapamilzugabe und anschließender Antikörperfärbung gegen P-Glykoprotein zu einer Zellverschiebung aus dem Gate „P-Gp“.
- Bei den Rh123 gefärbten Zelllinien L87/4 und V54/2 kommt es durch die Inkubation mit Verapamil und anschließender Antikörperfärbung gegen P-Glykoprotein zu **keiner** Zellverschiebung aus dem Gate „P-Gp“.

3.5. Nachweis definierter Oberflächenantigene

Die Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 wurden auf die Expression bestimmter Oberflächenantigene untersucht. Dabei wurden Antikörper gegen CD10, CD14, CD34, CD45, CD117 und gegen HLA-DR verwendet. Als Kontrollzelllinie diente KG1a, respektive MelJu für CD117. Die Fluoreszenz der ungefärbten Zelllinie (Kontrolle) wird am Anfang jeder Reihe als rotes Histogramm dargestellt. Die dem roten Histogramm nachfolgenden gelben Histogramme zeigen die jeweilige Antikörperfärbung. Diesen gelben Histogrammen, die den jeweils gemessenen Fluoreszenzzunahmen längs des untersuchten Kanals entsprechen, ist ein rotes Histogramm überlagert. Das rote Histogramm entspricht der am Anfang jeder Bildfolge gezeigten Kontrolle für die jeweilige Fluoreszenz. Dieser als rotes Histogramm dargestellter Leerwert ist der jeweilig untersuchten Zelllinie ohne Antikörperfärbung überlagert.

3.5.1. Zelllinie L87/4

In der Abb. 29 ist die Färbung mit den FITC markierten Antikörpern dargestellt. Als erstes stellt sich die Zelllinie L87/4 ohne Zugabe eines Farbstoffes als rotes Histogramm dar. Dann schließen sich die Färbungen auf CD10, CD45 und CD14 an.

L87/4 als Gesamtpopulation zeigt hier eine Positivität für CD10. Die anderen Epitope sind bei der Gesamtdarstellung nicht vorhanden.

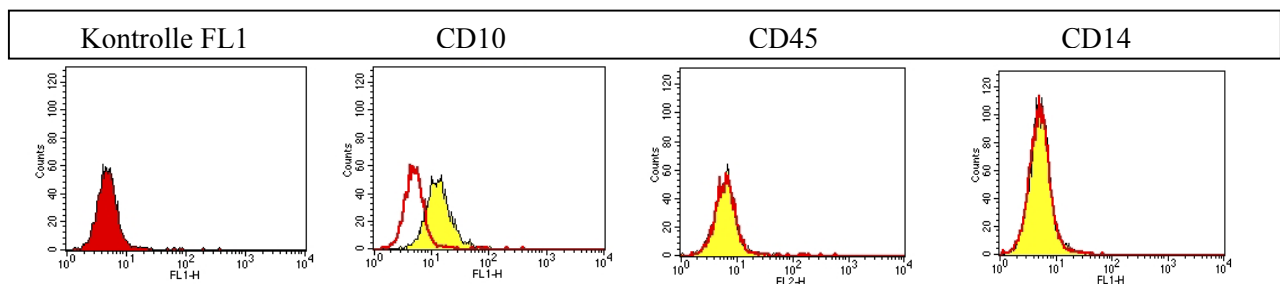


Abb. 29: In der Abbildung sind die Histogramme zu dem Antigennachweis von CD10, CD45 und CD14 für die Zelllinie L87/4 dargestellt. Das rote Histogramm ist das Kontrollhistogramm der ungefärbten Zelllinie in ihrer Darstellung in FL1.

In der folgenden Abbildung zeigt das rote Histogramm die ungefärbten Zellen in der FL2. Es folgen die Darstellungen der PE-markierten Antikörper gegen CD117, CD34 und HLA-DR. Hier

zeigt sich bei L87/4 eine Positivität der Gesamtpopulation für CD117. Für CD34 ergibt sich eine sehr geringe Zunahme der Positivität.

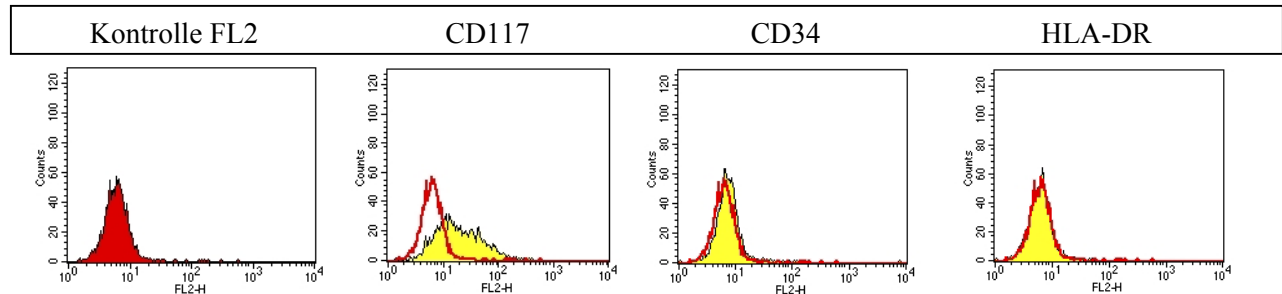


Abb. 30: Die Abbildung zeigt den Nachweis von CD117, CD34 und HLA-DR bei L87/4.

3.5.2. Zelllinie L88/5

In Abb. 31 erkennt man die Darstellung der Oberflächenantigene für L88/5. Die getesteten Oberflächenantigene stellen sich für die FITC markierten Antikörper in der untenstehenden Graphik dar. CD10 ist auf der Oberfläche vorhanden; CD14, und CD45 sind nicht nachweisbar.

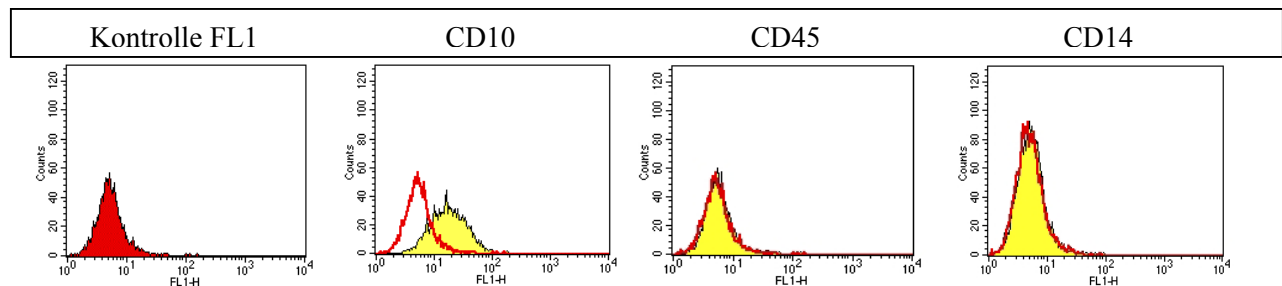


Abb. 31: In der Abbildung sieht man die Histogramme zu dem Antigennachweis von CD10, CD45 und CD14 für die Zelllinie L88/5.

Ein sehr geringer Anteil der Zellen ist CD117 positiv. Die Antikörper gegen CD117, CD34 und HLA-DR erscheinen in der Ansicht der Gesamtpopulation negativ.

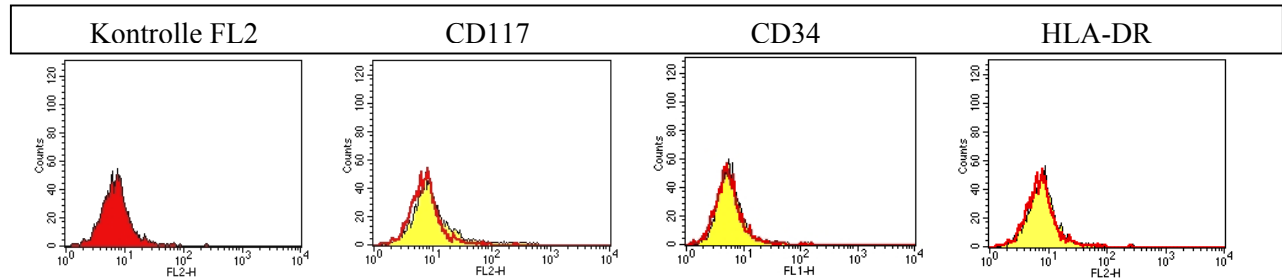


Abb. 32: Die Abbildung zeigt den Nachweis von CD117, CD34 und HLA-DR bei L88/5.

3.5.3. Zelllinie V54/1

Die Zelllinie V54/1 verhält sich, bezüglich der FL1, ähnlich wie die anderen Zelllinien. Man erkennt eine Positivität für CD10, wohingegen CD45 und CD14 negativ sind.

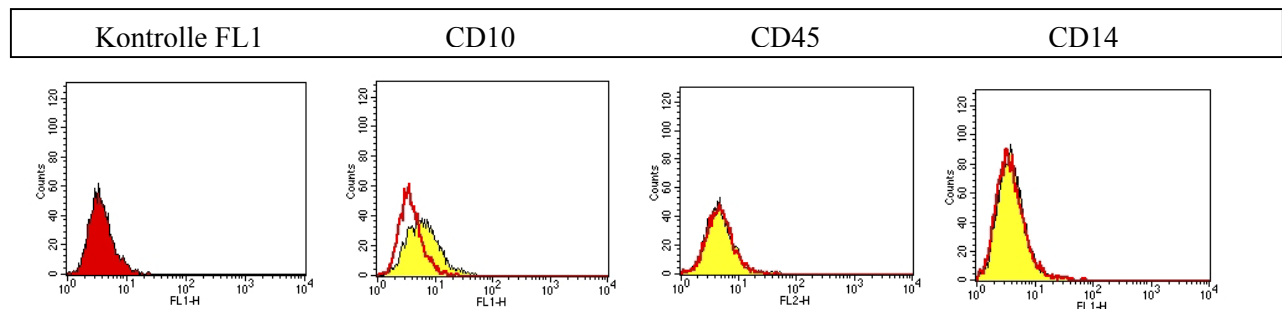


Abb. 33: Die Abbildung demonstriert die Histogramme zu dem Antigennachweis von CD10, CD45 sowie CD14 für die Zelllinie V54/1.

Die PE-markierten Antikörper haben eine schwache Positivität für CD34, hingegen wird CD117 und HLA-DR nicht auf der Oberfläche exprimiert.

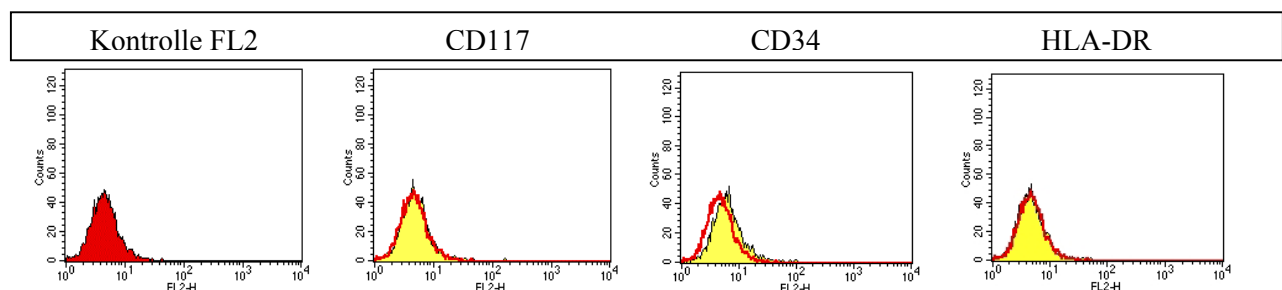


Abb. 34: Die Abbildung beinhaltet den Nachweis von CD117, CD34 und HLA-DR bei V54/1.

3.5.4. Zelllinie V54/2

V54/2 erscheint in unten stehender Abbildung positiv für CD10. CD45 und CD14 sind negativ.

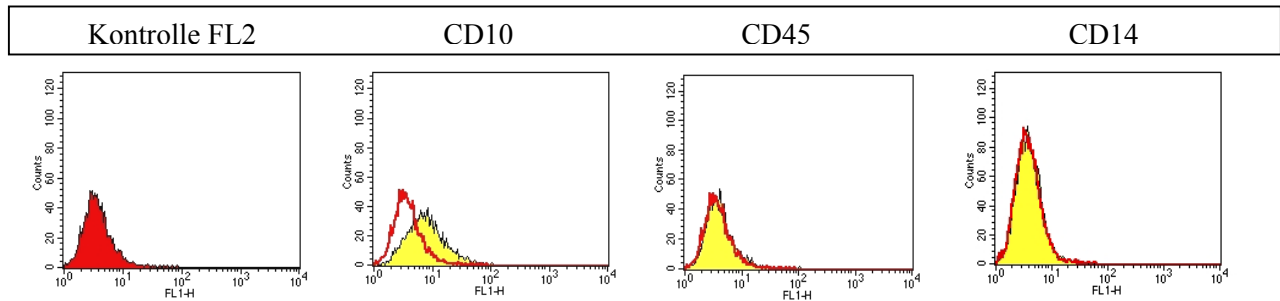


Abb. 35: In der Abbildung sieht man die Histogramme zu dem Antigennachweis von CD10, CD45 und CD14 für die Zelllinie V54/2.

V54/2 stellt sich in der unten stehenden Abbildung wie folgt dar: HLA-DR ist auf der Oberfläche nicht vorhanden. CD34 und CD117 zeigen eine leichte Positivität.

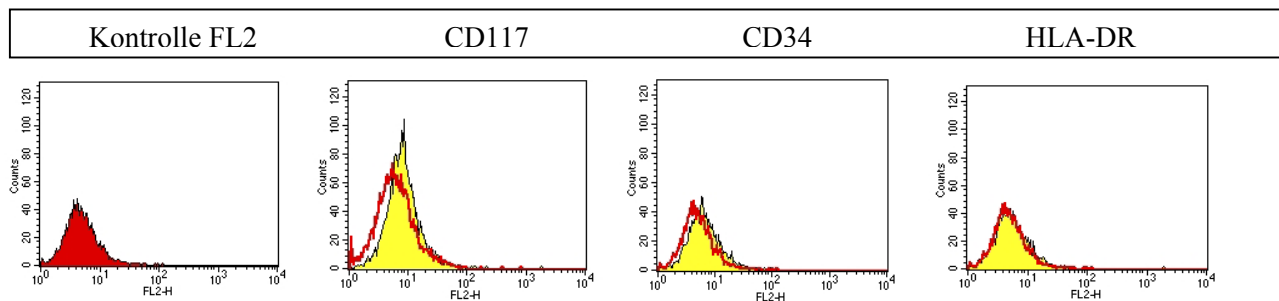


Abb. 36: Der Nachweis von CD117, CD34 und HLA-DR bei V54/2.

3.5.5. SH3 und CD105

3.5.5.1. SH3

SH3 ist ein Epitop, das auf mesenchymalen Stammzellen vorhanden ist. In der Massenspektroskopie und auch in der Aminosäuresequenz wurde erkannt, dass SH3 mit dem Epitop CD73 identisch ist und dessen Funktion in der Aktivierung von Lymphozyten liegt (Barry et al., 2001). Wir haben einen Antikörper gegen SH3 auf allen Zelllinien getestet. Das Ergebnis war eine starke Positivität bei allen Zelllinien. Die nachfolgenden Histogramme geben eine Übersicht über die Antikörperfärbungen der Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 mit SH3.

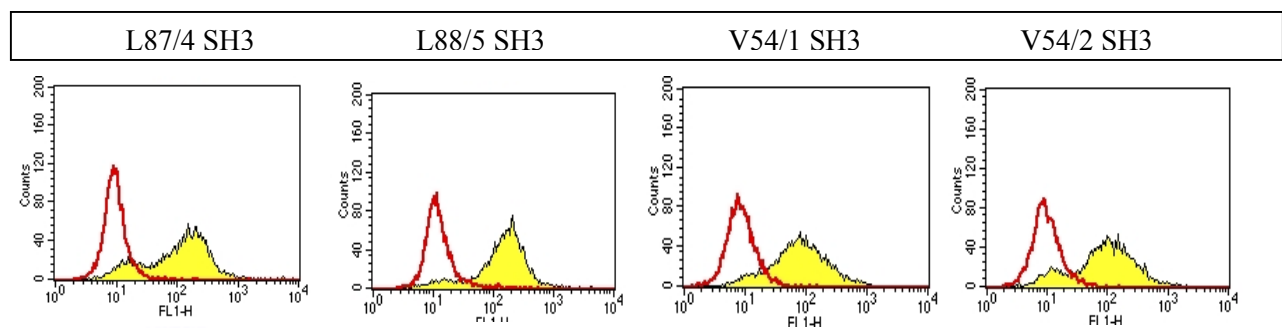


Abb. 37: Man erkennt in der Abbildung die Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2. Rot ist die ungefärbte Negativkontrolle und gelb die Darstellung nach Zugabe des Antikörpers gegen SH3.

3.5.5.2. CD105

Das Oberflächenprotein der CD-Klassifikation CD105 ist als Endoglin identifiziert worden. Es ist auf endothelialen Zellen, Synzytiotrophoblasten, Makrophagen und stromalen Bindegewebszellen vorhanden. CD105 ist als TGF- β Rezeptor III aufgeklärt worden. Es spielt unter anderem eine Rolle in der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und bei der Vermittlung der Interaktion von mesenchymalen Stammzellen mit hämatopoetischen Stammzellen im Mikromilieu des Knochenmarks. Die Abbildung zeigt die Färbung mit dem Antikörper gegen CD105 bei den Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2. CD105 ist auf allen Zellen vorhanden.

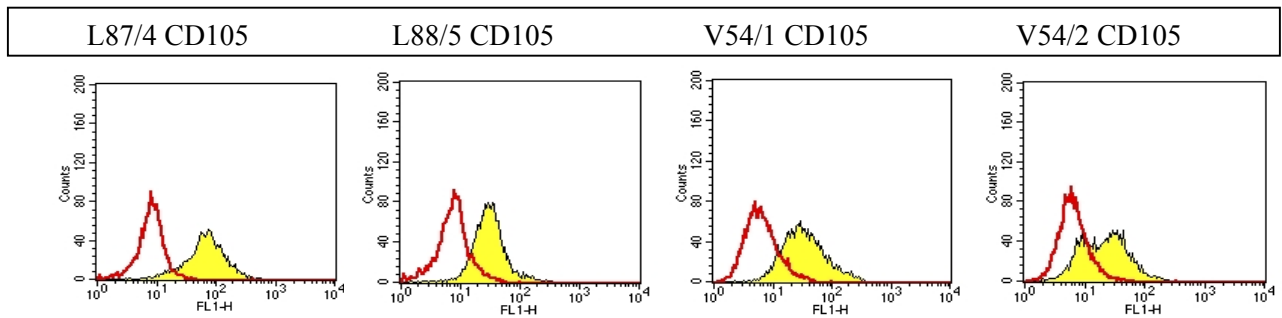


Abb. 38: Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 nach Färbung mit dem Antikörper, der das Epitop CD105 erkennt. Die Zelllinien sind alle positiv für den Antikörper.

3.5.5.3. CD105 und CD34

CD105⁺/CD34⁺ Zellen aus dem Spenderknochenmark, aus peripherem Blut und Nabelschnurblut werden hämatopoetische Stammzeleigenschaften nachgesagt (siehe Abschnitt 1.3.). Aus diesem Grund untersuchten wir mit einer Cofärbung, bestehend aus dem FITC markierten CD105 Antikörper und dem PE markierten Antikörper gegen CD34, die Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2. Dabei ergab sich, dass die wenigen Zellen, die CD34 positiv waren auch eine starke Reaktion mit dem Antikörper gegen CD105 aufwiesen. Die nächste Abbildung zeigt erst die CD105 gefärbte Zelllinie und dann die CD105 gefärbte Zelllinie nach zusätzlicher Färbung mit CD34.

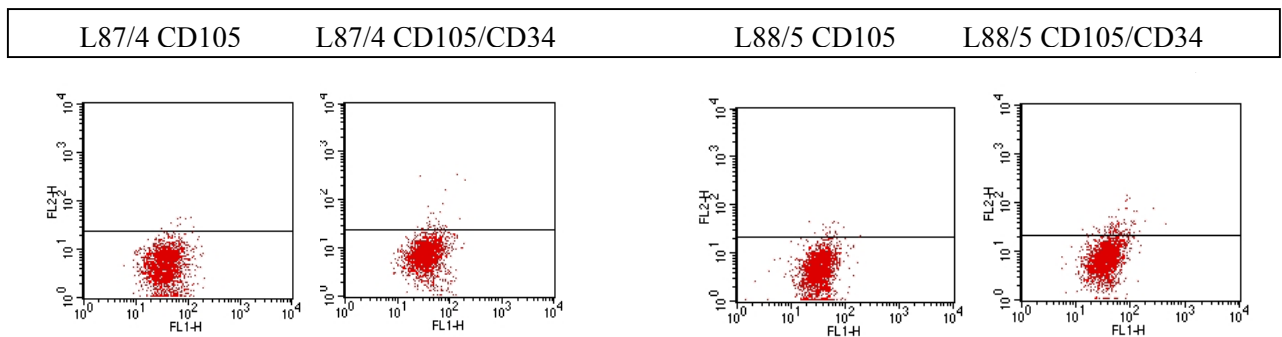


Abb. 39: Die obige Abbildung zeigt die CD105 gefärbten Zelllinien L87/4 und L88/5 vor und nach Zugabe des PE markierten Antikörpers gegen CD34.

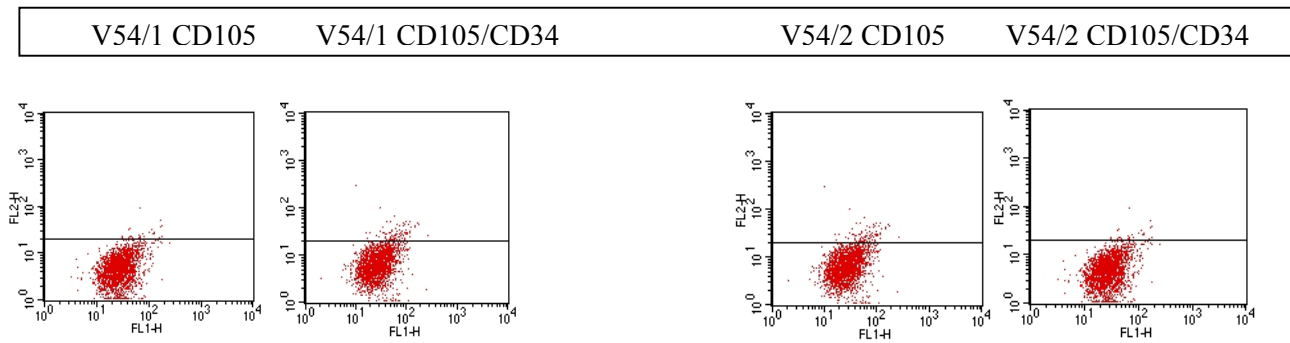


Abb. 40: Die obige Abbildung zeigt die CD105 gefärbten Zelllinien V54/1 und V54/2 vor und nach Zugabe des PE markierten Antikörpers gegen CD34.

3.5.5.4. Statistik

Die Tabelle zeigt die Statistik der Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 und deren Kofärbung mit CD105 und CD34. Die hervorgehobenen Zahlen sind der absolute Prozentsatz der in das Ergebnis einfließenden Werte, die positiv für die Antikörper gegen CD34 sind.

Zelllinie	CD34	%Gated	Ereignisse	% CD34 Positiv	X MW	X Geo WM	Y MW	Y Geo MW
L87/4	kein CD34	0.65	54	1.47	78.59	69.62	33.94	32.60
	CD34+	2.12	177		65.46	58.43	49.72	35.99
L88/5	kein CD34	1.17	100	3.65	63.53	57.40	30.53	29.48
	CD34+	4.82	412		66.41	58.14	38.48	34.25
V54/1	kein CD34	1.38	110	2.33	80.13	72.09	26.99	26.35
	CD34+	3.71	319		68.52	60.44	71.30	30.94
V54/2	kein CD34	1.23	110	2.56	87.51	74.29	26.82	26.01
	CD34+	3.79	345		31.23	27.25	5.46	4.50

Tab. 18: Die Tabelle zeigt die Statistik zu den CD105 gefärbten Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 vor und nach Zugabe von CD34.

3.5.6. Kontrollzelllinie KG1a

Als Kontrolle wurde unter anderem die Zelllinie KG1a verwendet, da ihre Epitope gut charakterisiert sind. Sie ist CD10 negativ und CD45 positiv.

Für das Antigen CD14 ist KG1a negativ. In der nachfolgenden Abbildung werden die Histogramme zu den Färbungen mit Antikörpern gegen CD10, CD45 und CD14 gezeigt.

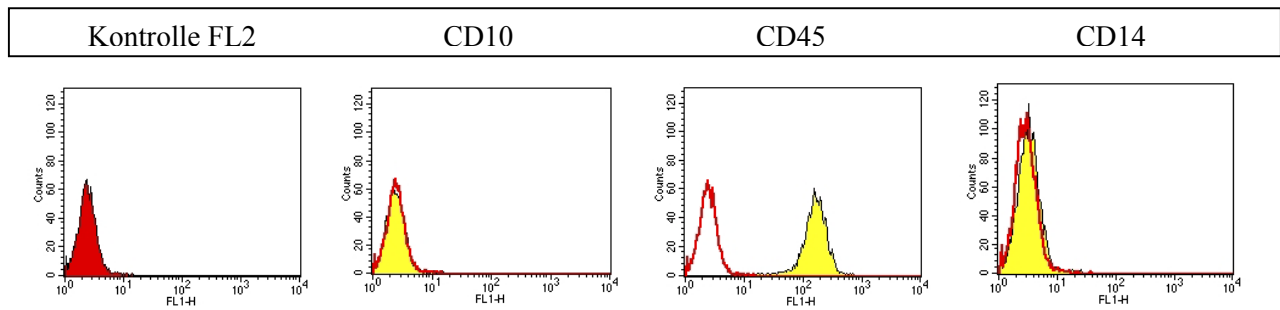


Abb. 41: In der Abbildung sieht man die Histogramme zu dem Antigennachweis von CD10, CD45 und CD14 für die Zelllinie V54/2.

Die folgende Abbildung zeigt die Histogrammanalyse zu den Antikörpern CD117, CD34 und HLA-DR. KG1a ist eine Negativkontrolle für CD117 und für HLA-DR und eine Positivkontrolle für CD34.

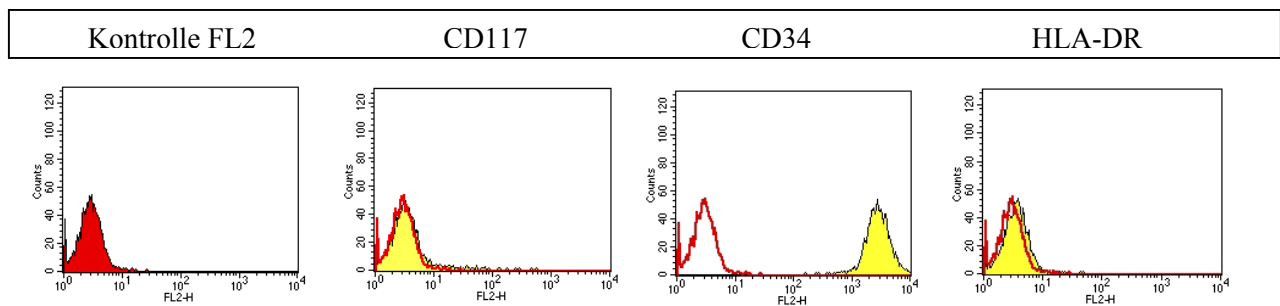


Abb. 42: Die Abbildung zeigt den Nachweis von CD117, CD34 und HLA-DR bei der Kontrollzelllinie KG1a.

3.5.7. Mel-Juso

Die Kontrolle für CD117 ist die Melanom-Zelllinie Mel-Juso. Aufgrund der Expression von CD117 diente sie als Positivkontrolle bei der CD117-Färbung.

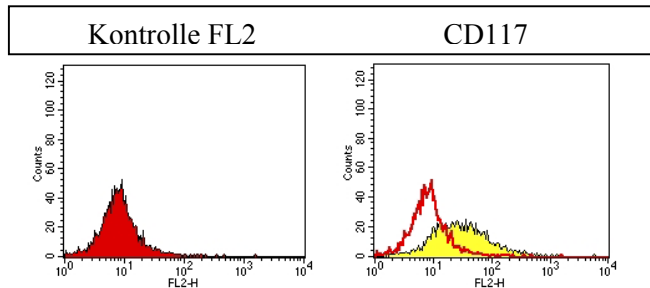


Abb. 43: *Mel-Juso dient als Positivkontrolle für den Antigennachweis von CD117.*

3.5.7. Statistik

Die Statistik zu den Antikörperfärbungen wird in der nachfolgenden Tabelle demonstriert. Sie zeigt die Werte für die Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1, V54/2 und die Kontrollzelllinien KG1a und Mel-Juso. Die statistischen Parameter entsprechen den im Kapitel „3.2.1.3. Statistik“ erklärten Parametern. Die Werte in der Spalte „% Positiv für AK“ entsprechen dem Prozentsatz der Ereignisse aus dem Gate „Gesamtpopulation“, die eine Fluoreszenzzunahme nach Färbung mit dem jeweiligen Antikörper zeigen.

Zelllinie	Antikörper gegen	Ereignisse	% Positiv für AK	% Gated	% Total	MW	Geo MW	SA	Variationskoeffizient	Median	Peak
L87/4	Kontrolle FL1	4443	0.90	100	87.46	3.75	6.00	10.47	154.96	5.99	57
	CD10	4794	48.50	100	93.63	14.06	12.72	7.20	51.19	12.41	52
	CD45	4655	1.56	100	93.10	6.47	5.98	2.89	44.73	6.10	63
	CD14	4794	0.12	100	93.63	14.06	12.72	7.20	51.19	12.41	52
	CD105	5994	92.06	100	59.94	78.69	64.82	51.10	64.94	67.32	69
	SH3	8973	77.68	100	89.73	154.53	97.22	184.89	119.65	126.35	148
	Kontrolle FL2	4550	0.91	100	91.00	6.55	6.05	3.55	54.22	6.10	64
	CD117	4623	47.22	100	92.46	25.79	17.93	26.85	104.09	15.96	31
	CD34	4550	2.24	100	91.00	6.55	6.05	3.55	54.22	6.10	64
HLA-DR	6756	0.01	100	94.36	7.47	6.86	4.64	62.08	6.85	86	
L88/5	Kontrolle FL1	4610	3.19	100	92.20	5.72	5.10	4.32	75.54	4.98	56
	CD10	4611	69.23	100	92.22	20.92	17.33	13.76	65.81	17.31	43
	CD45	4604	0.61	100	92.08	6.22	5.57	4.31	69.27	5.40	59
	CD14	9530	0.34	100	95.30	5.82	5.14	3.72	63.85	5.05	92
	CD105	9464	67.09	100	88.75	32.33	29.02	22.11	52.29	29.43	79
	SH3	8448	79.47	100	84.48	173.34	130.38	139.08	80.23	152	198
	Kontrolle FL2	4610	3.41	100	92.20	7.85	6.84	6.91	88.10	6.79	54
	CD117	4566	11.45	100	91.32	11.94	8.75	23.05	193.04	8.06	51
	CD34	4623	5.97	100	92.46	9.54	8.33	12.16	127.49	8.13	57
HLA-DR	4584	1.11	100	91.68	8.67	7.66	6.41	73.95	7.64	56	
V54/1	Kontrolle FL1	4731	0.76	100	94.62	5.00	4.47	2.70	54.02	4.41	48
	CD10	4713	10.26	100	94.26	7.13	6.06	4.64	65.09	5.94	38
	CD45	4710	0.23	100	94.20	4.93	4.41	2.73	55.29	4.33	53
	CD14	9516	0.28	100	95.16	4.37	3.84	2.77	63.37	3.72	92
	CD105	8864	63.70	100	88.64	41.80	31.73	36.87	88.21	30.51	59
	SH3	8928	80.56	100	89.28	109.61	73.21	150.10	136.94	74.99	78
	Kontrolle FL2	4731	1.44	100	94.62	5.00	4.47	2.70	54.02	4.41	48
	CD117	4656	1.05	100	93.12	5.36	4.78	3.59	67.02	4.74	55
	CD34	4680	3.21	100	93.60	6.96	6.09	4.60	66.07	5.94	52
HLA-DR	4735	0.17	100	94.70	5.95	5.17	11.21	188.41	5.09	53	
V54/2	Kontrolle FL1	9910	1.30	100	95.24	4.03	3.58	2.47	61.33	3.46	92
	CD10	4662	19.47	100	93.24	9.22	7.43	7.14	77.46	7.23	38
	CD45	4602	0.36	100	92.04	4.51	3.94	3.34	74.08	3.75	53
	CD14	9511	0.29	100	95.11	4.31	3.82	2.63	60.87	3.68	93
	CD105	8838	45.19	100	88.38	26.80	19.71	23.33	87.06	20.72	51
	SH3	8838	76.69	100	88.38	128.09	80.96	131.17	102.40	91.40	144
	Kontrolle FL2	4676	1.78	100	93.52	5.61	4.71	4.82	85.81	4.53	47
	CD117	4662	1.65	100	93.24	5.72	4.95	3.67	64.12	4.87	44
	CD34	4685	5.03	100	93.70	7.34	6.16	5.59	76.11	5.88	50
HLA-DR	4735	0.42	100	94.70	5.95	5.17	11.21	188.41	5.09	53	
KG1a	Kontrolle FL1	9910	0.60	100	92.11	3.00	2.81	1.23	41.02	2.79	108
	CD10	4454	0.50	100	89.08	2.51	2.39	0.86	34.23	2.37	61
	CD45	4506	34.35	100	90.12	169.12	157.84	62.51	36.96	161.08	60
	CD14	9293	0.23	100	92.93	3.49	3.25	1.42	2.37	3.25	115
	Kontrolle FL2	4428	0.74	100	88.56	3.07	2.82	1.38	44.90	2.84	54
	CD117	4538	3.76	100	90.76	4.51	3.34	13.24	293.44	3.22	50
	CD34	4476	100.00	100	89.52	2834.04	2600.36	1228.28	43.34	2571.32	53
HLA-DR	4479	1.15	100	89.58	3.73	3.41	1.83	49.13	3.46	53	
Mel-Juso	Kontrolle FL1	5059	0.41	100	50.59	10.19	7.79	23.85	234.16	7.64	52
	CD117	4488	19.51	100	44.88	46.71	28.04	98.92	211.77	26.42	25

Tab. 19: Die Tabelle gibt einen Überblick über die Färbung mit den Antikörpern gegen CD10, CD45, CD14, CD117, CD34 und HLA-DR.. Die Werte in der Spalte „% Positiv für AK“ demonstrieren den Prozentsatz der Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1, V54/2 und der Kontrollzelllinien KG1a und Mel-Juso nach Färbung mit den jeweiligen Antikörpern, die eine Floreszenz-Zunahme zeigen.

Die Tabelle zeigt die Statistik der SH2 und SH3 Färbung von V54/2. In der Spalte „Marker“ stehen die Grenzbereiche „All“, in dem sich alle Ereignisse befinden und „M1“, in den sich bei Fluoreszenz-Zunahme die Zellen verlagern. Bei dem Nachweis eines Antigens nehmen also die Werte in „M1“ entsprechend der Expression des Antigens zu. Bei der Kontrollpopulation liegen schon 0.14% der Zellen aufgrund von Autofluoreszenz in dem Grenzbereich „M1“, der für die Antikörperpositivität steht. Nach SH2 Färbung erkennt man die deutliche Zunahme der Ereignisse in „% Gated“ auf 20.06% und bei SH3 sogar auf 97.65%.

Antikörper	Marker	Linke Grenze	Rechte Grenze	Ereignisse	% Gated	% Total	MW
Kontrolle FL1	All	1	9910	2078	100	51.31	19085
	M1	16	9910	3	0.14	0.07	19.30
SH2	All	1	9910	2403	100	41.72	37115
	M1	16	9910	482	20.06	13728	20.57
SH3	All	1	9910	7738	100	45.73	68.82
	M1	16	9910	7556	97.65	44.66	70.19

Tab. 20: Die Tabelle demonstriert die Statistik für die Färbung mit dem Antikörper gegen die mesenchymalen Oberflächenantigene SH2 und SH3. Diese Werte für die Zelllinie V54/2 stellen mit freundlicher Unterstützung die Arbeitsgruppe Dr. Michael Andreeff, MD Anderson Cancer Center, University of Texas in Houston zur Verfügung.

Zusammenfassung der Antikörperfärbung:

- Die untersuchten Zelllinien zeigen eine Positivität für CD10, CD105 und SH3.
- L87/4 und L88/5 sind im Gegensatz zu den Zelllinien V54/1 und V54/2 positiv für CD117.
- Alle Zelllinien sind negativ für Antikörper gegen CD14, CD45 und HLA-DR.

3.6. CD34-Antigen Nachweis

3.6.1. Rh123 und CD34

Im vorigen Kapitel wurde ein Nachweis für Antikörper auf der Oberfläche der gesamten Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 gezeigt. In diesem Kapitel wird die Frage beantwortet, ob nach der Färbung der Zellen mit Rh123 und anschließender Färbung mit dem besonders wichtigen Antigen gegen CD34 Unterschiede in der Expression zwischen der Rh123^{low} und Rh123^{high} Population zu erkennen sind. CD34 ist das Antigen mit noch unvollständig verstandenen Funktionen, das mit Hämatopoese assoziiert ist.

Die Abb. 44a zeigt die Gesamtpopulation als Grundlage für die Analyse durch die nachfolgenden Punktdia- und Histogramme. In ihm stellen sich Zellen mit ihrer Kennfarbe aus den Gates „Rh123^{high}“, „Rh123^{low}“ und „CD34“ dar. Die Rh123^{high} Population ist grün, die Rh123^{low} Population ist rot und Zellen in dem Gate für CD34 sind mit der Kennfarbe blau versehen. Deutlich sieht man die blaue Rh123^{low} Population als kohärente Zellgruppe. Sie ist eher klein und hat eine geringere Granularität im Vergleich zur gesamten Zelllinie. Abb. 44b zeigt V54/2 nach Färbung mit Rh123, aber vor der Färbung mit dem PE markierten Antikörper gegen CD34. In ihr sind die Gates „Rh123^{low}“ und „Rh123^{high}“ eingetragen, die die Grundlage für eine Analyse der Histogramme sind. In Abb. 44c ist V54/2 nach Färbung mit Rh123 zu erkennen. Die CD34 positiven Zellen stammen fast nur aus der Rh123^{low} Population (3.47% aus Rh123^{low} gegen nur 0.39% aus Rh123^{high}).

Das sich bei der Rh123^{low} Population wenige Ereignisse bei der durchflußzytometrischen Untersuchung zeigen, werden in den Histogrammen in Abb. 44e und Abb. 44f nur die Zellen analysiert, die aus dem Gate „Rh123^{low}“ stammen. Dieses Gate ist in Abb. 44b eingetragen. So kann man trotz der geringen CD34-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtpopulation exakte Prozentsätze angeben.

Abb. 44e. zeigt das Histogramm für die Zellen im Bereich „Rh123^{low}“ ohne CD34-Färbung. Es ist der Kanal für den Antikörper CD34 (PE) gegen die Zellzahl aufgetragen. Der Bereich, aus dem die in dem Histogramm analysierten Zellen stammen, ist in Abb.44b mit „Rh123^{low}“ gekennzeichnet. Die nebenstehende Abb. 44f zeigt die deutliche Verlagerung im Kanal der FL2 nach Zugabe des FL2 markierten Antikörpers gegen CD34. Als „Overlay“ ist rot das Histogramm vor Antikörperzugabe in Abb. 44f eingetragen. Die deutliche Fluoreszenz-Zunahme nach Färbung der Rh123^{low} Population mit CD34 beweist das Vorhandensein des Antigens auf der Oberfläche der Rh123^{low} Population. In Abbildung 44g und 44h ist die Zellpopulation aus dem

Gate „ $Rh123^{high}$ “ aufgetragen. In Abb 44g sind die Zellen aus „ $Rh123^{high}$ “ vor Antikörperzugabe gegen CD34 gezeigt. Die Zellen in diesem Histogramm stammen aus dem Bereich, der in Abb 44b. als „ $Rh123^{high}$ “ bezeichnet ist. Abb. h zeigt die Situation nach Zugabe des Antikörpers gegen CD34. Es ist kaum eine Verlagerung längs der FL2 zu sehen. Vergleicht man die Abb. 44h mit der Abb. 44f dann wird deutlich, dass der Anteil der CD34 positiven Zellen fast nur aus der $Rh123^{low}$ Population stammt.

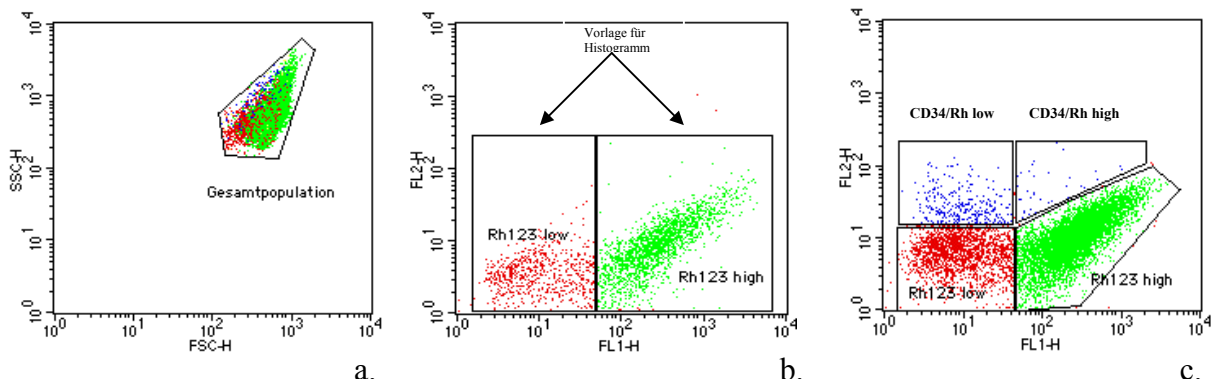


Abb. 44: Die Abbildung zeigt in **a** die Gesamtpopulation, die die Grundlage für die Analyse durch die nachfolgenden Punktdia- und Histogramme ist. In ihr stellen sich die Zellen aus den anderen Gates mit ihrer Kennfarbe aus den Gates „ $Rh123^{high}$ “, „ $Rh123^{low}$ “ und „ $CD34$ “ dar. **b** zeigt V54/2 nach Färbung mit Rh123, aber vor Färbung mit dem PE markierten Antikörper gegen CD34. In ihr sind die Gates „ $Rh123^{low}$ “ und „ $Rh123^{high}$ “ eingetragen, die der Analyse zugrunde liegen. In **c** erkennt man V54/2 nach Färbung mit Rh123 und Färbung mit CD34. Die CD34-positiven Zellen stammen fast nur aus der $Rh123^{low}$ Population.

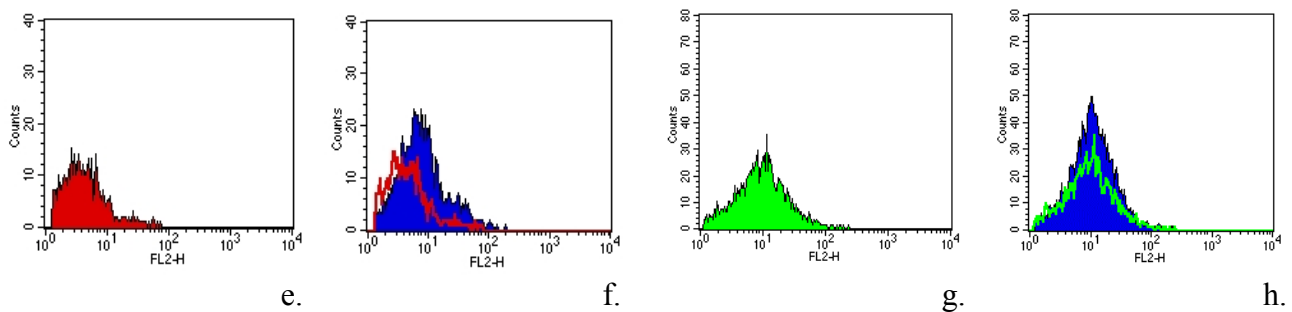


Abb. 44: Abb. **e** zeigt das Histogramm für die Zellen im Bereich $Rh123^{low}$ ohne CD34-Färbung. Der Bereich, aus dem die in dem Histogramm analysierten Zellen stammen, ist in Abb. **b** mit „ $Rh123^{low}$ “ gekennzeichnet. Die nebenstehende Abb. **f** zeigt die deutliche Verlagerung (blau) im Kanal der FL2 nach Zugabe des FL2 markierten Antikörpers gegen CD34. Als „Overlay“ ist rot das Histogramm vor Antikörperzugabe eingetragen. In Abbildung **g** ist die Zellpopulation $Rh123^{high}$ aufgetragen. Die Zellen in diesem Histogramm stammen aus dem Bereich, der in **b** als „ $Rh123^{high}$ “ bezeichnet ist. **h** zeigt die Situation nach Zugabe des Antikörpers gegen CD34. Es ist kaum eine Verlagerung längs der FL2 zu sehen.

Auch für die restlichen Zelllinien wurde ein Experiment zur Untersuchung der Rh123^{low} Population auf CD34 durchgeführt. Auch hier kommen CD34 positive Zellen vor, die sich fast nur aus der Rh123^{low} Population rekrutieren.

In Abb. 45a ist die Färbung der Zelllinie L87/4 in einem Punktdiagramm nach Färbung mit Rhodamin 123 dargestellt. Gezeigt werden FSC und SSC, wie auch FL1 gegen FL2. In dem Punktdiagramm FL1 gegen FL2 sieht man das Gate für die Rh123^{low} Population, Rh123^{high} Population und ein Gate für CD34. Das Gate für die Rh123^{low} Population ist die Grundlage zur Analyse für die weiteren Punktdiagramme (Abb. 45 b-d).

Die Abb. 45b bis Abb. 45d zeigen Punktdiagramme, in denen nur die Zellen aus der Rh123^{low} Population analysiert werden. Die jeweils erste Abbildung ist die Rh123^{low} Population ohne Antikörper gegen CD34. Daneben folgt die Darstellung nach Antikörperzugabe. Abb. 45b zeigt L87/4, Abb. 45c L88/5 und die letzte Abb. 45d belegt die CD34 Positivität der Rh123^{low} Population von V54/1 in einer Darstellung Forward Scatter gegen CD34.

Insgesamt kommen bei den untersuchten Zelllinien die CD34 positiven Zellen fast ausschließlich aus der Rh123^{low} Population. Ein besonders starker Anteil findet sich in der schon oben gezeigten Rh123^{low} Population von V54/2 (Abb. 44).

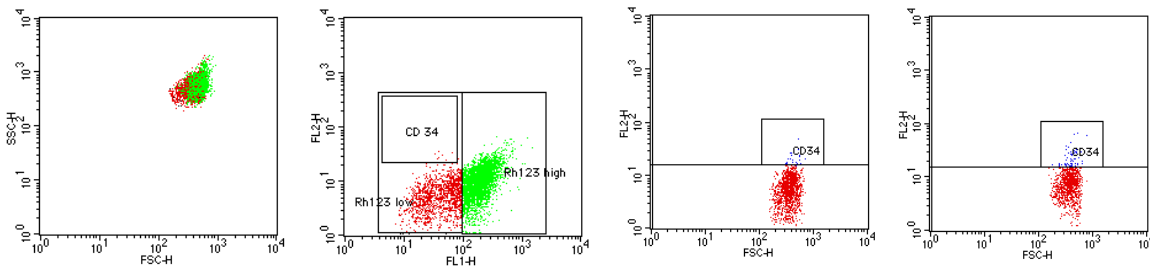


Abb. 45a.

Abb. 45b.

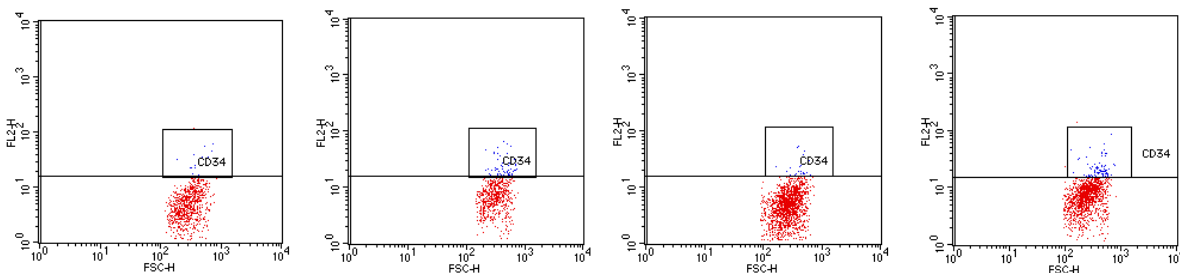


Abb. 45c.

Abb. 45d.

Abb. 45: In a. wird die Gesamtdarstellung der Zellen in FSC und SSC demonstriert. Gezeigt ist die Zelllinie L87/4. Daneben sieht man diese Zelllinie nach Färbung mit Rh123 mit den Gates „Rh123^{low}“, Rh 123^{high}“ und „CD34“.

Die Zellen aus dem Gate „Rh123^{low}“ sind die Grundlage für die Punktdiagrammanalyse von L87/4 in b., L88/5 in c. und V54/1 in d.

3.6.2. Statistik

3.6.2.1. Statistik zu V54/2

Die Färbung von V54/2 mit Rh123 und CD34 wurde in der nachfolgenden Tabelle statistisch ausgewertet. Diese Analyse bezieht sich auf Abb 44. Deutlich zeigt sich die Zunahme im Gate „CD34/Rh low“ nach Zugabe des Antikörpers gegen CD34. In „CD34/Rh low“ stellen sich die CD34 positiven Zellen aus der Rh123^{low} Population dar. In der Spalte „% Gated“ nimmt von „vor Antikörperzugabe“ auf „nach Antikörperzugabe“ der prozentuale Anteil der analysierten Zellen im Gate „CD34/Rh low“ von 0,43% auf 3,47% zu. Die anderen statistischen Parameter beschreiben ebenfalls die Tatsache, dass die CD34 positiven Zellen fast ausschließlich aus der Rh123^{low} Population stammen.

	Region	Ereignisse	% Gated	% Total	X MW	X Geo MW	Y MW	Y Geo MW	Px, Py
V54/2+Rh123 VOR CD34 Zugabe	Gesamtpopulation	5330	100	87.95	332.15	123.08	10.32	6.78	1,2
	Rh123 high	3990	74.86	65.84	427.31	274.32	11.57	8.41	3, 4
	Rh123low	1258	23.60	20.76	14.40	10.16	3.86	3.29	3, 4
	CD34/Rh low	23	0.43	0.38	26.55	25.00	25.30	24.01	3, 4
	CD34/Rh high	10	0.19	0.17	451.38	193.17	81.17	69.10	3, 4
V54/2+Rh123 NACH CD34 Zugabe	Gesamtpopulation	8873	100	0.18	282.46	115.61	12.29	9.26	3, 4
	Rh123 high	6573	74.08	0.19	373.64	268.68	12.70	9.98	3, 4
	Rh123low	1864	21.01	0.20	13.31	9.74	6.42	5.68	3, 4
	CD34 low	308	3.47	0.21	12.54	9.75	31.03	27.19	3, 4
	CD34 high	35	0.39	0.22	182.79	115.45	59.55	48.81	3, 4

Tab. 21: Die Tabelle zeigt die Statistik zu Abb.44. Es ist erkennbar, dass die CD34 positiven Zellen fast ausschließlich aus der Rh123^{low} Population stammen. Im Gate „CD34^{low}“, das die CD34 positiven Zellen aus der Rh123^{low} Population analysiert, liegen nach Antikörper-Zugabe 3.47% der Zellen. Im Gate „CD34^{high}“, das die CD34 positiven Zellen aus der Rh^{high}-Population analysiert, liegen nach Antikörper-Zugabe gegen CD34 nur 0.39% der Zellen.

3.6.2.2. Statistik zu L87/4, L88/5, V54/1

Die statistische Analyse der Rh123^{low} Population vor und nach CD34 Zugabe für die Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 wird im nachfolgenden Abschnitt erörtert. V54/2 wurde schon in Tab. 22 statistisch aufgearbeitet. Deutlich ist bei allen Zelllinien die Zunahme der CD34 positiven Zellen in der Rh123^{low} Population zu erkennen.

Bei L87/4 nimmt der Prozentsatz in dem Gate „CD34“ von 1.78% auf 6.18% um 4.4% zu. Bei L88/5 nehmen die CD34 positiven Zellen nach Antikörperzugabe um 7.33% zu. V54/1 zeigt eine Zunahme um 4.8%. Die Prozentsätze beziehen sich nur auf das Gate „Rh123^{low}“, in dem ungefähr 20% der Zellen der gesamten Zellpopulation liegen.

Zelllinie	Gate	Ereignisse	% Gated	% Total	X MW	X Geo MW	Y MW	Y Geo MW
L87/4 Rh123 low ohne CD34	CD34	97	1.78	0.49	470.17	454.34	22.68	21.31
	Rh123 low	5352	98.22	26.76	367.15	353.07	26054	33329
L87/4 Rh123 low mit CD34	CD34	274	6.18	1.37	437.45	420.92	23.28	21.43
	Rh123 low	4159	93.82	20.80	369.01	354.06	7.49	6.73
L88/5 Rh123 low ohne CD34	CD34	86	2.58	0.43	498.75	477.44	28.49	25.86
	Rh123 low	2929	97.15	14.65	303.45	280.83	5.13	4.36
L88/5 Rh123 low mit CD34	CD34	245	9.91	1.23	459.23	435.17	26.71	23.50
	Rh123 low	2228	90.09	11.14	331.17	309.57	7.11	6.26
V54/1 Rh123 low ohne CD34	CD34	82	1.43	0.41	420.21	390.44	21.54	20.20
	Rh123 low	5645	98.57	28.23	288.21	265.84	5.27	4.46
V54/1 Rh123 low mit CD34	CD34	331	6.23	1.66	417.15	392.16	24.06	21.91
	Rh123 low	4983	93.77	24.92	263.49	242.07	7.18	6.43

Tab. 22: Die Tabelle zeigt die Statistik zu den analysierten Zellen der Rh123^{low} Population. Gezeigt werden die Parameter in den Gates „CD34“ und „Rh123^{low}“ vor und nach Zugabe des Antikörpers gegen CD34. Die Gates „CD34“ und „Rh123“ sind in Abb. 45 gezeigt.

Zusammenfassung des Antigennachweises CD34 nach Rh123 Färbung:

- Der Anteil der CD34 positiven Zellen liegt bei den Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 zwischen 1% und 3%.
- Die CD34 positiven Zellen kommen nach Färbung mit Rh123 zu über 90% aus der Rh123^{low} Population.

3.7. Differenzierung

3.7.1. Neuronale Differenzierung

Um das mesenchymale Potential der Zelllinie V54/2 genauer zu charakterisieren, wurden nach Stimulierung der Gliagenese die Zellen auf die Expression eines glialen Markers, dem anti-Glial

Fibrillary Acidic Protein (GFAP) untersucht. Die Stimulierung der Gliabildung erfolgte durch Neuronalen Wachstums Faktor (NGF) und Merkaptoethanol. Nach 6h konnte man eine starke Änderung der Morphologie erkennen. Die Zellen hatten einen spindelförmigen Zellkörper mit gestreckten Zellausläufern. Nach 24h Induktion mit NGF und Merkaptoethanol wurden die Zellen immunohistochemisch auf das Vorhandensein des GFAP untersucht. Die Zellen zeigten eine positive Reaktion mit dem Antikörper gegen GFAP.

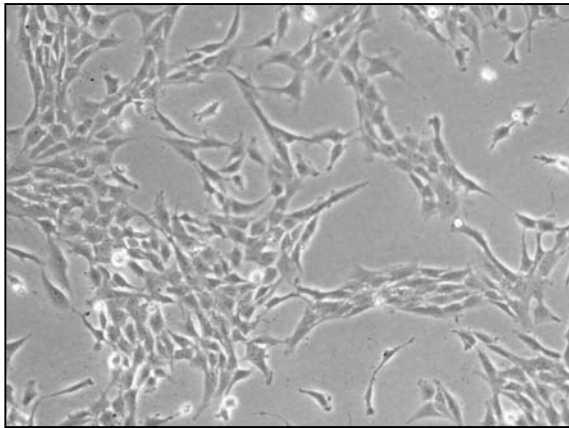


Abb 46a.

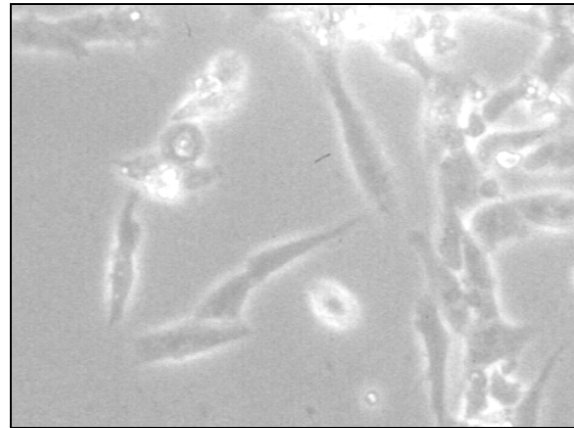


Abb 46b.

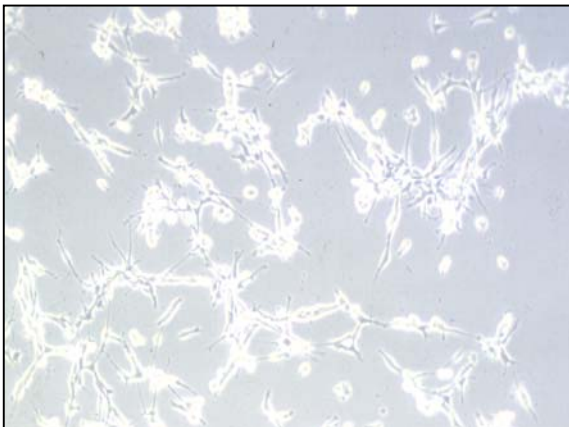


Abb 46c.

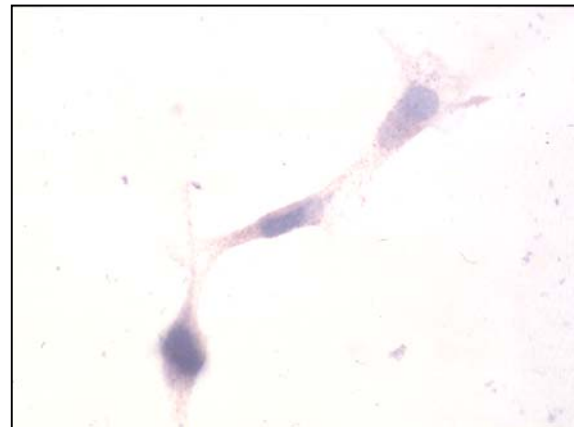


Abb 46d.

Abb. 46: In A und B sind die Kontrollaufnahmen für die in C und D gezeigte veränderte Morphologie nach Induktion der Gliabildung in 50x respektive 400x Vergrößerung gezeigt (vgl. auch 3.8.1.1). In B erkennt man die veränderte Morphologie der Zelllinie V54/2 nach Induktion der Gliabildung bei 50x Vergrößerung. Sie erscheint spindelförmig mit Ausläufern. In B erkennt man den immunohistochemischen Nachweis des Markers von Gliazellen GFAP bei 400x Vergrößerung.

3.7.2. Osteogene Differenzierung

Die untersuchten Zellen zeigten nicht nur die Potenz zur glialen Differenzierung, sondern auch die Durchführbarkeit der Induktion der Osteogenese, was durch den Nachweis von mRNA der alkalischen Phosphatase in der RT-PCR nach Induktion der osteogenen Differenzierung durch ein Medium, das Dulbeccos` s Modified Eagle Medium mit FCS, Penicillin/Streptomycin, Glutamin, Dexamethason, Ascorbinsäure, β -Glycerolphosphat, BMP-2 und Vitamin D3, bewiesen werden konnte. Das in Abb. 47 gezeigte Gel zeigt jeweils die Zelllinien V54/1, V54/2, L87/4 und L88/5 und die Positivkontrollzelllinie SAOS jeweils mit und ohne Konditionierung in dem osteogenen Medium. Man erkennt die Induzierbarkeit der alkalischen Phosphatase in den Zelllinien V54/1, V54/2 und L88/5 durch das osteogene Medium.

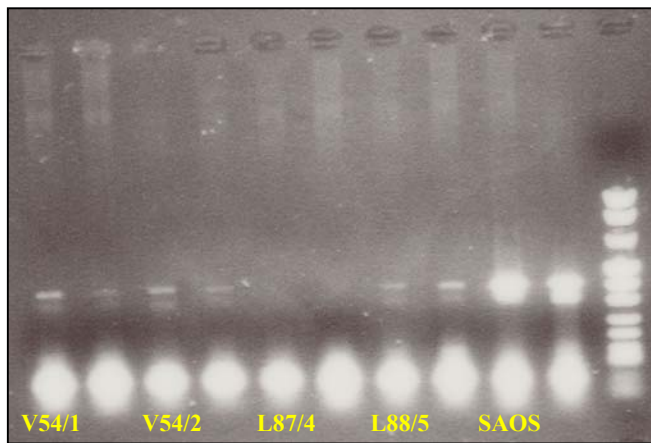


Abb. 47: *PCR auf Expression der alkalischen Phosphatase*

3.8. Zellsortierung

Auf der Basis der im 2. Kapitel beschriebenen Rh123 Färbung konnten zwei Populationen gewonnen werden. Die eine Subpopulation ist in der Lage, Rh123 aus der Zelle zu pumpen und wird Rh123^{low} genannt. Ihr Anteil beträgt je nach Zelllinie unter 10%. Die restlichen Zellen der untersuchten Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 sind dazu nicht in der Lage und werden als Rh123^{high} Population bezeichnet.

Die Separation der Zellen mit einem Zellsortiergerät ist dafür geeignet, die Fraktion der Rh123^{low} Zellen von der der Rh123^{high} Zellen zu trennen. Nach diesem Sortiervorgang lassen sich weitere

Charakteristika finden, die die zwei Subpopulationen neben der Fähigkeit zum Efflux von Rh123 unterscheiden.

Einer dieser Unterschiede zwischen der Rh123^{low} und der Rh123^{high} Population ist die Morphologie, die anhand von Zytocentrifugenpräparaten und elektronenmikroskopischen Bildern untersucht wurde. Weiterhin wurden die Zellen getrennt voneinander zum „Kolonie formierenden Wachstum (CFU)“ in die Methylcellulose gegeben. Außerdem erfolgte eine Untersuchung von Funktionseinheiten in Transkriptionsfaktor Netzwerken an den zwei Subpopulationen mit einer Reversen Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).

Die folgende Abbildung zeigt die Rh123-gefärbte Zelllinie V54/2. Es sind zwei Gates zu erkennen, die mit „Rh123^{highcc}“ und „Rh123^{lowcc}“ bezeichnet sind. Sie entsprechen den Gates „Rh123^{highcc}“ und „Rh123^{lowcc}“ aus dem 2. Kapitel, in dem die Rhodamin-Färbung ausführlich beschrieben wurde. Diese Gates sind die Grundlage für die Zellsortierung.

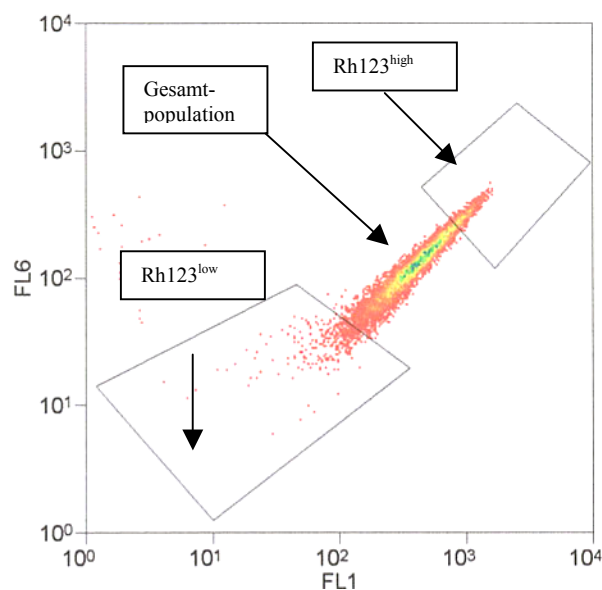


Abb. 48: Die nebenstehende Abbildung zeigt die mit Rh123 gefärbte Zelllinie V54/2. Die Gates „Rh123^{high}“ und „Rh123^{low}“ sind die Grundlage für die Zellsortierung in die Rh123^{high} Population und die Rh123^{low} Population. FL6 ist eine unspezifische Fluoreszenz: Exzitation 647 nm, Emission > 740 nm. Fluoreszenz FL1 hat die für die Darstellung von Rh123 benötigte Exzitation 488 nm, Emission 530/30 nm.

3.8.1. Morphologie

3.8.1.1. Licht- und Elektronenmikroskopie

Die nachfolgenden Abbildungen sollen die Morphologie der Zelllinie V54/2 sowohl lichtmikroskopisch als auch rasterelektronenmikroskopisch zeigen. Die Zelllinie V54/2 zeigt in der Kultur ein fibroblastoides Wachstum, was man in Abb. 49a bei 200facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiophot) erkennt. Die elektronenmikroskopische Darstellung ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, die bei 990facher Vergrößerung aufgenommen und in Zusammenarbeit mit der anatomischen Anstalt der LMU erstellt wurde. Die Abbildung zeigt zwei abgerundete Zellen, die auf den darunter liegenden fibroblastoid wachsenden Zellen locker anhaften.

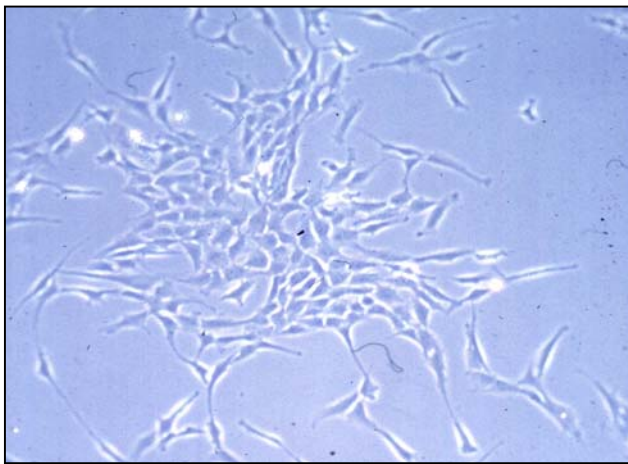


Abb. 49a.

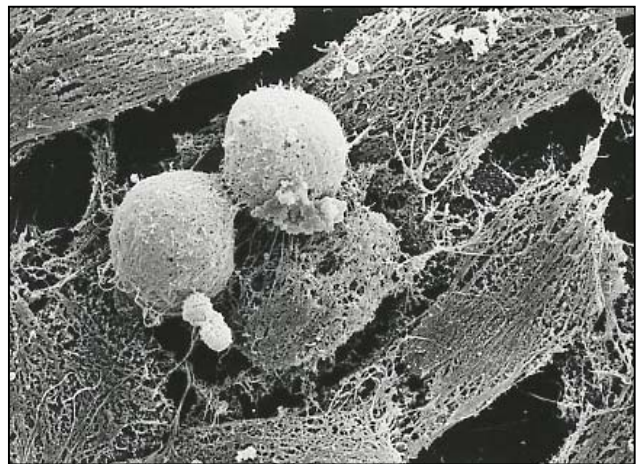


Abb. 49b.

Abb. 49: Morphologie der aus dem peripheren Blut etablierten und immortalisierten Zelllinie V54/2. **a** zeigt das adhärenente und fibroblastoide Wachstum in der Kultur. Man erkennt einige wenige nicht-adhärenente Zellen, die locker an den adhärenenten Zellen anhaften (200 x Vergrößerung). **b** zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von V54/2 in Kultur, mit einer möglichen mitotischen Figur von zwei nicht-adhärenenten Zellen auf den fibroblastoiden und adhärenenten Zellen (990 x Vergrößerung).

3.8.1.2. Vergleichende Morphologie der Rh123^{low} und Rh123^{high} Population

Von der Rh123^{high} und der Rh123^{low} Population wurden Zytozentrifugationspräparate angelegt, in dem die Zellen schonend auf einen Objektträger zentrifugiert und mit Pappenheim gefärbt wurden.

Die zwei sortierten Populationen Rh123^{high} und Rh123^{low} unterscheiden sich morphologisch dadurch, daß die Rhodamin123^{low} Population kleiner ist und einen ovoiden Kern besitzt. Ihr Plasma ist basophiler und homogener als das der Rhodamin 123^{high} Population. Die Rh123^{high} Population ist größer und besitzt einen gebuchteten bis segmentierten Kern mit perinukleärer Aufhellung.

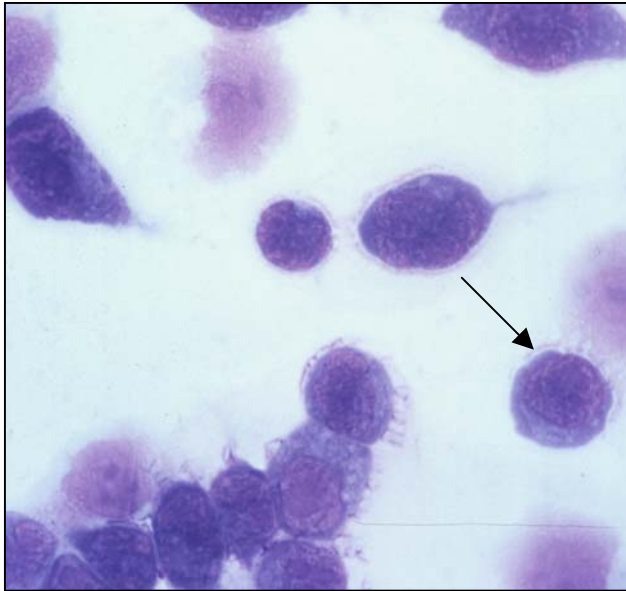


Abb. 50a.



Abb. 50b.

Abb. 50: Die Abbildung zeigt ein Zytozentrifugationspräparat von der Rh123^{low} (A) und eines von der Rh123^{high} (B) Population (Pappenheim, Obj. 100 x, Okl. 10 x). Der Pfeil in **a** markiert eine typische Rhodamin 123^{low} Zelle, mit basophilem, homogenem Plasma und ovoidem Kern. Das Bild **b** zeigt zwei Rh123^{high} Zellen, die deutlich größer als die Rh123^{low} Zellen sind. Sie besitzen einen gebuchteten bis segmentierten Kern mit perinukleärer Aufhellung.

3.8.2. Methylcellulose

In Methylcellulose kam es zu keinem Koloniewachstum über einen Zeitraum von drei Wochen. Weder die Rh123^{low} Population noch die Rh123^{high} Population zeigte nach getrenntem Wachstum in der Methylcellulose ein Wachstum im Sinne einer hämatopoietischen Kolonie formierenden Einheit (CFU-Colony forming Unit). In ihr sind Methylcellulose in Iscove's MDM, Fetales Kälber Serum, Bovines Serum Albumin, 2-Mercaptoethanol, L-glutamine, rh Stammzell Faktor, rh GM-CSF, rh IL-3, rh IL-6, rh G-CSF, rh Erythropoietin enthalten.

Zusammenfassung der Zellsortierung:

- Auf der Basis der Rhodamin-Färbung können zwei Populationen isoliert werden.
- Zwischen der Rh123^{low} und der Rh123^{high} Population bestehen starke Unterschiede in der Morphologie.
- Die als Rh123^{low} bezeichnete Population hat eine Morphologie, die für ein unreifes Stadium spricht.
- Die Morphologie der Rh123^{high} Population spricht für ein reiferes Stadium.
- Die Zellen zeigen kein Wachstum in der Methylcellulose.
- Die RT-PCR ergab gravierende Unterschiede in der Expression von wichtigen Funktionseinheiten von stammzellrelevanten Transkriptionsfaktor Netzwerke zwischen der Rh123^{high} und der Rh123^{low} Population (Kapitel 3.9.).
- Die Zelllinie V54/2 zeigt eine starke Plastizität, indem die zellsortierten Subpopulationen nach Reaktivierung in ihr prozentuales Verhältnis von vor der Zellsortierung zurückfallen (Kapitel 3.10.).

3.9. Expression von Funktionseinheiten von Transkriptionsfaktor Netzwerken

Aus den durch das Sortierexperiment gewonnenen Subpopulationen Rh123^{high} und Rh123^{low} wurde RNA isoliert, um danach anhand der RT-PCR die Expression von Funktionseinheiten von stammzellrelevanten Transkriptionsfaktor Netzwerken aufzuklären.

In der nachfolgenden Abbildung sind die Gelelektrophoresebilder der beiden Subpopulationen dargestellt. Man erkennt vier Zeilen in denen Banden zu sehen sind. In der zweiten und vierten Zeile läuft jeweils die Kontrolle für den Primer in der Zeile darüber. Folgende Primer sind von links nach rechts in der ersten Reihe aufgetragen: BMP4, BMP Rezeptor 1a, CD34, Cadherin5, Elf-1, Fli1, Flt1, Flt3, GATA1, GATA2, GATA3, GATA4, GATA5, GATA6 und Alpha Globin. In der zweiten Reihe folgt die Kontrolle für die genannten Primer.

In der dritten Reihe befinden sich von links nach rechts folgende Primer: Beta Globin, KDR, cKIT, LMO2, Myb, PBGD (Positivkontrolle), PECAM1, SCL, Spi1, TEK, TIE1, VEGF, vWF.

Da es sich bei der Untersuchung um eine semiquantitative RT-PCR handelt, ist es nötig, ein hoch konserviertes Gen als Kontrolle zu verwenden, das eine Relation zwischen dem RNA-Gehalt der zwei Subpopulationen herstellt. Verwendet wurde hierbei die Porphobilinogen Desaminase (PBGD), die geeignet dafür ist, einen quantitativen Bezug im RNA-Gehalt der beiden Subpopulationen herzustellen (Fink et al., 1998; Mensink et al., 1998).

In der vierten Reihe befinden sich wieder die Kontrollen für die Primer der darüberliegenden Reihe. Auf den Elektrophoresebildern sind deutliche Unterschiede in der RNA für bestimmte Einheiten innerhalb von Transkriptionsfaktor Netzwerken zwischen der Rh123^{high} und der Rh123^{low} Population zu erkennen. Unterschiede bestehen in der Expression von BMP4, Elf-1, Flt3, GATA1, GATA3, KDR und PECAM1 zwischen der Rh123^{high} und Rh123^{low} Population. RNA für für BMP4, GATA1, GATA3 und KDR ist nur in der Rh123^{low} Population vorhanden. Die Intensität der Banden folgender PCR Produkte ist wesentlich stärker in der Rh123^{low} Population: Elf1, GATA2, GATA6, Beta Globin, PECAM1.

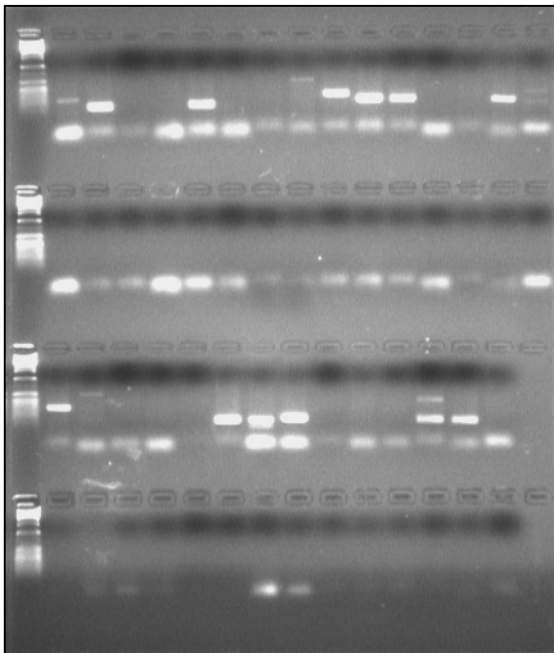


Abb. 51a (Rh123^{low})

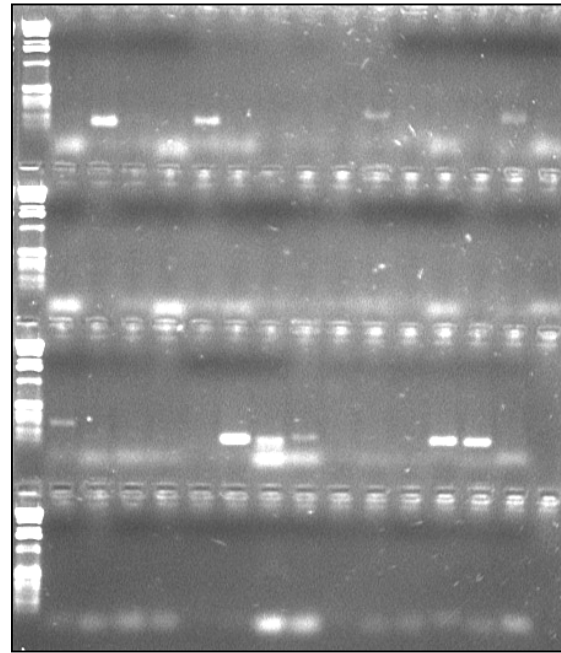
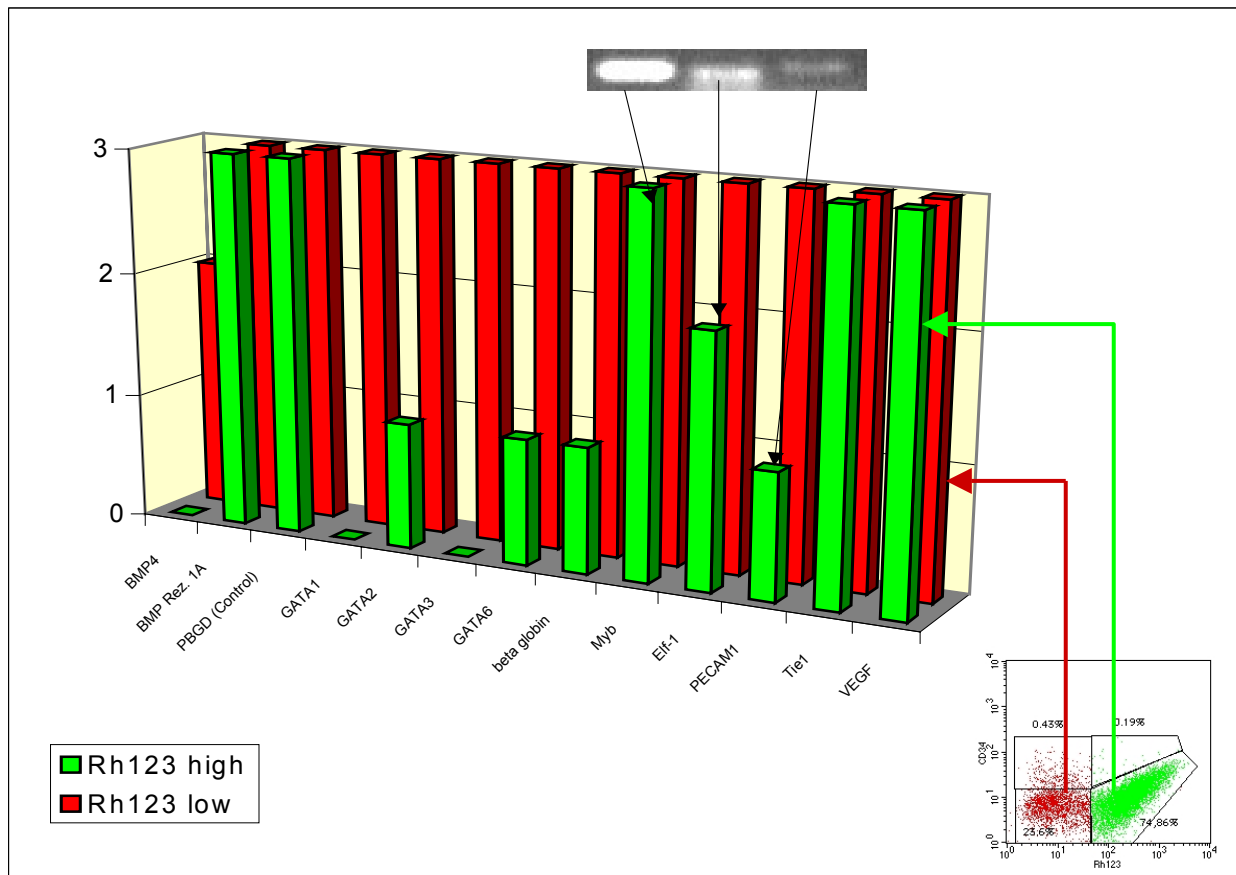


Abb. 51b (Rh123^{high})

Abb. 51: Die beiden Gelelektrophoresen zeigen die Analyse der RNA, die für bestimmte Faktoren innerhalb von Transkriptionsfaktor Netzwerken kodiert. Das linke Gel zeigt die RNA der Rh123^{low} Population und das rechte Gel die RNA der Rh123^{high} Population.

Eine Übersicht über die unterschiedliche Expression von Funktionseinheiten innerhalb von Transkriptionsfaktor Netzwerken gibt das nachfolgende Diagramm wieder. Grün ist die Kennfarbe für die Rh123^{high} Population und rot für die Rh123^{low} Population. Zusammenfassend wird aus dem Diagramm ersichtlich, dass die aufgeführten Faktoren in der Rh123^{low} Population meist viel stärker ausgeprägt sind oder nur in der Rh123^{high} Population vorkommen.



Tab. 24: Die Tabelle zeigt die Unterschiede im RNA-Gehalt für Funktionseinheiten innerhalb von Transkriptionsfaktor Netzwerken bei der Rh123^{low} und der Rh123^{high} Population.

Zusammenfassung der Expression von Funktionseinheiten in stammzellrelevanten Transkriptionsfaktor Netzwerken:

- Die RT-PCR ergab gravierende Unterschiede in der Expression von Funktionseinheiten innerhalb von Transkriptionsfaktor Netzwerken zwischen der Rh123^{high} und der Rh123^{low} Population.
- BMP4, GATA1 und GATA3 werden nur in der Rh123^{low} Population exprimiert.
- GATA2, GATA6, beta globin, Elf-1 und PECAM1 werden in einem stärkeren Maß in der Rh123^{low} als in der Rh123^{high} Subpopulation exprimiert.
- BMP Rezeptor 1A, Myb, Tie1 und VEGF werden im gleichen Maß in Rh123^{low} und Rh123^{high} exprimiert.

Wochen in Kultur gegeben und dann wiederum eine Rh123 Färbung durchgeführt. Die Messung ergab, dass sich die getrennten Populationen wieder in ihr altes Gleichgewicht begeben. Es wurde wieder ein kleiner Anteil an Rh123^{low} und ein großer Anteil an Rh123^{high} Zellen gemessen. Die Abbildung zeigt schematisch die Plastizität der Zelllinie V54/2. Der Begriff „Plastizität“ wird in der aktuellen Literatur für die Fähigkeit von adulten Stammzellen verwendet in verschiedene Linien zu differenzieren (Wagers et Weissman, 2004).

Zuerst wird die Messung der Rh123 gefärbten Zellen gezeigt. Danach erfolgt das Zellsortierexperiment, bei dem die zwei unterschiedlichen Subpopulationen anhand ihres Rh123 Effluxes unterschieden werden können. Das letzte Histogramm belegt, dass sich wieder das alte Verhältnis zwischen Rh123^{low} und Rh123^{high} Population eingestellt hat.

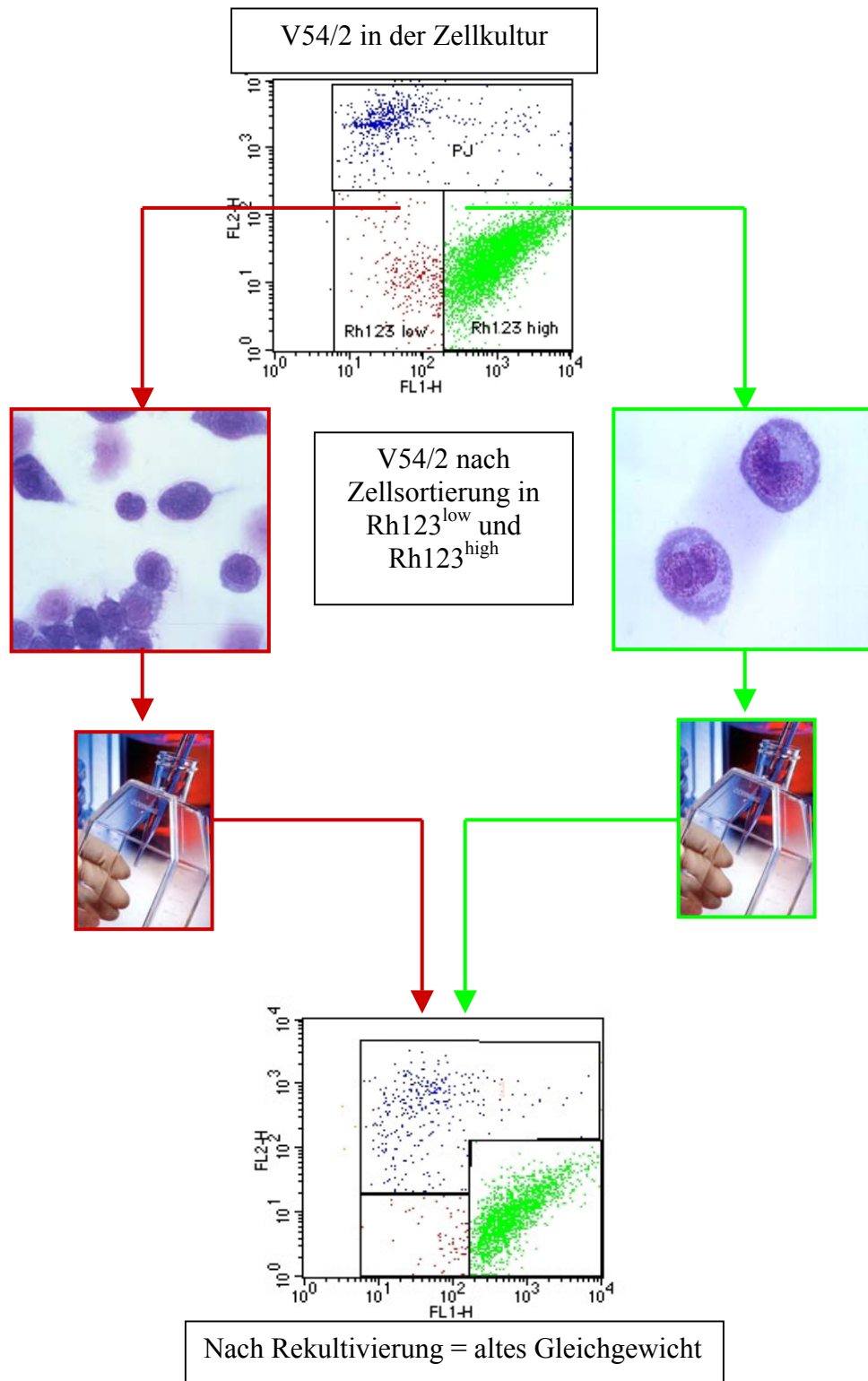


Abb. 52: Schematische Darstellung der Plastizität von V54/2. Die zellsortierten Subpopulationen Rh123^{low} und Rh123^{high} begeben sich nach Rekultivierung wieder in ihr altes Gleichgewicht.

IV. DISKUSSION

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der humanen Zelllinien V54/1 und V54/2, die aus dem peripheren Blut etabliert wurden, im Vergleich zu den aus dem Knochenmark gewonnenen Zelllinien L87/4, L88/5. Dabei wird anhand von molekularen, zellbiologischen und morphologischen Untersuchungen versucht, besondere Merkmale und Eigenschaften aufzuklären und Unterschiede zwischen den Zelllinien zu finden. Bei den Untersuchungen wurde besonderes Augenmerk auf mögliche Stammzeleigenschaften gelegt. Die in dieser Arbeit durchgeführten grundlagenbiologischen Untersuchungen sollen im nun folgenden Kapitel in den Kontext des Forschungsstands gerückt werden.

Besondere Bedeutung kommt den Zelllinien V54/1 und V54/2 hinsichtlich ihrer Modellfunktion für humane Stammzelllinien aus dem peripheren Blut zu. Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es möglich ist, humane Zelllinien mit Stammzeleigenschaften aus dem peripheren Blut zu etablieren. In der Stammzellforschung ist der Goldstandard zum Beweis von hämatopoetischen Stammzeleigenschaften die Rekonstitution der gesamten Hämatopoese bei tödlich bestrahlten Tieren oder der Nachweis, dass Stammzellen an Regenerations- oder Reparationsvorgängen nach Stammzelltransplantation teilnehmen (Körbling et al., 2002). Bei den hier untersuchten Zelllinien handelt es sich um humane immortalisierte Zelllinien, weshalb *in vivo* Experimente mit Stammzelllinien zur Beweisführung von Stammzeleigenschaften keine Option sind. Trotzdem gibt es einige sehr beweiskräftige Methoden, um Stammzeleigenschaften auch *in vitro* zu beweisen. Hierbei dient als erste Möglichkeit zur Aufklärung einer möglichen Stammzellfunktion die Charakterisierung des Immunphänotyps.

Wir haben gezeigt, dass alle untersuchten Zelllinien negativ für CD14, CD45 und HLA-DR sind. Durch das Fehlen von CD14 und CD45 konnte belegt werden, dass die Zelllinien sich noch nicht in die leukozytäre oder speziell die monozytäre Richtung differenziert haben. Bei der Untersuchung des Lymphoblastenmarkers CD10 konnte ein Unterscheidungsmerkmal zwischen den knochenmarksabgeleiteten und den aus dem peripheren Blut etablierten Zelllinien gefunden werden. Die Zelllinien aus dem Knochenmark sind stark positiv für CD10, die Linien V54/1 und V54/2 hingegen nur schwach positiv. Auch durch die Expression von CD117, den bekannten Rezeptor des Stammzellfaktors c-kit-Ligand, ist eine Unterscheidung zwischen den Zelllinien L87/4, L88/5 aus dem Knochenmark und den

Zelllinien V54/1 und V54/2 aus dem peripheren Blut möglich. CD117 konnte nur in den aus dem Knochenmark etablierten Zelllinien L87/4 und L88/5 nachgewiesen werden. V54/1 und V54/2 sind negativ für dieses auch als c-kit-Ligand beschriebene Oberflächenantigen. Des Weiteren war es möglich zu zeigen, dass unsere Zelllinien positiv für das als Endoglin bezeichnete und für mesenchymale Zellen mit Stammzeleigenschaften typische Oberflächenprotein CD105 sind. Ein Antikörper gegen dieses Epitop ist erst seit kurzem erhältlich. Somit konnte zum ersten Mal seit der Etablierung der Zellen im Jahre 1994 mittels Durchflußzytometrie gezeigt werden, dass es sich bei den Zelllinien L87/4 und L88/5, aber auch bei V54/1 und V54/2 um Zelllinien mit vorwiegend mesenchymaler Potenz handelt. Mit diesem Nachweis war ein wichtiger Schritt zur generellen Einordnung der Zellen als Zelllinien mit starker mesenchymaler Potenz gelungen.

Wir untersuchten auch die Zelllinien mit dem Antikörper gegen SH3, der uns durch die freundliche Unterstützung von Osiris Therapeutic Inc. zur Verfügung gestellt wurde und bis dato im Handel nicht erhältlich ist. Thompson et al. konnten 2001 durch Massenspektroskopie und Aminosäuresequenzierung zeigen, dass SH3 mit CD73 (5'-Nucleotidase) identisch ist. Zu Beginn unserer Untersuchungen galt dieser Antikörper als spezifisch für Knochenmarksstammzellen und man hypothesierte, dass der SH3 Antikörper nicht mit anderen Komponenten des Knochenmarks reagiere, wozu auch hämatopoetische Zellen gezählt wurden. Man war der Meinung, dass das SH3-Antigen nicht bei Osteoblasten gefunden werde und spezifisch sei für primitive Stammzellen. Mit dem Nachweis, dass SH3 eine Komponente von CD73, einem weit verbreiteten Marker für lymphoides Gewebe ist und dessen Expression mit lymphoider Reifung steigt, musste diese Hypothese neu überdacht werden.

Thompson et al. glauben, dass es sich bei CD73 um ein Epitop handelt, das die Zell-Zell-Interaktion zwischen stromalen und lymphoiden Zellen im Knochenmarksmikromilieu vermittelt. Obwohl wir mit dem Nachweis von CD105 den prädominierend mesenchymalen Charakter der untersuchten Zelllinien aufgeklärt haben, ist die genaue Einordnung der Zelllinien noch nicht abgeschlossen. Denn letztendlich ist die Bedeutung einer starken SH3/CD73-Positivität noch unklar.

Aufgrund Untersuchungen von Goodell et al. und anderen Arbeitsgruppen ist bekannt, dass durch den Farbstoff Rhodamin 123 Subpopulationen aufgeklärt werden können, denen Stammzeleigenschaften, wie z.B. eine aktive hämatopoetische Repopulationsfähigkeit von

bestrahltem Knochenmark, zugeschrieben werden (vgl. Kapitel 1.5.). Repopulationsfähigkeit ist vor allem mit der Expression von CD34 assoziiert, das auf allen untersuchten Zelllinien bei der Gesamtdarstellung bis dato nicht nachweisbar war.

Anhand der Rh123-Versuche konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich bei allen Zelllinien zwei Subpopulationen unterscheiden lassen. Die eine ist in der Lage, den Farbstoff Rh123 aktiv aus der Zelle zu pumpen und wird Rh123^{low} genannt. Sie macht einen Anteil von unter 10% der gesamten Zellpopulation aus. Der restliche Anteil der jeweiligen Zelllinie ist nicht in der Lage Rh123 aus der Zelle zu pumpen. Dieser Zellanteil wird als Rh123^{high} Population bezeichnet. Durch die Hemmung des Effluxes von Rh123 aus der Zelle durch Verapamil konnten wir zeigen, dass der verminderte Nachweis von Rh123 in der Rh123^{low} Population durch einen aktiven und Kalzium-abhängigen Efflux von Rh123 aus der Zelle zustande kommt. Dieser Efflux ist durch die *mdr*-Gen-kodierte P-Glykoproteinpumpe vermittelt und wird den frühesten Vorläuferzellen / Stammzellen zugeschrieben (Uchida et al., 1996). Durch den indirekten Nachweis des P-Glykoproteins können die untersuchten CD34 negativen Zelllinien als humane Zellmodelle identifiziert werden, die einen Anteil an potentiellen Rh123^{low} Vorläuferzellen besitzen. Es wurden schon viele Untersuchungen zu diesen Vorläuferzellen unternommen, wobei man meist von *ex-vivo* Material wie Knochenmark, Nabelschnurblut oder peripherem Blut ausging. Die Bedeutung eines humanen Zelllinienmodells für die Zellkultur zur Untersuchung dieser Subpopulationen von Knochenmark und peripherem Blut liegt u. a. darin, dass die aufwendige Gewinnung von Nativmaterial entfällt und ausreichende Mengen von monoklonalen Zellen langfristig zur Verfügung stehen.

Der Ausschluss von toten Zellen ist durch Kofärbung der Zelllinien mit dem Vitalfarbstoff Propidiumjodid möglich. Dadurch ist man in der Lage, sehr genaue Angaben zu den tatsächlichen prozentualen Verhältnissen von vitalen Zellen der Rh123^{low} zur Rh123^{high} Population zu machen. Wir haben gezeigt, dass sich die aus dem Knochenmark etablierten Zelllinien L87/4 und L88/5 dahingehend von den aus dem peripheren Blut kultivierten Zelllinien V54/1 und V54/2 unterscheiden, dass sie einen etwas höheren Anteil an Rh123^{low} Zellen haben.

Der aktive Efflux von Rh123 aus der Zelle wird durch die *mdr*-Gen kodierte und Kalzium-abhängige P-Glykoproteinpumpe vermittelt. Dass die untersuchten Zelllinien Träger dieser P-Glykoproteinpumpe sind, haben wir nicht nur funktionell durch die Verapamil-Hemmung des Rh123-Effluxes nachgewiesen, sondern auch strukturell durch den direkten Nachweis von P-

Glykoprotein auf der Zelloberfläche. Durch eine Kofärbung von Rh123 mit dem PE-markierten Antikörper gegen P-Glykoprotein konnten wir nachweisen, dass das P-Glykoprotein nur in der Rh123^{low} Population vorhanden ist. Dadurch war nun mit einer zweiten Methode bewiesen worden, dass nur die Rh123^{low} Population das P-Glykoprotein auf der Oberfläche trägt und damit zum Efflux von Rh123 befähigt ist. Damit ist die Rh123^{low} Subpopulation eindeutig als „aktive“ Subpopulation identifiziert. Uchida et al, Bertocello et al., Chaudary & Robinson und andere Arbeitsgruppen weisen den P-Gp⁺/Rh123^{low} Zellen die besonderen Eigenschaften von Vorläuferzellen zu. Ihre Untersuchungen beziehen sich dabei allerdings auf Nativmaterial und nicht auf Zelllinien.

Weiterer Bedarf für Forschung ergibt sich aus der Tatsache, dass die Zelllinien L88/5 und V54/1 nach Verapamilzugabe eine Abnahme der P-Gp positiven Zellen zeigen, L87/4 hingegen keine Veränderung und V54/2 eine Zunahme der P-Gp positiven Zellen.

Als Erklärung dafür wäre denkbar, dass es bei L88/5 und V54/1 zu einer relativen Verminderung der P-Gp positiven Zellen kommt, da sich diese nach Hemmung des Rh123-Effluxes in der Rh123^{high} Population darstellen. Ein Gleichbleiben der P-Gp positiven Zellen (L87/4) und eine Zunahme nach Verapamil-Inkubation wäre vielleicht durch eine vermehrte und induzierte Expression der P-Gp zu erklären. Bei Tumoren wurde beobachtet, dass der Anteil an P-Gp positiven Tumorzellen zunimmt, wenn sie mit Zellgiften, wie z.B. Zytostatika, in Verbindung gebracht werden. Chaudary et al. zeigten durch stressinduzierende Stoffe, die die „aktivierte Proteinkinase C“ aktivieren, dass auch eine relativ schnelle Induktion der P-Gp nach Exposition mit einem Chemotherapeutikum möglich ist. Sowohl Verapamil als auch der verwendete anti-P-Gp Antikörper könnten einen ähnlichen Effekt bedingen.

Die Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2 wurden auf den etablierten Oberflächenmarker für hämatopoetische Vorläuferzellen CD34 untersucht. Dabei stellten wir fest, dass es einen geringen Anteil an CD34 positiven Zellen bei allen untersuchten Zelllinien gibt. Da es sich hierbei um einen sehr kleinen Anteil von 1%-3% der Gesamtpopulation handelte, war es wünschenswert, durch eine weitere etablierte Methode eine Selektion von CD34⁺ Zellen durchzuführen. Hierfür bot sich die Methode der Rh123 Färbung mit zusätzlicher Kofärbung gegen CD34 an. Dabei sollte geklärt werden, ob bei der CD34-Expression eine Korrelation zur Färbung mit Rh123 besteht, insbesondere ob Unterschiede in der CD34-Expression zwischen den Subpopulationen Rh123^{low} und Rh123^{high} zu finden sind.

Diese Untersuchung ergab, dass die CD34 positiven Zellen ausschließlich aus der Rh123^{low} Subpopulation stammen. Offensichtlich gibt es also innerhalb der untersuchten Zelllinien eine

Rh123^{low}/CD34⁺ Subpopulation, der eine gewisse hämatopoetische Potenz aufgrund ihrer Positivität für CD34 zugeschrieben werden könnte. Wegen der Monoklonalität der vorliegenden Zelllinien ist dies ein Beispiel für die Plastizität der humanen Zelllinien und deren Stammzeleigenschaften, denn offensichtlich befindet sich innerhalb einer prädominant mesenchymalen und eher ruhenden Zelllinie eine „aktive“ Subpopulation, die Eigenschaften von hämatopoetischen Vorläuferzellen besitzt (Lange et al., 1999).

Untersuchungen von Pierelli et al. von 1999 haben gezeigt, dass im stammzellmobilisierten Spenderblut eine Zellpopulation vorhanden ist, die CD34⁺/CD105⁺ ist. Diese Zellen zeigen auch gewisse Stammzeleigenschaften, wie z.B. die erhöhte Potenz zur Initiierung von Langzeitkulturen (Long-term-culture-initiating-cell (LTC-IC)). Diese CD34⁺/CD105⁺ Zellen haben laut Pierelli et al. die biologischen Eigenschaften von primitiven Vorläuferzellen.

Auch wir haben bei unseren Untersuchungen an den Zelllinien Subpopulationen von Zellen gefunden, die CD34⁺/CD105⁺ waren. Die Kofärbungen von CD34 mit CD105 hat bei unseren Zellen ergeben, dass die Zellen mit der stärksten Expression von CD105 auch stark CD34 exprimieren. Im Gegensatz zu Pierelli haben wir aber ein humanes Zelllinienmodell verwendet, das von einer monoklonalen Zelle ausgeht. Daraus folgt, dass die CD105⁺ monoklonalen Zelllinien die Potenz haben, eine CD34⁺ Subpopulation hervorzubringen.

Die Besonderheit des Farbstoffs Hoechst 33342 ist neben der Tatsache, dass er an die DNA der Zellen in Abhängigkeit von deren Stadium im Zellzyklus bindet, seine Eigenschaft Zellgruppen zu erkennen, die als SP-Zellen bezeichnet werden (Goodell et al., 1996).

Mit Hilfe dieses Farbstoffs Hoechst 33342 ist es möglich, die Zelllinien näher zu charakterisieren, indem prozentuale Angaben dazu gemacht werden, wie groß jeweils der Anteil der Zelllinien in der G₁-, S- und der G₂M-Phase ist. Hierbei werden wieder Unterschiede zwischen den Linien L87/4 und L88/5 und den V54-Zelllinien deutlich. L87/4 und L88/5 haben einen größeren Anteil an Zellen in der G_{0/1}-Phase und einen kleineren Anteil in der G₂M-Phase als die beiden V54-Linien (64% und 54% gegenüber 47% und 37%).

Die Zellen, die sich in der G_{0/1}-Phase befinden, werden von einigen Autoren auch als SP-Zellen bezeichnet. Ihnen werden im Gegensatz zu nicht SP-Zellen Stammzeleigenschaften, wie z.B. tausendfach erhöhte Repopulationsfähigkeit zugeschrieben. Wir konnten zeigen, dass ein Anteil an SP-Zellen bei allen untersuchten Zelllinien vorhanden ist. Der Unterschied zwischen den Zelllinien L87/4, L88/5 und V54/1, V54/2 ist hierbei, dass der Anteil der SP-

Zellen in den aus dem Knochenmark kultivierten Zellen L87/4 und L88/5 zwischen 0.15 und 0.16%, bei den Zelllinien aus dem peripheren Blut V54/1 und V54/2 hingegen deutlich höher bei 0.46-0.96% liegt.

Ein sehr aussagekräftiges Instrument bei der Untersuchung von Stammzellen mit entsprechenden Eigenschaften ist die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Linien. Diese Plastizität dient bis heute zur Definition von Stammzellen (vgl. Kapitel 1.1.). Die hämatopoetische Potenz wurde durch die Rh123 Färbung und die Färbung mit dem Antikörper gegen CD34 gezeigt. Um weitere Beweise für die Plastizität der Zelllinie V54/2 zu finden, stimulierten wir die Zelllinie mit Neurotropic Growth Factor- β (NGF). Dadurch änderte sich die Morphologie der stimulierten Zelllinie V54/2 grundlegend. Die Zellen bekamen einen spindelförmigen Zellkörper mit Zellausläufern, die man zusammenfassend als neuronal/glial bezeichnen könnte. Um diesem Hinweis aus der Morphe einen immunhistochemischen Nachweis der glialen Potenz folgen zu lassen, haben wir die Zellen nach 24-stündiger NGF-Stimulierung auf die Expression von GFAP untersucht. Hainfellner et al. zeigten 2001, dass bei Fibroblasten und anderen mesenchymalen Geweben GFAP nachweisbar ist. Daraus schlossen Hainfeller et al. die Abstammung von Fibroblasten aus der Neuralleiste. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass GFAP auf der humanen Zelllinie V54/2, die aus dem peripheren Blut etabliert wurde, nach Induktion mit NGF- β vorhanden ist. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit Hainfellers Untersuchungen und ein weiterer Beweis für die mesenchymale Potenz dieser Zelllinie. Diese beinhaltet auch die gliale Differenzierung. Die Potenz zur glialen Differenzierung ist ein Hinweis auf die vielschichtige Differenzierungspotenz des von uns untersuchten humanen Zelllinienmodells.

Eine weitere Untersuchung zum Differenzierungspotential der Zelllinien war der Versuch einer Differenzierung in Richtung Osteogenese mit u. a. BMP 2 und Vitamin D3 mit anschließender Untersuchung der Expression der alkalischen Phosphatase durch RT-PCR. Diese Untersuchung ergab einen positiven Nachweis der mRNA in fast allen Zelllinien. Damit ist es wahrscheinlich, dass es eine Differenzierungspotenz der untersuchten Zelllinien in Richtung osteogene Differenzierung gibt. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend bewiesen werden.

Die Differenzierungsexperimente lieferten deutliche Hinweise, dass die hier untersuchten Zelllinien eine hohe Potenz zur Differenzierung in verschiedene Richtungen besitzen. Um

genauer das Potential der Zelllinie V54/2 genauer auszuloten, als dies durch die Induktion der gesamten Zelllinie möglichst ist, haben wir eine getrennte Analyse der durch die Rh123 Färbung unterscheidbaren Subpopulationen angestrebt. Für diese Untersuchung der Rh123^{low} und Rh123^{high} Subpopulationen bietet sich besonders ein Zellsortiergerät an, welches die getrennte Analyse der Subpopulationen, z.B. hinsichtlich der mRNA Ausstattungen möglich macht. Nach dieser Zellseparation wurde versucht, Unterschiede zwischen den zwei Subpopulationen bezüglich Morphologie, Wachstum in Methylzellulose und Expression von Funktionseinheiten innerhalb von Transkriptionsfaktor Netzwerken zu finden.

Um die Zelllinie V54/2 einordnen zu können, wurden erst Fotografien der Nativkultur angefertigt, in denen die Zellen ein fibroblastoides und adhärentes Wachstum zeigen. Elektronenmikroskopisch zeigt V54/2 ebenfalls ein fibroblastoides Wachstum, wobei aber auch sich gut ablösende Zellen zu erkennen sind, die eine andere Morphe zeigen. Sie sind abgerundet und kugelig und lagern sich den adhärent wachsenden Zellen locker an.

Die Morphologie der Subpopulationen Rh123^{low} und Rh123^{high} unterscheiden sich auf den Zytozentrifugationspräparaten nach konventioneller Zellfärbung stark voneinander. Rh123^{low} ist kleiner und hat einen ovoiden Kern. Das Plasma ist basophiler und homogener als das der Rh123^{high} Subpopulation. Die Rh123^{high} Subpopulation ist größer und besitzt einen gebuchteten Kern mit perinukleärer Aufhellung und breitem Zytoplasmasaum.

Die Morphologie der Rh123^{low} Zellen komplettiert das aus den Färbeversuchen und den Oberflächenproteinen gewonnene Bild, dass es sich bei dieser Subpopulation offenbar um besonders frühe Vorläuferzellen handelt.

In der Methylzellulose zeigte sich jeweils kein Wachstum der Rh123^{low} oder der Rh123^{high} Subpopulation. Die Methylzellulose enthält Cytokine, die eine Ausdifferenzierung in die hämatopoetische Reihe induzieren sollen. Ob es sich bei unseren Untersuchungen hierbei tatsächlich um die generelle Unfähigkeit zur Ausdifferenzierung in die hämatopoetische Reihe in der Methylzellulose handelt, oder ob die Zellen durch den „traumatisierenden“ Zellsortiervorgang so sehr geschädigt wurden, dass sie nicht mehr darin anwachsen konnten, konnte nicht genau geklärt werden. Eine weitere Hypothese für das fehlende Wachsen in der Methylzellulose ist, dass es sich bei der Rh123^{low} Subpopulation um eine entwicklungsbiologisch so frühe Stammzelle handelt, dass das spezielle Cytokingemisch der

Methylzellulose ein nur mangelhafter und unphysiologischer äußerer Stimulus zur hämatopoetischen Differenzierung ist.

Unser Bestreben war es, mit einer molekularbiologischen Methode aufzuklären, ob für bestimmte Stammzellfunktionen wichtige Funktionseinheiten von Transkriptionsfaktor Netzwerken exprimiert werden und ob es hierbei Unterschiede zwischen der Rh123^{low} und der Rh123^{high} Subpopulation gibt. Dazu eignet sich die sogenannte „Real Time Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion“ (RT-PCR).

Bei der Untersuchung der genomischen DNA und damit der Gene mit Hilfe der PCR kann noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Gene tatsächlich für die Zelle von funktioneller Relevanz sind. Es ist möglich, dass diese Gene im Leben einer Zelle nie transkribiert werden und somit funktionell keine Rolle spielen. Bei der Untersuchung der mRNA mittels RT-PCR werden die Botenmoleküle nachgewiesen, die dann zur Synthese der zellulären Funktionsproteine führen. Die bei dieser Arbeit durchgeführte RT-PCR für bestimmte stammzellrelevante Gene ist für die hier vorliegende Fragestellung eine sehr präzise Methode, die tatsächliche zelluläre Stammzellpotenz nachzuweisen.

Aus den zellsortierten Subpopulationen Rh123^{high} und Rh123^{low} wurde die RNA isoliert und auf das Vorliegen für folgende Syntheseprodukte untersucht: BMP4, BMP Rezeptor 1A, CD34, Cadherin 5, Elf-1, Fli1, Flt1, Flt3, GATA1, GATA2, GATA3, GATA4, GATA5, GATA6, alpha globin, beta globin, KDR, c-kit, KLF1, LMO2, Mab, PBGD, PECAM1, SCL, Spi1, Tie1, Tie2, VEGF, vWF.

Das Verteilungsmuster war hierbei sehr interessant, denn es zeigte sich eine Expression für eine Vielzahl von Funktionseinheiten von stammzellrelevanten Transkriptionsfaktor Netzwerken in der Rh123^{low} Population, wohingegen die Expression der meisten untersuchten Funktionseinheiten in der Rh123^{high} Population entweder geringer oder nicht vorhanden war. In der Rh123^{low} Subpopulation sind folgende Funktionseinheiten stark exprimiert: BMP4, BMP4 Rezeptor 1A, Elf-1, GATA1, GATA2, GATA3, GATA6, beta globin Myb-c, PBGD, PECAM1, Tie1 und VEGF. Dabei handelt es sich jeweils um Funktionseinheiten von Netzwerken, die für die Differenzierung von Zellen eine entscheidende Bedeutung haben, sowohl hinsichtlich einer Relevanz für mesenchymale Zellen, als auch hinsichtlich einer Assoziation zur Hämatopoese. Mit der Hämatopoese assoziiert sind GATA-1, GATA-2, GATA-3, Elf-1, beta globin, myb-c, und PECAM-1. Sie sind fast ausschließlich in der Rh123^{low} Population vorhanden, nicht aber in der Rh123^{high} Population. Die Tatsache, dass auch Faktoren mit Implikationen auch für die Angiogenese nachgewiesen werden können,

wie z.B. PECAM-1 oder VEGF, spricht für eine gewisse Pluripotenz der vorliegenden Subpopulation. Dieser gleichzeitige Nachweis von mesenchymalen und hämatopoetischen Funktionseinheiten von stammzellrelevanten Transkriptionsfaktor Netzwerken wirft ein neues Licht auf die Potenz von adulten Stammzellen.

Im Gegensatz dazu können bei der Rh123^{high} Subpopulation die Funktionseinheiten BMP4, GATA1 und GATA3 nicht nachgewiesen werden. GATA2, GATA6, beta globin und PECAM1 werden nur schwach exprimiert. Elf-1 ist mittelstark vorhanden. BMP Rezeptor 1A, Myb, Tie1 und VEGF können in gleichem Maße wie bei der Rh123^{low} Population nachgewiesen werden. Zusammenfassend ergibt sich für die Rh123^{high} Subpopulation, dass hämatopoetische Faktoren deutlich vermindert exprimiert werden, wohingegen Faktoren, die insbesondere eine Angiogenese betreffen, gleich stark wie bei der Rh123^{low} Subpopulation vorhanden sind.

Diese molekularbiologischen Erkenntnisse sind kongruent mit den Untersuchungen der Morphologie und der Oberflächenmarker der zellsortierten Subpopulationen. Auch diese Ergebnisse sprechen für eine aktivierte Rh123^{low} Subpopulation, die CD34⁺ Zellen beinhaltet, und eine eher undifferenzierte Rh123^{high} Population. Dabei ist besonders interessant, dass es sich bei der untersuchten Zelllinie V54/2 um eine - wie schon erwähnt - monoklonale Zelllinie handelt. Dadurch konnte zum ersten Mal anhand einer humanen Zelllinie nachgewiesen werden, dass eine monoklonale Zelllinie aus dem peripheren Blut die Potenz zur Differenzierung in die mesenchymale, aber auch in die hämatopoetische Richtung besitzt.

Ein von der Durchführung her nicht aufwendiges, aber von der Aussage her hoch relevantes Experiment war die getrennte Rekultivierung der sortierten Subpopulationen Rh123^{low} und Rh123^{high}. Nach der Zellsortierung wurden die gewonnenen Populationen jeweils in einer Zellkulturflasche für 14 Tage unter identischen Bedingungen inkubiert. Das Wachstumsverhalten der Subpopulationen ist unterschiedlich. Während die Rh123^{high} Population ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigt wie die unseparierte Zelllinie V54/2, wächst die Rh123^{low} Subpopulation bei identischen Wachstumsbedingungen langsamer als es bei differenzierten Zellen zu erwarten ist.

Nach der vierzehntägigen Inkubation wurden die getrennt voneinander kultivierten Zellpopulationen erneut mit Rh123 gefärbt und durchflußzytometrisch untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass sich wiederum eine Rh123^{low} und Rh123^{high} Subpopulation in einer prozentuellen Verteilung wie in der Ausgangspopulation vor der Zellsortierung nachweisen

ließen. Dies ist ein Indiz für die Plastizität der Zelllinie V54/2 und das natürliche biologische Fließgleichgewicht, das zwischen der Rh123^{high} und der Rh123^{low} Subpopulation besteht. Sowohl die Rh123^{low} als auch die Rh123^{high} Subpopulation sind in der Lage, beide der durch den Efflux von Rh123 charakterisierten Subpopulationen hervorzubringen. Die Subpopulationen scheinen folglich nicht nur nebeneinander zu existieren. Vielmehr ist eine Transdifferenzierung von Rh123^{low} Zellen zu Rh123^{high} Zellen und umgekehrt möglich und für die biologische Stammzellfunktion notwendig.

Die Ergebnisse der immunphänotypischen Charakterisierung der Rh123- und der Hoechst 33342 Färbung, der Induktionsexperimente und der Zellsortierung mit anschließender Untersuchung der Funktionseinheiten von Transkriptionsfaktor Netzwerken ergaben völlig neue und interessante Einblicke in die Biologie von humanen Stammzellen aus dem peripheren Blut und aus dem Knochenmark. Hierbei wurden viele Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede zwischen den Zelllinien L87/4, L88/5 und V54/1, V54/2 deutlich. Innerhalb der einzelnen Zelllinien wurden Beweise für die starke Differenzierungspotenz der monoklonalen Zelllinien gefunden, was besonders durch die Rh123 Färbungen mit anschließender molekularer Analyse nachgewiesen werden konnte. Die genauere Untersuchung der Zelllinie V54/2 ergab eine potentielle Differenzierungsfähigkeit in die mesenchymale, hämatopoetische und neuronale/gliale Richtung. Obwohl durch diese Arbeit Einblicke in die Biologie humaner Stammzellen gewonnen werden konnten, wurden viele neue Fragen aufgeworfen. Zu klären wird sein, in wiefern die untersuchten humanen Zelllinien Modellfunktion für Stammzellen in-vivo haben und welche äußeren Faktoren sowie zellulären biochemischen Informationswege (z.B. Zytokine oder Chemokine) die physiologische Differenzierung induzieren. Eine noch genauere Charakterisierung des Verhaltens der Zelllinien in biologischen Systemen bedarf weiterer Forschung. In Zukunft könnte eine in-vitro Expansion von Stammzellen aus dem peripheren Blut oder dem Knochenmark von Patienten mit Stammzelldefektkrankheiten eine klinische Anwendung in der hämatopoetischen Rekonstitution, dem Organersatz und der Zelltherapie zahlreicher Erkrankungen finden.

V. SYNOPTISCHE ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der funktionellen und molekularen Charakterisierung von humanen CD34⁺ Zelllinien aus dem peripheren Blut (V54/1, V54/2) im Vergleich zu den aus dem Knochenmark etablierten Zelllinien (L87/4, L88/5). Die Klone V54/1 und V54/2 wurden aus dem peripheren Blut nach Stammzellmobilisierung und CD6 Depletion durch Zugabe eines Faktorengemisches aus IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, IL-8 und IL-11 erzeugt. L87/4 und L88/5 hingegen sind adhärenz- und wachstumsarretierte Stromazellen, die die Erhaltung und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen durch Mediatoren ermöglichen (Thalmeier et al. 2000).

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Stammzeleigenschaften bei den Zelllinien L87/4, L88/5, V54/1 und V54/2. Dazu soll die Färbung mit den Farbstoffen Rhodamin 123 (Rh123) und Hoechst 33342 zeigen, ob Subpopulationen innerhalb der Klone mit unterschiedlichen Färbereigenschaften, bestehen. Die biologische Bedeutung der beiden Farbstoffe liegt darin, dass Sie dazu geeignet sind frühe Stammzellen zu identifizieren. Als Substrat der P-Glykoproteinpumpe, die u.a. auf frühen Vorläuferzellen mit stark erhöhter Repopulationskapazität gefunden wird, werden diese Farbstoffe aus der Zelle gepumpt. Der Farbstoff-Efflux kommt durch die mdr-Gen-kodierte (multi-drug-resistance) und Kalzium-abhängige P-Glykoproteinpumpe zustande. Das P-Glykoprotein hat neben der Bedeutung in der Stammzellbiologie in der angewandten Medizin eine wichtige Funktion in der Resistenzentwicklung von Tumoren.

Des Weiteren wurden bei den Zelllinien stammzellrelevante Oberflächenantigene (CD10, CD34, CD14, CD105, SH3 und CD117) untersucht, um Unterschiede zwischen L87/4, L88/5 und den Klonen V54/1, V54/2 zu erkennen. Versuche zur Induktion der Differenzierung sollten Hinweise auf die Plastizität der Zelllinien geben. Experimente an den durch den Rh123-Efflux unterscheidbaren Subpopulationen der Zelllinie V54/2 dienen der Aufklärung von Unterschieden in Morphologie, zellulären Transportfunktionen und Funktionseinheiten von Transkriptionsfaktor Netzwerken.

Methodisch wurde für die Analyse der Epitope und der Färbungen mit Rh123 und Hoechst 33342 ein Durchflußzytometer verwendet. Die Analyse der Funktionseinheiten von Transkriptionsfaktor Netzwerken wurde mittels Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion durchgeführt.

Die Ergebnisse der Färbeexperimente zeigten, dass bei allen untersuchten Zelllinien durch eine unterschiedliche Anfärbbarkeit der Zellen mit dem Farbstoff Rh123 zwei Subpopulationen unterschieden werden können. Die jeweils größere Subpopulation der Zelllinien färbt sich mit Rh123 an und bleibt auch nach einer definierten Inkubationszeit, die den Rh123-Efflux ermöglichen soll, gefärbt. Sie wird Rh123^{high} genannt. Die übrigen Zellen, die bei allen Zelllinien unter 10% der Gesamtpopulation betragen, sind in der Lage den Farbstoff aus der Zelle zu pumpen. Diese Subpopulation wird Rh123^{low} genannt und ist mit Stammzeleigenschaften wie tausendfach erhöhter Repopulationsfähigkeit in NOD/SCID-Mäusen assoziiert. Es konnte also innerhalb der untersuchten monoklonalen Linien eine Rh123^{low} Subpopulation identifiziert werden, die sich durch zahlreiche biologische Eigenschaften von der Gesamtpopulation unterscheidet.

Da der Rh123 Efflux durch eine Kalzium-abhängige Pumpe zustande kommt, lässt sie sich durch den Kalziumantagonisten Verapamil hemmen. Eine Hemmung der Pumpe bewirkt, dass die Rh123^{low} Zellen nicht mehr in der Lage sind Rh123 aus der Zelle zu pumpen, so dass sie nach einer definierten Inkubationszeit mit Rh123 gefärbt bleiben. Neben diesem funktionellen Beweis für die P-Glykoproteinpumpe konnte durch den strukturellen Nachweis der Pumpe mittels eines Antikörpers gegen P-Glykoprotein ein definitiver Beweis für das Vorhandensein der aktiven P-Glykoproteinpumpe bei der Rh123^{low} Population erbracht werden.

Mit dem anderen Farbstoff Hoechst 33342 können die jeweiligen Anteile der Zelllinien in den einzelnen Stadien des Zellzyklus nachgewiesen und zudem ein kleiner Anteil an Zellen bestimmt werden, der als „Side Population“ (SP-Zellen) definiert wird. Diesen SP-Zellen werden Eigenschaften von aktiven Stammzellen zugeschrieben. Hierbei besteht ein Unterschied zwischen den aus dem Knochenmark und den aus dem peripheren Blut etablierten Linien, da die Zellen aus dem peripheren Blut nicht nur ein anderes Zellzyklusmuster aufweisen, sondern auch einen höheren Anteil an SP-Zellen besitzen.

Es wurden vergleichende Untersuchungen zwischen den Zelllinien und zwischen den Rh123^{high} und Rh123^{low} Subpopulationen innerhalb einer Zelllinie mit Antikörpern gegen die Epitope CD14, CD45, HLA-DR, CD10, CD117, CD105 und SH3 durchgeführt. Dabei waren CD14 und CD45 auf allen Zelllinien negativ, wobei alle Zelllinien eine positive Expression für den mesenchymalen Marker Endoglin (CD105) und für SH3 (CD73) zeigten. CD117 konnte nur auf den aus dem Knochenmark etablierten Zelllinien L87/4 und L88/5 nachgewiesen werden. CD34, ein charakteristischer Marker für hämatopoetische

Vorläuferzellen, aber auch für Endothelzellen, konnte nur auf den Zellen der Rh123^{low} Subpopulation nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu exprimieren die Rh123^{high} Zellen kein CD34. Da es sich bei den Zelllinien um Klone handelt, ist der Unterschied in der Expression von CD34 zwischen der Rh123^{low} und der Rh123^{high} Population ein deutlicher Hinweis auf die Plastizität der Zelllinien und das Fließgleichgewicht zwischen Rh123^{low} und Rh123^{high}.

Durch eine Zellsortierung der Zelllinie V54/2 wurde die Rh123^{low} von der Rh123^{high} Subpopulation getrennt, um sie dann bezüglich ihrer Morphologie, dem Wachstum in Methylzellulose und der Expression ausgewählter Funktionseinheiten von Transkriptionsfaktor Netzwerken zu untersuchen. Dabei erhärtete sich die Hypothese, dass es sich bei der Rh123^{low} Subpopulation um aktivere Zellen mit einer gesteigerten Expression von erythroid/myeloischen und mesodermalen Eingaben (z.B. VEGF, BMP-4), Rezeptoren (z.B. tie-1), vernetzter Transkriptionsfaktoren (z.B. GATA, ETS) und letztendlich Ausgaben (z.B. PECAM) handelt. Diese fungieren in Netzwerken mit dem Ziel, stammzellrelevante Funktionen zu ermöglichen. Die Morphologie zeigte in den Zytozentrifugationspräparaten deutliche Unterschiede zwischen Zellen der Rh123^{low} und der Rh123^{high} Subpopulation. Die Rh123^{low} Subpopulation besteht aus lymphoid-ähnlichen Zellen, was für Zellen mit Stammzellfunktion charakteristisch ist. Die Rh123^{high} Subpopulation dagegen hat ein insgesamt größeres Zellvolumen und einen gebuchteten Kern mit perinukleärer Aufhellung.

Untersuchungen des klonalen Wachstums in der Methylzellulose ergaben bei keiner der Subpopulationen eine wesentliche Koloniebildung.

Durch die Inkubation der Zelllinie V54/2 mit dem Neurotrophen Wachstumsfaktor (NGF) konnte eine morphologische Änderung in Richtung einer neuronalen/glialen Differenzierung nach 8-12 Stunden induziert werden. Der immunhistochemische Nachweis von Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) bestätigte die mesenchymale Potenz zumindest in Richtung einer glialen Differenzierung.

Das unterschiedliche Expressionsmuster ausgewählter, für die Differenzierung notwendiger Zusammenspieler innerhalb von Transkriptionsfaktor Netzwerken innerhalb der Rh123^{high} und der Rh123^{low} Population bei V54/2 war ein weiterer Hinweis, dass es sich bei der Rh123^{low} Subpopulation um aktive Vorläuferzellen mit möglicher Stammzellpotenz handelt. In der Rh123^{low} Subpopulation wurde im Gegensatz zur Rh123^{high} Population eine Expression von BMP4, GATA1, GATA3 nachgewiesen, die essentiell für die Hämatopoese und für eine mesenchymale Differenzierung ist. Die Faktoren für GATA2, GATA3, beta globin, Elf-1 und PECAM1 wurden in einem stärkeren Maß in der Rh123^{low} als in der Rh123^{high} Population

exprimiert. BMP-Rez., Myb, sowie die Endothel-assoziierten Faktoren Tie-1 und VEGF waren in beiden Subpopulationen gleich stark vorhanden. Bei den wenigen Funktionseinheiten der größeren und Rh123^{high} Population handelt es sich vor allem um angiogenetische Faktoren, was auf eine limitierte Differenzierungseigenschaft der Rh123^{high} Subpopulation und die enge Beziehung zwischen Blut- und Endothelzellen („Hämangioblast“) hinweist.

Ein Nachweis für die Plastizität der Stammzellen innerhalb der von uns etablierten Zelllinien wurde dadurch erbracht, dass die zellsortierten Subpopulationen Rh123^{low} und Rh123^{high} nach dem Sortierexperiment getrennt rekultiviert wurden, wobei das Wachstum der Rh123^{low} Subpopulation deutlich langsamer war als das der Rh123^{high} Subpopulation. Nach zwei Wochen wurden die zellsortierten Subpopulationen erneut einer Rh123 Färbung unterzogen, wobei sich wiederum das ursprüngliche Verhältnis zwischen den Rh123^{low} und Rh123^{high} Subpopulationen einstellte. So kann man aus der Transdifferenzierung der Zelllinien von Rh123^{low} in Rh123^{high} und umgekehrt die Plastizität der hier untersuchten adulten Stammzelllinien ableiten.

Die Ergebnisse sollen zum grundlegenden Verständnis der Biologie adulter (nicht embryonaler) Stammzellen beitragen und damit die Möglichkeit schaffen, adulte Stammzellen bzw. deren Subpopulationen gezielt für einen reparativen Gewebe- und Organersatz zu verwenden. Dabei liefern sie die Basis für weitergehende Untersuchungen zum besseren Verständnis der physiologischen und regenerativen Vorgänge, z.B. auch bei Alterung oder bei gesteigerter Funktion. Darüber hinaus kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse durch weitere Untersuchungen möglicherweise besser verstanden werden, ob es gelingen kann das Potential adulter Stammzellen zur therapeutischen Gewebereparation, z.B. zur Verhinderung oder Verringerung einer Narbenbildung, zu nutzen.

Zusammenfassung in Stichpunkten

- Es wurden vergleichende Untersuchungen an Zelllinien aus dem Knochenmark und aus dem peripheren Blut hinsichtlich ihrer Stammzeleigenschaften durchgeführt.
- Durch den Farbstoff Rh123 lässt sich innerhalb der untersuchten klonalen Linien eine Subpopulation identifizieren, der Eigenschaften von frühen Vorläuferzellen zukommen.
- Durch den Farbstoff Hoechst 33342 lassen sich Unterschiede zwischen den Linien bezüglich deren Anteil an Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus feststellen. Weiterhin können sogenannte Side Population Zellen durch Hoechst 33342 gefunden werden, denen aktive Stammzeleigenschaften zugeschrieben werden.
- Durch Bestimmung der Epitope der Zelllinien konnten diese als mesenchymale Zellen eingeordnet werden. Es bestehen gravierende Unterschiede zwischen den Linien bezüglich stammzellrelevanter Epitope. Die als Rh123^{low} bezeichnete Subpopulation exprimiert CD34, was beweist, dass innerhalb der prädominant mesenchymalen Linien eine Subpopulation mit hämatopoetischen Eigenschaften gefunden werden kann.
- Induktionsexperimente der Linie V54/2 ließen die Differenzierung in die neuronale und die osteogene Richtung zu.
- Eine Trennung der Rh123^{low} von der Rh123^{high} Subpopulation zeigte gravierende Unterschiede zwischen den beiden Subpopulationen bezüglich Morphologie, stammzellrelevanter Funktionseinheiten von Transkriptionsfaktor Netzwerken und Wachstumsverhalten.
- Die Rh123^{low} Subpopulation lässt sich in die Rh123^{high} Subpopulation überführen und umgekehrt. Dies ist als ein Zeichen für die Plastizität der untersuchten Stammzelllinien zu werten.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Adam, P.J., Clesham, G.J., Weissberg, P.L., Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 247: 33. (1998).
2. Adriaansen, H., teBoekhorst, P., Hagemeijer, A., van der Schoot, C., Delvwel, H., van Donger, J.. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and in v(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 81: 3043. (1990).
3. Altomonte, M., Montagner, R., Fonsatti, E., Colizzi, F., Cattarossi, I., Brasoveanu, L.I., Nicotra, M.R., Cattelan, A., Natali, P.G., Maio, M.. Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor β 1, and β 3 binding protein, in human melanoma. *Br J Cancer* 74: 1586. (1996).
4. Andrews, R.G., Peterson, L.J., Morris, J., Potter, J., Heyward S., Gough, M., Bryant, E., Kiem, H.. Differential engraftment of genetically modified CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell subsets in lethally irradiated baboons. *Exp Hematol.* 28(5): 508-518. (2000).
5. Andrews, R.G., Singer J.W., Bernstein, I.D.. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kD molecular present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 67: 842. (1986).
6. Arceci, R.J., King, A., A., J., Simon, M., C., Orkin, S.H., Wilson, D.B.. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol.* 13: 2235. (1993).
7. Areman, E.M., Deeg, H.J., Sacher, R.A.. Bone Marrow and Stem Cell Processing: A Manual of Current Techniques. In: F.A. Davis & Co., Philadelphia. (1992).

8. Barbara, N.P., Wrana, J.L., Letarte, M., Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily. *J Biol Chem.* 274: 584. (1999).
9. Barry, F., Boynton, R., Murphy, M., Zaia, J.. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cell. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 289: 519. (2001).
10. Barry, F.P., Boynton, R.E., Haynesworth, S., Murphy, M.J., Zaia, J..The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265: 134-139, 1999.
11. Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M., Peault B.. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 2804-2811. (1992).
12. Baumheuter, S., Dybai, N., Kyle, C., Lasky, L.. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84: 2554 (1994).
13. Baumheuter, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S.D., Lasiky, L.A.. Binding of L-selection to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262: 436-438. (1993).
14. Bender, J.G., Unverzagt, K., Walker, D.E., Lee, W., Smith, S., Williams, S., Van Epps, D.E.. Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol.* 70: 10. (1994).
15. Berenson R.J., Besinger W.I., Hill, R.S., Andrews, R.G., Garcia-Lopez, J., Kalamsz, D.F., Still, B.J., Spitz, G., Buckner, C.D., Bernstein, I.D., Thomas, E.D.. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood.* 77. 1717. (1991).

16. Berenson, R.J., Andrews, R.G., Besinger, W.I., Kalamasz, D., Knitter, G., Buckner, C.D., Bernstin, I.D.. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *Blood*. 77: 1717. (1988).
17. Bertoncello, I., Hodgson, G.S., Bradley, T.R.. Multiparameter analysis of transplantable hematopoietic stem cells: I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on the basis of Rhodamin-123 fluorescence. *Exp. Hematol*. 13: 999. (1985).
18. Bezombes, C., Maestre, N., Laurent, G., Levade, T., Bettaieb, A., Jaffrezou, J., P.. Restoration of TNF-alpha-induced ceramide generation and apoptosis in resistant human leukemia KG1a cells by the P-Glykoprotein blocker PSC833. *FASEB J*. 12: 101. (1998).
19. Bignami, A., Eng, L., F., Dahl, D., Uyeda, C., T.. Localization of the the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res*. 43: 429. (1972).
20. Bodey, B., Bodey, B. Jr., Siegel, S., E., Kaiser, H., E.. Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma. *Anticancer Res* 18: 2701. (1998a).
21. Bodey, B., Bodey, B. Jr., Siegel, S.E., Kaiser, H.E... Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neovascularization. *Anticancer Res*. 18: 3621. (1998b).
22. Borowitz, M., J., Gockerman, J., P., Moore, J., O., Civin, C., I., Pagew, S., O., Robertson, J., Bigner, S., H.. Clinicopathologic and Cytogenetic Features of CD34 (My10)-positive acute nonlymphocytic leukemia. *A.J. Clin. Pathol.* 91: 265. (1989).
- 23.
24. Bouck, N., Stellmach, V., Hsu., S., C.. How tumors become angiogenetic. *Adv Cancer Res*. 69: 135. (1996).

25. Brecher, G., Conkrite, E.P.. Post-radiation parabiosis and survival in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 77: 292. (1951).
26. Broxmeyer, H., E., Cooper, S., Li, Z., H., Lu, L., Song, H., Y., Kwon, B., S., Warren, R., E., Donner, D., B.. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol.* 62: 203. (1995).
27. Bunting, K., D.. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cell.* 20: 11. (2002).
28. Burrows, F., J., Derbyshire, E., J., Tazzari, P., L., Amlot, P., Gazdar, A., F., King, S., W., Letarte, M., Vitetta, E., S., Thorpe, P., E.. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res.* 1: 1623. (1995).
29. Burtis, K.,C., Thummel, C., S., Jones, C.,W, Karim, F., D., Hogness, D., S.. The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell.* 61: 85. (1990).
30. Calabretta, B.. Inhibition of protooncogene expression by antisense oligodeoxynucleotides: Biological and therapeutic implications. *Cancer Res.* 51: 4505. (1991).
31. Campos, L., Guyotat, D., Archimbaud, E., Calmard-Oriol, P., Tsuruo, T., Troncy, J., Treille, D., Fierre, D.. Clinical significance of multidrug resistance P-Glykoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood.* 79: 473. (1992).
32. Chan, J., Y-H., Watt, S., M.. Adhesion receptors on hematopoietic progenitor cells. *Br J Haemat.* 112: 541. (2001).
33. Chaudhary, P., M., Robinson, I., G.. Expression and activity of P-Glykoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cell populations. *Blood Cells* 20: 364. (1994).

34. Chaudhary, P.M., Robinson, I.B.. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs.
35. Cheifetz, S., Bellón, T., Calés, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massagué, J., Letarte, M.. Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 19027. (1992).
36. Cho, S., K., Bourdeau, A., Letarte, M., Zúñiga-Pflücker, J., C.. Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1⁺ precursors. *Blood*, 98: 3635. (2001).
37. Chretien, S., Dubart, A., Beaupain, D., Raich, N., Grandchamp, B., Rosa, J., Goossens, M., Romeo, P.H.. Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result wither in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 6. (1988).
38. Civin, C., I., Strauss, L., C., Brovall, C., Fackler, M., J., Schwartz, J., F., Shaper, J., H.. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 133: 157. (1984).
39. Civin, C., J., Strauss, L., C., Brovall, C., Fackler, M., J., Schwartz, J., F., Shaper, J., H.. Antigenic analysis of the hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol*. 133: 157-165. (1984).
40. Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P.C., Pan, Y., C., Olander, J., V., Connolly, D., T., Stern, D.. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*. 172: 1535. (1990).
41. Collins, S., J., Gallo, R., C., Gallagher, R., E.. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*, 270(5635): 347-349. (1977).

42. Davis, D., L., Edwards, A., V., Amy, L., J., Phelps, A., Wessels, A., Burch, J., B., E.. A GATA-6 gene heart-region-specific enhancer provides a novel means to mark and probe a discrete component of the mouse cardiac conduction system. *Mechan Develop.* 108: 105. (2001).
43. Deans, R., J., Moseley, A., B.. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hemat.* 28: 875. (2000).
44. Deeg, H.J., Cottler-Fox, M.. Clinical spectrum and pathophysiology of acute graft-vs.-host disease. In: Burakoff S., J, Deeg H., J., Ferrara, J., Atkinson, K. (eds) *Graft-vs.-Host Disease: Immunology, Pathophysiology, and Treatment.* Marcel Dekker, Inc., New York, S. 311-335. (1990).
45. Delia, D., Lampugnani, M., Resnati, M., Dejana, E., Aiello, A., Fontanella E., Soligo, D., Pierotti, M., Greaves, M.. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood* 81: 1001. (1993).
46. Derynck, R., Feng, X.H.. TGF- β receptor signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1333: F105. (1997).
47. Deybach, J., C., Puy, H.. Porphobilinogen deaminase gene structure and molecular defects. *J Bioenerg Biomembr.* 27: 197. (1995).
48. Eichman, A., Corbel, C., Nataf, V., Breant, C., Le Dourain, N., M.. Ligand-dependent development of the endothelial and hematopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 5141. (1997).
49. Eng, L., F., Bond, P., Gerstl, B.. Isolation of myelin proteins from disc acrylamide gels electrophoresed in phenolformic acid-water. *Neurobiol.* 1: 58. (1971).
50. Eng, L., F., Gerstl, B. Vander haeghen, J., J.. A study of proteins in old multiple sclerosis plaques. *Trans Am Soc. Neurochem.* 1: 42. (1970).

51. Eng, L., F., Ghirnikar, R., S., Lee, Y., L.. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25: 1439. (2000).
52. Eng, L., F., Vanderhaeghen, J., J., Bignami, A., Gerstl, B.. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 28: 351. (1971).
53. Evans, T., Felsenfeld, G.. The erythroid-specific transcription factor Eryfl: a new finger protein. *Cell.* 58: 877. (1989).
54. Fackler, M., J., Civin, C., I., May, W., S.. Up-regulation of surface CD34 is associated with protein kinase C-mediated hyperphosphorylation of CD34. *J. Biol. Chem.* 267: 17540. (1992).
55. Feller, N., Kuiper, C., M., Lankelma, J., Ruhdal, J., K., Scheper, R., J., Pinedo, H., M., Broxterman, H.J.. Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumor cells by flow cytometry. *Br. J. Cancer.* 72: 543. (1995).
56. Ferrara, N., Davis-Smyth, T.. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endor Rev.* 18: 4. (1997).
57. Fibbe, W.E., van Damme, J., Bilau, A., Goselink, H., M., Voogt, P.J., van Eeden, G., Ralph, P., Altrock, B.W., Falkenburg, J.H.F.. Interleukin 1 induced human marrow stromal cells in long-term marrow culture to produce granulocyte colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 71: 430. (1988).
58. Fink, L., Seeger, W., Ermert, L., Hanze, J., Stahl, U., Grimminger, F., Kummer, W., Bohle, R.M.. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 4: 1329. (1998).
59. Fink, L., Seeger, W., Ermert, L., Hanze, J., Stahl, U., Grimminger, F., Kummer, W., Bohle, R., M.. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med.* 4: 1329. (1998).

60. Fleming, W., H., Alpern, E., J., Uchida, N., Ikuta, G., J., Spangrude, Weissman, I., L.. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J Cell Biol.* 122: 897. (1993).
61. Folkman, J.. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82: 204. (1989).
62. Fonsatti, E., Del Vecchio, L., Altomonte, M., Sigalotti, L., Nicotra, M., R., Coral, S., Natali, P.G., Maio, M.. Endoglin: an accessory component of the TGF- β -binding receptor complex with diagnostic, prognostic and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol.* 188: 1. (2001).
63. Fonsatti, E., Jekunen, A.P., Kairemo, K., J., A., Coral, S., Snellman, M., Nicotra, M., R., Natali, P., G., Altomonte, M., Maio, M.. Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res.* 6: 2037. (2000).
64. Ford, C., E., Hamerton, J., L., Narnes, D., W., H., Loutit, J., F.. Cytological identification of radiation in radiation chimeras. *Nature.* 177: 452-454. (1956).
65. Friedenstein, A., J.. Stromal mechanisms of bone marrow : cloning in vitro and retransplantation in vivo. In: Thienfelder, S., Rodt, H., Kolb, H., J.. (eds.) *Immunology of bone marrow transplantation.* Berlin: Springer-Verlag. 19-20. (1980).
66. Fujiwara, K., Masuda, M., Osawa, M., Kano, Y., Katoh, K.. Is PECAM-1 a mechanoresponsive molecule?. *Cell Struc Func.* 26: 11. (2001).
67. Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., Carbone, D.P.. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood.* 92: 4150. (1998).
68. Geller, R., B. Zahurak, M., Hurwitz, C., A., Burke, P., J., Karpe, J., E., Piantadosi S., Civin, C., I.. Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute

- myelocytic leukemia: The significance of the stem-cell Glykoprotein CD34 (My10). Br. J. Haematol. 76: 340. (1990).
69. Gewirtz, A., M., Calabretta, B.. A c-myb antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro. Science 242: 1303. (1988).
70. Gonda, T., J.. Molecular and cellular activities of myb: regulation in normal hematopoiesis and transformation. Semin. Virol. 2: 351. (1991).
71. Gonda, T., J.. Molecules in focus: the c-myb oncoprotein. Int J Biochem Cell Bio. 30: 547. (1998).
72. Goodell, M., A., Brose, K., Paradis G., Conner A., S., Mulligan, R., C.. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J Exp Med, 183(4): 1797-1806. (1996).
73. Goodell, M., A., Rosenzweig, M., Kim, H., et al.. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. Nat Med. 3: 1337. (1997).
74. Gougos, A., Letarte, M.. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against pre-B leukemic cell line. J Immunol 141: 1925. (1988).
75. Gougos, A., Letarte, M.. Primary structure of endoglin, an RGD-containing Glykoprotein of human endothelial cells. J Biol Chem. 265: 8361. (1990).
76. Graham, G., J., Wright, E., G.. Haematopoietic stem cells: their heterogeneity and regulation. Int. J. Exp. Path. 78: 197-218. (1997).
77. Grandchamp, B., De Verneuil, H., Beaumont, C., Chretien, S., Walter, O., Nordmann, Y.. Tissue-specific expression of porphobilinogen deaminase: two isoenzymes from a single gene. Eur J Biochem. 162: 105. (1987).

78. Gronthos, S., Simmons, P., J.. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematother.* 5: 15. (1996).
79. Gronthos, S., Simmons, P., J.. The growth factor requirements of STRO-1+ human bone marrow stromal precursors under serum –deprived conditions. *Blood.* 85: 929. (1995).
80. Gubin, A., N., Miller, J., L.. Human erythroid porphobilinogen deaminase exists in 2splice variants. *Blood.* 97: 815. (2001).
81. Guerrero-Esteo, M., Lastres, P., Letamendía, A, Pérez-Alvarez, M., J., Langa, C., López, L., A., Fabra, A., García-Pardo, A., Vera, S., Letarte, M., Bernabéu, C.. Endoglin overexpression modulates cellular morphology migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 78: 614. (1999).
82. Gyotat, D., Campos, L., Thomas, Z., Vila, L, Shi, Z., Charrin, C., Gentilhomme, O., Fiere, D.. Myelodysplastic syndromes: A study of surface markers in vitro growth patterns. *Am. J. Hematol.* 34: 26. (1990).
83. Hainfellner, J., A., Voigtlander, T., Strobel, T., Mazal, P., R., Maddalena, A., S., Aguzzi, A., Budka, H.. Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60: 449. (2001).
84. Haruta, Y., Seon, B., K.. Distinct human leukemia-associated cell surface Glykoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7898. (1986).
85. Haynesworth, S., E., Baber, M., A., Caplan, A., I.. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 13: 69. (1992).
86. Henriksen, R., Gobl, A., Wilander, E., Öberg, K., Miyazono, K., Funa, K.. Expression and prognostic significance of TGF- β isotypes, latent TGF- β 1 binding protein, TGF- β type I and II receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms. *Lab Invest* 73: 213. (1995).

87. Hood, A., F., Beckham, C., Huss, R., Lee, J., W., Hockenbery, D., Ledbetter, J.A., Deeg, H.J.. MHC class II mediated inhibition of hematopoiesis in long-term marrow cultures involves apoptosis and is prevented by c-kit ligand. *Blood* 86: 3341. (1995).
88. Huang, S., Terstappen, L., W.. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature*. 360(6406): 709-10. (1992).
89. Huber, T., L., Zon, L., I.. Transcriptional regulation of blood formation during *Xenopus* development. *Seminars in Immun.* 10: 103. (1998).
90. Huggon, I., C., Davies, A., Gove, C., Moscoso, G., Moniz, C., Foss, Y., Farzaneh, F., Towner, P.. Molecular cloning of human GATA-6 DNA binding protein: high levels of expression in heart and gut. *Biochim Biophys Acta*. 1353: 98. (1997).
91. Huss, R., Beckham, C., Storb, R., Deeg, H., J.. Alteration of growth factor transcription and Second message signals in canine marrow stromal cells and hematopoietic cells by anti-MHC class II monoclonal antibodies. *Blood*. 80: 180a (Abstract). (1992).
92. Huss, R., Deeg, H., J.. MHC antigens and hematopoiesis. *Transplant Immunol*. 2: 412. (1994a).
93. Huss, R., Günther, W., Schumm, M., Ottinger, H., Grosse-Wilde, H., Kolb, H., J.. CD34-negative hematopoietic stem cells isolated from human peripheral blood cells as ultimate precursors of hematopoietic progenitors. *Infusionsthera Transfusionsmed*. 24: 404. (1997).
94. Huss, R., Hoy, C., A., Deeg, H., J.. Stroma derived hematopoietic progenitors: Cell cycle dependent proliferation and differentiation. *Ontogeny of hematopoiesis. Aplastic anemia*. E. Gluckman & L.Coulombel (eds.); John Libbey Eurotext Limited. 235: 209. (1995e).

95. Huss, R.. CD34-negative stem cells as the earliest precursors of hematopoietic progeny. *Exp Hematol* 26: 1022. (1998).
96. Huss, R.. Perspectives on the morphology and biology of CD34-negative stem cells. *J. of Hematotherapy & Stem Cell Research*. 9: 783-793, (2000).
97. Huss,R.. Functional and structural studies on the burst of c-kit ligand containing Secretory cytoplasmatic vesicles. *Acta Histochem*. 99: 111. (1997).
98. Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J., D., Yamamoto, M.. *Development (Cambridge, U.K.)*. 120: 1759. (1994).
99. Jackson, A. Basic phenotyping of lymphocytes: Selection and testing of reagents and interpretation of data. *Clin Immunol Newslett*. 18: 43. (1990).
100. Jackson, K., A., Mi, T., Goodell, M., A.. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS*. 96: 14482. (1999).
101. Jakobson, L., O., Marks, E., K., Robson, M., J., Gaston, E., O., Zirkle, R., E.. Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J. Lab. Clin. Med*. 34 : 1538. (1949).
102. Janknecht, R., Cahill, M., A., Nordheim, A.. Signal integration at the c-fos promoter. *Carcinogenesis* 16: 443. (1995).
103. Janknecht, R., Taube, W., Lüdecke, H.-J., Pongs, O.. Characterization of a putative transcription factor gene expressed in the 20-OH-ecdysone inducible puff74EF in *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Acids Res*. 17: 4455. (1989).
104. Johnson, L., V., Walsh, M., L., Chen, L., B.. Localization of mitochondria in living cells with Rhodamin 123 retention. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77: 990. (1980).
105. Johnstone, R., W., Ruefli, A., A., Smyth, M.J.. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-Glykoprotein?. *Trends Biochem Sci*. 25: 1. (2000).

106. Jones, R., J., Collector, M., I., Barber, J., P., et al.. Characterization of mouse lymphohematopoietic stem cells lacking spleen colony forming activity. *J Exp Med.* 183: 1797. (1996).
107. Kappas, A., Sassa, S., Galbraith, R., A., Nordmann, Y.. The porphyries. In: *The molecular basis of inherited diseases* (ed. Scriver, C.R., Beaudet, A., Sly, W.S., Valle, D.) 2116-2127. McGraw-Hill, New York, NY.
108. Katz, F., Tindle, R., W., Sutherland, D., R., Greaves M., D.. Identification of a membrane Glykoprotein associated with hematopoietic progenitor cells. *Leuk. Res.* 9:191. (1985).
109. Kauppinen, R., Mustajoki, P.. Prognosis of acute intermittent prophyria: Occurrence of acute attacks, precipitating factors and associated disease. *Medicine* 71: 1. (1992).
110. Kaushansky, K., Lin, N., Adamson, J., W.. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-makrophage and granulocyte colony-stimulating factors. *J Clin Invest.* 81: 92. (1988).
111. Kim, M., Cooper, D., D., Hayes, S., F., Spangrude, G., J.. Rhodamin-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux. *Blood.* 91: 4106. (1998).
112. Kim, M., Turnquist, H., Jackson, J., Sgagias, M., Yan, Y., Gong, M., Dean, M., Sharp, J., G., Cowan, K.. The multidrug resistance transproter ABCG 2 (Breast Cancer Resistance Protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Canc Res.* 8: 22. (2002).
113. Koeffler, H., P., Billing, R., Lusic, A., J., Sparkes, R., Golde, D., W.. An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood,* 56(2): 265-273. (1980).

114. Korbling, M., Katz, R., L., Khanna, A., Ruifrok, A., C., Rondon, G., Albitar, M., Champlin, R., E., Estrov, Z.. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med.*, 346: 738. (2002).
115. Krause Diane, S., Fackler, M. J., Civin, I., Stratford W., M.. CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility. *Blood.* 87(1): 1-13. (1996).
116. Krause, D., Ito, T., Fackler, M., Collector, M., Sharkis, S., ay, W.. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 84: 691. (1994).
117. Krause, D., S., Fackler, M., J., Civin, C., I., May, S.. CD34: Structure, Biology and Clinical utility. *Blood.* 87: 1. (1996).
118. Krause, D., S., Ito, T., Fackler, M., J., Collector, M., Sharkis, S., May, W.. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic prgenitor and stem cells. *Blood.* 84: 691. (1994).
119. Kuwata T., Wang, I., M., Tamura, T., Ponnampereuma, R., M., Levine, R., Holmes, K., L., Morse, H., C., De Luca, L., M., Ozato, K.. Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood.* 95: 3349. (2000).
120. Lampson, L.A., Levy, R.. Two populations of Ia-like molecules ona a human B cell line. *J Immuol.* 125: 293. (1980).
121. Lange, C., Kaltz, C., Thalmeier, K., Kolb, H., J., Huss, R.. Hematopoietic reconstitution of syngeneic mice with a peripheral blood-derived, monoclonal CD34-, Sca1+, Thy-1^{low}, c-kit⁺ stem cell line. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research.* 8: 335-342. (1999).
122. Lansdorp, P., M., Dougherty, G., J., Humphries, R., K.. CD34 epitopes. In: Knapp, W., Dörken, Gilks, W., R.. et al., eds. *Leukocyte Typing IV : White Cell Differentiation Antigens.* New York: Oxford University Press; 826-827. (1989).

123. Lastres, P., Bellon, T., Cababas, C., Sanchez-Madrid, F., Acevedo, A., Gougos, A., Letarte, M., Bernab u, C.. Regulated expression on human makrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22: 393. (1992).
124. Lastres, P., Letamend a, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., L opez, L.A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M., Bernab u, C.. Endoglin modulates cellular response to TGF- 1. *J Cell Biol.* 133: 1109. (1996).
125. Lastres, P., Martín-Perez, J., Langa, C., Bernab u, C.. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor- -binding-protein endoglin. *Biochem J.* 301: 765. (1994).
126. Le Nien, T.W., McCormack, R.T.. The common acute lymphoblastic antigen (CD10) : emancipation from function enigma. *Blood.* 73: 625. (1989).
127. Lee, M., Segal, G., M., Bagby, G., C., J.. Interleukin 1 induces human bone marrow-derived fibroblasts to produce multilineage hematopoietic growth factors. *Exp Hemtol.* 15: 983. (1987).
128. Leong, L., M., Brickell, P., M.. Molecules in Focus: Bone morphogenetic protein-4. *Int J Biochem Cell Biol.* 28: 1293. (1996).
129. Letamend a, A., Lastres, P., Almendro, N., Raab, U., Buhring, H-J., Kumar, S., Bernab u, C.. Endoglin, a component of the TGF-  receptor system, is a differentiation marker of human choriocarcinoma cells. *Int J Cancer* 76: 541. (1998b).
130. Letamend a, A., Lastres, P., Botella, L., M., Raab., U., Langa, C., Velasco, B., Attisano, L., Bernabeu, C., Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor- . *J Biol Chem.* 273: 33011. (1998a).
131. Li, C., Guo, B., Wilson, P., B., Stewart, A., Byrne, G., Bundred, N., Kumar, S., 2000b. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 89: 122. (2000b).

132. Li, C., Hampson, I., N., Hampson, L., Kumar, P., Bernabeu, C., Kumar, S.. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor β 1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 14: 55. (2000a).
133. Li, C.L., Johnson, G., R.. Rhodamin 123 reveals heterogeneity within murine Lin-, Sca-1+ hematopoietic stem cells. *J. Exp.Med.* 175: 1443, (1992).
134. Li, D., Y., Sorensen, L., K., Brooke, B., S., Urness, L., D., Davis, E., C., Taylor, D., G., Boak, B.B., Wendel, D.P.. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284: 1534. (1999).
135. Lindholm, T., C., Lindholm, T., S., Maritten, A, Urist, M., R.. Bovine bone morphogenetic protein (bBMP/NCP)-induced repair of skull trephine defects in pigs. *Clin Orthop.* 301: 263. (1994).
136. Loken, M., R., Shah, V., O., Dattilio, K., I, Civin, C., I.. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood.* 70: 1316. (1987).
137. Loken, M., R., Shah, V., O., Dattilio, K., L., Civin, C., I.. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood.* 70: 1316. (1989).
138. Lorenz, E., Uphoff, D., E., Reid, T., R., Shelton, E., Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injection. *Radiology.* 58: 863-877. (1951).
139. Maguer-Satta, V., Oostendorp, R., Reid, D., Eaves, C., J.. Evidence that ceramide mediates the ability of tumor necrosis factor to modulate primitive human hematopoietic cell fates. *Blood.* 96: 4118. (2000).
140. Majdic, O., Stockl, J., Pickl, W., F., Bohuslav, J., Strobl, H., Scheinecker, C., Stockinger, H., Knapp, W.. Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the the hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood.* 85: 3040, (1995).

141. Martin, D., I., K., Zon, L., I., Mutter, G., Orkin, S., H.. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*. 344: 444. (1990).
142. Massagué, J.. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol*. 6: 597. (1990).
143. Matsushita, H., Kizaki, M., Kobayashi, H., Muto, A., Ikeda, Y.. Induction of apoptosis in myeloid leukaemic cells by ribozymes targeted against AML1/MTG8. *Blood*. 91: 2452. (1998).
144. Maximow, A., A.. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *Physiol. Rev*. 4: 533, (1924).
145. McSweeney, P., A., Rouleau, K., A., Wallace, P., M., Bruno, B., Andrews R., G., Krizanac-Bengez, L., Sandmaier, B., M., Storb, R., Wayner, E., Nash, R., A.. Characterization of monoclonal antibodies that recognize canine CD34. *Blood*. 91: 1977. (1998).
146. Mensink, E., van de Loch, A., Schattenberg, A., Linders, E., Schaap, N., Geurts van Kessel, A., De Witte, T.. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol*. 102: 768. (1998).
147. Mensink, E., van deLocht, A., Schattenberg, A., Linders, E., Schaap, N., Geurts van Kessel, A., De Witte, T.. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-timequantitative RT-PCR. *Br J Haematol* 102: 768. (1998).
148. Merenmies, J., Parida, L., Henkemyer, M.. Receptor tyrosine kinase signaling in vascular development. *Cell Grwth Differ*. 8: 3. (1997).
149. Miller, D., W., Graulich, W., Karges, B., Stahl, S., Ernst, M., Ramaswamy, A., Sedlacek, H-H., Miller, R., Adamkiewicz, J.. Elevated expression of endoglin, a

- component of the TGF- β -receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer*. 81: 568. (1999).
150. Mohan, R., R., Kim, W., J., Mohan, R., R., Chen, L., Wilson, S., E.. Bone morphogenic proteins 2 and 4 and their receptors in adult human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 39 : 2626. (1998).
151. Molkenin, J., D.. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, -6. *J Biol Chem*. 275: 38949. (2000).
152. Moore, K., L.. *Embryologie*. F.K. Schattauer Verlag. Stuttgart – New York. (1980).
153. Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A., Tambourin, P.. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature*. 331: 277. (1988).
154. Morrissey, E., E., Ip, H., S., Lu, M., M., Parmacek, M., S.. GATA-6: a zinc finger transcription factor expressed in multiple lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol*. 177: 309. (1996).
155. Morrissey, E., E., Ip, H., S., Tang, Z., Lu, M., M., Parmacek, M.S.. GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev Biol*. 183: 21 (1997).
156. Mulder, A., H., Visser, J., W.. Separation and functional analysis of bone marrow cells separated by Rhodamin-123 fluorescence. *Exp. Hematol*. 15: 99. (1987).
157. Muller-Sieburg, C.e., Whitlock, C.A., Weissman, I.L.. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: A committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1^{low} hematopoietic stem cell. *Cell*. 44: 653-662. (1986).
158. Narita, N., Heikinheimo, M., Bielinska, M., White, R., A., Wilson, D., B.. Genomics. The gene for transcription factor GATA-6 resides on mouse chromosome 18 and is expressed in myocardium and vascular smooth muscle. *36*: 4355. (1996).

159. Newman, P., J. Berndt, M., C., Gorski, J., White, G., C.2nd, Lyman, S., Paddock, C., Muller, W., A.. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 247 1219. (1990).
160. Newman, P., J.. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Inv*. 103. 5. (1999).
161. Newman, P., J.. The biology of PECMA-1. *J Clin Invest*. 99: 3. (1997).
162. O'Connell, P., J., McKenzie, A., Fisicaro, N., Rockman, S., P., Pearse, M., J., d'Apice, A., J., F.. Endoglin: A 180-kD endothelial cell and macrophages resitricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* 90: 154. (1992).
163. Ogawa, M.. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844-2853. (1993).
164. Onodera, K., Takahashi, S., Nishimura, S., Ohta, J., Motohashi, H., Yomogida, K., Hayashi, N., Engel, J., D., Yamamoto, M.. GATA-1 transcription is controlled by distinct regulatory mechanims during primitive and definitive erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 94: 4487. (1997).
165. Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K., Barrandon, Y.. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. 104: 233. (2001).
166. Owen, M.. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: Peck, W., A. (ed.) *Bone and mineral research*, Vol 3. New York: Elsevier. 1-25. (1985).
167. Pallis, M., Russell, N.. P-Glykoprotein plays a drug a drug-efflux-independent role in augmenting cell survival in acute myeloblastic leukemia and is associated with modulation of a sphingomyelin-ceramide apoptotic pathway. *Blood*. 95: 2897. (2000).
168. Pierelli, L., Scambia, G., Bonanno, G., Rutella, S., Puggioni, P., Battaglia, A., Mozzetti, S., Marone, M., Menchichella, G., Rumi, C., Manusco, S., Leone, G.. Cd34⁺/CD105⁺ cells are enriched in primitive circulating progenitors residing in the

- G0 phase of the cell cycle and containing all bone marrow and cord blood CD34+/CD39^{low/-} precursors. *Br J Haemat.* 108: 610. (2000).
169. Pittenger, M., F., Mackay, A., M., Beck, S., C., Jaiswal, R., K., Douglas, R., Mosca, J., D., Moorman, M., A., Simonetti, D., W., Craig, S., Marshak, D., R.. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284: 143. (2001).
170. Ploemacher, R., E., Brons, N., H., C.. Cells with marrow and spleen repopulation ability and forming spleen colonies on day 16, 12, and 8 are sequentially ordered on the basis of increasing Rhodamin 123 retention. *J Cell Physiol* 136: 531. (1988).
171. Pui, C., H., Behm, F., G., Crist, W., M.. Clinical and biological relevance of immunologic marker studies in childhood acute leukemia cells. *Leukemia.* 6:233. (1992).
172. Puri, M., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A., Partanen, J.. The receptor tyrosine kinase Tie is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* 14: 5884. (1995).
173. Raich, N., Dubart, A., Beaupain, D., Cohen-solal, M., Goossens, M.. Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen deaminase. *Nucleic Acids Res.* 14: 5955. (1986).
174. Robledo, M., M., Hidalgo, A., Lastres, P., Arroyo, A., G., Bernabeu, C., Sanchez-Madrid, F., Teixido, J.. Characterization of TGF- β 1 binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Br. J Haematol.* 93: 507. (1996).
175. Rokhlin, O., W., Cohen, M., B., Kubagawa, H., Letarte, M., Cooper, M., D.. Ada Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol* 154: 4456. (1995).
176. Romeo, P-H., Prandini, M-H., Joulin, V., Mignotte, V, Prenant, M., Vainchenker, W., Marguerie, G., Uzan, G.. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature.* 344 : 447. (1990).

177. Sassa, S.. Regulation of the genes for heme pathway enzymes in erythroid and non-erythroid cells. *Int J Cell Cloning*. 8: 10. (1990).
178. Sato, T., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Bucholz, K., Fujiwara, Y., Gendrom-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., Qin, Y.. Distinct role of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376: 70. (1995).
179. Scharenberg, C., M., Harkey, M., A., Torok-Storb, B.. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*. 99: 507. (2002).
180. Seon, B., K., Matsuno, F., Haruta, Y., Barcos, M. Spaulding, B.. CD105 Workshop: Immunohistochemical detection of CD105 in the vascular endothelium of human malignant and non-malignant tissues. In: Kishimoto, T, Kikutani, H., Kr von dem Borne, A., E., G., Goyert, S., M., Mason, D., Y., Miyasaka, M., Moretta, L., Okumura, K., Shaw, S., Springer, T., A., Sugamura, K., Zola, H., editors. *Leukocyte typing VI. White Cell Differentiation Antigens*. New York & London: Garland Publishing, Inc. p 709-711. (1997a).
181. Seon, B.K., Matsuno, F., Haruta, Y., Kondo, M., Barcos, M.. Langlasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin. *Clin Cancer Res*. 3: 1031. (1997b).
182. Seth, A., Watson, D., K., Blair, D., G., Papas, T., S.. c-ets-2 protooncogene has mitogenic and oncogenic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 7833 (1989).
183. Sharom, F.J.. The P-Glykoprotein efflux pump: how does it transport drugs?. *J. Membrane Biol*. 160: 161-175. (1997).
184. Sheiness, D., Gardinier, M.. Expression of a proto-oncogene (proto-myb) in hematopoietic tissues of mice. *Mol Cell Biol*. 4: 1206. (1984).

185. Shi, R., Wrin, J., Reeder, J., Liu, D., Ring, D., B.. High-affinity monoclonal antibodies against P-Glykoprotein. *Clin Immunol Immunopathol.* 76: 44. (1995).
186. Shou, J., Murray, R., C., Rim, P., C., Calof, A., L.. Opposing effects of bone morphogenetic proteins on neuron production and survival in the olfactory receptor neuron lineage. *Development.* 127: 5403. (2000).
187. Sicurella, C., Freeman, R., Micallef, S., Mucenski, M., L., Bertoncello, I., Ramsay, R., G.. Defective stem cell factor expression in c-myb null fetal liver stroma. *Blood Cells, Molecules, Diseases.* 27: 470. (2001).
188. Silvestri, F., Banavali, S., Bacarani, M., Preisler, H.D.. The CD34 hematopoietic progenitor cell associated antigen: Biology and clinical applications. *Hematologica.* 77: 265. (1992).
189. Simmons, D., L., Satterthwaite, A., B., Tenen, D., G., Seed, B.. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic cells. *J. Immunol.* 148: 267. (1992).
190. Simmons, P., J., Gronthos, S., Zannettino, A., Otha, S., Graves, S.E.. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hematopoiesis. *Prog Clin Biol Res.* 389: 271. (1994).
191. Simmons, P., J., Torok-Storb, B.. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood.* 78: 2848. (1991b).
192. Simmons, P., J., Torok-Storb, B.. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody. STRO-1. *Blood.* 78: 55. (1991a).
193. Soligo, D., Delia, Oriani, A., Cattoretti, G., Orazi, A., Bertolli, V., Quiric, N., Deliliers, G.. Identification of the CD34+ cells in normal and pathologic bone marrow biopsies by QBEND 10 monoclonal antibody. *Leukemia* 5: 1026. (1991).

194. Spangrude, G., J., Johnson, G., R.. Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 7: 7433. (1990).
195. Srour, E., F., Brand, J., E., Bridel, R., A., Leemhuis, T., van Besien, K., Hoffman, R.. Human CD34+DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis. *Blood cells.* 17: 287. (1991).
196. Srour, E.F., Brandt, J.E., Briddell, R.A., Grigsby, S., Leemhuis, T., Hoffman, R.. Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells in vitro. *Blood.* 81: 661. (1993).
197. Storb, R., Deeg, H.J., Whitehead, J., Appelbaum, F.R., Beatty, P., Bensinger, W., Buckner, C.D., Clift, R., Doney, K., Farewell, V., Hansen, J., Hill, R., Lum, L., Martin, P., McGuffin, R., Sanders, J., Stewart, P., Sullivan, K., Witherspoon, R., Yee, G., Thomas, E.D.. Methotrexate and cyclosporin compared with cyclosporin alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N. Eng. J. Med.* 314: 729. (1986).
198. Storb, R., Epstein, R.B., Thomas, E.D.. Marrow repopulating ability of peripheral blood cells compared to thoracic duct cells. *Blood* 32: 662. (1968).
199. Storms, R.W., Goodell, M.A., Fisher, A., Mulligan, R.C., Smith, C.. Hoechst dye efflux reveals a novel CD7+CD34- lymphoid progenitor in human umbilical cord blood. *Blood.* 96: 2125. (2000).
200. Strauss, L., Rowley, S., LaRussa, S., Stuart, R., Civin, C.. Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 14: 878. (1986).
201. Sun, Y., Ma, G., Li, D.. Repair of large cranial defect using allogeneic cranial bone and bone morphogenetic protein. *Cheng Hsing Shao Shang Wai chung Hua Ko Tsa Chih.* 11: 8. (1995).

202. Sutherland, D. Keating A.. The CD34 antigen: Structure, biology, and potential clinical applications. *J. Hemat.* 1:115. (1992).
203. Suzuki, E., Evans, T., Lowry, J., Truong, L., Bell, D.W., Testa, J.R., Walsh, K.. The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-spesponsive signals. *Genomics.* 38. 283. (1996).
204. Taghon, T., De Smedt, M., Stolz, F., Cnockaert, M., Plum, J., Leclercq, G.. Enforced Expression of GATA-3 Severly Reduces Human Thymic Cellularity. *J Immunol.* 167: 4468. (2001).
205. Takeshita, S., Zhung, L., Brogi, E., Kearney, M., Pu, L-Q., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J., F., Isner, J., M.. Therapeutic angiogenesis: a single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments collateral vessel formation in a rabbit ischemic hindlimb model. *J Clin Invest.* 93: 662. (1994).
206. Thalmeier, K., Meißner, P., Reisbach, G., Falk, M. Brechtel, A., Dörmer,P.. Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. *Blood,* 83(7):1799-1807. (1994).
207. Thalmeier, K., Meißner, P., Reisbach, G., Hültner, L., Mortensen, B.T., Brechtel, A., Oostendorp, R.A.J, Dörmer, P..Constitutive and modulated cytokine expression in two permanent human bone marrow stromal cell lines. *Exp Hematol.* 24: 1-10 (1996).
208. Till, J., E., McCulloch, E., A.. A direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Res.*14: 213. (1961).
209. Tong, Q., Dalgin, G., Xu., H., Ting, C-N., Leiden, J.M., Hotamisligil, G.S.. Function of GATA Transcription Factors in Preadipocyte-Adipocyte Transition. *Science.* 290: 134. (2000).
210. Tsai, S., F., Martin, D., I., K., Zon, L., I., D'Andrea, A., D., Wong, G.G., Orkin, S.,H.. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature.* 339: 446. (1989).

211. Tsiamis, A., C., Hayes, P., Box, H., Goodall, A., H., Bell, P., R., F., Brindle, N., P., J.. Characterization and regulation of the receptor tyrosine kinase Tie-1 in platelets. *Vascular Research*. 37: 437. (2000).
212. Uchida, N., Combs, J., Chen, S., Zanjani, E., Hoffman, R., Tsukamoto, A.. Primitive human hematopoietic cells displaying differential efflux of the Rhodamin 123 dye have distinct biological activities. *Blood*, 88(4): 1297-1305. (1996).
213. Uchida, N., Weissmann, I., L.. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{low} Lin-Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J. Exp. Med.* 175: 175. (1992).
214. Udomsakdi, C., Eaves, C., J., Southerland, H., J., Lansdorp, P., M.. Separation of functionally distinct subpopulations of primitive human hematopoietic cells using Rhodamin-123. *Exp. Hematol* 19:338. (1991).
215. Uyeda, C., T., Eng, L., F., Bignami, A.. Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.* 37: 81. (1972).
216. Vaughan, W., P., Civin, C., I., Weisenburger, D., D., Karp, J., E., Graham, M., L., Sanger, W., G., Grierson, H., L., Joshi, S., S., Burke, P., J.. Akute leukemia expressing the normal human hematopoietic stem cell membrane Glykoprotein CD34 (MY10) *Leukemia* 2: 661. (1988).
217. Vivin, C., I., Strauss, L., C., Brovall, C., Fackler, M., J., Schwartz, J., F., Shaper, J., H.. Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG1a cells. *J. Immunol.* 133: 157. (1984).
218. Vos, O., Ploemacher, R., E.. Developments in modern hematology. *Boll Sco Biol Sper.* 67: 435. (1991).

219. Wada, H., Saikawa, Y., Niida, Y., Nishimura, R., Noguchi, T., Matsukawa, H., Ichihara, T., Koizumi, S.. Selectively induced high MRP gene expression in multidrug-resistant human HL60 leukemia cells. *27*: 99. (1999).
220. Wagenmaker, G., van Gils, F., Bart-Baumeister, J., Weilenger, J. Levinsky, R. . Sustained engraftment of allogeneic CD34 positive hematopoietic stem cells in rhesus monkeys. *Exp Hematol.* *18*: 708. (1990).
221. Waller, E., K., Olweus, J., Lund-Johansen, F., Huang, S., Nguyen, M., Guo GR., Terstappen, L.. The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood.* *85*: 2422. (1995).
222. Wang, J., M., Kumar, S., Pye, D., Haboubi, N., Al-Nakib, L.. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasulature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst.* *86*: 386. (1994b).
223. Wang, J., M., Kumar, S., Pye, D., van Agthoven, A., J., Krupinski, J., Hunter, R., D.. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int J Cancer.* *54*: 363. (1993).
224. Wang, J., M., Wilson, P., B., Kumar, S., Pye, D., Hunter, R., D.. Quantitation of endothelial cell specific protein E-9 employing a single monoclonal antibody in an indirect sandwich ELISA. *J immunol Methods.* *171*: 55. (1994a).
225. Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D., Stehelin, D.. The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature.* *346*: 191 (1990).
226. Watt, S., M., Gschmeisser, S.E., Bates, P.A.. PECAM-1: ist expression and function as an adhesion molecule on haematopoietic and endothelial cells. *Leukemia Lymphoma.* *17*: 229. (1995).

227. Watt, S., M., Hogan, B., L., M.. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287: 1427. (2000).
228. Weston, K. Myb protein in life, death and differentiation. *Curr. Opin. Dev.* 8: 76. (1998).
229. Yamamoto, K., Ko, L., J., Leonard, M., W., Beug, H., Orkin, S.H., Engel, J.D.. Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev.* 4: 1650. (1990).
230. Yang, Y.C., Tsai, S., Wong, G.G., Clark, S.C.. Interleukin-1 regulation of hematopoietic growth factor production by human stromal fibroblasts. *J Cell Physiol* 134: 292. (1988).
231. Yong, K., L., Watts, M., Suan Thomas, N., Sullivan, A., Ings, S., Linch, D., C.. Transmigration of CD34⁺ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31). *Blood.* 91: 1196. (1998).
232. Zamann, G., J., Flens, M., J., van Leusden, M., R., de Haas, M., Mulder, H., S., Lankelma, J., Pinedo, H., M., Scheper, R., J., Baas, F., Broxterman, H., J., Borst, P.. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8822. (1994).
233. Ziegler-Hitchcock, H., W., L., Ulevitch, R., J.. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today.* 14: 121. (1993).
234. Patriarca, F., Damiani, D., Fanin, R., Grimaz, S., Geromin, A., Cerno, M., Sperotto, A., Silvestri, F., Zaja, F., Baccarani, M.. High-dose therapy in multiple myeloma: effect of positive selection of CD34⁺ peripheral blood stem cells on hematologic engraftment and clinical outcome. *Haematologica.* 85: 269-74. (2000).

235. Silvestri, F., Banavali, S., Savignano, C., Preisler, H.,D., Bacarani, M.. CD34+ cell selection: focus on immunomagnetic beads and chymopapain. *Int J Artif Organs*. 16 Suppl 5: 96-101. (1993).
236. Van Stijn, A., van der Pol, M.,A., Kok, A., Bontje, P.,M., Roemen, G.,M., Beelen, R.,H., Ossenkoppele, G.,J., Schuurhuis, G.,J.. Differences between the CD34+ and CD34- blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 88: 497-508. (2003).
237. Wang, J.S., Fang, Q., Sun, D.,J., Chen, J., Zhou, X.,L., Lin, G.,W., Lu, H.,Z., Fei, J.. Genetic modification of hematopoietic progenitor cells for combined resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide, vincristine, and daunorubicin. *Acta Pharmacol Sin*. 22: 949-55. (2001). Verfaillie, C., Blakolmer, K., McGlave, P.. Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J Exp Med*. 172: 509-2. (1990).
238. Katayama, Y., Hidalgo, A., Peired, A.,J., Frenette, P.,S.. Integrin alpha4beta7 and its counterreceptor MAdCAM-1 contribute to hematopoietic progenitor recruitment into bone marrow following transplantation. *Blood*. May 25 [Epub ahead of print] (2004).
239. Konakahara, S., Ohashi, K., Mizuno, K., Itoh, K., Tsuji, T.. CD29 integrin- and LIMK1/cofilin-mediated actin reorganization regulates the migration of haematopoietic progenitor cells underneath bone marrow stromal cells. *Genes Cells*. 9: 345-58. (2004).
240. Wagers, A., J., Weissman, I., L.. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 116: 639-648. (2004).
241. Dick, J.,E., Bhatia, M., Gan, O., Kapp, U., Wang, J.,C.. Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells*. 15 Suppl 1: 199-203; discussion 204-7. (1997).

DANKSAGUNG

Besonders herzlich danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Udo Löhrs, dem Direktor des Pathologischen Instituts der Universität München, für das Überlassen des Themas und für die Möglichkeit die Doktorarbeit am Pathologischen Institut zu erstellen. Herr Professor Löhrs hat mir jede erbetene Hilfe zukommen lassen und ist mir während der gesamten Zeit immer beratend zur Seite gestanden.

Herr Privatdozent Dr. Ralf Huss hat diese Arbeit mit viel pädagogischem Geschick, Kreativität und Humor kameradschaftlich betreut. Seine wissenschaftliche Sachkunde, aber auch sein hohes Maß an sozialer Kompetenz haben mich die Hürden dieser Arbeit nehmen lassen. Herr PD Dr. Huss wird mir stets ein wissenschaftliches Vorbild bleiben.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Berthold Gottgens vom Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge University, Cambridge, UK, für die kompetente Durchführung und Unterstützung bei der RT-PCR der Transkriptionsfaktoren.

Herr Prof. Dr. Michael Andreeff vom MD Anderson Cancer Center der University of Texas in Houston hat mir einen Forschungsaufenthalt in seinen Labors ermöglicht. Die dortige Zusammenarbeit mit Douglas Weidner hat meine Forschung an den Stammzelllinien sehr vorangebracht.

Herr Dr. Joachim Ellwart und Frau Karin Nispel vom Institut für molekulare Immunologie der GSF in München haben mich tatkräftig bei den Zellsortierexperimenten unterstützt.

Frau Dr. Karin Thalmeier und Frau Dr. Gudrun Amann aus dem Pathologischen Institut haben mich wissenschaftlich äußerst kompetent und hilfreich beraten. Frau Dr. Birgit Anderegg hat mir sehr bei der RNA-Extraktion geholfen.

Frau Sabine Sagebiel, Frau Sabine Moosmann und Frau Sabine Schäfer haben mir während meiner gesamten Forschungszeit am Pathologischen Institut exzellente technische Unterstützung geliefert.

Mein Vater, meine Schwester, Frau Christina Kaiser, Frau Sabine Moosmann und Frau Sabine Schäfer haben keine Mühen bei der Korrektur der Arbeit gescheut, um sie in ein lesbares Format zu bringen.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Claudius Horst Oskar CONRAD
Geburtsdatum: 08.01.1978
Geburtsort: Landsberg am Lech
Eltern: Dr. med. Dr. med. vet. Horst Conrad
Jana Conrad, geb. Sucha
Geschwister: Isabell Conrad, geb. 1975
Konfession: evangelisch-lutherisch

AUSBILDUNG

1988-1995 Dominikus-Zimmermann-Gymnasium Landsberg (math.-nat.),
Begabungsvoraussetzungen für Begabtenförderung (Bayern)
1995-1996 Stipendiat von Rotary International nach Dallas, Texas
Akademisches Stipendium Privatschule St. Mark's School of
Texas
1996 Hochschuldiplom, USA (College Board: with honor)
Anerkennung durch bayer. Zeugnisanerkennungsstelle
1996-1997 Wehrdienst: 1. Gebirgsjägerdivision/ 231.
Hochgebirgsjägerzug, Auslandseinsätze
Seit 1997 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität, München
2000 1. Deutsches Staatsexamen
1. Amerikanisches Staatsexamen (United States Medical
Licensing Exam, Step 1)
2001 Forschungsaufenthalt: "M.D. Anderson Cancer Center",
University of Texas in Houston
2002 2. Deutsches Staatsexamen
2002-2003 Praktisches Jahr:
1. *Tertial*: Gynäkologie/Geburtshilfe
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois-Lausanne, CH

2. *Tertial*: Kinderchirurgie und Traumatologie
Klinikum Innenstadt der Universität München
3. *Tertial*: Stipendiat der LMU, Harvard Medical School,
Boston, USA; Innere Medizin am Beth Israel Deakness
Medical Center und Notfallmedizin am Massachusetts
General Hospital

- 2003
3. Deutsches Staatsexamen
 2. Amerikanisches Staatsexamen (United States Medical
Licensing Exam, Step 2)

FAMULATUREN

seit 1997

- Innere Medizin – Clinique St. Anne Strasbourg (Frankreich),
1 Monat
- Akutpsychiatrie – BKH Kaufbeuren, 1 Monat
- Viszeralchirurgie (OP-Assistenz, Erstversorgung von
Notfällen) – Krankenhaus München Bogenhausen, 1 Monat
- Pathologisches Institut der Universität München, 1 Monat
- Hämatologische Onkologie – M.D. Anderson Cancer Center,
University of Texas in Houston (USA), 1 Monat
- Kinderchirurgie – Doktor von Haunersches Kinderspital der
Universität München, 1 Monat

ZUSATZQUALIFIKATIONEN

seit 1999

- Medien-Biennale: „Envisioning Knowledge“ - Die
Wissenschaftsgesellschaft und die neuen Medien (München)
- M.I.T - Harvard University, Conference on Genetic
Technology and Society (Boston)
- Kurs der klinischen Elektrokardiographie
- Ausbildungsbeginn der Zusatzbezeichnung „Sportmedizin“

INTERESSEN

Sozial: seit 1997 Mitglied von Rotaract International (RTC), der
Jugendorganisation von Rotary International
1998/1999 Präsident des RTC Lech-Ammersee

Musik: Geige und Klavier
1. Preise bei Klavier-Wettbewerben im In- und Ausland (Jugend
Musiziert; ISAS Festival, USA)
1995-1996 Klavier-Stipendium am Suzuki Institute of Dallas
Seit 1996 Violinist des Collegium Musicum Landsberg
1996-1997 Stipendiat der Stadt Bad Reichenhall (Mozarteum Salzburg)
1997-1999 Leopold - Mozart - Konservatorium, Augsburg
Seit 1999 Richard - Strauß - Konservatorium, München
2002-2003 Conservatoire de Musique de Lausanne

ORIGINALARBEITEN

- **Conrad, C.,** Gottgens, B., Thalmeier, K., Kinston, S., Ellwart, J., Huss, R.. GATA-Transcription in a small Rhodamine 123^{low}, CD34⁺ subpopulation of a peripheral blood-derived CD34⁻, CD105⁺ mesenchymal cell line. J Exp Hematol, 30: 887 (2002)

KONGRESSBEITRAG

- **Conrad, C.,** Gottgens, B., Thalmeier, K., Kinston, S., Ellwart, J., Huss, R.. GATA-Transcription in a small Rhodamine 123^{low}, CD34⁺ subpopulation of a peripheral blood-derived CD34⁻, CD105⁺ mesenchymal cell line. 31. Meeting der International Society of Experimental Hematology (ISEH), Montreal, 5.-9. Juli 2002 in Montreal, Canada)
- Huss, R., **Conrad, C.** Phenotypic characterization of adult stem cells (FlowTime 2002, 1. Jahrestagung der österreichischen Gesellschaft für Zytometrie, Wien, 25.-27. April 2002)
- **Conrad, C.,** Huss, R.. Funktionelle Plastizität und Molekulare Stammzellpotenz humaner adulter Stammzelllinien. Sommertreffen der Bayerischen Hochschulinstitute für Pathologie 2002, Würzburg, 13. 7. 2002

