



Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
der Philipps-Universität Marburg
Abteilung Hämatologie / Onkologie / Immunologie
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Andreas Neubauer

**Biologische Effekte eines
CD82-spezifischen monoklonalen
Antikörpers auf die normale
und maligne Hämatopoese**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Tobias Härle
aus Kiel

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am 24. Februar 2005.
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Andreas Neubauer

Korreferent: Prof. Dr. med. Heinz-Gert Höffkes

*„Der erste Schluck aus dem Becher
der Natur führt zum Atheismus,
aber auf dem Grund wartet Gott.“*

Werner Heisenberg

*Für meine Eltern
Elisabeth und Wilfried Härle*

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>6</u>
1.1	HÄMATOPOESE	6
1.1.1	Hämatopoetische Stammzellen	6
1.1.2	Das Knochenmark-Mikromilieu	9
1.1.3	LTC-IC-Kultur	10
1.1.4	Maligne Erkrankungen der Hämatopoese	11
1.2	TETRASPANINE	12
1.2.1	Struktur und Vorkommen	12
1.2.2	Biologie der Tetraspanine	13
1.2.3	Tetraspanine in der Hämatopoese	14
1.3	CD82	15
1.3.1	Struktur und Vorkommen	15
1.3.2	Biologie von CD82	16
1.3.3	CD82 in der Hämatopoese	17
1.4	FRAGESTELLUNG	19
<u>2</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>20</u>
2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN	20
2.2	PATIENTENPROBEN	20
2.3	ZELLKULTUR UND ZELLINIEN	21
2.4	ANTIKÖRPER	22
2.5	ZELLADHÄSIONSKULTUR	23
2.6	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	24
2.6.1	Prinzip	24
2.6.2	Durchführung	27
2.7	ZELLSTIMULATION FÜR CDNA-ARRAY-ANALYSE	28
2.8	KONTROLLE DER ERGEBNISSE DER CDNA-ARRAY-ANALYSE	29
2.9	LIMITING-DILUTION-ANALYSE EINER LTC-IC-KULTUR	30
2.9.1	Prinzip	30
2.9.2	Durchführung	31
2.10	STATISTISCHE AUSWERTUNG	34
2.11	SOFTWARE	35
<u>3</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>36</u>
3.1	ADHÄSION UND MORPHOLOGIEVERÄNDERUNG BEI CD82-LIGATION	36
3.2	EINFLUSS VON CD82-LIGATION AUF DIE EXPRESSION VON ZELLOBERFLÄCHENMOLEKÜLEN BEI CD34 ⁺ PBPC UND LEUKÄMIEZELLEN	39
3.3	CDNA-ARRAY-ANALYSE UND NACHUNTERSUCHUNG	42
3.4	ANALYSE DER LTC-IC-FREQUENZ BEI KULTUR MIT CD82-ANTIKÖRPERN	45

4	<u>DISKUSSION</u>	51
4.1	ADHÄSION UND MORPHOLOGIEVERÄNDERUNG BEI CD82-LIGATION	51
4.2	EINFLUSS VON CD82-LIGATION AUF DIE EXPRESSION VON ZELLOBERFLÄCHENMOLEKÜLEN BEI CD34 ⁺ PBPC UND LEUKÄMIEZELLEN	53
4.3	cDNA-ARRAY-ANALYSE UND NACHUNTERSUCHUNG	56
4.4	ANALYSE DER LTC-IC-FREQUENZ BEI KULTUR MIT CD82-ANTIKÖRPERN	57
4.5	FAZIT UND AUSBLICK	60
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	62
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	63
	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	83
	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	85
	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	89
	<u>ANHANG</u>	90
I.	DANKSAGUNG	90
II.	MEINE AKADEMISCHEN LEHRER	91

1 EINLEITUNG

1.1 Hämatopoese

Der zentrale Ort der Hämatopoese und damit die wichtigste Quelle neuer Blutzellen beim Menschen ist das Knochenmark. Da reife Blutzellen nur eine begrenzte Lebensdauer haben, müssen während des gesamten Lebens konstant neue Blutzellen gebildet werden. Außerdem muss der Organismus in der Lage sein, auf einen erhöhten Bedarf oder Verbrauch von Blutzellen mit einer gesteigerten Bildung des spezifisch benötigten Zelltyps zu reagieren und diese bei nicht mehr vorhandener Notwendigkeit wieder herunterzuregulieren. Diese Prozesse sind sehr komplex, und eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren ist daran beteiligt. Die intensive Forschung der letzten Jahrzehnte hat enorme Fortschritte beim Verständnis der Hämatopoese gebracht, aber trotzdem werden viele Zusammenhänge noch immer unzureichend verstanden.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über ausgewählte Aspekte der Hämatopoese gegeben werden.

1.1.1 Hämatopoetische Stammzellen

Stammzellen sind Zellen mit der Fähigkeit, sich über einen langen Zeitraum selbsterneuernd zu teilen und in die verschiedenen Zelltypen zu differenzieren, aus denen sich die Gewebe und Organe des Organismus entwickeln (Till und McCullough, 1961). Dabei muss zwischen embryonalen und adulten Stammzellen unterschieden werden. Ersterer werden aus der inneren Zellmasse eines Embryos im Stadium der Blastozyste gewonnen, wobei die Entnahme zur Zerstörung des Embryos führt. Sie sind daher Gegenstand ethischer Diskussionen, während letztere als undifferenzierte Zellen in differenziertem Gewebe vorkommen. Den am besten charakterisierten Typ adulter Stammzellen stellt wohl die hämatopoetische Stammzelle (HSC) dar. Nach heutiger Auffassung stammen alle Blutzellen direkt von im Knochenmark ansässigen pluripotenten HSC ab (Morrison und Weissman, 1994). Dabei können zwei Subpopulationen differenziert werden, die sich bezüglich ihrer Selbstreproduktionskapazität unterscheiden. Die so genannten „long-term“ HSC (LT-HSC) sollen sich während der gesamten Lebensdauer des Organismus selbst reproduzieren können, während diese Fähigkeit bei „short-term“ HSC (ST-HSC) auf etwa 8 Wochen beschränkt zu sein scheint (Morrison und Weissman, 1994). Die HSC generieren über mehrere Zwischenstufen mit abnehmender Differenzierungspotenz die reifen Blutzellen der verschiedenen Zellreihen (Abbildung 1-1).

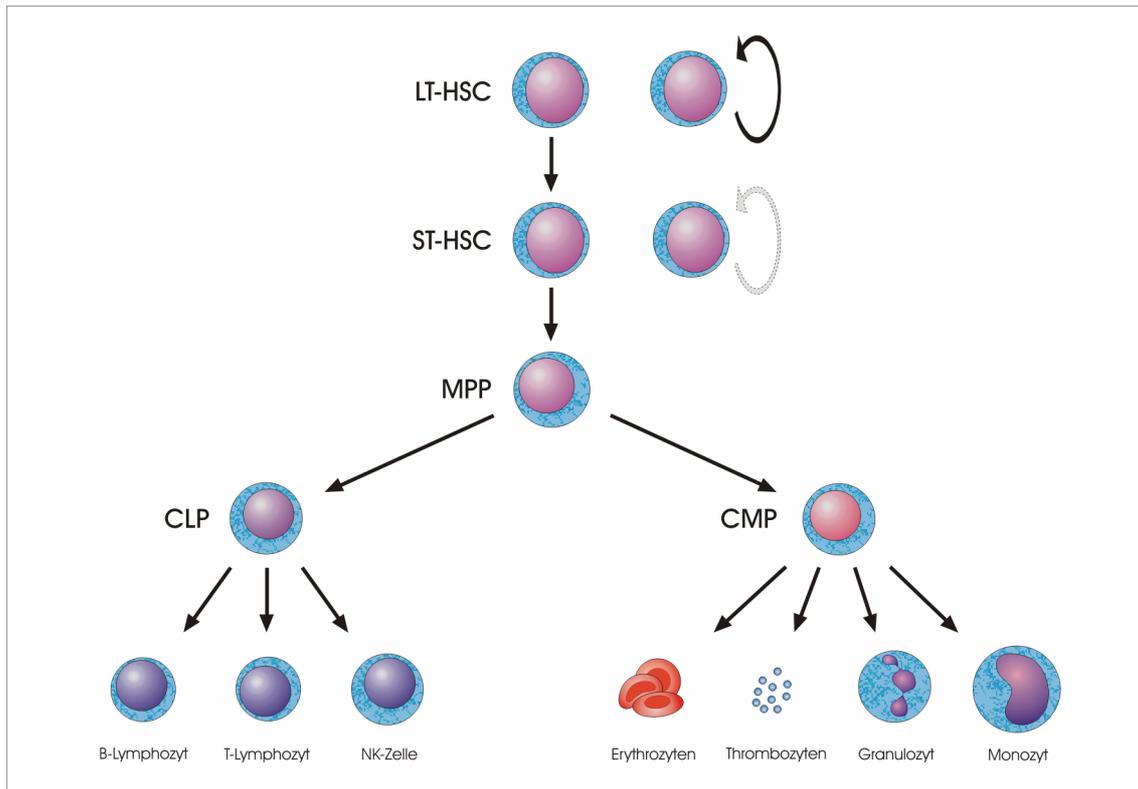


Abbildung 1-1 Modell der selbsterneuernden Teilung und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen. HSC können in LT-HSC und ST-HSC unterteilt werden, wobei erstere im Gegensatz zu letzteren eine unbegrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung zu haben scheinen. ST-HSC gehen aus LT-HSC hervor und differenzieren zu multipotenten Progenitoren (MPP) (Morrison et al., 1997). Aus diesen können zwei Arten oligopotenter Zellen hervorgehen, die lymphatischen Progenitoren (CLP) (Kondo et al., 1997) und die myeloischen Progenitoren (CMP) (Akashi et al., 1999). Über Zwischenstufen differenzieren sich diese zu reifen Blutzellen.

Lange Zeit wurde angenommen, dass HSC nur extrem selten in den Zellzyklus eintreten und immer nur eine oder wenige HSC gleichzeitig an der Blutbildung beteiligt sind, bis sie nach ihrem Tod durch eine oder wenige neue ersetzt werden (Lemischka et al., 1986). Heute geht man jedoch davon aus, dass jeden Tag etwa 10% der HSC zufällig in den Zellzyklus eintreten und ihn alle HSC in einem Zeitraum von 1-3 Monaten wenigstens einmal durchlaufen müssen (Bradford et al., 1997; Cheshier et al., 1999). Um einer Limitierung der möglichen Mitosen durch eine Verkürzung der Telomere an den Chromosomenenden entgegenzuwirken, haben die LT-HSC eine im Vergleich zu ST-HSC und MPP erhöhte Aktivität des Telomerasekomplexes (Vaziri et al., 1994; Allsopp et al., 1995; Morrison et al., 1996). Ihre Zellzahl können die HSC, wie andere Zellen auch, zumindest partiell durch programmierten Zelltod (Apoptose) regulieren (Domen et al., 2000). Die molekularen Mechanismen der Regulation von Proliferation und Apoptose werden bisher nur unvollständig verstanden.

Eine weitere Eigenschaft der HSC stellt ihre Fähigkeit dar, unter bestimmten Bedingungen das Knochenmark (KM) zu verlassen und unter bestimmten Bedingungen wieder

dorthin zurückzukehren, zwei Vorgänge, die als Mobilisation und Homing bezeichnet werden. Eine große Bedeutung scheint dabei den β_1 -Integrinen, besonders dem very late antigen-4 (VLA-4, $\alpha_4\beta_1$ -Integrin), zuzukommen, welche auch während der Ontogenese an der Migration der HSC vom embryonalen Dottersack in die fetale Leber (Cumano et al., 1995; Medvinsky und Dzierzak, 1996) und später in die Milz und das Knochenmark (Morrison et al., 1995) zumindest partiell beteiligt sind (Hirsch et al., 1996). VLA-4 scheint bei Stammzellen ein wichtiger Regulator von Migration, Mobilisation und Homing zu sein (Miyake et al., 1991a; Verfaillie et al., 1991; Williams et al., 1991). Daneben sind zahlreiche andere Moleküle beteiligt und viele noch unbekannt. Im peripheren Blut befindliche HSC und Progenitoren werden unter dem Begriff periphere Blutvorläuferzellen (PBPC) zusammengefasst.

Da HSC und Progenitorzellen morphologisch nur unzureichend von reifen Lymphozyten unterschieden werden können, wird versucht sie anhand ihrer Zelloberflächenmoleküle zu charakterisieren. Zahlreiche dieser Moleküle sind als humane Leukozytendifferenzierungsantigene (HLDA) in ein Schema eingeordnet und mit einer fortlaufenden Nummerierung versehen (engl. Cluster Designation=CD) (Mason et al., 2002). Die wenigsten HLDA sind absolut spezifisch, so dass einzelne Zellpopulationen durch die Kombination vorhandener (+) und fehlender (-) Expression einzelner HLDA charakterisiert und differenziert werden. Bisher besteht noch kein wissenschaftlicher Konsens darüber, welche HLDA konsistent auf humanen HSC exprimiert werden. Derzeit wird davon ausgegangen, dass humane HSC zu einer $CD34^+$, $CD38^-$, $CD90^+$ und Lin^- Zellpopulation gehören (Baum et al., 1992; Miller et al., 1999). Lin steht dabei für „lineage markers“ und repräsentiert eine Gruppe der HLDA verschiedener reifer Blutzellen (z.B. CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK 1.1, B220, Ter 119, GR-1, Mac-1).

In Bezug auf das Differenzierungspotenzial der HSC hat in den letzten Jahren ein Paradigmenwechsel stattgefunden. Während lange von einer Unumkehrbarkeit jedes Differenzierungsschrittes ausgegangen wurde, deuten neuere Erkenntnisse auf ein weitaus größeres Differenzierungspotenzial der HSC hin. Neben der Bildung reifer Blutzellen sind sie möglicherweise auch in der Lage, andere Körperzellen zu generieren. Diese Fähigkeit wird mit dem Begriff der Plastizität umschrieben. In vivo Experimente mit Mäusen konnten eine Differenzierung der HSC in epitheliale Zellen der Lunge, des Magen-Darm-Traktes und der Haut (Krause et al., 2001), in Myokard mit zugehörigen Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen (Jackson et al., 2001; Orlic et al., 2001) sowie in Hepatozyten zeigen (Lagasse et al., 2000). Letzteres wurde auch beim Men-

schen *in vivo* beschrieben (Alison et al., 2000). Unklar ist allerdings, ob diese Beobachtungen tatsächlich auf einer Transdifferenzierung oder aber auf anderen Mechanismen, wie beispielsweise Zellfusion, beruhen.

Bisher wird nur sehr lückenhaft verstanden, welche Mechanismen und regulativen Faktoren der HSC vermitteln, wann sie in den Zellzyklus eintritt, differenzierte Zellen generiert, ins periphere Blut übertritt, programmierten Zelltod aktiviert oder sich in verschiedene Gewebe integriert und möglicherweise in andere Gewebe differenziert.

1.1.2 Das Knochenmark-Mikromilieu

Neben den hämatopoetischen Zellen ist das Knochenmark-Mikromilieu (auch Stammzellnische genannt) die zweite entscheidende Komponente der Hämatopoese. Es besteht zum einen aus hämatopoetischen Zytokinen, welche die Hämatopoese über endokrine und parakrine Mechanismen regulieren, und zum anderen aus dem Knochenmarkstroma, welches aus mesenchymalen Zellen, vor allem Fibrozyten und Adipozyten, und der extrazellulären Matrix (EZM) besteht.

Die HSC und die Progenitoren sind im KM in engem Kontakt mit dem Knochenmark-Mikromilieu (Schofield, 1983), welches ihnen die meisten, wenn nicht gar alle, notwendigen Faktoren für eine geordnete Entwicklung liefert (Lemischka, 1997). Die HSC und die Progenitoren exprimieren viele verschiedene Adhäsionsmoleküle, welche durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen den Verbleib im KM bewirken und wohl auch an der Regulation der Hämatopoese beteiligt sind (Prosper und Verfaillie, 2001). Über 40 verschiedene Wachstumsfaktoren (GF), Zytokine und Chemokine sind derzeit bekannt, welche endokrin und parakrin an spezifische Rezeptoren binden und auf diese Weise Proliferation, Differenzierung und Schicksal der hämatopoetischen Zellen beeinflussen (Watowich et al., 1996). Sie beeinflussen auch die adhäsiven Interaktionen zwischen den hämatopoetischen Zellen und ihren Liganden im Knochenmark, was einen weiteren Mechanismus der Regulation der Hämatopoese darstellt (Levesque et al., 1995).

Das Knochenmark-Mikromilieu stellt ein komplexes Netzwerk einer Vielzahl sich gegenseitig beeinflussender Mechanismen dar. Obwohl die Liste der beteiligten Moleküle stetig wächst, werden die Prozesse bisher nur unzureichend verstanden und es erscheint daher wichtig, auch weitere Moleküle auf eine mögliche Bedeutung in der Regulation der Hämatopoese zu untersuchen.

1.1.3 LTC-IC-Kultur

Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit von HSC und differenzierten Leukozyten sowie dem Fehlen eindeutiger Marker, stellt die Quantifizierung früher hämatopoetischer Zellen noch immer ein großes Problem dar. Ein wissenschaftlich anerkanntes Verfahren ist die Kultur Langzeitkultur-initiierender Zellen (LTC-IC).

Bei der LTC-IC-Kultur handelt es sich um ein Langzeitkultursystem, das die *in vitro* Erhaltung unreifster pluripotenter hämatopoetischer Zellen für mehrere Wochen ermöglicht (Eaves et al., 1987). Hämatopoetische Zellen werden dabei auf einem vorbestehenden Zellrasen humaner oder muriner, adhärenter Knochenmark-Stromazellen kultiviert (Sutherland et al., 1989). In Kombination mit einem speziellen LTC-Medium generieren die Stromazellen ein Mikromilieu, welches den hämatopoetischen Zellen Überleben, Differenzierung und Selbsterneuerung ermöglicht. Dabei kommt es zur Integration der primitiven hämatopoetischen Zellen in den Zellrasen (Coulombel et al., 1983). Zur Auswertung der LTC wird der Zellrasen adhärenter Zellen durch Trypsinieren resuspendiert und zusammen mit den nicht-adhärenenten Zellen in spezielles Methylzellulose-Medium transferiert, welches die terminale Differenzierung der enthaltenen Progenitoren forciert und zur Bildung mikroskopisch detektierbarer Zellklone führt (Abb. 1-2) (Coulombel et al., 1983).

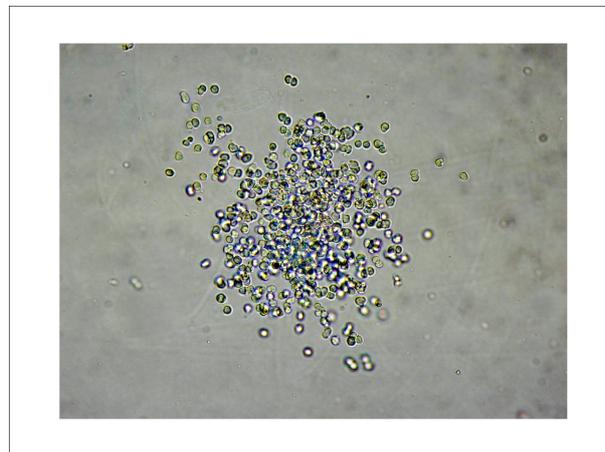


Abbildung 1-2 Mikrofotografie eines typischen Zellklons, beobachtet an Tag 14 der Methylzellulose-Kultur einer LTC-IC-Kultur (Vergrößerung 100x)

Aufgrund dieser Eigenschaft werden die Progenitoren auch als Kolonie-bildende Zellen (CFC) und zusammen mit den Zellklonen als Kolonie-bildende Einheiten (CFU) bezeichnet. Entsprechend ihrem Differenzierungspotenzial zu granulozytären (G), monozytären (M), megakaryozytären (Meg) und erythrozytären (E) Zellen unterscheidet man CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-Meg und CFU-E.

Während eines Zeitraumes von 5 Wochen durchlaufen mehr als 95% der initial vorhandenen CFC ihre terminale Differenzierung. Damit stammen praktisch alle nach diesem Zeitraum detektierbaren CFU von primitiven hämatopoetischen Zellen ab, die unter den geeigneten Kulturbedingungen CFC über mehrere Wochen generieren können. Aufgrund dieser Eigenschaft werden diese primitiven hämatopoetischen Zellen als LTC-IC bezeichnet (Winton und Colenda, 1987; Sutherland et al., 1990; van der Sluijs et al., 1990). Die LTC-IC-Kultur stellt ein in vitro Modell der Hämatopoese dar, wobei die LTC-IC pluripotente HSC repräsentieren sollen (Lemieux et al., 1995).

1.1.4 Maligne Erkrankungen der Hämatopoese

Störungen in dem fein geregelten Prozess der Hämatopoese können unterschiedlichste Ursachen haben und zu einer Vielzahl von Erkrankungen führen. Bei einer Insuffizienz des Knochenmarks kommt es je nach betroffener Zelllinie zu Anämie, Granulozytopenie, Lymphozytopenie oder Thrombozytopenie.

Genetische Mutationen der HSC oder PBPC, welche die Apoptose oder eine terminale Differenzierung der Zellen blockieren oder aber diesen einen Wachstumsvorteil verschaffen, können eine klonale Proliferation und damit maligne Entartung dieser Zellen induzieren. Dabei hängt die klinische Manifestation der einzelnen Erkrankung vom Differenzierungszustand und der Linienzugehörigkeit der betroffenen Zelle ab sowie von der Art der im Verlauf der klonalen Entwicklung auftretenden initialen oder nachfolgenden Mutationen (Ruscetti et al., 1999). Bei der Polycythaemia vera kommt es beispielsweise zur autonomen Steigerung vor allem der Erythropoese, aber auch der Granulo- und Thrombopoese. Eine maligne Entartung weißer Blutzellen mit konsekutiver Proliferation führt zu Lymphomen oder Leukämien.

Die Leukämien werden anhand der betroffenen Zelllinie und des klinischen Verlaufs in die Akute Lymphatische Leukämie (ALL), die Akute Myeloische Leukämie (AML) und die Chronische Myeloische Leukämie (CML) unterteilt. Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) wird heute zu den niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt.

Die AML beruht auf einer malignen Entartung granulozytärer Vorläuferzellen. Sie wird anhand der Differenzierung und des Reifegrades der Zellen entsprechend der French-American-British-Klassifikation (FAB-Klassifikation) in die Subtypen M0-M7 unterteilt. Die Pathogenese der AML ist mit dem Auftreten onkogener Fusionsproteine assoziiert, welche durch spezifische Chromosomentranslokationen entstehen (Alcalay et al., 2001). Bei einem der beiden Partner handelt es sich meist um einen Transkriptionsfak-

tor, so dass die Fusionsproteine in der Regel zu einer aberranten Regulation der Transkription führen, was mit dem Prozess der myeloiden Differenzierung interferiert, einen Arrest der Ausreifung hervorruft oder das Zellüberleben fördert (Alcalay et al., 2001). Auch abnorme Expression oder Funktion von Adhäsionsmolekülen scheint für die Pathogenese von Bedeutung zu sein (Prosper und Verfaillie, 2001). Vor diesem Hintergrund hat die WHO eine Klassifikation vorgeschlagen, die auf einer Kombination von FAB-Klassifikation und Zyto- und Molekulargenetik basiert (Harris et al., 1999).

1.2 Tetraspanine

1.2.1 Struktur und Vorkommen

Die Tetraspanine wurden erstmals 1990 als eine neue Gruppe zellulärer Oberflächenmoleküle beschrieben (Oren et al., 1990). Dieser Proteinfamilie ist ein charakteristischer Aufbau mit vier transmembranären Domänen eigen (Abbildung 1-3).

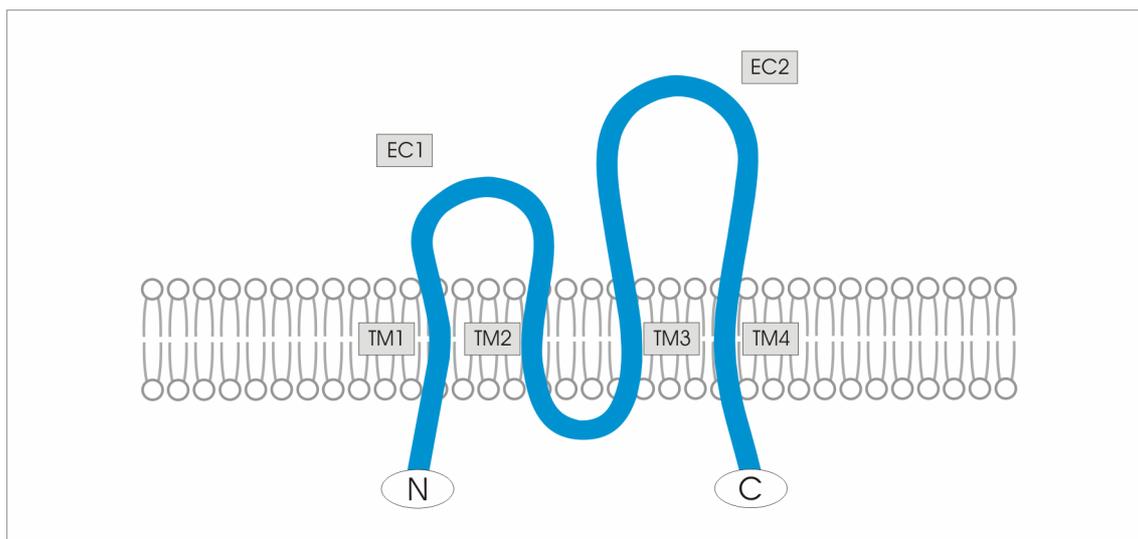


Abbildung 1-3 Schematische Struktur der Tetraspanine. Charakteristisch sind vier hydrophobe transmembranäre Domänen (TM 1-4), die zur Ausbildung einer kleinen, 20-28 Aminosäuren (As) langen, und einer großen, 76-131 As langen, extrazellulären Schleife (EC1 und EC2) mit kurzen, weniger als 19 As langen, intrazellulären C- und N-terminalen Enden führen (Wright und Tomlinson, 1994; Maecker et al., 1997). Zwischen TM2 und TM3 liegt eine kurze verbindende intrazelluläre Schleife. Von anderen Proteinen mit vier transmembranären Domänen unterscheiden sich die Tetraspanine durch eine große Zahl konservierter As, die vor allem im Bereich der TM (Wright und Tomlinson, 1994) und vermutlich spezifischer Motive der EC2 zu finden sind (Kitadokoro et al., 2001).

Die Expression einiger stark homologer Tetraspanine bei wirbellosen Tieren (Tomlinson und Wright, 1996; Todres et al., 2000) kann als Hinweis auf ein frühes Auftreten dieser Proteine in der Evolution angesehen werden. Wichtige Vertreter dieser Familie, zu der auf humanen Zellen inzwischen wenigstens 27 Proteine gehören, sind

CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 (TAPA-1), CD82 (KAI1) und CD151 (PETA-3) (Hemler, 2001).

Die Tetraspanine weisen heterogene Verteilungsmuster auf. Einige kommen in variabler Expression nahezu ubiquitär im menschlichen Organismus vor (CD9, CD63, CD81, CD82), während andere auf bestimmte Gewebe beschränkt sind, beispielsweise auf B-Lymphozyten (CD37) oder auf lymphoide und myeloide Zellen (CD53) (Maecker et al., 1997). Für einige Tetraspanine ist ein Zusammenhang mit embryonalen Entwicklungsprozessen beschrieben (Andria et al., 1992). Bei vielen Tetraspaninen besteht eine Korrelation zwischen ihrer Expression und der Aktivität der Zelle, wobei einige in aktiven Zellen heraufreguliert (CD9, CD53, CD63, CD82), andere herunterreguliert werden oder mit Zellarrest assoziiert sind (CD37, CD53) (Maecker et al., 1997). In Tumorzellen werden einige Tetraspanine differenziell exprimiert. So weisen beispielsweise Melanomzelllinien in frühen Stadien eine hohe, in fortgeschrittenen Stadien hingegen eine erniedrigte Expression von CD63 auf (Hotta et al., 1988). Obwohl es sich um Zelloberflächenmoleküle handelt, ist für einzelne auch eine intrazelluläre Expression beschrieben (Azorsa et al., 1991; Kuijpers et al., 1991; Vischer und Wagner, 1993).

1.2.2 Biologie der Tetraspanine

Die Biologie der Tetraspanine scheint sehr vielfältig zu sein, wird bisher aber noch nicht ausreichend verstanden. Von zentraler Bedeutung scheint ihre Fähigkeit zur Bildung multimolekularer Komplexe zu sein. Diese bilden sie untereinander (Imai und Yoshie, 1993; Berditchevski et al., 1996) und mit anderen Oberflächenmolekülen, wie Korezeptoren (Imai und Yoshie, 1993; Imai et al., 1995), MHC-Molekülen der Klasse II (Angelisova et al., 1994; Rubinstein et al., 1996) oder Integrinen, besonders den β 1-Integrinen wie VLA-4 (Maecker et al., 1997). Ein aktuelles Modell geht von unterschiedlichen Bindungsstellen der Tetraspanine aus, über die sie zu einer spezifischen Moleküle, zum anderen andere Tetraspanine binden sollen. Die Aufgabe dieses so genannten „tetraspanin web“ soll die Bildung und Stabilisierung multimolekularer Komplexe auf der Zelloberfläche sein (Boucheix und Rubinstein, 2001).

Durch monoklonale Antikörper (mAb) gegen bestimmte Tetraspanine kommt es in verschiedenen Zellen zu einer Aktivierung des Phosphatidylinositol-Signalwegs mit Anstieg des intrazellulären Kalziums, Aktivitätssteigerung der Proteinkinase C und Tyrosinphosphorylierungen (Jennings et al., 1990; Bosca und Lazo, 1994; Anton et al., 1995). Auch ein Zusammenhang mit kleinen GTP-bindenden Proteinen konnte gezeigt werden (Seehafer und Shaw, 1991).

Durch diese Mechanismen scheinen die Tetraspanine an einigen Zellfunktionen beteiligt zu sein. So vermitteln sie die Aggregation homotyper Zellen (Boucheix et al., 1983; Masellis-Smith et al., 1990), die heterotype Adhäsion von Zellen an Gewebe und EZM (Masellis-Smith und Shaw, 1994; Behr und Schriever, 1995; Todd et al., 1996) sowie die Zellfusion von Spermium und Eizelle (Le Naour et al., 2000). Die Zellmotilität können sie sowohl inhibieren (Miyake et al., 1991b; Ikeyama et al., 1993), als auch steigern (Shaw et al., 1995), und sie sind an Veränderungen der Zellmorphologie beteiligt (Lin et al., 1992). Das Metastaseverhalten einiger Malignome korreliert mit der Expressionshöhe einzelner Tetraspanine (Ikeyama et al., 1993; Si und Hersey, 1993; Miyake et al., 1996; Claas et al., 1998). Außerdem haben Tetraspanine kostimulatorische Eigenschaften (Rasmussen et al., 1994; Tai et al., 1996), und für ihre Aktivierung durch mAb sind antiproliferative Effekte beschrieben (Oren et al., 1990).

Die biologischen und biochemischen Funktionen der Tetraspanine sind bisher nicht abschließend geklärt. Unklar ist beispielsweise noch, inwiefern die beobachteten Phänomene direkt durch Tetraspanine oder indirekt durch ihre Bindungspartner hervorgerufen werden. Auch ihre Bedeutung für maligne Zellen und die Mechanismen, welche deren Metastasierung beeinflussen, sind bisher nur partiell bekannt.

1.2.3 Tetraspanine in der Hämatopoese

Tetraspanine kommen auf allen Blutzellen mit Ausnahme der Erythrozyten (Boucheix und Rubinstein, 2001) und auch auf malignen hämatopoetischen Zellen von Patienten mit ALL, CLL und AML vor (Boucheix et al., 1991). Über die Bedeutung dieser Expression ist bisher jedoch wenig bekannt.

Ein Zusammenhang mit hämatopoetischen Prozessen wurde erstmals 1996 beschrieben. Im murinen Thymus konnte ein anti-CD81 mAb die Ausreifung von lymphoiden Progenitoren zu reifen T-Lymphozyten inhibieren (Boismenu et al., 1996). Zur gleichen Zeit konnte in Experimenten mit murinen Zellen CD9 in Zusammenhang mit myelopoetischen Prozessen gebracht werden, da ein anti-CD9 mAb bei initialer Zugabe zu Dexter Langzeitkulturen (D-LTC) die Produktion myeloider Zellen komplett blockierte und bei Zugabe zu bereits etablierten D-LTC eine gesteigerte Produktion myeloider Zellen initiierte (Oritani et al., 1996). In weiteren Untersuchungen konnte durch anti-CD9 mAb eine Suppression der Proliferation und Differenzierung multipotenter hämatopoetischer Zellen bei verstärkter Adhäsion an die Stromazellen ausgelöst werden (Aoyama et al., 1999).

Im Jahr 2001 wurde erstmals die Rolle eines Tetraspanins in der humanen Hämatopoese beschrieben. Praktisch alle hämatopoetischen Zellen exprimieren CD9, wobei gezeigt werden konnte, dass myeloide Progenitoren mit einer niedrigen Expression von CD9 und B-lymphoide und megakaryopoetische Zellen mit einer hohen Expression von CD9 assoziiert sind. Die Ligation von CD9 mit anti-CD9 mAb resultierte in einem erhöhten Gehalt megakaryozytärer Progenitoren, bei verminderter Produktion megakaryozytärer Zellen in liquiden Kulturen. Diese Effekte waren assoziiert mit erniedrigter Expression megakaryozytärer Differenzierungsantigene und mit rasterelektronenmikroskopisch nachweisbaren morphologischen Veränderungen der Zellmembran (Clay et al., 2001). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf eine Regulation der CD9 Expression während der Hämatopoese und eine Rolle dieses Moleküls in der Megakaryopoese hin. Inwiefern andere Tetraspanine in Zusammenhang mit hämatopoetischen Prozessen stehen, war bisher nicht bekannt.

1.3 CD82

1.3.1 Struktur und Vorkommen

Das Tetraspanin CD82 wurde erstmals als Leukozytenantigen R2 oder SAR2 auf Lymphozyten beschrieben (Gaugitsch et al., 1991). Unter dem Namen IA4 wurde es als Marker für Aktivierung und Differenzierung auf mononukleären Zellen beschrieben (Gil et al., 1992) und anschließend in die Klassifikation der Leukozytendifferenzierungsantigene als CD82 aufgenommen (International CD Workshop, Boston 1993). Unabhängig davon wurde es auch unter den Synonymen C33-Antigen (Imai et al., 1992), Suppressor of Tumorigenicity ST6 (Ichikawa et al., 1992), 4F9 (Nojima et al., 1993) und KAI1 (Dong et al., 1995) in der Literatur beschrieben.

CD82 zeigt den typischen Aufbau eines Tetraspanins (Abbildung 1-3) und besteht aus 267 As mit einem Molekulargewicht von 28 kDa, welches nach posttranslationalen Modifikationen in Abhängigkeit von Zelltyp und Aktivierungszustand zwischen 45 kDa und 90 kDa variiert. Das Gen zeigt variable Expression in den verschiedenen Organen (Nagira et al., 1994) bei nahezu ubiquitärem Verteilungsmuster (Dong et al., 1995).

Wie für Tetraspanine typisch, scheint CD82 auf der Zelloberfläche in multimolekulare Komplexe eingebunden zu sein. Es wurden dabei Assoziationen von CD82 mit anderen Tetraspaninen (Angelisova et al., 1994; Mannion et al., 1996; Rubinstein et al., 1996), mit MHC-Molekülen der Klasse I (Szollosi et al., 1996; Lagaudriere-Gesbert et al., 1997b) und II (Angelisova et al., 1994; Rubinstein et al., 1996; Szollosi et al., 1996),

mit den T-Lymphozytenantigenen CD4 (Imai et al., 1995) und CD8 (Imai und Yoshie, 1993) sowie mit β_1 -Integrinen (Berditchevski et al., 1996; Mannion et al., 1996; Rubinstein et al., 1996) beschrieben. Letztere sind von großer Bedeutung in der Stammzellbiologie (Arroyo et al., 1996; Hirsch et al., 1996; Zanjani et al., 1999). Inwiefern es sich bei den genannten Molekülen um direkte oder indirekte Bindungspartner handelt, ist bislang nicht eindeutig geklärt.

1.3.2 Biologie von CD82

Erste Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung von CD82 stammen aus Zellkultur-Experimenten mit immobilisierten anti-CD82 mAb (Abbildung 2-1). Jurkat-T-Zellen, eine T-lymphozytäre Zelllinie, zeigten dabei starke, lang anhaltende Adhäsion an der mAb-beschichteten Oberfläche der Plastikzellkulturschalen, morphologische Veränderungen mit Ausbildung pseudopodienartiger Zellausläufer und einen Arrest der Zellproliferation bei gesteigertem Metabolismus (Lebel-Binay et al., 1995a). Bei Adhäsion und morphologischen Veränderungen ist die Assoziation von CD82 an das Zytoskelett mit konsekutiver Aktinpolymerisation beteiligt (Lagaudriere-Gesbert et al., 1998). Eine gesteigerte Zellaggregation konnte sowohl durch den anti-CD82 mAb (Lagaudriere-Gesbert et al., 1997a) als auch durch eine Überexpression von CD82 (Shibagaki et al., 1998) ausgelöst werden. Letztere steht auch in Zusammenhang mit einer verstärkten LFA-1/ICAM-1-vermittelten Zelladhäsion (Shibagaki et al., 1999). Diese Ergebnisse machen die proadhäsiven Eigenschaften von CD82 deutlich. Da Zelladhäsion von fundamentaler Bedeutung für die Regulation der Hämatopoese ist (Prosper und Verfaillie, 2001), wäre eine funktionelle Beteiligung von CD82 in der Hämatopoese denkbar.

In einigen dieser Experimente wurde außerdem festgestellt, dass der anti-CD82 mAb ein kostimulatorisches Signal für die CD3-vermittelte T-Zellaktivierung darstellt und zu einer gesteigerten Synthese der Zytokine Interleukin-2 und Interferon-gamma führt (Lebel-Binay et al., 1995a; Lagaudriere-Gesbert et al., 1997a). Im Gegensatz zu den adhäsiven Eigenschaften, setzt dies jedoch die Anwesenheit eines anti-CD3 mAb voraus, der das Erstsinal bei der T-Zellaktivierung erbringt.

Die Untersuchung intrazellulärer Vorgänge bei Ligation des anti-CD82 mAb zeigte eine Aktivitätssteigerung der Phospholipase C (PLC) mit daraus resultierendem Anstieg von Inositoltrisphosphat (IP_3) und konsekutiver Erhöhung der freien, intrazellulären Kalziumkonzentration (Lebel-Binay et al., 1995b). Zusätzlich kam es zu Tyrosinphosphorylierungen unterschiedlicher Proteine (Lebel-Binay et al., 1995b). Beides kann als Hinweis für eine CD82-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion gedeutet werden.

Unabhängig von diesen Forschungsergebnissen wurde unter dem Namen KAI1 eine inhibierende Wirkung von CD82 auf die Metastasierung verschiedener Tumoren beschrieben. Es gibt eine Gruppe von Genen, welche die Metastasierung von Tumoren unterdrücken, ohne deren proliferative Eigenschaften zu beeinflussen. Sie werden als Metastasensuppressorgene bezeichnet (Ichikawa et al., 1991; Rinker-Schaeffer et al., 1994). Als ein solches wurde CD82 unter dem Synonym KAI1 bei verschiedenen Karzinomen (Ca) beschrieben, erstmals beim Prostata-Ca (Dong et al., 1995). Weitere Untersuchungen zeigten konsistent einen Verlust von CD82 bei der Progression des humanen Prostata-Ca, der nicht auf Mutationen oder Allelverlust des Gens zurückzuführen war (Dong et al., 1996). Analoge Ergebnisse konnten in der Folgezeit auch für das Pankreas-Ca (Guo et al., 1996), das nicht-kleinzellige Bronchial-Ca (Adachi et al., 1996), das Mamma-Ca (Huang et al., 1998; Yang et al., 2001), das Harnblasen-Ca (Yu et al., 1997), das hepatozelluläre Ca (Guo et al., 1998), das Melanom (Takaoka et al., 1998a), das kolorektale Ca (Takaoka et al., 1998b; Lombardi et al., 1999; Hashida et al., 2003), das Plattenepithel-Ca des Ösophagus (Uchida et al., 1999; Miyazaki et al., 2000) und für verschiedene humane Tumorzelllinien (White et al., 1998) gezeigt werden.

Eine mögliche Erklärung für diese Metastasensuppression sind die adhäsiven Eigenschaften von CD82. Es gibt jedoch auch Hinweise auf intrazelluläre Mechanismen. So besitzt CD82 eine Bindungsstelle für p53 (Mashimo et al., 1998), ein häufig bei humanen Tumoren inaktiviertes Tumorsuppressorgen (Hainaut et al., 1998), obwohl es keinen direkten Einfluss des p53-Status auf die CD82-Expression zu geben scheint (Duriez et al., 2000; Jackson et al., 2002; Uzawa et al., 2002). Auch ein zumindest indirekter Einfluss des Transkriptionsfaktors NFκB auf die CD82-Expression wird diskutiert (Shinohara et al., 2001). Letztendlich sind die molekularen Mechanismen aber noch immer unklar. Ihr Verständnis wäre eine wichtige Voraussetzung, um potentielle therapeutische Ansätze oder klinische Einsatzmöglichkeiten zu finden.

1.3.3 CD82 in der Hämatopoese

Bereits die Erstbeschreibungen von CD82 erfolgten in lymphatischen Zellen (Gaugitsch et al., 1991; Gil et al., 1992; Imai et al., 1992), und bald wurde eine differenzielle Expression von CD82 auf reifen Blutzellen beschrieben (Lebel-Binay et al., 1994). Erst später erfolgte eine systematische Untersuchung der Blutzellen einschließlich früher hämatopoetischer und leukämischer Zellen (Burchert et al., 1999). Dabei zeigte sich bei myeloiden Zellen eine stärkere CD82-Expression als bei lymphoiden Zellen. Eine sehr hohe CD82-Expression fand sich bei normalen CD34⁺ PBPC, aber auch bei Leukämie-

zellen, besonders von Patienten mit AML, CML und CLL (Burchert et al., 1999). Die Bedeutung dieser Expression in der Hämatopoese im Vergleich zu Leukämiezellen ist bisher nicht bekannt, eine Aufklärung könnte aber möglicherweise zum weiteren Verständnis der Stammzellbiologie und der Leukämien sowie zur Entwicklung therapeutischer Ansätze beitragen.

Nahezu alle gesunden $CD34^+$, $CD38^-$, Lin^- , $CD90^+$ hämatopoetischen Zellen exprimieren stark CD82, wobei es mit der Ausreifung der Zellen zu einem Verlust von CD82 kommt (Burchert et al., 1999). CD82 ist also ein bereits auf primitiven hämatopoetischen Zellen exprimiertes Antigen. Außerdem exprimieren auch Stromazellen des KM CD82 (Burchert et al, bisher unveröffentlicht).

Bisher ist kein natürlicher Ligand für CD82 bekannt. Basierend auf den Berichten über die verschiedenen Effekte des anti-CD82 mAb auf Jurkat-T-Zellen (Lebel-Binay et al., 1995a, 1995b; Lagaudriere-Gesbert et al., 1998) wurde postuliert, dass der anti-CD82 mAb als Ersatzligand für CD82 dienen kann. Auch andere Studien haben gezeigt, dass mAb ein probates Mittel sind, um bei unbekanntem natürlichem Liganden die Effekte potentieller Interaktionspartner nachzuahmen und so neue Aspekte der Bedeutung von Molekülen in der normalen und malignen Hämatopoese aufzudecken (Francis et al., 1998; Zannettino et al., 1998; Levesque et al., 1999).

Analoge Versuche zu den Untersuchungen an Jurkat-T-Zellen wurden in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (Burchert et al., bisher unveröffentlicht). Bei Kultur auf immobilisierten anti-CD82 mAb zeigen $CD34^+$ PBPC im Gegensatz zur Kontrolle deutliche Adhäsion und morphologische Veränderungen in Form pseudopodienartiger Zellausläufer. Es konnte gezeigt werden, dass diese Phänomene spezifisch für CD82 und den eingesetzten anti-CD82 mAb sind. Als ursächlich für die Morphologieveränderungen wurde eine Umstrukturierung des Zytoskeletts nachgewiesen. Zusätzlich kommt es zur Phosphorylierung eines etwa 33kDa schweren Proteins, was als Hinweis für eine CD82-spezifische intrazelluläre Signaltransduktion gedeutet werden kann.

Ein anderer Ansatz konzentrierte sich auf die funktionelle Untersuchung der Myelopoese mittels Dexter-Langzeitkultur (D-LTC). Diese dienen als in vitro Modell myelopoetischer Prozesse, also der Ausreifung myeloischer Vorläuferzellen (Dexter et al., 1977; Eaves et al., 1991; Mayani und Lansdorp, 1998). Die Zugabe des anti-CD82 mAb zu D-LTC resultierte im Vergleich zu murinem Isotyp mAb und antikörperfreier Kultur in einer signifikant inhibierten Myelopoese.

1.4 Fragestellung

Auf der Basis der in der Einleitung dargestellten Ergebnisse sollte die Rolle von CD82 und die Bedeutung des spezifischen monoklonalen CD82-Antikörpers in der normalen und malignen Hämatopoese systematisch weiter untersucht werden.

Vor diesem Hintergrund ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. *Da CD82 bei normalen CD34⁺ Zellen Adhäsion und Veränderungen der Morphologie mediiert und Leukämiezellen CD82 exprimieren, soll geklärt werden, ob diese Phänomene auch bei Leukämiezellen beobachtet werden können.*

2. *Vor dem Hintergrund der CD82-vermittelten Zelladhäsion stellt sich die Frage, ob es bei normalen CD34⁺ Zellen während dieser Vorgänge zu einer veränderten Expression bestimmter Zelloberflächenmoleküle kommt und ob Leukämiezellen analoge Veränderungen aufweisen.*

3. *In Anbetracht einer möglichen intrazellulären Signaltransduktion soll untersucht werden, ob die Ligandierung von CD82 zu einer veränderten Genexpression in normalen CD34⁺ Zellen führt und inwiefern diese Veränderungen auch bei Leukämiezellen auftreten.*

4. *Zur Untersuchung einer möglichen funktionellen Bedeutung von CD82 in der frühen Hämatopoese soll geklärt werden, ob der CD82-spezifische Antikörper einen Einfluss auf den Erhalt normaler primitiver hämatopoetischer Zellen in LTC-IC-Kulturen hat.*

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die folgenden Methoden sind Standardmethoden in der Molekularbiologie und wurden anhand der „Current Protocols in Human Genetics“ (Dracopoli et al., 1994) und der „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1994) durchgeführt. Die Verwendung von Kits erfolgte – soweit nicht anders beschrieben – nach Anleitung des Herstellers. Diese Techniken werden daher hier einzeln aufgeführt, nicht aber detailliert beschrieben.

- Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) aus Zelllinien, primären humanen CD34⁺ PBPC und primären humanen Leukämiezellen mittels QIAmp (QIAGEN, Hilden, Deutschland)
- fotometrische RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
- Synthese komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT; Superscript, Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland)
- Polymerasekettenreaktion (PCR) mittels des Enzyms Taq-Polymerase (AmpliTaq, Applied Biosystems, Foster City, USA) in einem „Gene Amp PCR System 9600“ Thermocycler (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)
- Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese
- Visualisierung aufgetrennter DNA-Fragmente mittels Ethidiumbromid

2.2 Patientenproben

Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurden unterschiedliche Zellen verschiedener Personen untersucht. Die Asservation erfolgte mit Zustimmung der über die Verwendung des Materials aufgeklärten Patienten und nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission.

Für die Untersuchung der CD82-Funktionalität in malignen Blutzellen wurden 10 Blut- sowie 3 Knochenmarksproben von 13 Patienten mit AML verwendet. Einschlusskriterien waren eine ausreichend große Population maligner Zellen in der zu untersuchenden Probe und die Expression von CD82 auf der Oberfläche der malignen Zellen. Aus den Proben wurden mittels Ficoll Paque Dichtegradient (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) die mononukleären Zellen (MNC) isoliert. Bei ausreichender Zellzahl und

Expression von CD34 wurde die leukämische Fraktion durch magnetische Zellsortierung (MACS) zusätzlich angereichert. Dazu wurden ein MidiMACS-Zellseparator, LS⁺-MACS-Säulen und das Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit entsprechend den Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Die durchflusszytometrisch ermittelten Reinheiten der CD34⁺ Zellpopulationen lagen bei 97-99%.

Für die Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion in gesunden CD34⁺ PBPC wurden Reste allogener Transplantationen peripherer Stammzellen verwendet. Nach Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark der Spender durch mehrtägige Gabe von G-CSF, waren diese Transplantate durch Blutabnahme und anschließende Leukapherese gewonnen worden. Bei der Leukapherese handelt es sich um ein maschinelles Verfahren, bei dem das Blut durch Zentrifugation aufgetrennt und dann die Leukozytenschicht abgesaugt wird. Für die experimentellen Untersuchungen wurden die CD34⁺ PBPC mittels MACS zu durchflusszytometrisch ermittelten Reinheiten von 97-99% angereichert.

Für die Durchführung der LTC-IC-Kulturen wurden 6 Knochenmark-Spongiosa-Proben aus dem proximalen Femurschaft von hämatologisch gesunden Patienten verwendet. Alle Proben waren Exzidate orthopädischer Hüftoperationen (Kalla et al., 1991). Die Spongiosa-Proben wurden manuell unter sterilen Bedingungen zerkleinert und die Blutzellen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; Biochrom KG, Berlin, Deutschland) herausgespült. Mittels Ficoll Paque Dichtegradient wurden die MNC isoliert.

2.3 Zellkultur und Zelllinien

Neben den in Abschnitt 2.2 aufgeführten primären humanen Zellen wurden für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellexperimente auch KG1a-Zellen verwendet. Es handelt sich dabei um eine Zelllinie primitiver CD34 und CD82 exprimierender myeloider Zellen, welche die Eigenschaften einer AML aufweisen, sich aber ursprünglich aus einer Erythroleukämie entwickelt haben (Koeffler und Golde, 1980). Die Zelllinie wurde von der Deutschen Gesellschaft für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) erworben.

Die Bedingungen unter denen die Zellen kultiviert wurden, variierten in Abhängigkeit vom Zelltyp. Die primären humanen Zellen der Patienten mit AML wurden in RPMI-1640-Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS; beides Gibco-BRL), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) kultiviert.

Die primären humanen CD34⁺ PBPC wurden in StemSpan SFEM Medium (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) mit 10% FCS kultiviert. Die KG1a-Zelllinie wurde in RPMI-1640-Medium mit 20% FCS, 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Kulturbedingungen der Knochenmark-Spongiosazellen sind in Abschnitt 2.9.2 beschrieben. Zellzahlen wurden mittels Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

Adhärente Zellen wurden durch zehnmünütige Inkubation mit 40 µl Trypsin bei 37 °C abgelöst, die Trypsinwirkung anschließend durch Zugabe von 10 µl FCS abgestoppt und die Zellen in PBS resuspendiert.

Alle hier beschriebenen Zellen wurden bei 37 °C in einer humidifizierten und 5% CO₂ enthaltenden Inkubatoratmosphäre kultiviert.

2.4 Antikörper

Alle durchgeführten Experimente basieren auf dem Modell einer CD82-Ligation durch den spezifischen anti-CD82 mAb des Klons 50F11 (#555905; PharMingen, San Diego, CA, USA). Als Isotyp-Kontrolle diente ein muriner IgG₁ mAb (#MAB002; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Die mAb wurden entweder auf einer Plastikoberfläche immobilisiert, ein Vorgang der als „panning“ bezeichnet wird, oder befanden sich in Suspension (Abbildung 2-1). Die Durchführung der Antikörper-Immobilisation ist in Abschnitt 2.5 beschrieben.

Die zu durchflusszytometrischen Untersuchungen eingesetzten und mit Fluoreszenzfarbstoff markierten mAb sind in Abschnitt 2.6.2 aufgeführt (Tabelle 2-1).

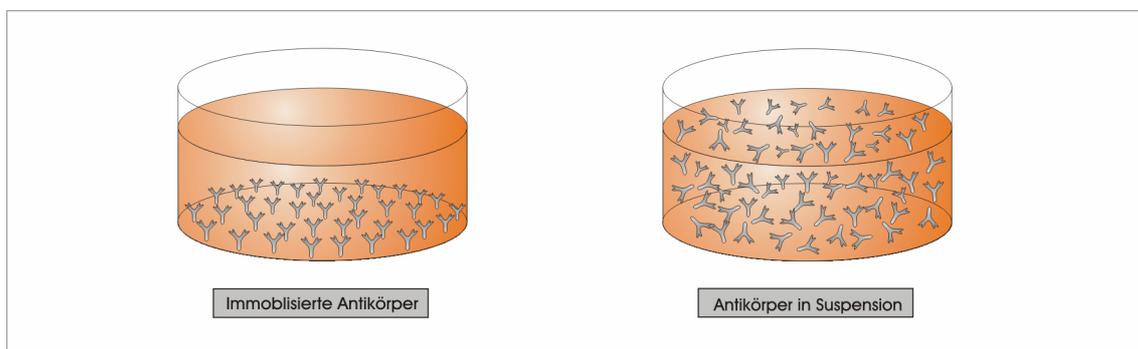


Abbildung 2-1 Antikörper nach Immobilisation oder in Suspension. Antikörper können auf Plastikoberflächen immobilisiert werden, was als „panning“ bezeichnet wird. Alternativ kann die Zugabe der Antikörper als Suspension im Kulturmedium erfolgen.

2.5 Zelladhäsionskultur

Um zu untersuchen, inwiefern die bei CD34⁺ PBPC durch den anti-CD82 mAb induzierten Veränderungen von Adhäsion und Zellmorphologie auch bei primären humanen Leukämiezellen zu beobachten sind, wurden CD34⁺ PBPC und Leukämiezellen von Patienten mit AML auf immobilisierten anti-CD82 mAb und Isotyp mAb kultiviert.

Anti-CD82 mAb und Isotyp mAb wurden in einem 2-Kammer-Kultursystem (Permax; Nunc, Wiesbaden, Deutschland) immobilisiert. Dazu wurden die Antikörper in PBS mit einer Konzentration von 20 µg/ml gelöst, je 600 µl der Suspension in die entsprechenden Kammern gegeben und für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Da Proteine die Eigenschaft haben, an Kunststoff zu binden, kommt es während dieser Zeit zur Fixierung der Antikörper auf dem Boden der Kammer. Anschließend wurden die Kammern mit einer Blockierungslösung aus PBS und 0,5% bovinem Serumalbumin (BSA; Sigma, St.Louis, MO, USA) aufgefüllt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um durch das BSA spätere unspezifische Bindungen der Antikörper zu verringern. Danach wurden die Kammern zweimal mit dem entsprechenden Kulturmedium gewaschen, StemSpan Medium (mit FCS) für CD34⁺ PBPC und RPMI-1640-Medium (mit FCS) für AML- und KG1a-Zellen. Es wurden 1x10⁶ Zellen pro Kammer zugegeben und unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Für jedes Experiment wurden drei Kammern mit immobilisierten anti-CD82 mAb und drei mit immobilisierten Isotyp mAb generiert. Abgesehen von den mAb, herrschten für alle Zellen zu jeder Zeit des Experimentes die gleichen Bedingungen (Abbildung 2-2).

Zur Beurteilung von Adhäsion und Morphologieveränderungen wurden die nicht-adhärenenten Zellen nach vier Tagen entfernt und vier repräsentative mikroskopische Blickfelder ausgewählt. Diese wurden mittels eines Phasenkontrastmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland) und einer damit verbundenen digitalen Kamera (Coolpix 950; Nikon, Melville, NY, USA) fotografisch dokumentiert. Die Blickfelder wurden visuell ausgezählt. Dabei wurde auch die Zahl nicht-sphärischer, also morphologisch veränderter Zellen registriert.

Zur Bestimmung der Adhäsion wurde zunächst das arithmetische Mittel der vier Blickfelder des entsprechenden Antikörpers gebildet und anschließend die Zahl der adhärenenten Leukämiezellen auf die Zahl der adhärenenten CD34⁺ PBPC bezogen. Die Adhäsion wird somit als Relation zweier Zellpopulationen angegeben.

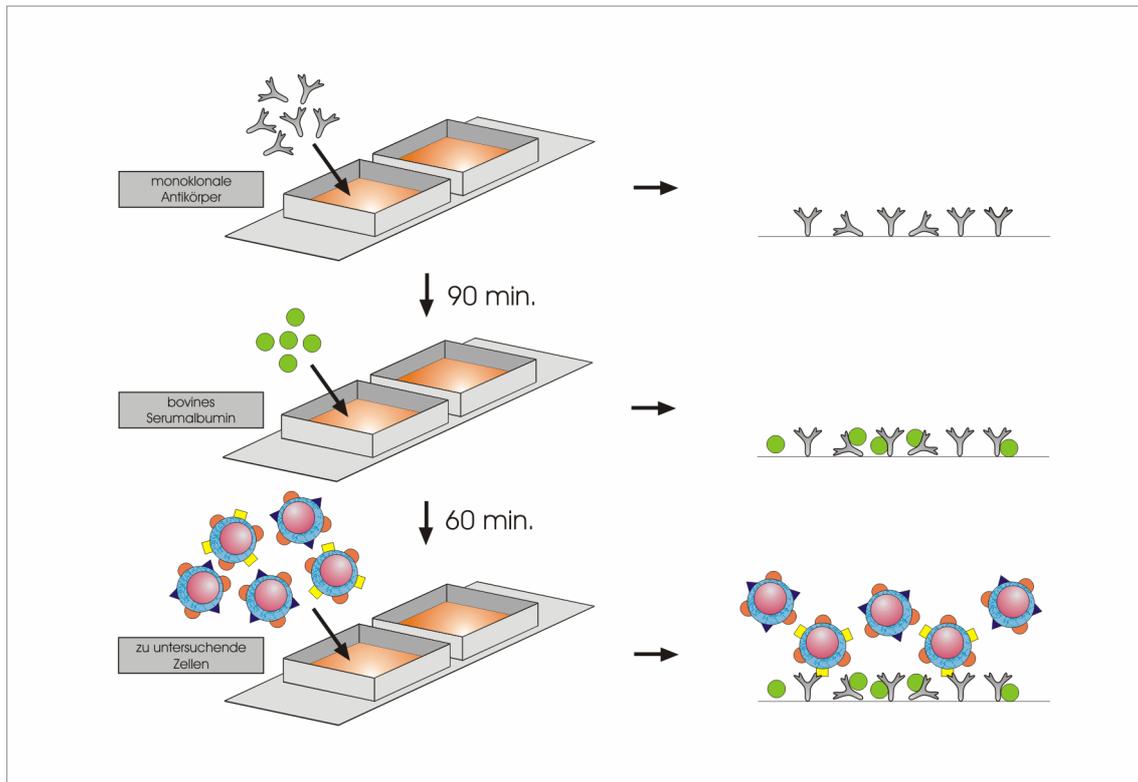


Abbildung 2-2 Schema der Zelladhäsionskultur. In einem 2-Kammer-Zellcultursystem werden monoklonale Antikörper immobilisiert. Durch Zugabe von bovines Serumalbumin sollen unspezifische Bindungen minimiert werden. Die mAb sollen ortständige Bindungspartner imitieren, mit denen bestimmte Zellen über spezifische Oberflächenantigene interagieren können.

Zur Bestimmung der Morphologieveränderungen wurde zunächst die Zahl der morphologisch veränderten Zellen auf die Gesamtzahl der adhären Zellen der entsprechenden Kammer bezogen und anschließend das arithmetische Mittel der vier Relationen des entsprechenden Antikörpers gebildet. Die Morphologieveränderungen werden somit als Relation innerhalb einer Zellpopulation angegeben.

Adhärenz und nicht-adhärenz Zellen wurden für durchflusszytometrische (Abschnitt 2.6) oder molekularbiologische Untersuchungen (Abschnitte 2.7 und 2.8) weiterverwendet.

2.6 Durchflusszytometrie

2.6.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie (Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse, FACS) ist ein Verfahren, welches eine Quantifizierung der Expression von Zelloberflächenmolekülen erlaubt. Grundlage der Methode ist die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion von Fluoreszenz-markierten Antikörpern mit dem zu untersuchenden Protein (Abbildung 2-3).

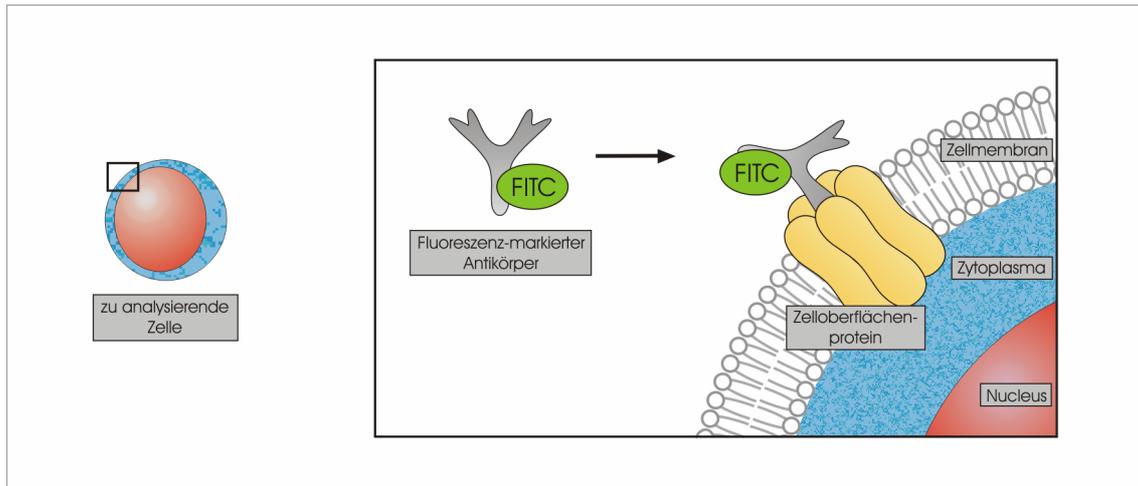


Abbildung 2-3 Identifizierung von Zelloberflächenproteinen durch Fluoreszenz-markierte Antikörper. Mit den Fluorochromen PE oder FITC markierte monoklonale Antikörper binden an spezifische Zelloberflächenantigene. Die Intensität der Fluoreszenz einer Zelle korreliert danach mit der Expression des entsprechenden Antigens.

Die Methode beruht auf der Kombination zweier Messverfahren: Messung der Streuung eines Laserstrahles und der Fluoreszenz angeregter Farbstoffe. Durch Messung der Lichtstreuung können morphologische Kriterien der Zellen analysiert werden. Die Vorwärtsstreuung (engl. forward scatter = FSC) korreliert mit der Zellgröße, die Seitwärtsstreuung (engl. side scatter = SSC) korreliert mit der Granularität der Zellen. Durch Messung der Fluoreszenz kann die Beladung der Zellen mit spezifischen Antikörpern und damit die Expression der entsprechenden Zelloberflächenmoleküle quantifiziert werden.

Im Durchflusszytometer werden die zu analysierenden Zellen als Probenstrom mit Überdruck in eine Quarzküvette eingebracht, wo sie mittels hydrodynamischer Fokussierung durch den ständigen Fluss einer Trägerflüssigkeit (Hüllstrom) einzeln im Zentrum des Probenstroms aufgereiht werden. Auf diese Weise werden die Zellen einzeln an einem gebündelten Argon-Laserstrahl mit der Wellenlänge von 488 nm vorbeigeführt. Der Laserimpuls bedingt eine Exzitation des Fluoreszenzfarbstoffs (Fluorochrom), die nach Beendigung des Impulses zur Emission von Photonen mit einem für den Farbstoff charakteristischen Wellenlängenspektrum führt. Die Maxima der Spektren für die im Rahmen dieser Experimente eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe liegen bei 519 nm (gelb-grün) für Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) und bei 587 nm (rot-orange) für Phycoerythrin (PE). Gestreutes Licht und emittierte Fluoreszenzspektren werden im Durchflusszytometer durch Spiegel- und Filtersysteme aufgetrennt, von Detektoren mit integrierten Photomultipliern (PMT) in elektrische Impulse umgewandelt und gleichzei-

tig verstärkt und dann zur quantitativen Auswertung an einen Computer weitergeleitet (Abbildung 2-4)

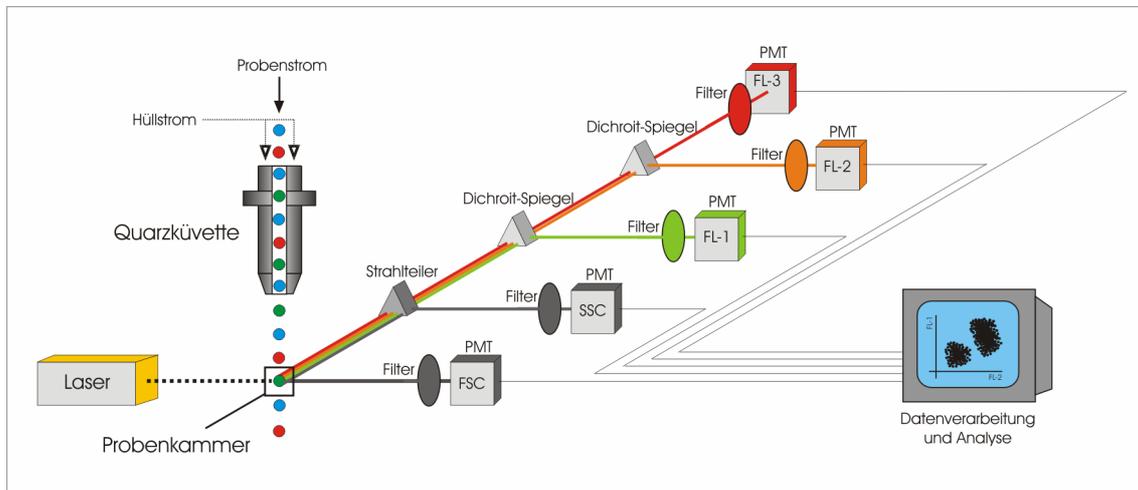


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers. Die zu analysierenden Zellen kommen als Probenstrom in eine Quarzküvette, wo sie durch den Hüllstrom einer Trägerflüssigkeit einzeln zentral aufgereiht werden. Die Zellen treffen auf einen Laserstrahl, dessen Licht gestreut wird und der die Fluoreszenzfarbstoffe anregt. Das Streulicht und die emittierten Fluoreszenzen werden durch Spiegel- und Filtersysteme zu nachgeschalteten Detektoren mit Photomultipliern (PMT) als Verstärkern weitergeleitet. Diese wandeln die Fluoreszenz- und Streulichtsignale in elektrische Impulse um und senden diese zur Auswertung an einen Computer.

Bei der elektronischen Auswertung der Rohdaten können alle erfassten Parameter gegeneinander aufgetragen werden. In der Regel werden die Zellen zunächst in Form einer Verteilung der morphologischen Parameter (FSC, SSC) dargestellt. Durch Setzen eines elektronischen „gates“ können einzelne Zellpopulationen zur weiteren Analyse selektiert werden (Abbildung 2-5, A).

Um bei der Messung der Fluoreszenz zwischen positiven Ergebnissen (Fluoreszenz-markierte Zelle) und Hintergrundfärbung (Eigenfluoreszenz, unspezifische Bindungen) zu differenzieren, werden murine Fluoreszenz-markierte mAb als Isotyp-Kontrollen eingesetzt. Die Auswertung der Fluoreszenz kann mit Hilfe eines Quadrantenkreuzes erfolgen, welches so positioniert wird, dass die Zellen der Isotyp-Kontrolle alle im linken unteren Quadranten dargestellt werden. Für die Testzellen kann der Computer die prozentuale Verteilung auf die Quadranten berechnen (Abbildung 2-5, B). Eine genauere Quantifizierung ermöglicht die Darstellung als Histogramm, bei der die Fluoreszenzintensität gegen die absolute Zellzahl aufgetragen wird (Abbildung 2-5, C).

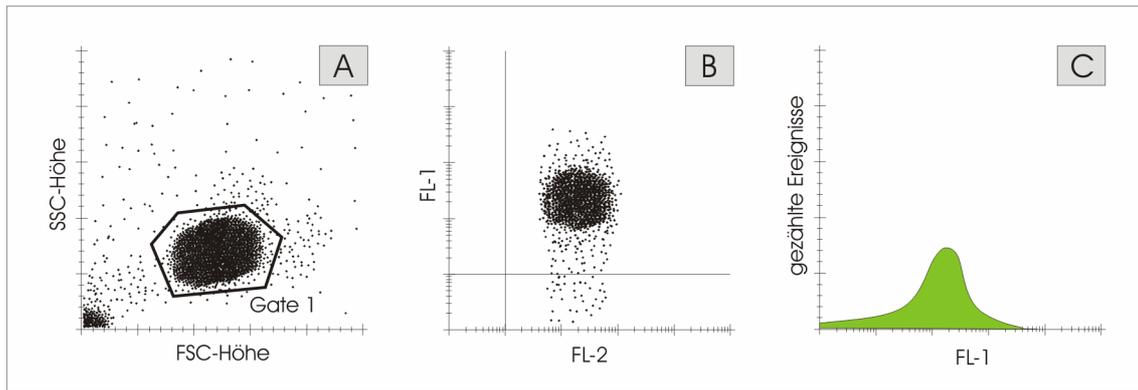


Abbildung 2-5 Exemplarische Auswertung einer durchflusszytometrischen Analyse. Bild A zeigt eine Verteilung der Zellen auf Grund ihrer morphologischen Parameter (FSC, SCC). Es ist nur eine Zellpopulation dargestellt, die durch das elektronische gate 1 zur weiteren Auswertung selektiert wird. Zelltrümmer befinden sich in der linken unteren Ecke. Bild B zeigt die Verteilung der selektierten Zellen für die Fluoreszenzparameter FL-1 und FL-2. Bild C zeigt eine Histogramm-Auswertung der selektierten Zellen, bei der die Fluoreszenzintensität gegen die absolute Zellzahl aufgetragen wird. Diese Darstellung ermöglicht eine relativ gute Quantifizierung der Fluoreszenz pro Zelle bzw. innerhalb der Zellpopulation.

Per Computer können aus diesen Rohdaten statistische Kenngrößen ermittelt werden. Ein wichtiges Maß für die Anzahl der gebundenen, Fluoreszenz-markierten mAb und damit für die Expression des entsprechenden Zelloberflächenmoleküls stellt dabei die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dar.

2.6.2 Durchführung

Die für vier Tage auf immobilisierten mAb kultivierten Zellen (Abschnitt 2.5) wurden mit PBS resuspendiert. In 12x15 mm Polystyren-FACS-Röhrchen (Falcon, Lincoln Park, NJ, USA) wurden jeweils 5×10^5 Zellen gegeben und mit 3 ml FACS-Puffer (PBS mit 0,5% BSA) gewaschen. Die Zellen wurden mit jeweils 10 μ l eines direkt PE- und eines direkt FITC-markierten mAb (Tabelle 2-1) unter standardisierten Bedingungen bei 4 °C für 20 Minuten inkubiert. Humanes IgG (Sigma) war der Suspension in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und dann in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml resuspendiert.

Die Auswertung erfolgte mittels eines FACScan Durchflusszytometers (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) unter Verwendung der CellQuest Analyse-Software (Becton Dickinson).

Tabelle 2-1 Durchflusszytometrisch untersuchte Oberflächenantigene und verwendete Antikörper.

HLDA-Workshop ^a			Swiss-Prot ^c	Antikörper		
Antigen	Sektion	Zelltypen ^b		Hersteller ^d	Best-Nr	FL
CD1a	T-Lymphoid	T,B,M	P06126	PharMingen	555806	FITC
CD4	T-Lymphoid	T,M	P01730	PharMingen	30154X	FITC
CD9	Plättchen	T,B,M,G,P	P21926	Immunotech	1755	FITC
CD11a (LFA-1)	Adhäsion	T,B,NK,M,G	P20701	PharMingen	30424X	FITC
CD13	Myeloid	S,M,G	P15144	Immunotech	0778	FITC
CD14	Myeloid	M,G	P08571	Immunotech	0650	PE
CD15	Kohlenhydrat	M,G	-	Immunotech	1423	FITC
CD29 (VLA-4 β)	Adhäsion	T,B,NK,M,G,P	P05556	Immunotech	0791	FITC
CD33	Myeloid	S,M,G	P20138	Immunotech	1179	PE
CD34	Adhäsion	S	P28906	BD	348057	PE
CD40	B-Lymphoid	B,D,S,M	P25942	PharMingen	555589	PE
CD49d (VLA-4a)	Adhäsion	T,B,D,NK,S,M	P13612	Immunotech	1404	FITC
CD54 (ICAM-1)	Adhäsion	T,B,M	P05362	Immunotech	1239	PE
CD58 (LFA-3)	Adhäsion	T,B,D,NK,M,G,E	P19256	Immunotech	1430	PE
CD62L (L-Selektin)	Adhäsion	T,B,NK,M,G	P14151	Immunotech	1231	FITC
CD82	B-Lymphoid	T,B,NK,S,M,G,P	P27701	RDI	50FT	FITC
CD86	B-Lymphoid	T,B,D,M	P42081	Immunotech	2729	PE
CD117 (c-kit)	Zytokin	S	P10721	Immunotech	1360	PE
HLA-DR	-		-	BD	347367	PE
IgG ₁ /IgG ₂ Isotyp	-	Kontrolle	-	BD	340041	-

Best-Nr, Bestellnummer; HLDA, Humane Leukozytendifferenzierungsantigene; FL, Fluoreszenzfarbstoff

- a Die vollständigen Ergebnisse des 7. HLDA-Workshops sind in „Leucocyte Typing VII“ veröffentlicht (Mason et al., 2002). Weitere molekulare oder funktionelle Details sind auf der Homepage „Protein Reviews on the Web“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/>) zusammengetragen (Shaw et al., 1998).
- b Angabe der Zelltypen, die das entsprechende Antigen exprimieren: T, T-Lymphozyten; B, B-Lymphozyten; D, dendritische Zellen; NK, natürliche Killerzellen; S, hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen; M, Monozyten und Makrophagen; G, Granulozyten; P, Thrombozyten; E, Erythrozyten
- c Spezifische Informationen über die einzelnen Antigene einschließlich der entsprechenden Referenzen können der Swiss-Prot Datenbank im Internet (<http://www.expasy.ch/sprot/>) entnommen werden (Bairoch und Boeckmann, 1992).
- d BD, Becton Dickinson; Immunotech (jetzt Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA); PharMingen; RDI, Research Diagnostics Inc (Flanders, NJ, USA)

2.7 Zellstimulation für cDNA-Array-Analyse

Ein cDNA-Expressions-Array ist ein molekularbiologisches Verfahren zur simultanen Analyse der Expression vieler hundert Gene (Skena et al., 1995). Für das hier beschriebene Experiment wurde ein AtlasTM 1.2 human cDNA Expressions Array (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) eingesetzt, mit dem 1176 Gene mit Schlüsselrollen in vielen verschiedenen biologischen Prozessen parallel analysiert werden. Diese Methode wurde eingesetzt, um aus dem Vergleich der Genexpression anti-CD82 mAb stimulierter Zellen mit der Genexpression der Isotyp-Kontrolle, Hinweise für eine intrazelluläre Signaltransduktion mit differenzieller Genexpression zu erhalten.

Für das Experiment wurden primäre CD34⁺ PBPC eingesetzt. Aus 3x10⁶ Zellen wurde direkt RNA extrahiert. Analog zur Zelladhäsionskultur (Abschnitt 2.5) wurden in 6 Kammern eines 2-Kammer-Kultursystem der anti-CD82 mAb und in 6 Kammern der Isotyp mAb immobilisiert. In jede Kammer wurden 1x10⁶ Zellen gegeben und unter Standardbedingungen (Abschnitt 2.3) kultiviert. Aus je 3 Kammern jedes Antikörpers wurden nach 48 und 96 Stunden die Zellen entnommen und daraus RNA extrahiert. Die insgesamt fünf RNA-Proben wurden zur Durchführung der cDNA-Array-Analyse eingesetzt.

Da die Array-Analyse ein kompliziertes Verfahren darstellt und spezielles Equipment zur Fluoreszenzdetektion erfordert, wurde die Durchführung freundlicherweise von Herrn PD Dr. Stefan Wölfl (Klinik für Innere Medizin, Jena, Deutschland) übernommen, der sich auf dieses Verfahren spezialisiert hat. Er führte den cDNA-Expressions-Array entsprechend den Angaben des Herstellers durch.

2.8 Kontrolle der Ergebnisse der cDNA-Array-Analyse

Aus den im cDNA-Expressions-Array ermittelten Daten wurden 13 Gene pragmatisch ausgewählt, die einerseits im Kontext der bisherigen Beobachtungen interessant erschienen und andererseits deutliche Unterschiede zwischen den auf anti-CD82 mAb kultivierten Zellen und der Isotyp-Kontrolle zeigten. Für die Gene wurden mittels der DNA-Sequenz-Analysesoftware Lasergene (DNASTAR, Madison, WI, USA) Primer entworfen und diese anschließend durch ein kommerzielles Syntheselabor (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland) generiert (Tabelle 2-2). Für jedes Primerpaar wurde eine geeignete PCR unter folgenden Bedingungen etabliert: Zugabe der Proben bei 80 °C, Denaturierung für 2,5 min. bei 94 °C, variable Zahl an Zyklen von jeweils 30 sek. 94 °C - T_{Annealing} - 72 °C und abschließend 94 °C für 30 sek. und 60 °C für 5 min. Zum Ausschluss von Artefakten durch unterschiedlichen cDNA-Gehalt der Proben wurden RT-PCR mit dem „Housekeeping“-Gen β-Aktin durchgeführt, dessen Expression in allen Zellen relativ konstant sein soll.

Die Zellstimulation der CD34⁺ PBPC (Abschnitt 2.7) wurde mit drei weiteren, voneinander unabhängigen Proben wiederholt. Zusätzlich wurde das Experiment mit zwei Proben von Patienten mit AML und einmal mit der Zelllinie KG1a durchgeführt, um gegebenenfalls mögliche Abweichungen der Leukämiezellen in Bezug auf eine differenzielle Genexpression zu untersuchen. Da sich im cDNA-Array am zweiten Tag deutlichere Unterschiede zeigten, wurde der Ansatz auf zwei Tage beschränkt. Um zwischen

spezifischen, antikörpervermittelten und unspezifischen, adhäsionsvermittelten Phänomenen differenzieren zu können, wurden bei allen Ansätzen zusätzlich in 3 Kammern jeweils 1×10^6 Zellen mit suspendierten anti-CD82 mAb kultiviert.

Aus allen Proben wurde nach 48 Stunden RNA extrahiert. Mittels RT-PCR wurden die Array-Ergebnisse der 13 Gene an diesen Proben überprüft.

Tabelle 2-2 Untersuchte Gene und eingesetzte Primer. Zusätzlich angegeben sind die Länge des PCR-Produktes sowie die entsprechende Annealing-Temperatur.

Gen	GenBank ^a	Swiss-Prot ^b	Sequenz [5'®3']	Länge	T _{Annealing}
β-Aktin	X00351	P02570	CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT AAT CTC ATC TTG TTT TCT GCG	406 bp	60 °C
ABL-2	M35296	P42684	CCT GGT GCG AGA AAG TGA GAG TAG TTG GGT GCT GGG TAG TGT AAT GTT	210 bp	68 °C
ATM	U33841	Q13315	ACA CAG TAA AGG TTC AGC GAG AGC AAC AAA GCC GGA ATA CCC ACA TA	156 bp	67 °C
HLH 1R21	X69111	Q02535	CGG TGT GCT GCC TGT CGG AAC G GCT CGG CTG TCT GGA TGG GAA GGT	272 bp	69 °C
Hox-D3	D11117	P31249	TAC GCA CGG CAT ACA CGA G CCC TTG GCC TTC TGG TCC TTC T	181 bp	67 °C
IL-6	M14584	P05231	CCT TCG GTC CAG TTG CCT TCT TGC CTC TTT GCT GCT TTC ACA C	230 bp	62 °C
Lyn	M16038	P07948	ATT ACC AAA AGC AGG CAG ATG TGG CTT CAG GGT TTT CAC A	209 bp	65 °C
NEK-3	Z29067	P51956	CCT CGG CTA CAA CGC TTC TC CTG ATT CTG CTG GGG TTT GTT T	160 bp	66 °C
POL-A	X06745	P09884	ATT GGT AAA AGG GGC AGA TG TCA CGG GGA AGG AAG TAA AG	188 bp	64 °C
RARβ2	X07282	P10826	AGG AAT CGA TGC CAA TAC TG AGC TTT TCG GAT CTT CTC TG	173 bp	59 °C
RXRβ	M84820	P28702	CCC TTT CCA GTC ATC AGT TCT TCC TAG TGT TTG CCT GAG CTT CTG TCC	257 bp	70 °C
SSR2	M81830	P30874	TTC ATG CTG GGT CTG CCT TTC TTG TCT CCT CCA CTT GGC CGA CTT GAT	192 bp	70 °C
Stat-1	M97935	P42224	TCT CTG CCC GTT GTG GTG A CAT CGG GGC TGG CGT TAG	250 bp	65 °C
TNFα	X01394	P01375	AAG CCT GTA GCC CAT GTT GTA GC TTG AAG AGG ACC TGG GAG TAG ATG	164 bp	68 °C

a Spezifische Informationen über die Nukleinsäuresequenzen der einzelnen Gene sowie entsprechende Referenzen können der GenBank Datenbank im Internet (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>) entnommen werden (Benson et al., 2003).

b Spezifische Informationen über die Proteine, welche die einzelnen Gene kodieren sowie entsprechende Referenzen können der Swiss-Prot Datenbank im Internet (<http://www.expasy.ch/sprot/>) entnommen werden (Bairoch und Boeckmann, 1992).

2.9 Limiting-Dilution-Analyse einer LTC-IC-Kultur

2.9.1 Prinzip

Die Limiting-Dilution-Analyse (LDA) ist eine Variante der LTC-IC-Kultur zur Quantifizierung von LTC-IC (Sutherland et al., 1990). Das Prinzip der Methode beruht auf der Annahme, dass es in einer Zellsuspension zwei Arten von Zellen gibt, solche die eine bestimmte Reaktion hervorrufen können und solche die es nicht können. Da LTC-IC als die Zellen definiert wurden, die für die Anwesenheit von CFC nach fünf Wochen LTC verantwortlich sind, kann deren Frequenz durch LDA-Techniken ermittelt werden

(Sutherland et al., 1990). Entscheidend für die LDA ist eine limitierte Zahl von LTC-IC in der zur Initiation eingesetzten Zellsuspension, so dass nur einige Kulturen eine LTC-IC enthalten und dementsprechend eine positive Reaktion in Form einer CFU zeigen. Da unter standardisierten Bedingungen der CFC-Gehalt nach 5 Wochen linear mit der eingesetzten Zellzahl korreliert ist (Sutherland et al., 1990), kann durch drei unterschiedliche initial eingesetzte Zellkonzentrationen mit jeweils 20 Wiederholungen die Frequenz der LTC-IC aus der relativen Häufigkeit der negativen Kulturen mittels statistischer Verfahren berechnet werden (Taswell, 1981). Da die Häufigkeit von LTC-IC in ficollisiertem Knochenmark bei etwa 1 pro 20000 Zellen liegt, gelten initiale Zellkonzentrationen von 500 bis 20000 Zellen als günstig für die Durchführung von LDA (Sutherland et al., 1990).

In Kombination mit Manipulationen der LTC-IC-Kultur während der Inkubationszeit stellt die vergleichende Quantifizierung der LTC-IC-Häufigkeiten mittels LDA eine Möglichkeit dar, molekulare Mechanismen der Regulation frühester Ereignisse der Hämatopoese zu analysieren (Hogge et al., 1996).

2.9.2 Durchführung

Die aus dem Knochenmark gesunder Probanden isolierten MNC (Abschnitt 2.2) wurden mit einer Konzentration von 2×10^7 Zellen pro ml in α -Modification of Eagle's-Medium (α MEM; PAA Laboratories, Linz, Österreich) mit 10% FCS, 100 U/ml Penizillin und 100 μ g/ml Streptomycin in einer 250 ml Zellkulturflasche (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) bei 37 °C in einer humidifizierten und 5% CO₂ enthaltenden Inkubatoratmosphäre inkubiert. Nach 12 Stunden wurde der Überstand abgenommen, die adhären Zellen mit PBS gewaschen und weiter unter gleichen Bedingungen kultiviert. Nach einer Woche wurde der semikonfluente Zellrasen trypsiniert und in LTC Medium (MyeloCult H5100, StemCell Technologies) mit frisch zugesetztem 10^{-6} M Hydrokortison resuspendiert. In die inneren 60 6mm-Kammern zweier 96-Kammer-Flachboden-Kulturplatten (Becton Dickinson) wurden jeweils $1,25 \times 10^4$ Zellen in einem Volumen von 100 μ l gegeben, um einen Zellrasen aus Stromazellen zu generieren. Die äußeren 36 Kammern wurden mit Aqua destillata (Braun, Melsungen, Deutschland) gefüllt, um eine gleichmäßige Humidifizierung zu gewährleisten (Abbildung 2-6).

Nach der Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurden erneut MNC aus einer Knochenmarksprobe isoliert und in LTC Medium mit frisch zugesetztem 10^{-6} M Hydrokortison bei 37 °C in einer humidifizierten und 5% CO₂ enthaltenden Inkubatoratmosphäre

kultiviert. Nach 12 Stunden wurde der Überstand abgenommen und zur Initiation der LTC verwendet. Mit LTC-Medium und frisch zugesetztem 10^{-6} M Hydrokortison wurden Zellsuspensionen mit den Konzentrationen 5×10^3 , 5×10^4 und 10^5 Zellen pro ml hergestellt (bei den ersten beiden LTC-IC-Kulturen 10^4 , 10^5 und 2×10^5 Zellen pro ml). Jede Verdünnung wurde zu gleichen Teilen getrennt. Zur einen Hälfte wurde anti-CD82 mAb, zur anderen Isotyp mAb gegeben, die Konzentration der mAb betrug jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$. Aus den 60 inneren Kammern der beiden Kulturplatten mit präformiertem Zellrasen wurde das Medium entfernt und 100 μl jeder Zellsuspension auf jeweils 20 Kammern verteilt, so dass für jeden Antikörper eine Kulturplatte mit 60 Kulturen angesetzt wurde. Die Kulturplatten wurden für 4 Tage bei 37 °C und danach für 31 Tage bei 33 °C in einer humidifizierten und 5% CO_2 enthaltenden Inkubatoratmosphäre kultiviert.

An den Tagen 10, 14, 21 und 28 der LTC wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde aus jeder Kammer zunächst 40 μl des Mediums entnommen, die Kulturplatte vorsichtig geschwenkt und anschließend das restliche Medium aus dieser Kammer entnommen und mit der ersten Fraktion vereint. Die Hälfte des gesamten Mediums wurde wieder in die entsprechende Kammer zurückgegeben und danach durch neues, mit frischem 10^{-6} M Hydrokortison und entsprechendem Antikörper versetztes, LTC-Medium auf 100 μl aufgefüllt.

Am Tag 35 wurde das gesamte Medium jeder Kammer auf eine neue 96-Kammer-Platte mit U-förmigem Boden (Greiner Bio-One) überführt. Jede Kammer wurde zweimal mit 25 μl PBS gewaschen, die anschließend ebenfalls der entsprechenden Kammer der neuen 96-Kammer-Platte hinzugefügt wurden. Die adhärennten Zellen wurden durch Trypsinieren gelöst und jede Kammer wurde mit 50 μl ihres ursprünglichen Mediums aufgefüllt, um die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren bestmöglich zu resuspendieren. Die 100 μl Zellsuspension wurden dann der entsprechenden Kammer der neuen Platte hinzugefügt. Nochmals wurde jede Kammer mit 50 μl ihres ursprünglichen Mediums gespült. Die gesamten 200 μl Zellsuspension jeder Kammer wurden danach in sterile Polystyren-Röhrchen mit Deckel (Greiner Bio-One) überführt und mit RPMI-1640-Medium mit 2% FCS aufgefüllt. Die Röhrchen wurden 5 Minuten bei 4 °C und 1440 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert. Die Zellen wurden in 100 μl RPMI-1640-Medium mit 2% FCS resuspendiert.

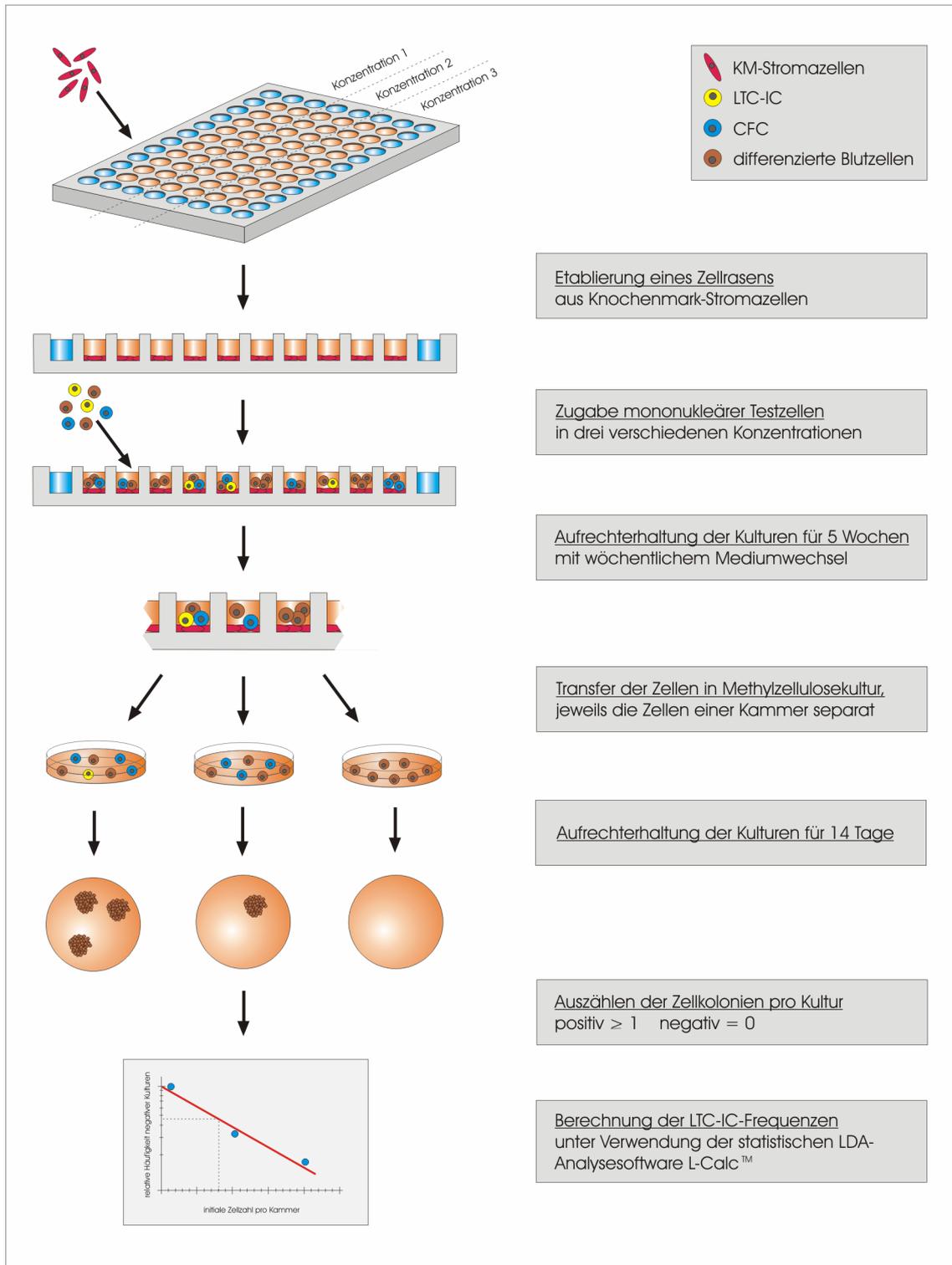


Abbildung 2-6 Schematische Darstellung einer Limiting-Dilution-Analyse. Auf die inneren 60 Kammern einer 96-Kammer-Kulturplatte werden Knochenmark-Stromazellen verteilt. Durch mehrtägige Kultur wird ein Zellrasen etabliert, auf welchen Testzellen in drei unterschiedlichen Konzentrationen gegeben werden. Die Kulturen werden für 5 Wochen aufrechterhalten und anschließend einzeln in Methylzellulose-Kulturen transferiert. Nach 14 Tagen Kultur erfolgt die mikroskopische Auswertung jeder Kulturkammer durch Detektion der enthaltenen Zellklone. Aus den ermittelten Daten können die LTC-IC-Frequenzen elektronisch berechnet werden.

Für den Ansatz der Methylzellulose-Kulturen zur Detektion der CFC wurde jeder Probe 1,1 ml Methylzellulose-Medium (MethoCult GF+ 4435, StemCell Technologies) hinzugefügt. Diese Zellsuspension jeder Kammer wurde mittels steriler 1 ml Pasteurpipetten (Greiner Bio-One) jeweils in eine sterile 35mm Gewebekulturschale (Becton Dickinson) überführt und gleichmäßig verteilt. Je sechs dieser Gewebekulturschalen mit Deckel sowie eine weitere mit Aqua destillata gefüllte Schale ohne Deckel, wurden in einer sterilen 15 cm Gewebekulturschale (Becton Dickinson) platziert.

Die 120 Proben wurden für 14 Tage bei 37 °C in einer humidifizierten und 5% CO₂ enthaltenden Inkubatoratmosphäre kultiviert. Während dieser Zeit waren den Kulturen keine Antikörper zugesetzt.

Nach 14 Tagen erfolgte die visuelle Auswertung mittels Phasenkontrastmikroskop und eines unter der Gewebekulturschale befindlichen Rasters. Jede Kultur wurde komplett durchgesehen und die Zahl der detektierten CFU jeder Kammer dokumentiert.

Während des gesamten Experimentes herrschten für alle Proben die gleichen äußeren Bedingungen. Der gesamte Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei sowohl die MNC für die Generierung des Zellrasens, als auch die zur LTC-Initiierung eingesetzten MNC jeweils aus neuem Probenmaterial gewonnen wurden.

2.10 Statistische Auswertung

Allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten statistischen Auswertungen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt.

Bei den Ergebnissen der Zelladhäsionskulturen wurden Gruppenvergleiche mittels eines zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben (nach Student) durchgeführt. Zur Untersuchung möglicher Zusammenhänge wurden Korrelationskoeffizienten für die ermittelten Ergebnisse und klinische oder laborchemische Merkmale gebildet.

Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde für jedes Antigen getrennt nach normalen CD34⁺ PBPC und Leukämiezellen ein Einstichproben-t-Test zur Überprüfung einer Abweichung des Mittelwertes der berechneten Quotienten von 0 durchgeführt. Zum Vergleich der Ergebnisse zwischen normalen CD34⁺ PBPC und Leukämiezellen wurde für jedes Antigen ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Da im Rahmen dieser Untersuchung multiple Tests durchgeführt wurden, erfolgte eine Adjustierung des p-Wertes nach Bonferroni ($\alpha' = \alpha \times \text{Anzahl der getesteten Variablen} =$

0,0032). Dabei spricht ein p-Wert $< \alpha$ für signifikante Unterschiede, aber nur bei einem p-Wert $< \alpha'$ können die Unterschiede als eindeutig signifikant klassifiziert werden.

Die LTC-IC-Kulturen wurden entsprechend einer LDA durchgeführt. Den Daten wurde eine Poisson-Verteilung zugrunde gelegt, und die Maximum-Likelihood-Methode wurde zur Parameterschätzung der $f_{\text{LTC-IC}}$ in der initialen Zellsuspension angewendet (Taswell, 1981). Dieses Verfahren ermöglicht die Berechnung der Frequenz (f), ihres Standardfehlers (SE) und daraus des 95%-KI. Zur Überprüfung der Konsistenz der experimentellen Ergebnisse mit dem Modell der LDA wurde ein χ^2 -Test durchgeführt. Dabei zeigt ein p-Wert $< \alpha$ eine Inkonsistenz mit dem Modell an und die entsprechenden Daten dürfen nicht entsprechend einer LDA ausgewertet werden. Die beiden für den jeweiligen Antikörper berechneten $f_{\text{LTC-IC}}$ einer LTC-IC-Kultur wurden in Relation zueinander gesetzt. Um zu prüfen, ob dabei ein statistisch nachweisbarer Unterschied zwischen diesen beiden $f_{\text{LTC-IC}}$ besteht, wurde ein zweiseitiger t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Alle Berechnungen für die im Rahmen der LTC-IC-Kulturen erhobenen Daten wurden mittels der zur Auswertung von LDA konzipierten Software L-Calc 1.1 (StemCell Technologies) durchgeführt. Alle Auswertungsprozeduren dieses Programms wurden mittels in der Literatur aufgeführter Zahlenbeispiele (Taswell, 1981) überprüft und auf diese Weise die Validität der Ergebnisse sichergestellt.

2.11 Software

Zur Auswertung der erhobenen Daten sowie zur Erstellung dieser Arbeit wurde folgende Software eingesetzt:

- Cell Quest
- DNASTAR Primer Select
- L-Calc 1.1
- Microsoft Office XP
- SPSS 11.5
- Corel Draw 10.0
- Sigma Plot 2001
- Adobe Photoshop Deluxe 3.1

3 ERGEBNISSE

3.1 Adhäsion und Morphologieveränderung bei CD82-Ligation

Da CD82 bei normalen CD34⁺ Zellen Adhäsion und Veränderungen der Morphologie mediiert, sollte mit dieser Arbeit geklärt werden, ob diese Phänomene auch bei CD82⁺ Leukämiezellen beobachtet werden können. Dazu wurden Proben von 13 Patienten mit AML untersucht. Klinische Daten der Patienten sowie Informationen zur AML wurden aus den Patientenakten ermittelt (Tabelle 3-1). Außerdem wurden drei Proben normaler CD34⁺ PBPC als Kontrolle untersucht.

Tabelle 3-1 Klinische Daten der untersuchten Proben von Patienten mit AML.

ID	Alter	Geschlecht	FAB	Diagnose	leukämische Population ^a			Quelle	MACS ^b
					%	CD34	CD82 ^c		
1	72 a	w	M2	Rezidiv	96	–	97,7	pB	–
2	57 a	m	M5	Rezidiv	96	–	58,7	pB	–
3	35 a	m	M1/2	de novo	80	+	+	pB	+
4	81 a	m	M1	de novo	66	+	75,2	pB	+
5	65 a	w	M5	de novo	95	–	22,4	pB	–
6	65 a	m	M4	de novo	80	–	+	pB	–
7	65 a	w	M4	de novo	60	–	22,5	pB	–
8	61 a	m	M4	Rezidiv	n.a.	–	30,8	KM	–
9	64 a	w	n.a.	n.a.	55	–	15,7	KM	–
10	59 a	m	M1	de novo	50	+	28,2	pB	+
11	68 a	w	M4	Rezidiv	n.a.	+	24,0	KM	–
12	61 a	m	M0/1	de novo	63	+	78,2	pB	+
13	63 a	m	n.a.	Rezidiv	n.a.	+	74,8	pB	+

FAB, Französisch-Amerikanisch-Britische Klassifikation der AML; ID, fortlaufende Identifikationsnummer der Patientenproben nach Eingangsdatum; KM, Knochenmark; MACS, magnetisch aktivierte Zellsortierung; n.a., nicht ermittelt; pB, peripheres Blut

- a Der prozentuale Anteil der Leukämiezellen im peripheren Blut sowie ihr Immunphänotyp wurden im Zytologischen Labor der Philipps-Universität Marburg bestimmt
- b Periphere Blutproben von Patienten mit CD34⁺ leukämischer Fraktion wurden mittels CD34-spezifischer magnetischer Antikörper zu >97% Reinheit aufgearbeitet; sonst wurden mononukleäre Zellen eingesetzt
- c Durchflusszytometrisch ermittelte Expressionshöhe von CD82 bei Diagnose; CD82⁺ bei Expression >10,0

In Analogie zu den Vorarbeiten wurden Zelladhäsionskulturen mit den primären CD82⁺ Leukämiezellen sowie normalen CD34⁺ PBPC durchgeführt. Zur Ligation wurden immobilisierte anti-CD82 mAb eingesetzt, als Kontrolle dienten immobilisierte murine Isotyp mAb.

Die Proben normaler CD34⁺ PBPC zeigten alle, entsprechend den Vorarbeiten, deutliche Adhäsion und morphologische Veränderungen in Form pseudopodienartiger Zellausläufer (Abbildung 3-1, A). Im Gegensatz dazu zeigten 9 der leukämischen Zellpopulationen deutlich weniger Adhäsion und praktisch keine morphologischen

Veränderungen (Abbildung 3-1, B). Die übrigen vier leukämischen Zellpopulationen zeigten verminderte Adhäsion und morphologische Veränderungen in schwächerer Ausprägung (Abbildung 3-1, C).

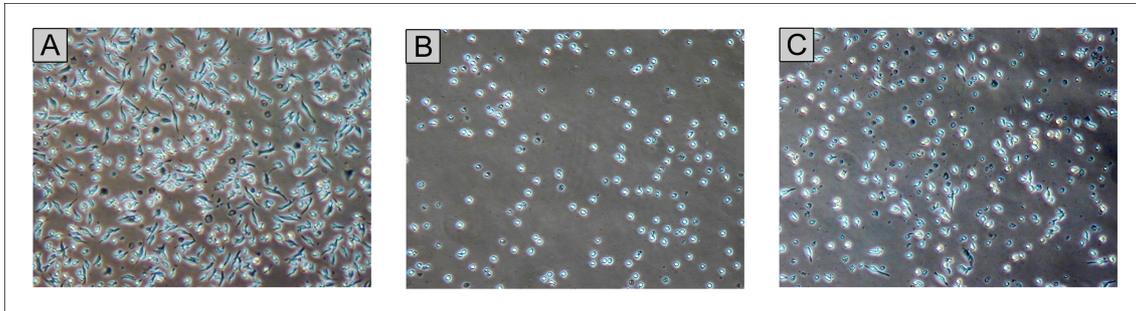


Abbildung 3-1 Repräsentative Bildausschnitte mikroskopischer Fotografien von auf immobilisierten CD82-Antikörpern kultivierten Zellen. A) CD34⁺ PBPC; B) AML 10, ohne morphologisch veränderte Zellen, entsprechend 9 von 13 AML; C) AML 6, mit morphologisch veränderten Zellen in verminderter Zahl, entsprechend 4 von 13 AML (Vergrößerung 40x).

Die bei normalen CD34⁺ PBPC beobachtete Adhäsion und die morphologischen Veränderungen dieser Zellen bei CD82-Ligation wurden als Bezugsgröße verwendet.

Zur Quantifizierung der Adhäsion wurden von drei voneinander unabhängigen CD34⁺ PBPC Proben je vier Blickfelder ausgezählt. Aus den absoluten Zellzahlen wurde das arithmetische Mittel berechnet und dieses als 1 definiert. Anschließend wurden in gleicher Weise die Anzahl der adhärenz CD82⁺ Leukämiezellen ermittelt und in Relation zu den adhärenz CD34⁺ PBPC gesetzt. Um zu prüfen, ob ein statistischer Unterschied zwischen den beiden Zellarten bezüglich ihrer Adhäsion besteht, wurde ein 2-seitiger t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt und zuvor ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ festgelegt. Die Leukämiezellen zeigten im Vergleich zu PBPC eine signifikant erniedrigte Adhäsion ($p<0,05$) und es gab keine Überschneidung der 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI) (Tabelle 3-2). Eine Korrelation mit der CD82-Expression konnte nicht gefunden werden ($r= -0,45$).

Zur Quantifizierung der Morphologieveränderungen wurde zunächst die Zahl der morphologisch veränderten Zellen auf die Gesamtzahl der adhärenz Zellen des entsprechenden Blickfeldes bezogen und anschließend das arithmetische Mittel dieser vier Quotienten gebildet. Um zu prüfen, ob ein statistischer Unterschied zwischen den beiden Zellarten bezüglich ihrer morphologischen Veränderungen besteht, wurde ein 2-seitiger t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt und zuvor ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ festgelegt. Die Leukämiezellen zeigten im Vergleich zu PBPC hoch signifikant weniger morphologische Veränderungen ($p<0,001$) und es gab keine Überschneidung der 95%-KI (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Differenzielle Effekte für Adhäsion und morphologische Veränderungen bei normalen CD34⁺ PBPC und Leukämiezellen von Patienten mit AML durch Ligation von CD82.

Zellen	Quelle	Adhäsion ^a		morphologische Veränderungen ^b (adhärenter Zellen)	
		anti-CD82 mAb	Isotyp mAb	anti-CD82 mAb	Isotyp mAb
PBPC	KM	1 ^c	0,05	0,6	0
95%-KI		0,95 - 1,05	0,04 - 0,06	0,5 - 0,7	–
AML 1	pB	0,21	< 0,01	< 0,01	< 0,01
AML 2	pB	0,60	< 0,01	< 0,01	< 0,01
AML 3	pB	0,75	< 0,01	< 0,01	< 0,01
AML 4	pB	0,81	0,3	< 0,01	< 0,01
AML 5	pB	0,79	0,3	< 0,01	< 0,01
AML 6	pB	0,90	0,2	0,4	< 0,01
AML 7	pB	0,38	< 0,01	< 0,01	< 0,01
AML 8	KM	0,86	< 0,01	< 0,01	< 0,01
AML 9	KM	0,55	< 0,01	0,05	< 0,01
AML 10	pB	0,37	< 0,01	< 0,01	< 0,01
AML 11	KM	0,82	< 0,01	0,02	< 0,01
AML 12	pB	0,33	< 0,01	0,03	< 0,01
AML 13	pB	0,51	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Mittelwert		0,605	0,069	0,045	< 0,01
95%-KI		0,479 - 0,731	0,009 - 0,129	-0,015 - 0,105	–
t-Test ^d		p = 0,013	p = 0,78	p < 0,000001	–

- a Die Adhäsionskulturen wurden mit 1×10^6 Zellen pro Kammer initiiert. Zur Quantifizierung der Adhäsion wurde jeweils das arithmetische Mittel von vier Blickfeldern des entsprechenden Antikörpers berechnet und dieser Wert auf die Zahl adhärenter CD34⁺ PBPC bezogen.
- b Zur Quantifizierung der morphologischen Veränderungen wurde die Zahl der morphologisch veränderten Zellen jedes Blickfeldes ermittelt und auf die Gesamtzahl der adhärenter Zellen des entsprechenden Blickfeldes bezogen. Es wurde das arithmetische Mittel dieser vier Quotienten des entsprechenden Antikörpers berechnet.
- c Die durchschnittliche absolute Zahl adhärenter CD34⁺ PBPC wurde als 1 definiert.
- d Ein 2-seitiger t-Test für unverbundene Stichproben wurde zur statistischen Prüfung der Unterschiede zwischen PBPC und AML durchgeführt, als Signifikanzniveau wurde zuvor $\alpha=0,05$ definiert.

Weder für die verminderte Adhäsion, noch für die verringerten morphologischen Veränderungen konnten Korrelationen mit dem AML-Subtyp, dem Anteil der Leukämiezellen im peripheren Blut oder dem Alter gefunden werden. Ein Unterschied zwischen Patienten mit Erstdiagnose und Patienten mit Rezidiv einer AML war nicht zu ermitteln. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass zwei der vier leukämischen Zellpopulationen, bei denen morphologische Veränderungen zu beobachten waren, aus Knochenmarksaspiraten isoliert wurden. Damit ist nicht auszuschließen, dass die beobachteten Veränderungen durch gesunde, im Aspirat enthaltene CD34⁺ PBPC hervorgerufen wurden. Bei der CD82⁺ AML-Zelllinie KG1a waren keine morphologischen Veränderungen durch CD82-Ligation nachweisbar, die Zellen zeigten aber im Vergleich mit CD34⁺ PBPC keine signifikanten Unterschiede bezüglich der adhäsiven Eigenschaften.

3.2 Einfluss der CD82-Ligation auf die Expression von Zelloberflächenmolekülen bei CD34⁺ PBPC und Leukämiezellen

Vor dem Hintergrund der CD82-vermittelten Zelladhäsion stellte sich die Frage, ob es bei normalen CD34⁺ PBPC während dieser Vorgänge zu einer veränderten Expression bestimmter Zelloberflächenmoleküle kommt und ob Leukämiezellen analoge Veränderungen aufweisen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde jede Zellpopulation im Anschluss an die Zelladhäsionskulturen (Abschnitt 3.1) getrennt nach CD82-Antikörper und Isotyp-Kontrolle durchflusszytometrisch untersucht. Auf diese Weise wurde die Expression von 16 (bei AML-Proben 18) Zelloberflächenmolekülen quantifiziert (Tabelle 2-1). Aufgrund limitierter Zellproben musste auf durchflusszytometrische Untersuchungen vor Durchführung der Zelladhäsionskulturen verzichtet werden.

Eine durchflusszytometrische Analyse erfolgte bei 3 Proben normaler CD34⁺ PBPC sowie 10 Leukämiezellproben. Alle Proben waren zuvor im Rahmen der Zelladhäsionskulturen 4 Tage kultiviert worden, jeweils zur Hälfte mit CD82-Antikörper und Isotyp-Kontrolle. Für jede Probe wurde getrennt nach anti-CD82 mAb und Isotyp-Kontrolle die Expression der Antigene in Form der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Da die absoluten Messwerte eine große Variabilität zwischen den einzelnen Proben zeigten und für den Vergleich der Populationen von untergeordneter Bedeutung sind, wurden für jede Probe die Messwerte bei CD82-Ligation in Relation zur Isotyp-Kontrolle gesetzt. Für die auf diese Weise berechneten Quotienten wurde eine logarithmische Darstellung gewählt, so dass positive Werte einer verstärkten, negative Werte einer verminderten Expression bei Kultur mit CD82-Antikörpern entsprechen. Auf eine Darstellung der absoluten Fluoreszenzintensitäten wird an dieser Stelle verzichtet.

Die ermittelten Quotienten liefern zwei unterschiedliche Informationen. Von zentraler Bedeutung ist zunächst der Vergleich der Expression der Zelloberflächenmoleküle bei CD82-Ligation mit der Isotyp-Kontrolle. Diese Information enthält der Quotient direkt, da eine signifikante Abweichung des logarithmierten Quotienten von 0 einen signifikanten Unterschied zwischen Test- und Kontrollpopulation anzeigt.

Bei Betrachtung der Boxplot-Darstellung fällt eine deutliche Abweichung von der Nulllinie für die Antigene CD29, CD49d, CD62L und CD86 bei CD34⁺ PBPC auf, was eine verminderte Expression dieser Moleküle bei CD82-Ligation zeigt. In diesem Kontext ist interessant, dass CD29 und CD49d gemeinsam das Integrin VLA-4 bilden. Bei den un-

tersuchten Leukämieproben zeigt sich für CD62L ein Trend zu erniedrigter Expression (Abbildung 3-2).

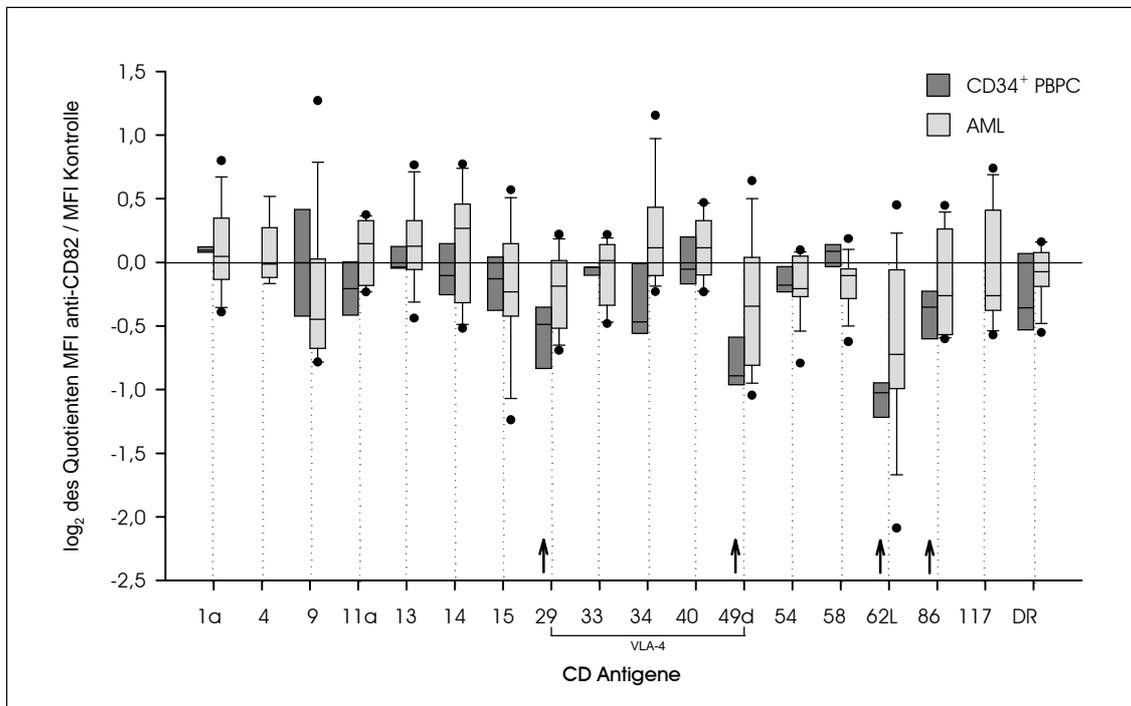


Abbildung 3-2 Boxplot-Darstellung der relativen Expressionsänderung bei CD82-Ligation. Zelladhäsionskulturen wurden mit 3 Proben normaler CD34⁺ PBPC und 10 Leukämiezellproben (AML) durchgeführt. Getrennt nach CD82-Antikörper und Isotyp-Kontrolle, wurde für jede Probe die Expression definierter Antigene als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch ermittelt. Zur Quantifizierung der Expressionsänderung bei CD82-Ligation wurde für jede Probe der Quotient aus MFI anti-CD82 und MFI Isotyp-Kontrolle gebildet, welcher zur besseren Veranschaulichung logarithmiert wurde. Die Darstellung zeigt eine Boxplot-Verteilung dieser Quotienten, getrennt nach normalen CD34⁺ PBPC (dunkelgrau) und Leukämiezellen (hellgrau). Jede Box entspricht dem Bereich vom 1. bis zum 3. Quartil, die Linie repräsentiert den Median, die dünnen Linien zeigen die 10. und 90. Perzentile, und Punkte stehen für außerhalb gelegene Quotienten. Pfeile verweisen auf eine deutliche Abweichung von der Nulllinie.

Zur statistischen Auswertung wurde für jedes Zelloberflächenmolekül, getrennt nach CD34⁺ PBPC und Leukämiezellen, der Mittelwert der log₂-Quotienten mit 95%-KI berechnet. Für alle Antigene, deren 95%-KI nicht die 0 einschließt, wurde ein 2-seitiger Einstichproben-t-Test zur Überprüfung einer Abweichung der berechneten Mittelwerte von 0 durchgeführt, wobei ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ definiert wurde (Korrektur nach Bonferroni: $\alpha'=0,0032$). Bei den normalen CD34⁺ PBPC war die Expression der Antigene CD49d ($p=0,036$) und CD62L ($p=0,010$) statistisch signifikant vermindert, bei den AML-Proben nur die des Antigens CD62L ($p=0,017$). In keinem Fall wurde jedoch ein p -Wert $< \alpha'$ erreicht (Abbildung 3-3), wobei die Aussagekraft der statistischen Auswertung aufgrund der kleinen Stichprobenumfänge eingeschränkt ist.

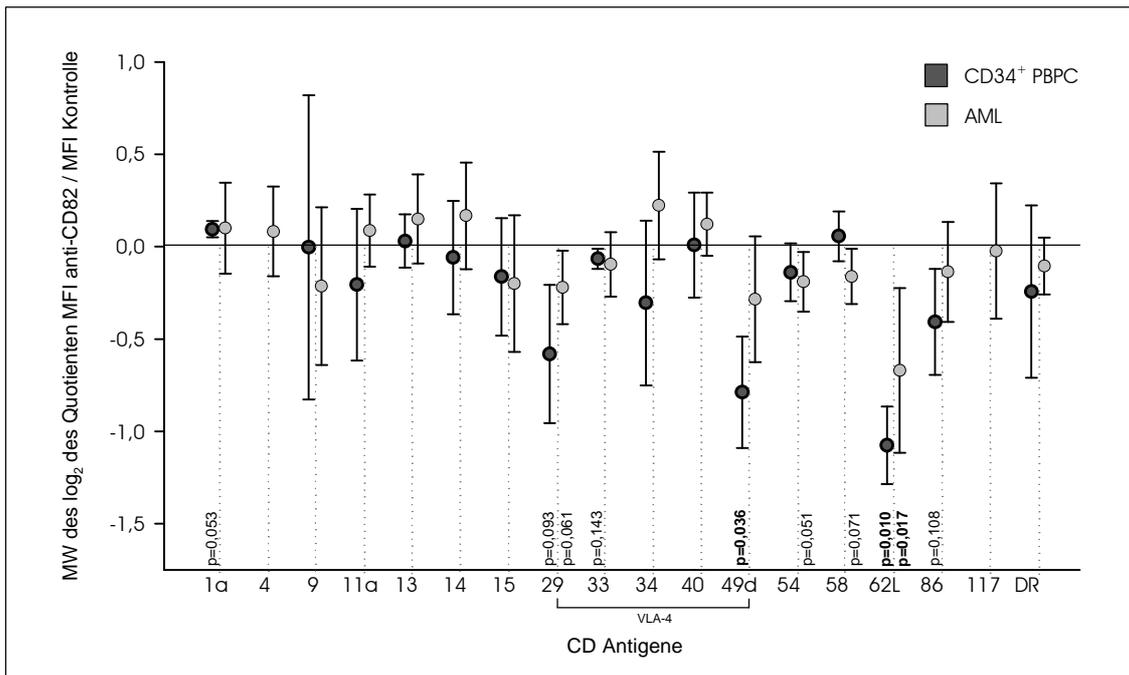


Abbildung 3-3 Mittlere relative Expressionsänderung bei CD82-Ligation. Die Abbildung zeigt für jedes Antigen, getrennt nach normalen CD34⁺ PBPC und Leukämiezellen (AML) den Mittelwert (MW) der relativen Expressionsänderung bei CD82-Ligation mit seinem 95%-Konfidenzintervall. Für alle Populationen, deren Konfidenzintervall nicht die 0 einschließt, wurde ein zweiseitiger Einstichproben-t-Test zur Überprüfung der Abweichung von 0 durchgeführt, wobei ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ definiert wurde. Die ermittelten p-Werte sind angegeben.

Der zweite wichtige Aspekt der Auswertung ist der Vergleich von normalen CD34⁺ PBPC mit Leukämiezellen, besonders für jene Antigene, welche durch CD82-Ligation verändert exprimiert werden. Bei Betrachtung der Boxplot-Darstellung scheinen dabei tendenziell Unterschiede für die Antigene CD29, CD34, CD49d, CD62L und CD86 zu bestehen. Zur statistischen Analyse dieser Unterschiede wurde ein 2-seitiger Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, wobei für kein Antigen ein signifikanter Unterschied zwischen Test- und Kontrollpopulationen nachgewiesen werden konnte.

Zusammengefasst liefern diese Ergebnisse starke Hinweise für eine veränderte Expression einzelner Zelloberflächenmoleküle in Folge einer CD82-Ligation bei normalen CD34⁺ PBPC. Besonders deutlich erscheinen diese Veränderungen bei VLA-4 und CD62L. Bei Leukämiezellen scheinen diese Veränderungen mit Ausnahme von CD62L zu fehlen. Eine gezielte Untersuchung des Zusammenhangs von CD82 und VLA-4 erscheint daher sinnvoll.

3.3 cDNA-Array-Analyse und Nachuntersuchung

In Anbetracht einer möglichen intrazellulären Signaltransduktion sollte untersucht werden, ob die Ligation von CD82 zu einer veränderten Genexpression in normalen CD34⁺ Zellen führt und inwiefern diese Veränderungen auch bei Leukämiezellen auftreten. Dazu wurden zunächst mit normalen CD34⁺ PBPC Zelladhäsionskulturen für 4 Tage mit CD82-Antikörpern oder Isotyp-Kontrolle generiert (Abschnitt 2.5) und an den Tagen 0, 2 und 4 aus diesen Zellen RNA extrahiert. Anschließend wurde mit diesen Proben eine cDNA-Array-Analyse zur simultanen Untersuchung der Expression von 1176 Genen durchgeführt. Die Durchführung der cDNA-Array-Analyse sowie eine erste Auswertung der Rohdaten erfolgte durch eine externe Arbeitsgruppe. Dabei wurde eine Auswahl von 38 interessant erscheinenden Genen zusammengestellt. Aus diesen wurden später 13 Gene pragmatisch zur Nachuntersuchung ausgewählt (Abbildung 3-4).

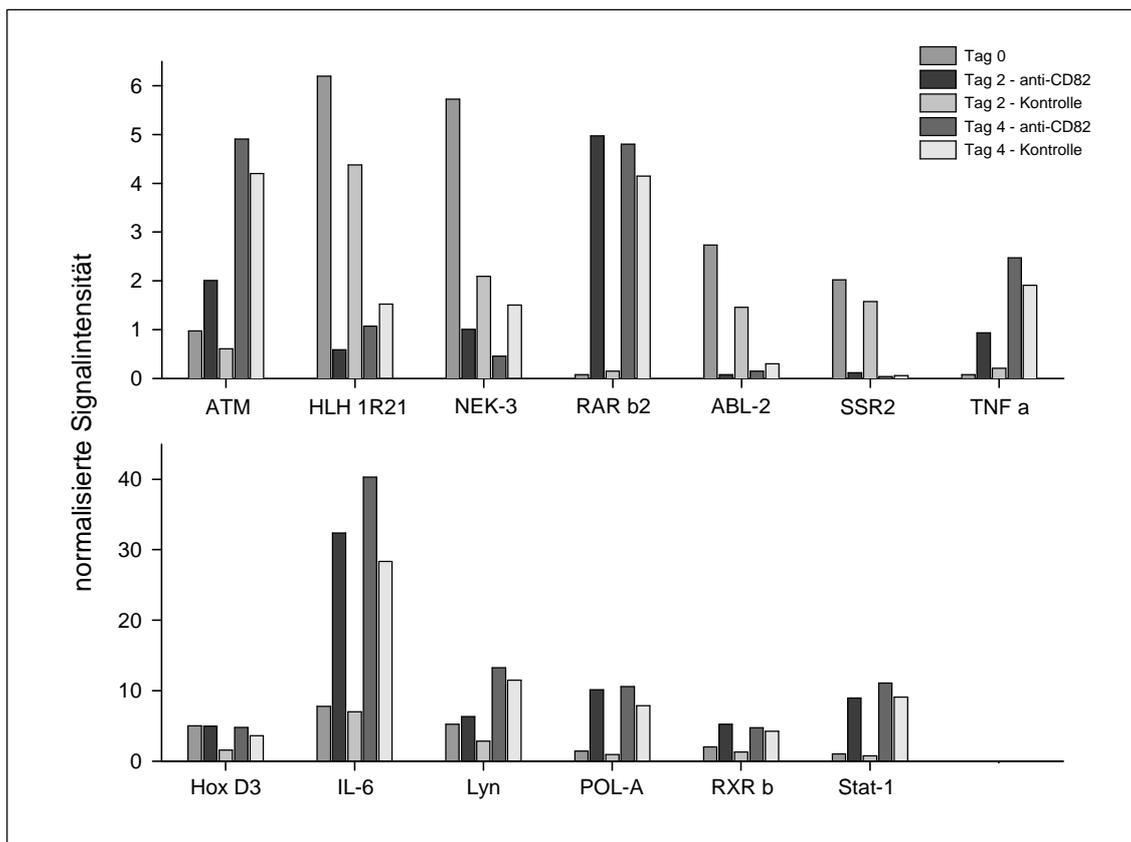


Abbildung 3-4 Ergebnisse der cDNA-Array-Analyse. Die Abbildung zeigt die normalisierten Signalintensitäten der zur Nachuntersuchung ausgewählten Gene. Es wurden 5 cDNA-Array-Analysen durchgeführt. Die erste RNA-Probe wurde aus der initialen, unstimulierten Zellpopulation normaler CD34⁺ PBPC extrahiert (Tag 0). Die übrigen Proben wurden aus normalen CD34⁺ PBPC nach Durchführung einer Zelladhäsionskultur mit CD82- oder Isotyp-Kontrollantikörper an den Tagen 2 und 4 gewonnen.

Zur Quantifizierung des Einflusses der CD82-Ligation auf die Genexpression wurden für die beiden Untersuchungszeitpunkte (Tag 2 und 4) die normalisierten Signalintensitäten der mit CD82-Antikörper kultivierten Zellen in Relation zur Kontrolle gesetzt (Abbildung 3-5). Die Unterschiede zwischen Test- und Kontrollpopulation zeigen dabei an beiden Untersuchungszeitpunkten die gleiche Tendenz, sind aber, mit Ausnahme von NEK-3, am Tag 2 wesentlich deutlicher ausgeprägt.

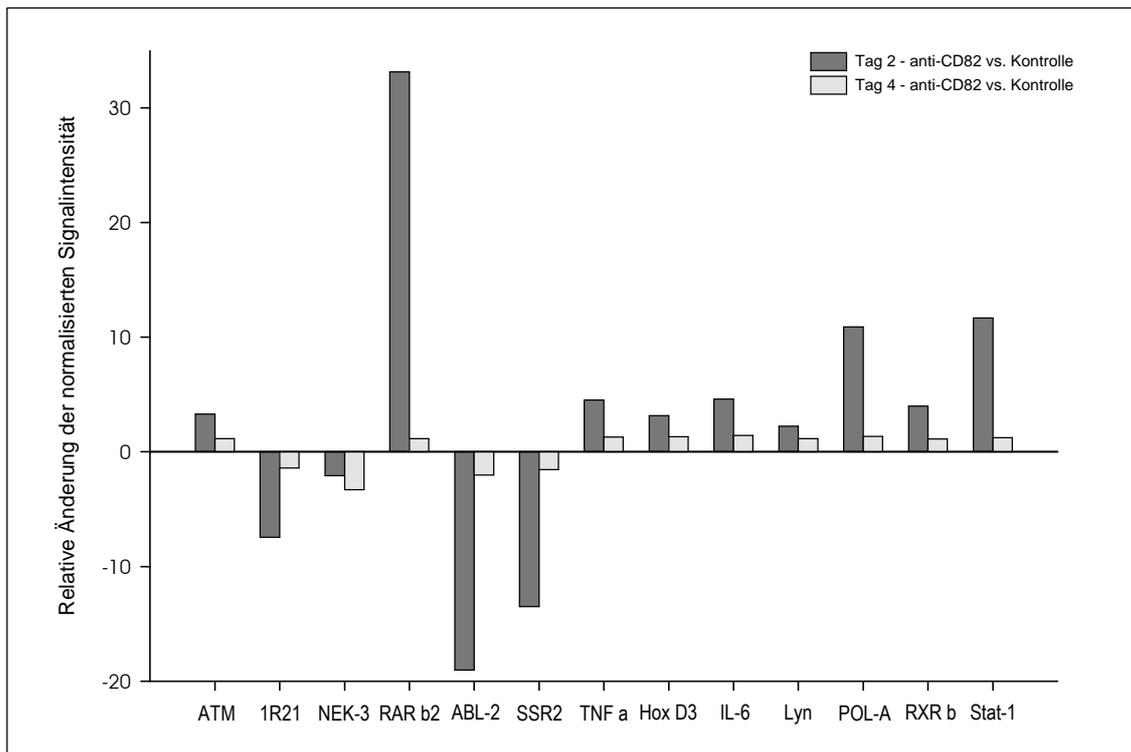


Abbildung 3-5 Relative Unterschiede der Genexpression zwischen CD82-Antikörper und Isotyp-Kontrolle. Für die zur Nachuntersuchung ausgewählten Gene ist für die beiden Untersuchungszeitpunkte Tag 2 (dunkelgrau) und Tag 4 (hellgrau) jeweils die relative Änderung der normalisierten Signalintensität der mit CD82-Antikörper kultivierten Zellen bezogen auf die Isotyp-Kontrolle dargestellt.

Zur Überprüfung der Konsistenz dieser Ergebnisse sowie zur Untersuchung von Leukämiezellen auf analoge Veränderungen wurde die Zelladhäsionskultur mit 3 Proben von normalen CD34⁺ PBPC, 2 Proben von Patienten AML sowie KG1a-Zellen wiederholt. Aufgrund der deutlicheren Unterschiede der Genexpression am Tag 2 der cDNA-Array-Analyse wurde der Ansatz auf zwei Tage beschränkt. Um CD82-spezifische von Adhäsions-bedingten Effekten zu differenzieren, wurde jeweils zusätzlich eine Kultur mit suspendierten anti-CD82 mAb durchgeführt.

Für jedes Gen wurde ein Primerpaar generiert und eine RT-PCR etabliert. Als Kontrolle der eingesetzten cDNA diente das „Housekeeping“-Gen β -Aktin. Alle untersuchten Gene wurden in normalen CD34⁺ PBPC exprimiert, eine differenzielle Expression in

Analogie zu den Ergebnissen der cDNA-Array-Analyse konnte aber mittels RT-PCR für kein Gen mit Sicherheit nachgewiesen werden. Nur für Hox-D3 konnte bei zwei von drei CD34⁺ PBPC Proben eine differenzielle Expression in Analogie zur cDNA-Array-Analyse gezeigt werden. Da diese Unterschiede nicht konsistent in allen drei Proben nachgewiesen wurden, ist eine CD82-spezifische, differenzielle Expression wahrscheinlich, aber nicht sicher. Die beiden Proben der Patienten mit AML zeigten keine Expressionsunterschiede, bei der Leukämie-Zelllinie KG1a fand sich keine Expression von Hox-D3 (Abbildung 3-6).

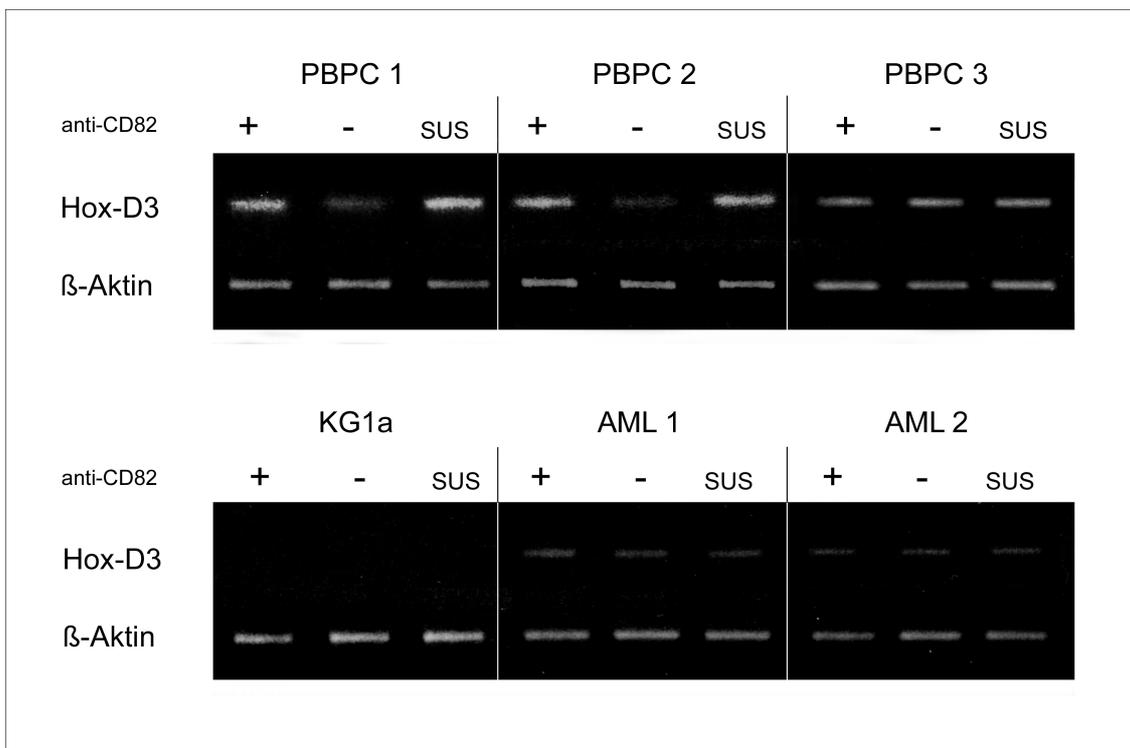


Abbildung 3-6 Ergebnisse der Nachuntersuchung mittels RT-PCR für Hox-D3. Mit 3 Proben normaler CD34⁺ PBPC, 2 Proben von Patienten mit AML und KG1a-Zellen wurden Zelladhäsionskulturen mit immobilisierten anti-CD82 mAb (+) und immobilisierter Isotyp-Kontrolle (-) durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit suspendierten anti-CD82 mAb generiert (sus). Nach 2 Tagen wurde RNA extrahiert. Dargestellt sind die Resultate der Nachuntersuchung mittels RT-PCR für das Gen Hox-D3, als Kontrolle der Methode wurde das Gen β -Aktin eingesetzt.

Unter Berücksichtigung der in Abbildung 3-4 dargestellten Ergebnisse der cDNA-Array-Analyse ist die mögliche differenzielle Expression von Hox-D3 nicht durch einen CD82-spezifischen Anstieg verursacht, sondern durch einen Abfall der Expression in den mit Isotyp mAb kultivierten Zellen.

Für die anderen nachuntersuchten Gene (Abbildung 3-4) konnten die Expressionsunterschiede der cDNA-Array-Analyse nicht mittels RT-PCR reproduziert werden. Auf eine Darstellung dieser Ergebnisse im Einzelnen wird daher verzichtet.

3.4 Analyse der LTC-IC-Frequenz bei Kultur mit CD82-Antikörpern

Zur Klärung der Frage, ob der anti-CD82 mAb eine Bedeutung für den Erhalt normaler primitiver hämatopoetischer Zellen hat, wurden drei LTC-IC-Kulturen entsprechend dem Modell einer LDA durchgeführt. Dieses Modell dient zur Ermittlung der Frequenz von LTC-IC (f_{LTC-IC}), welche primitive hämatopoetische Zellen repräsentieren, in der untersuchten Zellsuspension. Zur Durchführung jeder LTC-IC-Kultur wurden MNC in drei verschiedenen Zellkonzentrationen mit jeweils 40 Replikaten pro Konzentration auf 96-Kammer-Kulturplatten mit einem präformierten Zellrasen aus adhärensten Stromazellen verteilt. Die Hälfte, also 20 Replikate, wurde mit anti-CD82 mAb kultiviert, während der anderen Hälfte Isotyp mAb als Negativkontrolle zugesetzt wurden. Nach fünf Wochen Kultur wurden die Zellen zur Ermittlung des Gehalts klonogener Progenitoren in Methylzellulose-Kulturen überführt. Nach weiteren zwei Wochen Kultur wurde jede Kammer mikroskopisch ausgezählt. Die Anzahl der Zellklone pro Kammer kann für jede Konzentration, getrennt nach zugesetztem Antikörper, als Häufigkeitsverteilung dargestellt werden (Abbildung 3-7 bis Abbildung 3-9).

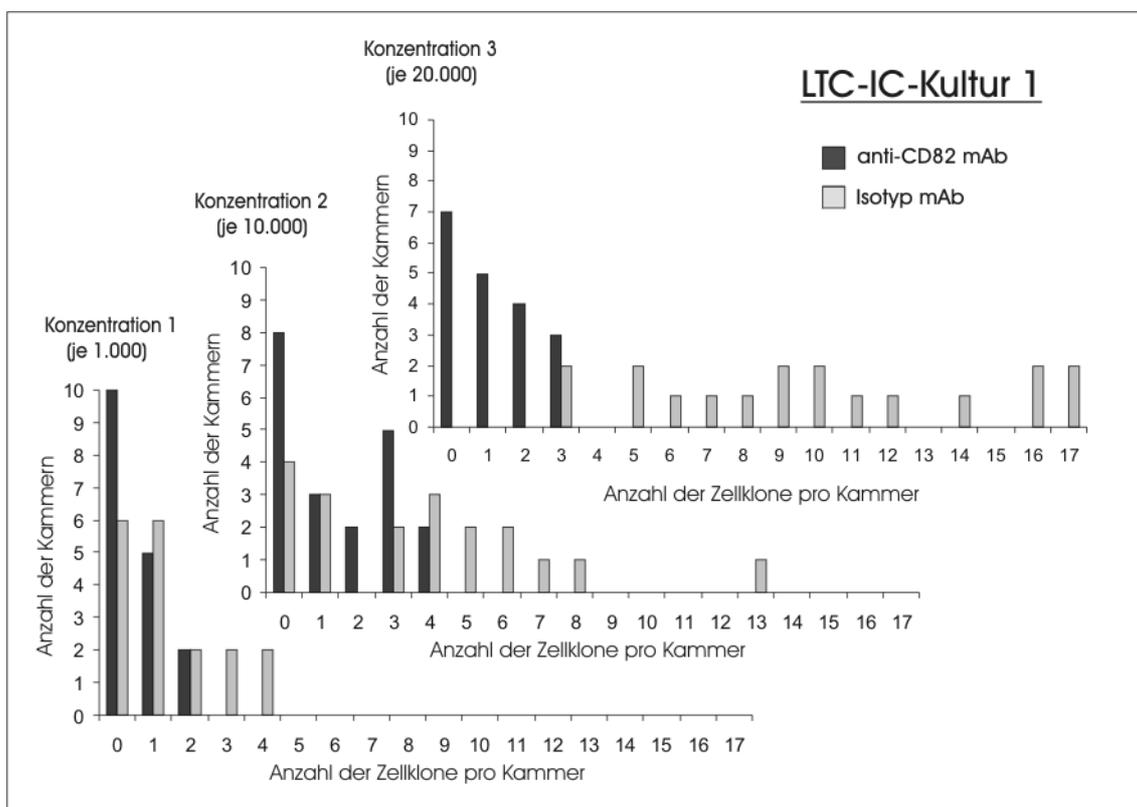


Abbildung 3-7 Ergebnisse der visuellen Auszählung der ersten LTC-IC-Kultur. Die Abbildung zeigt für jede Zellkonzentration ein Diagramm mit einer Häufigkeitsverteilung der ermittelten Klonzahl pro Kulturkammer, jeweils getrennt nach anti-CD82 mAb (schwarz) und Isotyp mAb (grau).

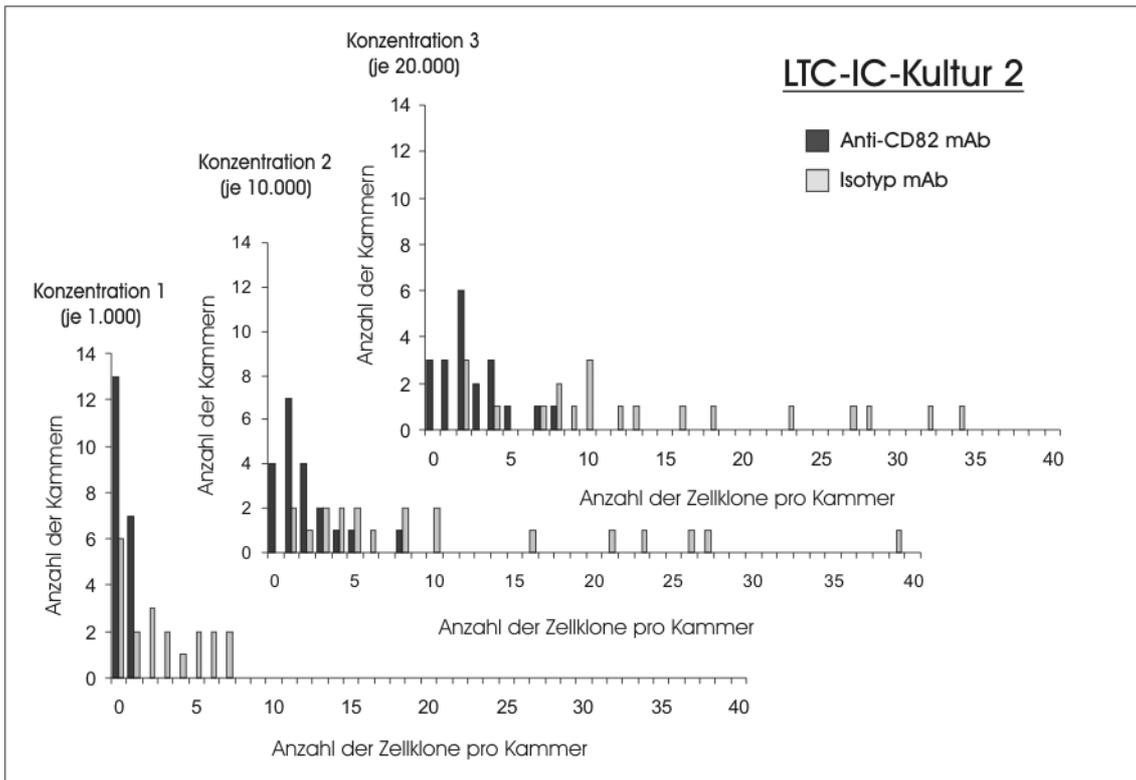


Abbildung 3-8 Ergebnisse der visuellen Auszählung der zweiten LTC-IC-Kultur. Die Abbildung zeigt für jede Zellkonzentration ein Diagramm mit einer Häufigkeitsverteilung der ermittelten Klonzahl pro Kulturkammer, jeweils getrennt nach anti-CD82 mAb (schwarz) und Isotyp mAb (grau).

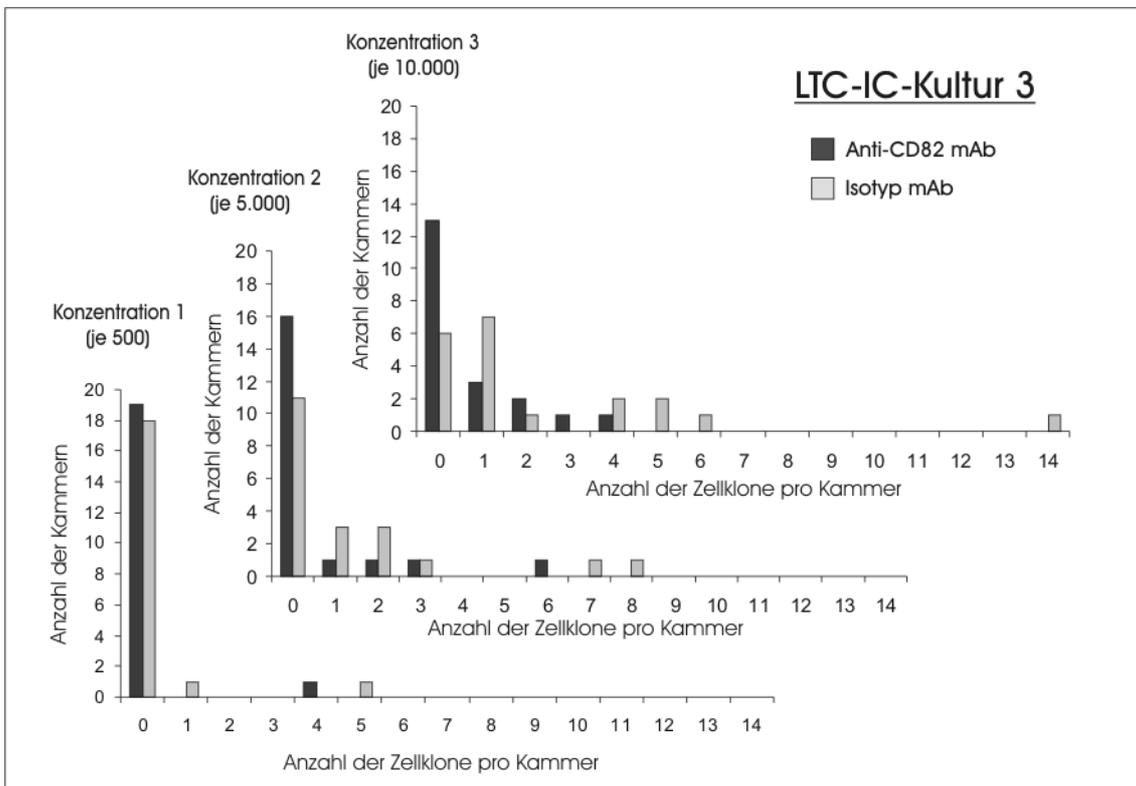


Abbildung 3-9 Ergebnisse der visuellen Auszählung der dritten LTC-IC-Kultur. Die Abbildung zeigt für jede Zellkonzentration ein Diagramm mit einer Häufigkeitsverteilung der ermittelten Klonzahl pro Kulturkammer, jeweils getrennt nach anti-CD82 mAb (schwarz) und Isotyp mAb (grau).

Die deskriptive Analyse der Ergebnisse zeigt bei den mit anti-CD82 mAb kultivierten Zellen im Vergleich zu den mit Isotyp mAb kultivierten Zellen in allen Konzentrationen aller drei LTC-IC-Kulturen eine niedrigere durchschnittliche Zahl an Zellklonen pro Kammer. Zur objektiven statistischen Auswertung einer LDA ist es notwendig, ein positives Ereignis zu definieren. Für diese Experimente wurde eine Ein-Treffer-Hypothese zugrunde gelegt, welche davon ausgeht, dass eine einzelne Zelle in der Lage ist, eine positive Antwort zu erzeugen. Als positive Antwort wurde das Auftreten eines Zellklons in einer Methylzellulose-Kultur definiert. Da nach fünf Wochen LTC-IC-Kultur alle klonogenen Progenitoren, die eine positive Antwort auslösen können, von einer LTC-IC abstammen, kann auf diese Weise eine f_{LTC-IC} ermittelt werden. Diese Auswertung basiert auf der Erkenntnis, dass die relative Häufigkeit negativer Kammern, aufgetragen auf einer logarithmischen Skala, in linearer Beziehung zur initial zugegebenen Zellzahl steht und eine relative Häufigkeit von 0,37 die Zugabe genau einer LTC-IC widerspiegelt. Zur statistischen Auswertung benötigt man die initialen Zellkonzentrationen, die Zahl der Replikate pro Zellkonzentration und den relativen Anteil negativer Kulturen. Diese Daten sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Tabelle 3-3 Experimentelle Daten für die Ermittlung der LTC-IC-Frequenzen. Die folgende Tabelle fasst diejenigen Daten und Ergebnisse der drei LTC-IC-Kulturen (Abbildung 3-7 bis Abbildung 3-9) zusammen, welche für die Berechnung der LTC-IC-Frequenzen benötigt werden.

LTC-IC-Kultur	Antikörper	Konzentration	Zellen pro Kultur	Kulturen	negative Kulturen	Verhältnis neg. Kult. / Kult.
1	anti-CD82	1	1000	20	13	0,65
		2	10000	20	4	0,20
		3	20000	20	3	0,15
	Isotyp	1	1000	20	6	0,30
		2	10000	20	0	0
		3	20000	20	0	0
2	anti-CD82	1	1000	17	10	0,59
		2	10000	20	8	0,40
		3	20000	19	7	0,37
	Isotyp	1	1000	18	6	0,33
		2	10000	19	4	0,21
		3	20000	18	0	0
3	anti-CD82	1	500	20	19	0,95
		2	5000	20	16	0,80
		3	10000	20	13	0,65
	Isotyp	1	500	20	18	0,90
		2	5000	20	11	0,55
		3	10000	20	6	0,30

Die zur Auswertung der hier erhobenen Daten durchgeführten Berechnungen sind in Abschnitt 2.10 ausführlich beschrieben. Es wurde die zur Auswertung von LDA konzipierte Software L-Calc 1.1 eingesetzt. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 3-4 dargestellt. An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass die ermittelten f_{LTC-IC} zu fiktiven Werten werden, sobald eine LTC-IC-Kultur manipuliert wird. In diesem Fall zeigt der Vergleich mit einer Negativkontrolle funktionelle Veränderungen durch die Manipulation an.

Tabelle 3-4 Ermittelte LTC-IC-Frequenzen. Angegeben sind die berechneten LTC-IC-Frequenzen (f_{LTC-IC}) mit Standardfehler (SE) sowie 95%-KI. Mittels χ^2 -Tests wurde die Konsistenz der LTC-IC-Kultur mit dem Modell der LDA überprüft, wobei ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ definiert wurde. Die Auswertung erfolgte mittels der speziell für LDA konzipierten Software L-Calc 1.1.

LTC-IC-Kultur	Antikörper	$f_{LTC-IC} \times 10^{-3}$	SE(f) $\times 10^{-3}$	95%-KI (f) $\times 10^{-3}$	$c^2(f)_{[df]}$	p (c^2)
1	anti-CD82	0,147	0,029	0,099 - 0,215	11,534 [2]	0,003*
	Isotyp	1,204	0,346	0,691 - 2,099	0	-
2	anti-CD82	0,083	0,017	0,056 - 0,124	29,606 [2]	< 0,001*
	Isotyp	0,337	0,092	0,199 - 0,573	21,538 [2]	< 0,001*
3	anti-CD82	0,046	0,014	0,026 - 0,081	0,705 [2]	0,703
	Isotyp	0,125	0,026	0,083 - 0,188	0,582 [2]	0,747

SE, Standardfehler; df, Freiheitsgrade

* Ein p-Wert <0,05 zeigt eine Inkonsistenz der Daten mit dem Modell der LDA an

Für die beiden ersten LTC-IC-Kulturen zeigte sich jeweils in beiden Antikörperansätzen eine Inkonsistenz mit dem Modell der LDA, so dass die ermittelten Frequenzen als nicht-valide angesehen werden müssen. Für die dritte LTC-IC-Kultur wurde 0,046 als fiktive f_{LTC-IC} bei den mit anti-CD82 mAb kultivierten Zellen ermittelt (95%-KI: 0,026 - 0,081), während sie bei den mit Isotyp mAb inkubierten Zellen bei 0,125 lag (95%-KI: 0,083 - 0,188) (Abbildung 3-10).

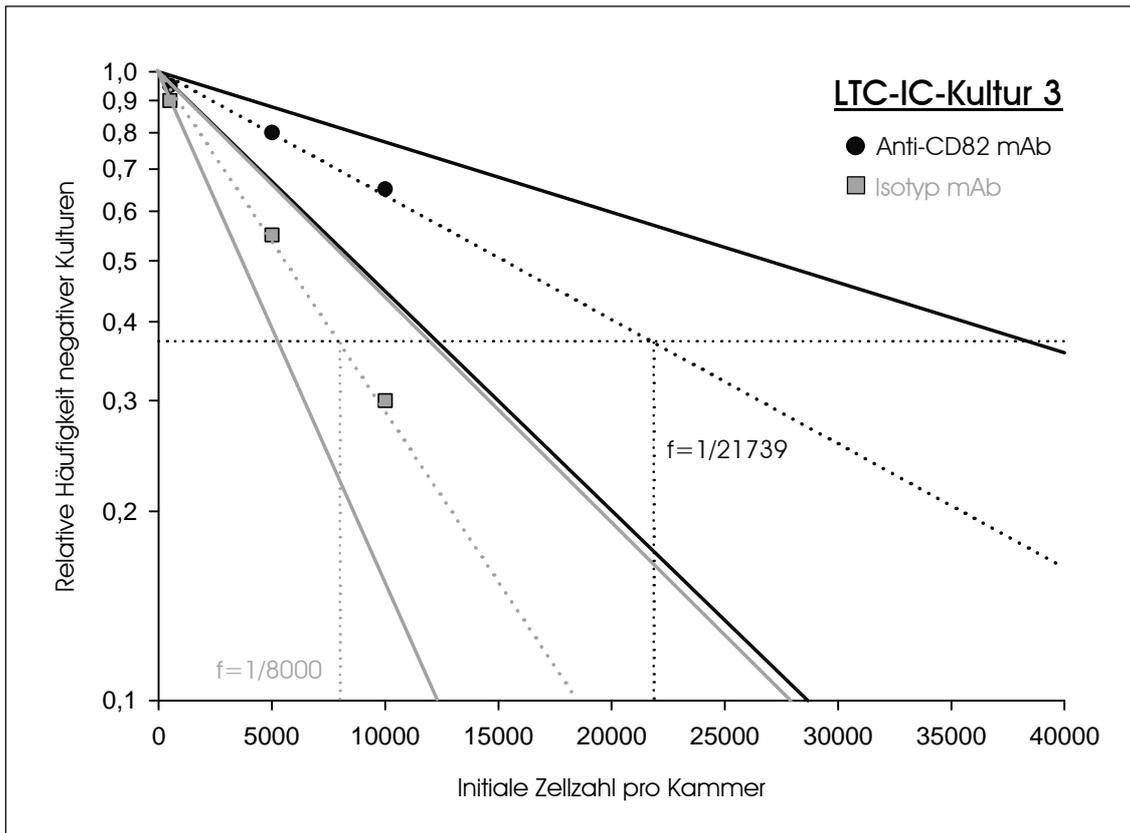


Abbildung 3-10 Grafische Darstellung der geschätzten LTC-IC-Frequenzen der dritten LTC-IC-Kultur. Für beide Gruppen der dritten LTC-IC-Kultur repräsentiert die untere Linie die obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, die mittlere, gepunktete Linie die geschätzte f_{LTC-IC} und die obere Linie die untere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls. Die schwarzen Kreise entsprechen den gemessenen Ergebnissen der mit anti-CD82 mAb inkubierten Zellen, die grauen Quadrate denen der mit Isotyp mAb inkubierten Zellen.

Um zu prüfen, ob zwischen den beiden so ermittelten f_{LTC-IC} der dritten LTC-IC-Kultur ein statistisch nachweisbarer Unterschied besteht, wurde ein Gruppenvergleich durchgeführt (Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5 Verhältnis der LTC-IC-Frequenzen der auf CD82-Antikörper kultivierten Zellen bezogen auf die Isotyp-Kontrolle. Zur Quantifizierung des Einflusses der CD82-Ligation auf den Erhalt von LTC-IC wurden die ermittelten LTC-IC-Frequenzen (f_{LTC-IC}) mittels der zur Auswertung von LDA konzipierten Software L-Calc 1.1 in Relation zueinander gesetzt. Angegeben ist das Verhältnis der f_{LTC-IC} der dritten LTC-IC-Kultur mit 95%-KI.

LTC-IC-Kultur	Verhältnis $f_{anti-CD82}/f_{Isotyp}$	95%-Konfidenzintervall des Verhältnisses $f_{anti-CD82}/f_{Isotyp}$	p-Wert ^a
3	0,368	0,182 - 0,743	0,0054 [*]

a Es wurde ein 2-seitiger t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt

* Ein p-Wert <0,01 zeigt einen hoch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die fiktive f_{LTC-IC} der mit anti-CD82 mAb kultivierten Zellpopulation der dritten LTC-IC-Kultur im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 0,368 (95%-KI: 0,182-0,743) erniedrigt war. Dieses Ergebnis war statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$). Da die Daten der beiden ersten LTC-IC-Kulturen inkonsistent mit dem Modell der LDA sind, ist eine vergleichende Berechnung der f_{LTC-IC} in diesen Fällen nicht zulässig. Die deskriptive Analyse dieser beiden LTC-IC-Kulturen (Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8) zeigt aber in allen drei Konzentrationen beider Kulturen eine größere Zahl negativer Kulturen und tendenziell niedrigere Zahlen von Zellklonen pro Kammer bei den mit anti-CD82 mAb kultivierten Zellen. Trotz ihrer Inkonsistenz mit dem Modell der LDA reproduzieren diese Kulturen damit das Ergebnis der dritten LTC-IC-Kultur.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Studie war es, Erkenntnisse über die Funktion des Tetraspanins CD82 auf normalen unreifen Progenitorzellen sowie - vergleichend dazu - auf Leukämiezellen zu gewinnen. Da bislang kein natürlicher Ligand für CD82 bekannt ist, wurde hierzu ein Antikörpermodell verwendet, wobei der CD82-spezifische monoklonale Antikörperklon 50F11 als Ersatzligand für das transmembranäre CD82-Molekül diente. Dieses Vorgehen hatte bereits im Falle anderer Rezeptoren zu einem besseren Verständnis von deren biologischer Funktion geführt (Francis et al., 1998; Zannettino et al., 1998; Levesque et al., 1999). Von dem hier benutzten aktivierenden CD82-Antikörper war bekannt, dass er Adhärenz und Morphologieveränderungen in einer T-Zelllinie auslösen konnte. Da erste Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe biologische Effekte des anti-CD82 mAb auch bei normalen CD34⁺ PBPC zeigten, war dies die Rationale für das Studium der biologischen Effekte dieses anti-CD82 mAb auf Stammzellen.

Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Ligation von CD82 auf CD34⁺ PBPC zu einer Regulation von Adhäsionsmolekülen führt, was mit einer differenziellen Regulation von Genen assoziiert war. Diese Oberflächenmarkerregulationen sind in Leukämiezellen zum Teil verändert. Auffällig war zudem, dass Leukämiezellen von Patienten mit AML im Vergleich zu normalen CD34⁺ PBPC Defekte hinsichtlich der CD82-induzierten Adhäsion und Morphologie aufweisen. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des anti-CD82 mAb zu LTC-IC-Kulturen in einem signifikant verminderten Gehalt an LTC-IC resultierte, was erstmals eine biologische Rolle von CD82 in der frühen Hämatopoese andeutet.

4.1 Adhäsion und Morphologieveränderung bei CD82-Ligation

Im ersten Teil der Studie wurde versucht, die biologischen Effekte des anti-CD82 mAb bei gesunden CD34⁺ PBPC und Leukämiezellen von Patienten mit AML zu vergleichen. Es sollte geklärt werden, ob die Leukämiezellen von Patienten mit AML bei Kultur auf immobilisierten CD82-Antikörper die gleichen Veränderungen von Adhäsion und Morphologie zeigen, wie sie für gesunde CD34⁺ PBPC beschrieben wurden (Burchert et al., bisher unveröffentlicht). Dabei wurden bei der Mehrheit der Leukämiezellen von Patienten mit AML eine signifikant verminderte Adhäsion und hoch signifikant weniger Morphologieveränderungen beobachtet (Tabelle 3-2). Diese signifikanten Unterschiede zwischen normalen und malignen Zellen sind interessant, da es zahlreiche Berichte über eine negative Korrelation von CD82-Expression und Metastasierung soli-

der Tumoren gibt (Yang et al., 1997; Takaoka et al., 1998b). Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen erstmals für eine funktionelle Bedeutung von CD82 auf Leukämiezellen. CD82 vermittelt seine intrazelluläre Wirkung durch eine vav-vermittelte Aktivierung kleiner G-Proteine (sog. GTPasen) der Rho-Familie (Rac, Cdc42 und RhoA) (Delaguillaumie et al., 2002). Rho-GTPasen sind von großer Bedeutung für die Aktin-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts (Ridley und Hall, 1992; Ridley et al., 1992) und für Veränderungen der Zellmorphologie u.a. in Form pseudopodienartiger Zellausläufer (Hall, 1998). Diese Daten korrelieren mit dem hier beobachteten Ergebnis, dass die Aktivierung von CD82 in humanen Stammzellen eine Reorganisation des Zytoskeletts bewirkt. Offensichtlich besteht in Leukämiezellen jedoch ein Defizit dieser CD82-Wirkung. So wurde kürzlich erstmals eine „splice“-Variante von CD82 mit verminderter Fähigkeit zur Interaktion mit Integrinen identifiziert (Lee et al., 2003). Einiges spricht jedoch dafür, dass ein Defekt nachgeschalteter Moleküle innerhalb der CD82-initiierten Signaltransduktionskaskade für diese Defizienz verantwortlich ist, da CD82 in normalen und malignen Zellen gleich stark exprimiert wird und in den bisher untersuchten Tumorzellen keine Mutationen von CD82 gefunden wurden (Dong et al., 1996). In diesem Kontext ist besonders interessant, dass Rho-GTPasen zur Ras-Superfamilie gehören (Takai et al., 2001), welche in Leukämiezellen häufig konstitutiv aktiviert sind (Birkenkamp et al., 2004) und in etwa 30% Mutationen aufweisen (Bos et al., 1985; Liu et al., 1987; Neubauer et al., 1994; Kiyoi et al., 1999). Ras aktiviert über vav (Crespo et al., 1997; Han et al., 1998) und CrkL (Nishihara et al., 2002) die Rho-GTPase Rac, welche zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führt (Irani et al., 1997; Shields et al., 2000). Zum einen stellen sowohl vav (Delaguillaumie et al., 2002) als auch CrkL Ziele von CD82 dar, zum anderen ist NFκB in AML-Blasten konstitutiv aktiviert (Guzman et al., 2001) und spielt eine wichtige Rolle für Zellwachstum und maligne Entartung (Mayo und Baldwin, 2000). Dies ist besonders interessant, da ein Zusammenhang von NFκB und CD82 diskutiert wird (Shinohara et al., 2001). Daneben führt auch eine aberrante Aktivierung der Rho-GTPase RhoA selbst zu unkontrolliertem Wachstum von Tumorzellen und fördert deren invasive und metastatische Eigenschaften (Zohn et al., 1998; Bishop und Hall, 2000), und es gibt Hinweise für eine Beteiligung von RhoA an der Entstehung der AML (Reuther et al., 2001). Vieles spricht somit für eine gestörte Funktion der Rho- und/oder Ras-GTPasen in Leukämiezellen, was die verminderten Effekte bei Ligation von CD82 in Leukämiezellen plausibel machen wür-

de. Gleichzeitig wäre dies ein Indiz dafür, dass CD82 einen Einfluss auf die Aktivität von Ras-GTPasen hat.

Andererseits kann den verminderten Effekten bei Ligation von CD82 auch ein genereller, CD82-unabhängiger Defekt des Zytoskeletts der Leukämiezellen zugrunde liegen. Die Reorganisation des Zytoskeletts ist eine Schlüsseleigenschaft lebender Zellen, die für alle Aspekte zellulärer Aktivität, insbesondere für biologische Prozesse wie Homing, transendotheliale Migration und Proliferation, essentiell ist (Mitchison und Cramer, 1996). Mehrfach wurde eine gestörte Funktion des Zytoskeletts bei Leukämien beschrieben, beispielsweise in CML-Zellen (McWhirter und Wang, 1993; Salgia et al., 1997), B-CLL-Zellen, Haarzell-Leukämiezellen (Burthem et al., 1994) und der myeloïden Leukämiezelllinie M1 (Nagata et al., 1980).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen ein Defizit der Leukämiezellen von Patienten mit AML für die bei gesunden CD34⁺ PBPC beobachteten Effekte durch Ligation von CD82. Da adhäsive Eigenschaften von großer Bedeutung für die Freisetzung unreifer Leukämiezellen aus dem KM sind (Gordon et al., 1987; Verfaillie et al., 1992) und ein besseres Verständnis dieses Prozesses möglicherweise zu therapeutischen Konsequenzen führen könnte, geben die hier vorgestellten Ergebnisse Anlass zur weiteren Untersuchung der Bedeutung von CD82 für Leukämiezellen.

4.2 Einfluss der CD82-Ligation auf die Expression von Zelloberflächenmolekülen bei CD34⁺ PBPC und Leukämiezellen

Vor dem Hintergrund der Induktion von Adhäsion von normalen CD34⁺ PBPC durch CD82-Ligation und zur Untersuchung möglicher Differenzierungsprozesse wurden durchflusszytometrische Analysen zur Quantifizierung einzelner Zelladhäsionsmoleküle und Differenzierungsantigene durchgeführt. Insbesondere interessierte auch die Klärung der Frage, ob der immobilisierte CD82-Antikörper als Ersatzligand differenzielle Effekte bei CD34⁺ PBPC versus Leukämiezellen von Patienten mit AML auslöst.

Gemessen an dem Oberflächenmarkerprofil konnten signifikante Differenzierungseffekte durch CD82-Ligation nicht gesehen werden. Es kam jedoch bei normalen CD34⁺ PBPC durch Kultur auf immobilisierten anti-CD82 mAb zu einer verminderten Expression der Zelloberflächenmoleküle CD49d, CD62L und tendenziell auch CD29 und CD86, wobei hier die statistische Auswertung durch die kleinen Stichprobenumfänge – besonders für die CD34⁺ PBPC - in ihrer Aussagekraft eingeschränkt war.

CD86 wird auf B-Lymphozyten und monozytären Zellen exprimiert (Engel et al., 1994) und ist ein kostimulatorisches Antigen bei der Aktivierung von T-Lymphozyten

(Freeman et al., 1993). Es gibt Hinweise für einen Einfluss der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B (Hinz et al., 2001) sowie einzelner Zytokine (Creery et al., 1996) auf die Expression von CD86, und bei AML-Zellen ist CD86 ein Marker monozytärer und dendritischer Zellen (Re et al., 2002). Eine Bedeutung für die Stammzellbiologie wurde für CD86 bisher nicht beschrieben.

CD62L spielt eine große Rolle bei Adhäsionsprozessen von Leukozyten (Spertini et al., 1991b; Spertini et al., 1992). Eine Bindung von CD62L führt initial zu einer verstärkten Expression von CD62L mit gesteigerter Aktivität, in der Folgezeit kommt es aber zu einem Verlust der CD62L-Expression auf der Zelloberfläche (Spertini et al., 1991a), was eine mögliche Erklärung für die verminderte Expression auf CD34⁺ PBPC bei Kultur auf anti-CD82 mAb darstellt. Diese verminderte Expression von CD62L spricht für eine Bedeutung von CD62L in der CD82-vermittelten Adhäsion. Eine essenzielle Rolle von CD62L in der Stammzellbiologie und Hämatopoese ist bisher nicht bekannt (de Boer et al., 2002).

CD49d (α_4 -Integrin) und CD29 (β_1 -Integrin) bilden gemeinsam das Integrin VLA-4, welches von großer Bedeutung in der Hämatopoese ist (Arroyo et al., 1996). So ist VLA-4 wichtig für Verbleib und Homing von hämatopoetischen Progenitoren im Knochenmark-Mikromilieu (Miyake et al., 1991a; Verfaillie et al., 1991; Williams et al., 1991) und für die Interaktionen dieser Zellen mit den KM-Stromazellen und der EZM (Simmons et al., 1992; Kerst et al., 1993; Papayannopoulou und Nakamoto, 1993; Levesque et al., 1995). Integrine sind entscheidend an der Vermittlung extrazellulärer Signale nach intrazellulär beteiligt (Burrige und Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Craig und Johnson, 1996), was durch die Bildung multimerer Proteinkomplexe in der Zellmembran geschieht (Yamada und Miyamoto, 1995). Gerade in der Bildung und Stabilisierung solcher Komplexe wird auch die zentrale Bedeutung der Tetraspanine gesehen (Boucheix und Rubinstein, 2001), und es erscheint in diesem Kontext besonders interessant, dass sowohl bei Integrinen (Hotchin und Hall, 1995; Clark et al., 1998; Ren et al., 1999) als auch bei CD82 (Delaguillaumie et al., 2002) eine Aktivierung der Rho-GTPasen für ihre Effekte verantwortlich gemacht wird. Zudem steht die Integrin-vermittelte Aktivierung von Rac und Cdc42 in Zusammenhang mit Veränderungen der Zellmorphologie (Price et al., 1998). Zwar war bekannt, dass Tetraspanine die Funktion von Integrinen regulieren können (Berditchevski et al., 1996; Berditchevski und Odintsova, 1999), aber die Ergebnisse dieser Studie zeigen erstmals einen Einfluss von CD82 auf die Expression von VLA-4. Ob es sich dabei um direkte,

CD82-vermittelte Effekte oder indirekte, beispielsweise adhäsionsbedingte Phänomene handelt, müssen weitere Experimente zeigen. Da durch VLA-4-Antikörper die Integration von CD34⁺ PBPC in einen Stromazellrasen komplett inhibiert (Yamaguchi et al., 1998) und deren Ansiedlung im KM nach Transplantation deutlich reduziert wird (Zanjani et al., 1999; Papayannopoulou et al., 2001), wäre die Untersuchung von Stammzellmobilisation und Integrinexpression nach Injektion von CD82-Antikörper in Mäuse ein viel versprechender Ansatz.

Interessanterweise führte die Ligation von CD82 durch anti-CD82 mAb in Leukämiezellen (mit Ausnahme von CD62L) zu keinen Veränderungen in der Oberflächenregulation der untersuchten Antigene, was auf eine Defizienz der CD82-Funktion in Leukämiezellen hinweist.

Leukämiezellen weisen ein gestörtes Adhäsions- und Homingverhalten auf. Dabei sind auch eine veränderte Integrinexpression und Defekte der β_1 -Integrin-Signaltransduktion involviert (Janiak et al., 1994; Reuss-Borst et al., 1995; Salesse und Verfaillie, 2002). So ist trotz hoher Expression die Funktion von VLA-4 bei CML-Progenitoren gestört, was in einer abnormalen β_1 -Integrin-Zytoskelett-Interaktion mit gestörter Aktinpolymerisation resultiert (Gordon et al., 1987; Verfaillie et al., 1992; Bhatia et al., 1999) und die Integrin-vermittelte Wachstumsregulation beeinträchtigt (Hurley et al., 1995; Bhatia et al., 1996; Hurley et al., 1997). Zudem konnte kürzlich für die AML eine prognostische Bedeutung der VLA-4-vermittelten Progenitor-Stromazell-Interaktion gezeigt werden (Matsunaga et al., 2003). Insgesamt müssen daher weiterführende Untersuchungen zeigen, ob die in dieser Arbeit gezeigte fehlende Regulation bei Leukämiezellen ein CD82-spezifisches Phänomen ist oder auf einem generellen Defekt der Integrinregulation beruht.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse erstmals einen regulativen Einfluss des Tetraspanins CD82 auf Adhäsionsmoleküle – insbesondere VLA-4. Vieles spricht damit für eine Bedeutung von CD82 in der Stammzellbiologie. In Analogie zu den verminderten Morphologieveränderungen werden auch die Antigenexpressionsdifferenzen bei Leukämiezellen nicht sichtbar, was die Hypothese einer CD82-Defizienz in diesen Zellen weiter untermauert.

4.3 cDNA-Array-Analyse und Nachuntersuchung

Zu Beginn dieser Studie gab es kaum Erkenntnisse über molekulare Funktionen von CD82. In Vorarbeiten war eine CD82-spezifische Proteinphosphorylierung nachgewiesen worden, die als Indiz für eine CD82-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion gewertet wurde (Burchert et al., bisher unveröffentlicht). Vor diesem Hintergrund wurde eine cDNA-Array-Analyse der ersten Generation durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob es durch Kultur auf immobilisierten anti-CD82 mAb zu einer veränderten Genexpression in primären humanen CD34⁺ PBPC kommt und ob Leukämiezellen von Patienten mit AML analoge Veränderungen aufweisen.

Die Ergebnisse der cDNA-Array-Analyse zeigten eine differenzielle Expression verschiedener Gene. Diese Regulationen konnten jedoch für 12 der ausgewählten Gene (z.B. STAT1, RAR β 2, Lyn, ATM und TNFa) mittels RT-PCR nicht eindeutig an weiteren Patientenproben bestätigt werden.

Nur für ein weiteres Gen, Hox-D3, konnte die differenzielle Expression in zwei von drei Kontrollexperimenten mittels RT-PCR reproduziert werden. Hox-D3 ist damit möglicherweise ein neues Zielgen von CD82 in CD34⁺ PBPC. Dieses Ergebnis ist insbesondere deshalb interessant, weil Hox-D-Gene nach aktueller Literaturlage in hämatopoetischen Zellen nicht exprimiert werden (Sauvageau et al., 1994; van Oostveen et al., 1999). Nur eine Veröffentlichung existiert bisher zur Expression von Hox-D3 in den Leukämie-Zelllinien HEL und K562, in der eine verstärkte Adhäsion sowie homotype Aggregation bei Überexpression von Hox-D3 in HEL-Zellen beschrieben wurde (Taniguchi et al., 1995). Andere Hox-Gene sind hingegen bekannte Regulatoren der frühen Hämatopoese (Sauvageau et al., 1994; Buske et al., 2002). Interessanterweise konnte in beiden durch uns untersuchten AML-Proben keine differenzielle Expression von Hox-D3 in Abhängigkeit von einer CD82-Aktivierung gezeigt werden. Dieses Ergebnis liefert damit ein mögliches molekulares Korrelat der verminderten Effekte der Leukämiezellen von Patienten mit AML bei Ligation von CD82. Eine Rolle von Hox-D3 in der CD82-induzierten Vermittlung von Adhäsion und Morphologieveränderungen bei CD34⁺ PBPC sowie in der Regulation der humanen Hämatopoese durch CD82 ist daher ein Thema, das in weiterführenden Experimenten geprüft werden wird.

Hingegen ist die mangelnde Reproduzierbarkeit von Array-Expressionsregulationen anderer Gene mittels RT-PCR kritisch zu sehen und nicht klar. Ursachen hierfür können vielfältig sein. So könnten die Quelle der gewonnenen CD34⁺ Zellen (PBPC oder Knochenmark), Dauer und Art der Lagerung vor RNA-Extraktion mögliche Fehlerquellen

sein. Zudem wäre retrospektiv die Durchführung einer cDNA-Array-Clusteranalyse von antikörperbehandelten Proben sicher sinnvoll gewesen, um an mehreren, voneinander unabhängigen Proben CD82-ligationsspezifische Genexpressionsmuster (sog. Cluster) zu ermitteln und diese dann mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR zu bestätigen. Dieses Vorgehen ist mittlerweile methodischer Standard (Fambrough et al., 1999; Hughes et al., 2000; Cho et al., 2001; Berwanger et al., 2002). cDNA-Arrays der ersten Generation, wie von uns verwendet, boten hierzu aber keine Möglichkeit.

Allerdings liegen inzwischen auch neue Erkenntnisse zur intrazellulären Signaltransduktion von CD82 vor, aus denen sich weitere vielversprechende Fragestellungen und Hypothesen ableiten lassen. So wurde eine Assoziation von CD82 mit dem EGF-Rezeptor beschrieben (Odintsova et al., 2000; Odintsova et al., 2003), und ein weiterer potentieller direkter Bindungspartner für CD82 ist das Mitglied der Immunglobulinfamilie EWI2/PGRL, welches an der Regulation von Zellmigration beteiligt ist (Zhang et al., 2003). Eine andere Veröffentlichung beschreibt für CD82 eine intrazelluläre Signalkaskade über Rho-GTPasen sowie vav (Delaguillaumie et al., 2002). Eine aktuelle Studie schließlich hat gezeigt, dass CD82 über eine Aktivierung der Rho-GTPase Cdc42 mit konsekutiver Freisetzung von Gluthation (GSH) Apoptose induzieren kann (Schoenfeld et al., 2004).

Zusammengefasst sprechen die vorliegenden Daten für eine Induktion des Gens HoxD3 bei Ligation von CD82 auf CD34⁺ PBPC mittels immobilisierten anti-CD82 mAb. Bei den untersuchten Leukämiezellen von Patienten mit AML konnten diese Expressionsunterschiede nicht gezeigt werden, was für Defekte der CD82-vermittelten Signaltransduktion in malignen Leukämiezellen spricht. cDNA-Array-Clusteranalysen wären eine interessante Möglichkeit, um weitere CD82-regulierte Gene in Stammzellen zu identifizieren und das Verständnis der intrazellulären Signaltransduktion von CD82 zu vertiefen.

4.4 Analyse der LTC-IC-Frequenz bei Kultur mit CD82-Antikörpern

Eine Expression von CD82 auf frühen hämatopoetischen Zellen ist bekannt (Burchert et al., 1999). Ob dieser jedoch eine funktionelle Bedeutung zukommt, war bisher unklar. Ziel dieser Studie war daher die Klärung der Frage, ob die Ligation von CD82 einen Einfluss auf den Erhalt primitiver hämatopoetischer Zellen hat und ob somit der Expression von CD82 auf CD34⁺ PBPC eine mögliche funktionelle Bedeutung in der Hämatopoese zukommt.

Das frühe Kompartiment der Hämatopoese ist experimentell schwer zugänglich. Eine etablierte Methode zur *in vitro* Quantifizierung frühester hämatopoetischer Zellen mit Pluripotenz stellt die LTC-IC-Kultur dar (Sutherland et al., 1990). Durch Manipulationen der Kulturbedingungen bietet sie die Möglichkeit, gezielte Informationen über funktionelle Prozesse der frühesten Hämatopoese zu erhalten (Hogge et al., 1996). Eine stringendere Vorgehensweise erlauben derzeit nur *in vivo* Experimente.

Die Zugabe des anti-CD82 mAb zu LTC-IC-Kulturen resultierte in einem signifikant verminderten Gehalt an LTC-IC. Aufgrund zu hoher initialer Zellkonzentrationen waren die ersten beiden Experimente nicht konsistent mit dem Modell einer Limiting-Dilution-Analyse. Eine statistische Auswertung mit Ermittlung der LTC-IC-Frequenzen und vergleichenden Analysen dieser Werte waren daher nicht zulässig. Die deskriptive Analyse der Resultate zeigt jedoch für alle Zellkonzentrationen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der dritten LTC-IC-Kultur, welche einen signifikant verminderten Gehalt von LTC-IC in den mit anti-CD82 mAb kultivierten Zellen aufwies. Somit deuten die vorliegenden Daten erstmals eine funktionelle Bedeutung von CD82 in der frühen Hämatopoese an. Zur Erklärung der ursächlichen Mechanismen dieser inhibierenden Effekte des anti-CD82 mAb bieten sich mehrere plausible Modelle an (Abbildung 4-1).

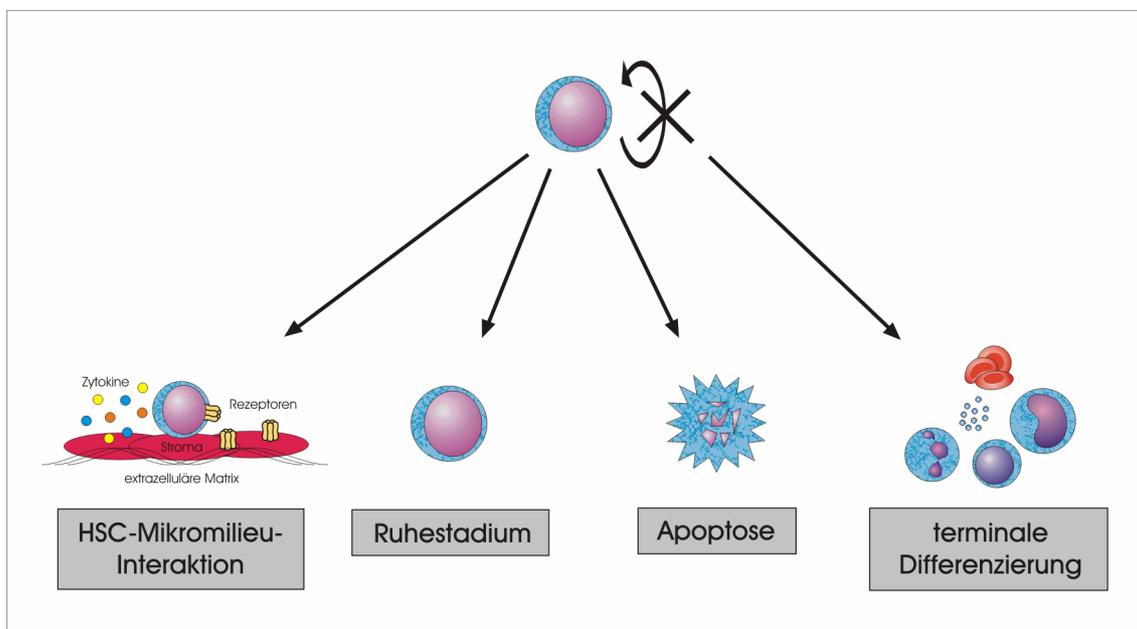


Abbildung 4-1 Modelle der Effekte einer Ligation von CD82. Die inhibierenden Effekte des CD82-Antikörpers können einerseits durch einen tatsächlichen Verlust von LTC-IC in Form von Apoptose oder terminaler Differenzierung erklärt werden. Andererseits kann eine Regulation des Zellzyklus mit einem konsekutiven Ruhestadium der HSC ursächlich verantwortlich sein. Ebenso möglich ist eine Modulation der Interaktionen von HSC und Knochenmark-Mikromilieu.

Einerseits kann es durch CD82-Ligation zu einem tatsächlichen Verlust an LTC-IC kommen. So ist bekannt, dass der Erhalt von HSC durch Apoptose reguliert wird (Domen et al., 2000; Domen und Weissman, 2000). Dies ist interessant, da Ergebnisse unserer Studie einen regulativen Einfluss von CD82 auf das Integrin VLA-4 zeigen und Adhäsions-induzierende Signale dieses Integrins an der Induktion von Apoptose beteiligt sind (Kapur et al., 2001). Zudem haben neuere Daten gezeigt, dass CD82 über eine Aktivierung der Rho-GTPase Cdc42 mit konsekutiver Freisetzung von GSH Apoptose induzieren kann (Schoenfeld et al., 2004). Gegen diesen ursächlichen Mechanismus sprechen jedoch aktuelle Experimente unserer Arbeitsgruppe sowie die trotz signifikanter Reduktion relativ hohe Zahl überlebender LTC-IC. Die Durchflusszytometrie bietet zahlreiche Methoden zum Nachweis apoptotischer Zellen (Ormerod, 1998), um in weiterführenden Experimenten die Bedeutung dieses Mechanismus für die Effekte der CD82-Ligation zu klären.

Ein Verlust von LTC-IC kann auch durch eine verminderte Fähigkeit dieser Zellen zu selbsterneuernden Teilungen (Petzer et al., 1996; Zandstra et al., 1997) und daraus resultierender terminaler Differenzierung in reife Blutzellen erklärt werden (Verfaillie und Miller, 1995). In diesem Kontext ist interessant, dass die selbsterneuernden Teilungen durch Zytokine (Zandstra et al., 1997), aber auch durch intrinsische Signale der HSC reguliert werden. So konnte auch ein Einfluss der Expression von Hox-Genen, wenngleich nicht Hox-D3, auf die Fähigkeit der HSC zu selbsterneuernden Teilungen gezeigt werden (Antonchuk et al., 2002; Thorsteinsdottir et al., 2002).

Andererseits kann die Ligation von CD82 einen regulativen Einfluss auf den Zellzyklus haben, so dass die Proliferation unreifer hämatopoetischer Zellen inhibiert wird und die HSC in einem Ruhestadium (G_0 -Phase des Zellzyklus) verweilen (Hatzfeld et al., 1991; Sitnicka et al., 1996; Soma et al., 1996). Zudem exprimieren $CD34^+$ PBPC im Ruhestadium signifikant weniger VLA-4 (Yamaguchi et al., 1998), was in Analogie zu Ergebnissen dieser Studie steht. Auch wurde eine Regulation der Zellzyklusprogression bei HSC durch Rho-GTPasen wie Rac1 gezeigt (Olson et al., 1995; Gu et al., 2003), welche an der intrazellulären Signaltransduktion von CD82 beteiligt sind (Delaguillaumie et al., 2002). Weitere Experimente, wie Analysen des Zellzyklus bei HSC mittels durchflusszytometrischer Methoden (Ormerod und Kubbies, 1992), werden die Bedeutung dieses Mechanismus für die Effekte der CD82-Ligation zeigen.

Ebenso möglich ist eine indirekte Wirkung des anti-CD82 mAb auf HSC über eine Modulation der Interaktion von HSC und KM-Mikromilieu als Ursache der beobachteten

Effekte. Zum Einen bilden die Stromazellen des KM-Mikromilieus zahlreiche Faktoren, die den Erhalt von LTC-IC beeinflussen (Otsuka et al., 1991; Verfaillie, 1993; Verfaillie et al., 1994; Levesque et al., 1995; Gupta et al., 1996), und bei T-Lymphozyten wurde eine Modulation der Zytokinsekretion durch CD82 bereits nachgewiesen (Lebel-Binay et al., 1995a; Lagaudriere-Gesbert et al., 1997a).

Zum Anderen sind Zell-Zell-Interaktionen wichtig für den Erhalt der LTC-IC im KM (Bentley, 1981), so dass eine Beeinflussung von Adhäsionsprozessen der HSC sicher ein weiterer möglicher Mechanismus der CD82-Effekte in der Hämatopoese wäre. Dabei ist neben den proadhäsiven Effekten von CD82 besonders der regulative Einfluss von CD82 auf die Expression von VLA-4 interessant, da dieses Zelladhäsionsmolekül an der Inhibition von Proliferationsprozessen beteiligt ist (Hurley et al., 1995; Verfaillie und Catanzaro, 1996) und es die Signalkaskade einzelner Zytokine aktivieren kann (Papayannopoulou et al., 1998). Für das Tetraspanin CD9 wurde gezeigt, dass die initiale Zugabe eines anti-CD9 mAb zu D-LTC in einer inhibierten Myelopoese, die Zugabe zu etablierten Kulturen nach 4 Wochen jedoch in einer gesteigerten Myelopoese resultierte (Oritani et al., 1996). Ein analoges Experiment mit Zugabe des anti-CD82 mAb sowie die Durchführung so genannter „non-contact“ LTC-IC-Kulturen (Verfaillie, 1992; Verfaillie et al., 1994; Breems et al., 1997) würden die Relevanz direkter HSC-Stromazell-Interaktionen für die beobachteten Effekte klären.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine inhibierende Wirkung der CD82-Ligation auf den Erhalt normaler primitiver hämatopoetischer Zellen und deuten damit erstmals eine funktionelle Bedeutung von CD82 in der humanen Hämatopoese an. Die ursächlichen Mechanismen müssen weiterführende Experimente klären.

4.5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Studie sollte die funktionelle Bedeutung von CD82 in der normalen und malignen Hämatopoese untersucht werden. Dazu wurde ein monoklonaler CD82-Antikörper als Ersatzligand für CD82 eingesetzt. Die Ligation von CD82 durch diesen Antikörper resultierte in verstärkter Adhäsion sowie in Veränderungen der Zellmorphologie und der Expression von Zelladhäsionsmolekülen. Damit reguliert CD82 offensichtlich essenzielle Eigenschaften hämatopoetischer Progenitorzellen. Leukämiezellen von Patienten mit AML scheinen hingegen für diese Reaktionen zumindest partiell defizient zu sein. Zudem konnte mittels LTC-IC-Kulturen eine Wirkung von CD82 auf das früheste Kompartiment der Hämatopoese nachgewiesen werden.

Wenngleich die hier gezeigten Untersuchungen keine abschließenden Schlussfolgerungen zulassen, zeigen sie doch erstmals eine Funktion von CD82 im Rahmen der Regulation der humanen Hämatopoese. Ein tiefgreifendes Verständnis der komplexen Stammzellbiologie ist von erheblichem Interesse, insbesondere vor dem Hintergrund aktueller Ergebnisse, welche ein möglicherweise größeres Potenzial hämatopoetischer Stammzellen andeuten, als bislang angenommen wurde. Sollten sich diese Hinweise bestätigen, könnten sich daraus vielfältige Möglichkeiten für die klinische Anwendung hämatopoetischer Stammzellen ergeben. In diesem Kontext ist es besonders interessant, dass CD82 insbesondere auch das unreifste experimentell zugängige Stammzellkompartiment zu regulieren scheint, die LTC-IC. Diese Funktion weiter zu studieren und zudem die CD82-vermittelte Signaltransduktion in hämatopoetischen Progenitoren besser zu verstehen, sollte ein Schwerpunkt weiterer Experimente sein.

Leukämien sind schwerwiegende Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, die noch immer nicht zufriedenstellend behandelt werden können. Die Klärung der Ursachen der CD82-Defizienz in malignen Blasten könnte neue Implikationen für das Verständnis der differenziellen Biologie normaler und maligner Stammzellen ergeben, welche möglicherweise in neuen Behandlungskonzepten resultieren.

Das Verständnis der Biologie hämatopoetischer Stammzellen sowie deren leukämischen Gegenspielern weiter zu vertiefen, ist essenziell – möglicherweise kann CD82 dabei ein weiterer Mosaikstein sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Tetraspanine sind eine Gruppe transmembranärer Proteine mit charakteristischem Aufbau, die in variabler Expression auf nahezu allen humanen Zellen vorkommen. Ihre Funktionen sind sehr vielfältig, aber noch immer nicht abschließend geklärt. Eine Hauptfunktion der Tetraspanine ist jedoch die Regulation der Interaktion von Zellen durch Beeinflussung der Stabilität und Kooperation multimerer Proteinkomplexe auf der Zelloberfläche. Über ihre Rolle in der Hämatopoese ist bisher nur wenig bekannt.

Das Tetraspanin CD82 ist bekannt für seinen inhibierenden Einfluss auf das Metastasierungsverhalten zahlreicher solider Tumoren. Zudem besitzt es die Fähigkeit zur Auslösung eines kostimulatorischen Signals bei der T-Zell-Aktivierung. Obwohl CD82 auf hämatopoetischen Progenitorzellen und Leukämiezellen stark exprimiert wird, war dessen Funktion in der Hämatopoese bisher unklar.

Ziel dieser Studie war es daher, Erkenntnisse über die mögliche Bedeutung dieser Expression von CD82 auf unreifen normalen und vergleichend auf malignen Progenitoren zu gewinnen. Da bislang kein natürlicher Ligand für CD82 bekannt ist, wurde hierzu ein Antikörpermodell verwendet. Ein CD82-spezifischer aktivierender monoklonaler Antikörper, 50F11, diente als Ersatzligand für das transmembranäre CD82-Molekül. In Vorarbeiten konnten mit Hilfe dieses Modells eine verstärkte Adhäsion sowie Morphologieveränderungen bei normalen hämatopoetischen Progenitorzellen ausgelöst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass maligne Blasten im Vergleich zu normalen Progenitorzellen generell ein Defizit für die CD82-induzierten biologischen Effekte zu haben scheinen und dass normale Stammzellen distinkte Effekte nach CD82-Aktivierung zeigen. Zu nennen wären hier in erster Linie die CD82-induzierte Adhäsion und Morphologieveränderung wie auch CD82-ligationsspezifische Zelloberflächenregulationen, die in Leukämiezellen zum Teil hoch signifikant gestört waren. Durch cDNA-Array-Analysen wurde Hox-D3 als ein mögliches Zielmolekül der CD82-vermittelten Signaltransduktion identifiziert. Schließlich konnte erstmals gezeigt werden, dass CD82-Aktivierung mit dem hier genutzten Antikörpermodell zu einer signifikanten Negativregulation der LTC-IC-Frequenzen führt. Dies bedeutet, dass CD82 ein Regulator der frühesten in vitro zugängigen menschlichen Hämatopoese zu sein scheint. Zusammengefasst ist CD82 ein neues Antigen, das in die Regulation der Biologie von hämatopoetischen Stammzellen involviert und dessen Funktion in Leukämiezellen eingeschränkt ist. Die vorliegenden Daten geben Anlass zur weiteren Untersuchung der Rolle von CD82 in der Hämatopoese.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi M, Taki T, Ieki Y, Huang CL, Higashiyama M, Miyake M (1996).** "Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer." *Cancer Res* **56**(8): 1751-5.
- Akashi K, Kondo M, Cheshier S, Shizuru J, Gandy K, Domen J, Mebius R, Traver D, Weissman IL (1999).** "Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**: 1-12.
- Alcalay M, Orleth A, Sebastiani C, Meani N, Chiaradonna F, Casciari C, Sciarpi MT, Gelmetti V, Riganelli D, Minucci S, Fagioli M, Pelicci PG (2001).** "Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia." *Oncogene* **20**(40): 5680-94.
- Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA (2000).** "Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells." *Nature* **406**(6793): 257.
- Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azham M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, Harley CB (1995).** "Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo." *Exp Cell Res* **220**(1): 194-200.
- Andria ML, Barsh GS, Levy S (1992).** "Expression of TAPA-1 in preimplantation mouse embryos." *Biochem Biophys Res Commun* **186**(3): 1201-6.
- Angelisova P, Hilgert I, Horejsi V (1994).** "Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA- 1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins." *Immunogenetics* **39**(4): 249-56.
- Anton ES, Hadjiargyrou M, Patterson PH, Matthew WD (1995).** "CD9 plays a role in Schwann cell migration in vitro." *J Neurosci* **15**(1 Pt 2): 584-95.
- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK (2002).** "HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo." *Cell* **109**(1): 39-45.
- Aoyama K, Oritani K, Yokota T, Ishikawa J, Nishiura T, Miyake K, Kanakura Y, Tomiyama Y, Kincade PW, Matsuzawa Y (1999).** "Stromal cell CD9 regulates differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells." *Blood* **93**(8): 2586-94.
- Arroyo AG, Yang JT, Rayburn H, Hynes RO (1996).** "Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis." *Cell* **85**(7): 997-1008.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1994).** Current protocols in molecular biology. New York, John Wiley & Sons, Inc.

- Azorsa DO, Hyman JA, Hildreth JE (1991).** "CD63/Pltgp40: a platelet activation antigen identical to the stage-specific, melanoma-associated antigen ME491." *Blood* **78**(2): 280-4.
- Bairoch A, Boeckmann B (1992).** "The SWISS-PROT protein sequence data bank." *Nucleic Acids Res* **20**: 2019-2022.
- Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B (1992).** "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 2804-8.
- Behr S, Schriever F (1995).** "Engaging CD19 or target of an antiproliferative antibody 1 on human B lymphocytes induces binding of B cells to the interfollicular stroma of human tonsils via integrin alpha 4/beta 1 and fibronectin." *J Exp Med* **182**(5): 1191-9.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2003).** "GenBank." *Nucleic Acids Res* **31**(1): 23-7.
- Bentley SA (1981).** "Close range cell:cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture." *Exp Hematol* **9**(3): 308-12.
- Berditchevski F, Odintsova E (1999).** "Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling." *J Cell Biol* **146**(2): 477-92.
- Berditchevski F, Zutter MM, Hemler ME (1996).** "Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins)." *Mol Biol Cell* **7**(2): 193-207.
- Berwanger B, Hartmann O, Bergmann E, Bernard S, Nielsen D, Krause M, Kartal A, Flynn D, Wiedemeyer R, Schwab M, Schafer H, Christiansen H, Eilers M (2002).** "Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma." *Cancer Cell* **2**(5): 377-86.
- Bhatia R, McCarthy JB, Verfaillie CM (1996).** "Interferon-alpha restores normal beta 1 integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by the marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia." *Blood* **87**(9): 3883-91.
- Bhatia R, Munthe HA, Verfaillie CM (1999).** "Role of abnormal integrin-cytoskeletal interactions in impaired beta1 integrin function in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors." *Exp Hematol* **27**(9): 1384-96.
- Birkenkamp KU, Geugien M, Schepers H, Westra J, Lemmink HH, Vellenga E (2004).** "Constitutive NF-kappaB DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway." *Leukemia* **18**(1): 103-12.
- Bishop AL, Hall A (2000).** "Rho GTPases and their effector proteins." *Biochem J* **348 Pt 2**: 241-55.

- Boismenu R, Rhein M, Fischer WH, Havran WL (1996).** "A role for CD81 in early T cell development." *Science* **271**(5246): 198-200.
- Bos JL, Toksoz D, Marshall CJ, Verlaan-de Vries M, Veeneman GH, van der Eb AJ, van Boom JH, Janssen JW, Steenvoorden AC (1985).** "Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia." *Nature* **315**(6022): 726-30.
- Bosca L, Lazo PA (1994).** "Induction of nitric oxide release by MRC OX-44 (anti-CD53) through a protein kinase C-dependent pathway in rat macrophages." *J Exp Med* **179**(4): 1119-26.
- Boucheix C, Benoit P, Frachet P, Billard M, Worthington RE, Gagnon J, Uzan G (1991).** "Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins." *J Biol Chem* **266**(1): 117-22.
- Boucheix C, Rubinstein E (2001).** "Tetraspanins." *Cell Mol Life Sci* **58**(9): 1189-205.
- Boucheix C, Soria C, Mirshahi M, Soria J, Perrot JY, Fournier N, Billard M, Rosenfeld C (1983).** "Characteristics of platelet aggregation induced by the monoclonal antibody ALB6 (acute lymphoblastic leukemia antigen p 24). Inhibition of aggregation by ALB6Fab." *FEBS Lett* **161**(2): 289-95.
- Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertocello I (1997).** "Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment." *Exp Hematol* **25**(5): 445-53.
- Breems DA, Blokland EA, Ploemacher RE (1997).** "Stroma-conditioned media improve expansion of human primitive hematopoietic stem cells and progenitor cells." *Leukemia* **11**(1): 142-50.
- Burchert A, Notter M, Dietrich Menssen H, Schwartz S, Knauf W, Neubauer A, Thiel E (1999).** "CD82 (KAI1), a member of the tetraspan family, is expressed on early haemopoietic progenitor cells and up-regulated in distinct human leukaemias." *Br J Haematol* **107**(3): 494-504.
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M (1996).** "Focal adhesions, contractility, and signaling." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 463-518.
- Burthem J, Baker PK, Hunt JA, Cawley JC (1994).** "Hairy cell interactions with extracellular matrix: expression of specific integrin receptors and their role in the cell's response to specific adhesive proteins." *Blood* **84**(3): 873-82.
- Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C, Spiekermann K, Eaves CJ, Coulombel L, Sauvageau G, Hogge DE, Humphries RK (2002).** "Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells." *Blood* **100**(3): 862-8.
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL (1999).** "In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 3120-5.

- Cho RJ, Huang M, Campbell MJ, Dong H, Steinmetz L, Sapinoso L, Hampton G, Elledge SJ, Davis RW, Lockhart DJ (2001).** "Transcriptional regulation and function during the human cell cycle." *Nat Genet* **27**(1): 48-54.
- Claas C, Seiter S, Claas A, Savelyeva L, Schwab M, Zoller M (1998).** "Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy." *J Cell Biol* **141**(1): 267-80.
- Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO (1998).** "Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases." *J Cell Biol* **142**(2): 573-86.
- Clay D, Rubinstein E, Mishal Z, Anjo A, Prenant M, Jasmin C, Boucheix C, Le Bousse-Kerdiles MC (2001).** "CD9 and megakaryocyte differentiation." *Blood* **97**(7): 1982-9.
- Coulombel L, Eaves AC, Eaves CJ (1983).** "Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer." *Blood* **62**(2): 291-7.
- Craig SW, Johnson RP (1996).** "Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents." *Curr Opin Cell Biol* **8**(1): 74-85.
- Creery WD, Diaz-Mitoma F, Filion L, Kumar A (1996).** "Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype." *Eur J Immunol* **26**(6): 1273-7.
- Crespo P, Schuebel KE, Ostrom AA, Gutkind JS, Bustelo XR (1997).** "Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product." *Nature* **385**(6612): 169-72.
- Cumano A, Garcia-Porrero J, Dieterlen-Lievre F, Godin I (1995).** "Intra-embryonic hematopoiesis in mice." *C R Seances Soc Biol Fil* **189**(4): 617-27.
- de Boer F, Kessler FL, Netelenbos T, Zweegman S, Huijgens PC, van der Wall E, van der Linden JA, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Drager AM (2002).** "Homing and clonogenic outgrowth of CD34(+) peripheral blood stem cells: a role for L-selectin?" *Exp Hematol* **30**(6): 590-7.
- Delaguillaumie A, Lagaudriere-Gesbert C, Popoff MR, Conjeaud H (2002).** "Rho GTPases link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes." *J Cell Sci* **115**(Pt 2): 433-43.
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG (1977).** "Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro." *J Cell Physiol* **91**(3): 335-44.
- Domen J, Cheshier SH, Weissman IL (2000).** "The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential." *J Exp Med* **191**(2): 253-64.

- Domen J, Weissman IL (2000).** "Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other." *J Exp Med* **192**(12): 1707-18.
- Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC (1995).** "KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2." *Science* **268**(5212): 884-6.
- Dong JT, Suzuki H, Pin SS, Bova GS, Schalken JA, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT (1996).** "Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss." *Cancer Res* **56**(19): 4387-90.
- Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR (1994).** Current protocols in human genetics. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Duriez C, Falette N, Cortes U, Moyret-Lalle C, Puisieux A (2000).** "Absence of p53-dependent induction of the metastatic suppressor KAI1 gene after DNA damage." *Oncogene* **19**(20): 2461-4.
- Eaves AC, Cashman JD, Gaboury LA, Eaves CJ (1987).** "Clinical significance of long-term cultures of myeloid blood cells." *Crit Rev Oncol Hematol* **7**(2): 125-38.
- Eaves CJ, Cashman JD, Eaves AC (1991).** "Methodology of long-term culture of human hemopoietic cells." *J Tiss Cult Meth* **13**: 55-62.
- Engel P, Gribben JG, Freeman GJ, Zhou LJ, Nozawa Y, Abe M, Nadler LM, Wakasa H, Tedder TF (1994).** "The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen." *Blood* **84**(5): 1402-7.
- Fambrough D, McClure K, Kazlauskas A, Lander ES (1999).** "Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes." *Cell* **97**(6): 727-41.
- Francis K, Ramakrishna R, Holloway W, Palsson BO (1998).** "Two new pseudopod morphologies displayed by the human hematopoietic KG1a progenitor cell line and by primary human CD34(+) cells." *Blood* **92**(10): 3616-23.
- Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Jr., Lombard LA, Gray GS, Nadler LM (1993).** "Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation." *Science* **262**(5135): 909-11.
- Gaugitsch HW, Hofer E, Huber NE, Schnabl E, Baumruker T (1991).** "A new superfamily of lymphoid and melanoma cell proteins with extensive homology to *Schistosoma mansoni* antigen Sm23." *Eur J Immunol* **21**(2): 377-83.

- Gil ML, Vita N, Lebel-Binay S, Miloux B, Chalon P, Kaghad M, Marchiol-Fournigault C, Conjeaud H, Caput D, Ferrara P, et al. (1992).** "A member of the tetra spans transmembrane protein superfamily is recognized by a monoclonal antibody raised against an HLA class I-deficient, lymphokine-activated killer-susceptible, B lymphocyte line. Cloning and preliminary functional studies." *J Immunol* **148**(9): 2826-33.
- Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF (1987).** "Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia." *Nature* **328**(6128): 342-4.
- Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, Sieftring JE, Williams EP, Jasti AC, Harris CE, Lee AW, Prabhakar R, Atkinson SJ, Kwiatkowski DJ, Williams DA (2003).** "Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases." *Science* **302**(5644): 445-9.
- Guo X, Friess H, Graber HU, Kashiwagi M, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW (1996).** "KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases." *Cancer Res* **56**(21): 4876-80.
- Guo XZ, Friess H, Di Mola FF, Heinicke JM, Abou-Shady M, Graber HU, Baer HU, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW (1998).** "KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **28**(6): 1481-8.
- Gupta P, McCarthy JB, Verfaillie CM (1996).** "Stromal fibroblast heparan sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells." *Blood* **87**(8): 3229-36.
- Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, Jordan CT (2001).** "Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells." *Blood* **98**(8): 2301-7.
- Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R (1998).** "IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools." *Nucleic Acids Res* **26**(1): 205-13.
- Hall A (1998).** "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." *Science* **279**(5350): 509-14.
- Han J, Luby-Phelps K, Das B, Shu X, Xia Y, Mosteller RD, Krishna UM, Falck JR, White MA, Broek D (1998).** "Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav." *Science* **279**(5350): 558-60.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD (1999).** "World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997." *J Clin Oncol* **17**(12): 3835-49.

- Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Hattori N, Taki T, Hasegawa H, Satoh S, Kobayashi N, Yamaoka Y, Miyake M (2003).** "Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer." *Br J Cancer* **89**(1): 158-67.
- Hatzfeld J, Li ML, Brown EL, Sookdeo H, Levesque JP, O'Toole T, Gurney C, Clark SC, Hatzfeld A (1991).** "Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor beta 1 or Rb oligonucleotides." *J Exp Med* **174**(4): 925-9.
- Hemler ME (2001).** "Specific tetraspanin functions." *J Cell Biol* **155**(7): 1103-7.
- Hinz M, Loser P, Mathas S, Krappmann D, Dorken B, Scheidereit C (2001).** "Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells." *Blood* **97**(9): 2798-807.
- Hirsch E, Iglesias A, Potocnik AJ, Hartmann U, Fassler R (1996).** "Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta1 integrins." *Nature* **380**(6570): 171-5.
- Hogge DE, Lansdorp PM, Reid D, Gerhard B, Eaves CJ (1996).** "Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor." *Blood* **88**(10): 3765-73.
- Hotchin NA, Hall A (1995).** "The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases." *J Cell Biol* **131**(6 Pt 2): 1857-65.
- Hotta H, Ross AH, Huebner K, Isobe M, Wendeborn S, Chao MV, Ricciardi RP, Tsujimoto Y, Croce CM, Koprowski H (1988).** "Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression." *Cancer Res* **48**(11): 2955-62.
- Huang CI, Kohno N, Ogawa E, Adachi M, Taki T, Miyake M (1998).** "Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients." *Am J Pathol* **153**(3): 973-83.
- Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD, Bennett HA, Coffey E, Dai H, He YD, Kidd MJ, King AM, Meyer MR, Slade D, Lum PY, Stepaniants SB, Shoemaker DD, Gachotte D, Chakraborty K, Simon J, Bard M, Friend SH (2000).** "Functional discovery via a compendium of expression profiles." *Cell* **102**(1): 109-26.
- Hurley RW, McCarthy JB, Verfaillie CM (1995).** "Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation." *J Clin Invest* **96**(1): 511-9.

- Hurley RW, McCarthy JB, Wayner EA, Verfaillie CM (1997).** "Monoclonal antibody crosslinking of the alpha 4 or beta 1 integrin inhibits committed clonogenic hematopoietic progenitor proliferation." *Exp Hematol* **25**(4): 321-8.
- Ichikawa T, Ichikawa Y, Dong J, Hawkins AL, Griffin CA, Isaacs WB, Oshimura M, Barrett JC, Isaacs JT (1992).** "Localization of metastasis suppressor gene(s) for prostatic cancer to the short arm of human chromosome 11." *Cancer Res* **52**(12): 3486-90.
- Ichikawa T, Ichikawa Y, Isaacs JT (1991).** "Genetic factors and suppression of metastatic ability of prostatic cancer." *Cancer Res* **51**(14): 3788-92.
- Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, Sasada R, Miyake M (1993).** "Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA." *J Exp Med* **177**(5): 1231-7.
- Imai T, Fukudome K, Takagi S, Nagira M, Furuse M, Fukuhara N, Nishimura M, Hinuma Y, Yoshie O (1992).** "C33 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T cell leukemia virus type 1-induced syncytium formation is a member of a new family of transmembrane proteins including CD9, CD37, CD53, and CD63." *J Immunol* **149**(9): 2879-86.
- Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O (1995).** "Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82." *J Immunol* **155**(3): 1229-39.
- Imai T, Yoshie O (1993).** "C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells." *J Immunol* **151**(11): 6470-81.
- Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ (1997).** "Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts." *Science* **275**(5306): 1649-52.
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001).** "Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells." *J Clin Invest* **107**(11): 1395-402.
- Jackson P, Grimm MO, Kingsley EA, Brosius U, Antalis T, Yardley G, Russell PJ (2002).** "Relationship between expression of KAI1 metastasis suppressor gene, mRNA levels and p53 in human bladder and prostate cancer cell lines." *Urol Oncol* **7**(3): 99-104.
- Janiak M, Sawicki G, Janowska-Wieczorek A (1994).** "Expression of beta 1 integrin mRNAs in human leukemic blasts." *Leukemia* **8**(9): 1544-50.
- Jennings LK, Fox CF, Kouns WC, McKay CP, Ballou LR, Schultz HE (1990).** "The activation of human platelets mediated by anti-human platelet p24/CD9 monoclonal antibodies." *J Biol Chem* **265**(7): 3815-22.

- Kalla P, Hintz-Obertreis P, Wilke A, Griss P, Seiler FR, Rude E, Krumwieg D (1991).** "Bone marrow obtained during hip surgery: a novel source for studies of hemopoiesis in human long-term bone marrow culture (LTBMC)." *Behring Inst Mitt*(90): 93-8.
- Kapur R, Cooper R, Zhang L, Williams DA (2001).** "Cross-talk between alpha(4)beta(1)/alpha(5)beta(1) and c-Kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-activated protein kinase, and Akt signaling pathways." *Blood* **97**(7): 1975-81.
- Kerst JM, Sanders JB, Slaper-Cortenbach IC, Doorakkers MC, Hooibrink B, van Oers RH, von dem Borne AE, van der Schoot CE (1993).** "Alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way." *Blood* **81**(2): 344-51.
- Kitadokoro K, Bordo D, Galli G, Petracca R, Falugi F, Abrignani S, Grandi G, Bolognesi M (2001).** "CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs." *Embo J* **20**(1-2): 12-8.
- Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R (1999).** "Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia." *Blood* **93**(9): 3074-80.
- Koeffler HP, Golde DW (1980).** "Human myeloid leukemia cell lines: a review." *Blood* **56**(3): 344-50.
- Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997).** "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." *Cell* **91**(5): 661-72.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001).** "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." *Cell* **105**(3): 369-77.
- Kuijpers TW, Tool AT, van der Schoot CE, Ginsel LA, Onderwater JJ, Roos D, Verhoeven AJ (1991).** "Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation." *Blood* **78**(4): 1105-11.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M (2000).** "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." *Nat Med* **6**(11): 1229-34.
- Lagaudriere-Gesbert C, Le Naour F, Lebel-Binay S, Billard M, Lemichez E, Boquet P, Boucheix C, Conjeaud H, Rubinstein E (1997a).** "Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity." *Cell Immunol* **182**(2): 105-12.

- Lagaudriere-Gesbert C, Lebel-Binay S, Hubeau C, Fradelizi D, Conjeaud H (1998).** "Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its association with the cytoskeleton leading to sustained morphological changes and T cell activation." *Eur J Immunol* **28**(12): 4332-44.
- Lagaudriere-Gesbert C, Lebel-Binay S, Wiertz E, Ploegh HL, Fradelizi D, Conjeaud H (1997b).** "The tetraspanin protein CD82 associates with both free HLA class I heavy chain and heterodimeric beta 2-microglobulin complexes." *J Immunol* **158**(6): 2790-7.
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C (2000).** "Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice." *Science* **287**(5451): 319-21.
- Lebel-Binay S, Gil ML, Lagaudriere C, Miloux B, Marchiol-Fournigault C, Quillet-Mary A, Lopez M, Fradelizi D, Conjeaud H (1994).** "Further characterization of CD82/IA4 antigen (type III surface protein): an activation/differentiation marker of mononuclear cells." *Cell Immunol* **154**(1): 468-83.
- Lebel-Binay S, Lagaudriere C, Fradelizi D, Conjeaud H (1995a).** "CD82, member of the tetra-span-transmembrane protein family, is a costimulatory protein for T cell activation." *J Immunol* **155**(1): 101-10.
- Lebel-Binay S, Lagaudriere C, Fradelizi D, Conjeaud H (1995b).** "CD82, tetra-span-transmembrane protein, is a regulated transducing molecule on U937 monocytic cell line." *J Leukoc Biol* **57**(6): 956-63.
- Lee JH, Seo YW, Park SR, Kim YJ, Kim KK (2003).** "Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression." *Cancer Res* **63**(21): 7247-55.
- Lemieux ME, Rebel VI, Lansdorp PM, Eaves CJ (1995).** "Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures." *Blood* **86**(4): 1339-47.
- Lemischka IR (1997).** "Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells." *Stem Cells* **15**(Suppl 1): 63-8.
- Lemischka IR, Raulet DH, Mulligan RC (1986).** "Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells." *Cell* **45**(6): 917-27.
- Levesque JP, Leavesley DI, Niuitta S, Vadas M, Simmons PJ (1995).** "Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins." *J Exp Med* **181**(5): 1805-15.
- Levesque JP, Zannettino AC, Pudney M, Niuitta S, Haylock DN, Snapp KR, Kansas GS, Berndt MC, Simmons PJ (1999).** "PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis." *Immunity* **11**(3): 369-78.

- Lin SL, Derr D, Hildreth JE (1992).** "A monoclonal antibody against a novel 20-kDa protein induces cell adhesion and cytoskeleton-dependent morphologic changes." *J Immunol* **149**(8): 2549-59.
- Liu E, Hjelle B, Morgan R, Hecht F, Bishop JM (1987).** "Mutations of the Kirsten-ras proto-oncogene in human preleukaemia." *Nature* **330**(6144): 186-8.
- Lombardi DP, Geradts J, Foley JF, Chiao C, Lamb PW, Barrett JC (1999).** "Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer." *Cancer Res* **59**(22): 5724-31.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S (1997).** "The tetraspanin superfamily: molecular facilitators." *Faseb J* **11**(6): 428-42.
- Mannion BA, Berditchevski F, Kraeft SK, Chen LB, Hemler ME (1996).** "Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associated with integrin alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29)." *J Immunol* **157**(5): 2039-47.
- Masellis-Smith A, Jensen GS, Seehafer JG, Slupsky JR, Shaw AR (1990).** "Anti-CD9 monoclonal antibodies induce homotypic adhesion of pre-B cell lines by a novel mechanism." *J Immunol* **144**(5): 1607-13.
- Masellis-Smith A, Shaw AR (1994).** "CD9-regulated adhesion. Anti-CD9 monoclonal antibody induce pre-B cell adhesion to bone marrow fibroblasts through de novo recognition of fibronectin." *J Immunol* **152**(6): 2768-77.
- Mashimo T, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, Miura K, Tegtmeyer PJ, Rinker-Shaeffer CW, Watabe K (1998).** "The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19): 11307-11.
- Mason D, Simmons D, Buckley C, Albiez RS, Hadam M, Saalmuller A, Clark E, Malavasi F, Morrissey JA, Vivier E (2002).** *Leucocyte Typing VII*. Oxford, Oxford University Press.
- Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, Akiyama T, Kuroda H, Kawano Y, Kobune M, Kato J, Hirayama Y, Sakamaki S, Kohda K, Miyake K, Niitsu Y (2003).** "Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia." *Nat Med* **9**(9): 1158-65.
- Mayani H, Lansdorp PM (1998).** "Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells." *Stem Cells* **16**(3): 153-65.
- Mayo MW, Baldwin AS (2000).** "The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance." *Biochim Biophys Acta* **1470**(2): M55-62.

- McWhirter JR, Wang JY (1993).** "An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias." *Embo J* **12**(4): 1533-46.
- Medvinsky A, Dzierzak E (1996).** "Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region." *Cell* **86**(6): 897-906.
- Miller JS, McCullar V, Punzel M, Lemischka IR, Moore KA (1999).** "Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells." *Blood* **93**(1): 96-106.
- Mitchison TJ, Cramer LP (1996).** "Actin-based cell motility and cell locomotion." *Cell* **84**(3): 371-9.
- Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW (1991a).** "Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis." *J Exp Med* **173**(3): 599-607.
- Miyake M, Koyama M, Seno M, Ikeyama S (1991b).** "Identification of the motility-related protein (MRP-1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility." *J Exp Med* **174**(6): 1347-54.
- Miyake M, Nakano K, Itoi SI, Koh T, Taki T (1996).** "Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer." *Cancer Res* **56**(6): 1244-9.
- Miyazaki T, Kato H, Shitara Y, Yoshikawa M, Tajima K, Masuda N, Shouji H, Tsukada K, Nakajima T, Kuwano H (2000).** "Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma." *Cancer* **89**(5): 955-62.
- Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL (1995).** "The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10302-6.
- Morrison SJ, Prowse KR, Ho P, Weissman IL (1996).** "Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential." *Immunity* **5**(3): 207-16.
- Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL (1997).** "Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors." *Development* **124**(10): 1929-39.
- Morrison SJ, Weissman IL (1994).** "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." *Immunity* **1**(8): 661-73.
- Nagata K, Sagara J, Ichikawa Y (1980).** "Changes in contractile proteins during differentiation of myeloid leukemia cells. I. Polymerization of actin." *J Cell Biol* **85**(2): 273-82.

- Nagira M, Imai T, Ishikawa I, Uwabe KI, Yoshie O (1994).** "Mouse homologue of C33 antigen (CD82), a member of the transmembrane 4 superfamily: complementary DNA, genomic structure, and expression." *Cell Immunol* **157**(1): 144-57.
- Neubauer A, Dodge RK, George SL, Davey FR, Silver RT, Schiffer CA, Mayer RJ, Ball ED, Wurster-Hill D, Bloomfield CD, et al. (1994).** "Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia." *Blood* **83**(6): 1603-11.
- Nishihara H, Maeda M, Oda A, Tsuda M, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S (2002).** "DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in human leukemia cell lines." *Blood* **100**(12): 3968-74.
- Nojima Y, Hirose T, Tachibana K, Tanaka T, Shi L, Doshen J, Freeman GJ, Schlossman SF, Morimoto C (1993).** "The 4F9 antigen is a member of the tetraspan transmembrane protein family and functions as an accessory molecule in T cell activation and adhesion." *Cell Immunol* **152**(1): 249-60.
- Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F (2000).** "Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1." *Curr Biol* **10**(16): 1009-12.
- Odintsova E, Voortman J, Gilbert E, Berditchevski F (2003).** "Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR." *J Cell Sci* **116**(Pt 22): 4557-66.
- Olson MF, Ashworth A, Hall A (1995).** "An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1." *Science* **269**(5228): 1270-2.
- Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S (1990).** "TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins." *Mol Cell Biol* **10**(8): 4007-15.
- Oritani K, Wu X, Medina K, Hudson J, Miyake K, Gimble JM, Burstein SA, Kincade PW (1996).** "Antibody ligation of CD9 modifies production of myeloid cells in long-term cultures." *Blood* **87**(6): 2252-61.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001).** "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium." *Nature* **410**(6829): 701-5.
- Ormerod MG (1998).** "The study of apoptotic cells by flow cytometry." *Leukemia* **12**(7): 1013-25.
- Ormerod MG, Kubbies M (1992).** "Cell cycle analysis of asynchronous cell populations by flow cytometry using bromodeoxyuridine label and Hoechst-propidium iodide stain." *Cytometry* **13**(7): 678-85.

- Otsuka T, Thacker JD, Eaves CJ, Hogge DE (1991).** "Differential effects of microenvironmentally presented interleukin 3 versus soluble growth factor on primitive human hematopoietic cells." *J Clin Invest* **88**(2): 417-22.
- Papayannopoulou T, Nakamoto B (1993).** "Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9374-8.
- Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B (1998).** "Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway." *Blood* **91**(7): 2231-9.
- Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B, Zafiropoulos V, Scott LM (2001).** "Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins." *Blood* **98**(8): 2403-11.
- Petzer AL, Hogge DE, Landsdorp PM, Reid DS, Eaves CJ (1996).** "Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1470-4.
- Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM (1998).** "Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading." *Mol Biol Cell* **9**(7): 1863-71.
- Prosper F, Verfaillie CM (2001).** "Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors." *J Leukoc Biol* **69**(3): 307-16.
- Rasmussen AM, Blomhoff HK, Stokke T, Horejsi V, Smeland EB (1994).** "Cross-linking of CD53 promotes activation of resting human B lymphocytes." *J Immunol* **153**(11): 4997-5007.
- Re F, Arpinati M, Testoni N, Ricci P, Terragna C, Preda P, Ruggeri D, Senese B, Chirumbolo G, Martelli V, Urbini B, Baccarani M, Tura S, Rondelli D (2002).** "Expression of CD86 in acute myelogenous leukemia is a marker of dendritic/monocytic lineage." *Exp Hematol* **30**(2): 126-34.
- Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA (1999).** "Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton." *Embo J* **18**(3): 578-85.
- Reuss-Borst MA, Klein G, Waller HD, Muller CA (1995).** "Differential expression of adhesion molecules in acute leukemia." *Leukemia* **9**(5): 869-74.
- Reuther GW, Lambert QT, Booden MA, Wennerberg K, Becknell B, Marcucci G, Sondek J, Caligiuri MA, Der CJ (2001).** "Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor, a Dbl family protein found mutated in leukemia, causes transformation by activation of RhoA." *J Biol Chem* **276**(29): 27145-51.
- Ridley AJ, Hall A (1992).** "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." *Cell* **70**(3): 389-99.

- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992).** "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." *Cell* **70**(3): 401-10.
- Rinker-Schaeffer CW, Hawkins AL, Ru N, Dong J, Stoica G, Griffin CA, Ichikawa T, Barrett JC, Isaacs JT (1994).** "Differential suppression of mammary and prostate cancer metastasis by human chromosomes 17 and 11." *Cancer Res* **54**(23): 6249-56.
- Rubinstein E, Le Naour F, Lagaudriere-Gesbert C, Billard M, Conjeaud H, Boucheix C (1996).** "CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins." *Eur J Immunol* **26**(11): 2657-65.
- Ruscetti FW, Keller JR, Longo DL (1999).** Funktionsstörungen der Hämatopoese. Harrisons Innere Medizin. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JD, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. New York, McGraw-Hill: 759-765.
- Salesse S, Verfaillie CM (2002).** "Mechanisms underlying abnormal trafficking and expansion of malignant progenitors in CML: BCR/ABL-induced defects in integrin function in CML." *Oncogene* **21**(56): 8605-11.
- Salgia R, Li JL, Ewaniuk DS, Pear W, Pisick E, Burky SA, Ernst T, Sattler M, Chen LB, Griffin JD (1997).** "BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function." *J Clin Invest* **100**(1): 46-57.
- Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, Largman C, Lawrence HJ, Humphries RK (1994).** "Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 12223-7.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995).** "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* **270**(5235): 467-70.
- Schoenfeld N, Bauer MK, Grimm S (2004).** "The metastasis suppressor gene C33/CD82/KAI1 induces apoptosis through reactive oxygen intermediates." *Faseb J* **18**(1): 158-60.
- Schofield R (1983).** "The stem cell system." *Biomed Pharmacother* **37**(8): 375-80.
- Seehafer JG, Shaw AR (1991).** "Evidence that the signal-initiating membrane protein CD9 is associated with small GTP-binding proteins." *Biochem Biophys Res Commun* **179**(1): 401-6.
- Shaw AR, Domanska A, Mak A, Gilchrist A, Dobler K, Visser L, Poppema S, Fliegel L, Letarte M, Willett BJ (1995).** "Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers beta 1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* **270**(41): 24092-9.

- Shaw S, Turni L, Katz K (1998).** "Protein Reviews On The Web: Controlling the flood of biological information." *Immunology Today* **18**: 557-558.
- Shibagaki N, Hanada K, Yamaguchi S, Yamashita H, Shimada S, Hamada H (1998).** "Functional analysis of CD82 in the early phase of T cell activation: roles in cell adhesion and signal transduction." *Eur J Immunol* **28**(4): 1125-33.
- Shibagaki N, Hanada K, Yamashita H, Shimada S, Hamada H (1999).** "Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1 / ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation." *Eur J Immunol* **29**(12): 4081-91.
- Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ (2000).** "Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'." *Trends Cell Biol* **10**(4): 147-54.
- Shinohara T, Miki T, Nishimura N, Nokihara H, Hamada H, Mukaida N, Sone S (2001).** "Nuclear factor-kappaB-dependent expression of metastasis suppressor KAI1/CD82 gene in lung cancer cell lines expressing mutant p53." *Cancer Res* **61**(2): 673-8.
- Si Z, Hersey P (1993).** "Expression of the neuroglandular antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversely related to metastatic potential of melanoma." *Int J Cancer* **54**(1): 37-43.
- Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torok-Storb B, Gallatin WM (1992).** "Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells." *Blood* **80**(2): 388-95.
- Sitnicka E, Ruscetti FW, Priestley GV, Wolf NS, Bartelmez SH (1996).** "Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells." *Blood* **88**(1): 82-8.
- Soma T, Yu JM, Dunbar CE (1996).** "Maintenance of murine long-term repopulating stem cells in ex vivo culture is affected by modulation of transforming growth factor-beta but not macrophage inflammatory protein-1 alpha activities." *Blood* **87**(11): 4561-7.
- Spertini O, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Tedder TF (1991a).** "Regulation of leukocyte migration by activation of the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin." *Nature* **349**(6311): 691-4.
- Spertini O, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Jr., Tedder TF (1992).** "Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions." *J Exp Med* **175**(6): 1789-92.
- Spertini O, Luscinskas FW, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Gimbrone MA, Jr., Tedder TF (1991b).** "Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin)

- interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion." *J Immunol* **147**(8): 2565-73.
- Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM (1989).** "Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro." *Blood* **74**(5): 1563-70.
- Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ (1990).** "Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(9): 3584-8.
- Szollosi J, Horejsi V, Bene L, Angelisova P, Damjanovich S (1996).** "Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY." *J Immunol* **157**(7): 2939-46.
- Tai XG, Yashiro Y, Abe R, Toyooka K, Wood CR, Morris J, Long A, Ono S, Kobayashi M, Hamaoka T, Neben S, Fujiwara H (1996).** "A role for CD9 molecules in T cell activation." *J Exp Med* **184**(2): 753-8.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001).** "Small GTP-binding proteins." *Physiol Rev* **81**(1): 153-208.
- Takaoka A, Hinoda Y, Sato S, Itoh F, Adachi M, Hareyama M, Imai K (1998a).** "Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells." *Jpn J Cancer Res* **89**(4): 397-404.
- Takaoka A, Hinoda Y, Satoh S, Adachi Y, Itoh F, Adachi M, Imai K (1998b).** "Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene." *Oncogene* **16**(11): 1443-53.
- Taniguchi Y, Komatsu N, Moriuchi T (1995).** "Overexpression of the HOX4A (HOXD3) homeobox gene in human erythroleukemia HEL cells results in altered adhesive properties." *Blood* **85**(10): 2786-94.
- Taswell C (1981).** "Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis." *J Immunol* **126**(4): 1614-9.
- Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, Humphries K, Sauvageau G (2002).** "Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion." *Blood* **99**(1): 121-9.
- Till JE, McCullough EA (1961).** "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." *Radiation Res* **14**: 213-222.
- Todd SC, Lipps SG, Crisa L, Salomon DR, Tsoukas CD (1996).** "CD81 expressed on human thymocytes mediates integrin activation and interleukin 2-dependent proliferation." *J Exp Med* **184**(5): 2055-60.

- Todres E, Nardi JB, Robertson HM (2000).** "The tetraspanin superfamily in insects." *Insect Mol Biol* **9**(6): 581-90.
- Tomlinson MG, Wright MD (1996).** "A new transmembrane 4 superfamily molecule in the nematode, *Caenorhabditis elegans*." *J Mol Evol* **43**(3): 312-4.
- Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Li ZG, Hong T, Miyake M, Imamura M (1999).** "Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely correlate with lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma." *Br J Cancer* **79**(7-8): 1168-73.
- Uzawa K, Ono K, Suzuki H, Tanaka C, Yakushiji T, Yamamoto N, Yokoe H, Tanzawa H (2002).** "High prevalence of decreased expression of KAI1 metastasis suppressor in human oral carcinogenesis." *Clin Cancer Res* **8**(3): 828-35.
- van der Sluijs JP, de Jong JP, Brons NH, Ploemacher RE (1990).** "Marrow repopulating cells, but not CFU-S, establish long-term in vitro hemopoiesis on a marrow-derived stromal layer." *Exp Hematol* **18**(8): 893-6.
- van Oostveen J, Bijl J, Raaphorst F, Walboomers J, Meijer C (1999).** "The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies." *Leukemia* **13**(11): 1675-90.
- Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM (1994).** "Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21): 9857-60.
- Verfaillie CM (1992).** "Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis." *Blood* **79**(11): 2821-6.
- Verfaillie CM (1993).** "Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation." *Blood* **82**(7): 2045-53.
- Verfaillie CM, Catanzaro P (1996).** "Direct contact with stroma inhibits proliferation of human long-term culture initiating cells." *Leukemia* **10**(3): 498-504.
- Verfaillie CM, Catanzarro PM, Li WN (1994).** "Macrophage inflammatory protein 1 alpha, interleukin 3 and diffusible marrow stromal factors maintain human hematopoietic stem cells for at least eight weeks in vitro." *J Exp Med* **179**(2): 643-9.
- Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB (1991).** "Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin." *J Exp Med* **174**(3): 693-703.

- Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB (1992).** "Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV." *J Clin Invest* **90**(4): 1232-41.
- Verfaillie CM, Miller JS (1995).** "A novel single-cell proliferation assay shows that long-term culture-initiating cell (LTC-IC) maintenance over time results from the extensive proliferation of a small fraction of LTC-IC." *Blood* **86**(6): 2137-45.
- Vischer UM, Wagner DD (1993).** "CD63 is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells." *Blood* **82**(4): 1184-91.
- Watowich SS, Wu H, Socolovsky M, Klingmuller U, Constantinescu SN, Lodish HF (1996).** "Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 91-128.
- White A, Lamb PW, Barrett JC (1998).** "Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines." *Oncogene* **16**(24): 3143-9.
- Williams DA, Rios M, Stephens C, Patel VP (1991).** "Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions." *Nature* **352**(6334): 438-41.
- Winton EF, Colenda KW (1987).** "Use of long-term human marrow cultures to demonstrate progenitor cell precursors in marrow treated with 4-hydroperoxycyclophosphamide." *Exp Hematol* **15**(6): 710-4.
- Wright MD, Tomlinson MG (1994).** "The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily." *Immunol Today* **15**(12): 588-94.
- Yamada KM, Miyamoto S (1995).** "Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control." *Curr Opin Cell Biol* **7**(5): 681-9.
- Yamaguchi M, Ikebuchi K, Hirayama F, Sato N, Mogi Y, Ohkawara J, Yoshikawa Y, Sawada K, Koike T, Sekiguchi S (1998).** "Different adhesive characteristics and VLA-4 expression of CD34(+) progenitors in G0/G1 versus S+G2/M phases of the cell cycle." *Blood* **92**(3): 842-8.
- Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME (2001).** "Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells." *Cancer Res* **61**(13): 5284-8.
- Yang X, Welch DR, Phillips KK, Weissman BE, Wei LL (1997).** "KAI1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer." *Cancer Lett* **119**(2): 149-55.
- Yu Y, Yang JL, Markovic B, Jackson P, Yardley G, Barrett J, Russell PJ (1997).** "Loss of KAI1 messenger RNA expression in both high-grade and invasive human bladder cancers." *Clin Cancer Res* **3**(7): 1045-9.

Zandstra PW, Conneally E, Petzer AL, Piret JM, Eaves CJ (1997). "Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4698-703.

Zanjani ED, Flake AW, Almeida-Porada G, Tran N, Papayannopoulou T (1999). "Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4- dependent function." *Blood* **94**(7): 2515-22.

Zannettino AC, Buhring HJ, Niutta S, Watt SM, Benton MA, Simmons PJ (1998). "The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis." *Blood* **92**(8): 2613-28.

Zhang XA, Lane WS, Charrin S, Rubinstein E, Liu L (2003). "EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells." *Cancer Res* **63**(10): 2665-74.

Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ (1998). "Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested." *Oncogene* **17**(11 Reviews): 1415-38.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

95%-KI	95%-Konfidenzintervall
α MEM	α -Modification of Eagle´s Medium
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
As	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
Ca	Karzinom
CD	Leukozytendifferenzierungsantigen (engl. cluster designation)
cDNA	komplementäre DNA
CFC	Kolonie-bildende Zelle (engl. colony forming cell)
CFU	Kolonie-bildende Einheit, Zellklon (engl. colony forming unit)
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLP	gemeinsame lymphatische Progenitorzelle
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMP	gemeinsame myeloide Progenitorzelle
D-LTC	Myeloopoetische Langzeitkultur nach Dexter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
f	Frequenz
f_{LTC-IC}	Frequenz der LTC-IC
FAB-Klassifikation	French-American-British-Klassifikation der AML
FACS	Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
FL	Fluoreszenz
FSC	Vorwärtsstreuung (engl. forward scatter)
GF	Wachstumsfaktor(en) (engl. growth factor[s])
HLDA	humane Leukozytendifferenzierungsantigene
HSC	hämatopoetische Stammzelle (engl. hematopoietic stem cell)
IgG	Immunglobulin G

KAI1	Synonym für CD82 (chin. „kang ai“ = gegen Krebs)
kDa	Kilo-Dalton (Maßeinheit des Molekulargewichtes)
KM	Knochenmark
LDA	Limiting-Dilution-Analyse
LTC	Langzeitkultur (engl. long-term culture)
LTC-IC	Langzeitkultur-initiiierende Zelle (engl. LTC-initiating cell)
LT-HSC	hämatopoetische Stammzelle mit zeitlich unbegrenzten Stammzeleigenschaften (engl. long-term HSC)
mAb	monoklonale Antikörper
MACS	magnetische Zellsortierung
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MNC	mononukleäre Zellen
MPP	multipotente Progenitoren
MW	Mittelwert
pB	peripheres Blut
PBPC	periphere hämatopoetische Progenitor- und Stammzellen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
PMT	Photomultiplier
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SE	Standardfehler (engl. standard error)
SSC	Seitwärtsstreuung (engl. side scatter)
ST-HSC	hämatopoetische Stammzelle mit zeitlich begrenzten Stammzeleigenschaften (engl. short-term HSC)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. world health organisation)

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1-1 Modell der selbsterneuernden Teilung und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen. HSC können in LT-HSC und ST-HSC unterteilt werden, wobei erstere im Gegensatz zu letzteren eine unbegrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung zu haben scheinen. ST-HSC gehen aus LT-HSC hervor und differenzieren zu multipotenten Progenitoren (MPP) (Morrison et al., 1997). Aus diesen können zwei Arten oligopotenter Zellen hervorgehen, die lymphatischen Progenitoren (CLP) (Kondo et al., 1997) und die myeloischen Progenitoren (CMP) (Akashi et al., 1999). Über Zwischenstufen differenzieren sich diese zu reifen Blutzellen. 7
- Abbildung 1-2 Mikrofotografie eines typischen Zellklons, beobachtet an Tag 14 der Methylzellulose-Kultur einer LTC-IC-Kultur (Vergrößerung 100x) 10
- Abbildung 1-3 Schematische Struktur der Tetraspanine. Charakteristisch sind vier hydrophobe transmembranäre Domänen (TM 1-4), die zur Ausbildung einer kleinen, 20-28 Aminosäuren (As) langen, und einer großen, 76-131 As langen, extrazellulären Schleife (EC1 und EC2) mit kurzen, weniger als 19 As langen, intrazellulären C- und N-terminalen Enden führen (Wright und Tomlinson, 1994; Maecker et al., 1997). Zwischen TM2 und TM3 liegt eine kurze verbindende intrazelluläre Schleife. Von anderen Proteinen mit vier transmembranären Domänen unterscheiden sich die Tetraspanine durch eine große Zahl konservierter As, die vor allem im Bereich der TM (Wright und Tomlinson, 1994) und vermutlich spezifischer Motive der EC2 zu finden sind (Kitadokoro et al., 2001). 12
- Abbildung 2-1 Antikörper nach Immobilisation oder in Suspension. Antikörper können auf Plastikoberflächen immobilisiert werden, was als „panning“ bezeichnet wird. Alternativ kann die Zugabe der Antikörper als Suspension im Kulturmedium erfolgen. 22
- Abbildung 2-2 Schema der Zelladhäsionskultur. In einem 2-Kammer-Zellkultursystem werden monoklonale Antikörper immobilisiert. Durch Zugabe von bovinem Serumalbumin sollen unspezifische Bindungen minimiert werden. Die mAb sollen ortständige Bindungspartner imitieren, mit denen bestimmte Zellen über spezifische Oberflächenantigene interagieren können. 24
- Abbildung 2-3 Identifizierung von Zelloberflächenproteinen durch Fluoreszenzmarkierte Antikörper. Mit den Fluorochromen PE oder FITC markierte monoklonale Antikörper binden an spezifische Zelloberflächenantigene. Die Intensität der Fluoreszenz einer Zelle korreliert danach mit der Expression des entsprechenden Antigens. 25
- Abbildung 2-4 Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers. Die zu analysierenden Zellen kommen als Probenstrom in eine Quarzküvette, wo sie durch den Hüllstrom einer Trägerflüssigkeit einzeln zentral aufgereiht werden. Die Zellen treffen auf einen Laserstrahl, dessen Licht gestreut wird und der die Fluoreszenzfarbstoffe anregt. Das Streulicht und die emittierten Fluoreszenzen werden durch Spiegel- und Filtersysteme zu nachgeschalteten

- Detektoren mit Photomultipliern (PMT) als Verstärkern weitergeleitet. Diese wandeln die Fluoreszenz- und Streulichtsignale in elektrische Impulse um und senden diese zur Auswertung an einen Computer. 26
- Abbildung 2-5 Exemplarische Auswertung einer durchflusszytometrischen Analyse. Bild A zeigt eine Verteilung der Zellen auf Grund ihrer morphologischen Parameter (FSC, SSC). Es ist nur eine Zellpopulation dargestellt, die durch das elektronische Gate 1 zur weiteren Auswertung selektiert wird. Zelltrümmer befinden sich in der linken unteren Ecke. Bild B zeigt die Verteilung der selektierten Zellen für die Fluoreszenzparameter FL-1 und FL-2. Bild C zeigt ein Histogramm-Auswertung der selektierten Zellen, bei der die Fluoreszenzintensität gegen die absolute Zellzahl aufgetragen wird. Diese Darstellung ermöglicht eine relativ gute Quantifizierung der Fluoreszenz pro Zelle bzw. innerhalb der Zellpopulation. 27
- Abbildung 2-6 Schematische Darstellung einer Limiting-Dilution-Analyse. Auf die inneren 60 Kammern einer 96-Kammer-Kulturplatte werden Knochenmark-Stromazellen verteilt. Durch mehrtägige Kultur wird ein Zellrasen etabliert, auf welchen Testzellen in drei unterschiedlichen Konzentrationen gegeben werden. Die Kulturen werden für 5 Wochen aufrechterhalten und anschließend einzeln in Methylzellulose-Kulturen transferiert. Nach 14 Tagen Kultur erfolgt die mikroskopische Auswertung jeder Kulturkammer durch Detektion der enthaltenen Zellklone. Aus den ermittelten Daten können die LTC-IC-Frequenzen elektronisch berechnet werden. 33
- Abbildung 3-1 Repräsentative Bildausschnitte mikroskopischer Fotografien von auf immobilisierten CD82-Antikörpern kultivierten Zellen. A) CD34⁺ PBPC; B) AML 10, ohne morphologisch veränderte Zellen, entsprechend 9 von 13 AML; C) AML 6, mit morphologisch veränderten Zellen in verminderter Zahl, entsprechend 4 von 13 AML (Vergrößerung 40x). 37
- Abbildung 3-2 Boxplot-Darstellung der relativen Expressionsänderung bei CD82-Ligation. Zelladhäsionskulturen wurden mit 3 Proben normaler CD34⁺ PBPC und 10 Leukämiezellproben (AML) durchgeführt. Getrennt nach CD82-Antikörper und Isotyp-Kontrolle, wurde für jede Probe die Expression definierter Antigene als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch ermittelt. Zur Quantifizierung der Expressionsänderung bei CD82-Ligation wurde für jede Probe der Quotient aus MFI anti-CD82 und MFI Isotyp-Kontrolle gebildet, welcher zur besseren Veranschaulichung logarithmiert wurde. Die Darstellung zeigt eine Boxplot-Verteilung dieser Quotienten, getrennt nach normalen CD34⁺ PBPC (dunkelgrau) und Leukämiezellen (hellgrau). Jede Box entspricht dem Bereich vom 1. bis zum 3. Quartil, die Linie repräsentiert den Median, die dünnen Linien zeigen die 10. und 90. Perzentile, und Punkte stehen für außerhalb gelegene Quotienten. Pfeile verweisen auf eine deutliche Abweichung von der Nulllinie. 40
- Abbildung 3-3 Mittlere relative Expressionsänderung bei CD82-Ligation. Die Abbildung zeigt für jedes Antigen, getrennt nach normalen CD34⁺ PBPC und Leukämiezellen (AML) den Mittelwert (MW) der relativen Expressionsänderung bei CD82-Ligation mit seinem 95%-

- Konfidenzintervall. Für alle Populationen, deren Konfidenzintervall nicht die 0 einschließt, wurde ein zweiseitiger Einstichproben-t-Test zur Überprüfung der Abweichung von 0 durchgeführt, wobei ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ definiert wurde. Die ermittelten p-Werte sind angegeben. 41
- Abbildung 3-4 Ergebnisse der cDNA-Array-Analyse. Die Abbildung zeigt die normalisierten Signalintensitäten der zur Nachuntersuchung ausgewählten Gene. Es wurden 5 cDNA-Array-Analysen durchgeführt. Die erste RNA-Probe wurde aus der initialen, unstimulierten Zellpopulation normaler CD34⁺ PBPC extrahiert (Tag 0). Die übrigen Proben wurden aus normalen CD34⁺ PBPC nach Durchführung einer Zelladhäsionskultur mit CD82- oder Isotyp-Kontrollantikörper an den Tagen 2 und 4 gewonnen. 42
- Abbildung 3-5 Relative Unterschiede der Genexpression zwischen CD82-Antikörper und Isotyp-Kontrolle. Für die zur Nachuntersuchung ausgewählten Gene ist für die beiden Untersuchungszeitpunkte Tag 2 (dunkelgrau) und Tag 4 (hellgrau) jeweils die relative Änderung der normalisierten Signalintensität der mit CD82-Antikörper kultivierten Zellen bezogen auf die Isotyp-Kontrolle dargestellt. 43
- Abbildung 3-6 Ergebnisse der Nachuntersuchung mittels RT-PCR für Hox-D3. Mit 3 Proben normaler CD34⁺ PBPC, 2 Proben von Patienten mit AML und KG1a-Zellen wurden Zelladhäsionskulturen mit immobilisierten anti-CD82 mAb (+) und immobilisierter Isotyp-Kontrolle (-) durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit suspendierten anti-CD82 mAb generiert (sus). Nach 2 Tagen wurde RNA extrahiert. Dargestellt sind die Resultate der Nachuntersuchung mittels RT-PCR für das Gen Hox-D3, als Kontrolle der Methode wurde das Gen β -Aktin eingesetzt. 44
- Abbildung 3-7 Ergebnisse der visuellen Auszählung der ersten LTC-IC-Kultur. Die Abbildung zeigt für jede Zellkonzentration ein Diagramm mit einer Häufigkeitsverteilung der ermittelten Klonzahl pro Kulturkammer, jeweils getrennt nach anti-CD82 mAb (schwarz) und Isotyp mAb (grau). 45
- Abbildung 3-8 Ergebnisse der visuellen Auszählung der zweiten LTC-IC-Kultur. Die Abbildung zeigt für jede Zellkonzentration ein Diagramm mit einer Häufigkeitsverteilung der ermittelten Klonzahl pro Kulturkammer, jeweils getrennt nach anti-CD82 mAb (schwarz) und Isotyp mAb (grau). 46
- Abbildung 3-9 Ergebnisse der visuellen Auszählung der dritten LTC-IC-Kultur. Die Abbildung zeigt für jede Zellkonzentration ein Diagramm mit einer Häufigkeitsverteilung der ermittelten Klonzahl pro Kulturkammer, jeweils getrennt nach anti-CD82 mAb (schwarz) und Isotyp mAb (grau). 46
- Abbildung 3-10 Grafische Darstellung der geschätzten LTC-IC-Frequenzen der dritten LTC-IC-Kultur. Für beide Gruppen der dritten LTC-IC-Kultur repräsentiert die untere Linie die obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, die mittlere, gepunktete Linie die geschätzte f_{LTC-IC} und die obere Linie die untere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls. Die schwarzen Kreise entsprechen den gemessenen Ergebnissen der mit anti-CD82 mAb inkubierten Zellen, die grauen Quadrate denen der mit Isotyp mAb inkubierten Zellen. 49

Abbildung 4-1 Modelle der Effekte einer Ligation von CD82. Die inhibierenden Effekte des CD82-Antikörpers können einerseits durch einen tatsächlichen Verlust von LTC-IC in Form von Apoptose oder terminaler Differenzierung erklärt werden. Andererseits kann eine Regulation des Zellzyklus mit einem konsekutiven Ruhestadium der HSC ursächlich verantwortlich sein. Ebenso möglich ist eine Modulation der Interaktionen der HSC mit dem Knochenmark-Mikromilieu.

58

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1 Durchflusszytometrisch untersuchte Oberflächenantigene und verwendete Antikörper.	28
Tabelle 2-2 Untersuchte Gene und eingesetzte Primer. Zusätzlich angegeben sind die Länge des PCR-Produktes sowie die entsprechende Annealing-Temperatur.	30
Tabelle 3-1 Klinische Daten der untersuchten Proben von Patienten mit AML.	36
Tabelle 3-2 Differenzielle Effekte für Adhäsion und morphologische Veränderungen bei normalen CD34 ⁺ PBPC und Leukämiezellen von Patienten mit AML durch Ligation von CD82.	38
Tabelle 3-3 Experimentelle Daten für die Ermittlung der LTC-IC-Frequenzen. Die folgende Tabelle fasst diejenigen Daten und Ergebnisse der drei LTC-IC-Kulturen (Abbildung 3-7 bis Abbildung 3-9) zusammen, welche für die Berechnung der LTC-IC-Frequenzen benötigt werden.	47
Tabelle 3-4 Ermittelte LTC-IC-Frequenzen. Angegeben sind die berechneten LTC-IC-Frequenzen (f_{LTC-IC}) mit Standardfehler (SE) sowie 95%-KI. Mittels χ^2 -Tests wurde die Konsistenz der LTC-IC-Kultur mit dem Modell der LDA überprüft, wobei ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ definiert wurde. Die Auswertung erfolgte mittels der speziell für LDA konzipierten Software L-Calc 1.1.	48
Tabelle 3-5 Verhältnis der LTC-IC-Frequenzen der auf CD82-Antikörper kultivierten Zellen bezogen auf die Isotyp-Kontrolle. Zur Quantifizierung des Einflusses der CD82-Ligation auf den Erhalt von LTC-IC wurden die ermittelten LTC-IC-Frequenzen (f_{LTC-IC}) mittels der zur Auswertung von LDA konzipierten Software L-Calc 1.1 in Relation zueinander gesetzt. Angegeben ist das Verhältnis der f_{LTC-IC} der dritten LTC-IC-Kultur mit 95%-KI.	49

ANHANG

I. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Andreas Burchert** für die Überlassung des Themas, die methodische Anleitung, die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und Denken, die stetige Förderung meiner Kreativität und geistigen Flexibilität, seine große Bereitschaft jederzeit Anregungen und Hilfestellungen zu geben, seine stets konstruktive Kritik und die freundliche Betreuung.

Herrn **Prof. Dr. Andreas Neubauer** danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit, die vorbehaltlose Aufnahme unserer Ideen und die Übernahme des Referates.

Ich danke Herrn **PD Dr. Stefan Wölfl** von der Klinik für Innere Medizin in Jena für die Durchführung der cDNA-Array-Analyse und die Zusammenstellung der Daten.

Herrn **Oliver Hartmann** vom Institut für Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung der für diese Arbeit erhobenen Daten.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn **Albert Reisenleitner** für die guten Anregungen für die Erstellung der Abbildungen sowie die Überarbeitung der Fotografien.

Ein besonderer Dank gilt den **MitarbeiterInnen** der Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Immunologie für Anleitung, vielfältige Hilfe, Anregungen, konstruktive Kritik und wohlwollende Unterstützung. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Frau **Barbara Denecke**, die mich tatkräftig bei der Durchführung der Langzeitkultur-Experimente unterstützt hat.

Ich danke den **Stammzellspendern, Patienten mit AML** und **orthopädischen Patienten** für ihr Einverständnis, das benötigte Probenmaterial zur Verfügung zu stellen. Ich hoffe die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur besseren Versorgung von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Partnerin **Ines Hartke**, meiner **Familie** und meinen **Freunden**, die viel Geduld und Verständnis aufgebracht haben und mir während meines Studiums und der Promotion stets Rückhalt gaben.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der **Kempkes Stiftung**.

II. Meine akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold	Grzesik	Lippert	Schneider
Aumüller	Gudermann	Löffler	Schneyer
Bach	Happle	Maisch	Schüffel
Back	Hasilik	Mennel	Schulze
Bandmann	Herzum	Meyer-Wittstock	Schwarz
Bartalanaffy	Hörle	Moll	Seitz
Barth	Hoffmann	Moosdorf	Seyberth
Barth	Hofmann	Müller	Simon
Basler	Joseph	Müller	Sommer
Baum	Jungclas	Mutters	Steiniger
Bien	Kaluza	Neubauer	Sturm
Cetin	Kern	Oertel	Sundermeyer
Christiansen	Kill	Pfeiffer	Sure
Cziubayko	Kim-Berger	Prinz	Vogelmeier
Daut	Klaus	Radsak	Vohland
Dobbelstein	Klenk	Remschmidt	Voigt
Eilers	Klose	Renz	Wagner
Engenhardt-Cabillic	Koolman	Richter	Weihe
Feuser	Kraft	Riße ¹	Werner
Gemsa	Kretschmer	Röhm	Westermann
Gerdes	Krieg	Rosenow	Wulf
Geus	Kroh	Rothmund	
Görg	Kroll	Schäfer	
Görg	Kuhn	Schäfer	
Gotthardt	Lammel	Schepelmann	
Gotzen	Lang	Schmidt	
Grimm	Lange	Schmidt	
Griss	Lennartz	Schnabel	

¹ Institut für Rechtsmedizin Gießen

Meine weiteren akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Andresen ¹	Neudeck ⁵	Rühlmann ⁵	Wiedemann ¹
Hankeln ⁵	Olivier ³	Snow ³	Young ²
Janka ⁵	Pries ⁴	Stern ¹	
Klevansky ³	Rubayiza ²	Wenk ⁵	

- 1 Krankenhaus am Urban, Berlin, Abteilung für Kardiologie
- 2 West-Gonja-Hospital, Damongo, Ghana
- 3 Gold-Coast-Hospital, Southport, Australien, Department of Medical Imaging
- 4 Praxis für Innere Medizin, Dinklage
- 5 Zentralkrankenhaus Bremen-Nord, Bremen