

# **Funktionelle Analyse von Numb und Redefinition der humanen hämatopoetischen Hierarchie**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
der Fakultät für  
Biologie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
André Görgens  
aus Wermelskirchen  
September 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf begonnen und im Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Essen, Universität Duisburg-Essen, fortgeführt und beendet.

1. Gutachter: PD Dr. Bernd Giebel
2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Bertram Opalka

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>12</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Stammzellen</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Hämatopoetische Stammzellen und die Blutbildung</b>	<b>14</b>
1.2.1 Der embryonale Ursprung der Blutbildung	14
1.2.2 Nachweis und Analyse adulter hämatopoetischer Stammzellen	14
1.2.3 Immunphänotypisierung hämatopoetischer Stammzellen	17
1.2.4 Das hämatopoetische Modell	19
1.2.5 Quellen humaner hämatopoetischer Stammzellen	21
<b>1.3 Regulierung von Zellschicksalsentscheidungen in HSZ</b>	<b>22</b>
1.3.1 Mechanismen der Regulierung von Zellschicksalsentscheidungen	22
1.3.2 Die hämatopoetische Stammzellnische	25
1.3.3 Asymmetrische Zellteilung in hämatopoetischen Stammzellen	26
<b>1.4 Der Notch-Signalweg in der Hämatopoese</b>	<b>30</b>
<b>1.5 Die Zellschicksalsdeterminante Numb</b>	<b>31</b>
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>35</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>37</b>
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	37
2.1.2 Zellkulturmedien	38
2.1.3 Zytokine und Medienzusätze	39
2.1.4 Antikörper und Seren	40
2.1.5 Kits	41
2.1.6 Oligonukleotide und TaqMan-Sonden	41
2.1.7 Sonstige Chemikalien und Reagenzien	43
2.1.8 EDV-Programme	44
2.1.9 Bakterien	45
2.1.10 Zelllinien	45
2.1.11 Primärzellen	46
2.1.12 Mausstämme	47

---

<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>47</b>
2.2.1	Methoden der Zellkultur	47
2.2.1.1	Einfrieren / Auftauen von Zellen	47
2.2.1.2	Isolierung mononukleärer Zellen	48
2.2.1.3	Anreicherung humaner CD34 <sup>+</sup> Zellen	48
2.2.1.4	Kultivierung humaner CD34 <sup>+</sup> Zellen	50
2.2.2	Genetische Manipulation humaner CD34 <sup>+</sup> Zellen	50
2.2.2.1	Transfektion humaner CD34 <sup>+</sup> Zellen mittels Nukleofektion	50
2.2.2.2	Transduktion humaner CD34 <sup>+</sup> Zellen	51
2.2.3	Durchflusszytometrie	54
2.2.3.1	Durchflusszytometrische Analysen	55
2.2.3.2	Durchflusszytometrische Zellsortierung	56
2.2.4	<i>In vitro</i> Differenzierung von humanen HSVZ	58
2.2.4.1	CFC (Colony-Forming Cell)-Ansatz	58
2.2.4.2	Qualitative Analyse von Zellen aus einzelnen CFC-Kolonien	59
2.2.4.3	LTC-IC (Long-term culture-initiating cell)-Ansatz	60
2.2.4.4	NK-IC (Natural killer cell-initiating cell)-Ansatz	61
2.2.4.5	Erythrozytärer Flüssigkultur-Differenzierungsansatz	62
2.2.4.6	Megakaryozytärer Flüssigkultur-Differenzierungsansatz	62
2.2.5	Mausversuche	63
2.2.5.1	NOD/SCID- und NSG-Maus Repopulierungsansatz	63
2.2.5.2	Generierung von <i>Numb/Numblike Knockout</i> -Mäusen	64
2.2.6	Molekularbiologische Methoden	66
2.2.6.1	Bakterienkultur	66
2.2.6.2	Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i>	66
2.2.6.3	Transformation elektrokompetenter Bakterien	67
2.2.6.4	Isolierung von Plasmid-DNA	67
2.2.6.5	Enzymatische Spaltung von DNA	67
2.2.6.6	Ligation von DNA-Fragmenten	68
2.2.6.7	Agarose-Gelelektrophorese	68
2.2.6.8	Isolierung von RNA	68
2.2.6.9	Reverse Transkription zur Synthese von cDNA	69
2.2.6.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	69
2.2.6.11	Quantitative Real-Time-PCR (RT-qPCR)	69
2.2.7	Statistik	71



<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>72</b>
<b>3.1</b>	<b>Funktionelle Analyse von Numb in der humanen Hämatopoese</b>	<b>72</b>
3.1.1	Etablierung lentiviraler Numb-Überexpressionskonstrukte	73
3.1.2	Validierung des verwendeten Systems zum <i>Knockdown</i> von <i>Numb</i>	78
3.1.3	Analyse des Koloniebildungspotenzials nach genetischer Manipulation	80
3.1.4	Auswirkungen der genetischen Manipulation von Numb auf das Langzeitpotenzial von CD34 <sup>+</sup> Zellen	83
3.1.5	Durchflusszytometrische Analyse von CD34 <sup>+</sup> Zellen nach Numb-Überexpression	85
3.1.6	Analyse des Einflusses des Notch-Signalweges auf das Zellschicksal von HSVZ	88
3.1.7	Analyse des Effekts von Numb auf die Aktivierung des Notch-Signalweges	92
<b>3.2</b>	<b>Analyse der Subpopulationen CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup></b>	<b>97</b>
3.2.1	Charakterisierung der Expression von CD133 auf CD34 <sup>+</sup> Zellen	97
3.2.2	Analyse der Expression von linienspezifischen Oberflächenmarkern	98
3.2.3	Analyse des <i>in vitro</i> Langzeitpotenzials der durch CD133 definierten Subpopulationen	100
3.2.4	Analyse von CD133 <sup>+</sup> und CD133 <sup>low</sup> Zellen im NOD/SCID-Repopulierungsassay	101
3.2.5	Detaillierte Analyse der CD133 <sup>+</sup> und CD133 <sup>low</sup> Fraktionen im CFC-Ansatz	103
3.2.6	Charakterisierung der CD133 <sup>+</sup> und CD133 <sup>low</sup> Subpopulationen in humanen Apheresat-Proben und humanem Knochenmark	105
3.2.7	Sequenzielle Sortierung und Kultivierung von CD133 <sup>+</sup> Zellen	108
3.2.8	Sequenzielle Analyse der <i>in vitro</i> Entwicklung von CD34 <sup>+</sup> Zellen	110
3.2.9	Analyse des erythrozytären Potenzials von CD133 <sup>+</sup> Zellen <i>in vivo</i>	114
3.2.10	Immunphänotypisierung von Granulozyten in hämatopoetischen Kolonien	119
3.2.11	Analyse der Granulozytenkomposition hämatopoetischer Kolonien	122
3.2.12	Analyse von durch frisch isolierte HSVZ gebildeten Kolonien	124
3.2.13	Erweiterte Analyse von CD133 <sup>+</sup> Zellen mit CFU-MIX Potenzial	126
3.2.14	Analyse der Expression linien-assoziiierter Faktoren	127
3.2.15	Oberflächenexpression von CD133 im Kontext klassisch verwendeter Marker	129
<b>3.3</b>	<b>Die Rolle von Numb in der Maus-Hämatopoese</b>	<b>132</b>
3.3.1	Generierung von <i>Numb/Numblike Knockout</i> -Mäusen	133
3.3.2	Nachweis der <i>Vav-iCre</i> -vermittelten Deletion von <i>Numb</i> und <i>Numblike</i>	135
3.3.3	Analyse reifer Blutzellen im peripheren Blut der Mäuse	137
3.3.4	Quantitative Analyse von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Maus-Knochenmark	138
3.3.5	Analyse der T-Zell-Entwicklung nach Inaktivierung von <i>Numb</i> und <i>Numblike</i>	140

<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>142</b>
4.1	Die Entwicklungspotenziale humaner CD133 <sup>+</sup> und CD133 <sup>low</sup> Zellen	143
4.2	Die Rolle von Numb in der humanen Hämatopoese	156
4.3	Numb und der Notch-Signalweg	160
4.4	Numb in der Maus-Hämatopoese	162
4.5	Ausblick	165
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>167</b>
<b>6</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>169</b>
	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b>	<b>171</b>
	<b><i>Danksagung</i></b>	<b>185</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AGM	Aorta-Gonaden-Mesonephros
APC	Allophycocyanin
BaEoP	Basophil-Eosinophiler Progenitor
BFU-E	<i>burst forming unit-erythrocyte</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFC	<i>colony forming cell</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CFU-E	<i>colony forming unit-erythrocyte</i>
CFU-G	<i>colony forming unit-granulocyte</i>
CFU-GEMM	<i>colony forming unit-granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte</i>
CFU-GM	<i>colony forming unit-granulocyte-macrophage</i>
CFU-M	<i>colony forming unit-macrophage</i>
CFU-S	<i>colony forming unit-spleen</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CMF	<i>common myeloid progenitor</i>
CMV	humanes Cytomegalievirus
Ct	<i>cycle threshold</i>
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAPT	Difluorophenylacetyl-alanyl-phenylglycine-t-butyl-ester
DII	Delta-like
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dnMAML1	dominant-negatives Mastermind-like-1
ECD	<i>electron-coupled dye</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	eGFP
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMP	Erythro-myeloischer Progenitor
EoBP	Eosinophil-Basophiler Progenitor
EPO	Erythropoietin
EPX	Eosinophil-Peroxidase
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	fötales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3L	FLT3-Ligand
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

FSC	<i>forward scatter</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSFR	<i>granulocyte-macrophage-colony stimulating factor receptor</i>
GMP	Granulozyten-Makrophagen Progenitor
GPA	Glycophorin A
HDC	Histidin-Decarboxylase
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HSVZ	hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzelle
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
ICD	<i>intracellular domain</i>
IEG	IRES-eGFP
IGF	<i>insuline-like growth factor</i>
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kbp	Kilo-Basenpaare
lin	<i>lineage</i>
LMPP	<i>lymphoid-primed multipotent progenitor</i>
LSK	lineage <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> c-kit <sup>+</sup>
LTC-IC	<i>long-term culture initiating cell</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MegE	Megakaryozyten-Erythrozyten
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitor
MkP	Megakaryozytärer Progenitor
ML-IC	<i>myeloid-lymphoid initiating cell</i>
M-NK-IC	Makrophagen-NK-Zellen initiiierende Zelle
MNZ	mononukleare Zellen
MPO	Myeloperoxidase
MPP	multipotente Progenitorzelle
NK-IC	<i>natural killer cell-initiating cell</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD/SCID	<i>Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i>
NSG	<i>NOD/SCID gamma</i>
NTC	<i>no template-control</i>
NumbL	Numbllike
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>progenitor cell</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein

ProE	Pro-Erythroblast
PRR	Prolin-reiche Region
psi	<i>pound-force per square inch</i>
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SC	<i>stem cell</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOP	Sinnesorgan-Progenitorzelle
SRC	<i>SCID-repopulating cell</i>
SRZ	SCID-repopulierende Zelle
SSC	<i>side scatter</i>
TAMRA	Tetramethyl-Rhodamin
TPO	Thrombopoietin
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das klassische Modell der humanen Hämatopoese .....	20
Abb. 2: Extrinsische und intrinsische Kontrolle somatischer Stammzellen .....	24
Abb. 3: Kinetik der Expression der HSVZ-Marker CD133 und CD34 .....	29
Abb. 4: Schematische Darstellung der vier humanen Numb-Isoformen .....	34
Abb. 5: Durchflusszytometrische Messung vor und nach magnetischer Zellseparation .....	49
Abb. 6: Kriterien zum Ausschluss von Zell-Aggregaten In durchflusszytometrischen Messungen .....	58
Abb. 7: Validierung lentiviraler Expressionskonstrukte mittels durchflusszytometrischer Analyse nach intrazellulärer Numb-Färbung .....	75
Abb. 8: Experimentelle Strategie und Validierung des lentiviralen Systems an CD34 <sup>+</sup> Zellen.....	78
Abb. 9: Validierung des siRNA-vermittelten <i>Knockdowns</i> von <i>Numb</i> und <i>Numblike</i> .....	80
Abb. 10: Koloniebildungsraten nach Überexpression und Knockdown von Numb .....	82
Abb. 11: Analyse des Langzeitpotenzials von CD34 <sup>+</sup> Zellen nach genetischer Manipulation der Numb-Expression .....	84
Abb. 12: Quantifizierung der eGFP- und CD133-Expression in transduzierten CD34 <sup>+</sup> Zellen.....	86
Abb. 13: Einfluss der Induktion des Notch-Signalweges auf CD34 <sup>+</sup> Zellen .....	90
Abb. 14: Analyse des Einflusses der Zugabe von Überstand der OP9-GFP bzw. OP9-DL1 Zellen .....	92
Abb. 15: Analyse der Rolle von Numb auf die Aktivierung des Notch-Signalweges .....	95
Abb. 16: Definition der humanen HSVZ-Subpopulationen CD133 <sup>+</sup> und CD133 <sup>low</sup> .....	98
Abb. 17: Analyse gängiger linienspezifisch-exprimierter Oberflächenmarker auf CD34 <sup>+</sup> Zellen.....	99
Abb. 18: Analyse des myeloischen und lymphatischen Langzeitpotenzials in humanen HSVZ .....	100
Abb. 19: Analyse des Repopulierungspotenzials der HSVZ-Subpopulationen.....	102
Abb. 20: Vergleich des erythro-myeloischen Potenzials von CD133 <sup>+</sup> und CD133 <sup>low</sup> Zellen .....	103
Abb. 21: Analyse von CD133-Subpopulationen in CD34 <sup>+</sup> Zellen aus humanem Apheresat.....	106
Abb. 22: Analyse von CD133-Subpopulationen in CD34 <sup>+</sup> Zellen aus humanem Knochenmark.....	107
Abb. 23: Sequenzielle Analyse von CD133 <sup>+</sup> Zellen <i>in vitro</i> .....	109
Abb. 24: Darstellung der an Tag 0 und Tag 3 sortierten und analysierten Populationen.....	111
Abb. 25: Analyse der in Ery- und MK-Ansatz erhaltenen Zellen.....	112
Abb. 26: Sequenzielle Analyse des Differenzierungspotenzials von CD133-Subpopulationen .....	113
Abb. 27: Vergleich von CD133 <sup>+</sup> Zellen an Tag 3 und Tag 9 im NSG-Mausmodell .....	115
Abb. 28: Analyse des Multi-Linien- <i>Engraftments</i> in NSG-Mäusen.....	116

---

Abb. 29: Durchflusszytometrische Sortierung humaner CD133-Subpopulationen aus dem Knochenmark repopulierter NSG-Mäuse.....	117
Abb. 30: Koloniebildungsfrequenzen von aus Maus-Knochenmark isolierten humanen CD34 <sup>+</sup> Zellen .....	117
Abb. 31: Sekundäre Transplantation von Knochenmark im NSG-Mausmodell .....	119
Abb. 32: Isolierung einzelner hämatopoetischer Kolonien aus CFC-Ansätzen.....	120
Abb. 33: Immunphänotypische Charakterisierung hämatopoetischer Kolonien.....	121
Abb. 34: Identifikation immunphänotypisch unterschiedlicher Granulozyten in CFU-GM- und CFU-MIX Kolonien.....	122
Abb. 35: Nachweis von Granulozyten-Subtypen in CFU-MIX und CFU-GM Kolonien.....	123
Abb. 36: Granulozytenkomposition in durch Tag 0 Zellen gebildeten Kolonien.....	125
Abb. 37: Analyse von CFU-MIX Kolonien nach Replattierung.....	127
Abb. 38: Analyse der Expression linienspezifischer Faktoren .....	128
Abb. 39: CD133 im Kontext der klassischen Immunphänotypen von CMP, GMP und MEP .....	130
Abb. 40: Kreuzungsschema zur Generierung von <i>Numb/Numblike Knockout</i> -Mäusen.....	134
Abb. 41: Maus-Genotypisierung bei der Generierung von <i>Numb/Numblike Knockout</i> -Mäusen .....	135
Abb. 42: Nachweis der Vav-iCre vermittelten Rekombination der <i>Numb</i> - und <i>Numblike</i> -Allele.....	136
Abb. 43: Quantitative Analyse reifer Blutzellen nach <i>Knockout</i> von <i>Numb</i> und <i>Numblike</i> .....	137
Abb. 44: Quantifizierung verschiedener HSVZ-Subpopulationen im Maus-Knochenmark .....	139
Abb. 45: Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung im Thymus .....	140
Abb. 46: Analyse der T-Zell Reifung im Thymus nach <i>Numb/Numblike-Knockout</i> .....	141
Abb. 47: Segregation der hämatopoetischen Linienpotenziale in CD34 <sup>+</sup> Subpopulationen.....	144
Abb. 48: Vergleich humaner hämatopoetischer Modelle .....	145
Abb. 49: Enthaltene Granulozyten-Subtypen in Kolonien aus frisch isolierten CD34 <sup>+</sup> Zellen .....	149

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete konjugierte Antikörper zur Analyse humaner Zellen .....	40
Tabelle 2: Verwendete Antikörper zur Analyse muriner Zellen .....	40
Tabelle 3: Verwendete unkonjugierte Primärantikörper .....	41
Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper .....	41
Tabelle 5: Für immunzytologische Färbungen verwendete Seren .....	41
Tabelle 6: Übersicht der für Sequenzierungen verwendeten Primer .....	41
Tabelle 7: Übersicht über verwendete genspezifische Primer .....	42
Tabelle 8: Verwendete siRNA-Oligonukleotide .....	42
Tabelle 9: Übersicht der für die Genotypisierung von Mäusen verwendeten Primer .....	43
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten TaqMan-Assays .....	43
Tabelle 11: Mittlere Effizienzen bei der Transduktion von CD34 <sup>+</sup> Zellen (n=4).....	76



# 1 Einleitung

## 1.1 Stammzellen

Eine Stammzelle ist definitionsgemäß eine undifferenzierte Zelle, die sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung als auch zur Differenzierung besitzt. Dabei wird der Begriff „Stammzelle“ zur Beschreibung teilweise sehr unterschiedlicher Arten von Zellen mit Stammzeleigenschaften verwendet. In der öffentlichen Diskussion werden Stammzellen oft mit embryonalen Stammzellen gleichgesetzt. Dabei handelt es sich um Zellen, die nach Isolierung aus der Inneren Zellmasse von Embryonen im Blastozystenstadium unter definierten Bedingungen dauerhaft in der Zellkultur expandiert werden können und auch nach dieser Expansion in Zellen aller drei Keimblätter differenzierbar sind (Evans und Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Amit *et al.*, 2000; Keller, 2005).

Während der gesamten Lebensspanne eines adulten multizellulären Organismus müssen ständig spezialisierte Zellen in verletzten oder abgestorbenen Geweben oder nach natürlichem Verlust ersetzt werden. Diese Aufgabe wird von sogenannten somatischen oder adulten Stammzellen erfüllt, die nach Zellteilung determinierte, gewebespezifische Vorläuferzellen hervorbringen können, die durch weitere Differenzierung zu reifen, spezialisierten Zellen eine Regeneration des jeweiligen Gewebes ermöglichen. Auf der anderen Seite müssen somatische Stammzellen auch in der Lage sein, sich selbst zu erhalten, um den Gesamtgehalt an Stammzellen im jeweiligen Gewebe nahezu konstant zu halten. Eine Reduktion der Stammzellaktivität oder eine verringerte Anzahl an Stammzellen kann zur Degeneration des Gewebes führen, wie es z.B. bei der Alterung beobachtet werden kann (Ruzankina und Brown, 2007; Sharpless und DePinho, 2007; Rossi *et al.*, 2008). Andererseits kann die gesteigerte oder unkontrollierte Expansion von somatischen Stammzellen im Körper zur Entstehung von Krebserkrankungen führen (Al-Hajj, 2007; Visvader und Lindeman, 2008; Magee *et al.*, 2012). Somit wird ersichtlich, dass die Entscheidung zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung stringenten regulatorischen Mechanismen unterliegen muss. Das umfassende Verständnis solcher Mechanismen ist nicht zuletzt wegen der möglichen Relevanz im

Hinblick auf die langfristige Entwicklung neuer Therapieansätze ein fundamentales Anliegen der Stammzellbiologie.

## **1.2 Hämatopoetische Stammzellen und die Blutbildung**

### **1.2.1 Der embryonale Ursprung der Blutbildung**

Während der Embryonalentwicklung von Säugern entstehen die ersten zu beobachtenden hämatopoetischen (blutbildenden) Zellen in den Blutinseln des Dottersacks, in der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM)-Region des Embryos und in der Plazenta (Moore und Metcalf, 1970; Medvinsky *et al.*, 1993; Medvinsky und Dzierzak, 1996; Gekas *et al.*, 2005). Im weiteren Verlauf der Ontogenese besiedeln hämatopoetische Zellen die fötale Leber, die während eines Großteils der pränatalen Entwicklung den Hauptort der Blutbildung darstellt. Während der neonatalen Entwicklung wandern diese Zellen letztendlich über das Blut in das Knochenmark ein, dem Zentrum der adulten Hämatopoese (Dzierzak, 2002; Medvinsky *et al.*, 2011; Boisset und Robin, 2012).

Wie alle anderen Arten von somatischen Zellen mit Stammzeleigenschaften sind adulte hämatopoetische Stammzellen (HSZ) definitionsgemäß in der Lage, sich selbst zu erneuern und in alle verschiedenen, spezialisierten Blutzellen zu differenzieren. Im Gegensatz zu den meisten anderen somatischen Stammzellen werden HSZ im Rahmen von Knochenmarktransplantationen seit über 50 Jahren erfolgreich klinisch eingesetzt (Thomas *et al.*, 1957; Baron und Storb, 2004). HSZ und die zugrundeliegenden Mechanismen bei Differenzierungsprozessen wurden in den letzten Jahrzehnten durch eine ständige Weiterentwicklung verschiedener Analyse- und Nachweisverfahren immer besser verstanden.

### **1.2.2 Nachweis und Analyse adulter hämatopoetischer Stammzellen**

Bereits in den frühen 1950er Jahren zeigten Versuche, in denen letal bestrahlten Mäuse durch die Transplantation von Knochenmark gesunder Spendertiere geheilt wurden, dass das Knochenmark transplantierbare, blutbildende Zellen enthält (Jacobson *et al.*, 1951; Lorenz *et al.*, 1951). In den frühen 1960er Jahren wurde durch weitere Maus-Transplantationsexperimenten entdeckt, dass einzelne Zellen aus dem adulten Knochenmark einer Spendermaus in der Lage sind, Kolonien auf der Milz von letal bestrahlten Empfängermäusen zu bilden, die aus erythrozytären und weißen myeloischen Zellen bestehen (McCulloch und Till, 1960; Till und

McCulloch, 1961; Becker *et al.*, 1963). Diese koloniebildenden Zellen wurden als *Colony Forming Unit* (CFU) beschrieben und werden heute als CFU-S (engl. *spleen*; Milz) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass aus diesen Kolonien gewonnene Zellen wiederum in der Lage sind, in sekundären Empfängermäusen Kolonien hervorzubringen (Siminovitch *et al.*, 1963). In weiterführenden Experimenten konnten die Kolonie-bildenden Zellen näher als erythro-myeloischer Vorläuferzellen charakterisiert werden. Dabei wurden neben Mausversuchen auch erstmals klonale *in vitro* Analyseverfahren verwendet, sogenannte *Colony-Forming-Cell* (CFC)-Ansätze, bei denen in semisoliden Medien auf der Basis von Agar und später Methylzellulose die Bildung von hämatopoetischen Kolonien in der Zellkultur analysiert wurde (Worton *et al.*, 1969; Johnson und Metcalf, 1977; Humphries *et al.*, 1979; Hara *et al.*, 1980; Humphries *et al.*, 1981). Im Laufe der folgenden Jahrzehnte wurden hämatopoetische Stammzellen und der Aufbau des hämatopoetischen Systems in Mäusen durch Transplantationsversuche unter optimierten Bedingungen, Entwicklung weiterer *in vitro* Analyseverfahren und funktionelle Studien nach genetischer Manipulation der Mäuse bis heute immer weiter aufgeklärt (Akashi *et al.*, 2000; Purton und Scadden, 2007; Doulatov *et al.*, 2010).

Da sich am Menschen aus ethischen Gründen jegliche Experimente zur Aufklärung der Stammzellbiologie verbieten, wurden parallel Analyseverfahren zur Untersuchung humaner hämatopoetischer Zellen entwickelt. Dabei konnten die aus dem Maussystem bekannten CFC-Ansätze auch erfolgreich für humane Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) adaptiert werden (Pike und Robinson, 1970; Moore *et al.*, 1973). CFC-Ansätze werden in weiterentwickelter Form bis heute zur Analyse und Quantifizierung des erythro-myeloischen Differenzierungspotenzials von HSVZ in der Forschung und in der Klinik verwendet (Nissen-Druey *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2008). Ende der 1980er Jahre wurde durch Kokultivierung humaner HSVZ mit Stromazellen der sogenannten *Long-Term-Culture-Initiating-Cell* (LTC-IC)-Ansatz entwickelt, der wesentlich unreifere und den Stammzellen näher verwandte Zellen mit *in vitro* Langzeitpotenzial beschreibt als der CFC-Ansatz. Diese Vorläuferzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nach mehr als fünf Wochen *in vitro* Kultur noch in der Lage sind, in myeloische Zellen zu differenzieren (Sutherland *et al.*, 1989; Sutherland *et al.*, 1991).

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Charakterisierung der Eigenschaften humaner HSVZ war die Entwicklung xenogener Maus-Repopulierungsansätze. Nach Transplantation humaner hämatopoetischer Zellen in Mäuse können in diesem Analyseverfahren humane Zellen detektiert werden, die in der Lage sind, in das Knochenmark solcher Mäuse einzuwandern, menschliche Blutzellen über einen längeren Zeitraum hervorzubringen und Aspekte eines humanen Immunsystems in den Mäusen auszubilden (engl. *engraftment*). Zellen mit diesen Eigenschaften werden entsprechend des initial verwendeten SCID-Mausstammes (Lapidot *et al.*, 1992) SCID-repopulierende Zellen genannt (engl. *scid-repopulating cell*; SRC). Da in jeweils auf diese Weise repopulierten Mäusen verschiedene humane myeloische und lymphatische Blutzellen detektiert werden können, spricht man in diesem Zusammenhang von Multi-Linien-*Engraftment*. Durch Verkreuzungen der SCID-Mäuse mit anderen Mausstämmen wurden im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte weitere immundefiziente Mausstämme gezüchtet, die die jeweils transplantierten humanen Zellen besser unterstützen und tolerieren. Zunächst wurde hauptsächlich die NOD/SCID-Maus für xenogene Repopulierungsversuche verwendet (Shultz *et al.*, 1995). Seit einigen Jahren werden solche Experimente zunehmend mit Mäusen durchgeführt, denen aufgrund einer Deletion der  $\gamma$ -Untereinheit des für die NK-Zell Reifung wichtigen Interleukin-2 Rezeptors neben T- und B-Zellen auch NK-Zellen fehlen, sogenannte NSG (NOD/SCID *gamma*)-Mäuse (Shultz *et al.*, 2007).

Heutzutage sind bei der Erforschung humaner HSVZ sowohl Maus-Repopulierungsansätze als auch *in vitro* Analyseverfahren bedeutsam. Während der grundsätzliche Nachweis und die Quantifizierung von primitiven humanen HSVZ mit multipotentem Potenzial in der Regel durch Maus-Repopulierungsexperimente erfolgt, werden Differenzierungspotenziale von Vorläuferzellen in teilweise klonalen *in vitro* Analyseverfahren untersucht. Solche Verfahren ermöglichen die Analyse der Fähigkeit einer einzelnen humanen determinierten Vorläuferzelle, *in vitro* in eine bestimmte hämatopoetische Linie zu differenzieren. Aufgrund des in Vorläuferzellen im Gegensatz zu multipotenten Zellen eingeschränkten Selbsterneuerungs- bzw. Proliferationspotenzials ist deren Analyse in Repopulierungsversuchen *in vivo* dagegen nicht möglich.

Aus diesen Gründen stehen heute verschiedene *in vitro* Ausleseverfahren zur Analyse der Differenzierung humaner HSVZ in alle hämatopoetischen Linien zur

Verfügung. Beispielhaft seien hier neben den bereits erwähnten Verfahren Protokolle zur *in vitro* Differenzierung von humanen HSVZ in Erythrozyten (Dorn *et al.*, 2008), Megakaryozyten (Boyer *et al.*, 2008), B-Zellen (Vieira und Cumano, 2004), T-Zellen (La Motte-Mohs *et al.*, 2005) und NK-Zellen (Miller *et al.*, 1992) erwähnt, bei denen in der Regel durch Zusatz bestimmter Wachstumsfaktoren die Differenzierung der Zellen in die jeweilige Richtung induziert wird. Des Weiteren wurde zur Beurteilung des myeloischen und lymphatischen *in vitro* Langzeitpotenzials einzelner Zellen der ML-IC- (*myeloid-lymphoid initiating cell*-) Ansatz entwickelt (Punzel *et al.*, 1999c).

### 1.2.3 Immunphäotypisierung hämatopoetischer Stammzellen

Mit Hilfe der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Verfahren konnten die funktionellen Eigenschaften und Abhängigkeiten einzelner Zellen oder von Zellpopulationen muriner und humaner HSVZ immer weiter verstanden werden. Dabei war entscheidend, dass im Laufe der Zeit immer weitere Oberflächenmarker identifiziert wurden, anhand deren Expression verschiedene Populationen von HSVZ durchflusszytometrisch unterschieden und durch Sortierung getrennt analysiert werden konnten.

Als einer der ersten Oberflächenmarker für frühe humane hämatopoetische Zellen wurde das Glykoprotein CD34 beschrieben (Civin *et al.*, 1984; Katz *et al.*, 1985; Tindle *et al.*, 1985). Es konnte gezeigt werden, dass die Population der CD34-positiven (CD34<sup>+</sup>) Zellen neben den humanen HSZ sowohl myeloische als auch lymphatische Vorläuferzellen enthält (Krause *et al.*, 1996). Die Identifizierung weiterer Marker, darunter auch linienspezifisch-exprimierter Marker wie z.B. CD19 für B-Zellen und ihre Progenitoren (Tedder und Isaacs, 1989), ermöglichte die weitere Unterteilung der grundsätzlich heterogenen CD34<sup>+</sup> Population. Durch Verwendung linienspezifischer Marker gelang die Abgrenzung primitiverer HSVZ (engl. *lineage*<sup>-</sup>, *lin*<sup>-</sup>) von liniendeterminierten Zellen (engl. *lineage*<sup>+</sup>, *lin*<sup>+</sup>) innerhalb der CD34<sup>+</sup> Fraktion (Terstappen *et al.*, 1991). Im Weiteren konnten anhand der Expressionsstärke des Markers CD38 eher unreife Zellen als *lin*<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> Zellen von reiferen Progenitoren (*lin*<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) unterschieden werden (Terstappen *et al.*, 1991; Hao *et al.*, 1996; Larochelle *et al.*, 1996). Die Identifizierung weiterer Marker und Markerkombinationen führte im myeloischen Kompartiment innerhalb der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Fraktion zur Beschreibung von gemeinsamen myeloischen Vorläuferzellen (engl. *common myeloid progenitor*, CMP) über die Kombination

CD123<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>. Zudem konnten die hierarchisch unterhalb des CMP eingeordneten Granulozyten-Makrophagen Progenitoren (GMP; CD123<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) und die Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitoren (MEP; CD123<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) identifiziert werden (Manz *et al.*, 2002). Die Verwendung der Marker CD10 und CD7 erlaubte die weitere Abtrennung lymphatischer Vorläufer innerhalb der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Fraktion (Galy *et al.*, 1995; Six *et al.*, 2007; Doulatov *et al.*, 2010). Eine zusätzliche Unterteilung innerhalb der primitiveren, die multipotenten Vorläufer und HSZ enthaltenden CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> Fraktion konnte mit Hilfe des Markers CD90 (Majeti *et al.*, 2007) und kürzlich über den Marker CD49f erreicht werden, was letztlich zu dem heutzutage humane HSZ am ehesten beschreibenden Immunphänotyp lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup> führte (Notta *et al.*, 2011) (vgl. Abb. 1).

Allerdings sollte nicht unerwähnt bleiben, dass trotz aller Annäherungen durch verbesserte Methoden und neue Oberflächenmarker die humane hämatopoetische Stammzelle nicht isolierbar ist. Streng genommen könnte der Nachweis nur durch Transplantation einzelner Zellen im Menschen gelingen. Da solche Versuche ethisch nicht vertretbar sind, kann bei Erwähnung der humanen hämatopoetischen Stammzelle im eigentlichen Sinne immer nur die nach aktuellem Wissensstand größtmögliche Annäherung daran gemeint sein, in der die Stammzellen enthalten sein müssen.

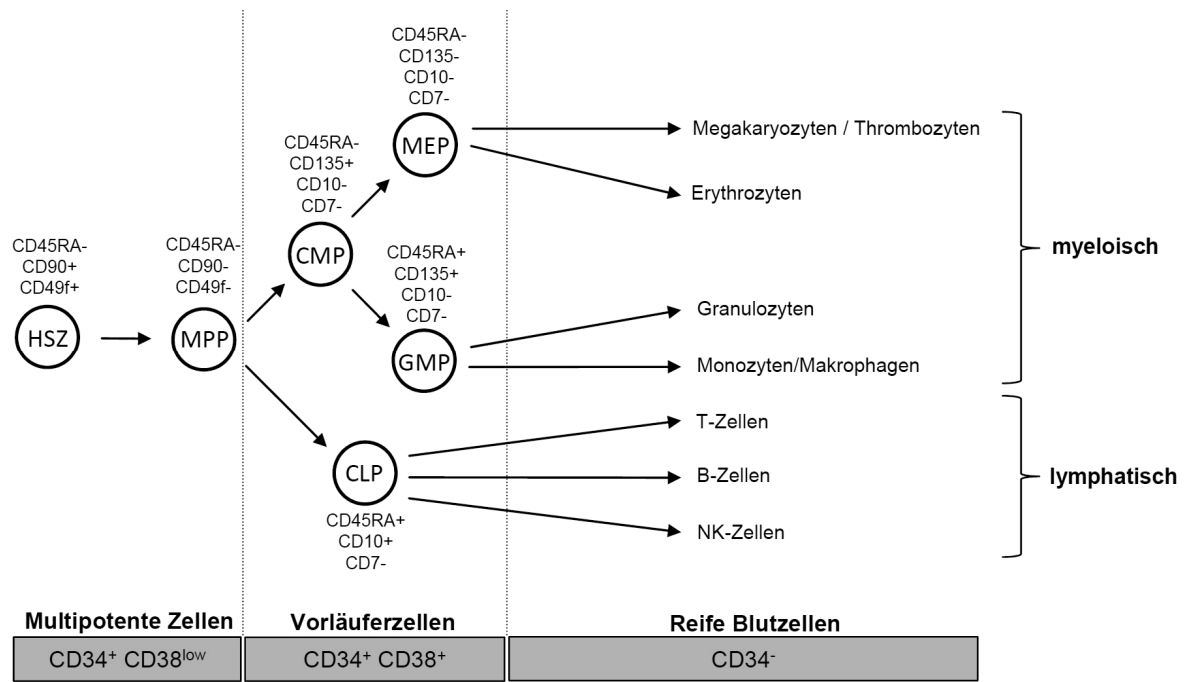
Neben den bislang erwähnten Oberflächenmarkern, die heute standardmäßig zur Identifikation humaner hämatopoetischer Subpopulationen verwendet werden, wurden verschiedene weitere Oberflächenproteine auf humanen HSVZ beschrieben. Der humane Oberflächenmarker CD133, auch Prominin-1 genannt, wurde 1997 unabhängig von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Weigmann *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997) und markiert neben eher primitiven humanen HSVZ auch Zellen mit Stammzeleigenschaften in anderen Geweben, die Funktion von CD133 ist aber größtenteils ungeklärt (Mizrak *et al.*, 2008). CD133 wird auf einem Großteil der CD34<sup>+</sup> Zellen exprimiert und markiert eher primitivere Zellen, die innerhalb der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> Fraktion angereichert sind (Giebel *et al.*, 2006; Beckmann *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2010). Eine genauere Charakterisierung der Expression von CD133 im Hinblick auf verschiedene hämatopoetische Linien und HSVZ-Subpopulationen ist bislang nicht erfolgt und die Bedeutung der Expression dieses Markers dementsprechend größtenteils unverstanden.

In Mäusen führte, ebenso wie im humanen System, die Identifizierung verschiedener Oberflächenmarker zur Charakterisierung von Progenitoren mit verschiedenen Linien-Differenzierungspotenzialen und zur genaueren Aufklärung des Immunphänotyps von HSZ (Giebel und Punzel, 2008). Im Gegensatz zum humanen System etablierten sich größtenteils andere Oberflächenmarker: Die Koexpression der Marker Sca-1 und c-kit auf für spezifische Linienmarker negativen ( $lin^-$ ) Zellen kennzeichnet sogenannte LSK-Zellen, die mit Hilfe der Marker CD150 und CD105 in multipotente Progenitoren ( $CD105^-CD150^-$ ) und HSZ ( $CD105^+CD150^+$ ) aufgetrennt werden können (Kiel *et al.*, 2005; Pronk *et al.*, 2007). Diese im Maus-System gebräuchlichen Markerkombinationen sind nach dem aktuellen Stand der Forschung im Menschen nicht konserviert exprimiert oder beschreiben keine vergleichbaren Subpopulationen im humanen System. Aufgrund dieser Unterschiede zwischen murinen und humanen HSVZ werden in beiden Systemen somit unterschiedliche Marker und Markerkombinationen verwendet.

#### **1.2.4 Das hämatopoetische Modell**

Die Grundlage der ersten umfassenden Beschreibung eines hierarchischen hämatopoetischen Modells war die Identifikation von primitiven myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen im Maussystem, sogenannter gemeinsamer lymphatischer Progenitorzellen (engl. *common lymphoid progenitor*; CLP) und gemeinsamer myeloischer Vorläuferzellen (CMP) (Kondo *et al.*, 1997; Akashi *et al.*, 2000; Reya *et al.*, 2001). Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, wurden im humanen System äquivalente Zellen mit CLP- und CMP-Potenzial beschrieben (Galy *et al.*, 1995; Manz *et al.*, 2002).

Dementsprechend beruht das Modell der Hämatopoese, aufbauend auf den durch Oberflächenmarker isolierten und in Analyseverfahren charakterisierten Zellqualitäten, auf dem fundamentalen Prinzip einer klaren Unterteilung zwischen lymphatischer und myeloischer Linie: Die lymphatische Linie bringt demnach T-, B- und NK-Zellen hervor, während in der myeloischen Linie über verschiedene hierarchische Zwischenstufen Granulozyten, Makrophagen, Erythrozyten und Megakaryozyten gebildet werden. HSZ und multipotente Progenitorzellen (MPP) können beide Linien hervorbringen (Darstellung des humanen Modells in Abb. 1).



**Abb. 1: Das klassische Modell der humanen Hämatopoese**

Schematische, vereinfachte Darstellung des klassischen Modells der humanen Hämatopoese. Bei der Differenzierung multipotenter Zellen (HSZ und MPP) erfolgt eine erste Linien-Auftrennung in myeloische und lymphatische Progenitorzellen (CMP und CLP). Im weiteren Verlauf werden lymphatische Zellen (T-, B- und NK-Zellen) vom CLP hervorgebracht. Im myeloischen Kompartiment erfolgt eine weitere Auftrennung der Linienpotenziale zwischen Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitoren (MEP) und Granulozyten-Makrophagen Progenitoren (GMP). Multipotente Zellen und Vorläuferzellen haben die Expression des Markers CD34 gemeinsam, sind in der Regel negativ für linienspezifische Marker (lin<sup>-</sup>) und können durch verschiedene weitere Markerkombinationen genauer identifiziert werden. Reife Blutzellen sind in der Regel negativ für CD34 und exprimieren hier nicht dargestellte linienspezifische Marker. Zur besseren Übersicht wurden verschiedene bekannte Vorläufer-Zwischenstufen und Differenzierungswege nicht dargestellt. Abbildung modifiziert nach Doulatov *et al.*, 2012.

Über Jahre hinweg stellte das klassische Modell ein solides Modell dar, wurde aber durch neue experimentelle Beobachtungen mehr und mehr in Frage gestellt. Entsprechend wurden verschiedene alternative Modelle postuliert. Beispielsweise wurde das myeloische und lymphatische Differenzierungspotenzial einzelner muriner Progenitorzellen mit Hilfe von *in vitro* Verfahren untersucht. Dabei zeigte sich, dass jede Zelle, die das Potenzial zur Bildung von B- oder T-Zellen oder Erythrozyten innehatte, immer auch myeloischen Zellen hervorbrachte, während Zellen mit ausschließlich lymphatischem Potenzial analog zum vorher beschriebenen CLP nicht detektiert werden konnten. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten Kawamoto *et al.* das sogenannte „myeloisch-basierte“ Modell, nach dem Vorläufer existieren, die



lymphatisch-myeloisches, nicht aber MEP-Potenzial besitzen (Kawamoto *et al.*, 1999; Kawamoto *et al.*, 2010).

Des Weiteren konnten im Knochenmark adulter Mäuse Progenitorzellen identifiziert werden, die nach Transplantation in Empfängermäuse diese für einen gewissen Zeitraum repopulieren konnten, aber fast ausschließlich lymphatisches und Granulozyten-Makrophagen-Potenzial und kein Megakaryozyten-Erythrozyten-Potenzial zeigten, was die Hypothese von Kawamoto stärkte und die klare Trennung zwischen lymphatischem und myeloischem Differenzierungspotenzial in Frage stellte (Adolfsson *et al.*, 2005). Diese sogenannten LMPP (engl. *lymphoid-primed multipotent progenitor*), waren somit alternativ zum klassischen CMP in der Lage, Granulozyten-Makrophagen Progenitoren (GMP) hervorzubringen (Adolfsson *et al.*, 2005; Mansson *et al.*, 2007).

Auch bei der Analyse humaner Zellen in klonalen *in vitro* Langzeit-Analyseverfahren konnten in unserer Gruppe Progenitorzellen identifiziert werden, die das Potenzial zur Bildung von NK-Zellen und Makrophagen hatten, aber das Potenzial zur Bildung sekundärer myeloischer Kolonien in LTC-IC Ansätzen verloren hatten. Die Existenz dieser Zellen, die dementsprechend M-NK-IC (Makrophagen-NK-Zellen-initiiierende Zellen) genannt wurden, ist ebenfalls mit dem klassischen Modell der Hämatopoese nicht zu erklären (Giebel *et al.*, 2006).

### **1.2.5 Quellen humaner hämatopoetischer Stammzellen**

Als Quellen für humane HSVZ dienen vor allem das Knochenmark, das Restblut aus der Nabelschnurvene Neugeborener (Nabelschnurblut) und das periphere Blut von Spendern, deren HSVZ durch Gabe von G-CSF (engl. *granulocyte-colony stimulating factor*) mobilisiert wurden.

Die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor G-CSF bewirkt beim Menschen eine Mobilisierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut und ermöglicht die Gewinnung der Zellen durch ein sogenanntes Leukapherese-Verfahren, das seit einigen Jahren standardmäßig klinisch alternativ zur Knochenmarkentnahme zur Herstellung von Blutstammzelltransplantaten genutzt wird (Duhrsen *et al.*, 1988; Bensinger, 2012). Dagegen ist die Nutzung von Nabelschnurblut als Alternative zur Knochenmarktransplantation möglich, wird aber in Deutschland seltener angewendet. Nabelschnurblutzellen scheinen zwar im

Vergleich zu Zellen adulter Spender ein höheres Repopulierungspotenzial (Lewis und Verfaillie, 2000) und eine bessere Immunverträglichkeit (Hofmeister *et al.*, 2007) zu besitzen, allerdings reichen die HSVZ aus einem Nabelschnurblut in der Regel nicht aus, um einen erwachsenen Menschen zu transplantieren (Brunstein und Wagner, 2006). Dieser Nachteil kann zwar durch die kombinierte Transplantation der Zellen aus zwei Nabelschnurbluten ausgeglichen werden, es zeigte sich aber, dass nach Transplantation der Zeitraum, nach dem im Patienten wieder Neutrophile und Thrombozyten detektiert werden können, bei Verwendung von Nabelschnurblut im Vergleich zu Knochenmark deutlich länger ist (Rocha *et al.*, 2001; Brunstein *et al.*, 2007).

Der Anteil der CD34<sup>+</sup>-Zellen liegt im peripheren Blut üblicherweise bei weniger als 0,5%, im Knochenmark bei 0,5-2% und bei Nabelschnurrestblut ebenfalls bei ca. 0,5-2% (Bender *et al.*, 1994; Hofmeister *et al.*, 2007).

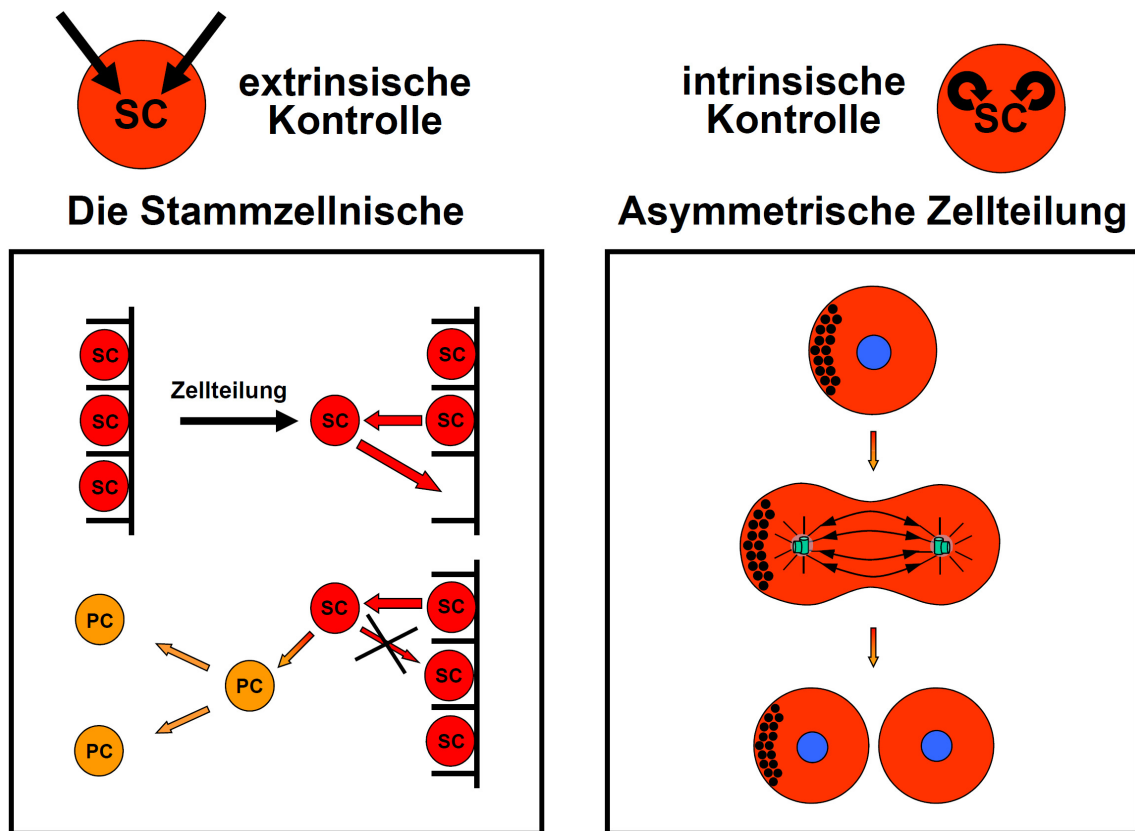
### **1.3 Regulierung von Zellschicksalsentscheidungen in hämatopoetischen Stammzellen**

#### **1.3.1 Mechanismen der Regulierung von Zellschicksalsentscheidungen**

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) sind aufgrund der langen Geschichte ihrer klinischen Anwendung im Rahmen von Knochenmarktransplantationen und der potentiellen Erweiterbarkeit ihres therapeutischen Nutzens die am besten untersuchten adulten humanen Stammzellen. Dennoch sind bis heute die molekularen Mechanismen, die in diesen Zellen die Entscheidung zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung regulieren, weitgehend unverstanden. Wie bereits in Abschnitt 1.1 erörtert, ist sowohl die unkontrollierte Expansion als auch der Verlust somatischer Stammzellen in einem Organismus fatal. Da im menschlichen Körper normalerweise ungefähr 11 Millionen Blutzellen pro Sekunde gebildet werden (Doulatov *et al.*, 2012) und dieser Vorgang lebenslang funktionieren muss, ist ersichtlich, dass auch bei HSZ eine stringente Kontrolle dieser Entscheidung auf zellulärer Ebene essentiell ist (Morrison *et al.*, 1997; Görgens und Giebel, 2010).

Grundsätzlich gibt es verschiedene Strategien zur Kontrollierung der Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung. Beispielsweise könnten somatische Stammzellen durch Zellteilung Tochterzellen hervorbringen, die primär identische Entwicklungspotenziale innehaben. In Abhängigkeit von äußeren Faktoren aus der Umgebung der Zelle könnte dann das Zellschicksal der Tochterzellen moduliert werden. Dabei ist denkbar, dass bestimmte Kombinationen extrinsischer Faktoren zur Selbsterhaltung der Stammzellen führen, während andere Kombinationen die Differenzierung induzieren würden. Durch eine limitierte Präsentation äußerer Faktoren, die einen Stammzell-Selbsterhalt ermöglichen, könnte die Anzahl der Stammzellen in einem Gewebe zumindest theoretisch relativ konstant gehalten werden (Abb. 2A). Tatsächlich wurden solche Bereiche, die den Stammzell-Selbsterhalt ermöglichen, initial bei der Erforschung von Modellorganismen wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* in den Gonaden der Tiere identifiziert (Boyce *et al.*, 1995; Xie und Spradling, 1998; Tran *et al.*, 2000; Xie und Spradling, 2000). In Analogie zu speziellen ökologischen Umgebungen, den ökologischen Nischen, wurden diese stammzellerhaltenden Bereiche Stammzellnischen genannt.

In einem anderen Szenario hängt die Entscheidung, ob eine neugebildete Tochterstammzelle ihr Stammzellpotenzial aufrechterhält oder dieses verliert, ausschließlich von intrinsischen Faktoren ab. Falls ein zellschicksalsdeterminierender Faktor in einer Tochterzelle in bestimmter Konzentration benötigt wird, um das Stammzellpotenzial aufrechtzuerhalten, könnte durch die Verteilung dieses Faktors auf die beiden Tochterzellen während der Mitose das Zellschicksal dieser Zellen reguliert werden. Eine unterschiedliche Verteilung solcher Faktoren auf beide Tochterzellen würde dementsprechend zu unterschiedlichen Entwicklungskapazitäten der Zellen führen, eine Zelle würde eine Stammzelle bleiben, die andere in Ermangelung des Faktors differenzieren (Abb. 2B).



**Abb. 2: Extrinsische und intrinsische Kontrolle somatischer Stammzellen**

(A) Das Modell der Stammzellnische postuliert, dass eine Kombination spezifischer Faktoren in bestimmten Umgebungen, den Stammzellnischen, für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften erforderlich ist. Stammzellen, die keinen Kontakt zur Nische herstellen können, differenzieren demnach. (B) Intrinsische Zellschicksalsdeterminanten segregieren während der asymmetrischen Zellteilung unterschiedlich in entstehende Tochterzellen, wodurch die Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung reguliert wird (SC: Stammzelle; PC: Progenitorzelle) Abbildung modifiziert nach Görgens und Giebel, 2010.

Auch für diese Art der Regulierung von Zellschicksalsentscheidungen gab es erste Hinweise aus der Forschung an Modellorganismen. So konnte gezeigt werden, dass während der Mitose von Neuroblasten, den neuralen Stammzellen in *Drosophila melanogaster*, bestimmte zellschicksalsdeterminierende Proteine in unterschiedlichen Quantitäten auf die entstehenden Tochterzellen verteilt werden. Resultierend aus dieser asymmetrischen Zellteilung bleibt die eine Tochterzelle eine Stammzelle, während die andere determiniert wird und differenziert (Hirata *et al.*, 1995; Spana und Doe, 1995).

Als dritte Möglichkeit ist eine Kombination extrinsischer und intrinsischer Faktoren zur Regulierung der Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung denkbar. Im Folgenden werden auf Grundlage der aus Modellorganismen bekannten

mechanistischen Prinzipien die Erkenntnisse hinsichtlich der Regulierung von Zellschicksalsentscheidungen im humanen hämatopoetischen System zusammengefasst.

### 1.3.2 Die hämatopoetische Stammzellnische

Nicht zuletzt aufgrund ihrer enormen klinischen Relevanz wurden zahlreiche Versuche unternommen, humane hämatopoetische Stammzellen *ex vivo* in verschiedensten Zellkultur-Medien zu expandieren. Bisher konnten allerdings keine Bedingungen gefunden werden, die eine nachhaltige Expansion humaner HSZ in der Zellkultur ermöglichen (Hofmeister *et al.*, 2007). Es konnte allerdings beobachtet werden, dass eine Kokultivierung primitiver hämatopoetischer Zellen mit bestimmten Stroma-Zelllinien zu einer Verlangsamung der Differenzierung der Zellen und zu einem Erhalt primitiver Potenziale über einen Zeitraum von mehreren Wochen führt (Moore *et al.*, 1997; Punzel *et al.*, 1999b; Shih *et al.*, 1999; Nolte *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass im Rahmen der Knochenmarktransplantation Patienten nach Myeloablation durch Transplantation HSZ-enhaltener Fraktionen lebenslang geheilt werden können, zeigt dagegen, dass HSZ *in vivo* expandieren können (Baron und Storb, 2004). Zudem können humane HSZ-enhaltene Fraktionen nach Transplantation geringer Zelldosen in Maus-Repopulierungsexperimenten auch sequenziell über lange Zeiträume erhalten werden, was eine starke Expandierbarkeit ohne Verlust des Stammzellpotenzials impliziert (Iscoe und Nawa, 1997). Diese Hinweise legen nahe, dass die Umgebung und damit extrinsische Signale für den Erhalt humaner HSZ essentiell sind. Vor diesem Hintergrund wurde von Raymond Schofield bereits 1978 die Existenz einer hämatopoetischen Stammzellnische postuliert, einer speziellen Umgebung, in der die HSZ auch durch Kontakt mit anderen Zellentitäten die Signale erhält, die für ihre Expansion bzw. den Erhalt ihres Stammzellpotenzials erforderlich sind (Schofield, 1978).

Tatsächlich wurde von wenigen Jahren gezeigt, dass HSZ-Nischen existieren und unter anderem von Osteoblasten im Endosteum des Knochenmarks und sinusoidalen Endothelzellen in vaskulären Nischen in der Milz und im Knochenmark gebildet werden (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Kiel *et al.*, 2005). Es zeigte sich, dass die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase Tie-2 auf der Oberfläche von

HSZ durch den auf Osteoblasten präsentierten Liganden Angiopoietin-1 in diesem Zusammenhang für den Selbsterhalt der HSZ in der Nische essentiell ist (Arai *et al.*, 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten den Notch-Liganden Jagged-1 exprimieren, über den der Notch-Signalweg aktiviert werden kann. Dieser Befund impliziert vor dem Hintergrund, dass eine Blockierung des Notch-Signalweges in Kokultur-Versuchen mit HSVZ zu einer deutlichen Verminderung der supportiven Eigenschaften von Osteoblasten führt, dass eine wichtige Funktion von Stammzellnischen die Aktivierung des Notch-Signalweges in HSZ beinhaltet (Calvi *et al.*, 2003). Zudem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des Wnt-Signalweges und verschiedenen anderen, den Selbsterhalt von HSZ unterstützenden Faktoren, die möglicherweise auch in HSZ-Nischen an einer konstanten Aufrechterhaltung der Zahl der HSZ beteiligt sind (Oh und Humphries, 2012; Wang und Wagers, 2012). Aufgrund der Bedeutung des Notch-Signalweges für das Thema dieser Arbeit wird dieser später im Text noch genauer beschrieben (Abschnitt 1.4).

### **1.3.3 Asymmetrische Zellteilung in hämatopoetischen Stammzellen**

Erste Hinweise darauf, dass HSZ sich asymmetrisch teilen können, ergaben sich aus Versuchen der Arbeitsgruppe von Ogawa, in denen das Proliferationsverhalten und das Differenzierungspotenzial beider Tochterzellen einer zuvor einzeln abgelegten primitiven hämatopoetischen Zelle getrennt voneinander analysiert wurde. Dabei wurde beobachtet, dass in einigen Fällen die Tochterzellen hämatopoetische Kolonien unterschiedlicher Größe und Linienzusammensetzung hervorbrachten, sich also hinsichtlich ihres Differenzierungspotenzials und ihrer proliferativen Eigenschaften unterschieden. Diese Unterschiede wurden damals als das Resultat stochastischer Entscheidungsprozesse gedeutet (Suda *et al.*, 1984a; Suda *et al.*, 1984b; Leary *et al.*, 1985).

Im Folgenden wurden in der Gruppe um Landsdorp Tochterzellen der CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD71<sup>low</sup> Fraktion, in der primitive humane hämatopoetische Zellen angereichert sind, einzeln unter identischen oder unterschiedlichen Bedingungen kultiviert (Brummendorf *et al.*, 1998). Dabei wurde beobachtet, dass unabhängig von den Kultivierungsbedingungen in manchen Fällen unterschiedliche Zellschicksale realisiert wurden. In weiteren Versuchen mit Zellen der primitivere HSVZ

enthaltenden CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD71<sup>low</sup> Fraktion konnte gezeigt werden, dass die Zellen in sich langsam teilende und sich schnell teilende Zellen unterschieden werden konnten. Da sich langsam teilende Zellen im Vergleich höhere Expansionsraten zeigten, wurde gefolgert, dass es sich bei diesen Zellen um primitivere Zellen handelt. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Nachkommen einzelner CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen durch unterschiedliche Proliferationskinetiken voneinander unterscheidbar waren. Die Autoren schlussfolgerten, dass diese Unterschiede das Resultat sequenzieller asymmetrischer Zellteilungen sind, in denen ähnlich wie aus Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster* bekannt, Zellschicksalsdeterminanten jeweils nur auf eine Tochterzelle weitergegeben werden. Zudem wurde diskutiert, dass alternativ auch postmitotische Mechanismen eine Erklärung für diese Beobachtungen sein könnten (Brummendorf *et al.*, 1998).

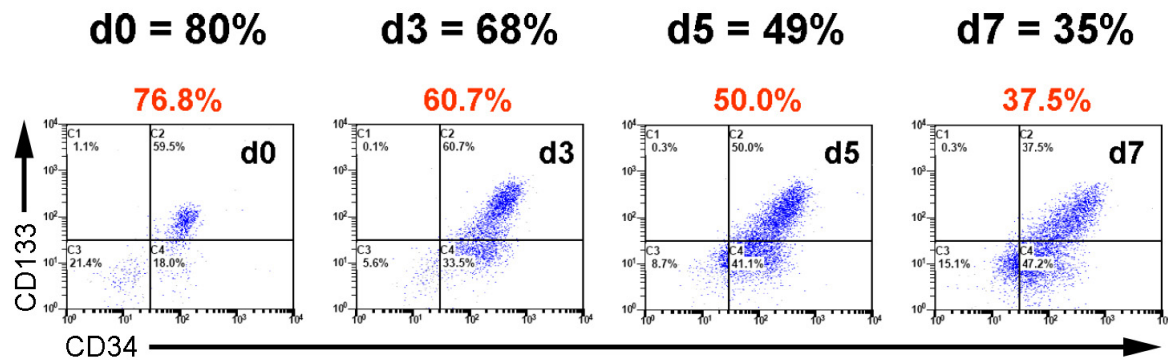
In weiteren Experimenten anderer Gruppen wurde die Proliferation von CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen aus verschiedenen HSZ-Quellen und nach Zugabe verschiedener Kombinationen von Zytokinen miteinander verglichen. Dafür wurden die Zellen initial mit dem Membranfarbstoff PKH-26 gefärbt und die Proliferation der Zellen durchflusszytometrisch über die Zeit analysiert. Dabei zeigte sich, dass je nachdem welche Zytokine genutzt wurden, die erste *in vitro* Zellteilung 36-38 h bzw. 48-50 h nach dem Beginn der Kultur stattfand. Die Frequenz der Bildung mit Zellen unterschiedlicher proliferativer Eigenschaften war dabei mit ca. 30% unabhängig von den verwendeten Zytokin-Kombinationen, aber abhängig von der verwendeten Zellquelle (Huang *et al.*, 1999). In weiterführenden Studien wurde das Proliferationspotenzial der Tochterzellen einzeln abgelegter CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen nach Separation direkt nach der Mitose untersucht. Dabei zeigte sich, dass primitivere CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen häufiger Zellen mit unterschiedlichem Proliferationspotenzial hervorbrachten als reifere CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen und dass es sich bei den jeweils langsamer teilenden Zellen um primitivere Zellen handelt (Punzel *et al.*, 2002).

Zur genaueren Analyse des jeweiligen Linienpotenzials der entstehenden Tochterzellen wurden im Weiteren einzelne CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen abgelegt und die Nachkommen der nach der Teilung separierten Tochterzellen jeweils in myeloische (LTC-IC) und lymphatische (NK-IC) Langzeit-Analyseverfahren eingebracht. Initial abgelegte Zellen, die sowohl myeloische als auch lymphatische Nachkommen

hervorbringen konnten, wurden dementsprechend retrospektiv als ML-IC (engl. *myeloid-lymphoid initiating cell*) bezeichnet. Dabei zeigte sich, dass mehr als 80% der initial abgelegten Zellen mit ML-IC Potenzial unterschiedlich spezifizierte Tochterzellen hervorbrachten: Eine Tochterzelle hielt das ML-IC Potenzial aufrecht, während die andere ein reduziertes Entwicklungspotenzial zeigte (Giebel *et al.*, 2006). Obwohl alle diese Daten auf das Vorhandensein asymmetrischer Zellteilungen in primitiven humanen hämatopoetischen Zellen hindeuteten, könnten die jeweils erhaltenen Ergebnisse auch das Resultat postmitotischer Prozesse sein. Demzufolge ist es denkbar, dass die Tochterzellen direkt nach der Mitose identische Entwicklungspotenziale innehaben, die in dem Zeitraum zwischen Mitose und Separation der Zellen z.B. durch gegenseitige Beeinflussung verändert werden (Brummendorf *et al.*, 1998; Giebel *et al.*, 2006).

Bei der Untersuchung der Proliferationskinetik kultivierter CD34<sup>+</sup> Zellen zeigte sich, dass zu Beginn der *in vitro* Kultur die meisten CD34<sup>+</sup> Zellen auch den Marker CD133 auf ihrer Oberfläche tragen. Nach 2-3 –tägiger Kultur, also zu dem Zeitpunkt, zu dem sich die ersten Zellen *in vitro* teilen, wurde beobachtet, dass die Expression von CD133 auf einem Teil der Zellen verlorenght, während der Marker CD34 nahezu unverändert exprimiert wird (Abb. 3). Der Anteil der CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> Zellfraktion nahm über den weiteren *in vitro* Kulturverlauf immer weiter ab, wobei die beobachtete Kinetik der Abnahme der CD133-Expression in Anlehnung an die in oben beschriebenen Versuchen beobachtete Frequenz von ca. 70% symmetrischer und 30% asymmetrischer Mitosen (Huang *et al.*, 1999) mit dem Modell der asymmetrischen Zellteilung rechnerisch kompatibel war. Demnach würden ca. 70% der Zellen bei der ersten Zellteilung zwei CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> Zellen hervorbringen, während in 30% der Fälle eine CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> und eine CD34<sup>+</sup>CD133<sup>low</sup> Zelle gebildet würde (Abb. 3) (Giebel *et al.*, 2006; Beckmann *et al.*, 2007; Görgens und Giebel, 2010).





**Abb. 3: Kinetik der Expression der HSVZ-Marker CD133 und CD34**

Hypothetischer und durchflusszytometrisch bestimmter Anteil an CD133<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD34<sup>+</sup> Fraktion über eine Kulturdauer von 7 Tagen. Wie im Text beschrieben, deuten experimentelle Analysen darauf hin, dass ca. 30% der primitiven CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> Zellen Tochterzellen mit unterschiedlichen Proliferations- und Linienpotenzialen hervorbringen. Bei Annahme der Voraussetzungen, dass (1.) sich 30% der CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> Zellen asymmetrisch teilen und jeweils eine primitive CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> Zelle und eine reifere CD34<sup>+</sup>CD133<sup>low</sup> Zelle hervorbringen, (2.) sich alle CD34<sup>+</sup> Zellen ab Kulturtag 2 einmal pro Tag teilen, und (3.) ungefähr 80% der frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen CD133 exprimieren, kann der Anteil der CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> Zellen an einem gegebenen Kulturtag n mit folgender Formel berechnet werden: **Anteil (CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>) = 0,8 x (0,7+0,15)<sup>n-2</sup>**. Der theoretisch berechnete Anteil der CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD34<sup>+</sup> Fraktion je Kulturtag ist in schwarz dargestellt, der durchflusszytometrisch gemessene Wert in rot (d0: Tag 0; d3: Tag 3 etc.). Abbildung modifiziert nach Görgens und Giebel, 2010.

Die Verteilung von CD133 auf der Oberfläche mitotischer CD34<sup>+</sup> Zellen wurde trotz dieser zum Modell der asymmetrischen Zellteilung passenden Expressionskinetik nicht asymmetrisch verteilt gefunden, sondern war stets symmetrisch verteilt (Beckmann *et al.*, 2007). Aufgrund der grundlegenden Übereinstimmung zwischen hypothetischer Rate asymmetrischer Zellteilungen und Verlust der Expression von CD133 wurde jedoch durchflusszytometrisch die Expression verschiedener Oberflächenantigene auf CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup>CD133<sup>low</sup> Zellfraktionen untersucht. Die größten Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke auf beiden CD133 Subpopulationen zeigten die Marker CD53, CD62L, CD63 und CD71, die in weiterführenden mikroskopischen Analysen tatsächlich jeweils in 20-30% der untersuchten mitotischen CD34<sup>+</sup> Zellen asymmetrisch verteilt waren. Somit wurde von unserer Gruppe gezeigt, dass humane primitive hämatopoetische Zellen in der Lage sind, sich asymmetrisch zu teilen (Beckmann *et al.*, 2007). Kurze Zeit danach wurde durch intrazelluläre Färbungen an mitotischen humanen CD34<sup>+</sup> Zellen auch gezeigt, dass der Marker CD133 intrazellulär in ca. 20% der untersuchten Zellen asymmetrisch verteilt war und mit CD63 kolokalisierte (Fonseca *et al.*, 2008).

Zusammenfassend sind damit primitive hämatopoetische Zellen in der Lage, sich asymmetrisch zu teilen, und die hämatopoetische Stammzellnische ist essentiell für den Erhalt und die Expansion von HSZ. Demzufolge ist es naheliegend, dass die Regulierung der Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung über eine Kombination extrinsischer und intrinsischer Mechanismen erfolgt.

#### 1.4 Der Notch-Signalweg in der Hämatopoese

Der Notch-Signalweg ist ein wichtiger Regulator bei der Entwicklung und Spezifikation von Geweben und Zellen und steuert eine Vielzahl verschiedener Differenzierungsprozesse (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Bigas *et al.*, 2012). Notch wurde ursprünglich als Mutation im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* beschrieben, die sich als Einkerbung (engl. *notch*) am Flügelrand äußerte. Heute wissen wir, dass die vielfältigen Funktionen von Notch durch einen in der Evolution hochkonservierten Signalweg realisiert werden, in dem Notch selbst als Transmembranrezeptor und Transkriptionsaktivator wirkt (Maillard *et al.*, 2005; Guruharsha *et al.*, 2012).

In Säugern gibt es, anders als in *Drosophila*, vier Notch-Rezeptoren (Notch1-4), die alle konservierte Proteinregionen enthalten und jeweils aus einer extrazellulären und einer intrazellulären Untereinheit bestehen. Die extrazelluläre Region enthält eine Vielzahl von EGF- (engl. *epidermal growth factor*) ähnlichen Motiven (Rebay *et al.*, 1991), und die Notch-Liganden, in *Drosophila* Delta und Serrate, in Säugern die drei Delta-Paraloga (Delta-like1-3) sowie Jagged1 und Jagged2, binden (Larsson *et al.*, 1994; Sugaya *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 1999). Zudem wird die ligandenunabhängige Aktivierung des Signalweges durch drei LIN12/NOTCH-Motive verhindert (Gordon *et al.*, 2007). Die intrazelluläre Domäne von Notch (Notch-ICD; engl. intracellular domain) dient der Signalweiterleitung nach Aktivierung und besteht u.a. aus einer RAM-Domäne sowie mehreren Ankyrin-Wiederholungen (Zweifel und Barrick, 2001).

Der Notch-Rezeptor wird durch die Bindung eines Liganden aktiviert (Fehon *et al.*, 1990; Zeng *et al.*, 1998), und die Ligandenbindung induziert eine  $\gamma$ -Secretase-abhängige, proteolytische Spaltung und letztendlich die Freisetzung von Notch-ICD (De Strooper *et al.*, 1999; Struhl und Greenwald, 1999). Daraufhin erfolgt die

Translokation von Notch-ICD in den Nukleus, was unter anderem durch die Bindung von Notch1-ICD an den Kofaktor RBPjk und den Transkriptionsfaktor CSL (CBF-1 in Säugetieren, *Suppressor of Hairless* in *Drosophila* und *lag-2* in *C. elegans*) die Umwandlung eines transkriptionellen Repressorkomplexes zu einem Aktivator und somit letztendlich die Initiation der Transkription verschiedener Notch-Zielgene (z.B. *Hes1*, *Hey1*, *Deltex1*) ermöglicht (Jarriault *et al.*, 1995; Struhl und Adachi, 1998; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Kitagawa *et al.*, 2001). Die Regulation des Notch-Signalweges kann durch extrazelluläre, zytoplasmatische oder Kernproteine erfolgen. Auf extrazellulärer Seite kann z.B. durch Glykosyltransferasen der Fringe-Familie die Ligandenspezifität des Notch-Rezeptors verändert werden (Moloney *et al.*, 2000). Die intrazellulär antagonistisch zu Notch wirkende Zellschicksalsdeterminante Numb (Spana und Doe, 1996) wird im nächsten Abschnitt genauer beschrieben.

Neben der bereits erwähnten Funktion bei der Regulierung der Erhaltung hämatopoetischer Stammzellen in der Stammzellnische (Calvi *et al.*, 2003) scheint die Aktivität des Notch-Signalweges in der Hämatopoese vor allem bei der lymphatischen Differenzierung eine wichtige funktionelle Rolle zu spielen (Maillard *et al.*, 2004; Maillard *et al.*, 2005). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Kokultivierung humaner HSVZ mit Stromazelllinien, die den Notch-Liganden Delta-like1 (Dll1) exprimieren, zur Induktion der T-Zell Differenzierung führt (La Motte-Mohs *et al.*, 2005). In Mausversuchen resultierte die genomische Inaktivierung von Notch1 durch Cre/loxP-vermittelte Rekombination in Störungen bei der T-Zell-Entwicklung und in vermehrter Bildung von B-Zellen, allerdings entwickelten sich alle anderen Linien normal (Radtke *et al.*, 1999). In ähnlicher Weise war nach konditionalem *Knockout* von RBPjk im Mäusen nur die T-Zell-Entwicklung gestört, während die anderen Linien und der Gehalt der Stammzellen unbeeinträchtigt war (Han *et al.*, 2002).

## 1.5 Die Zellschicksalsdeterminante Numb

Ein relativ gut verstandenes Beispiel für eine Kombination aus intrinsischer und extrinsischer Kontrolle von Entwicklungsprozessen findet sich bei der Regulierung der Entwicklung von peripheren Sinnesorganen bei *Drosophila*. Die Borsten von Insekten stellen Mechanosensoren des peripheren Nervensystems dar. Sie bestehen aus vier spezialisierten Zellen, einem Neuron, einer Schaftzelle sowie einer Haar- und einer Sockelzelle. In diesem Kontext spielt der Notch-Signalweg eine

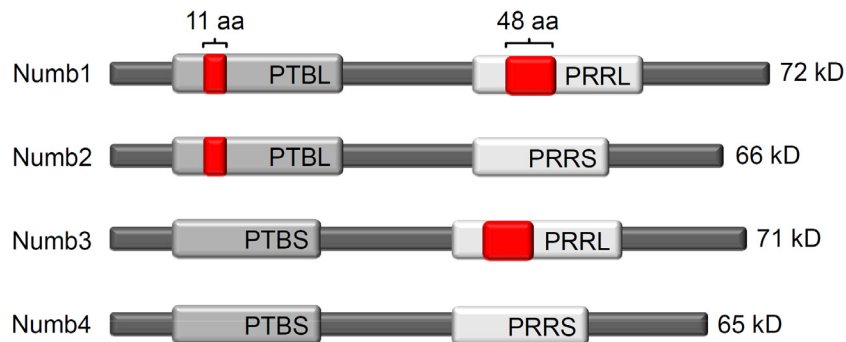
entscheidende Rolle (Hartenstein und Posakony, 1990; de Celis *et al.*, 1991): Zur Generierung dieser vier Zelltypen und damit eines individuellen Sinnesorgans teilen sich sogenannte Sinnesorgan-Progenitorzellen (SOP; engl. *sensory organ precursor*) nach einem binären Muster zweimal asymmetrisch, wobei jeweils das Protein Numb ungleich verteilt wird (Rhyu *et al.*, 1994; Gho *et al.*, 1999). Die Tochterzelle, die nach der ersten Teilung Numb enthält, wird als IIb-Zelle, die andere Tochterzelle als IIa-Zelle bezeichnet. Im Weiteren entwickeln sich aus der IIa-Zelle die Haar- und die Sockelzelle, aus der IIb-Zelle Schafzelle und Neuron. An beide Tochterzellen (IIa und IIb) werden Notch-Liganden als extrinsische Signale herangetragen, und der Notch-Rezeptor wird von beiden Zellen exprimiert. Es zeigte sich aber, dass nur in der IIa-Zelle das Notch-Signal in den Nukleus transduziert wird (Rhyu *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 1998) und dass in der jeweiligen Zelle, die nach asymmetrischer Zellteilung mehr Numb erhalten hatte, die Notch-Funktion durch das Vorhandensein von Numb eingeschränkt war (Frise *et al.*, 1996; Spana und Doe, 1996; Gho *et al.*, 1999). Ein Funktionsverlust von Numb in diesem System führte zur Bildung von zwei IIa-Zellen, und damit zu nicht-funktionellen Sinnesorganen in den betroffenen Fliegen (Spana und Doe, 1996). Diesem Effekt verdankt Numb (engl. *numb*, gefühllos) seinen Namen, und es wurde angenommen, dass Numb, möglicherweise durch direkte Interaktion mit Notch-ICD, für diesen Effekt verantwortlich war (Guo *et al.*, 1996; Spana und Doe, 1996). Somit verhindert in diesem Beispiel die intrinsische Zellschicksalsdeterminante Numb die Weiterleitung des initial extrinsisch an die Zelle herangetragen, Notch-induzierenden Signals und somit die Aktivierung des Notch-Signalweges.

Im Hinblick auf die Regulierung des Notch-Signalweges durch Numb legen neuere Arbeiten eine Funktion von Numb bei endozytotischen Sortierungsprozessen nahe (Santolini *et al.*, 2000; Vaccari und Bilder, 2005; McGill *et al.*, 2009). Demzufolge wird der gesamte membranständige Notch-Rezeptor konstitutiv endozytotisch internalisiert. Die Entscheidung, ob der Rezeptor zurück an die Zellmembran transportiert (*Recycling*) oder der lysosomalen Degradation zugeführt wird, scheint dabei durch Numb reguliert zu werden. Dementsprechend würde bei Anwesenheit von Numb der Notch-Rezeptor eher degradiert und damit indirekt die Anzahl von aktivierbarem Notch an der Zelloberfläche reguliert (McGill *et al.*, 2009). Damit ist dieser Mechanismus, gerade vor dem Hintergrund, dass endozytotischer Transport

auch für den Notch-Signalweg wichtig ist (Vaccari und Bilder, 2005), eine denkbare Alternative zum klassischen Modell, in dem Numb nur nach erfolgter Notch-Aktivierung Notch-ICD in die lysosomale Degradation dirigiert. Kürzlich veröffentlichte Daten aus *Drosophila* deuten allerdings darauf hin, dass Numb in diesem Kontext den Notch-Signalweg nicht direkt, sondern über einen weiteren Faktor, das Protein Sanpodo, antagonisiert (Couturier *et al.*, 2012; Giebel und Wodarz, 2012).

Numb wirkt auch in anderen Geweben bei der Entwicklung von *Drosophila* und anderen Modellorganismen als Zellschicksalsdeterminante nach asymmetrischen Zellteilungen (Wan *et al.*, 2000; Ward und Skeath, 2000; Reugels *et al.*, 2006) und ist ein evolutionär konserviertes Protein, von dem in Säugern vier verschiedene Isoformen existieren, die vor allem im neuronalen System funktionell unterschiedlich zu sein scheinen (Verdi *et al.*, 1996; Dho *et al.*, 1999; Verdi *et al.*, 1999; Bani-Yaghoub *et al.*, 2007). Zudem wurde Numblike identifiziert, ein Protein mit hoher Sequenzhomologie zu den vier Numb-Isoformen in Säugern und geringerer Homologie zum ursprünglichen Numb in *Drosophila* (Zhong *et al.*, 1996; Zhong *et al.*, 1997). Die vier Numb-Isoformen unterscheiden sich in zwei Domänen, einer Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB), die für die Bindung verschiedener Interaktionspartner und zur Inhibierung des Notch-Signalweges wichtig zu sein scheint (Siegal, 1999; Zwahlen *et al.*, 2000; McGill und McGlade, 2003), sowie einer Prolin-reichen-Region (PRR), die unter anderem mehrere SH3-Bindestellen enthält (Smith *et al.*, 2004). Die Isoformen Numb3 und Numb4 besitzen eine kürzere Variante der PTB-Domäne (PTBS), während Numb1 und Numb2 eine 11 Aminosäuren längere Variante aufweisen (PTBL). Zudem unterscheiden sich Numb1 und Numb3 durch eine um 48 Aminosäuren längere PRR-Domäne von Numb2 und Numb4 (Abb. 4). Die Insertion innerhalb der PTB-Domäne scheint unter anderem für die Interaktion mit der E3-Ubiquitinligase LNX wichtig zu sein, über die die Degradation von Numb vermittelt wird (Nie *et al.*, 2004).

Zudem zeigte sich nach Missexpression der humanen Numb-Isoformen Numb3 und Numb4 in *Drosophila*, dass die Expression der Numb4-Isoform mit der kürzeren PRR-Domäne zu einer stärkeren Reduktion von nukleärem Notch führte, was nahelegt, dass die verschiedenen Numb-Isoformen in Säugern im Bezug auf die Regulierung des Notch-Signalweges auch funktionell unterschiedlich sein könnten (Toriya *et al.*, 2006).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der vier humanen Numb-Isoformen**

Numb1 und Numb2 unterscheiden sich durch eine größere PTB-Domäne (PTBL) von Numb3 und Numb4. Die PRR-Domäne von Numb 1 und Numb3 ist 48 Aminosäuren länger (PRRL) als von Numb2 und Numb3 (PRRS). Abbildung modifiziert nach Verdi *et al.*, 1999.

Untersuchungen zur Aufklärung der Rolle von Numb im hämatopoetischen System führten zu teils widersprüchlichen Ergebnissen. So wurde Numb bei Zellteilungen in murinen und humanen primitiven hämatopoetischen Zellen und in T-Zell Progenitoren in Mäusen als asymmetrisch verteiltes Protein beschrieben (Wu *et al.*, 2007; Aguado *et al.*; Nteliopoulos und Gordon, 2012) und es konnte auch gezeigt werden, dass die Notch-Aktivität in der Tochterzelle, die jeweils mehr Numb enthielt, vermindert war (Nteliopoulos und Gordon, 2012). Der gleichzeitige gewebespezifische *Knockout* von *Numb* und *Numblike* im hämatopoetischen System von Mäusen führte dagegen zur keiner detektierbaren Beeinflussung des Selbsterneuerungspotenzials hämatopoetischer Stammzellen. Zudem zeigten die Mäuse eine normale Differenzierung in allen hämatopoetischen Linien (Wilson *et al.*, 2007). Der konventionelle *Knockout* von *Numb* in Mäusen führte dagegen zu starken Defekten in der Angiogenese und der neuralen Entwicklung und war embryonal letal (Zhong *et al.*, 2000; Zilian *et al.*, 2001). Ob Numb demnach auch in primitiven hämatopoetischen Zellen die Realisierung des Notch-Signalweges inhibiert, ist unklar. In Vorarbeiten in unserer Gruppe wurde allerdings bereits gezeigt, dass Numb in humanen CD34<sup>+</sup> Zellen exprimiert wird und die genetische Manipulation der Numb-Expression in diesen Zellen zu Beeinflussungen von Zellschicksalsentscheidungen führt (Spanholtz, 2005; von Levetzow, 2008).

Zusammenfassend sind somit die Komponenten des Notch-Signalweges und Numb evolutionär konserviert und scheinen jeweils eine funktionelle Bedeutung bei hämatopoetischen Entwicklungsprozessen zu haben. Da in Säugern bzw. im

humanen System bislang unklar ist, ob Numb wie in *Drosophila* den Notch-Signalweg inhibiert und welche Rolle Numb im Besonderen bei Zellschicksalsentscheidungen im humanen hämatopoetischen System spielt, ist das Ziel dieser Arbeit, die Funktion von Numb, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung des Notch-Signalweges, weiter aufzuklären.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Rolle des aus *Drosophila melanogaster* als Zellschicksalsdeterminante bekannten Proteins Numb bei zellschicksalsspezifisierenden Prozessen in humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ). Von besonderem Interesse war vor diesem Hintergrund die Aufklärung möglicher Beeinflussungen des Notch-Signalweges durch Numb.

Aufbauend auf Vordaten aus unserer Arbeitsgruppe (Spanholtz, 2005; von Levetzow *et al.*, 2006; von Levetzow, 2008) wurden dazu zunächst Methoden zur genetischen Manipulation von humanen CD34<sup>+</sup> Zellen optimiert. Die kodierenden Regionen aller vier Numb-Isoformen wurden für Überexpressionsversuche in lentivirale Expressionsvektoren kloniert. Nach Überexpression und nach RNAi-vermitteltem *Knockdown* von *Numb* und dem homologen *Numblike* in humanen CD34<sup>+</sup> Zellen wurden genetisch manipulierte Zellen mit Hilfe verschiedener *in vitro* Analyseverfahren funktionell analysiert.

Aufgrund der limitierenden experimentellen Auflösung bei Verwendung der heterogenen CD34<sup>+</sup> Population sollten für weiterführende Versuche zur Klärung der Frage, inwieweit Numb die Aktivierung des Notch-Signalweges beeinflusst, primitivere (CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>) und reifere (CD34<sup>+</sup>CD133<sup>low</sup>) humane hämatopoetische Zellen nach genetischer Manipulation getrennt voneinander funktionell analysiert werden. Zum besseren Verständnis der dabei erhaltenen Resultate war es im Weiteren erforderlich, die Linienpotenziale beider Zellfraktionen mit verschiedenen Methoden umfassend zu analysieren. Dazu wurde unter anderem der *NOD/SCID*-Repopulierungsansatz zum Nachweis primitiver humaner Zellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dürig (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen) etabliert und angewandt.

In der Literatur wurden hinsichtlich der Rolle von *Numb* und dem homologen *Numblike* im primitiven hämatopoetischen System von Mäusen teilweise widersprüchliche Ergebnisse beschrieben. Deshalb wurden parallel zu den anderen

Versuchen Mäuse generiert, in denen mittels Vav-iCre/loxP-vermittelter Rekombination spezifisch im gesamten hämatopoetischen Kompartiment sowohl *Numb* als auch *Numblike* genomisch inaktiviert werden. Anschließend erfolgte in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Göthert (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen) eine umfassende quantitative Analyse verschiedener hämatopoetischer Zellqualitäten im Knochenmark, Thymus und peripheren Blut der Mäuse.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

<b>Gerät</b>	<b>Modell (Hersteller)</b>
Bestrahlungsgerät (Mäuse)	Cobalt-60 Gammabestrahlungsvorrichtung (Philips)
Bestrahlungsgerät (Zellen)	320kV X-Ray Machine (GE/Pantak)
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	HERAcell 150i und 240i (Thermo Scientific)
Durchflusszytometer	ARIA I (Zellsortierer, BD Biosciences) Cytomics FC500 (Analysegerät, Beckman Coulter) EPICS Elite ESP (Zellsortierer, Coulter) LSR II (Analysegerät, BD Biosciences)
Einfrierhilfe	Typ 5100 (Nalgene)
Färbegerät für Objektträger	Hematek 2000 Slide Stainer (Bayer Healthcare)
Geldokumentationsgerät	Fusion FX7 (Vilber Lourmat)
Heizblock	HX-2 (PeQLab)
Magnet-Heizrührer	MR 3002 (Heidolph)
Mikroskope	CKX41 (Olympus) Axio Vert.A1 (Zeiss) Axio Observer Z1 (Zeiss)
Ohr-Markierer	4,5 cm Modell (Fine Science Tools)
PCR-Gerät	GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
Real-Time PCR System	ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems)
Schüttler	VX7 (IKA - Janke & Kunkel)
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS12 (Thermo Scientific)
Spektralphotometer	NanoDrop 1000 (PeQLab)
Transfektionsgerät	Nukleofektor I (Amaxa)
Waage	MP-300 (Citizen)
Zentrifugen	5810R und 5424 (Eppendorf) Universal 30 RF Rotixa/P (Hettich) Avanti J-26XP (Beckman Coulter)

**Verbrauchsmaterial**

Deckgläser  
 Einfrierröhrchen (2 ml)  
 Einmalspritzen (1 ml, 5 ml, 20 ml)  
 Feinspitzen-Pasteurpipetten  
 Filter (0,22 und 0,45 µm Porengröße)  
 Flachbodenplatten (6er, 24er, 96er)  
 Injektionsnadeln (Micro-Fine+, 29 G)  
 MACS Separationssäulen (LS, MS)  
 Pipettenspitzen  
 Polypropylen-Röhrchen (14 ml, 50 ml)  
 Polypropylen-Rundbodenröhrchen (5 ml)  
 Reagenzien-Reservoir  
 Reaktionsgefäße (0,5-2 ml)  
 Stabpipetten (5, 10, 25, 50 ml)  
 Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm<sup>2</sup>)  
 Zellsieb (40 µm Porengröße)  
 Zentrifugationsröhrchen (40 ml)

**Hersteller**

Roth (Karlsruhe)  
 Greiner (Frickenhausen)  
 Braun (Melsungen)  
 Alpha Laboratories (Eastleigh, UK)  
 Corning (New York, NY, USA)  
 Greiner (Frickenhausen)  
 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)  
 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)  
 Starlab (Ahrensburg) und PeQLab (Erlangen)  
 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)  
 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)  
 Corning (New York, NY, USA)  
 Eppendorf (Hamburg)  
 Greiner (Frickenhausen)  
 Greiner (Frickenhausen)  
 Partec (Münster)  
 Nalgene (Rochester, NY, USA)

**2.1.2 Zellkulturmedien****Verwendete Basalmedien**

alpha-MEM	Promocell (Heidelberg)
DMEM (1 g/l Glucose)	PAA (Pasching, Österreich)
DMEM (4,5 g/l Glucose)	PAA (Pasching, Österreich)
Ham's F12	Biochrom (Berlin)
IMDM	Lonza (Basel, Schweiz)
RPMI1640	PAA (Pasching, Österreich)

**Zusammensetzung der Zellkulturmedien (für Zelllinien)****Medium für OP9-Zellen**

20% FBS  
 100 U/ml Penicillin/Streptomycin  
 100 U/ml L-Glutamin  
 in alpha-MEM

**Medium für AFT024-Zellen**

20% FBS  
 100 U/ml Penicillin/Streptomycin  
 100 U/ml L-Glutamin  
 in DMEM (1 g/l Glucose)

**Medium für HEK293T-Zellen**

10% FBS  
 100 U/ml Penicillin/Streptomycin  
 100 U/ml L-Glutamin  
 in DMEM (4,5 g/l Glucose)

**Medium für 5637-Zellen**

10% FBS  
 100 U/ml Penicillin/Streptomycin  
 100 U/ml L-Glutamin  
 in RPMI1640

Sofern nicht erwähnt, wurde standardmäßig FBS der Firma Biochrom für die Medienherstellung verwendet. Alle Zusammensetzungen der Medien zur Kultur von primären Zellen bzw. Differenzierungsmedien sind im entsprechenden Abschnitt unter Punkt 2.2.1.4 bzw. 2.2.4 aufgeführt.

### 2.1.3 Zytokine und Medienzusätze

#### Zytokine

Erythropoietin (NeoRecormon; EPO)	Roche (Basel, Schweiz)
Flt3-Ligand (FTL3L)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<i>insulin-like growth factor</i> (IGF-1)	PeptoTech (Rocky Hill, NJ, USA)
Interleukin 2 (IL-2)	PeptoTech (Rocky Hill, NJ, USA)
Interleukin 3 (IL-3)	PeptoTech (Rocky Hill, NJ, USA)
Interleukin 6 (IL-6)	PeptoTech (Rocky Hill, NJ, USA)
Interleukin 7 (IL-7)	PeptoTech (Rocky Hill, NJ, USA)
<i>stem cell factor</i> (SCF)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Thrombopoietin (TPO)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

#### Seren für die Zellkultur

Fetales Rinderserum (FBS)	Biochrom (Berlin)
FBS für Langzeitkultur	Stemcell Technologies (Vancouver, Kanada)
FBS für CFC-Ansatz	Stemcell Technologies (Vancouver, Kanada)
Humanes AB-Serum	Lonza (Basel, Schweiz)
Pferdeserum	Stemcell Technologies (Vancouver, Kanada)

#### Sonstige Medienzusätze

2-Mercaptoethanol	Invitrogen (Karlsruhe)
Ethanolamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Gentamycin	Lonza (Basel, Schweiz)
Insulin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-Ascorbinsäure	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Methylzellulose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Invitrogen (Karlsruhe)
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Selen	Invitrogen (Karlsruhe)
Transferrin	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

## 2.1.4 Antikörper und Seren

**Tabelle 1: Verwendete konjugierte Antikörper zur Analyse humaner Zellen**

Spezifität	Konjugation	Klon	Hersteller
CD2	PE	S5.2	Beckman Coulter
CD3	FITC	SK3	BD Biosciences
CD4	PE	RPA-T4	BD Biosciences
CD8	FITC	HIT8a	BD Biosciences
CD9	FITC	MEM-61	Euro Biosciences
CD13	FITC	SJ1D1	Beckman Coulter
CD14	PE	MΦP9	BD Biosciences
CD14	APC	MΦP9	BD Biosciences
CD15	PerCP-Cy5.5	HI98	BD Biosciences
CD16	PE	3G8	BD Biosciences
CD19	FITC	4G7	BD Biosciences
CD19	PE-Cy5	HIB19	BD Biosciences
CD19	ECD	LT19	Beckman Coulter
CD20	FITC	L27	BD Biosciences
CD24	PE	ML5	BD Biosciences
CD34	ECD	581	Beckman Coulter
CD34	FITC	581	Miltenyi Biotec
CD34	PE-Cy5	581	BD Biosciences
CD34	PE-Cy7	581	BD Biosciences
CD38	PerCP-Cy5.5	HIT2	BD Biosciences

Spezifität	Konjugation	Klon	Hersteller
CD38	FITC	HIT2	BD Biosciences
CD41	PE	P2	Beckman Coulter
CD45	APC	2D1	BD Biosciences
CD45	PE-Cy7	J33	Beckman Coulter
CD45	FITC	581	Miltenyi Biotec
CD45	PE	J33	Beckman Coulter
CD45RA	PE-Cy7	HI100	Biolegend
CD49d	PE	L25	BD Biosciences
CD56	FITC	MEM-188	Immunotools
CD56	PerCP-Cy5.5	B159	BD Biosciences
CD61	FITC	SZ21	Beckman Coulter
CD66b	FITC	80H3	Beckman Coulter
CD71	FITC	YDJ1.2	Beckman Coulter
CD116	PE	4H1	Biolegend
CD133	PE	AC133	Miltenyi Biotec
CD133	APC	AC133	Miltenyi Biotec
CD166	PE	3A6	BD Biosciences
CD235a	PE	HIR2	BD Biosciences
CD294	PE	BM16	Miltenyi Biotec

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper zur Analyse muriner Zellen**

Biotinylierte Antikörper wurden mit PE-Cy7- oder ECD-markiertem Streptavidin nachgefärbt.

Spezifität	Konjugation	Klon	Hersteller
B220	APC-eFluor780	RA3-6B3	eBioscience
B220	PerCP-Cy5.5	RA3-6B2	BD Biosciences
CD3e	Biotin	145-2C11	BD Biosciences
CD3e	PerCP-Cy5.5	145-2C11	BD Biosciences
CD4	PE-Cy7	RM4-5	BD Biosciences
CD4	PerCP-Cy5.5	RM4-5	BD Biosciences
CD8a	APC-eFluor780	53-6.7	eBioscience
CD8a	PerCP-Cy5.5	53-6.7	BD Biosciences
CD16/32	FITC	2.4G2	BD Biosciences
CD19	PerCP-Cy5.5	1D3	BD Biosciences
CD25	AlexaFluor 488	3C7	eBioscience
CD41	PE	MWRReg30	eBioscience
CD44	APC	IM7	BD Biosciences
CD105	Pacific Blue	MJ7/18	eBioscience

Spezifität	Konjugation	Klon	Hersteller
CD150	APC	TC15	BioLegend
c-Kit	APC-eFluor780	ACK2	eBioscience
Gr1	PerCP-Cy5.5	RB6-8C5	BD Biosciences
Ly6G	FITC	1A8	BD Biosciences
Mac1	PE	M1/70	BD Biosciences
Mac1	PerCP-Cy5.5	M1/70	BD Biosciences
Nk1.1	PerCP-Cy5.5	PK136	BD Biosciences
Sca-1	PE-Cy7	D7	BD Biosciences
TCRb	PE	H57-597	BD Biosciences
TCRb	PerCP-Cy5.5	H57-597	eBioscience
Ter119	APC	TER119	BD Biosciences
Ter119	Biotin	TER119	BD Biosciences
Ter119	PerCP-Cy5.5	TER119	eBioscience

**Tabelle 3: Verwendete unkonjugierte Primärantikörper**

Spezifität	Spezies	Klonalität	Klon	Hersteller
CD125 (human)	Maus	Monoklonal	26815	R&D Systems
CD135 (human)	Maus	Monoklonal	4G8	BD Biosciences
Numb (human/murin)	Kaninchen	Monoklonal	C29G11	Cell Signaling Technology

**Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper**

Konjugation	Spezies und Reaktivität	Hersteller
AlexaFluor 488	Ziege anti Maus	Invitrogen
PE	Esel anti Kaninchen	Dianova
PE	Ziege anti Maus	Dianova

**Tabelle 5: Für immunzytologische Färbungen verwendete Seren**

Spezies	Hersteller
Esel	Dianova
Kaninchen	Dianova
Maus	Dianova

### 2.1.5 Kits

Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Flow-Count <i>Fluorospheres</i>	Beckman Coulter (Krefeld)
<i>High Capacity</i> cDNA RT Kit	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
MBC CD34 <i>Micro Bead</i> Kit human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<i>Mouse</i> Fc Block (anti Maus CD16/CD32)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
RNeasy Micro Kit	Qiagen (Hilden)
RT-qPCR MasterMix	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Wizard <i>SV Gel and PCR Clean-Up</i> System	Promega (Madison, WI, USA)

### 2.1.6 Oligonukleotide und TaqMan-Sonden

#### DNA-Oligonukleotide

**Tabelle 6: Übersicht der für Sequenzierungen verwendeten Primer**

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')
AGG0137	PR2 Sequencing	GGC CAA ACA GGA TAT CTG CG
AGG0138	GFP rev Sequencing	AGG GTC AGC TTG CCG TAG GT
AGG0139	IRES Seq +44	AAC GCA CAC CGG CCT TAT TCC
AGG0140	IRES Seq +103	TTC CGG GCC CTA CAT TGC

**Tabelle 7: Übersicht über verwendete genspezifische Primer**

Alle in dieser Tabelle aufgeführten Primer wurden der Arbeit Mori *et al.*, 2009 entnommen.

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')
AGG1034	MPO RT fw	GTA TGA CGG AGG CTT CTC TC
AGG1035	MPO RT bw	CAG TTG ACG CCA GTG ACG AA
AGG1036	EPX RT fw	CAC GGT TTC AAG GGA CAT C
AGG1037	EPX RT bw	CTT TTC TTG CCT GGG GTG
AGG1038	HDC RT fw	AGC TGC CTG AGA GTG CTC CTG A
AGG1039	HDC RT bw	GCA TTT TTG CCA ACC AGT CCA T
AGG1040	GAPDH RT fw	CCA CAT CGC TCA GAC ACC AT
AGG1041	GAPDH RT bw	GGC AAC AAT ATC CAC TTT ACC AGA
AGG1042	GATA-1 RT fw	CCT CAT CCG GCC CAA GA
AGG1043	GATA-1 RT bw	TGG TCG TCT GGC AGT TGG T
AGG1044	GATA-2 RT fw	ATC CAG ACT CGG AAC CGG A
AGG1045	GATA-2 RT bw	GCA CTT TGA CAG CTC CTC GAA
AGG1046	C/EBPa RT fw	AAG GTG CTG GAG CTG ACC AG
AGG1047	C/EBPa RT bw	AAT CTC CTA GTC CTG GCT CG
AGG1048	PU.1 RT fw	ATG TGC CTC CAG TAC CCA TC
AGG1049	PU.1 RT bw	TCT TCT GGT AGG TCA TCT TC
AGG1050	FOG-1 RT fw	ACA GAC GAG AAG CCC AAA GA
AGG1051	FOG-1 RT bw	AGA GGA TGT CCC TTG TGG TG
AGG1052	GM-CSFRa RT fw	CTT CTC TCT GAC CAG CA
AGG1053	GM-CSFRa RT bw	ACA TGG GTT CCT GAG TC
AGG1054	IL-5Ra RT fw	ATG AAG GAA GCT GCC TGA GA
AGG1055	IL-5Ra RT bw	GTA ATA CAT GCG CCA CGA TG

**Tabelle 8: Verwendete siRNA-Oligonukleotide**

Alle siRNA-Oligonukleotide wurden bereits hybridisiert von Qiagen (Hilden) bezogen. Als Transfektionskontrolle wurde folgende siRNA mit AlexaFluor-488 Markierung am 3' Ende des *sense*-Stranges von Qiagen bezogen: AllStars *validated non-silencing negative control* siRNA. Die Sequenz dieser Kontroll-siRNA wird von Qiagen nicht bekannt gegeben.

Bezeichnung	Sequenz ( <i>sense</i> )	Sequenz ( <i>anti-sense</i> )
GFP-22_HP	GCAACGUGACCCUGAAGUUCAU	GAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG
Hs_NUMB_4_HP	GAAGACGUUUGAAAUUGAA	UUCAAUUUCAAACGUCUUC
Hs_NUMB_6_HP	CAUAGUUGACCAGACGAUA	UAUCGUCUGGUCAACUAUG
Hs_NUMBL1_HP	GCACUGACUCCAGGUGAA	UUCACCUGGAAGUCAGUGC

**Tabelle 9: Übersicht der für die Genotypisierung von Mäusen verwendeten Primer**

\* Die Primersequenzen wurden der Literatur entnommen (Zilian *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2007).

\*\* Die Primersequenzen wurden von der Arbeitsgruppe Göthert (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen) übernommen.

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')
0983*	601_Numb_5'	GAA GGA GCC TTC CAA AAT CGT ATT C
0984*	602_Numb_3'	TAA GGG CTA CAG AGT AAG TTC AAG GAC AG
0985*	611_nbl5aU25	CTG TTT CCT GCC TTC CTT CCT AGT C
0986*	612_nbl3aL24	GCA GGC AGT GAA AAA CCA TCT CTC
0987*	613_nbl5aU24	CAC TCT GCC ACC TAG CTT CAT GTC
0988*	614_Numb_del_u25'	AGC TTA CAG GGT GCC CCA GTT CAT A
0989*	615_Numb_del_l26'	AGG CTT CTG GGA AAC CTC ACT TAC TC
1015**	MausGT186_VAVa	GTC ACA AAA GAG GAA GTG GTG
1016**	MausGT187_VAVb	TCC CTG AAC ATG TCC ATC AGG
1017**	MausGT068_WT_Bfw	AGC ATG CTC TTT TCC AGC AT
1018**	MausGT069_WT_Bbw	CTC AGG CTG GCC TAA AAC TG

**Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten TaqMan-Assays**

Alle TaqMan-Assays wurden von Open Biosystems bezogen. Die Sequenzen der jeweilig enthaltenen Primer und Sonden wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben. Die zwei verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten TaqMan-Assays zur Quantifizierung der Numb-Expression werden in dieser Arbeit wie in der Tabelle markiert als „Sonde 1“ und „Sonde 2“ bezeichnet.

Gensymbol	Assay Identification	Exon	Amplicon-Länge	Bemerkung
<i>DTX1</i>	Hs00269995_m1	1-2	110	
<i>HES1</i>	Hs00172878_m1	3-4	78	
<i>HES5</i>	Hs01387463_g1	1-2	62	
<i>HEY1</i>	Hs00232618_m1	1-2	66	
<i>NUMB</i>	Hs00377772_m1	4-5	79	„Sonde 1“
<i>NUMB</i>	Hs01105433_m1	9-10 / 11-12	71	„Sonde 2“
<i>NUMBL</i>	Hs00191080_m1	6-7	82	
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	6-7	122	

### 2.1.7 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Biocoll Separating Solution	Biochrom (Berlin)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

DAPI	Invitrogen (Karlsruhe)
DAPT	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMSO	Wak-Chemie (Steinbach)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Färbelösung ( <i>modified Wright's Stain</i> )	Bayer Healthcare (Leverkusen)
Glycerin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Lysepuffer (Erythrozytenlyse)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Lysozym	AppliChem (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Nukleasefreies Wasser	Ambion (Austin, TX, USA)
PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
Propidiumiodid	Baack Labor (Schwerin)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Retronektin	Takara (Otsu, Japan)
RNase A	AppliChem (Darmstadt)
Triton X-100	Bio-Rad Laboratories (München)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

### 2.1.8 EDV-Programme

Die Auswertung durchflusszytometrischer Messdaten erfolgte mit Hilfe der Programme CXP 2.2 (Beckman Coulter), Kaluza 1.1 (Beckman Coulter) und Diva 6.1.2 (BD Biosciences). Zur Auswertung von mikroskopischen Aufnahmen wurde das Programm AxioVision (Rel. 4.8, Zeiss) verwendet. Die Auswertung von RT-qPCR Daten wurde mit dem Programm SDS 2.2 (Applied Biosystems) durchgeführt. Verwendete Programme zur statistischen Auswertung sind unter Punkt 2.2.7 angegeben.



### 2.1.9 Bakterien

Für molekularbiologische Arbeiten wurde der *E. coli*-Bakterienstamm One Shot Top10 (Invitrogen) verwendet.

Genotyp: F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*

### 2.1.10 Zelllinien

Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Zelllinien bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Zellkulturmedien finden sich unter Punkt 2.1.2.

#### HEK293T

HEK293-Zellen sind von der humanen embryonalen Nierenzelllinie (human embryonic kidney) HEK293 abgeleitet, die durch Transfektion mit DNA des Adenovirus Typ 5 immortalisiert wurden (Graham *et al.*, 1977). HEK293T-Zellen exprimieren zusätzlich stabil das large-tumor Antigen des Simian Virus 40 (SV40), was die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung ermöglicht (DuBridghe *et al.*, 1987). Diese Zelllinie wurde in dieser Arbeit zur Produktion virushaltiger Überstände verwendet. Die adhären wachsenden Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% trypsinisiert und 1:10 gesplittet.

#### 5637

Die humane Blasenzellkarzinomzelllinie 5637 produziert und sekretiert eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie z.B. IL-6, G-CSF und SCF (Myers *et al.*, 1984). Diese Zytokine regen humane hämatopoetische Progenitorzellen zur Koloniebildung an (McNiece *et al.*, 1989). Deshalb wird der Kulturüberstand dieser Zelllinie zur Herstellung von klonogenem Methyzellulosemedium verwendet, welches für LTC-IC-Assays benötigt wird. Für die Gewinnung des Überstandes wurden die Zellen zunächst bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch IMDM mit 20% FBS (für CFC-Assay) ersetzt und die Zellen für weitere vier bis sechs Tage kultiviert. Anschließend wird der Überstand abgenommen, sterilfiltriert und aliquotiert. Der gereinigte Überstand wird bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### AFT024

Die Zelllinie AFT024 ist eine murine Stromazelllinie, die von Moore 1997 aus der fötalen Leber isoliert wurde (Moore *et al.*, 1997). Durch Kokultivierung von humanen

HSVZ auf konfluenten AFT024-Zellen können diese *in vitro* mehr als sieben Wochen erhalten werden (Punzel *et al.*, 1999a). Dadurch eignet sich diese Kokultivierung zur Identifizierung von primitiveren humanen hämatopoetischen Zellen mit *in vitro*-Langzeitpotenzial in LTC-IC, NK-IC oder ML-IC Versuchen. Die adhärent wachsende Zelllinie wurde bei 33°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% trypsinisiert und im Verhältnis von ca. 1:5 bis 1:6 gesplittet. Da langfristig das Proliferationspotenzial dieser Zellen nachlässt, wurde nach jeweils ca. 7-8 Wochen eine neue Charge der Zelllinie in Kultur genommen.

### **OP9-GFP und OP9-DL1**

Die murine Stromazelllinie OP9 wurde aus der Schädeldecke einer neugeborenen Maus isoliert (Kodama *et al.*, 1994) und wird wegen ihrer supportiven Eigenschaften auf HSVZ bei *in vitro* Kokultur-Versuchen verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien OP9-GFP und OP9-DL1 wurden durch Transduktion der Linie OP9 mit für GFP (als Kontroll-Zelllinie) bzw. Delta-Like1 (Dl1) kodierenden retroviralen Konstrukten etabliert (Schmitt und Zuniga-Pflucker, 2002). Die Verwendung der Linie OP9-DL1 ist weit verbreitet und wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Induktion des Notch-Signalweges, auch in humanen HSVZ, verwendet (La Motte-Mohs *et al.*, 2005). Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% trypsinisiert und im Verhältnis von ca. 1:5 bis 1:6 gesplittet.

### **2.1.11 Primärzellen**

Alle Versuche mit humanem Zellmaterial wurden mit Genehmigung der Ethikkommissionen der Universitätskliniken Düsseldorf bzw. Essen durchgeführt.

Nabelschnurblute aus der José Carreras Stammzellbank der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, die z.B. aufgrund ihres zu geringem Gewichtes nicht in der Stammzellbank eingelagert wurden, wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Gesine Kögler für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Am Universitätsklinikum Essen erfolgte die Abnahme von Nabelschnurblut in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Leitung Prof. Dr. Rainer Kimmig, nach Zustimmung der Mütter.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Apheresat-Proben handelt es sich um Rückstellproben nach der Leukapherese G-CSF-mobilisierter, gesunder Spender. Die Proben wurden freundlicherweise von Dr. Johannes Fischer (Institut für

Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Knochenmarkproben (Rückstellproben) gesunder Spender wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dietrich W. Beelen, Direktor der Klinik für Knochenmarktransplantation am Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt.

### 2.1.12 Mausstämme

Die Mausstämme NOD.CB17-*Prkdc*<sup>scid</sup>/J (NOD/SCID) und NOD.Cg *Prkdc*<sup>scid</sup> *Il2rg*<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) wurden ursprünglich von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen und werden seit einigen Jahren im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen durch die Arbeitsgruppe Dürig (Klinik für Hämatologie) gehalten.

Zur Generierung von *Numb/Numblike* Doppel-*Knockout* Mäusen wurden folgende Mausstämme verwendet und im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen gehalten: Der Stamm B6.Cg-Tg(Vav1-cre)A2Kio/J (Vav-iCre) (de Boer *et al.*, 2003) wurde von Dr. Joachim Göthert (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Der Stamm *Numb*<sup>tm1Zili</sup> *Numb1*<sup>tm1Zili</sup>/J (Nb+L loxP) (Wilson *et al.*, 2007) wurde von Prof. Dr. Verdon Taylor (Department Biomedizin, Universität Basel) zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden der Zellkultur

#### 2.2.1.1 Einfrieren / Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Konservierung lebender Zellen wurden diese pelletiert, im jeweiligen Zellkulturmedium resuspendiert und 1:1 mit Einfriermedium (80% FBS, 20% DMSO) gemischt, um eine 10%ige DMSO-Endkonzentration zu erreichen. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml-Aliquots in Einfriereröhrchen überführt und unter Verwendung von mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfen, die eine konstante Temperatur-Absenkrate von 1°C/min ermöglichen, zunächst bei -80°C eingefroren. Für eine langfristige Lagerung wurden die Zellen in Stickstoff-Tanks überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfriereröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt, die Zellsuspension in 20 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und für 5 min bei 800 x g abzentrifugiert, bevor die Zellen in frischem Kulturmedium

aufgenommen und in Kultur genommen wurden. Auf diese Weise wurde das DMSO aus der Zellsuspension entfernt. Nach 24 h wurde das Medium komplett gewechselt, um tote Zellen aus der Kultur zu entfernen.

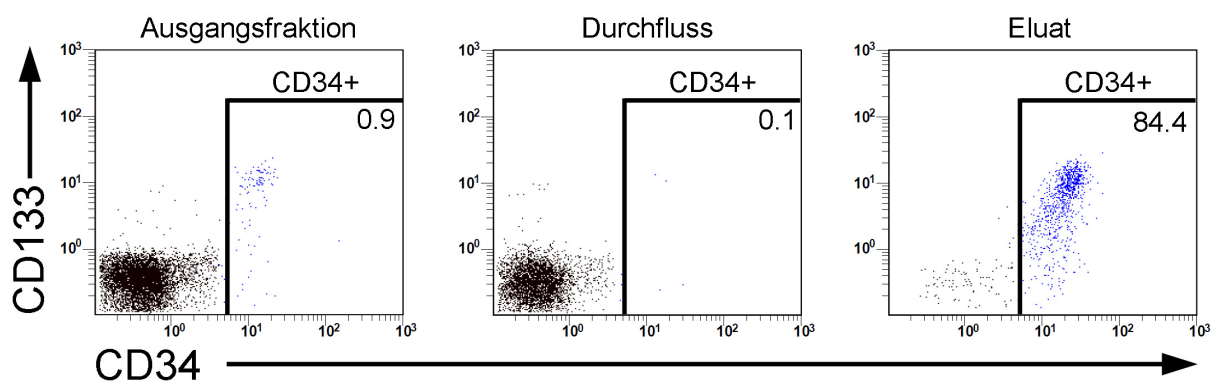
### **2.2.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen**

Zur Isolierung mononukleärer Zellen (MNZ) wurden in 50 ml Rörchen jeweils 15 ml Ficoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml; Biocoll Separating Solution) mit 35 ml humanem Nabelschnurblut, Knochenmark oder Apheresat überschichtet und mittels Dichtegradientenzentrifugation bei RT und 900 x g für 20 min bei deaktivierter Bremsfunktion zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation können mehrere sauber getrennte Phasen unterschieden werden. Erythrozyten und Granulozyten werden aufgrund ihrer höheren Dichte (>1,077 g/ml) in der untersten Phase pelletiert, darüber liegt die klare Ficollphase. In der darüberliegenden Interphase sammeln sich gut erkennbar die MNZ (hauptsächlich Lymphozyten, Monozyten und HSVZ) an, und die oberste Phase besteht aus Plasma und Thrombozyten. Die Interphase wurde mit einer Pipette vorsichtig abgehoben und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 650 x g 7 min zentrifugiert, wodurch MNZ pelletieren und Thrombozyten im Überstand verbleiben. Anschließend wurde das Pellet zur osmotischen Lyse residualer Erythrozyten in 15 ml Lysepuffer resuspendiert und für 7 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von PBS gestoppt und die Zellen bei 900 x g pelletiert. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, das Röhrchen auf 50 ml aufgefüllt und 500 µl zur Zellzahlbestimmung und zur Bestimmung des Gehaltes an CD34<sup>+</sup> Zellen abgenommen.

### **2.2.1.3 Anreicherung humaner CD34<sup>+</sup> Zellen**

CD34<sup>+</sup> Zellen (die HSVZ-enhaltende Zellfraktion) wurden mittels magnetischer Zellseparation aus der Fraktion der MNZ angereichert. Hierfür wurden MNZ erneut pelletiert, in 500 µl MACS-Puffer (0,1 % BSA, 2 mM EDTA in PBS) resuspendiert und 100 µl F<sub>c</sub>-Rezeptor Blockingreagenz (MBC CD34 *Micro Bead* Kit human, Miltenyi Biotec) hinzugegeben. Anschließend wurden je  $1 \times 10^8$  MNZ 40 µl anti-CD34-Antikörper, die mit ferromagnetischen Partikeln gekoppelt sind (MBC CD34 *Micro Bead* Kit human), hinzugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde nicht gebundener Antikörper durch Waschen mit MACS-Puffer entfernt und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension

wird über einen 40 µm Filter auf eine zuvor mit MACS-Puffer equilibrierte Separationssäule in einem starken Magnetfeld (Midimacs *Separation Unit*, Miltenyi Biotec) gegeben. Die Säule wird 2-3 mal mit jeweils einem Säulenvolumen MACS-Puffer gespült. Mit Antikörpern markierte Zellen (CD34<sup>+</sup> Zellen) verbleiben durch das starke Magnetfeld in der Säule, während unmarkierte Zellen durch die Säule fließen. Abschließend wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die CD34<sup>+</sup> Zellen werden mit zwei Säulenvolumina MACS-Puffer eluiert. Für weitere Analysen (Zellzahlbestimmung und Bestimmung des CD34<sup>+</sup> Gehaltes) werden von Durchfluss und Eluat Proben entnommen. Der Erfolg der Aufreinigung wurde vor Durchführung weiterer Proben mittels durchflusszytometrischer Analyse beurteilt. Stellvertretend für sämtliche verarbeiteten MNZ-Proben ist in Abb. 5 eine exemplarische durchflusszytometrische Messung von MNZ vor der Separation und Durchfluss und Eluat (nach der Separation) dargestellt. Alle Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind unter vergleichbaren Bedingungen aufgearbeitet worden.



**Abb. 5: Durchflusszytometrische Messung vor und nach magnetischer Zellseparation**

In der Ausgangsfraction mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut exprimierten in diesem Fall 0,9% der Zellen den Marker CD34 auf ihrer Oberfläche (CD34<sup>+</sup>). Nach erfolgter magnetischer Zellseparation unter Verwendung von an eisenhaltige *Microbeads* gekoppelte anti-CD34 Antikörpern wurden diese Zellen stark angereichert (in diesem Fall auf 84,4%), wohingegen im Durchfluss der Säule kaum noch CD34<sup>+</sup> Zellen detektierbar waren. Der Aufreinigungserfolg wurde jeweils durchflusszytometrisch unter Verwendung von anti-CD34 Antikörpern und anderer Antikörper gegen humane HSVZ-Marker (dargestellt in diesem Beispiel: CD133) dokumentiert.

Im Rahmen der gesamten Promotionszeit wurden auf diese Weise CD34<sup>+</sup> Zellen aus insgesamt 125 Nabelschnurbluten zu einem mittleren CD34<sup>+</sup> Anteil von 75,42% ( $\pm$  13,7%) angereichert. Der Großteil der auf diese Weise aufgearbeiteten CD34<sup>+</sup> Zellen wurde für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Projekte verwendet.

### **2.2.1.4 Kultivierung humaner CD34<sup>+</sup> Zellen**

Aufgereinigte CD34<sup>+</sup> Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, standardmäßig in zytokinhaltigem Medium (20% FBS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 100 U/ml L-Glutamin, 10 ng/ml SCF, 10 ng/ml TPO und 10 ng/ml FLT3L in IMDM, = HSVZ-Suspensionskulturmedium) in 24er Flachbodenplatten in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Zellen je Vertiefung bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Je Vertiefung wurden 500 µl Medium verwendet. Spätestens alle 3 Tage wurde die Hälfte des Mediums gewechselt. Bei Erreichen einer Zelldichte von mehr als  $2 \times 10^5$  Zellen je Vertiefung wurden die Zellen entsprechend auf mehrere Vertiefungen aufgeteilt.

## **2.2.2 Genetische Manipulation humaner CD34<sup>+</sup> Zellen**

### **2.2.2.1 Transfektion humaner CD34<sup>+</sup> Zellen mittels Nukleofektion**

Zur Transfektion aufgereinigter CD34<sup>+</sup> Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden wurde die Methode der Nukleofektion des Herstellers Amaxa entsprechend eines in unserer Gruppe etablierten Protokolls (von Levetzow *et al.*, 2006) verwendet. Entsprechend der Anzahl der Transfektionsansätze wurden 14 ml-Röhrchen mit je 5 ml Medium befüllt (20% FBS in IMDM). Gleichfalls wurden vorbereitend in 24er Flachbodenplatten zwei Vertiefungen je Ansatz mit 500 µl mit HSVZ-Suspensionskulturmedium befüllt. Die zu transfizierenden CD34<sup>+</sup> Zellen werden entsprechend der Anzahl der Transfektionsansätze in jeweils 100 µl Transfektionspuffer pro Ansatz gut resuspendiert und zu je 100 µl auf 14 ml Röhrchen verteilt. In die jeweiligen Transfektionsansätze wurden jeweils 1,5 µg siRNA-Oligonukleotide (Qiagen) hinzugegeben und der Ansatz komplett in eine Amaxa-Nukleofektionsküvette überführt. Nach einer Folge von Elektropulsen (Programm U001 des Nukleofektionsgerätes) wurde zeitnah 1 ml Medium (20% FBS in IMDM) in die Küvette gegeben und dann die Zellsuspension mit Hilfe von sterilen Feinspitzen-Pasteurpipetten (Alpha Laboratories) in die vorbereiteten 14 ml-Röhrchen überführt. Die transfizierten Zellen wurden bei 900 x g für 5 min pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen, wobei die Zellen in diesem Schritt nicht resuspendiert wurden. Die anschließende Inkubation des Zellpellets bei 37°C für 15 min ermöglichte die Regeneration der durch die Elektropulse geschädigten Zellmembranen. Nach dieser Regenerationsphase wurden die Zellen in vorgewärmtem HSVZ-Suspensionskulturmedium resuspendiert und wie unter Punkt 2.2.1.4 beschrieben kultiviert.

### 2.2.2.2 Transduktion humaner CD34<sup>+</sup> Zellen

Zur stabilen genetischen Manipulation von humanen CD34<sup>+</sup> Zellen wurde ein auf lentiviralen Vektoren basierendes System von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Helmut Hanenberg (Kinderklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf) adaptiert.

#### Verwendetes Plasmidsystem

Zur Produktion virushaltiger Überstände wurden je Ansatz drei Plasmide verwendet: Jeweils ein Vektorplasmid, ein Helferplasmid und ein Hüllplasmid. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektorplasmide pCL6-IEG-wo (IRES-eGFP) und pCL6-EG-wo (eGFP) basieren auf dem zur Familie der Retroviren zählenden Lentivirus HIV (humanes Immundefizienzvirus). Die viralen Strukturgene (z.B. *gag*, *pol*, *env*) wurden entfernt und werden durch das verwendete Helferplasmid bzw. Hüllplasmid kodiert. Das Vektorplasmid enthält eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) und *egfp* (*enhanced green fluorescent protein*) als Reporter gen unter der Kontrolle des SSFV (*spleen focus-forming virus*)-Promotors. In das Plasmid pCL6-IEG-wo wurde zudem zwischen MCS und *egfp* eine IRES (*internal ribosomal entry site*)-Sequenz eingefügt, die nach der Transkription einer bicistronischen mRNA bei der Translation die Expression von zwei getrennten Proteinen ermöglicht. Des Weiteren enthält das jeweilige Vektorplasmid das Verpackungssignal  $\Psi$ , welches notwendig ist, um die Inkorporierung viraler mRNA in die gebildeten viralen Partikel zu ermöglichen, und die für die Integration in das Genom der Zielzelle benötigten LTRs (*long terminal repeats*) des Virus. Neben der Verteilung der viralen Strukturgene auf mehrere Plasmide wurde durch eine Deletion der U3-Region im 3'-LTR-Bereich der viralen Expressionskassette sichergestellt, dass die produzierten viralen Partikel replikationsinkompetent sind (Leurs *et al.*, 2003).

Als Helferplasmid wurde der Vektor pCD/NL-BH verwendet, der für die lentiviralen Strukturgene *gag* und *pol* sowie die regulatorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev* und *tat* unter der Kontrolle des CMV (humanes Cytomegalie-Virus)-Promotors kodiert (Mochizuki *et al.*, 1998).

Als Hüllplasmid wurde der Vektor pcoPE, der für das foamyvirale (protoypisches Foamyvirus) Hüllprotein unter der Kontrolle des CMV-Promotors kodiert, verwendet. Das Verwenden dieses Hüllproteins zur Pseudotypisierung der lentiviralen Komponenten bietet im Gegensatz zu klassisch verwendeten Hüllproteinen (z.B. das Glycoprotein G des *vesicular stomatitis virus*, VSV-G) die Vorteile eines breiteren

Wirts- und Gewebetropismus (Meiering und Linial, 2001) sowie aufgrund der Größe des Foamyvirus-Genoms von über 13 kb eine potenziell höhere Kapazität, große heterologe Gensequenzen zu verpacken (Heinkelein *et al.*, 1998).

Darstellungen der verwendeten Plasmide finden sich im Anhang dieser Arbeit.

### **Klonierung von Expressionsplasmiden**

Zur Konstruktion lentiviraler Plasmide für die Überexpression der vier humanen Numb-Isoformen wurden die verschiedenen kodierenden Regionen (Numb1, 1956 bp; Numb2, 1812 bp; Numb3, 1923 bp; Numb4, 1779 bp) zur Klonierung in entsprechende pCL6-IEG-wo Plasmide durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* aus dem Expressionsplasmid pIRES-eGFP ausgeschnitten und in den entsprechend geöffneten Transfektor pCL6-IEG-wo ligiert. Zur Klonierung der für die vier Numb-Isoformen kodierenden Regionen in entsprechende pCL6-EG-wo Plasmide wurden diese mit Hilfe von *EcoRI* und *BsrGI* aus dem Expressionsplasmid peGFP-N1 ausgeschnitten und in den entsprechend geöffneten Transfektor pCL6-IEG-wo ligiert. Ursprünglich wurden die Numb-Expressionsplasmide freundlicherweise von Verdi *et al.* (Verdi *et al.*, 1999) zur Verfügung gestellt und die kodierenden Regionen für alle Numb-Isoformen in unserer Arbeitsgruppe durch Gregor von Levetzow und Jan Spanholtz in die Expressionsplasmide pIRES-eGFP und peGFP-N1 überführt. Das 2,4 kbp große cDNA-Fragment, das für die humane intrazelluläre Domäne von Notch1 (Notch1-ICD, engl. *intracellular domain*) kodiert, lag bereits in unserer Arbeitsgruppe vor und wurde von Gregor von Levetzow durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *XhoI* aus dem pCDNA3.1-Vektor (Invitrogen) ausgeschnitten und anschließend in den entsprechend mit *BglII* und *XhoI* geöffneten Transfektor pCL6-IEG-wo ligiert.

Das für dominant-negatives Mastermind-Like-1 (MAML1) kodierende, 906 bp große cDNA-Fragment wurde aus dem Expressionsvektor pFLAG-CMV2, der freundlicherweise von Prof. Dr. Lizi Wu (Universität von Florida) zur Verfügung gestellt wurde (Wu *et al.*, 2000), über *Sall* und *BamHI* ausgeschnitten und über die Schnittstellen *XhoI* und *BamHI* in das Plasmid pCL6-IEG-wo ligiert. Dieses cDNA-Fragment kodiert für eine verkürzte Form (Aminosäure 1-302) des nativen humanen MAML1-Proteins (Wu *et al.*, 2000).



Die relevanten Regionen aller verwendeten Expressionsplasmide wurden vor Beginn der Arbeiten mittels Sequenzierung durch einen externen Dienstleister (LGC Genomics, Berlin) überprüft.

### **Herstellung virushaltiger Überstände**

Für jeden herzustellenden virushaltigen Überstand wurden zwei 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit HEK293T-Zellen ( $6 \times 10^6$  Zellen pro Flasche) ausgesät und für einen Tag inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den drei im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Plasmiden transfiziert. Dafür wurde das Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI, hochmolekular, Sigma-Aldrich) verwendet. PEI ist ein kationisches Polymer, das Nukleinsäuren bindet, deren negative Ladung überdeckt und dadurch eine effiziente Aufnahme der DNA-Polykationen-Komplexe durch die Zielzelle ermöglicht (Boussif *et al.*, 1995). Vor der Transfektion wurde je Zellkulturflasche 135 µl PEI-Lösung (1 mg/ml) in 12 ml serumfreiem Medium in 14 ml-Röhrchen vorgelegt. Dann wurden die Plasmide hinzugegeben (Transferplasmid und Helferplasmid je 40 µg, Hüllplasmid 8 µg je Ansatz), der Ansatz gut vermischt und für 30 min bei RT inkubiert, um die Bildung von PEI-DNA Komplexen zu ermöglichen. Im Anschluss wurde die Transfektionslösung auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, 6 ml serumhaltiges Kulturmedium hinzugefügt und der Ansatz über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und je Flasche durch 20 ml Natriumbutyrat-haltiges (Buttersäure Natriumsalz, Merck) Medium ersetzt (10% FBS, 10 mM Natriumbutyrat in DMEM 4,5 g/l Glucose). Durch die Zugabe von Natriumbutyrat wird der CMV-Promotor der Plasmide induziert, wodurch bis zu zwölfmal höhere Virustiter erreicht werden können (Radsak *et al.*, 1989; Leurs *et al.*, 2003). Nach 6-8 h wurde das Medium erneut durch frisches Medium ersetzt und nach einer Inkubationsdauer von 18-22 h der virushaltige Überstand geerntet. Dazu wurde der Überstand abgenommen, zur Entfernung von residualen Zellen durch 0,45 µm Filter filtriert und in aerosoldichte 40 ml-Zentrifugationsröhrchen (Nalgene) überführt. Die viralen Partikel wurden durch Zentrifugation der Überstände bei 25.000 x g für 90 min bei 4°C konzentriert, nach Entfernen des Überstandes im gewünschten Volumen HEPES-gepufferten Mediums (20% FBS in IMDM) aufgenommen, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Alle auf diese Weise hergestellten virushaltigen Überstände wurden vor der Verwendung zur Transduktion primärer CD34<sup>+</sup> Zellen

entsprechend titriert, um vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten. Zur Titration wurden definierte Volumina der virushaltigen Überstände in serieller Verdünnung zu in definierter Zellzahl ausgesäten HEK293T Zellen appliziert, und nach 48 Stunden wurden die Anteile eGFP-positiver Zellen quantifiziert.

### **Transduktion humaner CD34<sup>+</sup> Zellen**

Die Transduktion humaner CD34<sup>+</sup> Zellen erfolgte in 24er Flachbodenplatten (*suspension culture plate*, Greiner), die vorher nach Herstellerangaben (Takara, Otsu, Japan) mit Retronektin (8 µg/cm<sup>2</sup> in PBS) beschichtet worden waren. Hierfür wurde die Flachbodenplatte entsprechend dem berechneten Titer mit 0,1-0,5 ml virushaltigem Überstand je Vertiefung beladen und bis zu 1x10<sup>5</sup> frisch isolierte CD34<sup>+</sup> Zellen in Medium (IMDM 20% FBS) je Vertiefung hinzupipettiert. Die Zytokine SCF, TPO und FLT3L (Endkonzentration 10 ng/ml) wurden hinzugegeben. Nach 12-14 h wurden die Zellen jeweils geerntet, mit Medium (20% FBS in IMDM) gewaschen und in frisches HSVZ-Suspensionsmedium überführt.

### **2.2.3 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Zählung und die Analyse von molekularen und physikalischen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Hierbei wird eine Zellsuspension durch eine Kapillare vom Durchflusszytometer aufgesogen und durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt. Die einzelnen Zellen werden in eine Messkammer geleitet, in der sie den Weg eines durch eine Fokussierungslinse gebündelten Laserstrahls kreuzen. Zellen, die diesen Strahl passieren, erzeugen Streulicht, das von optischen Sensoren im Gerät, sogenannten Photoelektronenvervielfachern (engl. *photomultiplier tube*; PMT), detektiert und verstärkt wird. Das in der ursprünglichen Bahn des Laserstrahls gestreute Licht (Vorwärtsstreulicht, engl. *forward scatter*, FSC) dient als Maß für die Größe der Zelle, wohingegen das seitliche Streulicht (engl. *side scatter*, SSC) als Maß für die Granularität einer Zelle dient. Durch das Laserlicht können zudem Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden, was genutzt wird, um Zellen hinsichtlich der Expression eines Reporterproteins wie z.B. des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) oder durch die Verwendung Fluorochrom-markierter Antikörper hinsichtlich ihrer Antigenexpression oder zu charakterisieren. Trifft das Licht eines Lasers auf eine mit Fluorochrom-gekoppeltem Antikörper markierte Zelle, wird es gestreut, und ein Teil der Energie des Laserstrahls wird durch das entsprechende Fluorochrom

absorbiert, was zur Anhebung von Elektronen auf ein höheres Energieniveau führt. Beim Zurückfallen der Elektronen auf das energetische Grundniveau wird dann Fluoreszenzlicht einer höheren Wellenlänge emittiert, über optische Filter und Spiegel aufgetrennt und durch Photoelektronenvervielfacher detektiert, verstärkt und quantifiziert. Es werden drei unterschiedliche Arten von optischen Filtern unterschieden: Der Langpass-, der Kurzpass- und der Bandpass-Filter. Der Langpass-Filter lässt langwelliges Licht ab einer definierten Wellenlänge passieren und reflektiert kurzwelligeres Licht, der Kurzpass-Filter lässt jeweils kurzwelliges Licht passieren und reflektiert langwelligeres Licht. Der Bandpass-Filter ermöglicht die Weiterleitung von Licht eines definierten Spektrums durch Kombination der Eigenschaften von Kurz- und Langpass-Filter. Je nach Verfügbarkeit von Fluorochromen mit ausreichend unterschiedlichen Emissionsspektren, der Anregungsspektren der im Durchflusszytometer verbauten Laser und der verwendeten Filter und Spiegel zur Auftrennung des Fluoreszenzsignals können gleichzeitig mehrere Fluoreszenzparameter quantitativ für jede einzelne analysierte Zelle gemessen werden. Dabei ist es essentiell, die durch die sich teilweise überlagernden Emissionsspektren der Fluorochrome und die Spektren der verwendeten Filter entstehenden Fehler computergestützt auszugleichen. In diesem als Kompensation bezeichneten Prozess werden die Signale in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen mathematisch gegeneinander abgeglichen, indem mit jeweils nur einem Fluorochrom gefärbte Zellen zur Einstellung der Messparameter als Kontrolle mitgeführt wurden (Traganos, 1984b, a; Alexander *et al.*, 2009; Pierzchalski *et al.*, 2011).

### **2.2.3.1 Durchflusszytometrische Analysen**

Durch zum Durchflusszytometer gehörige *Software* (vgl. Abschnitt 2.1.8) ermöglicht die Darstellung der gemessenen Signale aller Parameter als eindimensionales Histogramm oder als graphische Darstellung von Datenpunkte in Punktwolken (engl. *dotplot*), auf dem jede Achse einen anderen Parameter repräsentiert (FSC, SSC oder ein Fluoreszenzsignal). In solch einem *dotplot* entstehen so Wolken von Datenpunkten, die der Operator mit Hilfe der *Software* als Teilbereich markieren (engl. *gating*) und isoliert hinsichtlich ihrer Eigenschaften betrachten kann. Auf diese Weise können einzelne Zellfraktionen und Subpopulationen gezielt untersucht und quantifiziert werden.

Die extrazelluläre Markierung von Zellen mit direkt fluorochromkonjugierten Antikörpern wurde jeweils in Anwesenheit von 5 % (v/v) Eseserum durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Antikörper bei einer Verdünnung von 1:25 für 30 min bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden nicht gebundene Antikörper nach der Inkubationszeit durch Waschen mit PBS aus dem Färbeansatz entfernt. Zum Ausschluss toter Zellen wurden die Farbstoffe DAPI (Endkonzentration 0,1 µg/ml) oder Propidiumiodid (1 µg/ml) verwendet, durch die die DNA von Zellen, deren Membran nicht mehr intakt ist, markiert wird. Dadurch wird eine Diskriminierung von vitalen Zellen (kein Signal) von toten Zellen (positives Signal) bei der durchflusszytometrischen Messung ermöglicht.

Für intrazelluläre Färbungen wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellen zunächst mit 4% (v/v) Para-Formaldehyd für 20 min bei 4°C fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS durch Behandlung mit 0,1% (v/v) Triton X-100 (in PBS) für 40-45 min permeabilisiert. Die Zellen wurden pelletiert, in Wasch-Triton (0,01% Triton X-100 in PBS) aufgenommen und in Anwesenheit von 5 % (v/v) Eseserum mit entsprechendem unkonjugiertem Primärantikörper für 1 h bei RT auf dem Taumler inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch Waschen mit Waschtriton entfernt, danach erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen sekundären, fluorochromkonjugierten Antikörper für 1 h bei RT auf dem Taumler. Nach drei Waschschritten mit Waschtriton zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Zellen in PBS aufgenommen und standen für durchflusszytometrischen Analysen zur Verfügung.

Für alle durchflusszytometrischen Messungen wurden mit Isotyp-Kontrollantikörpern behandelte und ungefärbte Zellen als Kontrollansätze mitgeführt.

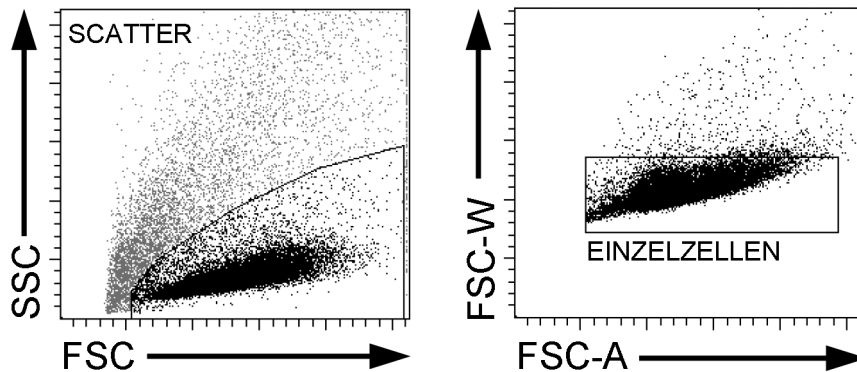
### **2.2.3.2 Durchflusszytometrische Zellsortierung**

Eine spezielle Anwendung der Durchflusszytometrie ist das Sortieren von Zellen. Bei reinen Messanwendungen wird die durchfließende Zellsuspension in einen Abfallbehälter entsorgt. Die Zellen können aber in speziellen Geräten, so genannten automatischen Zellsortierern, auch unmittelbar nach der Messung des Signals physikalisch aufgetrennt und in getrennten Gefäßen aufgefangen werden. Dazu wird nach der hydrodynamischen Fokussierung der Zellen im umhüllenden Flüssigkeitsstrahl dieser nach dem Passieren des Messpunktes piezoelektrisch bei

einer definierten Frequenz (hier 14 kHz) und Amplitude zu Schwingungen angeregt, so dass der Flüssigkeitsstrahl im sogenannten Tropfenabrissspunkt zu Tropfen übergeht. Die Distanz und damit die Zeitdauer zwischen der Messung und dem Tropfenabrissspunkt (*drop delay*) ist bei konstanten Geräteparametern konstant und wurde vor jeder durchflusszytometrischen Sortierung mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten Kalibrierungsbeads (BD FACS Accudrop Beads, BD) ermittelt. In dem Moment, in dem eine zu separierende Zellen den Tropfenabrissspunkt erreicht, wird für kurze Zeit der gesamte Flüssigkeitsstrahl elektrisch geladen, so dass im sich ablösenden Tropfen mit der darin enthaltenen Zelle eine elektrische Ladung angelegt wird. Im Weiteren wird durch ein elektrisches Feld zwischen zwei Ablenkplatten der Tropfen deflektiert und in entsprechend vorbereitete Probenröhrchen aufgefangen (Julius *et al.*, 1972; Ibrahim und van den Engh, 2007).

Durchflusszytometrische Sortierungsexperimente wurden mit einer 130 µm Nozzle bei einem Probenflüssigkeitsdruck von 10 psi durchgeführt. Als Trägerflüssigkeit wurde steriles PBS (PAA) eingesetzt. Die Kalibrierung des optischen Systems erfolgte mittels standardisierter Kalibrierungsbeads (BD Cytometer Setup & Tracking Beads, BD Biosciences). Alle zu sortierenden Zellsuspensionen wurden in Medium (20% FBS in IMDM) aufgenommen und zur Entfernung von Zellaggregaten vor der Messung durch ein steriles Zellsieb (35 µm Porengröße, BD Biosciences) filtriert und bei der Sortierung in Probenröhrchen mit 200 µl vorgelegtem Medium (20% FBS in IMDM) aufgefangen. Der Erfolg der Sortierung wurde jeweils durch nochmaliges Messen der sortierten Zellen mit den gleichen Einstellungen (Re-Analyse) überprüft. Die Reinheit der sortierten Zellfraktionen lag in der Regel bei über 99,5 %, bei geringeren Reinheiten wurden die Fraktionen erneut sortiert. Die erhobenen Daten der Zellseparationsprozedur wurden computergestützt gespeichert und mit Hilfe der zugehörigen *Software* Diva 6.1.2 (BD Biosciences) ausgewertet. Bei allen durchflusszytometrischen Sortierungen wurden unter Berücksichtigung der Größe und der Granularität der gemessenen Partikel Zelldebris und auf diese Weise erkennbar tote Zellen vorab ausgeschlossen (Abb. 6 links). Um für durchflusszytometrische Sortierungen eine höhere Reinheit zu erzielen, wurden ebenfalls Zell-Aggregate aufgrund der gemessenen Streulichtparameter ausgeschlossen (Abb. 6 rechts).

Für initiale Versuche zu Beginn dieser Arbeit am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (Universitätsklinikum Düsseldorf) wurde das Gerät EPICS Elite ESP (Coulter) verwendet und die Messdaten mit der Software CXP 2.2 (Beckman Coulter) ausgewertet.



**Abb. 6: Kriterien zum Ausschluss von Zell-Aggregaten In durchflusszytometrischen Messungen**

Exemplarische Darstellung verwendeter Regionen zum Ausschluss sehr granulärer Zellen und Zelldebris (links) sowie von Zell-Aggregaten (rechts). In diesem Beispiel wurden OP9-GFP Zellen und CD34<sup>+</sup> Zellen kokultiviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Region SCATTER ermöglicht eine erste Abgrenzung der Population, die erfahrungsgemäß die zu analysierenden Zellen enthält (hier CD34<sup>+</sup> Zellen) von Zelldebris und eindeutig toten oder granuläreren Zellen (hier auch OP9-GFP-Zellen, links). Im Weiteren (rechts) wurden Zellaggregate mit Hilfe der Parameter FSC-A (engl. *area*, Fläche) und FSC-W (engl. *width*; Weite) ausgeschlossen. Teilweise wurden auch je nach Eigenschaften der analysierten Zellsuspension sequenziell mehrere solche Regionen unter Verwendung anderer Kombinationen solcher Streulicht-Parametern verwendet (z.B. FSC-H, engl. *height*, Höhe gegen SSC-W oder SSC-H gegen FSC-W). Sofern nicht anders angegeben, werden im Allgemeinen immer die Area-Werte angegeben.

## 2.2.4 *In vitro* Differenzierung von humanen HSVZ

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene *in vitro*-Analyseverfahren verwendet, um das Differenzierungspotenzial von HSVZ retrospektiv beurteilen und quantifizieren zu können.

### 2.2.4.1 CFC (Colony-Forming Cell)-Ansatz

Der CFC-Ansatz ermöglicht die Analyse des erythro-myeloischen Differenzierungspotenzials von HSVZ. Zur Durchführung wurden die zu testenden Zellen in Duplikaten in definierter Zellzahl (in der Regel 200 Zellen) direkt mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung in 1 ml semisolidem Methyzellulosemedium (Methocult H4434 Classic, Stemcell Technologies) eingebracht und nach gründlichem Mischen in je zwei Vertiefungen einer 24er Flachbodenplatte überführt.

Nicht verwendete Vertiefungen der Platte wurden, um ein Austrocknen der umliegenden Ansätze zu verhindern, mit Wasser gefüllt. Die Ansätze wurden für 14 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend ausgewertet.

Das verwendete Medium enthält neben Methylzellulose, FBS, BSA und 2-Mercaptoethanol die Wachstumsfaktoren SCF, GM-CSF, IL-3 und EPO. Zellen mit erythro-myeloischem Differenzierungspotenzial werden dadurch zur Differenzierung angeregt und bilden hämatopoetische Kolonien, die je nach Form und Größe in fünf verschiedene Kolonietypen unterschieden werden: CFU-E (*colony-forming-unit-erythroid*), BFU-E (*burst-forming-unit-erythroid*), CFU-G (*colony-forming-unit-granulocyte*), CFU-M (*colony-forming-unit-macrophage*), CFU-GM (*colony-forming-unit-granulocyte-macrophage*) und CFU-MIX oder -GEMM (*colony-forming-unit-granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte*)-Kolonien. Als CFU werden dementsprechend die Zellen, die die jeweilige Kolonie hervorbringen, bezeichnet. Retrospektiv lässt dieser Ansatz damit eine Beurteilung des Stadiums der Determinierung von verschiedenen HSVZ zu: BFU-E und CFU-E Progenitoren bilden Kolonien, die nur aus erythrozytären Zellen bestehen und werden damit als erythrozytär determiniert angesehen. CFU-GM, -G und -M Progenitoren haben das Potenzial, Granulozyten und Makrophagen bzw. nur Granulozyten oder nur Makrophagen hervorzubringen, das Potenzial zur Bildung erythrozytärer Zellen aber verloren. CFU-MIX-Kolonien werden von Zellen gebildet, die das Potenzial hatten, sowohl erythrozytäre Zellen als leukozytäre myeloische Zellen zu bilden. Dementsprechend werden sie als die unreifsten in diesem Ansatz detektierbaren Zellen angesehen (Nissen-Druey *et al.*, 2005).

#### **2.2.4.2 Qualitative Analyse von Zellen aus einzelnen CFC-Kolonien**

Für die detaillierte Analyse einzelner hämatopoetischer Kolonien im CFC-Ansatz wurden, um Vermischungen zwischen Kolonien zu vermeiden, die Zellen in einer Dichte von 100 Zellen/ml in das semisolid Medium sortiert und in 6er Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 14 Tagen wurden einzelne zu untersuchende Kolonien vorsichtig bei mikroskopischer Betrachtung mit einer Standard-Pipette aus der Methylzellulose gesaugt und in PBS resuspendiert. Residuale Methylzellulose wurden durch zweimaliges Waschen mit EDTA-haltigem (2 mM) PBS herausgewaschen. Die Zellen wurden entweder für durchflusszytometrische Analysen einzelner Kolonien verwendet, oder es wurden, sofern nicht anders

angegeben, 5 Kolonien eines Typs gemischt, mittels Zytospin auf Objektträger aufgebracht und mit Eosin-Methylenblau nach Wright gefärbt (Hematek 2000 Slide Stainer mit Hematek Stain Pak, Modified Wright's Stain, Bayer Healthcare). Diese Färbetechnik ermöglicht durch die spezifische Anfärbung von Kerndetails und zytoplasmatischer Strukturen der Zellen die genaue Diskriminierung verschiedener hämatopoetischer Zellqualitäten. Auf diese Weise lassen sich u. a. Granulozyten-Subtypen unterscheiden: Eosinophile Granula binden den sauren Farbstoff Eosin und erscheinen orange-rötlich, basophile Granula binden den basischen Farbstoff Methylenblau und erscheinen bläulich-violett. Neutrophile Granula bindet keinen der beiden Farbstoffe. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mikroskopisch (Zeiss Axio Observer Z1). Für Analysen von Zellen aus CFC-Kolonien mittels RT-PCR wurden, wenn nicht anders angegeben, jeweils fünf Kolonien des gleichen Kolonietyps gemischt. RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurden wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben durchgeführt.

#### **2.2.4.3 LTC-IC (Long-term culture-initiating cell)-Ansatz**

Die Arbeitsgruppe um Sutherland entwickelte Ende der 1980er Jahre den sogenannten *Long-Term Culture-Initiating Cell* (LTC-IC)-Ansatz, der nach dem aktuellen Stand der Forschung eher unreifere myeloische Progenitoren mit Stammzeleigenschaften beschreibt als der CFC-Ansatz (Sutherland *et al.*, 1990). Der Ansatz besteht aus zwei Kulturphasen. In der ersten Phase werden die zu testenden HSVZ mit murinen Stromazellen kokultiviert, in der zweiten Phase wird analog zum CFC-Ansatz die Differenzierung induziert (Punzel *et al.*, 1999a). Somit werden im LTC-IC-Ansatz retrospektiv Zellen als LTC-IC identifiziert, die die Fähigkeit haben, ihr Differenzierungspotenzial über einen Zeitraum von 5 Wochen (erste Phase) zu erhalten und danach im CFC-Ansatz (zweite Phase) noch in der Lage sind, sekundäre myeloische Kolonien hervorzubringen. Das folgende Protokoll beschreibt die Durchführung des LTC-IC-Ansatzes.

Um Zellkulturplatten zur Durchführung von LTC-IC-Ansätzen zu präparieren, wurden AFT024-Zellen, die in einer Zellkulturflasche nahezu konfluent gewachsen sind, trypsinisiert und auf zuvor mit 0,1% Gelatine (Stem Cell Technologies) beschichteten 96er-Flachbodenplatten ( $1,5 \times 10^4$  Zellen je Vertiefung) ausplattiert und bei 33 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen bei 35 Gy bestrahlt (320 kV X-Ray Machine, GE/Pantak), um weiteres Wachstum zu verhindern.



Spätestens 24 h nach Bestrahlung wurde das Medium ausgetauscht. Die zu testenden Zellen wurden in definierter Zellzahl (meist 6.000 Zellen je Ansatz) durchflusszytometrisch sortiert und in vier Verdünnungen in 22 Replikaten je Verdünnung auf 96er Flachbodenplatten mit vorher bestrahlten AFT024 Zellen kokultiviert. Das dabei verwendete LTC-IC Medium (12,5% FBS für LTC, 12,5% Pferdeserum, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin in IMDM) enthielt vorgetestetes FBS (Stemcell Technologie), das die Langzeitkultur von HSVZ unterstützt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 35 Tage kultiviert. Einmal wöchentlich wurde das Medium durch Abnahme von 80 µl und Zugabe von 100 µl frischen LTC-IC-Mediums je Vertiefung erneuert. Die Differenz von ca. 20 µl geht jeweils im Laufe einer Woche durch Verdunstung verloren. Nach Ablauf der fünfwöchigen Kulturdauer wurde das Medium nahezu vollständig abgenommen, die Zellen wurden mit Methylcellulose-GEMM-Medium überschichtet (1,2% Methylzellulose, 30% FBS für CFC-Ansatz, 10% Überstand der Zelllinie 5637 in IMDM) und für weitere 10-14 Tage kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Platten mikroskopisch ausgewertet. Vertiefungen, in denen nach dem Überschichten sekundäre myeloische Kolonien entstanden sind, werden als positiv gewertet (LTC-IC). Ihre Frequenz innerhalb der eingesetzten Zellen wurde anhand der definierten Verdünnungsreihe mittels Poisson-Statistik ermittelt. Dazu wurde die *Software* L-Calc (Stemcell Technologies) eingesetzt.

#### **2.2.4.4 NK-IC (Natural killer cell-initiating cell)-Ansatz**

Zur Quantifizierung primitiver lymphatischer Vorläufer wurde der sogenannte NK-IC (Natural killer cell-initiating cell)-Ansatz verwendet (Punzel *et al.*, 1999c). Ähnlich wie bei der Durchführung des myeloischen LTC-IC Ansatzes wurden zu testende Zellen nach dem gleichen Schema mit bestrahlten AFT024-Stromazellen in 96er Flachbodenplatten für 5 Wochen kokultiviert. Das dabei verwendete Medium stimulierte stellvertretend für Zellen mit lymphatischem Differenzierungspotenzial die Proliferation und Reifung primitiver HSVZ mit dem Potenzial zur Differenzierung zu NK-Zellen (20% hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum, 20 µg/ml Ascorbinsäure, 50 µM Selen, 5 µM 2-Mercaptoethanol, 50 µM Ethanolamin, 1000 U/ml IL-2, 5 ng/ml IL-3, 20 ng/ml IL-7, 20 ng/ml SCF, 10 ng/ml FLT3L in DMEM 4,5 g/l Glucose/Ham's F12 im Verhältnis 2:1). Jeweils die Hälfte des Mediums wurde wöchentlich gewechselt. Ab der zweiten Woche wurde an Zytokinen nur noch IL-2 hinzugegeben. Nach einer Kultivierungsdauer von 35 Tagen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurden

exemplarisch Vertiefungen mit vitalen Zellen geernet und durchflusszytometrisch die Expression der NK-Zell-spezifischen Antigene CD16 und CD56 durchflusszytometrisch analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte analog zum LTC-IC Ansatz.

#### **2.2.4.5 Erythrozytärer Flüssigkultur-Differenzierungsansatz**

Zur Quantifizierung der erythrozytären Differenzierungsfähigkeit von HSVZ wurde ein Zwei-Phasen Flüssigkultur-Differenzierungsansatz (Ery-Ansatz) nach Dorn *et al.* (Dorn *et al.*, 2008) verwendet. Zu testende sortierte Zellen wurden in definierter Zellzahl sortiert und in erythrozytärem Differenzierungsmedium (15% FBS, 1% BSA, 0,1 M 2-Mercaptoethanol, 0,28 mg/ml Transferrin, 1 U/ml EPO, 100 U/ml L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin in DMEM 4,5 g/l Glucose) in jeweils 4 Verdünnungen in 96er Flachbodenplatten (1000, 2000, 4000 und 8000 Zellen je Vertiefung) pipettiert. In der ersten Phase (Tag 1 bis 7) wurde dem Medium zusätzlich 10 ng/ml SCF und 40 ng/ml IGF-1 hinzugegeben. Von Tag 8 bis 14 wurde dem Medium Insulin (1 mg/ml) hinzugegeben. Alle 3-4 Tage wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ausgetauscht. Nach einer Gesamtkultivierungsdauer von 14 Tagen wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und durchflusszytometrisch die Zellzahl (Flow-Count *Fluorospheres*, Beckman Coulter) sowie die Expression der erythrozytären Oberflächenmarker Glycophorin A (GPA) und CD71 bestimmt.

#### **2.2.4.6 Megakaryozytärer Flüssigkultur-Differenzierungsansatz**

Das verwendete Protokoll zur Quantifizierung des megakaryozytären Differenzierungspotenzials in Flüssigkultur (MK-Ansatz) basiert auf verschiedenen Vorarbeiten zur *in vitro* Differenzierung von HSVZ in Megakaryozyten bzw. Thrombozyten (Bruno *et al.*, 1988; Teramura *et al.*, 1992; Banu *et al.*, 1995; Boyer *et al.*, 2008). Analog zum erythrozytären Flüssigkultur-Differenzierungsansatz wurden zu testende sortierte Zellen in definierter Zellzahl sortiert und in megakaryozytärem Differenzierungsmedium (5% BSA, 0,1 M 2-Mercaptoethanol, 0,2 mg/ml Transferrin, 1 mg/ml Insulin, 50 ng/ml TPO, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 100 U/ml L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin in IMDM) in jeweils 4 Verdünnungen in 96er Flachbodenplatten (1000, 2000, 4000 und 8000 Zellen je Vertiefung) pipettiert. Alle 3-4 Tage wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ausgetauscht. Nach

einer Gesamt-Kultivierungsdauer von 14 Tagen wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und durchflusszytometrisch die Zellzahl (Flow-Count *Fluorospheres*, Beckman Coulter) sowie die Expression der megakaryozytären Oberflächenmarker CD41 und CD61 bestimmt.

### **2.2.5 Mausversuche**

Die Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mausversuche lassen sich im Wesentlichen in zwei Bereiche aufteilen:

Mit Hilfe der immundefizienten Mausstämme NOD/SCID und NSG wurden Subpopulationen humaner HSVZ funktionell auf ihre Fähigkeit getestet, nach Transplantation in das Knochenmark der Mäuse einzuwandern und dieses zu repopulieren (Repopulierungsassay). Die entsprechenden Versuche erfolgten mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen 87-51.04.2010.A349) und in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Jan Dürig (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen).

Des Weiteren wurde das Cre-loxP-System verwendet, um die Funktion der Proteine Numb und Numblake in murinen HSVZ zu analysieren. Hierzu wurden Mäuse generiert, in denen die gewebespezifisch exprimierte Cre-Rekombinase beide entsprechenden Gene in allen hämatopoetischen Zellen inaktiviert (Numb/Numblake *Knockout*-Mäuse). Diese Versuche erfolgten in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Joachim Göthert (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen).

Die Genotypen aller verwendeten Mausstämme sind in Abschnitt 2.1.12 angegeben.

#### **2.2.5.1 NOD/SCID- und NSG-Maus Repopulierungsansatz**

Eine humane hämatopoetische Zelle, die in einer subletal bestrahlten NOD/SCID- oder NSG-Maus ein humanes blutbildendes System bilden kann, wird als SCID-repopulierende Zelle (engl. *SCID-repopulating cell*, SRC) bezeichnet. Die Frequenz von SRCs ist sehr gering und beträgt im adulten Knochenmark beispielsweise ca. 1 in 3 Millionen mononukleären Zellen (Wang *et al.*, 1997). Um das Vorhandensein von SRCs in zu testenden humanen hämatopoetischen Subpopulationen beurteilen und vergleichend quantifizieren zu können, wurde der NOD/SCID- bzw. NSG-Repopulierungsassay verwendet. Beide Mausstämme sind immundefizient und

eignen sich deshalb für Transplantationsexperimente mit humanen HSVZ. Dem klassisch verwendeten NOD/SCID Stamm fehlen funktionelle B- und T-Zellen, bei dem verwendeten NSG-Stamm (NOD/SCID gamma) ist zudem die  $\gamma$ -Untereinheit des für die NK-Zell Reifung essentiellen Interleukin-2 Rezeptors vollständig deletiert, weshalb diese Mäuse auch keine funktionellen NK-Zellen besitzen (Cao *et al.*, 1995; Greiner *et al.*, 1995; Shultz *et al.*, 2005).

10-12 Wochen alte, zu transplantierende Mäuse wurden 12-24 h vor der Transplantation sublethal (3,25 Gy) bestrahlt. Da berichtet wurde, dass humane SRCs weibliche Mäuse besser repopulieren (Notta *et al.*, 2009), wurde darauf geachtet, dass experimentelle Mausgruppen hinsichtlich des Geschlechts ausgeglichen sind. Die Injektion definierter Zellzahlen durchflusszytometrisch sortierter humaner HSVZ-Subpopulationen erfolgte mit einer 29 Gauge Kanüle (Micro-Fine+, BD Biosciences) intravenös in die laterale Schwanzvene. Die Zellen wurden in RPMI-Medium ohne Zusätze in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l/Maus appliziert. Zur Analyse und Quantifizierung der humanen Repopulierung wurden die Versuchstiere nach acht Wochen durch Genickbruch getötet und jeweils beide Femora und Tibiae entnommen bzw. herauspräpariert. Das Knochenmark wurde durch Spülen mit jeweils 5 ml IMDM ohne Zusätze aus den Knochen isoliert, die Zellsuspension durch ein 40  $\mu$ m-Zellsieb gedrückt und bei 650 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und nach Blocken der F<sub>c</sub>-Rezeptoren (*Mouse Fc Block*, BD Biosciences) zur Detektion und Quantifizierung humaner Zellen mit humanspezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Bestrahlung, Transplantation und Pflege der Mäuse während der Versuchsdauer erfolgte freundlicherweise durch Michael Möllmann (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten gemeinsam.

#### **2.2.5.2 Generierung von Numb/Numblike Knockout-Mäusen**

In dieser Arbeit wurde das Cre-loxP-System zur gewebespezifischen Deletion der Gene Numb und Numblike im hämatopoetischen Kompartiment von Mäusen verwendet. Dazu wurden Mäuse des Stammes B6.Cg-Tg(Vav1-cre)A2Kio/J (Vav-iCre), die spezifisch im hämatopoetischen Kompartiment das *Vav-iCre*-Transgen bestehend aus dem Promotor des Onkogens *Vav1* sowie der cDNA der Rekombinase Cre (engl. *cyclization recombination*), exprimieren (de Boer *et al.*,

2003), mit Mäusen des Stammes *Numb*<sup>tm1Zili</sup> *Numbl*<sup>tm1Zili/J</sup> (Nb+L loxP) verkreuzt. Im letzteren Stamm sind Exon 1 des *Numb*-Gens und Exon 1 bis 3 des *Numbl*-Gens von loxP Sequenzen flankiert (Wilson *et al.*, 2007). Die Aktivität der auf diese Weise eingekreuzte Cre-Rekombinase entfernt durch Rekombination spezifisch die loxP-flankierten Zielsequenzen in allen hämatopoetischen Zellen der Maus und deletiert somit Teile der Gene selektiv in diesen Zellen (Gu *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 1997).

### **Genotypisierung von Mäusen**

Zur Genotypisierung der aus den jeweiligen Verkreuzungsschritten resultierenden Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Dazu wurde das Gewebe zunächst in 500 µl Lysepuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 20% SDS, 0,5 mM EDTA, Proteinase K 0,5 mg/ml in nukleasefreiem Wasser) überführt und über Nacht bei 55°C und 1200 rpm in einem Thermomixer inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 10.000 x g zur Entfernung nicht-löslicher Gewebekomponenten wurde die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt, pelletiert, einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und in nukleasefreiem Wasser gelöst. Der Nachweis jeweiliger Genotypen erfolgte durch Standard-PCRs mit den in Abschnitt 2.1.6 aufgelisteten Primern.

### **Organentnahmen**

Zur Untersuchung möglicher mutanter Phänotypen der *Knockout*-Mäuse wurden jeweils Kontrolltiere und *Numb/Numbl* *Knockout*-Mäuse nach Untersuchung des Habitus mittels zervikaler Dislokation getötet und die Morphologie des gesamten Organismus während der Präparation zur Entnahme von Blut, Thymus und Knochenmark begutachtet. Die Entnahme von Blut erfolgte durch intrakardiale Punktation nach Eröffnung des Thoraxraumes mit einer 23 Gauge-Nadel und einem EDTA-Röhrchen. Das Thymus-Gewebe wurde mit Hilfe der angerauten Flächen zweier Objektträger in 2 ml RPMI-Medium in einer Petrischale zerrieben und die Zellsuspension durch ein 100 µm-Zellsieb filtriert. Die Präparation von Knochenmark und die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit mausspezifischen Antikörpern analog zu Punkt 2.2.5.1. Die jeweilige Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauerzählkammer. Die Isolierung genomischer DNA aus Einzelzellsuspensionen wurde mit Hilfe des Qiagen QIAamp DNA Blood Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

**Hinweis:** Alle Organentnahmen und die durchflusszytometrischen Analysen der isolierten Zellen aus Kontrolltieren und *Numb/Numblike Knockout*-Mäusen wurden freundlicherweise durch Stefanie Weber (Arbeitsgruppe Göthert, Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt.

## **2.2.6 Molekularbiologische Methoden**

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle molekularbiologischen Methoden entsprechend den Angaben aus Sambrook und Russel (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt.

### **2.2.6.1 Bakterienkultur**

Für die Anzucht, Vermehrung und Selektion von *E. coli*-Bakterien wurden Flüssigkulturmedium (LB-Broth, Roth) und Agar-Kulturplatten (LB-Agar, Roth) verwendet. Bakterienkulturen wurden bei 37 °C inkubiert. Selektionsmedien wurden mit Antibiotika (Ampicillin 100 µg/ml, Sigma-Aldrich; Kanamycin 50 µg/ml, Sigma) versetzt.

### **2.2.6.2 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli***

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurden zunächst aus einem Bakterienstock 3 ml LB-Medium als Übernachtskultur angeimpft. Am nächsten Tag wurde 1 l LB-Medium mit 1 ml Bakteriensuspension der Vorkultur versetzt und bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,5-0,7 kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 15-30 Minuten auf Eis abgekühlt, dann in vorgekühlte Sorvall-Zentrifugenbecher (SLA-1500 Rotor) überführt und bei 3800 x g für 10 Minuten pelletiert. Durch drei Waschschriffe wurden die Bakterien von Mediumresten und Salzen befreit: Die ersten beiden Waschschriffe erfolgten mit kaltem Wasser, der erste Waschschriff mit dem Ausgangsvolumen, der zweite Schriff mit dem halben Ausgangsvolumen. Die Pelletierung erfolgte ebenfalls bei 3800 x g. Im abschließenden Waschschriff wurden die Zellen in 1/50 Ausgangsvolumen Wasser mit 10% Glycerin (Sigma) (v/v) resuspendiert und pelletiert. Die Bakterien wurden in ca. 2 ml Wasser mit 10% Glycerin (v/v) aufgenommen, in Aliquots zu 40 µl in 1,5 ml Plastik-Reaktionsgefäße abgefüllt und in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die eingefrorenen Bakterien können bei -80 °C mindestens ein halbes Jahr gelagert werden. Um eine qualitativ gute Kompetenz und damit später eine gute Transformationsrate zu erzielen, ist es erforderlich, während aller Schriffe kalt zu

arbeiten. Die Zentrifuge sowie Gefäße und Flüssigkeiten sollten vorgekühlt sein und sämtliche Arbeitsschritte sollten auf Eis erfolgen.

#### **2.2.6.3 Transformation elektrokompeter Bakterien**

20 ng Ligationsprodukt oder 1-10 ng Plasmid-DNA wurden in 40 µl-Aliquots elektrokompeter Bakterien (*E. coli* TOP10) pipettiert, eine Minute auf Eis vorinkubiert und in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm, Eurogentec) überführt. Die Transformation mit dem Elektroporationsgerät (EasyjecT) erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Direkt nach dem elektrischen Puls wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur Regeneration ohne Antibiotikum bis zu 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 200µl der Bakterienlösung auf entsprechenden selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **2.2.6.4 Isolierung von Plasmid-DNA**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurden 1,5 ml einer 4 ml Übernachtskultur 1 min bei 10.000 x g in 1,5 ml Reaktionsgefäßen pelletiert und das Pellet in 200 µl TELT-Puffer (1 M Tris pH 8,0, 0,5 M EDTA pH 8,0, 10% Triton X-100, 3,2 M LiCl, 50 mg/ml Lysozym und 20 mg/ml RNase A) resuspendiert. Zur Lyse wurde die Bakterienlösung nacheinander 5 min bei RT und 5 min bei 100°C inkubiert und danach für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 10.000 x g wurde das Pellet (bestehend aus Zelltrümmern) mit Hilfe einer Pipettenspitze entfernt und der Lösung zur Fällung der DNA 200 µl Isopropanol hinzugefügt und der Ansatz zur Durchmischung mehrmals invertiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 15.000 x g für 15 min wurde das entstandene DNA-Pellet einmal mit 800 µl Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

Zur Präparation von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab (z.B. zur Transfektion primärer Zellen), wurde das Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

#### **2.2.6.5 Enzymatische Spaltung von DNA**

Zur enzymatischen Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer von NEB und Fermentas nach Herstellerangaben bzw. den Angaben aus Sambrook und Russel (Sambrook und Russell, 2001) entsprechend verwendet. Der Erfolg der enzymatischen Spaltung wurde mittels Agarose-

Gelelektrophorese überprüft. Zur Isolation ausgeschnittener DNA-Fragmente wurden entsprechende Gelbanden eluiert und die DNA nach Herstellerangaben aufgereinigt (Wizard *SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega).

#### **2.2.6.6 Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide wurden jeweils 100 ng des geöffneten Plasmides und das aufgereinigte DNA-Fragment im 6-fachen molaren Überschuss zusammen mit 2 µl 10x Ligationspuffer sowie 1U T4-DNA-Ligase (Fermentas) gemischt und über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Die Ligrationsreaktion wurde direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **2.2.6.7 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde entsprechend der Angaben aus Sambrook und Russel (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden 1 %ige Agarosegele und die Größenstandards *GeneRuler 1 kb plus* oder *FastRuler low range DNA Ladder* (Fermentas) verwendet.

#### **2.2.6.8 Isolierung von RNA**

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNAeasy Micro Kit gemäß den Angaben des Herstellers (Qiagen). Die hierbei verwendeten Anionenaustauscher-Säulen des Kits wurden speziell zur RNA-Isolierung aus wenig Ausgangsmaterial (<math>5 \times 10^5</math> Zellen) entwickelt. Zellproben zur RNA-Extraktion wurden z.B. nach durchflusszytometrischer Zellsortierung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen pelletiert, einmal mit kaltem PBS gewaschen, in 75 µl RLT-Puffer aufgenommen und lysiert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der selektiven Bindung von freigesetzter RNA an die Siliziumdioxid-Membran der Säule, während DNA und Zellfragmente im Laufe der Aufreinigungsprozedur von der Säule gewaschen werden. Kontaminierende DNA-Moleküle wurden durch die Behandlung der Säule durch DNase nach Herstellerangaben (Qiagen) eliminiert. Auf diese Weise aufgereinigte RNA wurde in 12 µl nukleasefreiem Wasser (Ambion) eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Probe erfolgte photometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop 1000 (PeQLab).



### **2.2.6.9 Reverse Transkription zur Synthese von cDNA**

Einzelsträngige RNA kann mit Hilfe sogenannter reverser Transkriptasen (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970). In der vorliegenden Arbeit wurde dazu das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit entsprechend der Angaben des Herstellers (Applied Biosystems) verwendet. Die reverse Transkription erfolgt dabei mit Hilfe zufälliger Hexamernukleotide. Je Probe wurde zunächst ein zweifacher RT-Mastermix (2 µl 10x RT Puffer, 0,8 µl 100 nM dNTP Mix, 2 µl 10x RT Random Primer, 1 µl MultiScribe Reverse Transkriptase und 4,2 µl nukleasefreies Wasser) vorbereitet, 1:1 mit 10 µl RNA vermischt und nacheinander 10 min bei 25°C, 2 h bei 37°C und 5 min bei 85°C inkubiert. Im Hinblick auf folgende RT-qPCR Versuche wurde jeweils als Negativkontrolle ein Ansatz ohne reverse Transkriptase (minus-RT Kontrolle) angesetzt. Vor dem Einsatz für RT-qPCR-Versuche wurde die Reaktion abschließend mit 150 µl nukleasefreiem Wasser (Ambion) verdünnt, um eine Beeinträchtigung der RT-qPCR Reaktion durch residuale Bestandteile aus dem RT-Ansatz zu verhindern.

### **2.2.6.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

PCRs zur spezifischen Amplifikation von cDNA- oder gDNA-Fragmenten wurden unter Zugabe von 2 µl 10x PCR-Puffer (Qiagen, enthält 15mM MgCl<sub>2</sub>), 0,5 µl dNTP-Mix (je 5mM, Fermentas, jeweils 0,5 µl Primer (10 µM) sowie 1U Taq Polymerase (Qiagen) in einem Gesamtvolumen von 20 µl und je nach verwendetem Primersatz mit unterschiedlichen *Annealing*-Temperaturen (55-62°C) nach Angaben des Herstellers und unter Standardbedingungen durchgeführt (Mullis *et al.*, 1986).

### **2.2.6.11 Quantitative Real-Time-PCR (RT-qPCR)**

Die Quantifizierung der Genexpression auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time PCR (RT-qPCR), ausgehend von jeweils revers transkribierter mRNA, wurden im BioChip-Labor des IFZ (Institut für Zellbiologie, PD Dr. Ludger Klein-Hitpass) am Universitätsklinikum Essen mit Hilfe von TaqMan-Assays von Applied Biosystems durchgeführt. Mit dieser Methode lässt sich die Genexpression eines Zielgens relativ zu einem endogenen Referenzgen quantifizieren. Geeignete Referenzgene weisen unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine konstante Expression auf und sind meist in allen Zelltypen vorhanden. In der vorliegenden Arbeit wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Neben der endogenen

Kontrolle wurde in jedem Versuch eine NTC (*no template control*; ein Ansatz ohne DNA) mitgeführt. Jede analysierte Probe wurde in Duplikaten analysiert.

Der TaqMan-Assay (verwendete Assays sind unter Punkt 2.1.6 aufgelistet) basiert funktionell auf der 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase. Die verwendeten TaqMan-Sonden sind fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, deren 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (6-Carboxyfluorescein, kurz FAM) markiert sind und während der PCR wie auch die flankierenden Primer spezifisch an die Zielsequenz hybridisieren. Das 3'-Ende der Sonde ist mit einem sogenannten *Quencher*-Farbstoff (in diesem Fall Tetramethyl-Rhodamin, kurz TAMRA) markiert, der durch einen Phosphatrest blockiert wird. Solange die Sonde intakt ist, wird bei Anregung die Energie des Reporterfarbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe emissionsfrei zum benachbarten Quencher-Farbstoff übertragen (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer, FRET). Während der Elongationsphase der PCR wird die Sonde, die an den Einzelstrang hybridisiert ist, hydrolysiert und der FRET unterbrochen. Dementsprechend nimmt während der Amplifikation des PCR-Produktes das Fluoreszenzsignal des Reporters, das nach jedem PCR-Zyklus (*real-time*) gemessen wird, zu. Als passive Referenz zur Berechnung der Fluoreszenz diente der im PCR-Mastermix enthaltene Farbstoff ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin).

Jeder Reaktionsansatz wurde entsprechend der Herstellerangaben in 20 µl Ansätzen (10 µl 2x qRT-PCR Master-Mix, 1 µl TaqMan-Sonde, 9 µl cDNA) in 96er Flachbodenplatten im *Real-Time* PCR-Gerät ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) durchgeführt. Nach vollendetem Lauf wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte durch die Auswertesoftware (Applied Biosystems *Sequence Detection System* 2.2) grafisch gegen die Zyklenanzahl dargestellt. Nach Bestimmung eines Schwellenwertes im frühen exponentiellen Bereich der Amplifikationskurven, dem sogenannten Ct (engl. *cycle threshold*)-Wert, wurde der  $\delta$ Ct-Wert als Differenz der Ct-Werte des Zielgens und des endogenen Referenzgens (GAPDH) berechnet. Der im nächsten Schritt bestimmte  $\delta\delta$ Ct-Wert beschreibt die Differenz der  $\delta$ Ct-Mittelwerte der zu testenden Probe (z.B. der genetisch manipulierten Zellen) und des jeweiligen Kalibrators (z.B. der unbehandelten Kontrollzellen). Die relative mRNA-Expression normalisiert zu GAPDH und relativ zur gewählten Kalibrator-Probe wurde dementsprechend über die Rechenoperation  $2^{-\delta\delta Ct}$  berechnet.

### 2.2.7 Statistik

Alle statistischen Daten sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Alle Signifikanzniveaus wurden, sofern nicht anders erwähnt, mit Hilfe des gepaarten, zweiseitigen *students* t-Tests mit Hilfe der Programme Microsoft Excel 2007 und Graphpad Prism 5 ermittelt. Von einem signifikanten Unterschied wurde bei einer errechneten Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  ausgegangen. Errechnete p-Werte wurden wie folgt in Abbildungen gekennzeichnet: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

### 3 Ergebnisse

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war die genauere Aufklärung der Funktion von Numb als möglicher Negativ-Regulator des Notch-Signalweges in der humanen Hämatopoese. Dazu wurden zur Analyse von humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ), sofern nicht anders beschrieben, CD34<sup>+</sup> Zellen aus humanem Nabelschnurblut aufgereinigt und analysiert.

#### 3.1 Funktionelle Analyse von Numb in der humanen Hämatopoese

Die Analyse der Funktion von Numb in der Hämatopoese erfolgte in unserer Arbeitsgruppe bereits durch Jan Spanholtz in seiner Diplomarbeit (Spanholtz, 2005) durch und Gregor von Levetzow im Rahmen seiner Doktorarbeit (von Levetzow, 2008). In Fortführung dieser Arbeiten war das Ziel dieser Arbeit zunächst, aufbauend auf vorhandenen Daten die Rolle von Numb in humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) näher aufzuklären. Zum besseren Verständnis werden deshalb im Folgenden die Ergebnisse aus den genannten Vorarbeiten durch Jan Spanholtz und Gregor von Levetzow kurz zusammengefasst.

Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass sowohl die vier Isoformen Numb1-4 als auch die Notch-Liganden Delta-like1 und Delta-like4 und die Rezeptoren Notch1 und Notch2 in humanen CD34<sup>+</sup> Zellen exprimiert werden. Die Expression von Numb in CD34<sup>+</sup> Zellen wurde mittels immunzytochemischer Färbungen auf Proteinebene nachgewiesen. Zudem konnte die Expression der Notch-Zielgene *Hes1*, *Hey1* und *Hey2* nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen, dass der Notch-Signalweg in CD34<sup>+</sup> Zellen aktiv ist.

Funktionelle Analysen zeigten, dass die Überexpression aller vier Numb-Isoformen zu einer höheren Frequenz erythrozytär-determinierter Vorläufer (BFU-E) und einer geringeren Frequenz erythro-myeloischer (CFU-MIX) Vorläufer führte. Des Weiteren war der Anteil primitiverer Zellen mit *in vitro* Langzeitpotenzial (LTC-IC) reduziert (Spanholtz, 2005; von Levetzow, 2008). Nach transientem *Knockdown* von *Numb* und dem homologen *Numblike* zeigten sich gegensätzliche Effekte. Der Anteil der CFU-MIX Vorläufer war erhöht und es konnten mehr Zellen mit LTC-IC Potenzial detektiert werden. Zusammenfassend wiesen diese Daten darauf hin, dass Numb eine wichtige Funktion in der humanen Hämatopoese innehat. Die grundlegende

Bedeutung dieser Zellschicksalsverschiebung in die erythrozytäre Linie und auch die Frage, ob und inwiefern Numb den Notch-Signalweg beeinflusst, wurde abschließend nicht geklärt (von Levetzow, 2008).

Als methodisch problematisch erwies sich im Rahmen dieser Versuche die zur genetischen Manipulation verwendete Nukleofektion (von Levetzow *et al.*, 2006), da diese zu konsistent verringerten Überlebensraten bei transfizierten CD34<sup>+</sup> Zellen führte. In fast allen durchgeführten funktionellen Analysen resultierte die Anwendung dieser Methode des Weiteren in einer signifikanten Verminderungen der Differenzierungsfähigkeit der Zellen, was sich in konsequent niedrigeren Frequenzen jeweiliger Vorläuferzellen nach ektopter eGFP-Expression (eGFP-Kontrolle) im Vergleich zu unbehandelte Zellen äußerte (von Levetzow, 2008). Zudem beinhaltet die Transfektion eine transiente Manipulation der Zellen, es ist also zu erwarten, dass je nach Stabilität des Proteins die jeweilige Überexpression nach einigen Zellteilungen nicht mehr detektierbar ist. Somit konnten in den Vorarbeiten nach Überexpression von Numb in funktionellen Analysen zwar konsistente und in einigen Fällen signifikante Unterschiede im Vergleich zur eGFP-Kontrolle beobachtet werden, es war aber aus oben genannten Gründen zu erwarten, dass eine zellschonendere und stabile Methode zur genetischen Manipulation einen größeren und eindeutigeren Aufschluss über die Funktion von Numb in CD34<sup>+</sup> Zellen geben kann.

### **3.1.1 Etablierung lentiviraler Numb-Überexpressionskonstrukte**

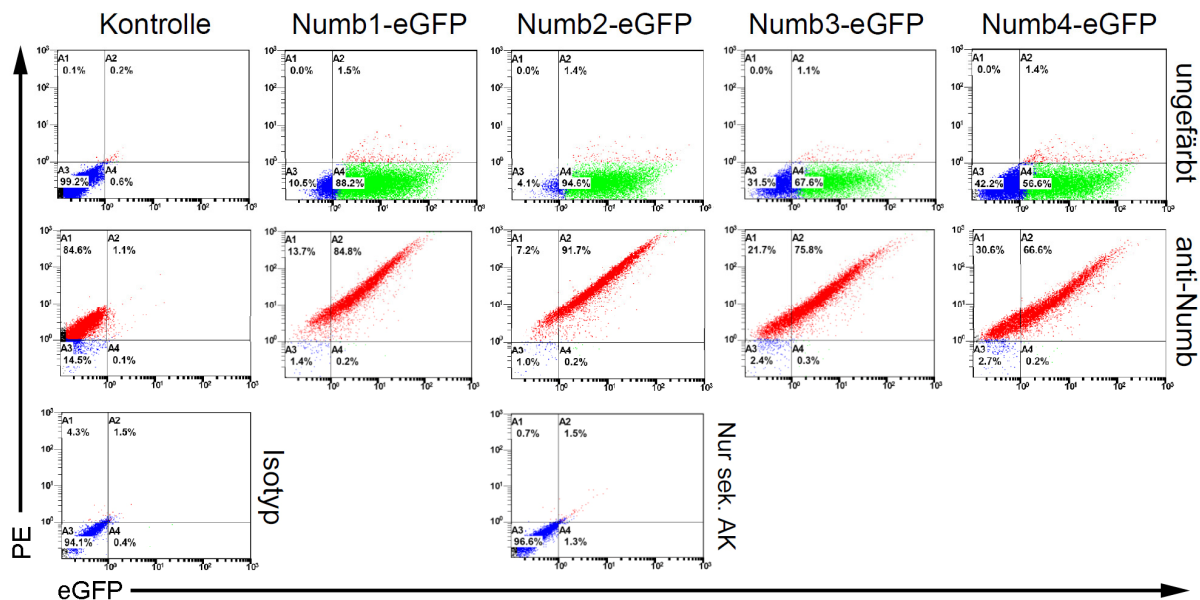
Bei allen Vorarbeiten von Jan Spanholtz und Gregor von Levetzow wurden Plasmide zur transienten Überexpression von Numb in humanen CD34<sup>+</sup> Zellen verwendet. Da die Verwendung dieser Plasmide und die zum Gentransfer in CD34<sup>+</sup> Zellen verwendete Methode der Nukleofektion oben beschriebene Limitierungen aufzeigten, war zunächst das Ziel, die bisherigen Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer anderen Methode zur genetischen Manipulation von CD34<sup>+</sup> Zellen zu bestätigen. Zudem sollten weiterführende Analysen genauere Einsichten in die Funktion von Numb in die humanen Hämatopoese ermöglichen. Die dafür verwendete Methode des lentiviralen Gentransfers wurde zusammen mit Gregor von Levetzow im Rahmen meiner Diplomarbeit von der Arbeitsgruppe um Helmut Hanenberg (Kinderklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf) (Leurs *et al.*, 2003) adaptiert und durch weitere Verbesserungen des Protokolls optimiert (Görgens, 2008; von Levetzow, 2008). Im Vergleich zur Nukleofektion ermöglicht die

Verwendung des lentiviralen Gentransfers zur Manipulation von humanen CD34<sup>+</sup> Zellen eine höhere Gentransfereffizienz ohne eine Beeinträchtigung der Überlebensrate der Zellen. Nach Nukleofektion konnten dagegen immer erhöhte Anteile toter Zellen beobachtet werden (Görgens, 2008). Weiterhin war im Hinblick auf mehrwöchige Kultivierungs- und Differenzierungsexperimente die stabile genetische Manipulation der Zellen durch lentivirale Konstrukte dem bislang verwendeten transienten System vorzuziehen.

Zur Etablierung stabiler Numb-Überexpressionskonstrukte im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die kodierenden Regionen von Numb1-4 in lentivirale Expressionsplasmide überführt. Um die Expression von Numb-eGFP- (EG) Fusionsproteinen zu ermöglichen, wurden die kodierenden Sequenzen der vier Numb-Isoformen jeweils aus dem entsprechenden vorhandenen pEGFP-N1-Numb Plasmid in den Vektor pCL6-EG-wo überführt. Um eine Überexpression der Numb-Proteine in ihrer nativen Form ohne eGFP-Fusion zu ermöglichen, wurden IRES-eGFP (IEG)-Konstrukte verwendet. Dabei wird in der Zielzelle jeweils zunächst eine bicistronische Numb-IRES-eGFP mRNA generiert, die bei der Translation in zwei unabhängige Proteine umgesetzt wird. Zur Konstruktion lentiviraler IRES-eGFP Konstrukte wurden dementsprechend die für Numb1-4 kodierenden Regionen aus jeweilig vorhandenen pIRES-eGFP-Numb Expressionsplasmiden in die lentiviralen Plasmide pCL6-IEG-wo überführt (siehe auch Abschnitt 2.2.2.2).

Die funktionelle Validierung aller Numb-Expressionskonstrukte erfolgte durch die intrazelluläre Färbung von Numb mittels indirekter Immunfluoreszenz in stabil transduzierten HEK293T-Zellen. Dazu wurden mit allen hergestellten Konstrukten virushaltige Überstände generiert und zur Herstellung stabiler Numb1-4-IEG und -EG HEK293T-Zelllinien verwendet. Da bei den hergestellten Linien nicht alle Zellen transduziert wurden, dienten nicht transduzierte, eGFP-negative Zellen jeweils als interne Negativkontrolle. Die Zelllinien wurden intrazellulär mit gegen alle vier Isoformen gerichteten anti-Numb Antikörpern gefärbt und mit sekundären PE-konjugierten Sekundärantikörpern nachgefärbt. Die Analyse der Numb-Expression erfolgte jeweils durchflusszytometrisch durch die Darstellung der eGFP-Fluoreszenz gegen das PE-Signal. Bei einer erfolgreichen Überexpression sollte dementsprechend das PE-Signal in stärker eGFP-exprimierenden Zellen deutlich

stärker sein als in schwächer eGFP-exprimierenden Zellen oder eGFP-negativen Zellen, was bei allen Konstrukten der Fall war (Abb. 7).



**Abb. 7: Validierung lentiviraler Expressionskonstrukte mittels durchflusszytometrischer Analyse nach intrazellulärer Numb-Färbung**

Darstellung durchflusszytometrischer Messungen an mit pCL6-EG-Numb-transduzierten HEK293T-Zellen. In der obersten Reihe sind jeweilige Kontrollmessungen an ungefärbten Zelllinien dargestellt. Die mittlere Reihe zeigt die Messungen der entsprechend mit anti-Numb Antikörpern und sekundären PE-konjugierten Antikörpern nachgefärbten Zelllinien. Zur Kontrolle wurden jeweils untransduzierte HEK293T-Zellen mitgefärbt und nur mit sekundärem Antikörper gefärbte Zellen und Isotyp-Kontrollen mitgeführt. Die Darstellung zeigt ein für zwei unabhängig durchgeführte Versuche repräsentatives Ergebnis. Analoge Versuche an mit pCL6-IEG-Numb-transduzierten HEK293T-Zellen wurden ebenfalls durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Aufgrund der jeweils klaren Korrelation zwischen eGFP- und PE-Fluoreszenz in allen stabil transduzierten HEK293T-Zellen kann davon ausgegangen werden, dass alle hergestellten lentiviralen Numb-Expressionsplasmide eine Expression der verschiedenen Numb-Isoformen in humanen Zellen ermöglichen. Ein ebenfalls verwendetes lentivirales Konstrukt, das für Notch1-ICD kodiert, lag bereits fertig in unserer Arbeitsgruppe vor.

Im nächsten Schritt wurden die lentiviralen Überstände zur Expression der vier Numb-Isoformen und von Notch1-ICD zur Transduktion von frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen verwendet. Dabei war das Ziel, eine Transduktionseffizienz von ca. 30-60% zu erreichen. Eine höhere Effizienz würde zu einer erhöhten Zahl an Integrationen in das Genom der Zielzelle bedeuten und damit die Wahrscheinlichkeit der

Insertionsmutagenese erhöhen. Eine niedrigere Transduktionseffizienz würde wiederum die Zellzahl der jeweilig transduzierten Zellen im Hinblick auf durchzuführende Versuche limitieren. Um das Volumen des zu verwendenden lentiviralen Überstands zur Transduktion von CD34<sup>+</sup> Zellen bestimmen zu können, wurde alle lentiviralen Überstände nach der Herstellung an HEK293T-Zellen titriert und so eingesetzt, dass erfahrungsgemäß eine mittlere auf CD34<sup>+</sup> Zellen bezogene MOI (engl. *multiplicity of infection*) von 0,5 (entspricht 50% erfolgreich transduzierter Zellen) erreicht wird. Entsprechende Effizienzen nach Transduktion von CD34<sup>+</sup> Zellen wurden jeweils nach 50-60 h durchflusszytometrisch bestimmt.

Bei Verwendung entsprechender Volumina der hergestellten lentiviralen Überstände zur Überexpression der vier Numb-Isoformen und zur ektopen Expression von Notch1-ICD konnten teilweise deutliche Abweichungen festgestellt werden: Nach Transduktion von CD34<sup>+</sup> Zellen mit den vier Numb-IEG-Konstrukten konnte in drei unabhängigen Versuchen jeweils nur eine Transduktionseffizienz von 4-8% bestimmt werden. eGFP-positive Zellen ließen sich nur durchflusszytometrisch detektieren, die eGFP-Fluoreszenzintensität war für die mikroskopische Betrachtung zu schwach. Vermutlich ließen sich nur Zellen mit mehreren Insertionen als eGFP-positiv (eGFP<sup>+</sup>) detektieren. Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, waren nach Verwendung der eGFP-Fusionskonstrukte zur Transduktion deutlich höhere, wenn auch leicht unter dem Erwartungswert liegende eGFP<sup>+</sup> Zellraten zu ermitteln. Ebenso war die mittlere Rate an eGFP<sup>+</sup> Zellen bei Verwendung des Notch1-ICD Konstruktes geringer als erwartet ( $29,0 \pm 4,7\%$ ), während diese bei der eGFP-Kontrolle im erwarteten Bereich lag ( $48,9 \pm 17,8\%$ , Tabelle 11). Ähnliche Unterschiede zwischen den Numb-IEG- und Numb-EG Konstrukten wurden bereits bei Verwendung der transienten Numb-Plasmide in Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe beobachtet (von Levetzow, 2008).

**Tabelle 11: Mittlere Effizienzen bei der Transduktion von CD34<sup>+</sup> Zellen (n=4)**

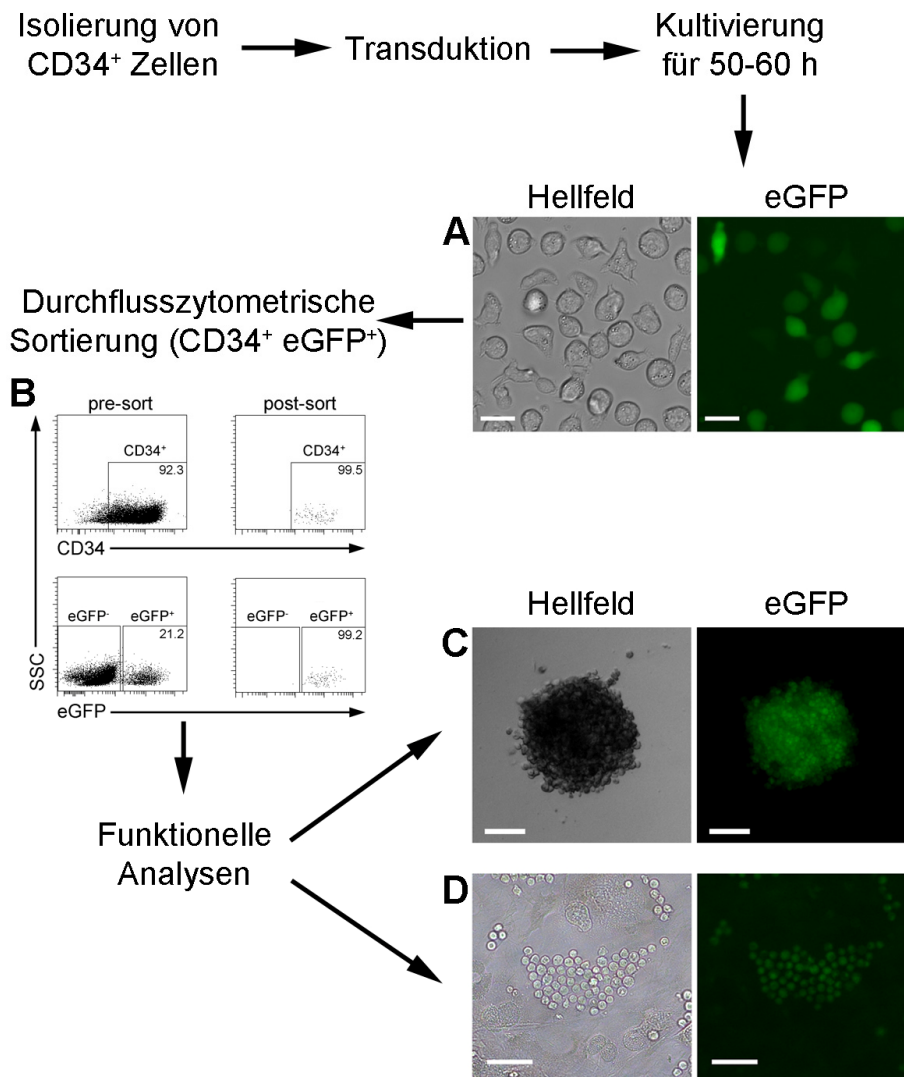
<b>Ansatz</b>	<b>Transduktionseffizienz</b>
eGFP (Leervektor)	$48,9 \pm 17,8\%$
Numb1-EG	$32,6 \pm 8,5\%$
Numb2-EG	$38,9 \pm 6,5\%$
Numb3-EG	$25,8 \pm 6,1\%$
Numb4-EG	$24,5 \pm 5,9\%$
Notch1-ICD-IEG	$29,0 \pm 4,7\%$



Weil in diesen Vorarbeiten zwischen den IRES- und Fusionskonstrukten keine funktionellen Unterschiede bei Effekten auf das Zellschicksal von CD34<sup>+</sup> Zellen festgestellt wurden (von Levetzow, 2008), wurden für Experimente zur Überexpression der vier Numb-Isoformen in dieser Arbeit die Fusionskonstrukte verwendet.

Zur weiteren Qualifizierung des verwendeten lentiviralen Systems und der gewählten experimentellen Strategie wurden jeweilig transduzierte CD34<sup>+</sup> Zellen nach einer Kultivierungsdauer von 50-60 h mikroskopisch beurteilt (Abb. 8A) und erfolgreich transduzierte CD34-positive (CD34<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup>) Zellen durchflusszytometrisch sortiert (Abb. 8B). Auf diese Weise isolierte CD34<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup> Zellen wurden dann in funktionelle Analyseverfahren überführt (LTC-IC- und CFC-Ansatz). Nach 14 Tagen (CFC-Ansatz, Abb. 8C) bzw. 5-7 Wochen (LTC-IC-Ansatz, Abb. 8D) konnte in allen Versuchen vor der Auswertung jeweils die eGFP-Expression in entstandenen Zellkolonien mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Abb. 8).

Damit konnte gezeigt werden, dass das verwendete lentivirale System eine über mehrere Wochen hinweg stabile genetische Manipulation von CD34<sup>+</sup> Zellen ohne grundsätzliche Beeinträchtigung der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit ermöglicht. Da analog zu den Numb-Überexpressionsversuchen auch Experimente nach Verlust der *Numb*-Genfunktion durchgeführt werden sollten, wurde als nächstes ein System zum *Knockdown* von Numb validiert.



**Abb. 8: Experimentelle Strategie und Validierung des lentiviralen Systems an CD34<sup>+</sup> Zellen**

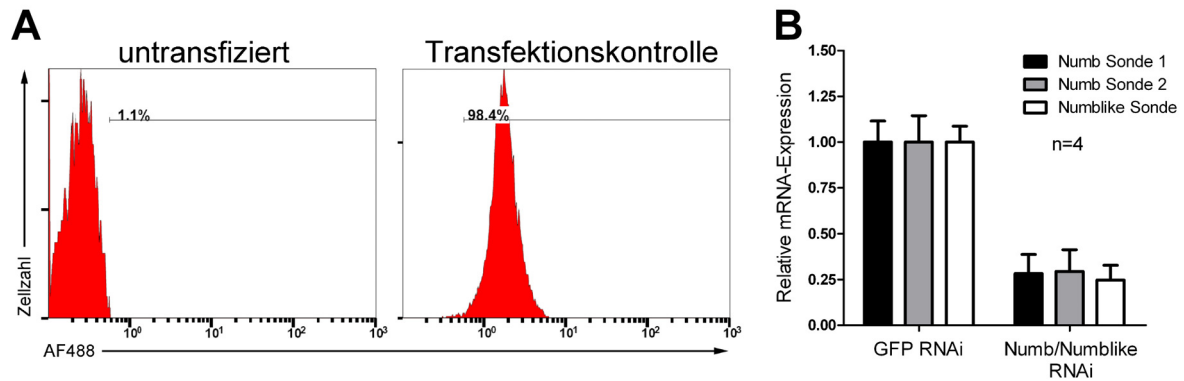
Frisch isolierte CD34<sup>+</sup> Zellen wurden transduziert, für 50-60 h kultiviert und nach mikroskopischer Beurteilung der eGFP-Fluoreszenz (A; Maßstabsbalken 15 µm) durchflusszytometrisch sortiert (B). Nach Durchführung mehrwöchiger funktioneller *in vitro* Analyseverfahren konnte die eGFP-Fluoreszenz in entstehenden hämatopoetischen Kolonien im CFC-Ansatz (C, Maßstabsbalken 100 µm) und im LTC-IC-Ansatz (D, Maßstabsbalken 50 µm) nachgewiesen werden.

### 3.1.2 Validierung des verwendeten Systems zum *Knockdown* von *Numb*

Um die Funktion von *Numb* in primitiven hämatopoetischen Zellen weiter aufklären zu können, wurde neben den Überexpressionsversuchen auch die Genfunktion von *Numb* mittels RNA-Interferenz (RNAi) ausgeschaltet bzw. die Expression herunterreguliert. Der dazu erforderliche Transfer von siRNAs in CD34<sup>+</sup> Zellen erfolgte mittels Nukleofektion. Während bei Verwendung dieser Methode zur Transfektion von Plasmid-DNA in der Regel Transfektionseffizienzen von ca. 40%

erreicht werden (von Levetzow *et al.*, 2006), führte die Transfektion von siRNA, vermutlich aufgrund der geringeren Größe der einzelnen Moleküle, zu Effizienzen von nahezu 100%. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde in jedem Versuch als Transfektionskontrolle eine AlexaFluor-488-markierte siRNA mitgeführt und die Aufnahme der siRNAs in die Zellen 2 h nach der Transfektion durchflusszytometrisch überprüft (Abb. 9A). Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten im Weiteren, dass das durchflusszytometrisch detektierte Signal nicht durch siRNA-Moleküle an der Zelloberfläche verursacht wird, sondern dass die Oligonukleotide tatsächlich von den Zellen aufgenommen wurden (Daten nicht gezeigt).

Als weitere Kontrolle wurde in allen Versuchen eine gegen *GFP* gerichtete siRNA mitgeführt. In ersten Versuchen von Gregor von Levetzow waren im Rahmen seiner Doktorarbeit (von Levetzow, 2008) zum *Knockdown* von *Numb* und dem homologen *Numblike* verschiedene siRNAs in verschiedenen Kombinationen ausgetestet worden. Entsprechend wurden in dieser Arbeit zum *Knockdown* von *Numb* zwei verschiedenen siRNAs gegen *Numb* (Hs\_NUMB\_4\_HP und Hs\_NUMB\_6\_HP) und zum *Knockdown* von *Numblike* eine siRNA (Hs\_NUMBL\_4\_HP) verwendet. Zum gleichzeitigen *Knockdown* von *Numb* und *Numblike* wurden alle drei siRNAs gleichzeitig in CD34<sup>+</sup> Zellen transfiziert. Zur Überprüfung des jeweiligen RNAi-vermittelten Effektes wurden nach Kultivierung der transfizierten Zellen für 50-60 h CD34<sup>+</sup> Zellen durchflusszytometrisch sortiert. Aus den Zellen wurde RNA extrahiert, diese in cDNA umgeschrieben und quantitative PCR-Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die zum verwendeten Referenzgen GAPDH relative Menge an *Numb*- und *Numblike*-mRNA 50-60 h nach Transfektion im Verhältnis zu Zellen, die mit Kontroll-siRNAs transfiziert worden waren, deutlich reduziert war (Abb. 9B).



**Abb. 9: Validierung des siRNA-vermittelten Knockdowns von *Numb* und *Numbl like***

(A) Darstellung der gemessenen AlexaFluor-488 (AF488)-Fluoreszenz in mit AF488-markierten Kontroll-siRNAs transfizierten CD34<sup>+</sup> Zellen 2 h nach Transfektion. Die Signale aller Zellen sind im Vergleich zu untransfizierten Zellen nach rechts verschoben, dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass fast alle Zellen die siRNAs aufgenommen haben. (B) Die relativ zu GAPDH ermittelte und auf Kontrollzellen normalisierte Quantifizierung der jeweiligen Genexpression in transfizierten CD34<sup>+</sup> Zellen zeigt eine konsistente Herunterregulation der Expression von *Numb* (0,28; 0,30) und *Numbl like* (0,25) an. Zur Quantifizierung der *Numb*-Expression wurden zwei verschiedene TaqMan-Sonden verwendet, um verlässlichere Werte zu erhalten.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass durch Verwendung der Nukleofektion zur Transfektion spezifischer siRNAs in CD34<sup>+</sup> Zellen eine spezifische, gleichzeitige Herunterregulation von *Numb* und *Numbl like* erreicht wurde. Im Folgenden wurden nun jeweilige Effekte der genetischen Manipulationen auf das Zellschicksal von CD34<sup>+</sup> Zellen untersucht.

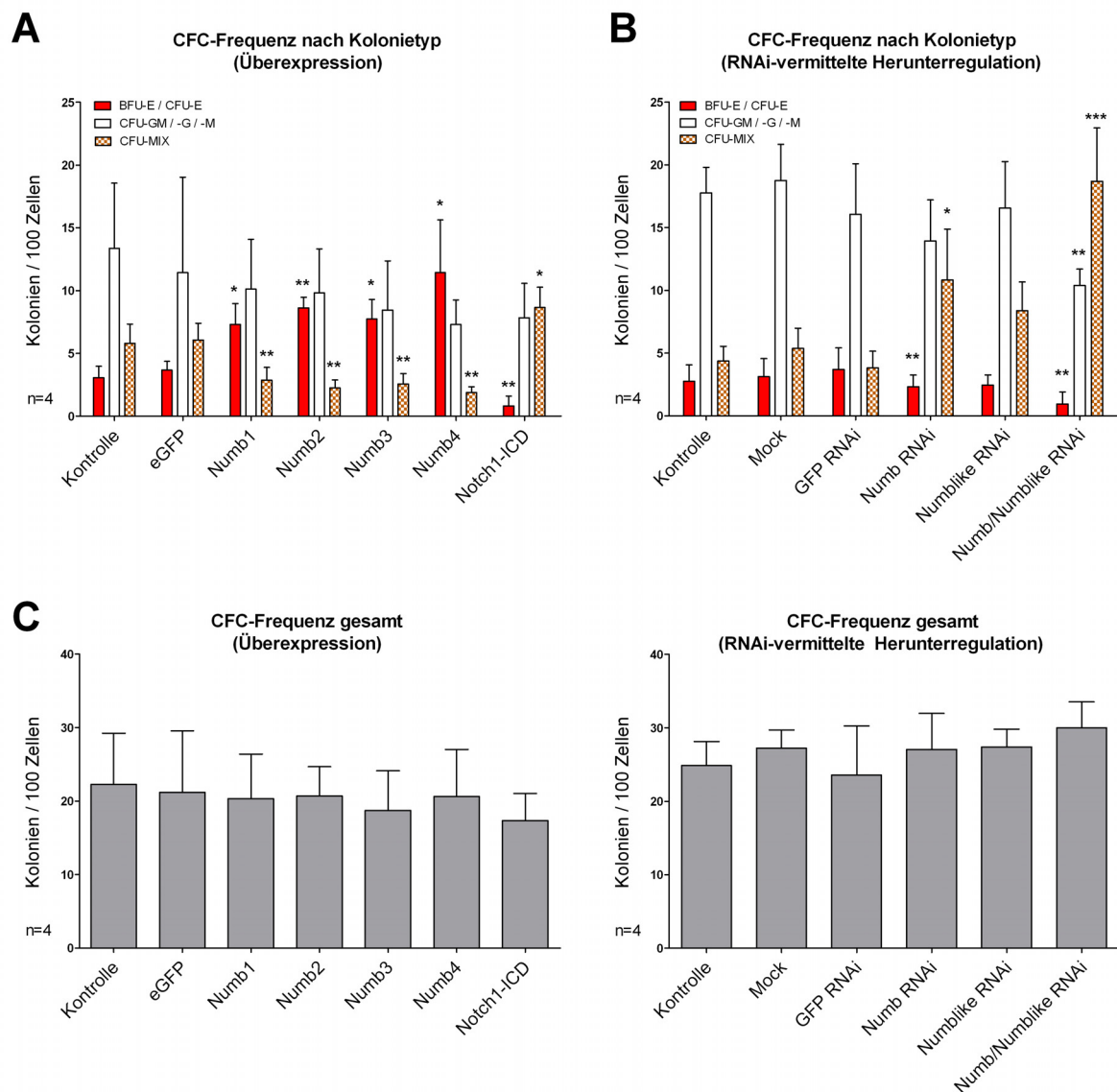
### 3.1.3 Analyse des Koloniebildungspotenzials nach genetischer Manipulation der *Numb*-Expression

Um den Einfluss von *Numb* auf das myelo-erthrozytäre Differenzierungspotenzial von CD34<sup>+</sup> Zellen zu beurteilen, wurden CFC-Ansätze durchgeführt. Dazu wurden wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben frisch isolierte CD34<sup>+</sup> Zellen genetisch manipuliert und nach einer Kultivierungsdauer von 50-60 h durchflusszytometrisch sortiert. Auf diese Weise wurden für Überexpressionversuche eGFP-positive CD34<sup>+</sup> Zellen und für RNAi-Versuche Gesamt-CD34<sup>+</sup> Zellen in CFC-Ansätze eingebracht. Zur besseren Übersicht wurden in der Darstellung der Ergebnisse jeweils alle gebildeten roten (BFU-E und CFU-E), weißen (CFU-GM, CFU-G und CFU-M) und gemischte Kolonien (CFU-MIX) zusammengefasst.

Während die Expression von eGFP in CD34<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Kontrolle) zu keinen erkennbaren Unterschieden in der jeweiligen Koloniebildungsrate führte, zeigten sich nach Überexpression der vier *Numb*-Isoformen in vier unabhängigen Versuchen jeweils mehr rote und weniger gemischte Kolonien. Die Expression von Notch1-ICD dagegen führte zu einer verminderten Rate roter und einer erhöhten Frequenz gemischter Kolonien. Die Rate weißer, myeloischer Kolonien war ebenfalls marginal reduziert (Abb. 10A).

Nach RNAi-vermittelter Herunterregulation von *Numb* zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine verminderte Bildung roter Kolonien und eine deutlich erhöhte Frequenz gemischter Kolonien. Der *Knockdown* von *Numblike* führte zu tendenziell ähnlichen, aber nicht statistisch signifikanten Ergebnissen. Bei gleichzeitiger Herunterregulation von *Numb* und *Numblike* war dieser Effekt deutlich verstärkt, es wurden im Vergleich zu allen Kontrollen konsistent weniger rote, deutlich mehr gemischte Kolonien sowie auch weniger weiße Kolonien gebildet. Die Analyse der Koloniebildung der drei mitgeführten Kontrollansätze (unbehandelte Kontrolle, Mock-Kontrolle, GFP-RNAi Kontrolle) ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 10B).

Da jeweilig verminderte oder erhöhte Frequenzen einzelner Kolonietypen in den verschiedenen Ansätzen sowohl Änderungen von Zellschicksalsentscheidungen als auch relative Verschiebungen in der CD34<sup>+</sup> Population durch Depletion oder Selektion einzelner Subpopulationen widerspiegeln können, wurde zudem die Gesamt-Koloniebildungsrate untersucht. Sowohl in allen Ansätzen der Versuche zur Überexpression als auch in den RNAi-Experimenten konnten zwischen jeweiligen Ansätzen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gesamt-CFC-Frequenz beobachtet werden (Abb. 10C).



**Abb. 10: Koloniebildungsraten nach Überexpression und Knockdown von Numb**

(A) Darstellung ermittelter Koloniebildungsfrequenzen (bezogen auf Kolonien je 100 eingesetzter  $CD34^+$  Zellen) nach lentiviraler Überexpression der vier Numb-Isoformen bzw. nach stabiler Expression von Notch1-ICD im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Kontrolle) und mit eGFP transduzierten Zellen ( $n=4$ ). (B) Darstellung der Koloniebildungsfrequenzen nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von *Numb* (Numb RNAi), *Numbllike* (Numbllike RNAi) und *Numb* und *Numbllike* parallel (Numb/Numbllike RNAi) im Vergleich zu jeweiligen Kontrollansätzen ( $n=4$ ). (C) Sowohl nach Überexpression als auch in Versuchen zur RNAi-vermittelter Herunterregulation konnten hinsichtlich der Gesamt-Koloniebildungsrate keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (\*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$ ).

Somit führte die Überexpression aller vier Numb-Isoformen zu mehr roten und weniger gemischten Kolonien, wohingegen nach RNAi-vermitteltem *Knockdown* von *Numb* die Bildung von weniger roten und mehr gemischten Kolonien, also der der gegenteilige Effekt, beobachtet wurde. Bei gleichzeitigem *Knockdown* von *Numb* und

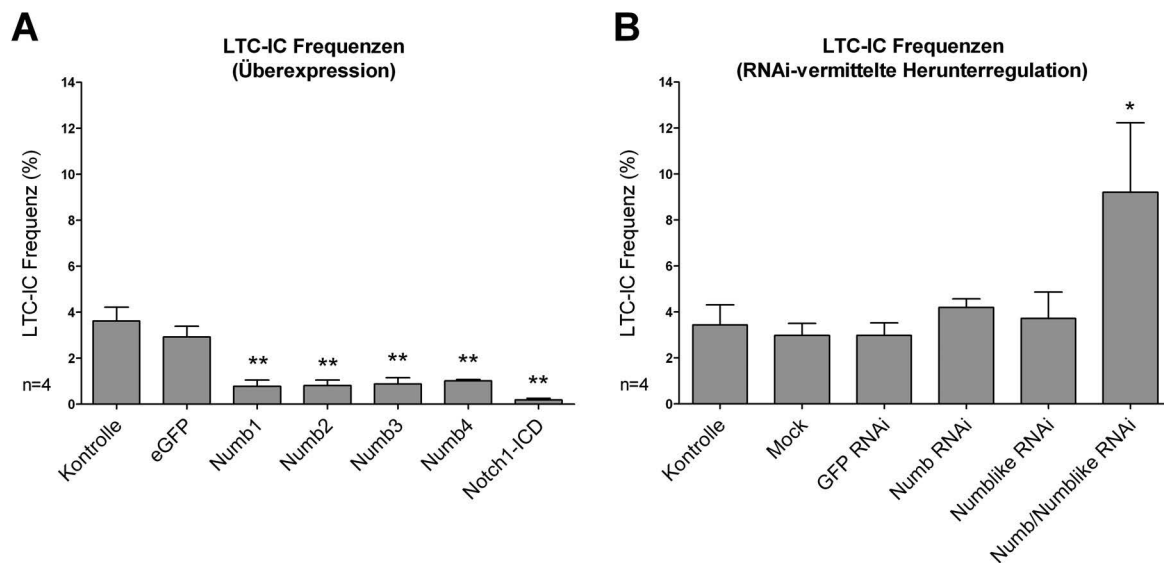
*Numblike* in CD34<sup>+</sup> Zellen wurde der Effekt deutlich verstärkt, was auf eine redundante Funktion von *Numblike* hindeutet. Die veränderten Koloniefrequenzen nach *Numb/Numblike-Knockdown* entsprachen tendenziell denen nach ektopter Expression von Notch1-ICD.

### 3.1.4 Auswirkungen der genetischen Manipulation von *Numb* auf das Langzeitpotenzial von CD34<sup>+</sup> Zellen

Während mit CFC-Ansätzen eher die *Numb*-Funktion in reiferen hämatopoetischen Progenitorzellen untersucht wurde, sollten mit dem LTC-IC Ansatz die Frequenzen früherer humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) bestimmt werden. In diesem Ansatz werden Zellen mit sogenanntem *in vitro* Langzeitpotenzial nach insgesamt 7-wöchiger Kultur retrospektiv ausgelesen. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurden dazu genetisch manipulierte CD34<sup>+</sup> Zellen sortiert und in LTC-IC Ansätze eingebracht.

Die Überexpression aller vier *Numb*-Isoformen führte zu einer deutlichen Reduktion der LTC-IC Frequenz (*Numb*1:  $0,8 \pm 0,3\%$ ; *Numb*2:  $0,8 \pm 0,2\%$ ; *Numb*3:  $0,9 \pm 0,3\%$ ; *Numb*4:  $1,0 \pm 0,1\%$ ) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Kontrolle;  $3,6 \pm 0,6\%$ ) und eGFP-transduzierten Zellen (eGFP;  $3,0 \pm 0,5\%$ ), wohingegen zwischen Kontrolle und eGFP-Ansatz keine konsistenten Unterschiede festgestellt werden konnten. Die konstitutive Aktivierung des Notch-Signalweges durch Expression von Notch1-ICD führte zu einer noch stärkeren Reduktion der Zellen mit LTC-IC-Potenzial ( $0,2 \pm 0,1\%$ ; Abb. 11A).

In entsprechenden Versuchen zur RNAi-vermittelten Herunterregulation von *Numb* und *Numblike* zeigte sich, dass der gleichzeitige *Knockdown* von *Numb* und *Numblike* im Vergleich zu den Kontrollen zu einer deutlich höheren LTC-IC Frequenz führte ( $9,2 \pm 3,0\%$ ), wohingegen der Funktionsverlust von *Numb* ( $4,2 \pm 0,4\%$ ) oder von *Numblike* ( $3,7 \pm 1,1\%$ ) jeweils einzeln im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen scheinbar nicht verändert war (Abb. 11B).



**Abb. 11: Analyse des Langzeitpotenzials von  $CD34^+$  Zellen nach genetischer Manipulation der Numb-Expression**

**(A)** In vier unabhängigen Versuchen zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten (Kontrolle) und eGFP-transduzierten (eGFP)  $CD34^+$  Zellen nach Überexpression der vier Numb-Isoformen eine deutliche Reduktion der LTC-IC Frequenz. Die Expression von Notch1-ICD führte zu einer noch deutlicheren Reduktion von Zellen mit LTC-IC Potenzial. **(B)** Während im Vergleich mit den Kontrollansätzen (Kontrolle/GFP RNAi) der einzelne *Knockdown* von *Numb* und *Numblike* keine signifikanten Unterschiede aufzeigte, war die LTC-IC Frequenz nach gleichzeitigem *Knockdown* von *Numb* und *Numblike* deutlich erhöht (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

Erneut zeigte sich im LTC-IC Ansatz nach gleichzeitigem *Knockdown* von *Numb* und *Numblike* der gegenteilige Effekt als nach Überexpression der vier Numb-Isoformen. Die ektopische Expression von Notch1-ICD, und damit die konstitutive Aktivierung des Notch-Signalweges, führte zu einem nahezu völligen Verlust von Zellen, die ein Langzeitpotenzial *in vitro* zeigten. In der Arbeit von Gregor von Levetzow wurde jedoch beobachtet, dass nach transienter Transfektion von Notch1-ICD die LTC-IC Frequenz signifikant erhöht wurde. Die lentivirale, stabile Expression von Notch1-ICD führt mutmaßlich zu einer dauerhaften Aktivierung des Notch-Signalweges. Denkbare Folgen sind deshalb z.B. die Induktion oder Blockierung von Differenzierungsprozessen, was den Verlust primitiver Zellen über den siebenwöchigen Kulturzeitraum erklären könnte.

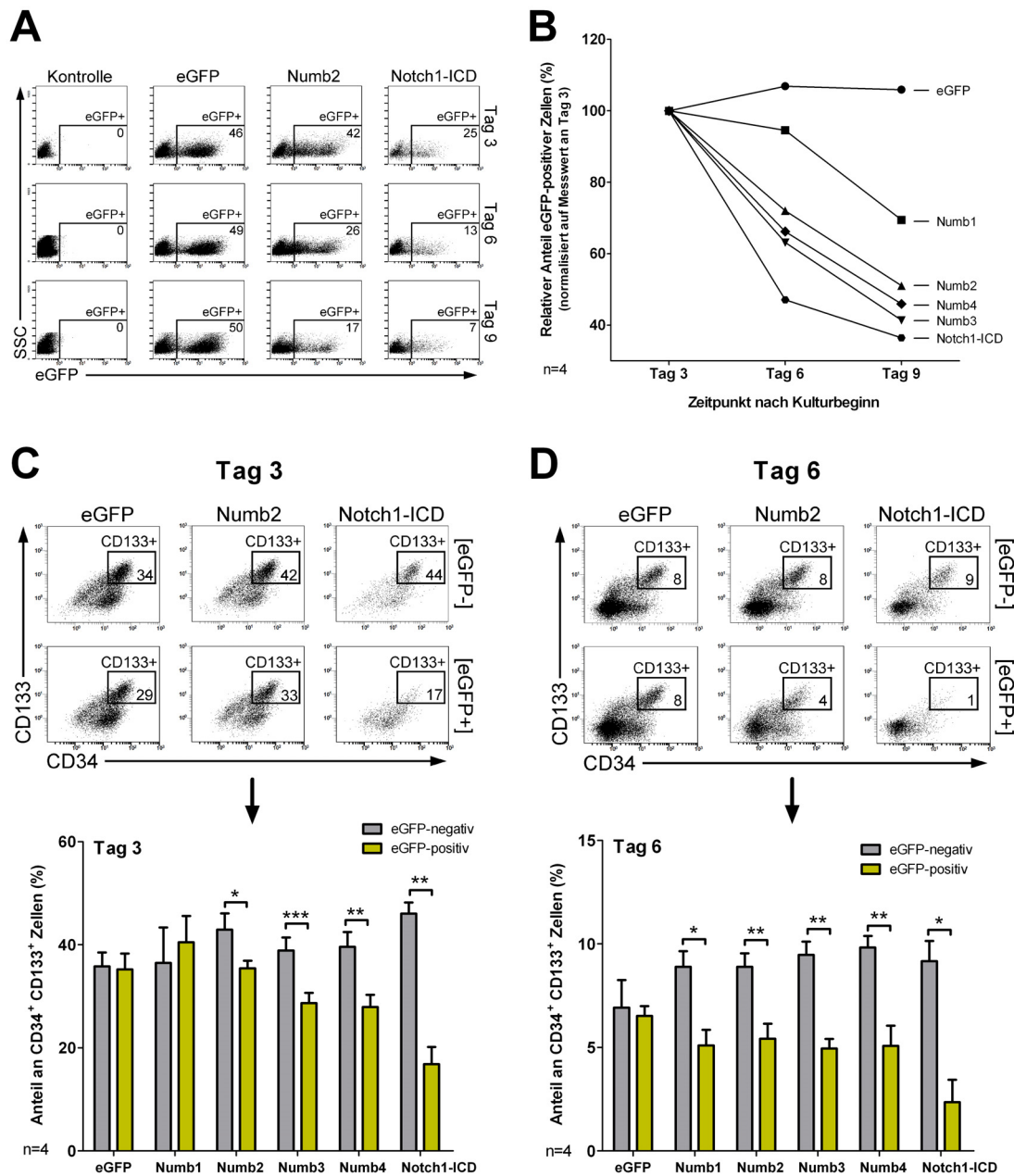


### 3.1.5 Durchflusszytometrische Analyse von CD34<sup>+</sup> Zellen nach Numb-Überexpression

Um die Funktion von Numb in CD34<sup>+</sup> Zellen weiter aufklären und im Verlauf der *in vitro* Entwicklung der Zellen die beobachteten Effekte besser beurteilen zu können, wurden stabil Numb-überexprimierende CD34<sup>+</sup> Zellen nach Transduktion für insgesamt neun Tage kultiviert und in diesem Zeitraum alle drei Tage durchflusszytometrisch analysiert. Mit eGFP und Notch1-ICD transduzierte CD34<sup>+</sup> Zellen wurden als Kontrollen mitgeführt.

Zu allen Zeitpunkten (Tag 3, Tag 6 und Tag 9) wurde jeweils zunächst der Anteil der eGFP-positiven (eGFP<sup>+</sup>) Zellen quantifiziert (beispielhaft in Abb. 12A dargestellt). Während der relative Anteil der eGFP<sup>+</sup> Zellen in der eGFP-Kontrolle im Vergleich zum Tag 3-Ausgangswert über den untersuchten Zeitraum relativ konstant blieb (Veränderung bis Tag 9: +5,9 ± 2,5%), verringerte sich der Anteil an eGFP<sup>+</sup> Zellen nach Überexpression aller Numb-Isoformen deutlich (beispielhaft Numb 2: Veränderung bis Tag 9: -49,1 ± 5,5 %). Die Expression von Notch1-ICD führte zu einer noch deutlicheren Abnahme des Anteils an eGFP<sup>+</sup> Zellen über die Zeit hinweg (Abb. 12B).

Des Weiteren wurde an Tag 3 und Tag 6 nach Kulturbeginn durchflusszytometrisch die Expression des Oberflächenmarkers CD133 in allen Ansätzen jeweils für eGFP<sup>+</sup> Zellen und für die nicht-transduzierten, eGFP-negativen (eGFP<sup>-</sup>) Zellen quantifiziert. CD133-positiv CD34<sup>+</sup> (CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>) Zellen wurden nach dem damaligen Stand der Forschung als primitiver angesehen als CD133-negativ bzw. schwach CD133-exprimierende CD34<sup>+</sup> (CD133<sup>low/-</sup>CD34<sup>+</sup>) Zellen (Beckmann *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2010). Deshalb stellte sich die Frage, ob und wie sich die Oberflächenexpression von CD133 auf CD34<sup>+</sup> Zellen nach Numb-Überexpression verändert.



**Abb. 12: Quantifizierung der eGFP- und CD133-Expression in transduzierten CD34<sup>+</sup> Zellen**

(A) Quantifizierung des jeweiligen Anteils eGFP-positiver Zellen (eGFP+; Zahlen zeigen prozentuale Werte an) zu verschiedenen Kulturzeitpunkten. Anhand dieser Daten wurden zur graphischen Darstellung (B) die relativen Anteile der eGFP<sup>+</sup> Zellen, normalisiert auf die jeweiligen Messwerte an Tag 3 (100%), ermittelt. Zur besseren Übersicht wurden die Mittelwerte (n=4) ohne Standardabweichung dargestellt, diese lagen im Bereich von 2,5-20,9%, im Mittel bei 6,6%. (C) Durchflusszytometrische Messdaten an Kulturtag 3 (n=4). Dargestellt sind jeweils eGFP-positive [eGFP+] bzw. eGFP-negative [eGFP-] CD34<sup>+</sup> Zellen (Bereiche definiert in A) gegen CD133. Der Anteil der CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen [CD133+] wurde quantifiziert und ist unten prozentual dargestellt. (D) Entsprechende Messungen und Quantifizierung an Kulturtag 6 (n=4; \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001).

Bereits an Tag 3 nach Kulturbeginn wurde nach Überexpression von Numb2, Numb3 und Numb4 jeweils eine Reduktion des Anteils der CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen in der eGFP<sup>+</sup> Fraktion im Vergleich zur jeweiligen eGFP<sup>-</sup> Fraktion beobachtet (beispielhaft Numb2: eGFP<sup>+</sup> 35,4 ± 1,5%; eGFP<sup>-</sup> 43,3 ± 3,2%). Die Expression von Notch1-ICD führte ebenfalls zu einer Verringerung des Anteils der CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen in der eGFP<sup>+</sup> Fraktion. Die Analyse der nur mit eGFP transduzierten Kontrollzellen zeigte in etwa gleiche Anteile an CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen in den eGFP<sup>+</sup> und eGFP<sup>-</sup> Zellfraktionen (eGFP<sup>+</sup> 35,2 ± 3,1 %, eGFP<sup>-</sup> 35,8 ± 2,7%) (Abb. 12C).

An Kulturtag 6 war der relative Unterschied zwischen den jeweiligen eGFP<sup>+</sup> und eGFP<sup>-</sup> Zellfraktionen nach Überexpression aller vier Numb-Isoformen noch deutlicher (beispielhaft Numb2: eGFP<sup>+</sup> 5,4 ± 0,7%; eGFP<sup>-</sup> 8,9 ± 0,7%). Die Expression von eGFP zeigte wie bereits an Tag 3 keine relevanten Unterschiede (eGFP<sup>+</sup> 6,5 ± 1,4%; eGFP<sup>-</sup> 6,9 ± 1,3%). Die Expression von Notch1-ICD führte bis zu Tag 6 zu einer fast vollständigen Depletion von CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen (Abb. 12D). An diesem Punkt soll erwähnt werden, dass analoge Versuche nach *Knockdown* von *Numb* und *Numblike* ebenfalls durchgeführt wurden. Im Gegensatz zu den beschriebenen Effekten nach Numb-Überexpression wurde nach *Knockdown* von *Numb/Numblike* keine veränderte Oberflächenexpression von CD133 festgestellt (Daten nicht dargestellt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der vier Numb-Isoformen in CD34<sup>+</sup> Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen zu einem selektiven Nachteil der transduzierten Zellen gegenüber den jeweils untransduzierten Zellen im selben Ansatz führt. Das kann durch eine verlangsamte Proliferation der Numb-überexprimierenden Zellen oder durch eine durch die Überexpression induzierte Differenzierung der Zellen erklärt werden. Da die stärkere Expression aller vier Numb-Isoformen zu einer Herunterregulation des Oberflächenmarkers CD133 führte, scheinen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus CFC- und LTC-IC-Ansatz alle vier Numb-Isoformen die Differenzierung von CD34<sup>+</sup> Zellen zu fördern und die Aufrechterhaltung primitiver Zellschicksale zu verhindern.

An beiden untersuchten Kulturzeitpunkten wiesen alle mit den Numb-Isoformen und Notch-ICD transduzierten Ansätzen die jeweils eGFP<sup>-</sup>, nicht-transduzierten Kontrollzellen konsistent höhere Anteile an CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen auf als die nicht-transduzierten Zellen des eGFP-Kontrollansatzes. In diesem Kontext war unklar,

warum nach stabiler Expression von Notch1-ICD im CFC-Ansatz deutlich mehr gemischten Kolonien (stehend für eher primitive, myelo-erythrozytäre Vorläufer) gebildet werden und gleichzeitig die Expression des Oberflächenmarkers CD133 innerhalb weniger Tage herunterreguliert wurde. Der höhere Anteil von CFU-MIX Kolonien sprach nach damaligem Verständnis für einen höheren Anteil primitiver HSVZ, während der Verlust der Oberflächenexpression von CD133 auf CD34<sup>+</sup> Zellen eine Induktion der Differenzierung suggeriert. Ähnliche Resultate wurden bereits in Experimenten zur Analyse der Bedeutung der Expression von CD133 auf humanen CD34<sup>+</sup> Zellen von Simon Magin im Rahmen seiner Diplomarbeit erhalten. Seinen Ergebnissen zufolge waren als primitiv geltende CFU-MIX-Progenitoren und erythrozytäre Vorläufer in der CD133<sup>low/-</sup>CD34<sup>+</sup> Fraktion angereichert, dagegen wurden Vorläufer mit dem Potenzial zur Differenzierung zu Granulozyten und Makrophagen überwiegend in der CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Fraktion gefunden (Magin, 2007). Eine weitere Aufklärung der Bedeutung dieser Ergebnisse erfolgte bislang nicht.

Vor dem Hintergrund der bisher im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nach Manipulation der Numb-Expression in CD34<sup>+</sup> Zellen stellten sich somit zwei grundsätzliche Fragen: Zum einen war unklar, was der durch Numb-Überexpression verursachte Verlust der Oberflächenexpression des Stammzell-Surrogatmarkers CD133 auf CD34<sup>+</sup> Zellen bedeutet. Zum anderen stellte sich die Frage, ob Numb tatsächlich die Realisierung des Notch-Signalweges verhindert oder ob die beobachteten Effekte nach Überexpression von Numb und Notch1-ICD auf unabhängige Mechanismen zurückzuführen sind, die zu gegensätzlichen Effekten führen.

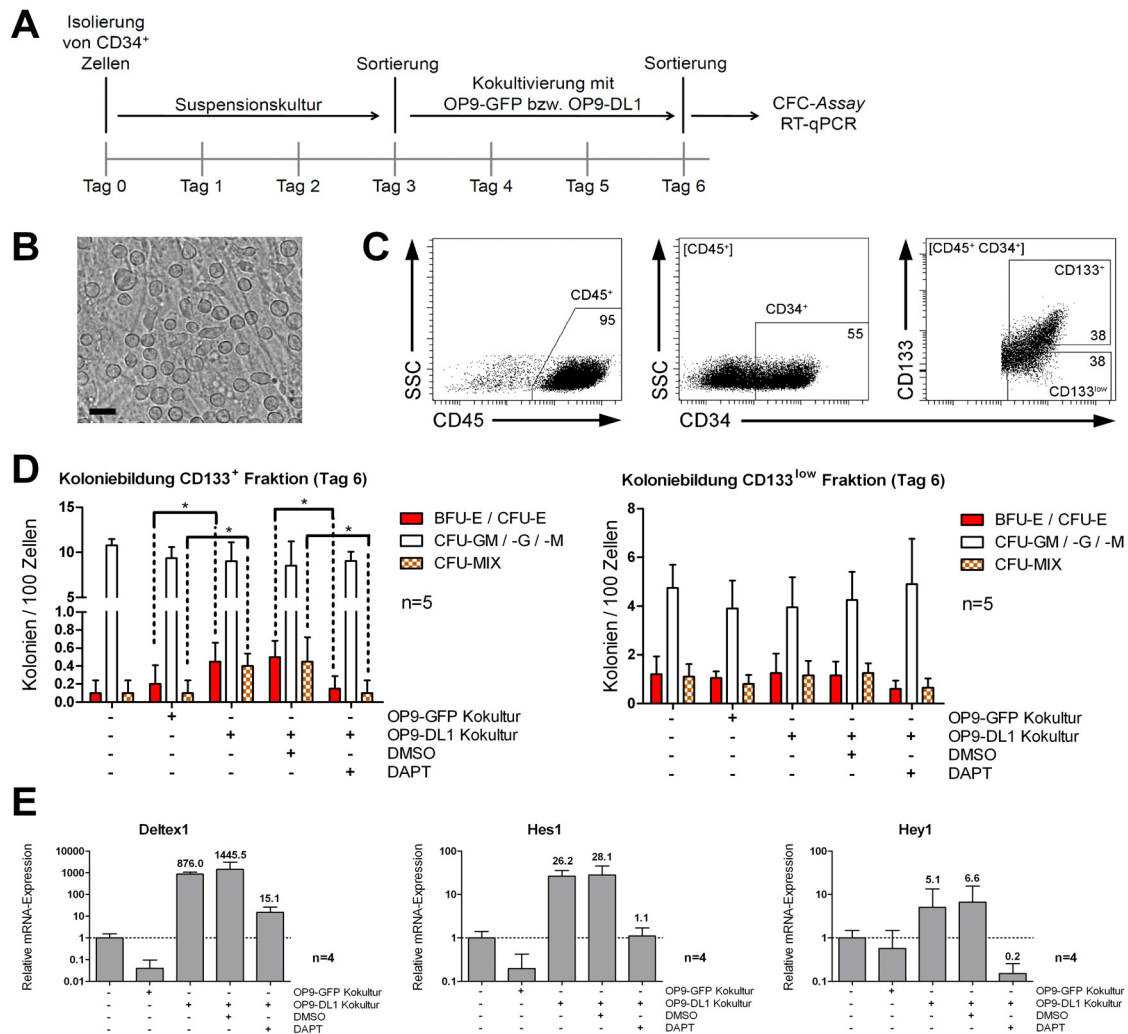
### **3.1.6 Analyse des Einflusses des Notch-Signalweges auf das Zellschicksal von HSVZ**

Aufgrund der oben beschriebenen Effekte von Numb und Notch1-ICD auf die Expression von CD133 wurde im Folgenden der Einfluss des Notch-Signalweges auf Zellschicksalsentscheidungen von CD34<sup>+</sup> Zellen unter Auftrennung der Subpopulationen CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> (im Weiteren als CD133<sup>+</sup> bezeichnet) und CD133<sup>low/-</sup>CD34<sup>+</sup> (CD133<sup>low</sup>) funktionell untersucht.

Zur Induktion des Notch-Signalweges in CD34<sup>+</sup> Zellen wurden diese mit der Zelllinie OP9-DL1 kokultiviert. In dieser stromalen Zelllinie wird ektop der Notch-Ligand Delta-like1 (Dll1) exprimiert (Schmitt und Zuniga-Pflucker, 2002). Entsprechend wird in

kokultivierten humanen CD34<sup>+</sup> Zellen der Notch-Signalweges aktiviert (La Motte-Mohs *et al.*, 2005; Holmes und Zuniga-Pflucker, 2009; Mohtashami *et al.*, 2010; Poirault-Chassac *et al.*, 2010). CD34<sup>+</sup> Zellen wurden nach dreitägiger Suspensionskultur durchflusszytometrisch isoliert und jeweils definierte Zellzahlen für weitere drei Tage (Tag 3 bis Tag 6) auf die Zelllinie OP9-DL1 aufgebracht. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Zellen ohne Stromazellen und zusammen mit der Zelllinie OP9-GFP kultiviert. Als Negativkontrolle wurden alle Ansätze jeweils zwischen Tag 3 und Tag 6 auch in Anwesenheit des  $\gamma$ -Secretase-Inhibitors DAPT (10  $\mu$ M, gelöst in DMSO) kultiviert, der zur Inhibition des Notch-Signalweges eingesetzt werden kann (De Smedt *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Alle Ansätze wurden zur Kontrolle jeweils auch nach Zugabe der entsprechenden Menge an DMSO mitgeführt. An Kulturtag 6 wurden die Zellen geerntet und die Subpopulationen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> nach durchflusszytometrischer Sortierung in CFC-Ansätze eingebracht. Die jeweilige Aktivierung des Notch-Signalweges wurde durch Quantifizierung der Expression der Notch-Zielgene *Deltex1*, *Hey1* und *Hes1* in an Tag 6 sortierten CD34<sup>+</sup> Zellen mittels RT-qPCR analysiert (Abb. 13A).

Hinsichtlich der gebildeten Kolonien zeigten sich dabei deutliche Unterschiede zwischen den Subpopulationen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup>. Es konnte beobachtet werden, dass generell CD133<sup>+</sup> Zellen nur noch in sehr geringem Ausmaß die Fähigkeit besaßen, rote oder gemischte Kolonien zu bilden (deutlich unter 1%), während die Rate der roten und gemischten Kolonien in der CD133<sup>low</sup> Fraktion in allen Versuchen konsistent höher war (zusammen ca. 2%). Dagegen war die Frequenz gebildeter weißer Kolonien in der CD133<sup>+</sup> Fraktion deutlich höher als in der CD133<sup>low</sup> Fraktion (Abb. 13D). Des Weiteren konnten zwar hinsichtlich des Koloniebildungspotenzials der CD133<sup>low</sup> Zellen in allen durchgeführten Ansätzen keine konsistenten Unterschiede gefunden werden, aber der Anteil der roten und gemischten Kolonien in der CD133<sup>+</sup> Population nach Kokultivierung mit der Zelllinie OP9-DL1 war im Gegensatz zu mit OP9-GFP oder ohne Stromazellen kultivierten CD133<sup>+</sup> Zellen deutlich erhöht. Nach Zugabe von DAPT, also nach Inhibition des Notch-Signalweges, war dieser Unterschied nicht mehr sichtbar (Abb. 13D).



**Abb. 13: Einfluss der Induktion des Notch-Signalweges auf CD34<sup>+</sup> Zellen**

(A) Gewählte experimentelle Strategie. Nach dreitägiger Suspensionskultur wurden CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> Zellen durchflusszytometrisch isoliert und für weitere drei Tage mit OP9-DL1- oder OP9-GFP-Zellen kokultiviert bzw. ohne Stroma weiterkultiviert. (B) Mikroskopische Aufnahme von CD34<sup>+</sup> Zellen auf einer konfluenten Schicht von OP9-DL1 Stromazellen an Tag 6 (Maßstabsbalken 20  $\mu$ m). (C) Sortierungsstrategie an Tag 6 zur Isolierung der in der CD45<sup>+</sup> Fraktion enthaltenen CD34<sup>+</sup> Subpopulationen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup>. Die verwendeten Stromazellen sind CD45<sup>-</sup>. (D) Koloniebildung beider Zellfraktionen unter verschiedenen Bedingungen im CFC-Ansatz. E: Quantifizierung der Expression der Notch-Zielgene *Deltex1*, *Hes1*, *Hey1* und unter den verschiedenen Bedingungen mittels RT-qPCR, jeweils normalisiert auf GAPDH und relativ zur Expression der Kontrolle ohne stromale Kokultur.

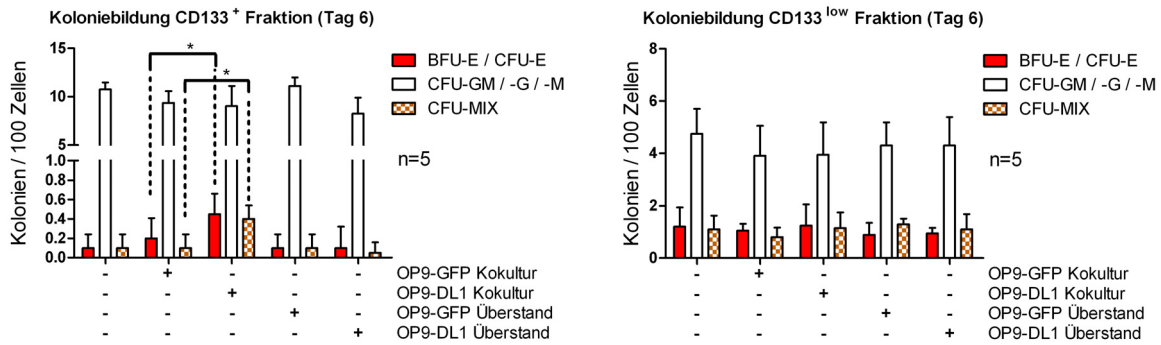
Die Expression der Notch-Zielgene *Deltex1*, *Hey1* und *Hes1* war in den Zellen nach Kokultur mit OP9-GFP und nach stromafreier Kultivierung jeweils schwach detektierbar und war nach Kokultivierung mit OP9-DL1 im Mittel erwartungsgemäß deutlich erhöht (*Hey1*: 5,1-fach; *Hes1*: 26,2-fach; *Deltex1*: 876-fach). Nach Applikation des Inhibitors DAPT während der OP9-DL1 Kokultur war dagegen die

---

Expression aller Notch-Zielgene deutlich weniger erhöht oder sogar vermindert (Abb. 13E).

Somit zeigen diese Versuche, dass die Aktivität des Notch-Signalweges nach Kokultivierung von CD34<sup>+</sup> Zellen mit OP9-DL1 Zellen stark induziert werden kann, während die Kokultivierung auf der Linie OP9-GFP zu keiner Induktion des Notch-Signalweges führte. In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Vordaten zeigte sich eine Anreicherung der erythrozytären und CFU-MIX-Progenitoren in der CD133<sup>low</sup> Fraktion, während diese Kolonietypen in der CD133<sup>+</sup> Fraktion kaum gefunden werden konnten. Nach Aktivierung des Notch-Signalweges durch Kokultivierung mit OP9-DL1 war dagegen die Zahl der Vorläufer mit rotem oder CFU-MIX Potenzial spezifisch in der CD133<sup>+</sup> Fraktion deutlich erhöht. Da nach Zugabe des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors DAPT dieser Effekt nicht zu beobachten war, spricht das für einen spezifisch durch Notch-Aktivierung verursachten Effekt und minimiert die Wahrscheinlichkeit möglicher Sekundäreffekte wie z.B. eines veränderten supportiven Potenzials der Zelllinie OP9-DL1 durch gegenseitige Beeinflussung der Zellen untereinander. Generell war die Fähigkeit der CD34<sup>+</sup> Zellen, rote und gemischte Kolonien hervorzubringen, nach sechstägiger Kultur unter allen Bedingungen im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchen nach 50-60 h deutlich reduziert.

Um im Rahmen der Etablierung dieses Systems weiter aufzuklären, ob der beobachtete Effekt nach Notch-Aktivierung auf direkte Zell-Zell Kontakte zwischen Stromazellen und CD133<sup>+</sup> Zellen zurückzuführen ist oder ob möglicherweise die Sekretion löslicher Faktoren eine Rolle spielt, wurde der Versuch um Ansätze, in denen der Überstand der Zelllinien OP9-GFP und OP9-DL1 statt der Zellen selbst zu den CD34<sup>+</sup> Zellen gegeben wurde, erweitert (Abb. 14).



**Abb. 14: Analyse des Einflusses der Zugabe von Überstand der OP9-GFP bzw. OP9-DL1 Zellen**

Analog zu dem in Abb. 13 dargestellten Versuchsaufbau wurden hier zusätzlich Ansätze mitgeführt, in denen zu testenden CD34<sup>+</sup> Zellen jeweils zwischen Tag 3 und Tag 6 nach Zugabe von Überstand der Zelllinien OP9-GFP bzw. OP9-DL1 kultiviert wurden. Zur Gewinnung dieses Überstandes wurden beide OP9-Zelllinien jeweils in zytokinhaltigem HSVZ-Suspensionskulturmedium für 4 Tage in einer Konfluenz von 60-90% kultiviert. Danach wurde der Überstand abgenommen, filtriert (Porengröße des Filters: 0,45 µm), im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium gemischt und für die Versuche eingesetzt.

Dabei zeigte sich, dass der Effekt (mehr rote/CFU-MIX-Vorläufer in der CD133<sup>+</sup> Fraktion nach OP9-DL1 Kokultivierung) nach Zugabe von OP9-DL1 Überstand nicht zu beobachten war. Zudem konnte wiederum in allen Ansätzen kein konsistenter Unterschied zwischen der Koloniebildungsrate der CD133<sup>low</sup> Zellen gefunden werden (Abb. 14). Folglich scheint ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen den CD133<sup>+</sup> Zellen und den Stromazellen zur Realisierung der beobachteten Veränderung im Zellschicksal der jeweiligen Zellen verantwortlich zu sein.

### 3.1.7 Analyse des Effekts von Numb auf die Aktivierung des Notch-Signalweges

In allen bislang geschilderten Experimenten wurden CD34<sup>+</sup> Zellen in Suspension kultiviert. Wie die im letzten Abschnitt beschriebenen Versuche zeigen, werden nach Induktion des Notch-Signalweges die Notch-Zielgene *Deltex1*, *Hes1* und *Hey1* stark hochreguliert. Das legt nahe, dass der Notch-Signalweg in CD34<sup>+</sup> Zellen unter den vorher verwendeten Kulturbedingungen (Suspensionskultur) nur relativ schwach aktiv ist. Mittels klassischer RT-PCR konnte Gregor von Levetzow in seiner Arbeit qualitativ zeigen, dass in frisch isolierten und in kultivierten CD34<sup>+</sup> Zellen die Expression der Notch-Zielgene *Hes1* und *Hey1* neben der bereits erwähnten Expression von Notch-Rezeptoren und –Liganden detektierbar ist (von Levetzow, 2008). Vermutlich ist der Notch-Signalweg unter nicht-induzierten Bedingungen in



CD34<sup>+</sup> Zellen basal aktiv und damit zwar über die Detektion der Zielgen-Expression nachweisbar, wird aber erst durch OP9-DL1 Kokultur vollständig aktiviert. Somit wurden die bisherigen Experimente zur Aufklärung der Funktion von Numb unter Kultivierungsbedingungen durchgeführt, in denen der Notch-Signalweg nur basal aktiv war. Zur Beantwortung der Frage, ob Numb in CD34<sup>+</sup> Zellen den Notch-Signalweg antagonisiert, wurde die Funktion von Numb deshalb als nächstes unter Notch-induzierten Bedingungen analysiert.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gibt es Hinweise aus verschiedensten Organismen und Geweben, dass die Präsenz von Numb in einer Zelle die Translokation des Notch-Signals in den Zellkern und somit die Induktion der Expression der Notch-Zielgene verhindert (Frise *et al.*, 1996; French *et al.*, 2002; McGill *et al.*, 2009; Giebel und Wodarz, 2012). Sollte also die Überexpression von Numb in CD34<sup>+</sup> Zellen im OP9-DL1 Kokultursystem zu einer verminderten Expression der Notch-Zielgene führen, würde das bedeuten, dass Numb auch in humanen HSVZ die Aktivierung des Notch-Signalweges verhindert.

Analog zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Versuchen wurden repräsentativ mit Numb2 transduzierte CD34<sup>+</sup> Zellen von Tag 3 bis Tag 6 mit den Zelllinien OP9-GFP und OP9-DL1 kokultiviert. Anschließend wurde in sortierten CD34<sup>+</sup> Zellen mittels RT-qPCR die Expression der Notch-Zielgene *Deltex1*, *Hes1* und *Hey1* quantifiziert (Abb. 15A). Weil bislang in keinem Versuch funktionelle Unterschiede zwischen einzelnen Isoformen detektiert wurden, wurde dieser nur mit einer Isoform durchgeführt. Numb2 wurde gewählt, da Studien mit Tumorzellen nahelegen, dass die PRRS-Domäne (Numb2 und Numb4, vgl. Abb. 4) für die Antagonisierung von Notch essentiell ist (Misquitta-Ali *et al.*, 2010).

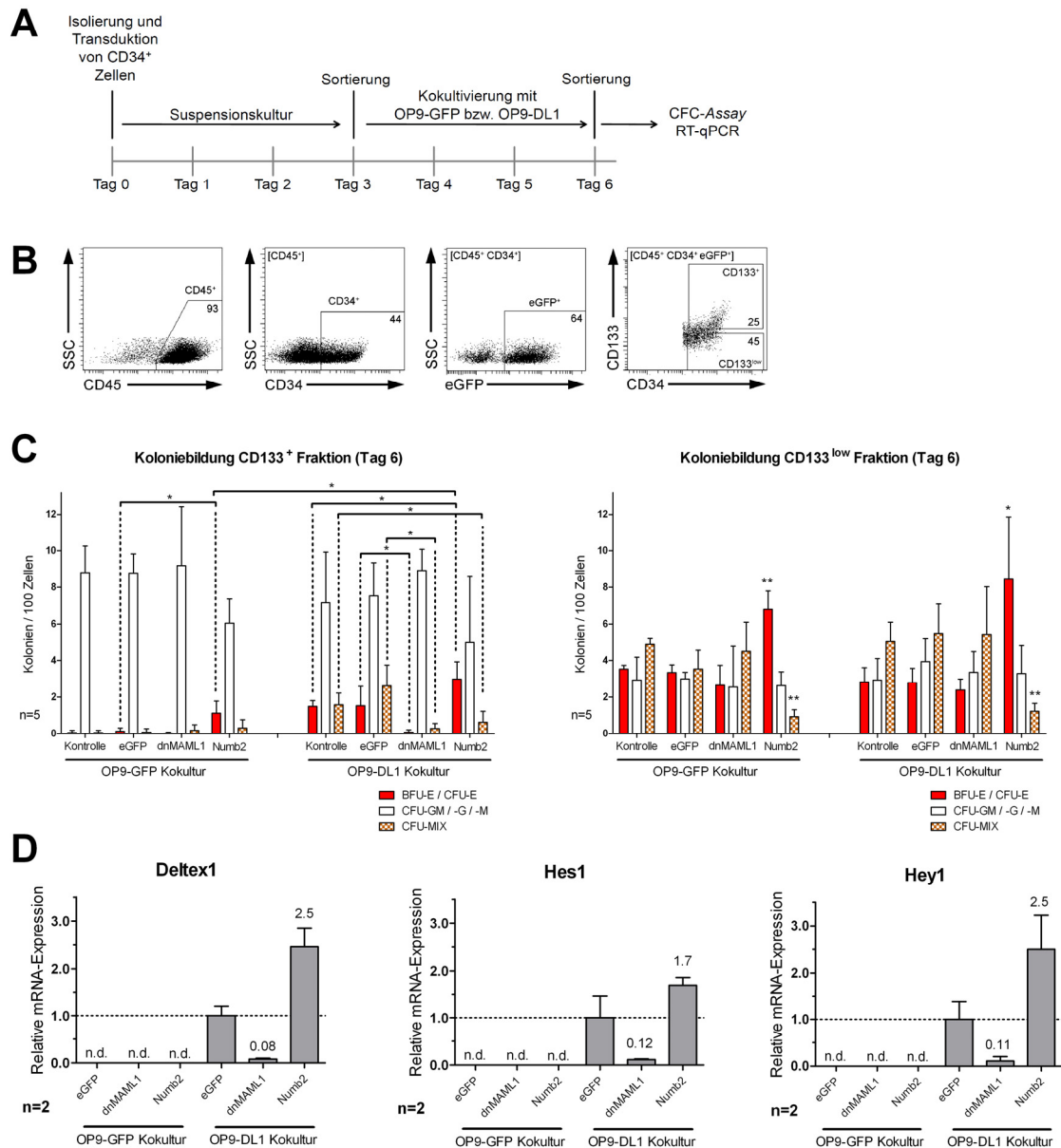
Der bei den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Versuchen als Negativkontrolle verwendete Inhibitor DAPT inhibiert das Enzym  $\gamma$ -Secretase. Da neben Notch auch andere Transmembranproteine (z.B. APP) durch  $\gamma$ -Secretase gespalten werden (Hemming *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2009) ist DAPT kein Notch-spezifischer Inhibitor, dessen Verwendung zu sekundären Effekten führen kann. Deshalb sollten weitere Versuche nach Expression von dominant-negativem Mastermind-like1 (dnMAML1) als Negativkontrolle erfolgen. Zum Zeitpunkt der vorher mit DAPT durchgeführten Versuche lag das dafür klonierte, lentivirale Konstrukt noch nicht in unserer Gruppe

vor. Die Expression dieser verkürzten, dominant-negativen Variante des humanen transkriptionellen Notch-Koaktivators MAML-1 bewirkt eine effiziente Bindung der intrazellulären Domänen (engl. *intracellular domain*; ICD) der Notch-Rezeptoren 1-4 in transkriptionell inaktiven CSL/ICD/dnMAML1-Komplexen und inhibiert damit spezifisch und effektiv die Aktivierung des Notch-Signalweges (Wu *et al.*, 2000; Maillard *et al.*, 2004; Poirault-Chassac *et al.*, 2010).

Hinsichtlich des Koloniebildungspotenzials der CD133<sup>+</sup> Zellen konnte der vorher ermittelte Unterschied zwischen OP9-GFP- und OP9-DL1-Kokultur reproduziert werden: Nach OP9-DL1-Kokultur waren wiederum deutlich mehr rote und gemischte Vorläufer in dieser Fraktion enthalten. Die gleichzeitige Expression von dnMAML-1 verhinderte diesen Effekt. Die Numb2-Überexpression führte in CD133<sup>+</sup> Zellen jeweils sowohl nach OP9-GFP- als auch nach OP9-DL1-Kokultur zu erhöhten Frequenzen roter Kolonien und nach OP9-DL1-Kokultur auch zu verminderten Raten gemischter Kolonien (Abb. 15C).

Hinsichtlich des Koloniebildungspotenzials der CD133<sup>low</sup> Zellen konnten bei allen Kontrollansätzen (unbehandelte Kontrolle, eGFP-Kontrolle, dnMAML1) unter beiden Bedingungen (OP9-GFP/-DL1 Kokultur) wie im vorherigen Abschnitt keine konsistenten Unterschiede gefunden werden. Dagegen führte die Numb2-Überexpression, unabhängig von der verwendeten OP9-Zelllinie, jeweils zu einer deutlich höheren Frequenz roter und einer deutlich reduzierten Frequenz gemischter Kolonien (Abb. 15C).

Die Expression der Notch-Zielgene *Hes1*, *Hey1* und *Deltex1* konnte in keinem der mit OP9-GFP kokultivierten Ansätzen detektiert werden. Im vorhergehenden Versuch war eine schwache Detektion gelungen (vgl. Abb. 13D), dabei wurden mehr Zellen je Ansatz sortiert (jeweils ca.  $0,5 \times 10^5$ ). In diesem Versuch erfolgte eine zusätzliche Sortierung auf jeweils eGFP<sup>+</sup> Zellen (Abb. 15B), weshalb je Ansatz nur ca.  $1 \times 10^4$  Zellen sortiert werden konnten, was zu einer Limitierung der Detektierbarkeit schwach exprimierter mRNAs führte. Deshalb erfolgte die Normalisierung auf die eGFP-Kontrolle nach OP9-DL1 Kokultur. Relativ dazu führte jeweils die Expression von dnMAML1 zu einer deutlich verminderten Expression aller drei Notch-Zielgene. Die Überexpression von Numb2 führte hingegen jeweils zu einer im Mittel erhöhten Expression von *Deltex1* (2,5-fach), *Hes1* (1,7-fach) und *Hey1* (2,5-fach) im Vergleich zur eGFP-Kontrolle (Abb. 15D).



**Abb. 15: Analyse der Rolle von Numb auf die Aktivierung des Notch-Signalweges**

(A) Experimentelle Strategie des Versuchs, analog zu dem in Abb. 13 dargestellten Versuch. An Tag 3 wurden jeweils CD34<sup>+</sup>eGFP<sup>+</sup> Zellen sortiert und für 3 Tage mit OP9-GFP/-DL-1 kokultiviert. An Tag 6 wurden eGFP<sup>+</sup> Zellen der Populationen CD133<sup>+</sup> bzw. CD133<sup>low</sup> sortiert und analysiert. (B) Verwendete Sortierungsstrategie. Alle CFC-Versuche (C) wurden jeweils mit dem lentiviralen Numb2-EG und dem Numb2-IEG Konstrukt durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse. Dargestellt sind die Ergebnisse nach Verwendung des Numb2-IEG Konstruktes. Zur Sortierung von Zellen für RT-qPCR-Versuche (D) wurde das Numb2-EG Konstrukt verwendet, da mit Numb2-IEG transduzierte Zellen zu schwach eGFP<sup>+</sup> waren, um durch Sortierung ausreichende Zellzahlen gewinnen zu können.

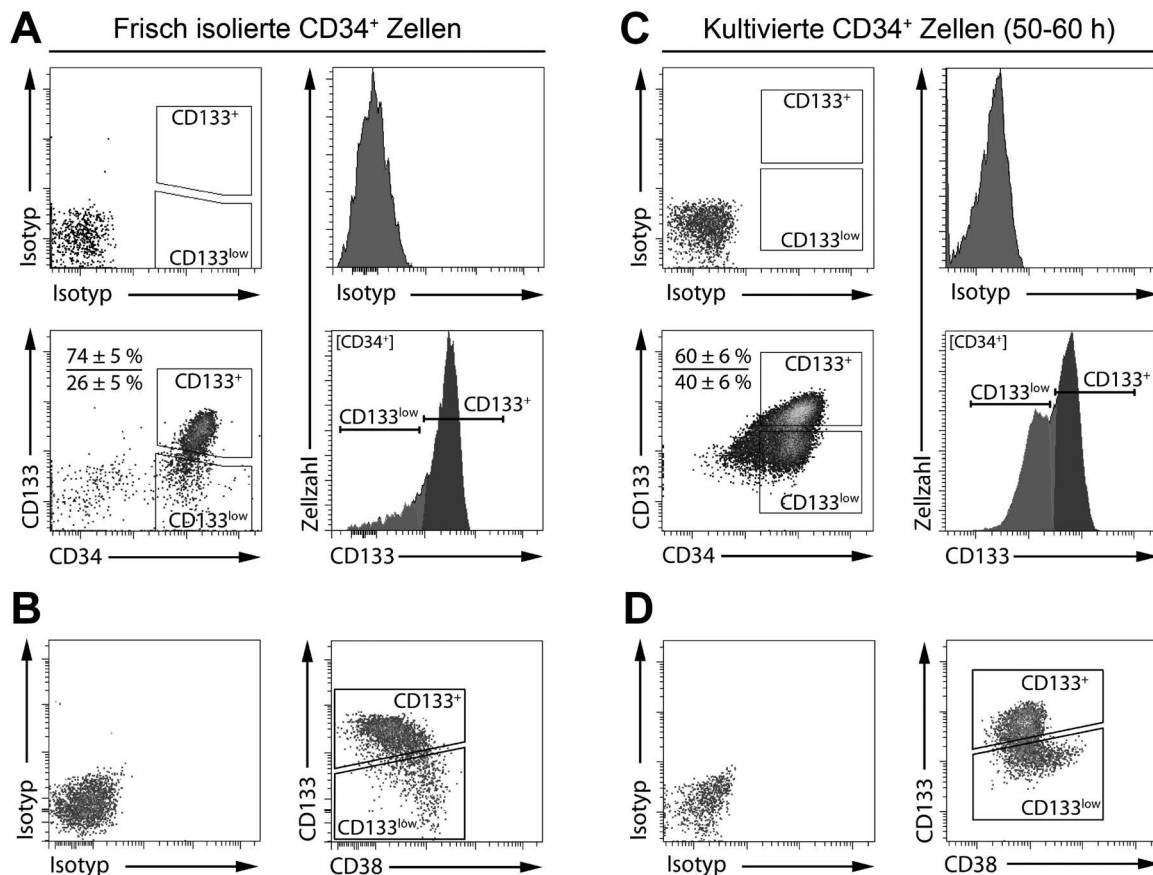
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von dnMAML1 den nach OP9-DL1 Kokultur gefundenen Effekt des vermehrten roten und CFU-MIX Potenzials in der CD133<sup>+</sup> Fraktion sowie die Hochregulierung der Notch Zielgene aufhebt. Dies bestätigt, dass die Aktivierung des Notch-Signalweges für diesen Effekt funktionell verantwortlich ist. Des Weiteren zeigte sich, dass die Überexpression von Numb (hier repräsentiert durch Numb2) unabhängig davon, ob die CD34<sup>+</sup> Zellen mit OP9-GFP oder OP9-DL1 kokultiviert wurden, zu einer vermehrten Frequenz roter und einer verminderten Frequenz gemischter Kolonien führte. Diese Tendenzen sind vergleichbar mit den in initial durchgeführten Versuchen erhaltenen Daten im CFC-Ansatz (vgl. Abschnitt 3.1.3). Wenn Numb, wie ursprünglich angenommen, die Aktivierung des Notch-Signalweges unterdrückt, wären nach Numb-Überexpression ähnliche Ergebnisse wie nach Expression von dnMAML1 zu erwarten gewesen. Die erhöhte Expression der Notch-Zielgene *Deltex1*, *Hey1* und *Hes1* nach Numb-Überexpression unter Notch-induzierten Bedingungen zeigt zudem, dass Numb die Aktivierung des Notch-Signalweges nicht verhindert, sondern eher zu einer verstärkten Aktivierung führt. Die Ergebnisse legen somit nahe, dass Numb in der humanen Hämatopoese eine wichtige funktionelle Rolle spielt, diese aber nicht durch direkte Modulation des Notch-Signalweges erfolgt.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass die Aktivierung des Notch-Signalweges unter diesen Versuchsbedingungen innerhalb der CD34<sup>+</sup> Zellen nur auf CD133<sup>+</sup> Zellen, nicht aber auf CD133<sup>low</sup> Zellen, einen zellschicksalsverändernden Einfluss hat, während die Überexpression von Numb in beiden Zellfraktionen zu Unterschieden führt. In beiden Populationen wirkt die Numb-Überexpression der Bildung primitiver erythro-myeloischer Vorläufer (CFU-MIX) entgegen und treibt die Zellen in die erythrozytäre Linie. Vorläuferzellen mit CFU-MIX Potenzial sind in unbehandelten Zellen, ebenso wie erythrozytäre Vorläufer, in der CD133<sup>low</sup> Fraktion angereichert. Zellen mit *in vitro*-Langzeitpotenzial (LTC-IC) sind hingegen in der CD133<sup>+</sup> Fraktion enthalten (Beckmann *et al.*, 2007). Die Überexpression von Numb verhindert somit die Aufrechterhaltung primitiver Zellschicksale in verschiedenen Zellfraktionen, die des LTC-IC in der CD133<sup>+</sup> und die des CFU-MIX in der CD133<sup>low</sup> Fraktion. Vor dem an dieser Stelle zunächst unerwarteten Hintergrund wurde der Entschluss gefasst, die beiden Fraktionen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> innerhalb der CD34<sup>+</sup> Zellfraktion hinsichtlich ihres Linien-Potenzials genauer zu charakterisieren.

## 3.2 Analyse der Subpopulationen CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup>

### 3.2.1 Charakterisierung der Expression von CD133 auf CD34<sup>+</sup> Zellen

Der Marker CD133 trennt CD34<sup>+</sup> Zellen in die beiden Subpopulationen CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> (CD133<sup>+</sup>) und CD133<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup> (CD133<sup>low</sup>) auf (Yin *et al.*, 1997; Giebel *et al.*, 2006; Beckmann *et al.*, 2007). Die Verhältnisse der jeweiligen Populationen sind in primären CD34<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut relativ konstant. Die Quantifizierung beider CD34<sup>+</sup> Subpopulationen an Nabelschnurblutproben (n=7) ergab, dass ungefähr drei Viertel der CD34<sup>+</sup> Zellen der CD133<sup>+</sup> Population zuzuordnen sind (Abb. 16A). Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass sich die meisten CD34<sup>+</sup> Zellen nach einer Kultivierungsdauer von 50-60 h in Anwesenheit der früh wirksamen Zytokine (SCF, TPO, FLT3L) einmal teilen (Beckmann *et al.*, 2007). Gleichzeitig veränderte sich das Verhältnis der CD34<sup>+</sup> Subpopulationen zueinander, ca. 60% der CD34<sup>+</sup> Zellen gehörten der CD133<sup>+</sup> Population an, ca. 40% der Zellen der abgetrennten CD133<sup>low</sup> Population (Abb. 16C). Zudem gehörten alle CD38<sup>low/-</sup> Zellen bei frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen der CD133<sup>+</sup> Fraktion an (Abb. 16B). Dieser deutliche Kontrast zwischen CD133 und CD38 ging mit Kultivierung der CD34<sup>+</sup> Zellen verloren. Tendenziell enthielt aber auch die kultivierte CD133<sup>+</sup> Fraktion Zellen mit deutlich geringerer CD38 Expression und die CD133<sup>low</sup> Fraktion für den Marker CD38 stärker positive Zellen (Abb. 16D).



**Abb. 16: Definition der humanen HSZ-Subpopulationen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup>**

**(A)** Durchflusszytometrische Charakterisierung und Definition der CD34<sup>+</sup> Subpopulationen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup>. Im Vergleich zu Isotyp-Kontrollmessungen (obere Reihe) exprimieren ca. ¾ frisch isolierter CD34<sup>+</sup> Zellen hohe Mengen an CD133 (CD133<sup>+</sup>), während ca. ¼ der CD34<sup>+</sup> Zellen geringere Mengen oder kein CD133 (CD133<sup>low</sup>) exprimiert (n=7). **(B)** Nach Kultivierung für 50-60 h bildet sich eine deutliche CD133<sup>low</sup> Population (n=7). Zur besseren Beurteilung ist die CD133 Expression der CD34<sup>+</sup> Zellen jeweils auch als Histogramm darstellt. **(C)** Analysen an frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen zeigen, dass alle CD38<sup>low/-</sup> Zellen in der CD133<sup>+</sup> Fraktion enthalten sind. **(D)** Nach Kultivierung wird CD38 auf allen Zellen hochreguliert, der Kontrast zwischen beiden Populationen ist reduziert und nur noch leicht erkennbar.

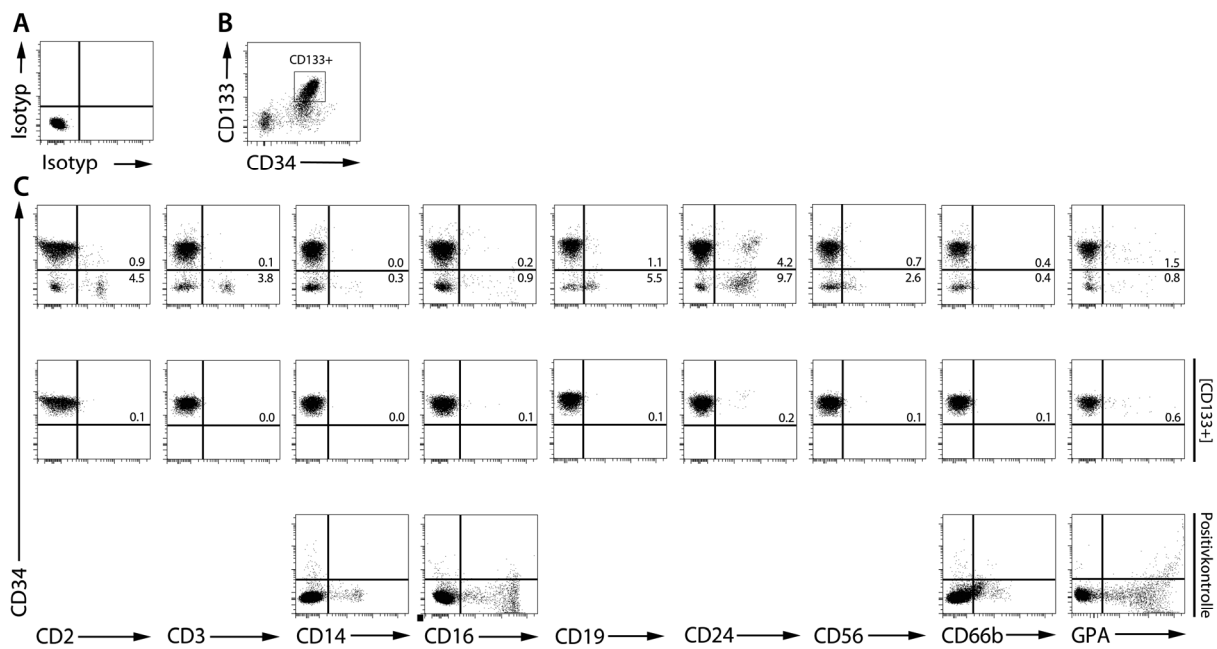
### 3.2.2 Analyse der Expression von linienspezifischen Oberflächenmarkern auf CD133<sup>+</sup> Zellen

Für durchflusszytometrische oder auch funktionelle Analysen immunphänotypisch primitiver humaner hämatopoetischer Subpopulationen ist es allgemein üblich, vorab eine sogenannte Linien-Depletion durchzuführen. Dabei werden alle Zellen, die bestimmte linienspezifische Oberflächenmarker exprimieren, depletiert oder von der Analyse ausgeschlossen, da sie eher reifere Vorläuferzellen darstellen und somit primitivere Zellen angereichert werden können (Terstappen *et al.*, 1991). Auf diese

Weise von vielen Arbeitsgruppen häufig verwendete Sets linienspezifischer Marker beinhalten die Marker CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b und Glycophorin A (GPA) (Dorrell *et al.*, 2000; Doulatov *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Linien-Depletionen durchgeführt, um keine Progenitor-Subpopulationen von den Analysen auszuschließen. Um im Rahmen der Analysen der CD133 Subpopulationen die Vergleichbarkeit mit Daten von anderen Arbeitsgruppen zu gewährleisten, wurde überprüft, in welchem Umfang CD133<sup>+</sup> bzw. CD133<sup>low</sup> Zellen linienspezifische Marker exprimieren (Abb. 17).

Dazu wurden angereicherte CD34<sup>+</sup> Zellen mit Antikörpern gegen linienspezifische Marker gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Es zeigte sich, dass die CD34<sup>+</sup> Zellpopulation für alle getesteten Marker mit Ausnahme der Marker CD19 (1,1% positiv), CD24 (4,2%), und GPA (1,5%) deutlich weniger als 1% Linienmarker-positive Zellen enthielt. Alle CD133<sup>+</sup> Zellen waren für die linienspezifischen Marker negativ. Der mit Abstand höchste Wert war für GPA messbar (0,6% positive Zellen; Abb. 17C).



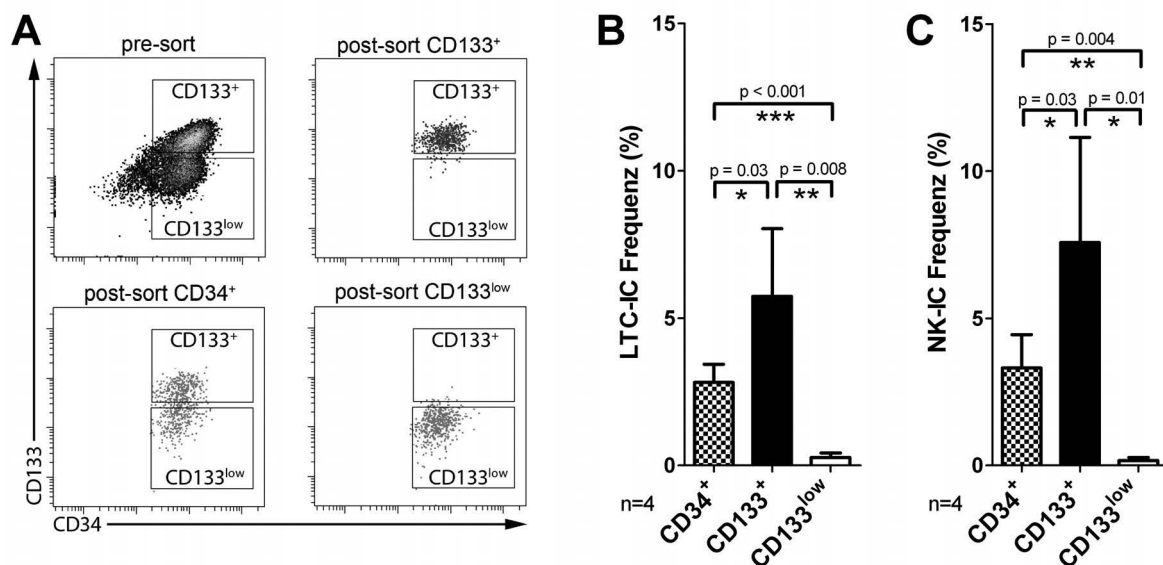
**Abb. 17: Analyse gängiger linienspezifisch-exprimierter Oberflächenmarker auf CD34<sup>+</sup> Zellen**

(A) Durchflusszytometrische Kontrollmessung mit Isotypen-Antikörpern. (B) Darstellung der zur getrennten Analyse der CD133<sup>+</sup> Zellen verwendeten Region. (C) In der obersten Reihe ist die Messung an allen Zellen nach durchflusszytometrischer Zellseparation dargestellt. Als interne Kontrolle dienen in einigen Fällen jeweils noch residuale CD34-negative Zellen. In der mittleren Reihe sind die Messungen nur für CD133<sup>+</sup> Zellen dargestellt. Für Marker, für die in CD34<sup>+</sup> Zellen kein solides Positiv-Signal detektiert werden konnte, wurden als Positivkontrolle gefärbte mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut dargestellt (untere Reihe; n=2).

Demnach enthalten  $CD34^+$  Zellen aus Nabelschnurblut sehr wenige und die  $CD133^+$  Fraktion nahezu gar keine Zellen, die linienspezifische Marker exprimieren. Folglich ist bei Verwendung von  $CD133^+$  Zellen eine Linien-Depletion nicht erforderlich.

### 3.2.3 Analyse des *in vitro* Langzeitpotenzials der durch $CD133$ definierten Subpopulationen

Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Zellen mit myeloischem *in vitro*-Langzeitpotenzial (LTC-IC) in der  $CD133^+$  Fraktion enthalten sind (Beckmann *et al.*, 2007). Zur Verifizierung dieses Befundes und um zu testen, welche Population Zellen mit lymphatischem Langzeitpotenzial enthält, wurden durchflusszytometrisch sortierte Zellen beider  $CD133$  Subpopulationen nach einer Kulturdauer von 50-60 h im LTC-IC-Ansatz und im NK-IC Ansatz analysiert. Der NK-IC-Ansatz erlaubt analog zum LTC-IC-Ansatz retrospektiv eine Quantifizierung von primitiven HSVZ mit lymphatischem Langzeitpotenzial. Zur Kontrolle wurden auch  $CD34^+$  Zellen ohne  $CD133$ -Subfraktionierung sortiert und analysiert. Die Reinheit der sortierten Zellpopulationen war konstant höher als 99,5% (Abb. 18A).



**Abb. 18: Analyse des myeloischen und lymphatischen Langzeitpotenzials in humanen HSVZ Subpopulationen**

(A) Sortierungsstrategie und Reanalysen nach durchflusszytometrischer Sortierung. (B/C) Darstellung der LTC-IC Frequenzen (B) und der NK-IC Frequenzen (C) in den sortierten Zellfraktionen (n=4).



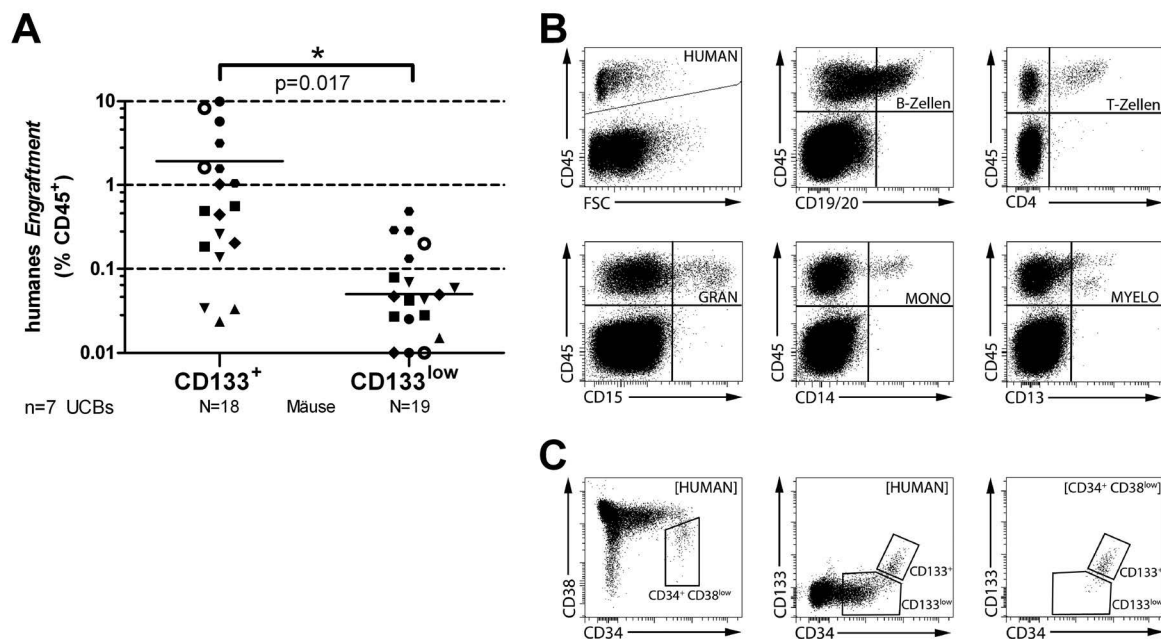
Die LTC-IC Frequenz lag in der CD34<sup>+</sup> Fraktion bei 2,8% ± 0,6% und war in der CD133<sup>+</sup> Fraktion deutlich höher (5,7% ± 2,3%). Dagegen konnten in der CD133<sup>low</sup> Fraktion fast keine Zellen mit LTC-IC Potenzial detektiert werden (Abb. 18B). Im NK-IC-Ansatz zeigten 3,3 ± 1,1% der Zellen der CD34<sup>+</sup> Fraktion lymphatisches Langzeitpotenzial, welches wiederum in der CD133<sup>+</sup> Fraktion stark angereichert (7,6% ± 3,6%) und in der CD133<sup>low</sup> Fraktion kaum vorhanden war. Somit zeigen diese Ergebnisse, dass nach einer Kultivierungsdauer von 50-60 h Vorläufer mit myeloischem und lymphatischem Langzeitpotenzial fast ausschließlich in der CD133<sup>+</sup> Fraktion enthalten sind.

### **3.2.4 Analyse von CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen im NOD/SCID-Repopulierungsassay**

Im Folgenden wurde der NOD/SCID Repopulierungsansatz in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dürig (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen) etabliert. Mit Hilfe dieses *in vivo* Analyseverfahrens lässt sich nach Transplantation zu testender Zellen in subletal bestrahlte, immundefiziente Mäuse die Fähigkeit der Zellen beurteilen, in das Knochenmark der Mäuse einzuwandern, sich dort einzunisten und in verschiedene hämatopoetische Linien zu differenzieren (engl. *multi-lineage engraftment*).

Dazu wurden 50-60 h kultivierte CD34<sup>+</sup> Zellen wiederum durchflusszytometrisch in die Populationen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> subfraktioniert und in Dosen von 50.000 Zellen je Maus intravenös in NOD/SCID Mäuse transplantiert. Nach 8 Wochen wurden humane hämatopoetische Zellen mit Hilfe von humanspezifischen Antikörpern im Knochenmark der Mäuse durchflusszytometrisch detektiert und die Gesamtfrequenz der humanen Zellen (humanes *Engraftment*) über den auf allen Leukozyten exprimierten Marker CD45 bestimmt. Mäuse mit einem Mindestanteil von 0,1% humaner CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark wurden als erfolgreich repopuliert angesehen (Dorrell *et al.*, 2000; Notta *et al.*, 2009). Bei 15 von 18 mit CD133<sup>+</sup> Zellen transplantierten Mäusen wurde eine erfolgreiche Repopulation nachgewiesen (Abb. 19A). Zudem konnten bei diesen Mäusen jeweils für alle gemessenen linienspezifischen Marker (CD19/20 für B-Zellen, CD4 für T-Zellen, CD15 für Granulozyten, CD14 für Makrophagen, CD13 für myeloische Zellen) positive Zellen detektiert werden (Abb. 19B).

In allen erfolgreich repopulierten Mäusen konnten zudem humane  $CD34^+$  Zellen gefunden werden. Das Knochenmark der Mäuse enthielt jeweils, vergleichbar mit frisch isolierten humanen HSVZ, immunphänotypisch die Subpopulationen  $CD133^+$  und  $CD133^{low}$ .  $CD133^+$  Zellen entsprachen zudem wiederum der  $CD34^+CD38^{low/-}$  und  $CD133^{low}$  Zellen der  $CD38^+$  Fraktion (Abb. 19C).



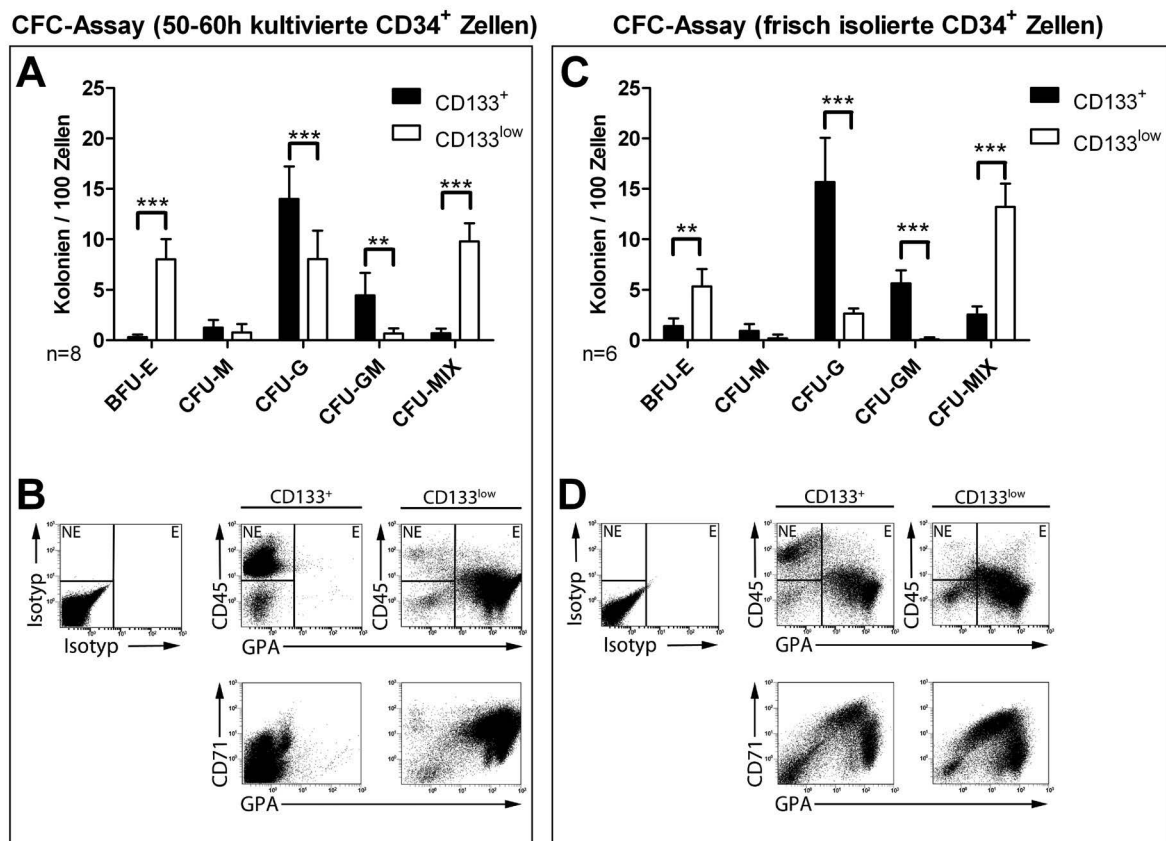
**Abb. 19: Analyse des Repopulierungspotenzials der HSVZ-Subpopulationen**

(A) Quantifizierung des humanen *Engraftments* in NOD/SCID Mäusen, angegeben als Prozentsatz der vitalen  $CD45^+$  Zellen im Knochenmark der Mäuse. Es wurden Zellen aus sieben verschiedenen Nabelschnurbluten (UCBs) transplantiert. Identische Symbole repräsentieren Mäuse, die mit Zellen aus dem gleichen Nabelschnurblut transplantiert wurden. (B) Repräsentative Multi-Linien Analyse einer mit  $CD133^+$  Zellen transplantierten Maus. Die Region HUMAN wurde zur Quantifizierung des humanen Engraftments verwendet. Humane lymphatische und myeloische Zellen wurden mit Hilfe der linienspezifischen Marker  $CD19/20$ ,  $CD4$ ,  $CD15$ ,  $CD14$  und  $CD13$  detektiert. (C) Die Detektion humaner HSVZ-Subpopulationen erfolgte durch Messung der Oberflächenexpression der Marker  $CD34$ ,  $CD133$  und  $CD38$ .

Nach Transplantation von  $CD133^{low}$  Zellen konnten in nur 5 von 19 Mäusen mehr als 0,1%  $CD45^+$  Zellen detektiert werden (Abb. 19A). Diese Zellen exprimierten jedoch keinen der anderen getesteten humanen Marker, deshalb wurden diese Mäuse als nicht repopuliert angesehen. Folglich befinden sich Zellen mit der Fähigkeit, NOD/SCID-Mäuse zu repopulieren, exklusiv in der  $CD133^+$  Fraktion.

### 3.2.5 Detaillierte Analyse der CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Fraktionen im CFC-Ansatz

Um das erythro-myeloische Differenzierungspotenzial der CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen genauer zu vergleichen, wurden als nächstes für 50-60 h kultivierte Zellen durchflusszytometrisch sortiert und in CFC-Ansätze eingebracht. Es zeigten sich bereits hinsichtlich der Gesamt-Koloniebildungsrate leichte Unterschiede (CD133<sup>+</sup>: 20% ± 4%; CD133<sup>low</sup>: 27% ± 2%; n=8; p<0,001; nicht dargestellt). Rote (BFU-E/CFU-E) und gemischte Kolonien (CFU-MIX) wurden fast ausschließlich von Zellen der CD133<sup>low</sup> Fraktion gebildet. Der Großteil der Granulozyten/Macrophagen (CFU-GM) bzw. Granulozyten (CFU-G) enthaltenen Kolonien fand sich in der CD133<sup>+</sup> Fraktion (Abb. 20A).



**Abb. 20: Vergleich des erythro-myeloischen Potenzials von CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen**

(A) Koloniebildungsfrequenzen der einzelnen Subtypen erythro-myeloischer Kolonien im CFC-Ansatz nach Analyse von nach einer Kulturdauer von 50-60 h durchflusszytometrisch sortierten CD133<sup>+</sup> oder CD133<sup>low</sup> Fraktionen. (B) Durchflusszytometrische Analyse der erhaltenen Zellen nach Ernte aller Kolonien aus A. Erythrozytäre (E) wurden über den Immunphänotyp GPA<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD45<sup>low/-</sup> von nicht-erythrozytären (NE) Zellen (GPA<sup>-</sup>CD71<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>) diskriminiert. (C) Darstellung der Koloniebildungsfrequenzen von frisch isolierten CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen analog zu (A). (D) Durchflusszytometrische Analyse der nach Ernte der Kolonien aus (C) erhaltenen Zellen analog zu (A).

Um diese deutlichen Unterschiede zu bestätigen, wurden alle Kolonien jeweils durch mehrfaches Waschen aus dem semisoliden Methylzellulosemedium geerntet und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass erythrozytäre Zellen im CFC-Assay deutlich stärker proliferieren als leukozytäre Zellen und dass der Großteil einer CFU-MIX Kolonie anteilig aus roten Zellen besteht. Folglich lassen sich die dargestellten durchflusszytometrischen Analysen der Gesamt-Kolonien nicht zur Beurteilung der Verhältnisse verschiedener Kolonietypen heranziehen. Qualitativ konnte dennoch bestätigt werden, dass fast alle Zellen aus den von der CD133<sup>+</sup> Fraktion gebildeten Kolonien keine erythrozytären Oberflächenmarker (CD71, GPA) aufwiesen. Dagegen war ein Großteil der Zellen der von der CD133<sup>low</sup> Fraktion hervorgebrachten Kolonien positiv für beide Marker (Abb. 20B).

An diesem Punkt war der Befund, dass CFU-MIX Kolonien hauptsächlich von der CD133<sup>low</sup> Fraktion und die meisten CFU-GM Kolonien von der CD133<sup>+</sup> Fraktion hervorgebracht wurden, unerwartet. CFU-MIX Kolonien werden auch als CFU-GEMM (engl. *granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte*) Kolonien bezeichnet und Vorläufer, die diese Kolonien bilden können, repräsentieren den CMP (engl. *common myeloid progenitor*), eine gemeinsame myeloische Vorläuferzelle, die im weiteren Verlauf der Differenzierung Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitorzellen (MEP) und Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen (GMP) hervorbringt (Akashi *et al.*, 2000; Manz *et al.*, 2002). Da der GMP durch CFU-GM Kolonien repräsentiert wird, implizieren die Ergebnisse im CFC-Ansatz an dieser Stelle, dass der CD133<sup>+</sup> GMP nicht vom CD133<sup>low</sup> CMP abstammt, primitive CD133<sup>+</sup> Zellen CD133<sup>+</sup> GMPs über CD133<sup>low</sup> CMPs bilden oder der Immunphänotyp der CD34<sup>+</sup> Zellen durch die gewählten Kulturbedingungen verändert wird.

Um somit mögliche Einflüsse der 50-60-stündigen Kultivierung auf die Oberflächenexpression von CD133 auszuschließen, wurden die CFC-Analysen mit CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellfraktionen aus frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen wiederholt. Dabei zeigte sich, ähnlich wie bei kultivierten CD34<sup>+</sup> Zellen, dass BFU-E- und CFU-MIX- Vorläufer in der CD133<sup>low</sup> Fraktion stark angereichert waren, während die CD133<sup>+</sup> Fraktion einen Großteil der Vorläufer mit CFU-GM-Potenzial und den überwiegenden Teil der CFU-G Progenitoren enthielt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach Analyse kultivierter Zellen zeigte sich bei der Analyse frisch

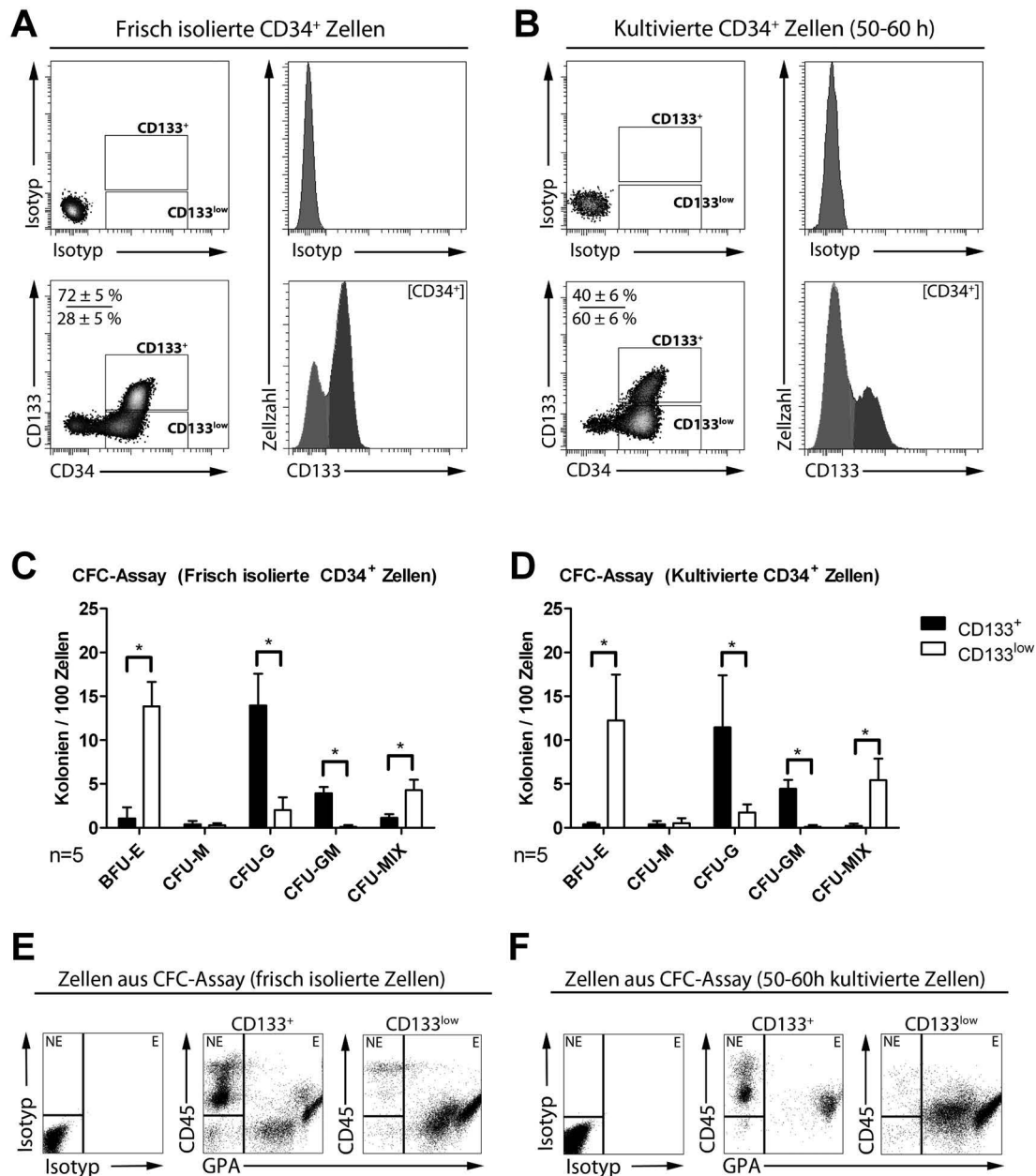
isolierter CD133<sup>+</sup> Zellen ein höherer Anteil an BFU-E- und CFU-MIX-Kolonien (Abb. 20C). Auch diese Ergebnisse wurden mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen bestätigt (Abb. 20D).

Folglich reduziert sich nach Kultivierung von CD34<sup>+</sup> Zellen für 50-60 h der Anteil der CD133<sup>+</sup> Zellen mit CFU-MIX Potenzial. Des Weiteren fanden sich sowohl in frisch isolierten als auch in kultivierten CD34<sup>+</sup> Zellen die Vorläufer mit CFU-GM Potenzial in der CD133<sup>+</sup> Fraktion und der Großteil der Progenitoren mit CFU-MIX-Potenzial in der CD133<sup>low</sup> Fraktion.

### **3.2.6 Charakterisierung der CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Subpopulationen in humanen Apheresat-Proben und humanem Knochenmark**

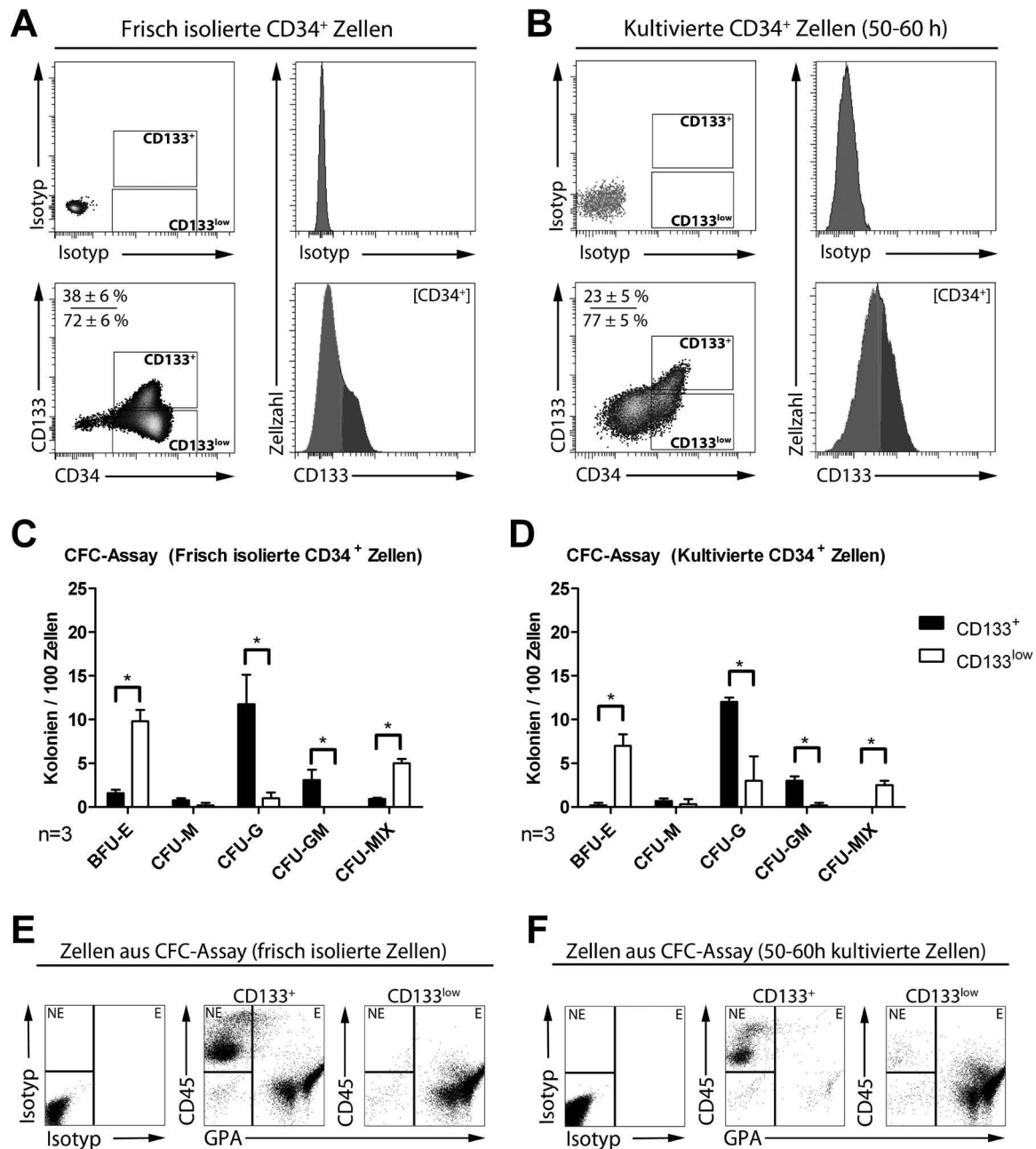
Im Rahmen dieser Arbeit wurden bislang jeweils CD34<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut analysiert. Da entsprechende Ergebnisse nicht notwendigerweise auf adulte humane HSVZ übertragen werden können, wurden auch CD34<sup>+</sup> Zellen aus Apheresaten G-CSF-mobilisierter Spender und aus humanem Knochenmark untersucht (Abb. 21/22).

Ebenso wie bei Verwendung von Nabelschnurblut konnten die CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Subpopulationen unterschieden werden. Ein Großteil der CD34<sup>+</sup> Zellen aus Apheresaten trug ebenfalls CD133<sup>+</sup> auf der Zelloberfläche (Abb. 21A). Den Experimenten mit CD34<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut entsprechend reduzierte sich der Anteil dieser Fraktion nach einer Kultivierung von 50-60 h auf ca. 40% (Abb. 21B). Die Analyse von CD34<sup>+</sup> Zellen aus Knochenmark zeigte, dass der Großteil der Zellen der CD133<sup>low</sup> Fraktion zuzuordnen ist (Abb. 22A). Nach Kultivierung für 50-60 h reduzierte sich die CD133<sup>+</sup> Fraktion anteilig weiter. Weiterhin zeigte sich eine deutliche CD34-negative bzw. sehr schwach für CD34 positive Population (Abb. 22A).



**Abb. 21: Analyse von CD133-Subpopulationen in CD34<sup>+</sup> Zellen aus humanem Apheresat**

(A) Durchflusszytometrische Charakterisierung und Definition der Subpopulationen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> an CD34<sup>+</sup> Zellen aus Apheresat-Proben. Im Vergleich zu Isotyp-Kontrollmessungen (obere Reihe) können im Mittel 72% der frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen der CD133<sup>+</sup> Fraktion zugeordnet werden und 28% der CD133<sup>low</sup> Fraktion (n=5). (B) Nach Kultivierung für 50-60 h reduziert sich der Anteil der CD133<sup>+</sup> Fraktion und der Anteil der CD133<sup>low</sup> Fraktion nimmt auf durchschnittlich 60% zu (n=5). Zur besseren Beurteilung ist die CD133 Expression der CD34<sup>+</sup> Zellen jeweils auch als Histogramm darstellt. (C/D) Darstellung der Koloniebildungsfrequenzen frisch isolierter (C) und kultivierter CD34<sup>+</sup> Zellen im CFC-Ansatz (E/F) Durchflusszytometrische Analyse der erhaltenen Zellen nach Ernte aller Kolonien, für Details vgl. Abb. 20 (n=3).



**Abb. 22: Analyse von CD133-Subpopulationen in CD34<sup>+</sup> Zellen aus humanem Knochenmark**

(A) Durchflusszytometrische Charakterisierung und Definition der Subpopulationen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> an CD34<sup>+</sup> Zellen aus Knochenmark-Proben. Im Vergleich zu Isotyp-Kontrollmessungen (obere Reihe) ist der Großteil (im Mittel 38%) der frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen der CD133<sup>low</sup> Fraktion zuzuordnen (n=3). (B) Nach Kultivierung für 50-60 h reduziert sich der Anteil der CD133<sup>+</sup> Fraktion auf durchschnittlich 23% (n=3). Zur besseren Beurteilung ist die CD133 Expression der CD34<sup>+</sup> Zellen jeweils auch als Histogramm darstellt. (C/D) Darstellung der Koloniebildungsfrequenzen frisch isolierter (C) und kultivierter CD34<sup>+</sup> Zellen im CFC-Ansatz. (E/F) Durchflusszytometrische Analyse der erhaltenen Zellen nach Ernte aller Kolonien, für Details vgl. Abb. 20 (n=3).

Analog zu den vorher mit Nabelschnurblut-CD34<sup>+</sup> Zellen durchgeführten Versuchen wurden die Fraktionen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> aus Apheresat (Abb. 21) und Knochenmark (Abb. 22) jeweils direkt nach Isolierung (Abb. 21/Abb. 22C) und nach einer Kulturdauer von 50-60 (Abb. 21/Abb. 22D) in CFC-Assays untersucht. Dabei zeigte sich zu beiden Zeitpunkten sowohl bei Zellen aus Apheresat-Proben als auch bei Zellen aus Knochenmark eine deutliche Konzentration von BFU-E- und CFU-MIX-Vorläufern in den CD133<sup>low</sup> Fraktionen, während der Großteil des CFU-G- und CFU-GM-Potenzials jeweils in der CD133<sup>+</sup> Fraktion detektiert wurde. Den Analysen der Zellen aus Nabelschnurblut entsprechend war der Anteil der BFU-E- und CFU-MIX-Vorläufer bei Apheresat und Knochenmark jeweils in der CD133<sup>+</sup> Fraktion frisch isolierter Zellen höher als nach Kultivierung (Abb. 21/Abb. 22C/D). Erhaltene Daten aus CFC-Ansätzen wurden entsprechend (vgl. Abschnitt 3.2.5) mittels durchflusszytometrischer Analysen für beide Zeitpunkte verifiziert (Abb. 21/Abb. 22E/F).

Somit zeigte sich, auch wenn der relative Anteil von CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Fraktionen je nach Quelle variierte, dass die Potenziale der CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen unabhängig von der Quelle vergleichbar sind. Die CD133<sup>+</sup> Zellen aus Apheresat, Knochenmark und Nabelschnurblut enthielten jeweils den größten Anteil der CFU-GM- und CFU-G-Potenziale, während Progenitoren mit BFU-E- und CFU-MIX- Potenzial jeweils in der CD133<sup>low</sup> Fraktion stark angereichert waren.

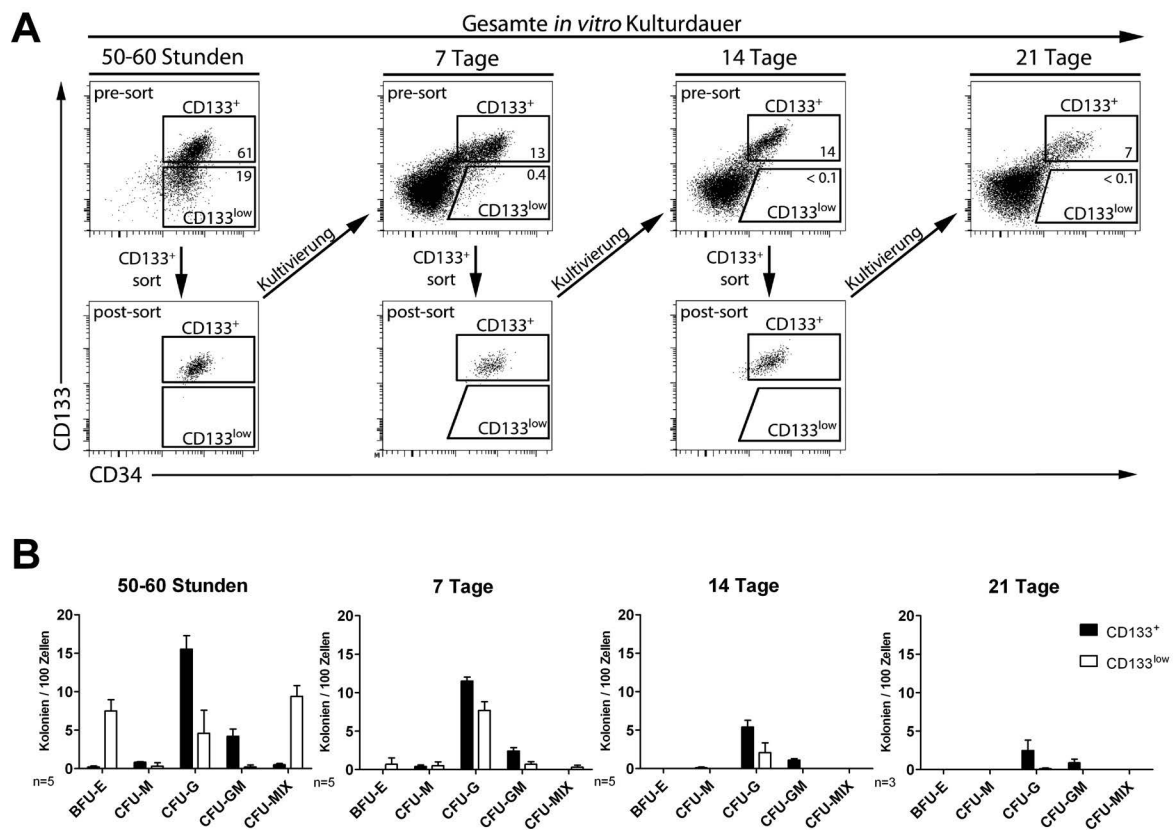
Für alle weiteren Versuche wurden in der vorliegenden Arbeit aufgrund der besseren Verfügbarkeit CD34<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut verwendet.

### **3.2.7 Sequenzielle Sortierung und Kultivierung von CD133<sup>+</sup> Zellen**

Um im Weiteren zu überprüfen, ob kultivierte CD133<sup>+</sup> Zellen möglicherweise zu primitiv sind, um rote oder gemischte Kolonien innerhalb von 14 Tagen im CFC-Ansatz hervorzubringen oder ob sie dieses Potenzial nachhaltig verloren haben, wurden CD133<sup>+</sup> Zellen über einen längeren Zeitraum kultiviert. Jeweilige Nachkommen wurden nach 50-60 h und 7, 14 und 21 Tagen als CD133<sup>+</sup> Zellen durchflusszytometrisch sortiert. Ein Teil dieser Zellen wurde in CFC-Assays eingebracht und die restlichen Zellen weiterkultiviert (Abb. 23A).



Dabei zeigte sich, dass nach Rekultivierung der sortierten  $CD133^+$  Zellen der Anteil der jeweilig bis zum nächsten Analysezeitpunkt gebildeten  $CD133^{low}$  Zellen immer weiter abnahm (Abb. 23A). Im gleichen Maße ging die Fähigkeit verloren, rote oder gemischte Kolonien zu bilden. Nach 7 Tagen bildeten sich noch vereinzelt rote und gemischte Kolonien, nach 14 Tagen keine mehr. Ebenso nach das Koloniebildungspotenzial über die Kulturzeit hinweg ab. Ab Tag 7 waren nur noch CFU-G und CFU-GM Kolonien detektierbar (Abb. 23B).



**Abb. 23: Sequenzielle Analyse von  $CD133^+$  Zellen *in vitro***

(A) Darstellung von einem für fünf unabhängig durchgeführte Experimente repräsentativen Ergebnis zur sequenziellen  $CD133^+$  Sortierung. (B) Ergebnisse der jeweils durchgeführten CFC-Ansätze (n=5).

Somit wurde bestätigt, dass  $CD133^+$  Zellen auch nach längerer *in vitro* Vorkultur nicht in der Lage sind, rote oder gemischte Kolonien zu bilden. Die Fähigkeit, unter den gewählten Kulturbedingungen Kolonien zu bilden, nahm innerhalb weniger Tage ab und war nach 7-14 Tagen nahezu komplett verloren.

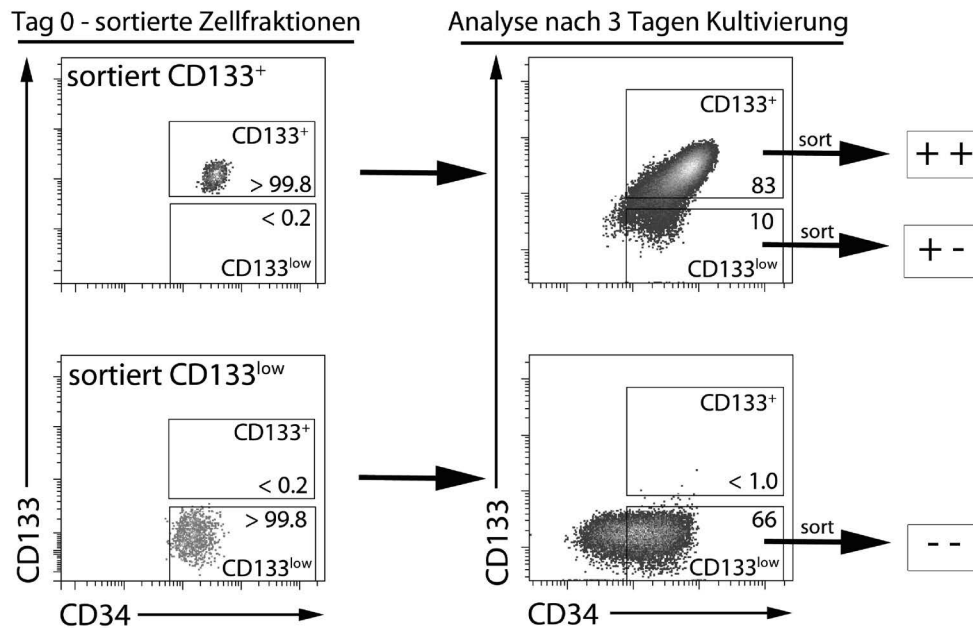
### 3.2.8 Sequenzielle Analyse der *in vitro* Entwicklung von CD34<sup>+</sup> Zellen

**Hinweis:** Die in diesem Abschnitt (3.2.8) beschriebenen Versuche wurden im Wesentlichen von Stefan Radtke (Doktorand in unserer Arbeitsgruppe) durchgeführt. Mein Anteil beschränkte sich auf die gemeinsame Konzeption der Versuche, die gemeinsame Entwicklung der Auswertungsmethodik, die gemeinsame Durchführung erster Sortierungs- und Kultivierungsversuche sowie die abschließende gemeinsame Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse.

Da bereits nach kurzer *in vitro* Expansion das in frisch isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen vorhandene Potenzial zur Bildung roter und gemischter Kolonien verloren ging und sich dann auf die CD133<sup>low</sup> Fraktion beschränkte, wurde als nächstes der Einfluss der Kultivierung auf das Differenzierungspotenzial und die CD133 Oberflächenexpression im Detail untersucht.

Dazu wurden CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, Tag 3, Tag 6) sequenziell mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert, analysiert und bis zum jeweils nächsten Zeitpunkt weiterkultiviert. Zur Vereinfachung wurden die jeweils sortierten Zellfraktionen wie folgt bezeichnet: An Tag 0 durch Sortierung isolierte CD133<sup>+</sup> Zellen wurden als (+) bezeichnet, CD133<sup>low</sup> Zellen als (-). Nach Weiterkultivierung der (+)-Fraktion bis Tag 3 konnten wiederum mittels CD133 zwei Populationen unterschieden werden, ein Teil der CD133<sup>+</sup> Zellen zeigte eine unveränderte Expression von CD133 (++), während ein Teil der CD133<sup>+</sup> Zellen im Verlauf dieser drei Tage die Expression von CD133 verlor bzw. eine verringerte Expression aufwies (+-). Die an Tag 0 mittels durchflusszytometrischer Sortierung isolierten CD133<sup>low</sup> Zellen (-) brachten nach Kultivierung bis Tag 3 keine CD133<sup>+</sup> Zellen hervor und blieben negativ für CD133. Entsprechende CD34<sup>+</sup> Zellen wurden als (--) aufgereinigt (Abb. 24).

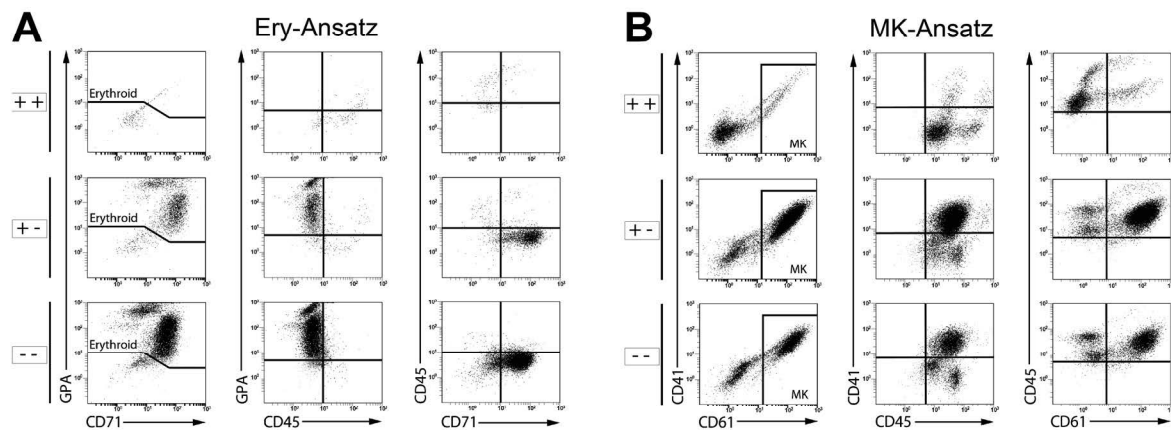
Zur weiteren Analyse der verschiedenen Subpopulationen wurden die drei an Tag 3 isolierten Subpopulationen (++), (+-) und (--) durchflusszytometrisch analysiert und direkt isoliert. Ein Teil der Zellen wurde in CFC-Assays eingebracht, der Rest weiterkultiviert. An Tag 6 wurden die entsprechenden Subpopulationen (+++), (++-), (+--) und (---) isoliert und analysiert (siehe Schema in Abb. 26A).



**Abb. 24: Darstellung der an Tag 0 und Tag 3 sortierten und analysierten Populationen**

Frisch isolierte (Tag 0) und durchflusszytometrisch sortierte CD133<sup>+</sup>(+) und CD133<sup>low</sup>(-) Zellen wurden nach einer dreitägigen Kulturdauer erneut durchflusszytometrisch analysiert. Die CD133<sup>+</sup> Fraktion (Tag 0) brachte bis Tag 3 CD133<sup>low</sup> Zellen hervor (+-), während ein Teil der Zellen nach wie vor CD133<sup>+</sup> war (++) . Kultivierte Tag 0 sortierte CD133<sup>low</sup> Zellen blieben CD133-negativ, ein Teil der Zellen verlor die Expression des Markers CD34. Entsprechend werden diese Tag 3 CD133<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen als (--) bezeichnet. Die jeweilig so gekennzeichneten Populationen (++) , (+-) und (--) wurden mittels durchflusszytometrischer Sortierung isoliert, in funktionelle Analyseverfahren überführt und übrige Zellen bis Tag 6 weiterkultiviert.

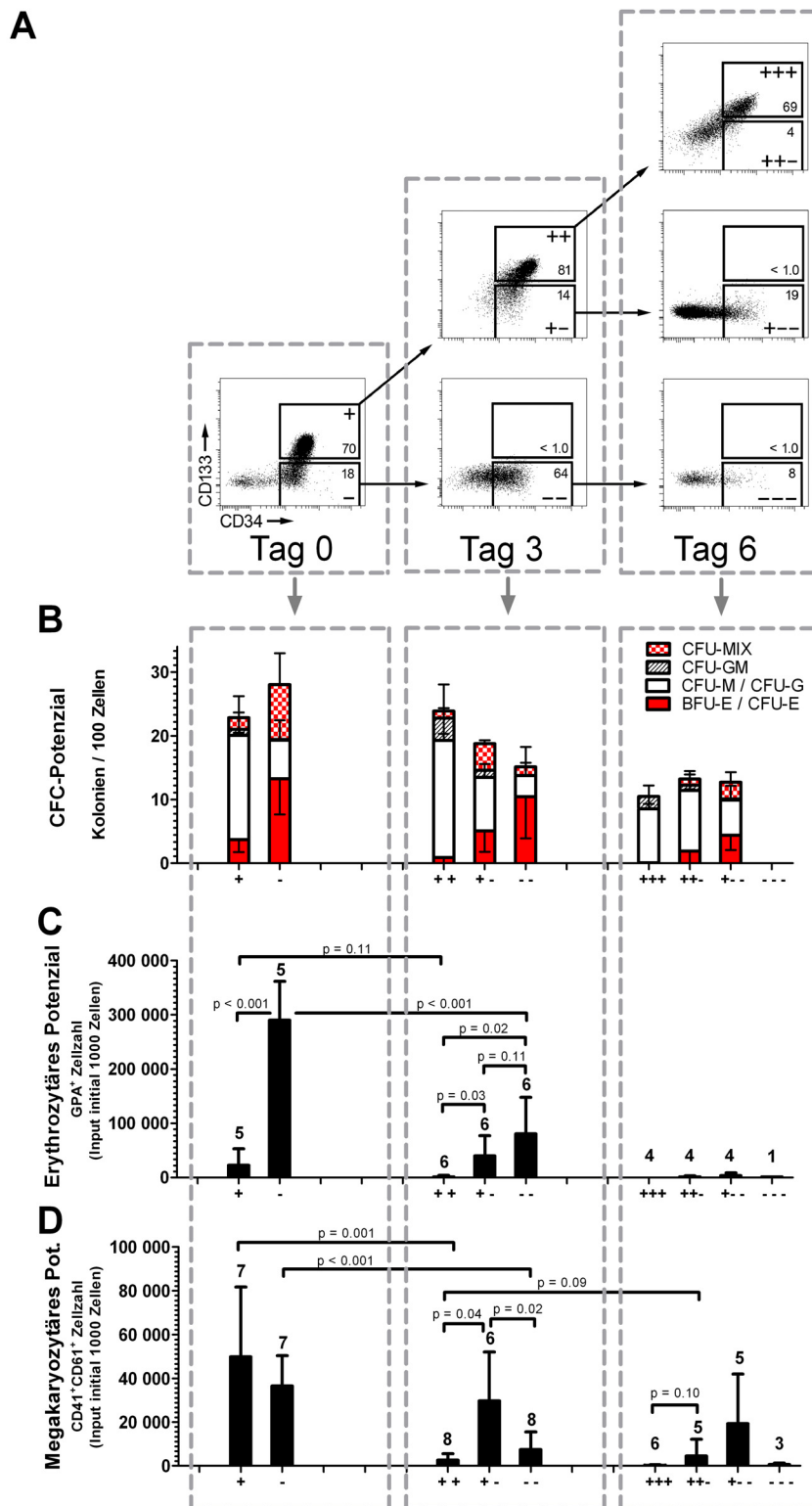
Die Analyse der auf diese Weise sortierten Zellen erfolgte jeweils in drei verschiedenen *in vitro* Ausleseverfahren: Im CFC-Ansatz, in einem erythrozytären Flüssigkultur-Differenzierungsansatz (Ery-Ansatz) und in einen megakaryozytären Flüssigkultur-Differenzierungsansatz (MK-Ansatz). Beide Ansätze ermöglichen die relative Quantifizierung der Differenzierungsfähigkeit der eingebrachten Zellen zu Erythrozyten bzw. Megakaryozyten. Der Ery-Ansatz dient der Validierung der Daten zur erythrozytären Differenzierung im CFC-Ansatz. Die MK-Ansätze wurden aufgrund der engen Linien-Verwandschaft von Megakaryozyten und Erythrozyten (Akashi *et al.*, 2000) durchgeführt. Die Bildung von erythrozytären (GPA<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>) bzw. megakaryozytären Zellen (CD41<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>) wurde jeweils in jedem Versuch durchflusszytometrisch überprüft und quantifiziert (Abb. 25).



**Abb. 25: Analyse der in Ery- und MK-Ansatz erhaltenen Zellen**

Die an Tag 3 isolierten Zellfraktionen (++) , (+-) und (--) wurden jeweils in erythrozytäre (A; Ery-Ansatz) und megakaryozytäre Differenzierungsansätze (B; MK-Ansatz) eingebracht. Nach zweiwöchiger Kulturdauer wurde durchflusszytometrisch die Expression linienspezifischer Oberflächenmarker analysiert. **(A)** Nach Durchführung des Ery-Ansatzes wurden erythrozytäre Zellen über den Immunphänotyp  $GPA^+CD71^+CD45^{low/-}$  identifiziert (*Erythroid*). **(B)** Nach Durchführung des MK-Ansatzes wurden megakaryozytäre Zellen immunphänotypisch als  $CD41^+CD61^+CD45^+$  diskriminiert (MK). Die Quantifizierung erfolgte jeweils durch Mitführen definierter Zahlen an Flow-Count *Beads* während der durchflusszytometrischen Messung.

Die Analysen des koloniebildenden Potenzials zeigte, dass an Tag 0, in Übereinstimmung mit den vorher im CFC-Ansatz erhaltenen Daten, der Großteil der Zellen mit CFU-G- und CFU-GM-Potenzial sowie wenige Zellen mit BFU-E- und CFU-MIX-Potenzial der  $CD133^+$  (+) Fraktion zuzuordnen waren. Der Großteil der Zellen mit BFU-E- oder CFU-MIX-Potenzial befand sich in der  $CD133^{low}$  (-) Fraktion. Nach Kultivierung war das BFU-E und CFU-MIX Potenzial jeweils in der neugebildeten  $CD133^{low}$  Fraktion (+-)/(++-) enthalten und ging aus der jeweiligen  $CD133^+$  (++)/(+++ ) Fraktion verloren. Das Potenzial zur Bildung von CFU-GM Kolonien blieb dagegen auch nach Kultivierung konsistent in der jeweiligen  $CD133^+$  (++)/(+++ ) Fraktion erhalten (Abb. 26B).



**Abb. 26: Sequenzielle Analyse des Differenzierungspotenzials von CD133-Subpopulationen**

(A) Schema des Versuchsaufbaues und Darstellung exemplarischer durchflusszytometrischer Messungen. (B) Koloniebildungsraten der getesteten Populationen im CFC-Ansatz (n=4). (C) Quantifizierung des erythrozytären Potenzials der im Ery-Ansatz analysierten Fraktionen, normalisiert auf 1000 eingebrachte Zellen. (D) Quantifizierung des megakaryozytären Potenzials im MK-Ansatz. Zahlen über den Balken bei C und D repräsentieren die Anzahl der durchgeführten Versuche.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen im CFC-Ansatz zeigte sich an Tag 0 ein geringes erythrozytäres Potenzial in der CD133<sup>+</sup> Fraktion (+) und das höchste erythrozytäre Potenzial in der CD133<sup>low</sup> Fraktion (-). Nach Kultivierung der sortierten Zellfraktionen bis Tag 3 war das Potenzial zur Bildung erythrozytärer Zellen in der CD133<sup>+</sup> (++) Fraktion fast nicht mehr nachweisbar (vgl. Abb. 25) und an Tag 6 in der (+++) Fraktion nicht mehr detektierbar. Das erythrozytäre Potenzial war an Tag 3 in der neugebildeten CD133<sup>low</sup> Fraktion (+-) zu finden und blieb in der (--) Fraktion erhalten. Generell war das Potenzial zur erythrozytären Entwicklung bis Tag 6 in allen Populationen fast nicht mehr nachweisbar (Abb. 26C).

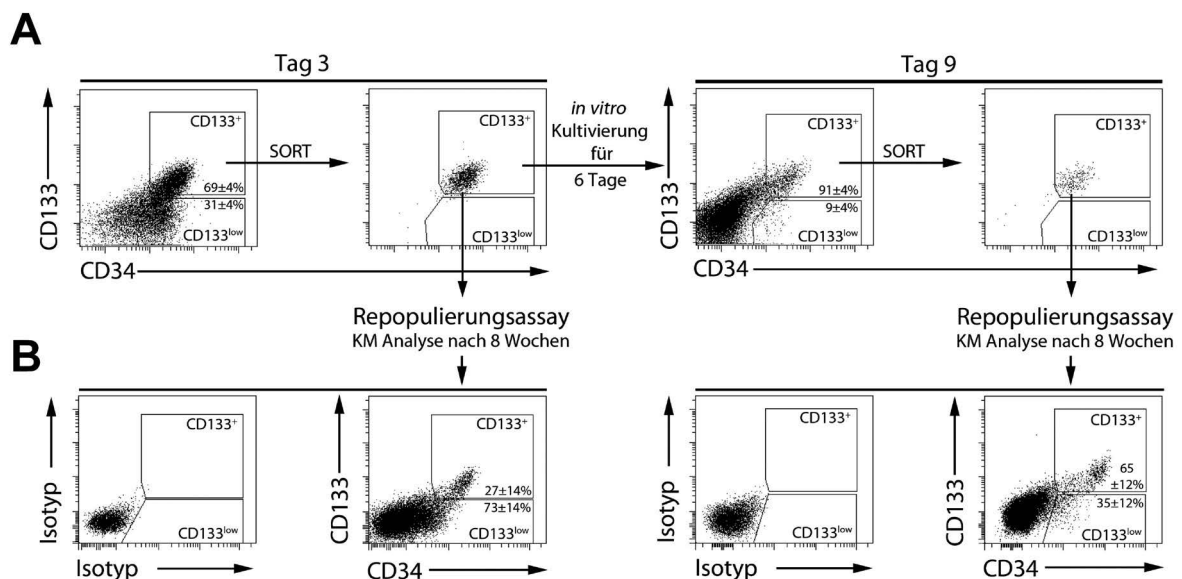
Die Quantifizierung der Megakaryozytenbildung ergab an Tag 0 für CD133<sup>+</sup> (+) und auch CD133<sup>low</sup> (-) Zellen vergleichbare Werte. Nach Kultivierung wurden allgemein deutlich geringere Werte ermittelt, im Vergleich wurden an Tag 3 die höchsten Werte in der jeweiligen CD133<sup>low</sup> Fraktion (+-)/(-- ) gemessen (vgl. Abb. 25). Auch an Tag 6 fand sich das höchste megakaryozytäre Potenzial in den CD133<sup>low</sup> (++)/(+--) Fraktionen, war aber in der CD133<sup>+</sup> (+++) Fraktion fast nicht mehr detektierbar (Abb. 26D).

Folglich gehen scheinbar Zellen mit CFU-MIX-, erythrozytärem und megakaryozytärem Potenzial im Laufe der Kultur schrittweise in der CD133<sup>+</sup> Fraktion verloren. Die Ergebnisse legen nahe, dass diese Potenziale zumindest unter den gewählten Kulturbedingungen in jeweils entstehende CD133<sup>low</sup> Zellen segregieren, während die Zellen mit CFU-GM-Potenzial in der CD133<sup>+</sup> Fraktion verbleiben. Zudem konnte gezeigt werden, dass CD133<sup>low</sup> Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen nicht in der Lage sind, CD133 zu re-exprimieren. Deshalb erscheint es fraglich zu sein, ob Zellen mit CFU-MIX (entspricht CMP) Potenzial Vorläuferzellen der Zellen mit CFU-GM (GMP) Potenzial sind.

### **3.2.9 Analyse des erythrozytären Potenzials von CD133<sup>+</sup> Zellen *in vivo***

Der im vorangegangenen Versuch ermittelte Befund, dass im Laufe der *in vitro* Kultivierung CD133<sup>+</sup> Zellen bis Tag 6 beinahe vollständig die Fähigkeit verlieren, Zellen der Megakaryozyten-Erythrozyten-Linie zu bilden, kann prinzipiell zwei mögliche Ursachen haben: Multipotente CD133<sup>+</sup> Zellen verlieren dieses Linienpotenzial tatsächlich, oder kultivierte multipotente CD133<sup>+</sup> Zellen enthalten nach wie vor das Megakaryozyten-Erythrozyten-Linienpotenzial, es kann aber unter

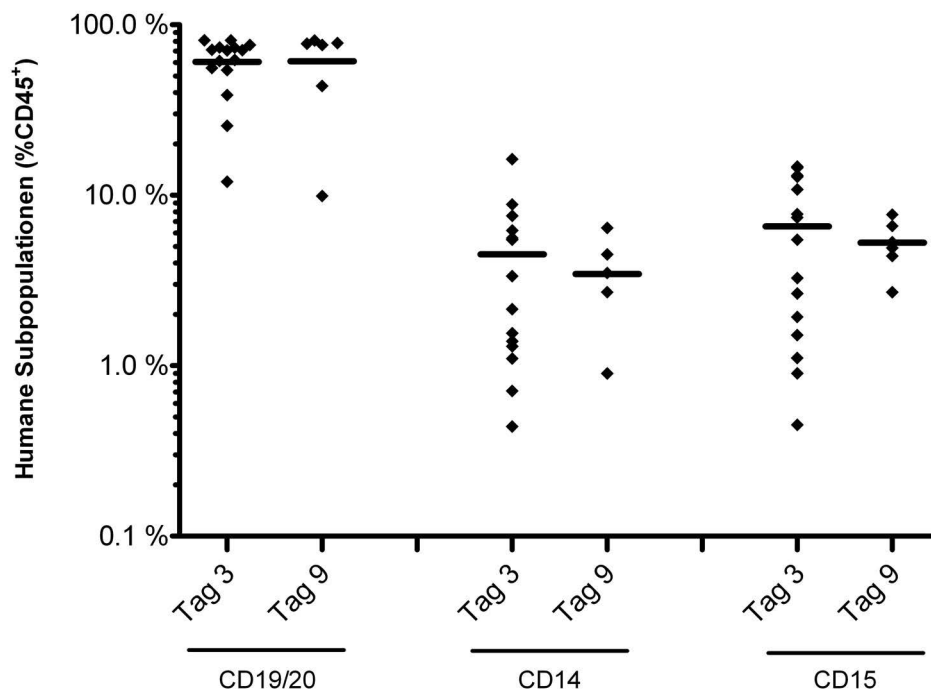
den Kulturbedingungen nicht abgerufen werden. Um zu testen, ob sich solche Potenziale *in vivo* reaktivieren lassen, wurden CD133<sup>+</sup> Zellen an Tag 3 und an Tag 9 in Maus-Repopulierungsversuchen verglichen. Die Versuche wurden mit Tag 9 Zellen durchgeführt, da *in vitro* Versuche an Tag 9 gezeigt hatten, dass ähnlich wie an Tag 6 zu diesem Zeitpunkt in der CD133<sup>+</sup> Fraktion keine erythrozytären oder megakaryozytären Zellen mehr gebildet wurden (Daten nicht dargestellt). Aufgrund limitierender CD133<sup>+</sup> Zellzahlen nach neuntägiger Kultivierung wurde für diese Versuche das NSG-Mausmodell verwendet, da laut Literatur mit höheren relativen *Engraftment*-Raten zu rechnen ist (Shultz *et al.*, 2005). An Tag 3 wurden je Maus 150.000 durchflusszytometrisch sortierte CD133<sup>+</sup> Zellen transplantiert, an Tag 9 wurden aufgrund der in der Literatur beschriebenen 10-15-fach höheren benötigten Zellzahl (Ito *et al.*, 2010)  $2 \times 10^6$  sortierte CD133<sup>+</sup> Zellen je Maus transplantiert (Abb. 27A).



**Abb. 27: Vergleich von CD133<sup>+</sup> Zellen an Tag 3 und Tag 9 im NSG-Mausmodell**

**(A)** An Tag 3 wurden durchflusszytometrisch sortierte CD133<sup>+</sup> Zellen in NSG-Mäuse transplantiert und übrige Zellen bis Tag 9 weiterkultiviert. An Tag 9 wurden wiederum CD133<sup>+</sup> Zellen durchflusszytometrisch sortiert und in weitere NSG-Mäuse transplantiert. **(B)** Im Knochenmark der Mäuse konnten nach 8 Wochen jeweils neben reifen humanen Blutzellen (vgl. Abb. 28) auch CD34<sup>+</sup> Zellen gefunden werden. Die Darstellung zeigt die Einteilung der CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Populationen sowie die Quantifizierung der Anteile an der CD34<sup>+</sup> Population im Knochenmark der Mäuse an Tag 3 und Tag 9.

Nach 8 Wochen wurde das Knochenmark der Mäuse entsprechend durchflusszytometrisch analysiert. Sowohl in mit Tag 3 als auch in mit Tag 9 CD133<sup>+</sup> Zellen transplantierten Mäusen konnte ein Multi-Linien-*Engraftment* zwischen 0,5 und 9% beobachtet werden. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede in der Qualität nachgewiesener reifer humaner Subpopulationen (Abb. 28). Neben B-Zellen, monozytären Zellen und Granulozyten wurden in allen erfolgreich repopulierten Mäusen humane CD34<sup>+</sup> Zellen detektiert (Abb. 27B). Das Knochenmark von mit Tag 3 CD133<sup>+</sup> Zellen transplantierten Mäusen enthielt einen deutlich höheren Anteil an CD133<sup>low</sup> Zellen als das der mit Tag 9 CD133<sup>+</sup> Zellen transplantierten Mäuse (Abb. 27B).

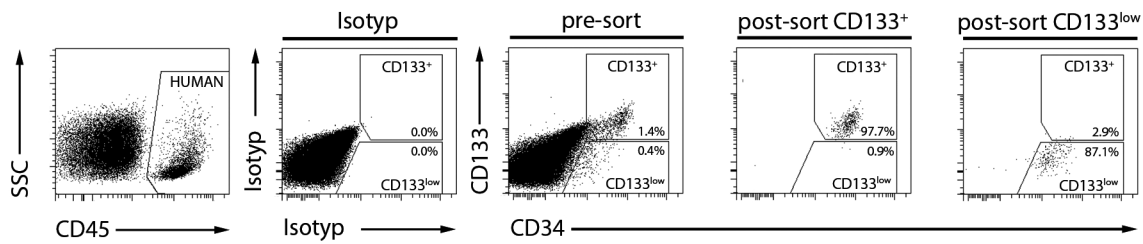


**Abb. 28: Analyse des Multi-Linien-Engraftments in NSG-Mäusen**

Quantifizierung des Multi-Linien-*Engraftments* im Knochenmark von mit Tag 3 CD133<sup>+</sup> und Tag 9 CD133<sup>+</sup> Zellen transplantierten Mäusen auf Basis durchflusszytometrischer Messungen mittels humanspezifischer Antikörper (CD19/20: B-Zellen; CD14: monozytäre Zellen; CD15: Granulozyten).

Da allgemein in NOD/SCID- oder NSG-Mäusen die Reifung humaner erythrozytärer Zellen nicht ausreichend unterstützt wird, um eindeutige Aussagen über das Vorhandensein bzw. Fehlen dieses Linienpotenzials treffen zu können (Mazurier *et al.*, 2003; Manz, 2007), erfolgte die Analyse *in vitro*. Folglich wurden beide humanen CD133-Subpopulationen aus dem Knochenmark der jeweiligen Mäuse durchflusszytometrisch sortiert (Abb. 29) und in CFC-Assays eingebracht.

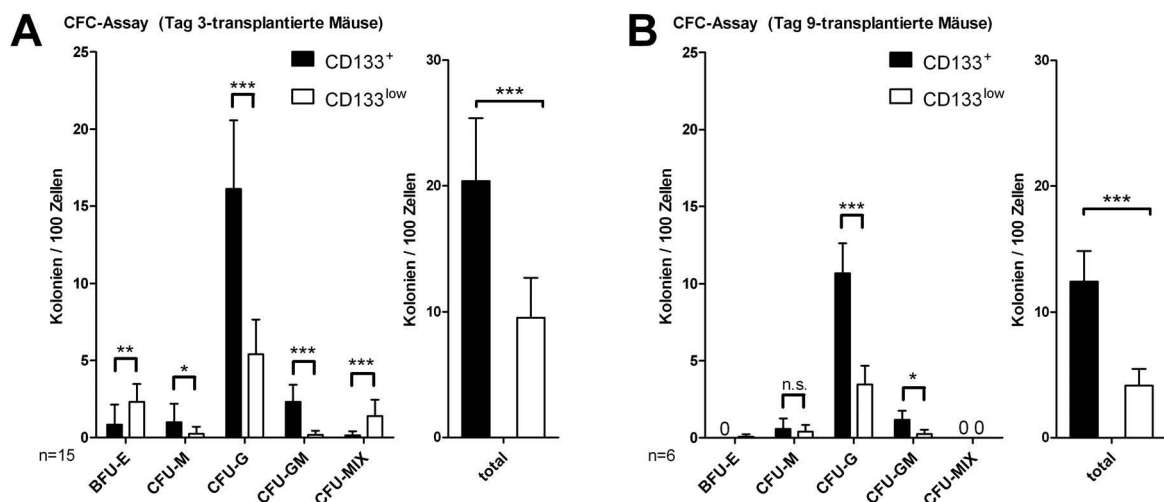




**Abb. 29: Durchflusszytometrische Sortierung humaner CD133-Subpopulationen aus dem Knochenmark repopulierter NSG-Mäuse**

Durchflusszytometrischen Sortierung von CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen aus dem Knochenmark repopulierter NSG-Mäuse sowie Re-Analysen nach erfolgter Sortierung.

Während die Nachkommen der Tag 3 CD133<sup>+</sup> Zellen, insbesondere die CD133<sup>low</sup> Fraktion, BFU-E und CFU-MIX Kolonien bildeten (Abb. 30A), fanden sich solche Kolonien nicht in den CFC-Ansätzen mit CD34<sup>+</sup> Zellen aus Tag 9 CD133<sup>+</sup> transplantierten Mäusen. In 6 unabhängigen Versuchen zeigte sich nur in einem Versuch eine BFU-E Kolonie in der CD133<sup>low</sup> Fraktion (Abb. 30B). Zudem war generell die Frequenz der Zellen mit Koloniebildungspotenzial bei aus Tag 9-transplantierten Mäusen sortierten Zellen geringer als in den Mäusen, die mit Tag 3 Zellen transplantiert worden waren (Abb. 30B).

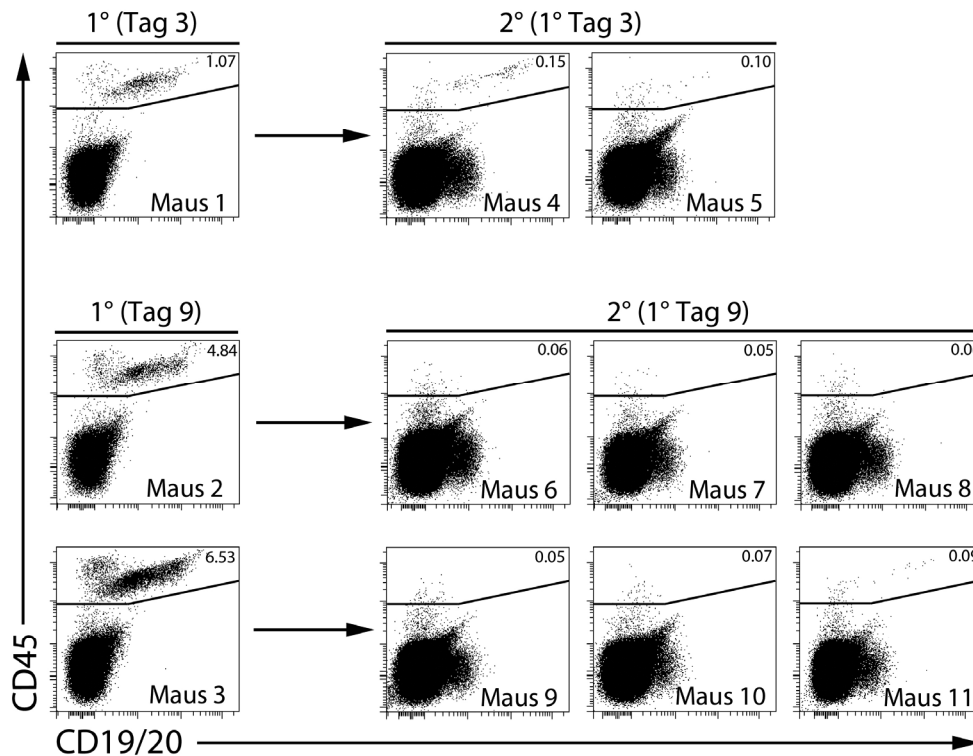


**Abb. 30: Koloniebildungsfrequenzen von aus Maus-Knochenmark isolierten humanen CD34<sup>+</sup> Zellen**

Koloniebildungsraten im CFC-Ansatz nach durchflusszytometrischer Sortierung von CD34<sup>+</sup> Subpopulationen aus dem Knochenmark von mit Tag 3 CD133<sup>+</sup> Zellen (A) bzw. mit Tag 9 CD133<sup>+</sup> Zellen (B) repopulierten NSG-Mäusen.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, dass nach einer neuntägigen Kultivierung CD133<sup>+</sup> Zellen vollständig die Fähigkeit verlieren, CFU-MIX und erythrozytäre Potenziale zu realisieren. Die Fähigkeit, NSG-Mäuse zu repopulieren und nach klassischen Maßstäben eine myeloische und lymphatische Linien-Entwicklung zu initiieren, bleibt allerdings erhalten.

Es stellte sich die Frage, ob die ausgelesenen Tag 9 CD133<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu klassisch definierten SCID-repopulierenden Zellen weitere Eigenschaften verloren haben. Die primitivsten humanen hämatopoetischen Zellen mit Stammzeleigenschaften sollten aufgrund ihres Selbsterneuerungspotenzials nach erfolgter Repopulierung primärer Mäuse auch die Fähigkeit haben, nach Transplantation in sekundäre Empfängermäuse auch deren Knochenmark zu besiedeln. Deshalb wurde in einem Versuch vergleichend das Knochenmark von mit Tag 3 bzw. Tag 9 CD133<sup>+</sup> Zellen repopulierten Mäusen in sekundäre Empfängertiere transplantiert. Nach Transplantation des Knochenmarks einer initial mit Tag 3 CD133<sup>+</sup> Zellen transplantierten Maus in zwei sekundäre Empfängermäuse konnten nach einem Zeitraum von 8 Wochen 0,1% bzw. 0,15% humane Zellen im Knochenmark der Mäuse detektiert werden (Abb. 31). Nach Transplantation des Knochenmarks von zwei primär mit Tag 9 CD133<sup>+</sup> Zellen repopulierten Mäusen konnte hingegen im Knochenmark von insgesamt 6 sekundären Mäusen kein Anteil humaner Zellen über 0,1% detektiert werden (Abb. 31), obwohl in beiden primär repopulierten Mäusen deutlich höhere Anteile humaner Zellen im Knochenmark detektiert worden waren (Abb. 31, Maus 2 und 3). Generell war in diesen Versuchen der Anteil der humanen Zellen im Knochenmark der sekundär transplantierten Zellen zu gering, um verschiedene hämatopoetische Linien quantitativ zu analysieren, da der Anteil der humanen Zellen nach sekundärer Transplantation um den Faktor 5-10 sinkt und der Großteil humaner Zellen nach Maus-Repopulierung B-Zellen bzw. B-Zell-Vorläufer sind (Notta *et al.*, 2009; Doulatov *et al.*, 2012).



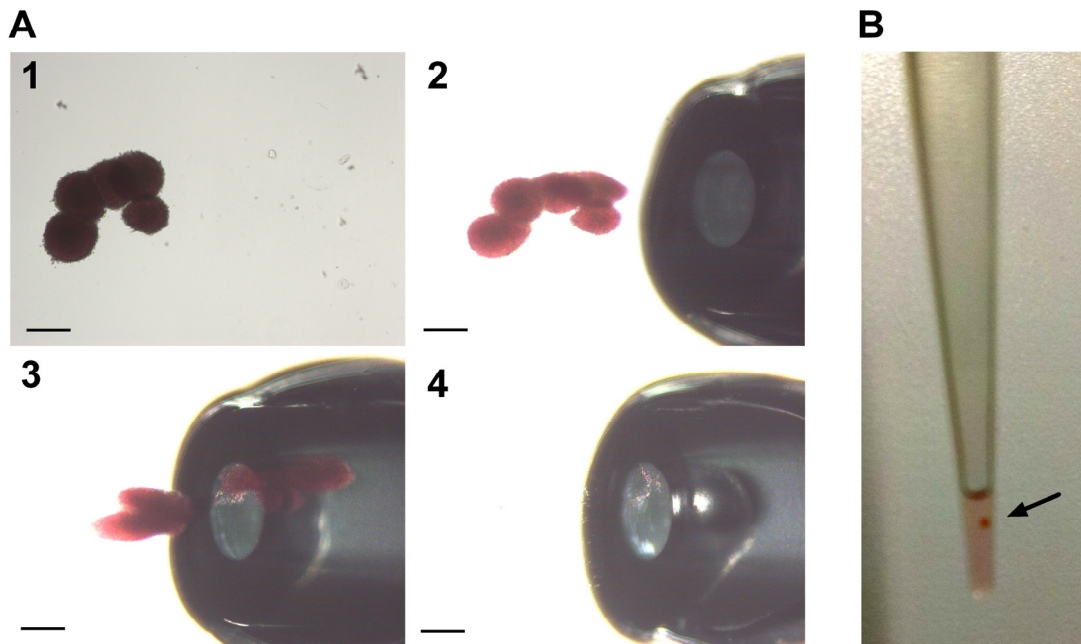
**Abb. 31: Sekundäre Transplantation von Knochenmark im NSG-Mausmodell**

Durchflusszytometrische Analyse des Gehaltes humaner Zellen ( $CD45^+$ ) im Knochenmark von NSG-Mäusen. Das Knochenmark primär repopulierter Mäuse ( $1^\circ$ ) wurde in sekundäre Empfängermäuse ( $2^\circ$ ) transplantiert und nach 8 Wochen das Knochenmark der Mäuse analysiert. Nach sekundärer Transplantation des Knochenmarks ( $1 \times 10^7$  Zellen je Maus) einer primär mit Tag 3  $CD133^+$  Zellen repopulierten Maus (Maus 1) konnten in beiden sekundären Mäusen (Maus 4 und 5) mehr als 0,1% humane  $CD45^+$  Zellen detektiert werden. Nach Transplantation von Knochenmark ( $1 \times 10^7$  Zellen je Maus) von primär mit Tag 9  $CD133^+$  Zellen repopulierten Mäusen (Maus 2 und 3) konnte in insgesamt 6 sekundären Empfängertieren kein humanes Engraftment nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die  $CD133^+$  Zellen, die nach neuntägiger Kultur noch in der Lage sind, NSG-Mäuse zu repopulieren, das Potenzial zur Bildung von Zellen der erythrozytären Linie verloren haben. Zudem scheint ihr sekundäres Repopulierungspotenzial eingeschränkt zu sein.

### 3.2.10 Immunphänotypisierung von Granulozyten in einzelnen hämatopoetischen Kolonien

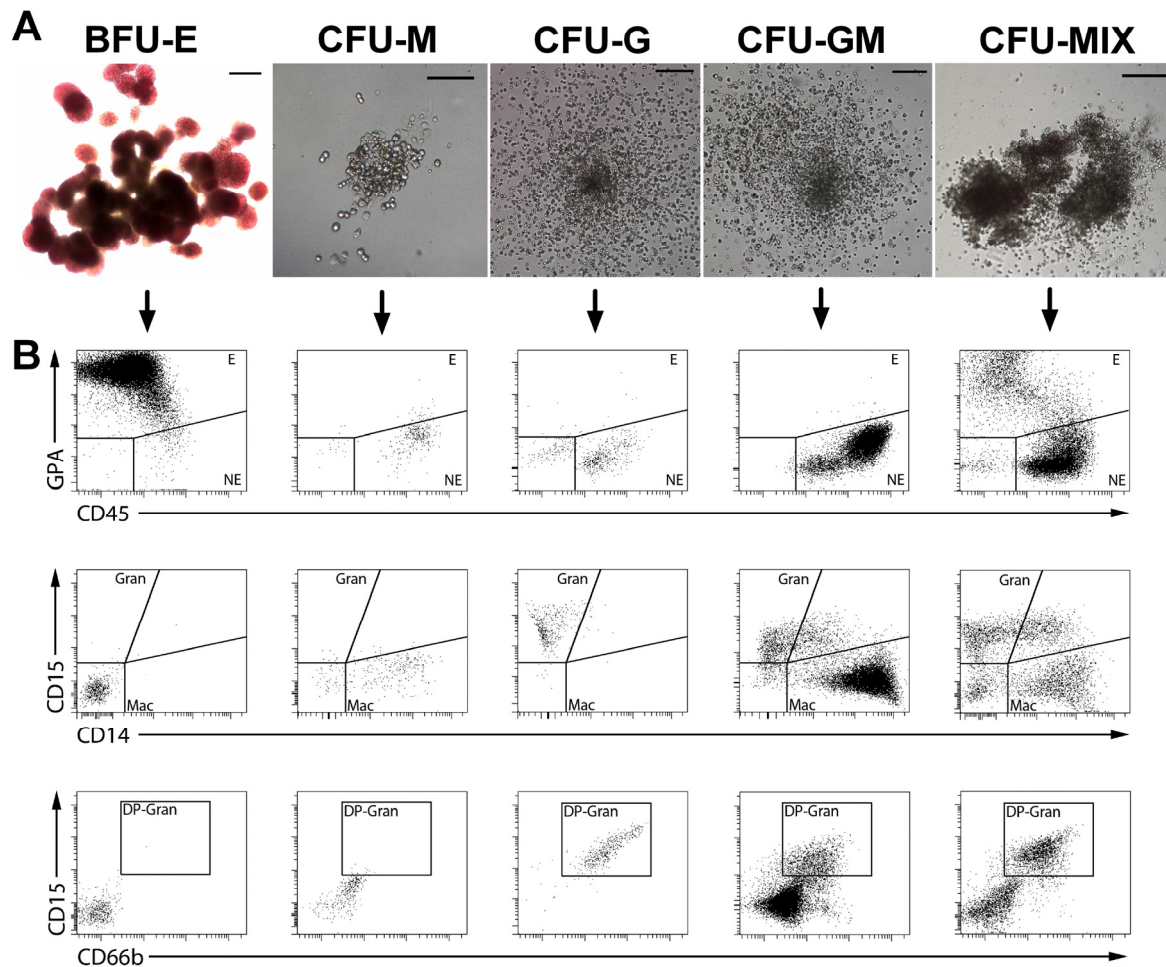
Die bislang erhobenen Daten implizieren, dass sich  $CD133^+$  Zellen mit CFU-GM und  $CD133^{\text{low}}$  Zellen mit CFU-MIX Potenzial aus unabhängigen hämatopoetischen Linien entwickeln. Da beide Vorläuferzellen definitionsgemäß Granulozyten hervorbringen, wurden als nächstes die jeweilig entstehenden Granulozyten in  $CD133^+$  und  $CD133^{\text{low}}$  Zellen genauer analysiert.



**Abb. 32: Isolierung einzelner hämatopoetischer Kolonien aus CFC-Ansätzen**

(A) Zur Isolierung einzelner hämatopoetischer Kolonien aus CFC-Ansätzen wurden diese unter Sichtkontrolle am Mikroskop aus der Methylzellulose gesaugt (Pipettenspitze jeweils rechts im Bild sichtbar; Darstellung zeigt die Isolierung einer kleinen BFU-E Kolonie; Maßstabsbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ ). (B) Fotografische Abbildung einer eingesaugten Kolonie in einer Standard-Pipettenspitze.

Für initiale Versuche wurden von 50-60 h kultivierten und anschließend durchflusszytomtrisch sortierten  $\text{CD133}^+$  und  $\text{CD133}^{\text{low}}$  Zellen im CFC-Ansatz hervorgebrachte Kolonien einzeln analysiert. Um bei diesen Versuchen sicherzustellen, dass tatsächlich einzelne Kolonien und damit die Nachkommen einer einzigen Zellen analysiert werden, wurden die sortierten Zellen in deutlich geringerer Dichte im CFC-Ansatz ausgesät. Nach 14 Tagen wurden unter Sichtkontrolle am Mikroskop Einzelkolonien aus der Methylzellulose pipettiert (Abb. 32) und nach Dissoziation durchflusszytomtrisch analysiert. Zur Kontrolle wurden alle verschiedenen diskriminierbaren Kolonietypen (Abb. 33A) mit Hilfe linienspezifischer Marker analysiert (Abb. 33B). Es zeigte sich, dass in allen Granulozyten-enthaltenden Kolonien (CFU-G, CFU-GM und CFU-MIX) Zellen zu finden waren, die für die Granulozyten-spezifischen Marker CD15 und CD66b positiv waren (Abb. 33B).

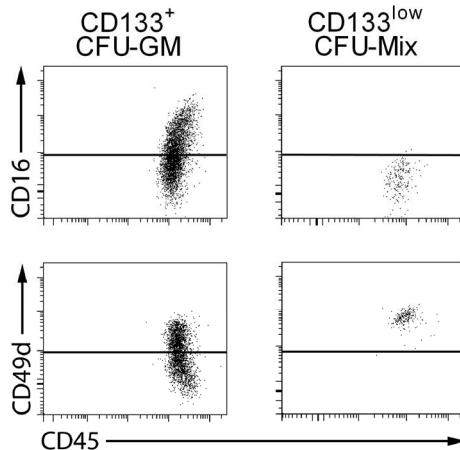


**Abb. 33: Immunphenotypische Charakterisierung hämatopoetischer Kolonien**

(A) Darstellung von im CFC-Ansatz diskriminierbaren Kolonietypen (Maßstabsbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ ). (B) Durchflusszytometrische Charakterisierung einzeln isolierter Kolonien mit Hilfe linienspezifischer Marker. Nach Abgrenzung erythrozytärer Zellen (E;  $\text{GPA}^+\text{CD45}^{\text{low/-}}$ ) von nicht erythrozytären Zellen (NE;  $\text{GPA}^+\text{CD45}^+$ ) wurden enthaltene Leukozyten mit Hilfe der Marker CD14 (Makrophagen) sowie CD15 und CD66b (Granulozyten) diskriminiert. In allen Granulozyten-enthaltenen Kolonien (CFU-G, CFU-GM, CFU-MIX) waren alle Granulozyten doppelt-positiv für beide Granulozytenmarker (DP-Gran).

Bezüglich der Marker CD15 und CD66b konnten sonst keine Unterschiede hinsichtlich der Komposition der Granulozyten aus den verschiedenen Kolonien (CFU-GM, CFU-G, CFU-MIX) gefunden werden, folglich enthalten entweder alle Kolonietypen gleiche Granulozytenarten, oder es sind weitere Marker nötig, um Unterschiede feststellen zu können. Vor diesem Hintergrund wurde die Expression weiterer Granulozyten-assoziiertes Marker (CD9, CD16, CD49d, CD116, CD125, CD166 and CD294) exemplarisch an  $\text{CD133}^+$  CFU-GM und  $\text{CD133}^{\text{low}}$  CFU-MIX

Kolonien analysiert. Von allen getesteten Markern zeigten nur die Marker CD49d und CD16 konsistente Unterschiede zwischen den Granulozyten beider Kolonietypen. In 9 von 9 untersuchten CFU-GM Kolonien wurden CD16<sup>+</sup>/CD49d<sup>-</sup> Granulozyten gefunden, während in keiner von 9 getesteten CFU-MIX Kolonien Zellen dieses Immunphänotyps detektierbar waren (Abb. 34).



**Abb. 34: Identifikation immunphänotypisch unterschiedlicher Granulozyten in CFU-GM- und CFU-MIX Kolonien**

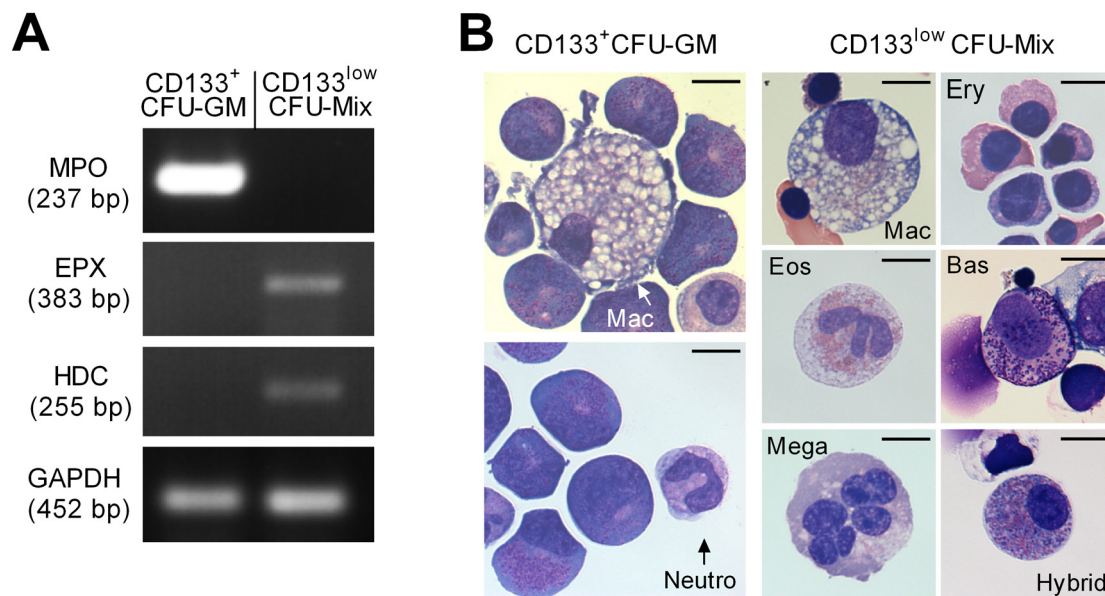
Expression der identifizierten Marker CD16 und CD49d auf Granulozyten aus CD133<sup>+</sup> CFU-GM- und CD133<sup>low</sup>-CFU-MIX Kolonien (n=9).

Bei Granulozyten gilt CD16 als ein Neutrophil-spezifischer Marker. Hingegen wird CD49d auf Eosinophilen und Basophilen, aber nicht auf Neutrophilen exprimiert (Huizinga *et al.*, 1988; Lukens *et al.*, 2010). Dieser Definition entsprechend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Neutrophile nur von Zellen der CD133<sup>+</sup> Population gebildet werden können. Da die Expression bestimmter linienspezifischer Oberflächenmarker nach *in vitro* Differenzierung gegenüber dem normalen, z.B. in humanem peripheren Blut zu findenden Immunphänotyp der Zellen verändert sein kann, wurden zwei weitere Methoden zur Verifizierung eingesetzt.

### 3.2.11 Analyse der Granulozytenkomposition hämatopoetischer Kolonien

Neben der Expression spezifischer Oberflächenmarker ist auch die Expression spezifischer, funktionsrelevanter Enzyme für die jeweiligen humanen Granulozyten-Subtypen charakteristisch. Neutrophile exprimieren das Enzym Myeloperoxidase (MPO), Eosinophile die Eosinophil-Peroxidase (EPX) und Basophile Histidin-Decarboxylase (HDC) (Mori *et al.*, 2009). Dementsprechend wurde zur Verifizierung der durchflusszytometrischen Analysen die Expression dieser drei Enzyme in Zellen

aus CFU-GM und CFU-MIX Kolonien, die jeweils von 50-60 h kultivierten CD133<sup>+</sup> (CFU-GM) bzw. CD133<sup>low</sup> (CFU-MIX) Zellen gebildet worden waren, mittels RT-PCR analysiert. In Proben aus CFU-GM Kolonien konnte die Expression von MPO, aber nicht von EPX oder HDC nachgewiesen werden. Dagegen fanden sich in Zellen aus CFU-MIX Kolonien keine Transkripte für MPO, aber für EPX und HDC (Abb. 35A). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den Granulozyten in CFU-GM Kolonien ausschließlich um neutrophile Granulozyten handelt und CFU-MIX Kolonien nur Eosinophile und Basophile enthalten.



**Abb. 35: Nachweis von Granulozyten-Subtypen in CFU-MIX und CFU-GM Kolonien**

**(A)** Nachweis Granulozyten-Subtyp spezifisch exprimierter Transkripte mittels RT-PCR zur Analyse der Granulozyten-Komposition in CD133<sup>+</sup> CFU-GM- und CD133<sup>low</sup> CFU-MIX-Kolonien. MPO wird von neutrophilen, EPX von eosinophilen und HDC von basophilen Granulozyten exprimiert (Mori *et al.*, 2009). **(B)** Qualitative Diskriminierung hämatopoetischer Zellen in CFC-Kolonien mittels hämatologischer Färbung nach Wright (Mac: Makrophage; Neuro: Neutrophiler; Ery: erythrozytäre Zellen; Eos: Eosinophiler; Bas: Basophiler; Mega: Megakaryozyt; Hybrid: Hybrid-Granulozyt; Maßstabsbalken entspricht 10 μm).

Zur genaueren Untersuchung wurden Zellen aus beiden Kolonietypen mittels Zytospin auf Objektträger gebracht, gefärbt und mikroskopisch begutachtet. Die Zellen in CFU-GM Kolonien bestanden neben einigen nicht ausgereiften myeloischen Zellen aus Makrophagen und stabkernigen Neutrophilen, in drei unabhängigen Versuchen wurden weder Eosinophile noch Basophile gefunden. CFU-MIX Kolonien



enthielten dagegen eosinophile und basophile Granulozyten und auch erythrozytäre Zellen sowie Makrophagen und wenige megakaryozytäre Zellen. Zudem enthielten CFU-MIX Kolonien Granulozyten mit eosinophilen und basophilen Granula (Abb. 35B). Das Vorkommen solcher eosinophilen/basophilen Hybrid-Granulozyten im humanen Blut und Knochenmark wurde in der Literatur bereits beschrieben (Poch *et al.*, 1973; Boyce *et al.*, 1995) und als Hinweis auf mögliche Basophilen-Eosinophilen-Vorläufer gewertet (Denburg *et al.*, 1985).

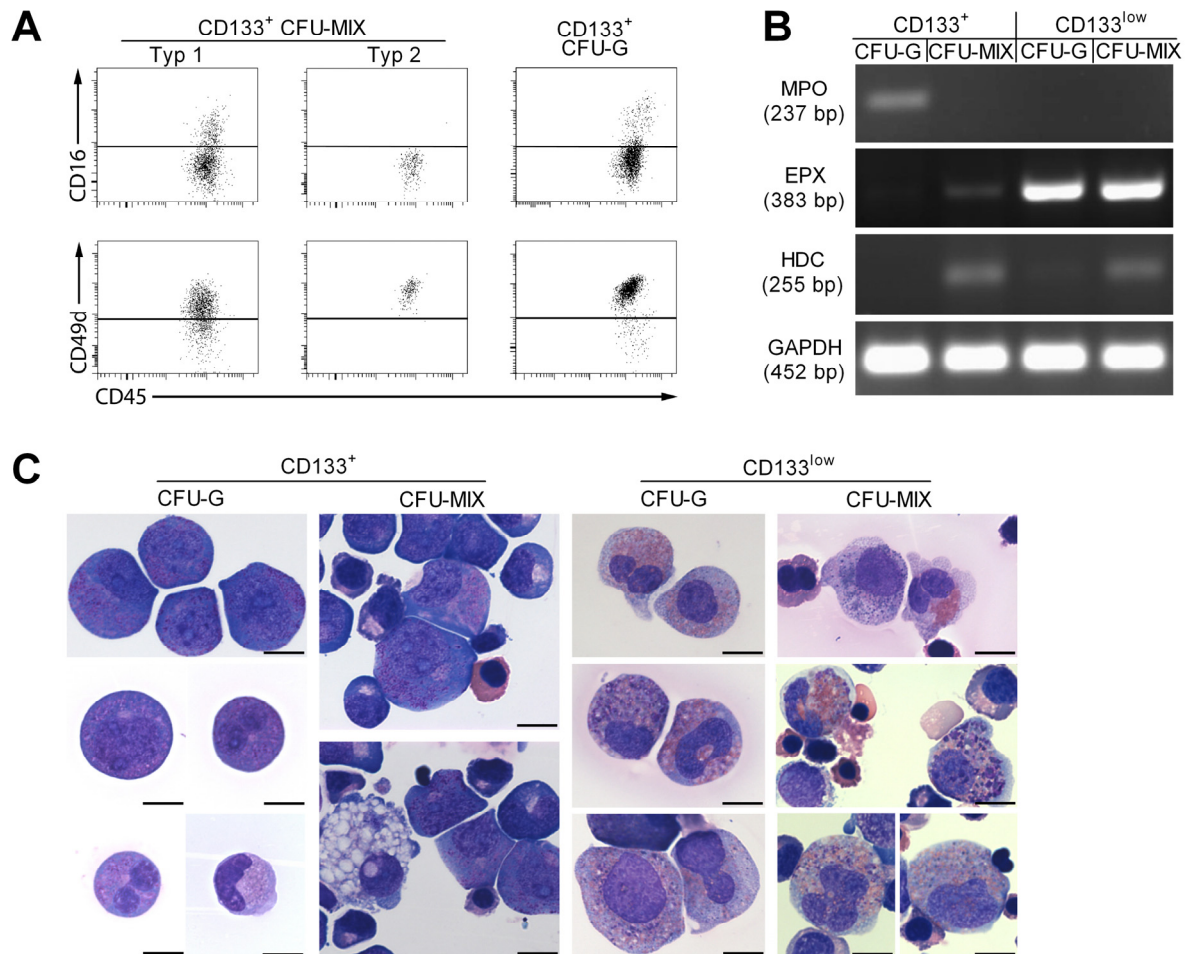
### 3.2.12 Analyse von durch frisch isolierte HSVZ gebildeten Kolonien

In den vorangegangenen Analysen wurden jeweils von für 50-60 h kultivierten Zellen gebildete Kolonien analysiert. Um genauer aufzuklären, welche Granulozyten im Besonderen die von Tag 0 CD133<sup>+</sup> Zellen gebildeten CFU-MIX Kolonien enthalten, wurden die Versuche entsprechend auf von Tag 0 Zellen gebildete Kolonien ausgedehnt. Dazu wurden aus frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen durchflusszymetrisch CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen sortiert, in CFC-Assays eingebracht und die in CFU-G und CFU-MIX Kolonien enthaltenen Granulozyten in beiden Fraktionen analysiert.

In durchflusszytometrischen Analysen enthielten 12 von 12 CD133<sup>+</sup> CFU-G Kolonien CD16<sup>+</sup>/CD49d<sup>-</sup> Granulozyten (Abb. 36A). In keiner der CD133<sup>low</sup> CFU-G Kolonien (n=9) fanden sich Zellen dieses Immunphänotyps (Daten nicht dargestellt). Anschließend wurden die von Tag 0 CD133<sup>+</sup> Zellen gebildeten CFU-MIX Kolonien analysiert (4 Nabelschnurblute, n=19 Kolonien). In 4 von 19 Kolonien wurden CD16<sup>+</sup>/CD49d<sup>-</sup> Zellen detektiert (Abb. 36A), aber in keiner der von CD133<sup>low</sup> Zellen gebildeten CFU-MIX Kolonien (nicht dargestellt).

Bei RT-PCR Analysen zur Detektion Granulozyten-spezifischer Transkripte konnte MPO nur in von CD133<sup>+</sup> Zellen gebildeten CFU-G Kolonien detektiert werden. In Zellen aus CD133<sup>low</sup> CFU-G Kolonien konnten Transkripte für EPX und eine schwache HDC-Expression nachgewiesen werden (Abb. 36B). In Zellen aus CFU-MIX Kolonien beider CD133 Fraktionen wurden nur EPX und HDC detektiert, wobei der EPX-Expressionsnachweis in allen Versuchen mit Zellen aus der CD133<sup>low</sup> Fraktion deutlich stärker ausfiel (Abb. 36B).





**Abb. 36: Granulozytenkomposition in durch Tag 0 Zellen gebildeten Kolonien**

**(A)** Expression der Marker CD16 und CD49d auf Granulozyten aus CD133<sup>+</sup> CFU-G und CFU-MIX Kolonien. CD16<sup>+</sup>/CD49d<sup>-</sup> Granulozyten wurden in allen CFU-G (n=12) und 4 von 19 CFU-MIX Kolonien gefunden (Typ 1). **(B)** Nachweis spezifisch von Granulozyten-Subtypen exprimierten Transkripten mittels RT-PCR (vgl. Abb. 35). **(C)** Qualitative Diskriminierung von in CFC-Kolonien enthaltenen Zelltypen mittels hämatologischer Färbung nach Wright (Maßstabsbalken entspricht 10 µm).

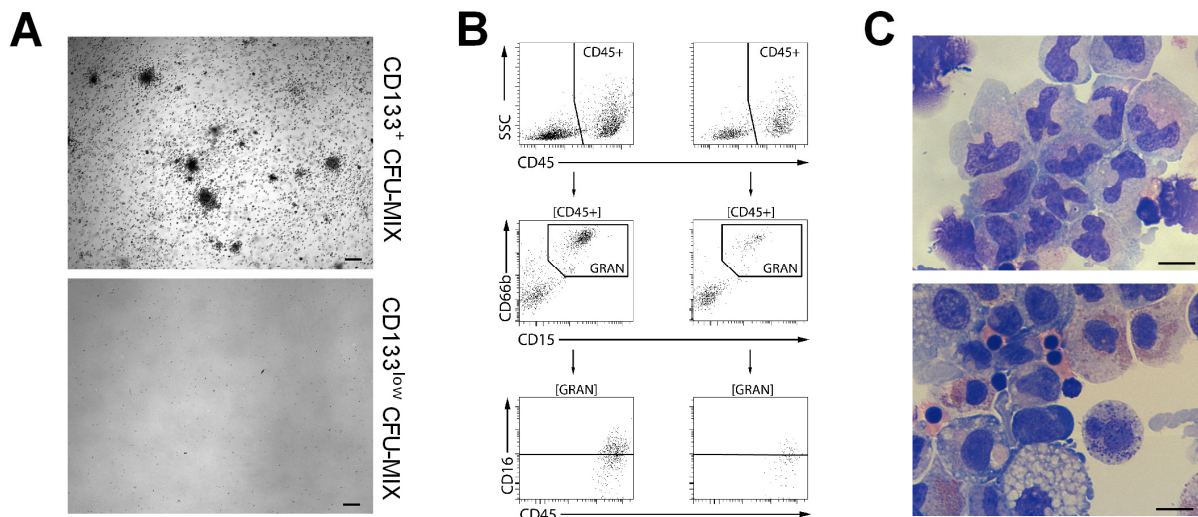
Nach hämatologischer Färbung der Zellen aus den jeweiligen Kolonien wurden neutrophile Granulozyten ausschließlich in CFU-G Kolonien der CD133<sup>+</sup> Fraktion gefunden. CD133<sup>low</sup> CFU-G Kolonien enthielten hingegen eosinophile und basophile Granulozyten sowie Hybrid-Granulozyten mit eosinophilen und basophilen Granula (Abb. 36C). Hybrid-Granulozyten wurden neben Eosinophilen, Basophilen, Makrophagen und wenigen megakaryozytären Zellen auch in von frisch isolierten CD133<sup>low</sup> Zellen gebildeten CFU-MIX Kolonien gefunden. In CFU-MIX Kolonien frisch isolierter CD133<sup>+</sup> Zellen fanden sich keine Neutrophilen und mit Ausnahme von Makrophagen und erythrozytären Zellen eher unreifere Zellen (Abb. 36C).

### 3.2.13 Erweiterte Analyse von CD133<sup>+</sup> Zellen mit CFU-MIX Potenzial

Die Analysen der Granulozyten aus Kolonien frisch isolierter Zellen bestätigen grundsätzlich die zuvor beschriebene Trennung granulozytärer Potenziale zwischen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Fraktion. CD133<sup>+</sup> Kolonien enthielten neutrophile und die von CD133<sup>low</sup> Zellen gebildeten Kolonien basophile und eosinophile Granulozyten. Mit Ausnahme der CD133<sup>+</sup> CFU-MIX Kolonien war das jeweilige Potenzial exklusiv auf die entsprechende Population beschränkt, d. h. Neutrophile wurden immer nur in CD133<sup>+</sup> Kolonien und Eosinophile/Basophile in CD133<sup>low</sup> Kolonien gefunden. Da nur ca. ¼ der von CD133<sup>+</sup> Zellen gebildeten CFU-MIX Kolonien CD16<sup>+</sup>/CD49d<sup>-</sup> Zellen enthielt, eosinophil- und basophil-spezifische Transkripte detektierbar waren und da diese Kolonien fast nur unreife Zellen enthielten, könnte das bedeuten, dass CD133<sup>+</sup> Zellen mit CFU-MIX Potenzial sehr unreife Zellen sind, die innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen nicht ausreifen können.

Um demzufolge zu testen, ob CD133<sup>+</sup> (Tag 0) CFU-MIX Kolonien sekundäre Kolonien bilden können und dabei eine weitere Reifung erfolgt, wurden einzelne Kolonien nach 14 Tagen geerntet, vereinzelt und erneut in CFC-Ansätzen ausplattiert. Im Laufe von 12 Tagen entwickelten sich in 16 von 16 Fällen viele (>50) sekundäre myeloische Kolonien (hauptsächlich CFU-G und CFU-M) sowie vereinzelt (im Mittel 2-3 je replattierter Kolonie) erythrozytäre oder CFU-MIX Kolonien (Abb. 37A). Alle Zellen jeweiliger Ansätze wurden zur Analyse der enthaltenen Granulozyten-Subtypen geerntet. Zur Kontrolle wurden analog CD133<sup>low</sup> Tag 0 CFU-MIX Kolonien replattiert, diese brachten keine sekundären Kolonien hervor (n=10) (Abb. 37A).

Die durchflusszytometrische Analyse der nach Replattierung der CD133<sup>+</sup> CFU-MIX Kolonien gebildeten sekundären Kolonien zeigte, dass in allen untersuchten Ansätzen CD16<sup>+</sup> Granulozyten enthalten waren (n=8) (Abb. 37B). Zudem konnte die Expression von MPO, EPX und HDC nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). Des Weiteren fanden sich in allen Ansätzen neben wenigen erythrozytären und megakaryozytären Zellen viele Makrophagen und neutrophile sowie einige eosinophile und basophile Granulozyten (Abb. 37C).



**Abb. 37: Analyse von CFU-MIX Kolonien nach Replattierung**

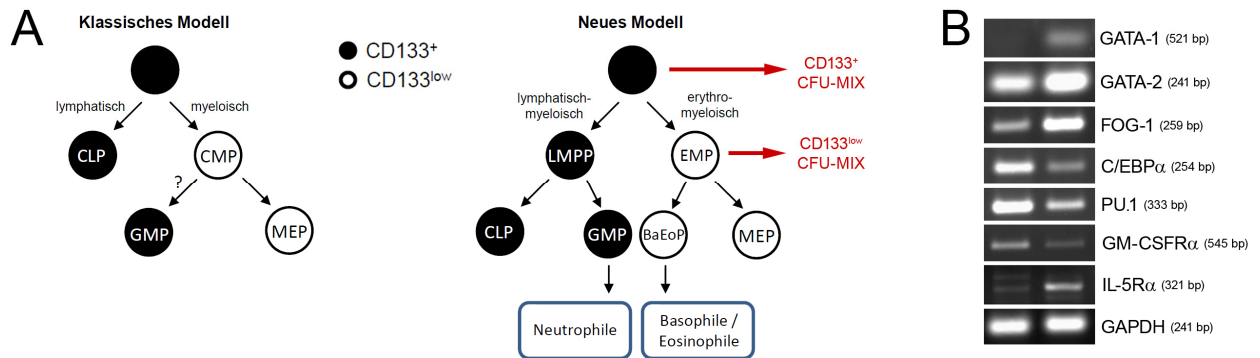
(A) Nach Replattierung entstanden aus den Zellen einzeln isolierter  $CD133^+$  CFU-MIX Kolonien sekundäre Kolonien ( $n=16$ ), die von Zellen einzelner  $CD133^{low}$  CFU-MIX Kolonien nicht gebildet wurden ( $n=10$ ). (B) Zwei Beispiele durchflusszytometrischer Analysen der Zellen aus sekundären Kolonien nach Replattierung von  $CD133^+$  CFU-MIX Kolonien. In allen Ansätzen wurden  $CD16^+$  Granulozyten (GRAN;  $CD15^+CD66b^+$ ) detektiert ( $n=8$ ). (C) Die Zellen aus sekundären Kolonien nach Replattierung von  $CD133^+$  CFU-MIX Kolonien enthielten neben Makrophagen und erythrozytären Zellen segmentkernige Neutrophile, Eosinophile und Basophile ( $n=16$ ; gefärbt nach Wright; Maßstabsbalken entspricht  $10\ \mu m$ ).

Da im Vergleich zu nicht replattierten  $CD133^+$  CFU-MIX Kolonien fast keine unreifen Zellen mehr vorhanden waren, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die  $CD133^+$  Zellen mit CFU-MIX Potenzial tatsächlich zu primitiv sind, um innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen terminal zu differenzieren.

### 3.2.14 Analyse der Expression linien-assoziiierter Faktoren

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass sich die von  $CD133^+$  Zellen gebildeten CFU-MIX Kolonien konsistent von den von  $CD133^{low}$  Zellen gebildeten CFU-MIX Kolonien unterscheiden. Vermutlich leiten sich die selten vorkommenden  $CD133^+$  CFU-MIX Kolonien von multipotenten Zellen ab, während die häufiger vorkommenden,  $CD133^{low}$  CFU-MIX Kolonien scheinbar von spezifizierten erythro-myeloischen Vorläufern gebildet werden, die das Potenzial zur Bildung von Neutrophilen verloren haben. Auch vor dem Hintergrund, dass nach neuntägiger Kultivierung  $CD133^+$  Zellen zur Repopulierung primärer, aber nicht sekundärer NSG-Mäuse befähigt waren und das erythrozytäre Differenzierungspotenzial verloren hatten, lassen sich diese Ergebnisse mit dem klassischen Modell der Hämatopoese, wie bereits mehrfach angedeutet, nicht vereinbaren (Abb. 38A). Unsere Daten suggerieren, dass

sich frühe Vorläufer in lymphatisch-myeloische und erythro-myeloische Entwicklungsreihen aufspalten. Hierbei zeigt der Verlust der CD133 Oberflächenexpression eine Segregation des erythro-myeloischen Linienpotenzials an und es ergibt sich ein verändertes, neues Modell (Abb. 38A).



**Abb. 38: Analyse der Expression linienspezifischer Faktoren vor dem Hintergrund des hämatopoetischen Modells**

**(A)** Dem klassischen hämatopoetischen Modell zufolge trennen sich zunächst myeloische und lymphatische Linie. Als myeloischer Vorläufer wird der CMP angesehen, dessen Potenzial sich in die MEP- und GMP-Linie auftrennt. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich mit diesem Modell nicht vereinbaren. Sie zeigen, dass sich wie bereits im myeloisch-basierten Modell vorausgesagt (Kawamoto *et al.*, 2010), lymphatisch-myeloische und erythro-myeloische Linien voneinander trennen. Neutrophile Granulozyten werden nur in der lymphatisch-myeloischen Linie (CD133<sup>+</sup>) gebildet, während die erythro-myeloische Linie (CD133<sup>low</sup>) basophile und eosinophile Granulozyten hervorbringt. Folglich sind CD133<sup>+</sup> CFU-MIX Vorläufer primitive multipotente Zellen, während es sich bei CD133<sup>low</sup> CFU-MIX Progenitoren um erythro-myeloische Progenitorzellen (EMP) handelt (BaEoP: Basophil-Eosinophiler Progenitor). **(B)** RT-PCR Analyse linienspezifisch-exprimierter Transkriptionsfaktoren und Oberflächenrezeptoren.

Verschiedene Transkriptionsfaktoren steuern die Spezifizierung und Realisierung verschiedener hämatopoetischer Linien. Entsprechend sind sie in der jeweiligen hämatopoetische Linie stärker exprimiert (Akashi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2009; Niebuhr *et al.*, 2009; Carotta *et al.*, 2010; Novershtern *et al.*, 2011).

In diesem Kontext sind vor allem die antagonistisch wirkenden Faktoren PU.1 und GATA-1 (Rekhtman *et al.*, 1999; Nerlov *et al.*, 2000) interessant. PU.1 steuert die Differenzierung von HSVZ zu Makrophagen, Neutrophilen und B-Zellen (DeKoter *et al.*, 1998; DeKoter und Singh, 2000). GATA-1 hingegen (Nerlov und Graf, 1998) fördert die Entwicklung der MEP-Linie und somit die Realisierung megakaryozytärer und erythrozytärer Zellschicksale (Pevny *et al.*, 1991; Fujiwara *et al.*, 1996; Shivdasani *et al.*, 1997). Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Faktoren GATA-

2 und friend of GATA-1 (FOG-1) für die MEP-Entwicklung wichtig sind und der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  bei der Spezifizierung zu granulozytär-monozytären Zellschicksalen (GMP) eine Rolle spielt (Akashi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2009; Niebuhr *et al.*, 2009).

Entsprechend wurde die Expression dieser Faktoren in CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen nach Kultivierung für 50-60 h mittels RT-PCR untersucht. Es zeigte sich, dass GATA-1, GATA-2 und friend of GATA-1 (FOG-1) jeweils stärker in Zellen der CD133<sup>low</sup> Fraktion exprimiert waren. Hingegen wurden für PU.1 und C/EBP $\alpha$  in CD133<sup>+</sup> Zellen eine stärkere Expression gefunden (Abb. 38B).

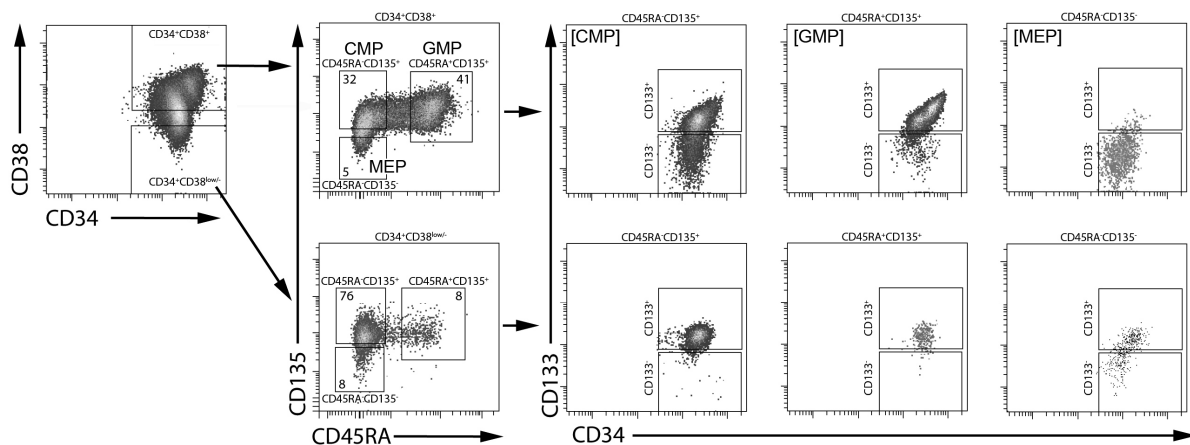
Im Kontext des sich neu ergebenden hämatopoetischen Modells war im Weiteren die Expression des für Zellen der GMP-Linie wichtigen Wachstumsfaktorrezeptors GM-CSFR (Akashi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2009) und der  $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-5 Rezeptors (IL-5R $\alpha$ ), der typischerweise auf humanen Eosinophilen, Basophilen sowie deren Vorläuferzellen exprimiert ist (Mori *et al.*, 2009), interessant. Deshalb wurde die Expression dieser Rezeptoren in CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen ebenfalls mittels RT-PCR untersucht. Für GM-CSFR wurde eine deutlich stärkere Expression in CD133<sup>+</sup> Zellen gefunden, wohingegen Transkripte für IL5R $\alpha$  exklusiv in Zellen der CD133<sup>low</sup> Fraktion detektiert wurden (Abb. 38B).

### **3.2.15 Oberflächenexpression von CD133 im Kontext klassisch verwendeter Marker**

Das klassische hämatopoetische Modell basiert, wie in der Einleitung genauer ausgeführt, hauptsächlich auf Analysen immunphänotypisch definierter Subpopulationen. Innerhalb des humanen erythro-myeloischen Kompartiments wurde der gemeinsame myeloische Vorläufer (CMP) über die Expression der Marker CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD135<sup>+</sup> definiert. Für die Vorläufer der granulozytär-monozytären Linie (GMP) und der megakaryozytären-erythrozytären Linie (MEP) wurden die Markerkombinationen CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup> (GMP) und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD135<sup>-</sup> (MEP) beschrieben (vgl. Abb. 39) (Manz *et al.*, 2002; Doulatov *et al.*, 2010).

Die experimentellen Daten dieser Arbeit deuten auf ein verändertes hämatopoetisches Modell hin, nach dem lymphatisch-myeloische (CD133<sup>+</sup>) und erythro-myeloische (CD133<sup>low</sup>) Potenziale in getrennten Linien vorliegen. Demzufolge

ist die Existenz eines gemeinsamen myeloischen Vorläufers (CMP) fraglich. Da der Marker CD133 in diesem Zusammenhang bislang in Arbeiten zur Aufklärung des hämatopoetischen Modells nicht berücksichtigt wurde, stellte sich die Frage, wie sich die untersuchten Subpopulationen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> im Hinblick auf die immunphänotypisch definierten Populationen des CMP, GMP und MEP einordnen lassen. Deshalb erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der CD133 Expression unter Einbeziehung aller erwähnter Marker (Abb. 39).



**Abb. 39: CD133 im Kontext der klassischen Immunphänotypen von CMP, GMP und MEP**

Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD133 im Kontext der immunphänotypisch definierten Subpopulationen CMP, GMP und MEP. Innerhalb der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Fraktion ermöglicht die Verwendung der Marker CD135 und CD45RA die Auftrennung in CMP-, GMP- und MEP-enhaltene Zellfraktionen. Die Messungen wurden an frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut durchgeführt (n=5).

Es zeigte sich, dass sich die Zellen der beschriebenen CMP-Fraktion (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) in beiden CD133 Subpopulationen befanden. Dagegen waren fast alle Zellen der GMP-Fraktion (CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) der CD133<sup>+</sup> Fraktion und fast alle Zellen der MEP-Fraktion (CD135<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) der CD133<sup>low</sup> Fraktion zuzuordnen (Abb. 39).

Die zusätzliche Analyse der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> Fraktion mit Hilfe der Marker CD135 und CD45RA zeigte, dass fast alle Zellen der Fraktionen CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> und CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> der CD133<sup>+</sup> Fraktion zuzuordnen sind, während sich die Zellen der CD135<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> Fraktion in beiden CD133 Subpopulationen befinden. Diese Markerkombinationen für CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> Zellen wurden bislang nicht charakterisiert.

Folglich enthält die CD133<sup>+</sup> Fraktion den klassisch definierten GMP und die CD133<sup>low</sup> Fraktion den MEP. In beiden CD133-Subpopulationen befinden sich Zellen, die immunphänotypisch bislang als CMP einordnet wurden. Dementsprechend suggeriert auch dieses Ergebnis das Vorhandensein verschiedener Zellqualitäten mit erythro-myeloischem CFU-MIX Potenzial.

### 3.3 Die Rolle von Numb in der Maus-Hämatopoese

Die Ergebnisse der Linienpotenzial-Analysen der mit Hilfe des Markers CD133 unterteilten humanen hämatopoetischen Subpopulationen ermöglichen auch ein besseres Verständnis und eine genauere Einordnung der Effekte nach genetischer Manipulation der Numb-Expression in humanen HSVZ. Die Ergebnisse der funktionellen Analysen legen nahe, dass Numb ein funktionell wichtiger Faktor bei der Regulierung von Zellschicksalsentscheidungen in der humanen Hämatopoese ist. Aufgrund teilweise widersprüchlicher Daten zur Funktion von Numb in der murinen Hämatopoese wurde der Entschluss gefasst, die Rolle von Numb auch in der Hämatopoese von Mäusen funktionell zu untersuchen.

Wie bereits erwähnt, ist der konventionelle ubiquitäre *Knockout* von Numb in Mäusen embryonal letal (Zilian *et al.*, 2001) und Numb und Numblike weisen redundante Funktionen zueinander auf (Petersen *et al.*, 2002). Deshalb wurde zur Untersuchung der Rolle von Numb im hämatopoetischen System in der gleichen Arbeitsgruppe ein Cre/loxP-basierendes *Knockout*-Modell angewandt, in dem über das *Mx1-Cre* Transgen konditional die Deletion von *Numb* und *Numblike* im Knochenmark der Mäuse ermöglicht wird (Wilson *et al.*, 2007). Dazu wurden Exon 1 des *Numb*-Gens und Exon 1 bis 3 des *Numblike* Gens mit flankierenden loxP Sequenzen versehen, die durch die Aktivität der Cre-Rekombinase durch Rekombination spezifisch entfernt werden können. Nach der auf diese Weise erfolgten genomischen Inaktivierung von *Numb* und *Numblike* im hämatopoetischen System der Mäuse wurden keine Effekte auf die Blutbildung im Knochenmark, die Ausreifung von T-Zellen im Thymus und die Quantität aller untersuchten hämatopoetischen Subpopulationen in beiden Organen der Mäuse im Vergleich mit Kontrollmäusen erkannt (Wilson *et al.*, 2007).

Das *Mx1-Cre* Transgen wird vielfach verwendet, um embryonal letale Faktoren im Knochenmark bzw. der Hämatopoese funktionell zu untersuchen, da es zeitlich steuerbar im adulten Tier durch Gabe von Interferon induzierbar ist (Kuhn *et al.*, 1995). Nachteile dieses Systems sind allerdings mögliche Sekundäreffekte auf die Entwicklung hämatopoetischer Zellen durch Interferon, die Aktivierung von *Mx1-Cre* in anderen, nicht-hämatopoetischen Geweben sowie die fehlende Induzierbarkeit in Interferon-insensitiven hämatopoetischen Zelltypen (Despres *et al.*, 1995; Baron *et al.*, 2008; Demoulins *et al.*, 2008; Mizutani *et al.*, 2008; Essers *et al.*, 2009; Gan *et al.*, 2010).



Somit ist es möglich, dass in der Arbeit von Wilson *et al.* (Wilson *et al.*, 2007) nach Inaktivierung von *Numb* und *Numblike* keine Effekte erkannt wurden, weil die *Mx1-Cre* vermittelte Rekombination nicht in allen hämatopoetischen Zellen erfolgt war. Zur Untersuchung der Funktion von *Numb* in der murinen Hämatopoese wurde deshalb in dieser Arbeit das *Vav-iCre* Transgen verwendet, durch das in allen hämatopoetischen Zellen eine Rekombination loxP-flankierter Sequenzen ermöglicht wird (de Boer *et al.*, 2003).

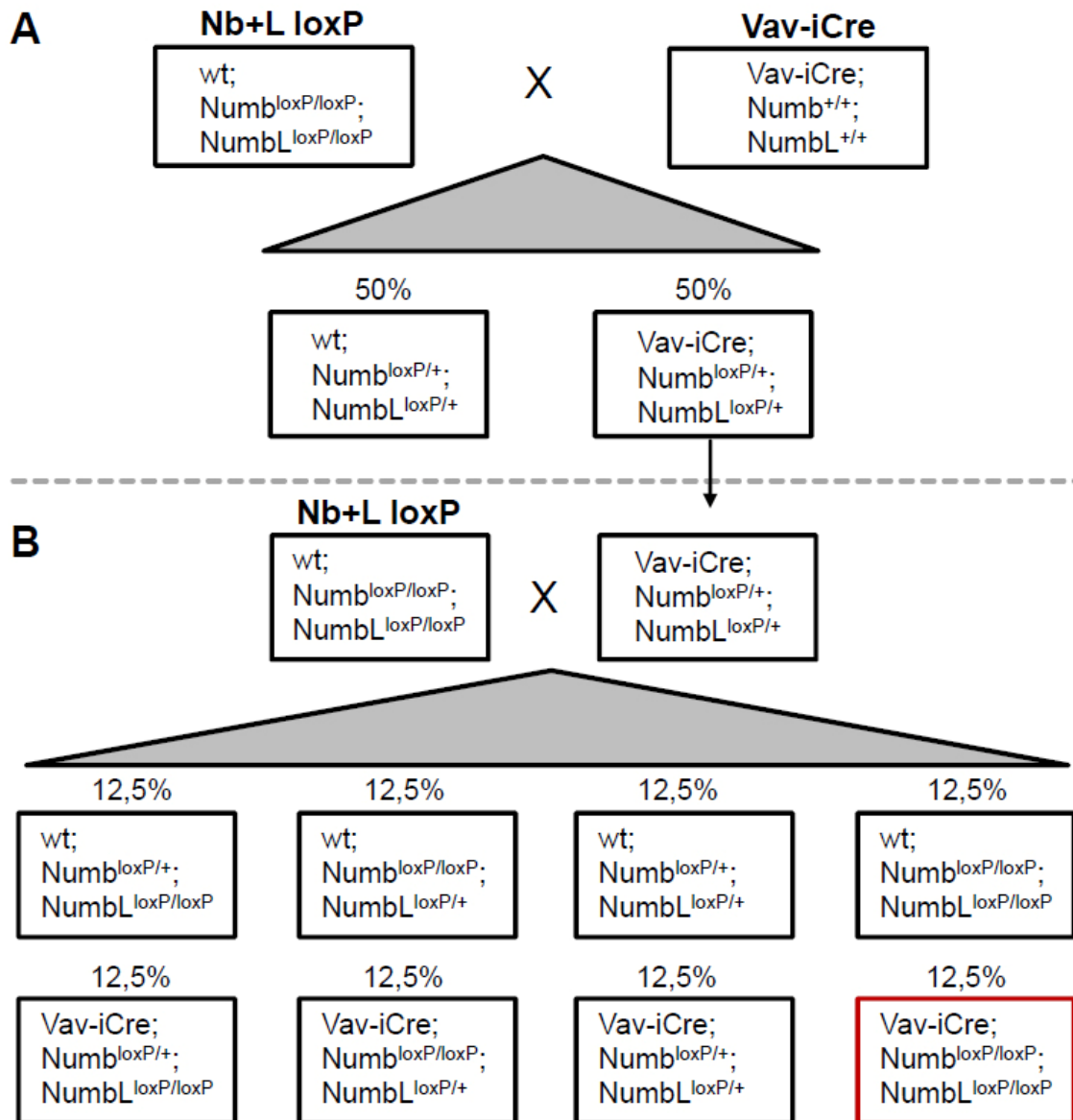
### 3.3.1 Generierung von *Numb/Numblike Knockout-Mäusen*

Zur genomischen Inaktivierung von *Numb* und *Numblike* mit Hilfe des *Vav-iCre*-Transgens wurden die im Rahmen der vorstehend beschriebenen Arbeit in der Gruppe von Olav Zilian generierten Mäuse, in denen Teile von *Numb* und *Numblike* mit loxP-Sequenzen flankiert worden waren, (Nb+L loxP; vgl. Abschnitt 2.2.5.2), verwendet (Wilson *et al.*, 2007).

Das *Vav-iCre*-Transgen besteht aus dem *Vav1*-Promotor sowie der *Cre*-cDNA und einem Polyadenylierungssignal (de Boer *et al.*, 2003). Die Expression des Proto-Onkogens *Vav1* und damit die Aktivität des *Vav1*-Promotors beginnt in den ersten definitiven HSZ, die aus dem hämogenen Endothel des Embryos generiert werden (Chen *et al.*, 2009). Zu diesem Zeitpunkt startet folglich auch die Expression der *iCre*-Rekombinase, die somit die Rekombination der loxP-flankierten (geflochten) Zielsequenzen in allen hämatopoetischen Zellen ermöglicht. Eine weitere Induktion ist nicht erforderlich (de Boer *et al.*, 2003).

Zur Generierung von Hämatopoese-spezifischen *Numb/Numblike Knockout-Mäusen* vor dem *Vav-iCre*-Hintergrund wurden entsprechend Nb+L loxP Mäuse zunächst mit *Vav-iCre*-Mäusen verkreuzt und genotypisiert. In Übereinstimmung mit den Mendel'schen Regeln führte das in ca. 50% der Fälle zu Nachkommen, bei denen die mit loxP-Sequenzen flankierten *Numb*- und *Numblike*-Allele heterozygot vorlagen und die heterozygot für das *Vav-iCre*-Transgen waren (*Vav-iCre*; *Numb*<sup>loxP/+</sup>; *NumbL*<sup>loxP/+</sup>; Abb. 40A). Auf diese Weise erhaltene Nachkommen wurden mit dem Ursprungstamm Nb+L loxP rückverkreuzt, um Mäuse zu generieren, in denen die Allele für *Numb* und *Numblike* homozygot geflocht vorlagen und die das *Vav-iCre*-Transgen exprimierten (Abb. 40B). Die Nachkommen dieser Verkreuzung zeigten mit

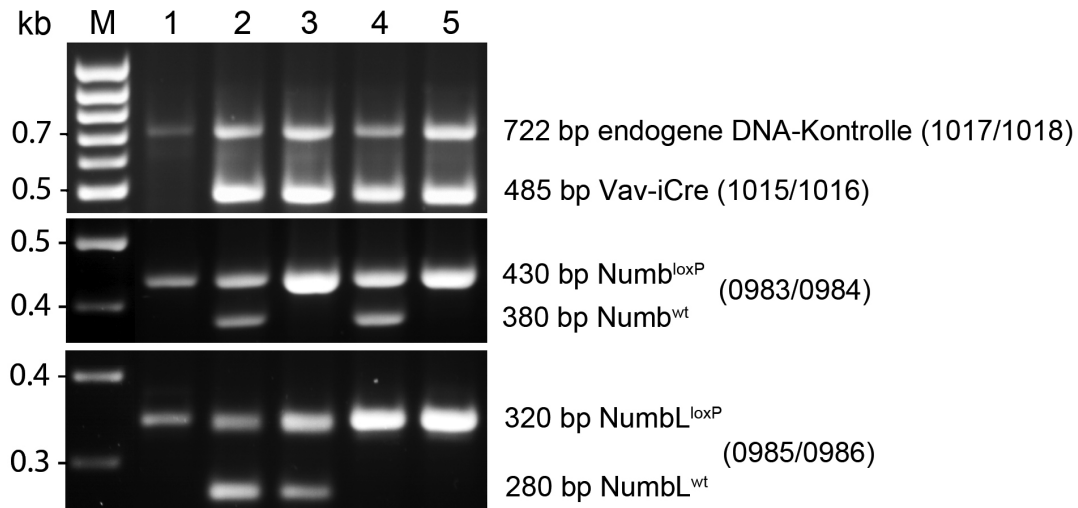
den Mendel'schen Regeln übereinstimmend zu ca. 12,5% den gewünschten Ziel-Genotyp ( $Vav-iCre; Numb^{loxP/loxP}; NumbL^{loxP/loxP}$ ; Abb. 40B).



**Abb. 40: Kreuzungsschema zur Generierung von *Numb/Numblike* Knockout-Mäusen**

(A) Die Verkreuzung der Stämme Nb+L loxP und Vav-iCre führte zu gleichen Teilen zu Vav-iCre-positiven (Vav-iCre) und -negativen (wt) Nachkommen mit jeweils heterozygot loxP-flankierten (gefloxten) *Numb/Numblike*-Allelen. (B) Zur Generierung von Vav-iCre-positiven Mäusen mit homozygot gefloxten Allelen für *Numb* und *Numblike* wurden Mäuse des Genotyps Vav-iCre;  $Numb^{loxP/+}$ ;  $NumbL^{loxP/+}$  mit dem Ursprungsstamm Numb+L loxP rückverkreuzt, was rechnerisch zu einer Frequenz des Ziel-Genotyps (rot umrandet) von 12,5% führen sollte (NumbL: Numblike; +/wt: Wildtyp).

Tiere des genannten Ziel-Genotyps wurden im Weiteren wiederum mit Tieren des ursprünglichen Nb+L loxP-Stammes rückverkreuzt, was den Mendel'schen Regeln entsprechend zu einer Frequenz des gewünschten Genotyps in der Nachkommenschaft von ca. 50% führte. Beispiele für den PCR-Nachweis der verschiedenen Genotypen sind in Abb. 41 dargestellt.



**Abb. 41: Maus-Genotypisierung bei der Generierung von Numb/Numblinke Knockout-Mäusen**

Beispiele für den PCR-Nachweis der *Vav-iCre* Rekombinase-Sequenz und des Status der Ziel-Loci innerhalb der Gene *Numb* und *Numblinke* zur Genotypisierung von Mäusen. 1: Der Nb+L loxP Ursprungsstamm, entsprechende *Numb*- und *Numblinke*-Allele sind homozygot von loxP-Sequenzen flankiert (gefloxt). 2-5: Erhaltene *Vav-iCre*-positive Genotypen nach Verkreuzung; in den Mäusen 3 und 5 sind beide *Numb*-Allele gefloxt, in den Mäusen 2 und 4 liegen wildtypisches und gefloxtes Allel vor. Entsprechend sind in den Mäusen 4 und 5 beide *Numblinke*-Allele gefloxt, in den Mäusen 2 und 3 liegt *Numblinke* heterozygot gefloxt vor (M: Marker; NumbL: *Numblinke*; vierstellige Zahlen beziehen sich auf die verwendeten Oligonukleotide, vgl. Abschnitt 2.1.6; die endogene DNA-Kontrolle für den *Vav-iCre* Nachweis zeigt die Amplifikation einer genomischen Sequenz aus dem Fas-Lokus).

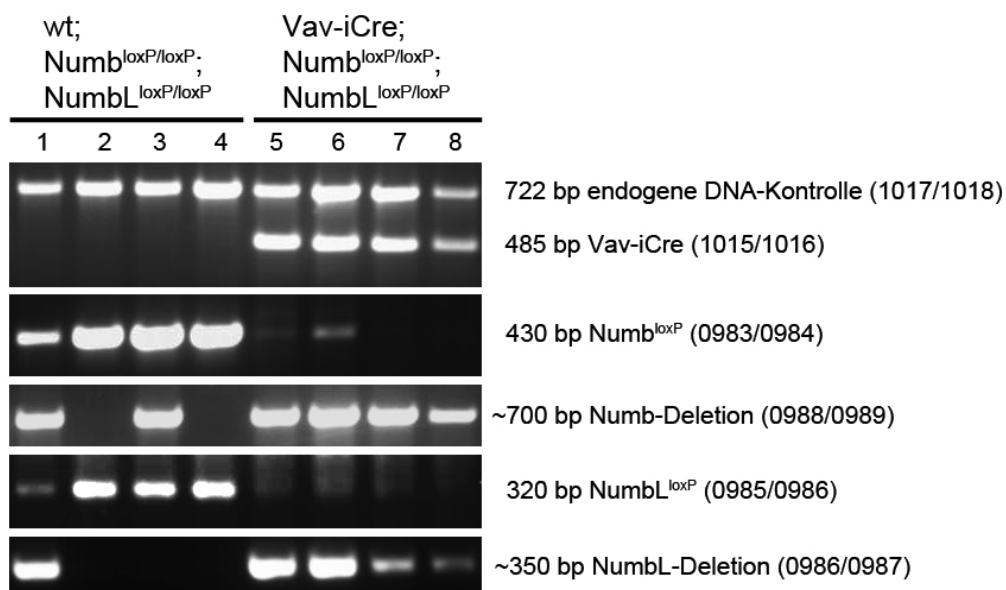
Diese Ergebnisse deuten bereits an, dass die Entwicklung des hämatopoetischen Systems der Mäuse nach genomischer Inaktivierung der Funktion von *Numb* und *Numblinke* nicht nachhaltig gestört war. Andernfalls wäre zu erwarten gewesen, dass aufgrund der beschriebenen embryonalen Letalität nach *Numb-Knockout* der Ziel-Genotyp nicht oder nur sehr selten unter den Nachkommen zu finden wäre.

### 3.3.2 Nachweis der *Vav-iCre*-vermittelten Deletion von *Numb* und *Numblinke*

Im Rahmen der phänotypischen Analysen von vier genotypischen *Numb/Numblinke* Knockout-Mäusen und vier gleichaltrigen Kontrolltieren wurden zum Nachweis der Deletion der gefloxt Sequenzen zunächst Zellen aus dem Knochenmark und Thymus der Mäuse isoliert (vgl. 2.2.5.2). Eine Begutachtung des Habitus, der

weiteren inneren Organe und verschiedener weiterer Parameter zeigte keine Unterschiede zwischen *Knockout*- und Kontroll-Mäusen. Nach Extraktion der genomischen DNA wurde die Deletion von *Numb* und *Numbl* mittels PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Zilian *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2007) (Abb. 42) untersucht. Die verwendeten Oligonukleotide ermöglichten jeweils die Detektion der deletierten oder der mit loxP-Sequenzen flankierten Allele.

In allen vier verwendeten *Numb/Numbl* *Knockout*-Mäusen konnten keine geflochtenen Allele, aber die rekombinierten Allele nach Deletion nachgewiesen werden (Abb. 42). Die für die Deletion spezifische PCR zeigte auch in zwei Kontrollmäusen Amplifikate, welche durch eine residuale Keimbahnaktivität von *Vav1* erklärt werden könnten. Die entsprechenden Tiere tragen somit das rekombinierte und das nicht-rekombinierte, mit loxP-Sequenzen flankierte Allel (Abb. 42).



**Abb. 42: Nachweis der Vav-iCre vermittelten Rekombination der *Numb*- und *Numbl*-Allele**

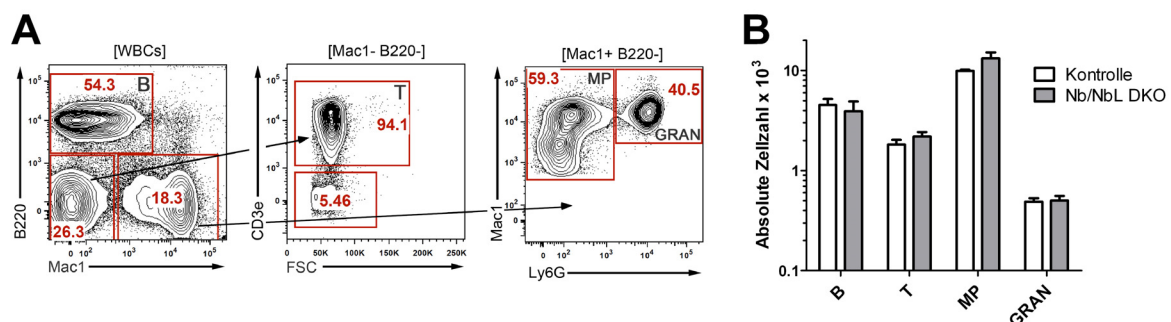
Im Knochenmark der *Numb/Numbl* *Knockout*-Mäuse (Vav-iCre;Numb<sup>loxP/loxP</sup>;Numbl<sup>loxP/loxP</sup>; 5-8) konnten im Vergleich zu Kontrolltieren (wt; Numb<sup>loxP/loxP</sup>;Numbl<sup>loxP/loxP</sup>; 1-4) die jeweils geflochtenen *Numb*- und *Numbl*-Allele mittels PCR mit Ausnahme des Numb<sup>loxP</sup>-Allels in Maus 5 und 6 nicht mehr nachgewiesen werden. Die in Maus 5 und 6 detektierbaren schwachen Banden für das Numb<sup>loxP</sup>-Allel könnten von einer Amplifikation der nicht-rekombinierten Allele in den wenigen nicht-hämatopoetischen Zellen im Knochenmark der Mäuse herrühren. Das jeweilig rekombinierte Allel (*Numb*-Deletion bzw. *Numbl*-Deletion) konnte in allen *Knockout*-Mäusen (5-8) nachgewiesen werden. Zudem wurden rekombinierte Allele zusätzlich zu den noch vorhandenen geflochtenen Allelen bei den Kontrolltieren 1 und 3 amplifiziert. Entsprechende Analysen wurden mit vergleichbaren Ergebnissen ebenfalls an genomischer DNA aus dem Thymus der Mäuse durchgeführt. Alle untersuchten Tiere waren ca. 14 Wochen alt.

Um mögliche Effekte nach Funktionsverlust von *Numb* und *Numblike* im hämatopoetischen System der Mäuse beurteilen zu können, wurden entsprechend isolierte Zellen aus peripherem Blut, Knochenmark und Thymus der acht oben beschriebenen Mäuse (vier Kontrolltiere, vier *Numb/Numblike* *Knockout*-Mäuse) durchflusszytometrisch analysiert.

**Hinweis:** Die in den folgenden Abschnitten (3.3.4, 3.3.3 und 3.3.5) beschriebenen durchflusszytometrischen Analysen im Knochenmark, im Blut und im Thymus der Versuchstiere sowie die jeweilige Aufarbeitung der Zellen wurden freundlicherweise im Rahmen einer Kollaboration durch Stefanie Weber (Technische Assistentin in der Arbeitsgruppe von Joachim Göthert, Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt. Mein Anteil daran beschränkt sich neben der gemeinsamen Planung der Versuche auf die abschließende Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse.

### 3.3.3 Analyse reifer Blutzellen im peripheren Blut der Mäuse

Die durchflusszytometrische Analyse und Quantifizierung verschiedener reifer Blutzelltypen in den Versuchstieren erfolgte mit Hilfe von Maus-spezifischen Antikörpern gegen die linienspezifisch exprimierten Antigene B220 (B-Zellen), Mac1 (Granulozyten und Makrophagen), CD3e (T-Zellen) und Ly6G (Granulozyten) (Abb. 43A). Durch gleichzeitige Bestimmung der Gesamt-Zellzahl im Blut konnten jeweils absolute Zellzahlen berechnet und verglichen werden (Abb. 43A).



**Abb. 43: Quantitative Analyse reifer Blutzellen nach Knockout von *Numb* und *Numblike***

**(A)** Durchflusszytometrische Messung zur Quantifizierung reifer Blutzelltypen im peripheren Blut der Mäuse sowie der zur Quantifizierung verwendeten Regionen. Innerhalb der weißen Blutzellen [WBCs] können B-Zellen (B220<sup>+</sup>; B) von T-Zellen (B220<sup>-</sup>Mac1<sup>-</sup>CD3e<sup>+</sup>; T) unterschieden werden. Die Population der B220<sup>-</sup>Mac1<sup>+</sup> Zellen kann im Weiteren durch Verwendung des Markers Ly6G in Makrophagen (Mac1<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>; MP) und Granulozyten (Mac1<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>; GRAN) aufgetrennt werden. **(B)** Auf durchflusszytometrischen Messdaten und bestimmter Gesamtzellzahl basierende vergleichende Quantifizierung der verschiedenen Arten von reifen Blutzellen aus (A) in Kontrolltieren (n=4) und nach *Numb/Numblike* Doppel-Knockout (Nb/NbL DKO; n=4). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

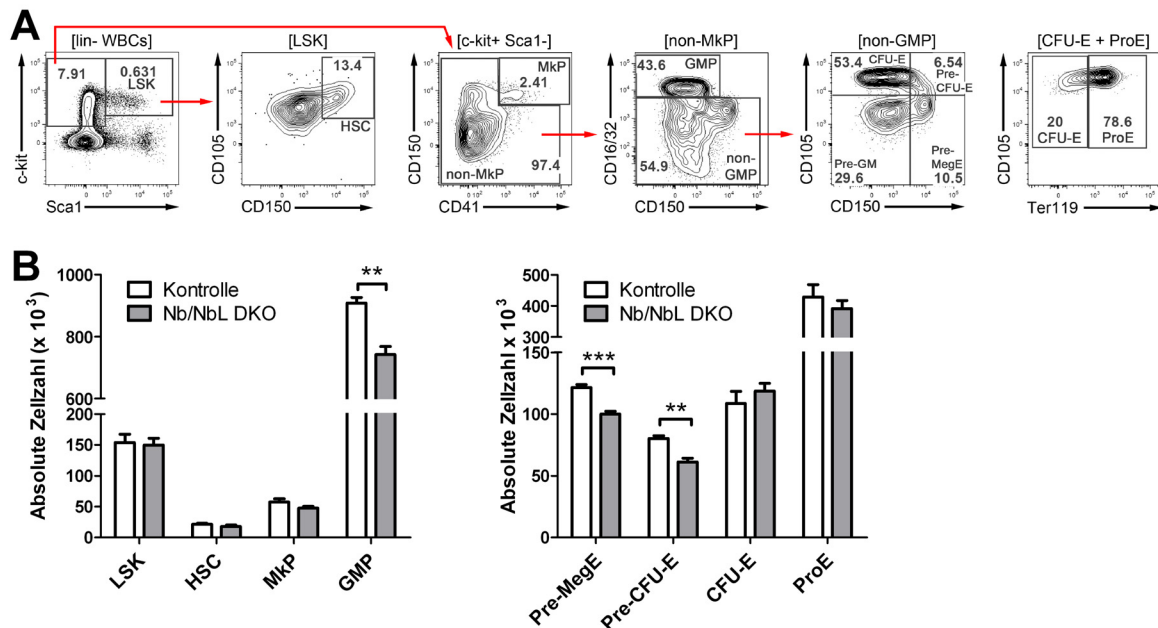
Nach Inaktivierung von *Numb* und *Numblike* konnten somit im Vergleich zu den Kontrolltieren keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Anteile bzw. Zellzahlen in den untersuchten lymphatischen und myeloischen Subpopulationen festgestellt werden (Abb. 43B).

### 3.3.4 Quantitative Analyse von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Maus-Knochenmark

Zur Analyse der Funktion von *Numb* und *Numblike* im primitiven hämatopoetischen Kompartiment wurden als nächstes die Anteile verschiedener hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellpopulationen im Knochenmark der *Numb/Numblike* *Knockout*-Mäuse und der Kontrolltiere quantifiziert.

Die Immunphänotypen der Stammzellen und der verschiedenen Progenitoren sind im Maus-System deutlich besser definiert und verstanden als im humanen System. Innerhalb der  $lin^-Sca1^+c-kit^+$  (LSK)-Fraktion können durch Verwendung der Marker CD150 und CD105 die Stammzellen ( $CD150^+CD105^+$ ) gut von den multipotenten Progenitoren ( $CD150^-CD105^+$ ) unterschieden werden (Kiel *et al.*, 2005; Pronk *et al.*, 2007). Des Weiteren ist durch Verwendung weiterer definierter Markerkombinationen die Identifikation der megakaryozytären Progenitoren ( $c-kit^+Sca1^-CD150^+CD41^+$ , MkP), der Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren ( $c-kit^+Sca1^-CD150^-CD16/32^+$ ; GMP) und weiterer Zwischenstufen der Megakaryozyten-Erythrozyten- (MegE) Linie möglich.

Vor dem Hintergrund der im humanen System nach Manipulation der *Numb*-Expression erhaltenen Ergebnisse war die Analyse der MegE-Differenzierungsline von besonderem Interesse. Der früheste Vorläufer der MegE-Reihe ist dabei der Pre-MegE, innerhalb der dann abspaltenden roten Reihe können immunphänotisch die bei der Differenzierung nacheinander entstehenden Zwischenstufen Pre-CFU-E, CFU-E und die Pro-Erythroblasten (ProE) unterschieden werden (Akashi *et al.*, 2000; Socolovsky *et al.*, 2001; Kiel *et al.*, 2005; Pronk *et al.*, 2007) (Abb. 44A).



**Abb. 44: Quantifizierung verschiedener HSVZ-Subpopulationen im Maus-Knochenmark**

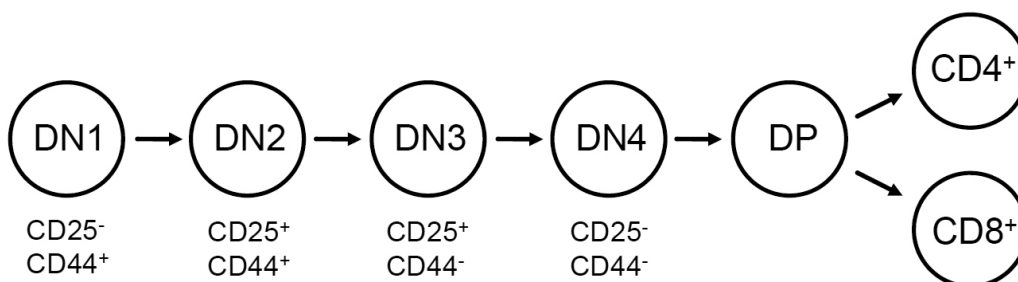
**(A)** Durchflusszytometrische Messung zur Quantifizierung verschiedener definierter hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellpopulationen im Maus-Knochenmark. Die Linienmarker-negativen ( $lin^-$ )  $c-kit^+Sca1^+$  Zellen (LSK) wurden durch die Darstellung von CD150 gegen CD105 zur Quantifizierung der HSZ ( $CD150^+CD105^+$ ; HSC) verwendet. Innerhalb der  $c-kit^+Sca1^-$  Zellfraktion wurden die megakaryozytären Progenitoren (MkP) quantifiziert. Alle übrigen Zellen enthielten megakaryozytäre-erythrozytäre (Pre-MegE) sowie verschiedene erythrozytäre Vorstufen (Pre-CFU-E, CFU-E, ProE) und Granulozyten-Makrophagen Progenitoren (Pre-GM). **(B)** Auf durchflusszytometrischen Messdaten und bestimmter Gesamtzellzahl basierende vergleichende Quantifizierung der verschiedenen Stamm- und Progenitor-Subpopulationen aus (A) in Kontrolltieren (n=4) und nach konditionalem *Numb/Numblike* Doppel-Knockout (Nb/NbL DKO; n=4) (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Die Quantifizierung dieser Stamm- und Progenitorzellfraktionen im Knochenmark der Versuchstiere ergab, dass nach Funktionsverlust von *Numb* und *Numblike* die Zahl der HSZ und der LSK- und MkP-Populationen im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert erschien. Dagegen war in den *Numb/Numblike* Knockout-Mäusen die Anzahl der Zellen mit granulozytär-monozytärem Potenzial (GMP) signifikant erniedrigt (Abb. 44B). Ebenfalls führte die Inaktivierung von *Numb* und *Numblike* im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer Verringerung der Zahl der Pre-MegE und Pre-CFU-E, also der primitivsten liniendeterminierten megakaryozytären bzw. erythrozytären Vorläuferzellen. Die Zahl der reiferen erythrozytären Vorläuferentitäten CFU-E und ProE war dagegen unverändert (Abb. 44B).

### 3.3.5 Analyse der T-Zell-Entwicklung nach Inaktivierung von *Numb* und *Numblike*

Da in verschiedenen Studien von einer funktionelle Beteiligung von *Numb* und dem Notch-Signalweg bei der Thymozytenentwicklung bzw. der T-Zell-Spezifizierung berichtet wurde (French *et al.*, 2002; Sambandam *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007; Aguado *et al.*, 2010), wurden die aus *Numb/Numblike Knockout*-Mäusen und Kontrolltieren isolierten Thymozyten ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert.

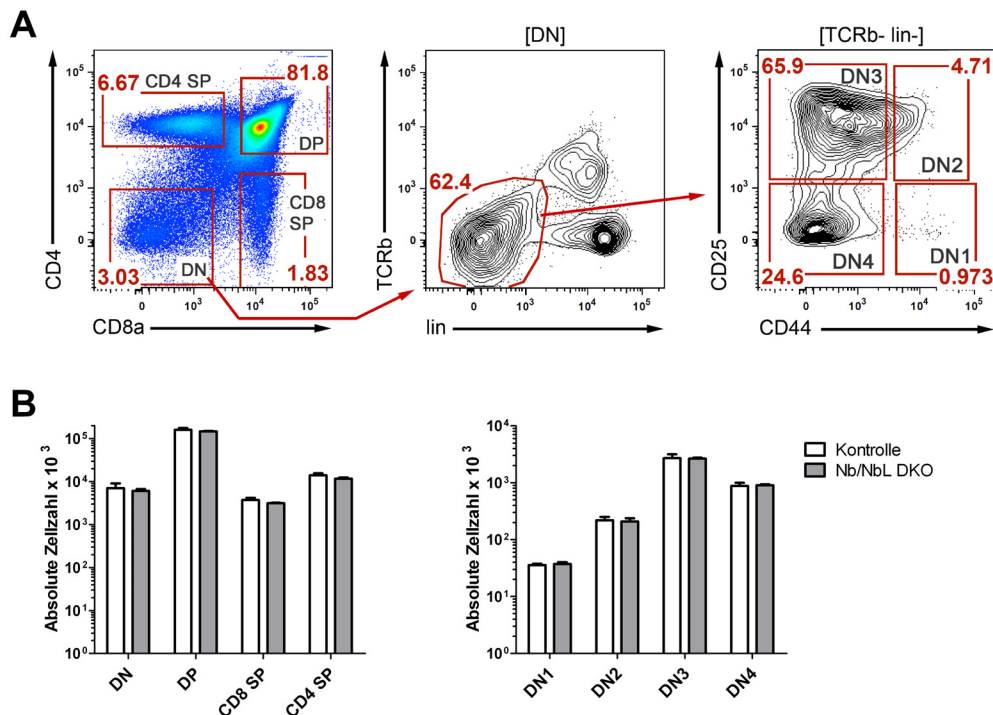
Die verschiedenen Stadien während der T-Zell Reifung in der Maus lassen sich immunphänotypisch gut unterscheiden. Mit Hilfe der Marker CD4 und CD8 lassen sich reife T-Zellen ( $CD8^+CD4^-$  und  $CD4^+CD8^-$ ) von deren für CD4 und CD8 doppelpositiven (DP) Vorläufern und den noch unreiferen, doppel-negativen (DN) Progenitoren abgrenzen. Durch die Verwendung der Marker CD25 und CD44 gelingt im Weiteren eine Unterteilung der DN-Fraktion in weitere Zwischenstadien. Der Immunphänotyp  $CD44^+CD25^-$  beschreibt die primitivsten Vorläufer (DN1), dann folgen im Laufe der Reifung die weiteren Stadien  $CD44^+CD25^+$  (DN2),  $CD44^-CD25^+$  (DN3) und  $CD44^-CD25^-$  (DN4) (Ballas und Rasmussen, 1990; Zlotnik *et al.*, 1992; Godfrey *et al.*, 1993) (schematische Darstellung in Abb. 45, vgl. Abb. 46A).



**Abb. 45: Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung im Thymus**

Die vier DN-(doppelt-negativ für CD4 und CD8) Entwicklungsstadien werden anhand der Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD44 identifiziert. DP- (doppelt positive) Zellen exprimieren CD4 und CD8 auf ihrer Oberfläche, während reife T-Zellen ( $CD4^+/CD8^+$ ) nur einen der beiden Marker exprimieren.





**Abb. 46: Analyse der T-Zell Reifung im Thymus nach *Numb/Numblike*-Knockout**

(A) Beispielhafte Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung zur Quantifizierung von T-Zell Vorstufen im Thymus der Mäuse sowie der zur Quantifizierung verwendeten Regionen. Durch Verwendung der Marker CD4 und CD8a erfolgt eine erste Auftrennung in ausgereifte T-Helferzellen (CD4 SP), cytotoxische T-Zellen (CD8 SP) und CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Thymozyten (DP). Die Quantifizierung unreifer Thymozyten-Subpopulationen (DN1-DN4) innerhalb der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) Fraktion erfolgte nach Ausschluss von lin<sup>+</sup>TCRb<sup>+</sup> Zellen über die Marker CD44 und CD25 (vgl. Abb. 45). (B) Auf durchflusszytometrischen Messdaten und bestimmter Gesamtzellzahl basierende vergleichende Quantifizierung der in A immunphänotypisch definierten Thymozyten-Subpopulationen in Kontrolltieren (n=4) und nach konditionalem *Numb/Numblike* Doppel-Knockout (Nb/NbL DKO; n=4).

Die Quantifizierung aller beschriebener Thymozyten-Subpopulationen im Thymus der Versuchstiere nach *Knockout* von *Numb* und *Numblike* zeigte im Vergleich zu Thymuszellen aus den Kontrolltieren keine signifikant veränderten Frequenzen oder absoluten Zellzahlen (Abb. 46B).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse nach genomischer Inaktivierung von *Numb* und *Numblike* im hämatopoetischen Kompartiment der Mäuse auf eine *Numb/Numblike* unabhängige T-Zellentwicklung hin. Auch der Selbsterhalt von HSZ und die Differenzierung in allen hämatopoetischen Linien im Knochenmark der Mäuse erschien größtenteils unverändert. Im Knochenmark war nach *Knockout* von *Numb* und *Numblike* im Vergleich zu Kontrolltieren konsistent die Anzahl der Vorläufer-Fractionen GMP, Pre-MegE und Pre-CFU-E reduziert.

## 4 Diskussion

Die Mechanismen zur Steuerung von Zellschicksalsentscheidungen in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) sind bislang nur sehr begrenzt verstanden. Es ist allerdings bekannt, dass HSVZ sich asymmetrisch teilen können und dass für den Erhalt primitiver hämatopoetischer Zellen die Stammzellnische im Knochenmark essentiell ist, in der unter anderem der Notch-Signalweg eine wichtige Rolle spielt (Calvi *et al.*, 2003; Beckmann *et al.*, 2007). Die Regulation von Zellschicksalsentscheidungen durch asymmetrische Zellteilung und Stammzellnischen sowie die Funktionen jeweils beteiligter Faktoren sind in klassischen Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster* deutlich besser verstanden als in Säugern. Dabei fungiert das Protein Numb in verschiedenen Geweben als Zellschicksalsdeterminante und wirkt als Antagonist des Notch-Signalweges.

Da Numb evolutionär konserviert ist und auch in humanen HSVZ exprimiert wird, wurde in Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Giebel begonnen, Numb in CD34<sup>+</sup> Zellen funktionell zu untersuchen. Nach genetischer Manipulation der Numb-Funktion zeigten sich Effekte, die auch im humanen hämatopoetischen System auf eine zu Notch antagonistische Wirkweise von Numb hindeuteten. Eine genauere Klärung der Frage, ob Numb auch in humanen HSVZ die Realisierung des Notch-Signalweges unterdrückt, erfolgte in diesen Vorarbeiten nicht (Spanholtz, 2005; von Levetzow, 2008).

Auf diesen Vordaten aufbauend war dementsprechend das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit, die Funktion der Zellschicksalsdeterminante Numb in HSVZ weiter aufzuklären. Von besonderem Interesse war dabei vor allem die Klärung der Frage, ob Numb, wie aus Modellorganismen bekannt, funktionell als Antagonist des Notch-Signalweges in HSVZ fungiert. Im Weiteren war es zum Verständnis der dabei erhaltenen Daten nach genetischer Manipulation der Numb-Expression erforderlich, die Entwicklungspotenziale der HSVZ-Subpopulationen CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup>CD133<sup>low</sup> systematisch zu untersuchen. Aufgrund von Diskrepanzen zwischen unseren Daten zur Numb-Funktion im humanen System zu veröffentlichten Daten in der murinen Hämatopoese beinhaltete ein weiteres Teilprojekt dieser Arbeit die funktionelle Untersuchung der Rolle von Numb in der Maus-Hämatopoese.

#### 4.1 Die Entwicklungspotenziale humaner CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen

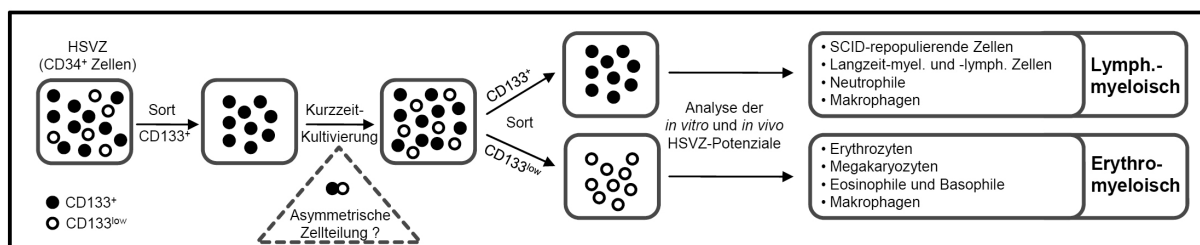
Mit dem ursprünglichen Ziel, die nach funktioneller Untersuchung von Numb erhaltenen Daten genauer einordnen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Linien-Differenzierungspotenzial der HSVZ-Subpopulationen CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> (CD133<sup>+</sup>) und CD34<sup>+</sup>CD133<sup>low</sup> (CD133<sup>low</sup>) umfassend untersucht.

Die dabei erhaltenen Befunde sprechen zusammengenommen unerwarteterweise für ein neues Modell der humanen Hämatopoese und bilden vom Umfang her den Hauptteil dieser Arbeit. Da diese Befunde wichtig zum Verständnis der erhaltenen Daten zur Funktion von Numb in humanen HSVZ sind, sollen sie zuerst diskutiert werden.

Wie bereits Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, exprimiert der Großteil frisch isolierter CD34<sup>+</sup> Zellen (Tag 0) hohe Level des Oberflächenmarkers CD133. Nach 2-3 tägiger *in vitro* Kultur entsteht eine neue CD133<sup>low</sup> Population (Giebel *et al.*, 2006; Beckmann *et al.*, 2007). Die Kinetik, mit der die CD133 Expression auf CD34<sup>+</sup> Zellen im weiteren Kulturverlauf verloren geht, passte zu einer postulierten Kinetik asymmetrischer Zellteilungen, weshalb in unserer Arbeitsgruppe in einer durchflusszytometrischen Reihenuntersuchung nach differenziell zu CD133 exprimierten Oberflächenmarkern auf CD34<sup>+</sup> Zellen gesucht wurde. Dabei wurden vier Oberflächenmarker, die unterschiedlich auf beiden CD133 Subpopulationen exprimiert waren, auf mitotischen CD34<sup>+</sup> Zellen als asymmetrisch verteilte Marker gefunden (Beckmann *et al.*, 2007). CD133 selbst wurde auf der Zelloberfläche sich asymmetrisch teilender CD34<sup>+</sup> Zellen immer gleich verteilt gefunden (Beckmann *et al.*, 2007), später wurde aber gezeigt, dass die intrazelluläre Komponente von CD133 in einem Teil der Zellteilungen humaner CD34<sup>+</sup> Zellen asymmetrisch segregiert (Fonseca *et al.*, 2008).

Die Analyse der Linienpotenziale beider CD133 Subpopulationen im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass bestimmte Linienpotenziale der CD133<sup>+</sup> bzw. der CD133<sup>low</sup> Fraktion zugeordnet werden können. Die CD133<sup>+</sup> Fraktion enthielt Zellen mit myeloischem (LTC-IC) und lymphatischem (NK-IC) *in vitro* Langzeitpotenzial sowie SCID-repopulierende Zellen (SRZ). Das deutete darauf hin, dass alle primitiveren und multipotenten humanen HSVZ innerhalb der CD133<sup>+</sup> Fraktion enthalten sind. Vergleichende Analysen der erythro-myeloischen Linienpotenziale in CD133<sup>+</sup> und

CD133<sup>low</sup> Zellfraktionen ergaben, dass das CFU-MIX Potenzial sowie das erythrozytäre und das megakaryozytäre Differenzierungspotenzial nach der ersten Zellteilung *in vitro* in die CD133<sup>low</sup> Fraktion segregiert und in der CD133<sup>+</sup> Fraktion nachhaltig verloren geht. Dagegen blieb auch nach mehreren Zellteilungen das Potenzial zur Bildung von CFU-GM Kolonien, die Granulozyten-Makrophagen Progenitoren (GMP) repräsentieren, ausschließlich in der CD133<sup>+</sup> Fraktion enthalten. Detaillierte Analysen der Granulozytenkomposition einzelner Kolonien zeigten, dass in den CFU-GM Kolonien im CFC-Ansatz nur neutrophile, aber keine basophilen und eosinophilen Granulozyten enthalten waren. In der CD133<sup>low</sup> Fraktion wurden dagegen neben erythrozytären Zellen, Makrophagen und Megakaryozyten konsistent nur Eosinophile und Basophile, aber keine Neutrophilen gefunden (Abb. 47).



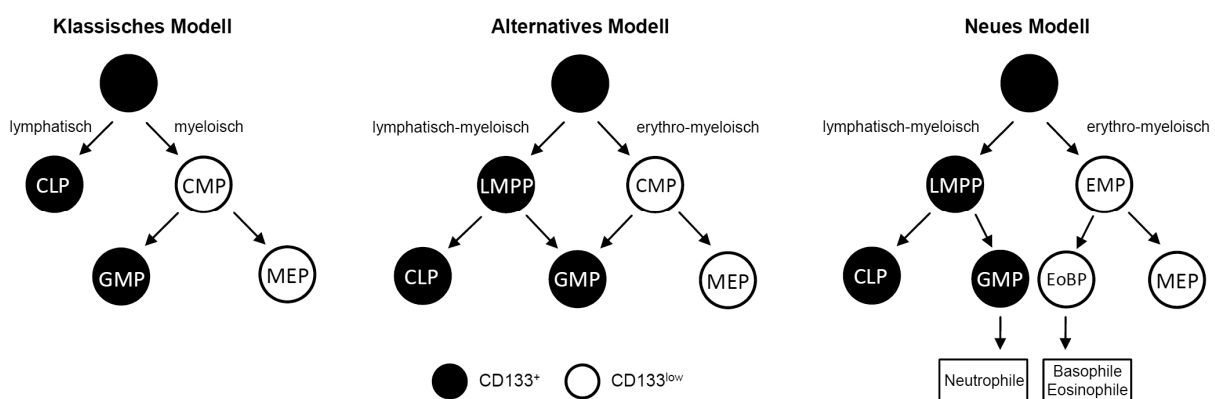
**Abb. 47: Segregation der hämatopoetischen Linienpotenziale in CD34<sup>+</sup> Subpopulationen**

Vereinfachte Darstellung der Ergebnisse nach Untersuchung des Entwicklungspotenzials von CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Zellen. Frisch isolierte CD133<sup>+</sup> Zellen bringen mit der ersten Zellteilung *in vitro* eine CD133<sup>low</sup> Fraktion hervor. Die getrennte Analyse der Linienpotenziale ergab, dass primitive Zellschicksale sowie das Potenzial zur Bildung lymphatischer Zellen und Neutrophiler in der CD133<sup>+</sup> Fraktion erhalten blieb (lymphatisch-myeloisch). In der CD133<sup>low</sup> Fraktion wurden hingegen Basophile, Eosinophile und Erythrozyten sowie Megakaryozyten gefunden (erythro-myeloisch).

Diesen Daten zufolge findet die erste Auftrennung hämatopoetischer Linienpotenziale mit der ersten Zellteilung statt, bei der CD133 mutmaßlich asymmetrisch verteilt wird (Beckmann *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2008), und es entstehen Linien mit lymphatisch-myeloischem und erythro-myeloischem Potenzial. Die lymphatisch-myeloische Linie setzt sich danach aus allen lymphatischen Zellen, Makrophagen und Neutrophilen zusammen, wohingegen in der erythro-myeloischen Linie Erythrozyten, Megakaryozyten, Makrophagen, Eosinophile und Basophile gebildet werden (Abb. 48, neues Modell).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die Auftrennung in (erythro-) myeloische und lymphatische Differenzierungspotenziale ein grundlegendes Prinzip des klassischen hämatopoetischen Modells, wie es nach wie vor in Lehrbüchern

beschrieben wird. Beide klassischen Linien gehen demnach durch eine dichotome Linienabzweigung aus multipotenten Zellen hervor, bei der alle lymphatischen Potenziale von einem gemeinsamen lymphatischen Vorläufer (*common lymphoid progenitor*; CLP) vereint werden, während alle myeloischen Zellen durch einen gemeinsamen myeloischen Progenitor (*common myeloid progenitor*; CMP) gebildet werden. Innerhalb der myeloischen Linie erfolgt dann eine weitere binäre Auftrennung der Linienpotenziale zwischen Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitoren (MEP) und Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren (GMP) (Akashi *et al.*, 2000; Manz *et al.*, 2002) (Abb. 48, klassisches Modell).



**Abb. 48: Vergleich humaner hämatopoetischer Modelle**

Das klassische Modell der humanen Hämatopoese basiert auf einer strikten Trennung zwischen lymphatischer und myeloischer Linie. Vorläufer mit GMP- und MEP-Potenzial werden der myeloischen Linie zugeordnet (Akashi *et al.*, 2000; Reya *et al.*, 2001). Ein alternatives Modell postuliert das Vorhandensein von Zellen mit lymphatischem und myeloischem Potenzial (*lymphoid-primed multipotent progenitor*; LMPP), die parallel zu Zellen mit CMP-Potenzial Granulozyten und Makrophagen hervorbringen können (GMP) (Adolfsson *et al.*, 2005; Goardon *et al.*, 2011). Das auf den Ergebnissen dieser Arbeit basierende, neue hämatopoetische Modell spricht dagegen für eine initiale Auftrennung in lymphatisch-myeloische und erythro-myeloische Linien. Der klassische GMP hat hinsichtlich von Granulozyten das Potenzial zur Bildung von Neutrophilen, während im erythro-myeloischen Zweig Eosinophile und Basophile gebildet werden (EoBP: Eosinophil-Basophiler Progenitor).

Durch die Entdeckung von lymphatischen Vorläuferzellen mit partiellem myeloischen Potenzial wurde dieses Modell in den letzten Jahren im humanen und auch im Maussystem in Frage gestellt (Kawamoto *et al.*, 1999; Adolfsson *et al.*, 2005; Giebel *et al.*, 2006; Kawamoto *et al.*, 2010; Goardon *et al.*, 2011). Es wurden Zellen identifiziert, die lymphatisches und myeloisches GMP-Differenzierungspotenzial aufweisen, aber die Fähigkeit zur Bildung von Zellen der MEP-Linie verloren haben.

Diese Zellen wurden als *lymphoid-primed multipotent progenitors* (LMPPs) bezeichnet (Adolfsson *et al.*, 2005; Goardon *et al.*, 2011) und in vorhergehenden Arbeiten *macrophage-natural killer cell initiating cells* (M-NK-ICs) genannt (Giebel *et al.*, 2006). Zudem wurden T-Zell Vorläufer mit myeloischem Differenzierungspotenzial beschrieben (Bell und Bhandoola, 2008; Hao *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 2008). Im Maussystem konnte gezeigt werden, dass LMPP im Gegensatz zu Zellen mit CMP Potenzial nach Transplantation ein begrenztes Repopulierungspotenzial haben (Adolfsson *et al.*, 2005), während diese Eigenschaft im humanen System für immunphänotypisch definierte Zellen mit LMPP-Potenzial bislang nicht gezeigt werden konnte (Goardon *et al.*, 2011).

Diese Entdeckungen führten zur Formulierung eines alternativen hämatopoetischen Modells (Adolfsson *et al.*, 2005; Goardon *et al.*, 2011). Diesem alternativen Modell zufolge erfolgt die erste Linienauftrennung im hämatopoetischen Baum zwischen LMPP und CMP, wonach beide Zellqualitäten das Potenzial zur Generierung von Zellen mit GMP-Potenzial behalten (Abb. 48, alternatives Modell).

Somit basiert dieses alternative Modell nicht auf dichotomen Linienabzweigungen, sondern das GMP-Potenzial bleibe sowohl im lymphatisch-myeloischen als auch im erythro-myeloischen Ast erhalten. Alle humanen hämatopoetischen Modelle beruhen größtenteils auf Analysen des Differenzierungspotenzials von auf Basis ihres Immunphänotyps fraktionierten Zellpopulationen oder Einzelzellen, die gerade für die verschiedenen Vorläuferentitäten größtenteils *in vitro* erfolgen müssen. Dies führt zwangsläufig dazu, dass erhaltene Daten in Ermangelung einer entsprechend hohen Auflösung und präziser Methoden fehlinterpretiert werden können. In Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans* sind ähnlich hierarchisch aufgebaute Stammzellensysteme deutlich besser verstanden. Wie beispielhaft in der Einleitung für die Entwicklung der peripheren Sinnesorgane bei *Drosophila* beschrieben, erfolgt in solchen präziser analysierten Modellen die Segregation von Linienpotenzialen immer dichotomen Entscheidungen, d. h. bestimmte spezialisierte Zellen gehen letztlich immer nur aus einem Ast solcher hierarchischer Modelle hervor. Beispiele für Systeme, in denen die Differenzierung in bestimmte Zelltypen aus verschiedenen, vorher aufgetrennten Linien erfolgt, liegen nicht vor. Vor diesem Hintergrund ist es einzigartig, dass das GMP-Potenzial im alternativen Modell sowohl vom LMPP als auch vom CMP realisiert werden kann.

Das in dieser Arbeit beschriebene, neue humane hämatopoetische Modell (vgl. Abb. 48) zeigt hingegen im Bezug auf das granulozytäre Entwicklungspotenzial einen dichotomen Charakter. Makrophagen sind demnach die einzigen Zellen, die konsistent sowohl in der erythro-myeloischen als auch in der lymphatisch-myeloischen Linie gefunden wurden. Eine gute Erklärung dafür ergibt sich aus dem myeloisch-basierten Modell, nach dem sich ontogenetisch sehr ursprüngliche, Makrophagen-ähnliche Blutzellen im Laufe der Evolution durch Spezialisierung zu den heutigen Blutzelltypen (z.B. T-Zellen oder Erythrozyten) entwickelt haben. Folglich wären Reste dieser prototypischen hämatopoetischen Zellen in allen entstandenen Linien verblieben (Kawamoto und Katsura, 2009).

In allen bislang veröffentlichten Arbeiten, in denen humane hämatopoetische Modelle postuliert und hinterfragt wurden, findet der Oberflächenmarker CD133 keine Berücksichtigung (Galy *et al.*, 1995; Manz *et al.*, 2002; Majeti *et al.*, 2007; Doulatov *et al.*, 2010; Goardon *et al.*, 2011). Wie die vorliegende Arbeit zeigt, ermöglicht die Verwendung von CD133 eine höhere experimentelle Auflösung als vorhergehende Arbeiten.

Der Expression des Oberflächenmarkers CD133 auf einem Teil humaner CD34<sup>+</sup> Zellen wurde bereits 1997 beschrieben, und bereits in dieser ersten Arbeit wurde gezeigt, dass Vorläufer mit CFU-GM Potenzial eher in der CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> Fraktion angereichert sind, während sich Vorläufer mit erythrozytärem oder CFU-MIX Potenzial in beiden Fraktionen befinden (Yin *et al.*, 1997). In weiterführenden Arbeiten verschiedener Gruppen wurden die Linienpotenziale der beiden durch CD133 aufgetrennten Subpopulationen untersucht, und es wurde übereinstimmend mit den Daten aus der vorliegenden Arbeit beschrieben, dass das erythrozytäre Potenzial in der CD133-negativen Population stark angereichert ist (Matsumoto *et al.*, 2000; Freund *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2010), während das LTC-IC Potenzial und das Potenzial zur Bildung von CFU-GM Vorläufern fast ausschließlich in der CD133-positiven Fraktion angereichert ist (de Wynter *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 2000; Summers *et al.*, 2004; Freund *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2010). Zellen mit CFU-MIX Potenzial wurden wiederum in beiden Fraktionen zu vergleichbaren Anteilen gefunden (Matsumoto *et al.*, 2000; Freund *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2010). Allerdings wurden diese Ergebnisse in keiner der genannten Arbeiten im Kontext des hämatopoetischen Modells diskutiert. Die Auftrennung der beiden untersuchten

Subpopulationen erfolgte in einem Teil der erwähnten Veröffentlichungen durch magnetische Zellseparation (Matsumoto *et al.*, 2000; Freund *et al.*, 2006), was vermutlich dazu geführt hat, dass die in dieser Arbeit definierte und untersuchte CD133<sup>+</sup> Fraktion zwar angereichert wurde, aber mit schwach CD133 exprimierenden Zellen (CD133<sup>low</sup>) kontaminiert war. In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen die beiden erkennbar CD133-positiven Zellpopulationen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> konsequent in hoher Reinheit mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert (vgl. Abb. 16). Ito *et al.* (2010) analysierten sortierte CD133 Subpopulationen ebenfalls nach durchflusszytometrischer Sortierung, allerdings wurde klar zwischen CD133-positiven und CD133-negativen Zellen unterschieden, weshalb auch hier die CD133<sup>low</sup> Fraktion zumindest teilweise bei Isolierung aller CD133-positiven Zellen mit aufgereinigt wurde. Diese Unterschiede in der Isolierungstechnik und der Definition der untersuchten Populationen können somit erklären, warum die in der vorliegenden Arbeit beschriebene deutliche Anreicherung von CFU-MIX Progenitoren in der CD133<sup>low</sup> Fraktion in vorherigen Arbeiten nicht gefunden wurde.

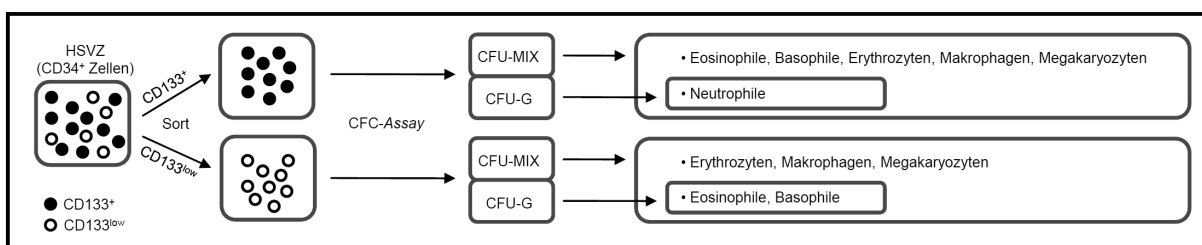
In fast allen Arbeiten zur genaueren Aufklärung der hämatopoetischen Hierarchie wurde bislang immer davon ausgegangen, dass alle Granulozyten-Subtypen vom GMP abstammen und innerhalb einer hämatopoetischen Differenzierungslinie gebildet werden. Dagegen zeigen die Daten in dieser Arbeit überraschend klar, dass innerhalb der lymphatisch-myeloischen Linie, ausgehend vom GMP, nur das Potenzial zur Bildung von neutrophilen Granulozyten enthalten ist, während eosinophile und basophile Granulozyten ausschließlich innerhalb der erythro-myeloischen Linie gebildet werden. Diese klare Unterteilung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nur nach *in vitro* Kultur, sondern nach Analyse frisch isolierter CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> Subpopulationen festgestellt: In beiden Fraktionen sind lichtmikroskopisch erkennbar sowohl CFU-G als auch CFU-MIX Kolonien vorhanden, deren Gehalt verschiedener Granulozyten-Subtypen jeweils mit drei unabhängigen Methoden untersucht wurde.

Es wurde berichtet, dass eine lichtmikroskopische Unterscheidung verschiedener Granulozyten-enthaltender (CFU-G-) Kolonietypen aufgrund der Morphologie der Kolonie, der Größe der enthaltenen Zellen oder der rötlichen Färbung eosinophiler Kolonien möglich ist (Nissen-Druey *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2009). Solche Indizien für verschiedene CFU-G Qualitäten wurden zwar bei Auswertungen von CFC-Ansätzen



in dieser Arbeit auch ansatzweise festgestellt, aufgrund der geringen Unterschiede und der daraus resultierenden hohen möglichen Fehleranfälligkeit aber nicht weiter zur Identifikation von Unterschieden in Betracht gezogen. Stattdessen wurden, wie ausführlich im Ergebnisteil beschrieben, im Rahmen dieser Arbeit Methoden etabliert, die eine eindeutige Unterscheidung der drei Granulozyten-Subtypen (Neutrophile, Eosinophile, Basophile) in Zellen aus hämatopoetischen Kolonien ermöglichen: Mittels durchflusszytometrischer Analysen konnten die in Kolonien enthaltenen Granulozyten ( $CD15^+CD66b^+$ ) genauer aufgetrennt werden. Es zeigte sich, dass innerhalb dieser Population Neutrophile über den Immunphänotyp  $CD16^+/CD49d^-$  von Eosinophilen und Basophilen ( $CD16^-/CD49d^+$ ) abgetrennt werden können. Des Weiteren erfolgte der Nachweis der Granulozyten-Subtypen über die Expression der spezifischen Enzyme MPO (Neutrophile), EPX (Eosinophile) und HDC (Basophile) und nach hämatologischer Kernfärbung nach Wright.

Alle verwendeten Methoden zur Identifizierung der enthaltenen Granulozyten zeigten übereinstimmend, dass von  $CD133^+$  Zellen hervorgebrachten CFU-G Kolonien ( $CD133^+$  CFU-G) ausschließlich Neutrophile enthielten, während in von  $CD133^{low}$  Zellen hervorgebrachten CFU-G Kolonien ( $CD133^{low}$  CFU-G) ausschließlich Basophile und Eosinophile gefunden wurden. In den von frisch isolierten  $CD133^+$  Zellen gebildeten CFU-MIX ( $CD133^+$  CFU-MIX) Kolonien waren nach 14 Tagen neben erythrozytären Zellen größtenteils nur unreife myeloische Zellen enthalten, die nach Replattierung und Kultivierung für weitere 12 Tage alle drei Granulozyten-Subtypen sowie Makrophagen und Megakaryozyten hervorbrachten. Von  $CD133^{low}$  Zellen gebildete CFU-MIX Kolonien enthielten nie Neutrophile, aber Basophile, Eosinophile, Megakaryozyten und Makrophagen (Abb. 49).



**Abb. 49: Enthaltene Granulozyten-Subtypen in Kolonien aus frisch isolierten  $CD34^+$  Zellen**

$CD133^+$  und  $CD133^{low}$  Fraktionen wurden aus frisch isolierten  $CD34^+$  Zellen durchflusszytometrisch isoliert und im CFC-Assay entstehende CFU-MIX und CFU-G Kolonien beider Fraktionen genauer analysiert.  $CD133^+$  CFU-G Kolonien enthielten nur Neutrophile,  $CD133^{low}$  CFU-G Kolonien nur

Eosinophile und Basophile. Neutrophiles Potenzial wurde ausschließlich in CD133<sup>+</sup> CFU-MIX Kolonien und nie in CD133<sup>low</sup> CFU-MIX Kolonien gefunden.

Der Ursprung eosinophiler und basophiler Granulozyten wurde bislang unseres Wissens nach noch nicht umfassend untersucht, möglicherweise aufgrund der Tatsache, dass sie im Blut und Knochenmark anteilig relativ selten vorkommen.

In verschiedenen Arbeiten wurden allerdings in der Vergangenheit bereits Hinweise darauf gefunden, dass Eosinophile und Basophile ihren Ursprung im erythro-myeloischen Kompartiment haben und relativ eng mit Megakaryozyten und Erythrozyten verwandt sind. So wurde beschrieben, dass die leukämische Zelllinie UT-7 basophile, eosinophile, megakaryozytäre und erythrozytäre Differenzierungspotenziale vereint (Hermine *et al.*, 1992), und dass die daraus abgeleitete Zelllinie UT-7D1 und die megakaryozytäre Zelllinie HEL eine Kombination von megakaryozytärem und basophilen Differenzierungspotenzial aufweisen (Dy *et al.*, 1999). Des Weiteren wurden erythro-eosinophile Kolonien beschrieben, die nach Replattierung ausschließlich eosinophile und erythrozytäre Kolonien bildeten (Nakahata *et al.*, 1982).

In den CD133<sup>low</sup> CFU-MIX und CFU-G Kolonien wurden auch hohe Anteile von Leukozyten mit eosinophilen und basophilen Granula gefunden. Das Vorkommen solcher „Hybrid“-Granulozyten wurde bereits in den 1970er und 1980er Jahren nach Analyse von Zellen einzelner Leukämiepatienten beschrieben (Poch *et al.*, 1973; Mlynek und Leder, 1986; Weil und Hrisinko, 1987), woraus geschlossen wurde, dass gemeinsame Eosinophil-Basophile Progenitoren (EoBP) existieren (Denburg *et al.*, 1985; Leary *et al.*, 1985; Boyce *et al.*, 1995). Folglich repräsentieren die in von CD133<sup>low</sup> Zellen gebildeten Kolonien gefundenen gemischt-granulierten, granulozytären Zellen vermutlich einen gemeinsamen Vorläufer der Eosinophilen und Basophilen (Eosinophil-Basophiler Progenitor, EoBP). Ob dieser Vorläufer bipotent ist und nur noch das Potenzial zur Bildung von Eosinophilen und Basophilen oder möglicherweise noch primitiver ist und noch megakaryozytäres oder erythrozytäres Potenzial hat, lässt sich anhand der vorhandenen Daten nicht aussagen.

Kürzlich wurde in der Gruppe um Koichi Akashi gezeigt, dass im Gegensatz zum Maussystem humane Eosinophilen-Vorläufer nicht von GMPs oder MEPs abstammen (Mori *et al.*, 2009), was nahelegt, dass die Entwicklung der Granulozyten-Subtypen im Maussystem möglicherweise anders ist als im humanen

System. Analysen der Expression von Transkriptionsfaktoren in derselben Gruppe haben gezeigt, dass die Expression von PU.1 sich im Maus-System auf Zellen der granulozytär-monozytären und lymphatischen Linie beschränkt. Im Gegensatz dazu wurde die Expression des Transkriptionsfaktors Gata-1 nur in Zellen der megakaryozytären-erythrozytären Linie und in gemeinsamen myeloischen Vorläufern (CMP, vor dem Hintergrund des neuen Modells vermutlich der in dieser Arbeit beschriebene EMP) gefunden (Arinobu *et al.*, 2007). Dabei wurde gezeigt, dass als CMP definierte Zellen Granulozyten-Makrophagen-Potenzial innehaben, es wurde allerdings nicht analysiert, ob es sich bei den gebildeten Granulozyten um Neutrophile, Basophile oder Eosinophile handelt (Arinobu *et al.*, 2007). Da die Regulation der Transkriptionsfaktoren PU.1 und Gata-1 im humanen System ähnlich zu sein scheint und wahrscheinlich zwischen murinem und humanem System konserviert ist (Mori *et al.*, 2009), sind vermutlich die Gata-1-positiven, vom „CMP“ hervorgebrachten Granulozyten basophile und eosinophile und keine neutrophilen Granulozyten. In Übereinstimmung dazu wurde gezeigt, dass im Maus-System die Realisierung der eosinophilen und basophilen Linie und auch die Bildung von Mastzellen, die im Maussystem einen gemeinsamen Vorläufer mit Basophilen haben (Arinobu *et al.*, 2005), Gata-1 abhängig ist (Harigae *et al.*, 1998; Iwasaki *et al.*, 2006). Zusammenfassend wäre also zu erwarten, dass die in unserem Modell postulierte Auftrennung zwischen lymphatisch-myeloischer und erythro-myeloischer Linie durch die differenzielle Expression von GATA-1 und PU.1 widergespiegelt wird.

Tatsächlich zeigte sich, dass GATA-1 in durchflusszytometrisch isolierten (Tag 3) CD133<sup>low</sup> Zellen exprimiert ist, wurde aber nicht in CD133<sup>+</sup> Zellen detektiert. Dagegen wurde in CD133<sup>low</sup> Zellen eine deutlich geringere PU.1 Expression gefunden als in CD133<sup>+</sup> Zellen (vgl. Kapitel 3.2.14). Somit scheint PU.1 für die Realisierung lymphatisch-myeloischer Zellschicksale wichtig zu sein, während GATA-1 für die erythro-myeloische Differenzierung benötigt wird. Bei der Realisierung megakaryozytärer und erythrozytärer Zellschicksale spielen auch die Transkriptionsfaktoren GATA-2 und FOG-1 eine wichtige Rolle (Akashi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2009), welche in Übereinstimmung mit dem neuen Modell ebenfalls in CD133<sup>low</sup> Zellen stärker exprimiert waren. Der bei der Realisierung der GMP-Linie wichtige Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  (Akashi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2009) war in Zellen der CD133<sup>+</sup> Fraktion stärker exprimiert, was ebenfalls zu dem in dieser Arbeit

postulierten Modell passt. Zur genaueren Aufklärung sollten weitere Versuche, auch an nicht kultivierten Zellen und an mit Hilfe weiterer Marker aufgetrennten Subpopulationen durchgeführt werden. Die auch hier nur durch Verwendung des Markers CD133 vorgefundene Auftrennung der Expression der genannten linienspezifischen Transkriptionsfaktoren untermauert die auf den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse basierende klare Segregation erythro-myeloischer (CD133<sup>low</sup>) von lymphatisch-myeloischen (CD133<sup>+</sup>) Zellschicksalen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Arten von Vorläufern mit CFU-MIX Potenzial identifiziert: CD133<sup>+</sup> CFU-MIX Kolonien enthielten neutrophiles Differenzierungspotenzial, bestanden nach 14 Tagen im CFC-Ansatz aus fast ausschließlich sehr unreifen Zellen und brachten nach Replattierung sekundären Kolonien hervor. CD133<sup>low</sup> CFU-MIX Kolonien bestanden dagegen bereits nach 14 Tagen im CFC-Ansatz aus deutlich reiferen Zellen und brachten keine sekundären Kolonien hervor. Folglich sind Vorläufer mit CD133<sup>low</sup> CFU-MIX-Potenzial erythro-myeloische Progenitoren (EMP), während CD133<sup>+</sup> CFU-MIX Kolonien wahrscheinlich von multipotenten Progenitorzellen (MPP) oder hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) abstammen. Dafür spricht auch, dass der Anteil der Zellen mit CFU-MIX Potenzial innerhalb der CD133<sup>+</sup> Fraktion ( $2,5 \pm 0,8\%$ ;  $n=6$ ) im Vergleich zum Anteil der in der CD133<sup>+</sup> Fraktion enthaltenen Zellen mit LTC-IC oder NK-IC Potenzial deutlich geringer ist. Somit ergäbe sich, bei Umrechnung dieses Anteils auf die gesamte CD34<sup>+</sup> Fraktion (ausgehend von 75% CD133<sup>+</sup> Zellen), dass ca. 1 von 50 frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen multipotent (CD133<sup>+</sup> CFU-MIX) ist, während erfahrungsgemäß ca. 1 von 25 frisch isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen LTC-IC-Potenzial haben. Nach Kultivierung für 50-60 h nahm der Anteil der Zellen mit CFU-MIX Potenzial innerhalb der CD133<sup>+</sup> Fraktion drastisch ab ( $0,7 \pm 0,5\%$ ;  $n=8$ ), während der Anteil der Zellen mit LTC-IC- ( $5,8 \pm 2,3$ ;  $n=4$ ) und NK-IC-Potenzial ( $7,6 \pm 3,6$ ;  $n=4$ ) innerhalb der CD133<sup>+</sup> Fraktion weiterhin deutlich höher war. Im weiteren Kultivierungsverlauf waren an Tag 6 bereits keine CD133<sup>+</sup> Zellen mit CFU-MIX Potenzial mehr detektierbar (vgl. Abb. 26).

In diesem Zusammenhang ist auffällig, dass in ungefähr gleichem Maße der schon bei frisch isolierten Zellen sehr geringe Anteil an roten Kolonien (BFU-E) in der CD133<sup>+</sup> Fraktion abnahm. Solche erythrozytär determinierten Vorläuferzellen in der CD133<sup>+</sup> Fraktion passen nicht zu dem hier postulierten Modell. Eine mögliche

Erklärung ist, dass es sich bei diesen Zellen um kontaminierende Zellen aus der CD133<sup>low</sup> Fraktion handelt. Die sehr ähnliche Kinetik in der Abnahme des Gehaltes an roten Kolonien zu denen der CFU-MIX Kolonien in der CD133<sup>+</sup> Fraktion im Laufe der Kultivierung deutet allerdings eher darauf hin, dass es sich auch um CFU-MIX Kolonien handelt und dass die erfahrungsgemäß wenigen myeloischen Zellen in diesen CFU-MIX Kolonien von massiv proliferierenden, erythrozytären Zellen verdeckt wurden. Von derartigen Schwierigkeiten, dass sich als BFU-E klassifizierte Kolonien nach genauerer Analyse als CFU-MIX Kolonien herausstellten, wurde bereits in den 1970er Jahren berichtet (Johnson und Metcalf, 1977). Somit handelt es sich vermutlich bei den wenigen als BFU-E eingestuft Kolonien in der CD133<sup>+</sup> Fraktion um CFU-MIX Kolonien, was in weiteren Versuchen durch sekundäre Replattierung und genauere Analyse der enthaltenen Zellqualitäten überprüft werden sollte. Zusammenfassend wird durch die gewählten Kultivierungsbedingungen somit der Erhalt multipotenter Zellen (MPP/HSZ) nicht unterstützt, da innerhalb weniger Zellteilungen das multipotente Potenzial (CD133<sup>+</sup> CFU-MIX) komplett verloren geht.

Um diesen Befund *in vivo* zu überprüfen, wurden Tag 9 CD133<sup>+</sup> Zellen (die *in vitro* jegliches erythrozytäre Potenzial verloren hatten) vergleichend mit Tag 3 CD133<sup>+</sup> Zellen in NSG-Mäuse transplantiert, was bei beiden Zellfraktionen nach klassischen Maßstäben zu einem Multi-Linien *Engraftment* (humane lymphatische und myeloische Zellen) führte. Nach jeweiliger Isolierung der humanen CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark der Mäuse zeigten allerdings im CFC-Ansatz CD34<sup>+</sup> Zellen aus mit Tag 9 CD133<sup>+</sup> transplantierten Mäusen keinerlei erythrozytäres Potenzial, während CD34<sup>+</sup> Zellen aus mit Tag 3 CD133<sup>+</sup> Zellen transplantierten Mäusen dieses Potenzial zeigten. Die Analyse des erythrozytären Potenzials erfolgte *in vitro*, da generell in NOD/SCID- oder NSG-Mäusen die Reifung humaner erythrozytärer und megakaryozytärer Zellen nicht ausreichend unterstützt wird, um eindeutige Aussagen über das Vorhandensein oder das Fehlen dieses Potenzials treffen zu können (Mazurier *et al.*, 2003; Manz, 2007). Folglich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass wie bereits im Maussystem beschrieben (Adolfsson *et al.*, 2005), zwei verschiedene Arten von SCID-repopulierenden Zellen (SRZ) existieren. Im Kontext des neuen hämatopoetischen Modells bedeutet das, dass die SRZ mit erythrozytärem Differenzierungspotenzial multipotente Zellen (MPP/HSZ) widerspiegeln, die innerhalb weniger Zellteilungen *in vitro* verloren gehen und

lymphatisch-myeloische Zellen hervorbringen, die nach wie vor NSG-Mäuse repopulieren können, ihr erythrozytäres Potenzial aber verloren haben (LMPP).

Obwohl in dieser Arbeit die Analysen zur Redefinition des humanen hämatopoetischen Modells nur unter der Verwendung der Marker CD34 und CD133 erfolgten, ist es im Hinblick auf die genauere Analyse bestimmter Entscheidungsprozesse zwischen einzelnen Linien (z.B. ausgehend vom EMP die Entscheidung EoBP versus MEP) sinnvoll, die Immunphänotypen aller Zwischenstufen innerhalb der Hierarchie herauszufinden und somit eine prospektive Isolierung einzelner Vorläuferentitäten zu ermöglichen. Folglich sollten, wie bereits begonnen, im Kontext des neuen Modells bereits bekannte Oberflächenmarker-Kombinationen in Verbindung mit CD133 nach durchflusszytometrischer Sortierung auf ihr Linienpotenzial getestet werden.

Zusammengenommen hat die Redefinition des hämatopoetischen Modells Konsequenzen auf die Beurteilung der Multipotenz z.B. nach *in vitro* Expansion humaner HSVZ. Klassischerweise werden zu testende Zellen, so auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, in NOD/SCID- oder NSG-Mäuse transplantiert, und nach ca. 2 Monaten wird das Knochenmark der Mäuse durchflusszytometrisch mit humanspezifischen Antikörpern auf das Vorhandensein lymphatischer Zellen (z.B. CD19/CD20 für B-Zellen) und myeloischer Zellen (CD15/CD66b für Granulozyten) getestet. Auch in verschiedenen *in vitro*-Verfahren, z.B. dem ML-IC- (*myeloid-lymphoid initiating cell*-) Ansatz, wurde aufgrund des Vorhandenseins von Zellen mit myeloischem und lymphatischem Potenzial in der Nachkommenschaft einzelner Zellen darauf geschlossen, dass die untersuchte Zelle multipotent war (Punzel *et al.*, 1999c). Im Kontext des neuen hämatopoetischen Modells kann allerdings mittels dieser Verfahren, und auch anhand der Expression von CD133 allein, nicht eindeutig zwischen multipotenten Zellen und Zellen mit LMPP-Potenzial unterschieden werden. Insofern können diese Methoden zu Fehlinterpretationen führen, da der komplette EMP-Differenzierungsweig nicht berücksichtigt wird. Folglich müsste zur Beurteilung der Multipotenz einer Zelle die Nachkommenschaft mindestens auf lymphatisches Potenzial und erythrozytäres, megakaryozytäres oder eosinophiles/basophiles Differenzierungspotenzial analysiert werden. Wie bereits erwähnt, wird die Entwicklung der humanen erythrozytären/megakaryozytären Linie in klassischen Mausmodellen, vermutlich

aufgrund mangelnder Kreuzreaktivität muriner Zytokine, nicht unterstützt, und die Reifung humaner eosinophiler oder basophiler Granulozyten nach Maus-Repopulierung wurde bislang nicht untersucht. Möglicherweise lassen sich diese Limitierungen im Maus-Repopulierungsansatz durch kürzlich entwickelte, humanisierte Mäusstämme lösen, in denen humane Zytokine exprimiert werden (Rongvaux *et al.*, 2011; Willinger *et al.*, 2011). Auch klonale *in vitro*-Analyseverfahren, in denen sowohl die lymphatische als auch die erythrozytäre oder megakaryozytäre Differenzierung unterstützt wird, wären für die Beurteilung der Multipotenz hilfreich, bislang gibt es allerdings solche Verfahren nicht.

Somit zeigt sich, dass das multipotente Entwicklungspotenzial in HSVZ, einhergehend mit der ersten Zellteilung, nach 2-3-tägiger Kultivierung *in vitro* verloren geht. Analysen von aus Maus-Knochenmark isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen legen hingegen nahe, dass dieses Potenzial nach Transplantation von CD133<sup>+</sup> (Tag 3) Zellen in NSG-Mäusen für 8 Wochen erhalten blieb (vgl. Abschnitt 3.2.9). Folglich sind die verwendeten Kulturbedingungen zur Erhaltung multipotenter Zellen nicht ausreichend, während die hämatopoetische Stammzellnische im Knochenmark der Mäuse anscheinend Faktoren enthält, die den Erhalt multipotenter Potenziale fördern. Dabei ist vermutlich ein komplexes Netzwerk verschiedener Faktoren beteiligt. Ein in diesem Zusammenhang identifizierter Faktor ist, wie bereits erwähnt, die Aktivität des Notch-Signalweges (Calvi *et al.*, 2003).

In diesem Kontext war interessanterweise bei Experimenten zur Untersuchung der Notch-Funktion an Kulturtag 6 bei unbehandelten Kontrollzellen der Anteil der Zellen mit erythrozytärem und CFU-MIX Potenzial in der CD133<sup>+</sup> Fraktion nach OP9-DL1-Kokultur deutlich erhöht (vgl. Abb. 15). Bei Berücksichtigung des neuen hämatopoetischen Modells spricht das dafür, dass die Aktivierung des Notch-Signalweges den Selbsterhalt multipotenter hämatopoetischer Zellen erhöht. Übereinstimmend dazu wurde in der Literatur vielfach über einen positiven Einfluss der Aktivierung des Notch-Signalweges durch den Liganden Delta-like1 (Dll1) auf die Aufrechterhaltung primitiver hämatopoetischer Zellschicksale berichtet (Han *et al.*, 2000; Ohishi *et al.*, 2002; Varnum-Finney *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2006; Mayani, 2010). Nach ersten Erfolgen durch Kultivierung von humanen HSVZ in Anwesenheit von Dll1 unter klinisch anwendbaren Bedingungen läuft mittlerweile die erste

---

klinische Studie, in der HSVZ aus Nabelschnurblut vor Transplantation mit Hilfe des Notch-Liganden expandiert werden (Delaney *et al.*, 2010).

## 4.2 Die Rolle von Numb in der humanen Hämatopoese

Vor dem Hintergrund des im vorherigen Abschnitt beschriebenen, neuen hämatopoetischen Modells lassen sich die Ergebnisse des ursprünglichen Projektes, in dem die Rolle des als Notch-Antagonist bekannten Proteins Numb in der humanen Hämatopoese näher aufgeklärt werden sollte, besser einordnen.

Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt (Spanholtz, 2005; von Levetzow, 2008), dass nach transienter Überexpression aller vier Numb-Isoformen in CD34<sup>+</sup> Zellen die Frequenz erythrozytärer Vorläufer deutlich zunahm, was mit der geringfügig verringerten Fähigkeit zur Bildung weißer myeloischer und gemischter Kolonien einherging. Zudem war der Anteil primitiverer myeloischer Zellen (LTC-IC) nach Numb-Überexpression verringert. In diesen Experimenten war die Numb-Funktion jeweils nach transienter Transfektion mittels Nukleofektion analysiert worden, was zu einer deutlichen Verminderung der Zellvitalität und zu Beeinflussungen des Zellschicksals der Zellen durch die Methode *per se* führte (Spanholtz, 2005; von Levetzow, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb lentivirale Numb-Überexpressionskonstrukte hergestellt und die Überexpressions-Versuche nach stabiler, lentiviraler Transduktion wiederholt, da sich diese Methode der genetischen Manipulation als deutlich schonendere und im Hinblick auf Zellschicksalsveränderungen als neutral herausgestellt hatte. Dabei zeigten sich tendenziell ähnliche, aber deutlichere Effekte.

Nach Überexpression aller vier Numb-Isoformen wurden im CFC-Ansatz deutlich mehr rote Kolonien und gleichzeitig signifikant weniger gemischte (CFU-MIX) Kolonien gebildet. Des Weiteren war die Frequenz der gebildeten weißen Kolonien jeweils nach Überexpression aller vier Numb-Isoformen insgesamt leicht reduziert.

Nach transientem *Knockdown* von *Numb* wurden dagegen weniger rote und mehr gemischte Kolonien gebildet. Dieser Effekt war nach gleichzeitigem *Knockdown* von *Numb* und dem homologen *Numblike* noch deutlich verstärkt, was auf eine redundante Wirkung von *Numblike* hindeutet. Der *Knockdown* von *Numb/Numblike* führte auch zu einer signifikanten Reduktion des Gesamtanteils weißer myeloischer Kolonien. Die Anteile der verschiedenen weißen Koloniearten (CFU-GM, -M, -G) war



allerdings nicht signifikant verändert, was darauf hindeutet, dass entweder alle Kolonietypen gleichermaßen seltener gebildet wurden oder die Unterschiede aufgrund der begrenzten Auflösung in diesen Versuchen, in denen die gesamte CD34<sup>+</sup> Population untersucht wurde, zu gering waren. Da sowohl nach Überexpression als auch nach *Knockdown* in allen Ansätzen die Gesamtzahl der gebildeten CFC-Kolonien nicht signifikant verändert war, kann insgesamt davon ausgegangen werden, dass die genetische Manipulation der Numb-Expression zu einer Veränderung von Zellschicksalsentscheidungen in HSVZ geführt hat. Es wäre zwar z.B. denkbar, dass die Fähigkeit zur Bildung bestimmter Kolonietypen, resultierend aus der genetischen Manipulation, in einer Population der CD34<sup>+</sup> Zellen verloren geht und gleichzeitig in ähnlichem Umfang einer anderen Population induziert wird oder vermehrt vorhanden ist, aber dieses Szenario ist sicherlich weniger wahrscheinlich und kann deshalb vernachlässigt werden.

Für eine Beeinflussung von Zellschicksalsentscheidungen sprechen auch die Befunde aus in *in vitro* Langzeit-Analyseverfahren. Nach Numb-Überexpression war jeweils die LTC-IC Frequenz deutlich vermindert, und auch in diesem Analyseverfahren war nach alleinigem *Knockdown* von *Numb* die LTC-IC Rate nur marginal beeinflusst, aber nach gleichzeitigem *Knockdown* von *Numb* und *Numblike* im Mittel fast dreimal höher. Vergleichbare redundante Wirkungen von Numb und Numblike wurden z.B. bei der neuralen Entwicklung der Maus gefunden (Petersen *et al.*, 2002). Folglich scheint Numb die Differenzierung von HSVZ in die erythrozytäre Linie zu induzieren und die Aufrechterhaltung primitiver Zellschicksale zu inhibieren.

In Übereinstimmung dazu wurde nach Überexpression aller vier Numb-Isoformen innerhalb weniger Tage eine im Vergleich zu den Kontrollzellen deutliche Reduktion des Anteils der CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen beobachtet. Das lässt bei Berücksichtigung des neuen hämatopoetischen Modells grundsätzlich darauf schließen, dass der Anteil der multipotenten Zellen (MPP/HSZ) und/oder Zellen mit lymphatisch-myeloischem Potenzial (LMPP) vermindert war und sich der Anteil von Zellen mit erythro-myeloischem Potenzial erhöht hat. Da multipotente Zellen ebenso wie Zellen mit LMPP-Potenzial innerhalb der CD133<sup>+</sup> Fraktion zu finden sind, ist unklar, ob die verminderte Frequenz von CFU-MIX Kolonien und Zellen mit LTC-IC Potenzial aus einem Verlust von multipotenten Zellen oder LMPP resultierte. Die Kinetik der Expression von CD133 über die Zeit hinweg und die verminderten Anteile der

CD133<sup>low</sup> Fraktion im Knochenmark von mit Tag 9 CD133<sup>+</sup> Zellen transplantierten Mäusen suggerieren allerdings, dass die Segregation erythro-myeloischer Zellschicksale zwingend mit der Bildung der CD133<sup>low</sup> Fraktion (CD34<sup>+</sup>CD133<sup>low</sup>) einhergeht. Zellen mit LMPP-Potenzial differenzieren hingegen scheinbar direkt zu CD34<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup> Zellen. Da nach Numb-Überexpression die Anteile der CD34<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup> Zellen nicht verändert waren und die Anteile der (CD34<sup>+</sup>)CD133<sup>low</sup> Fraktionen vergleichbar waren (vgl. Abb. 12), lässt sich vermuten, dass die Überexpression von Numb tatsächlich die Spezifizierung multipotenter Zellen in die erythro-myeloische Linie induziert. Zur genaueren Klärung dieser Frage sollten CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> (Tag 3) Zellen nach Numb-Überexpression in Folgeversuchen einzeln analysiert werden.

Vor dem Hintergrund der verstärkten Bildung roter Kolonien bei gleichzeitiger Reduktion der Bildung gemischter Kolonien, die bei unmanipulierten CD34<sup>+</sup> Zellen fast ausschließlich innerhalb der CD133<sup>low</sup> Fraktion zu finden sind, lässt sich weiterhin folgern, dass Numb humane CD34<sup>+</sup> Zellen nicht nur verstärkt in die erythro-myeloische Linie (CD133<sup>low</sup>) drängt, sondern massiv die weitere Differenzierung in die erythrozytäre Linie induziert. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass in der heterogenen CD34<sup>+</sup> Population neben multipotenten Zellen auch hohe Anteile bereits linienspezifischer Progenitorzellen enthalten sind. Vor diesem Hintergrund scheint es wahrscheinlich, dass durch die Numb-Überexpression z.B. vorhandene Zellen mit EMP-Potenzial (entspricht CD133<sup>low</sup> CFU-MIX) in die erythrozytäre Linie gedrängt werden, somit ihr Potenzial zur Bildung von Eosinophilen und Basophilen verlieren und deshalb der Anteil gemischter Kolonien reduziert ist. Insofern reguliert Numb wahrscheinlich die Entscheidungen zwischen lymphatisch-myeloischer *versus* erythro-myeloischer Linie und MEP- *versus* EoBP-Linie. Ob Numb funktionell auch an anderen, z.B. lymphatischen Differenzierungsprozessen beteiligt ist oder ebenfalls die Differenzierung in die megakaryozytäre Linie fördert, bleibt weitgehend offen.

Der gleichzeitige *Knockdown* von *Numb* und *Numblike* führte zu deutlich weniger roten und mehr CFU-MIX Kolonien sowie höheren LTC-IC Raten, aber zu keiner veränderten CD133-Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Dabei ist allerdings zu beachten, dass für die funktionellen Analysen nach *Numb/Numblike-Knockdown* jeweils die gesamte CD34<sup>+</sup> Fraktion und nicht die durch CD133 trennbaren Subpopulationen analysiert wurden. Insofern bleibt offen, ob die nach

*Knockdown* verstärkt entstandenen CFU-MIX Kolonien von MPP bzw. HSZ (CD133<sup>+</sup>), von Zellen mit EMP-Potenzial (CD133<sup>low</sup>) oder von beiden Zellentitäten abstammen. Da auch die LTC-IC Rate nach *Numb/Numblike Knockdown* deutlich erhöht war und das LTC-IC Potenzial in unmanipulierten Zellen der CD133<sup>+</sup> Fraktion zuzuordnen ist, spricht das dafür, dass tatsächlich der Erhalt multipotenter Zellschicksale durch die Abwesenheit von *Numb* (und *Numblike*) begünstigt wurde. Andererseits lag der Gesamtanteil gemischter Kolonien nach *Numb/Numblike Knockdown* im Mittel bei fast 20% und der mittlere Anteil der Zellen mit LTC-IC Potenzial bei ungefähr 10%, insofern entstammen die CFU-MIX Kolonien vermutlich sowohl multipotenten Zellen als auch Zellen mit EMP-Potenzial.

Zur weiteren Aufklärung der Rolle von *Numb* bei der Zellschicksalsspezifikation humaner HSVZ sollten folglich weitere Versuche nach genetischer Manipulation der *Numb*-Expression nach durchflusszytometrischer Sortierung der beiden CD133 Fraktionen im CFC-Ansatz erfolgen. Dabei wäre es sinnvoll, auch die Granulozyten in entstehenden Kolonien und das megakaryozytäre Differenzierungspotenzial im MK-Ansatz zu analysieren. Im Hinblick auf sich anbietende, mehrere Monate dauernde Maus-Repopulierungsexperimente nach *Knockdown* von *Numb* und *Numblike* in CD34<sup>+</sup> Zellen sollte die Herunterregulation der Expression beider Gene stabil mittels lentiviraler RNAi-Konstrukte erfolgen. Sofern der *Numb/Numblike Knockdown* tatsächlich zu einer Expansion hämatopoetischer Stammzellen führt, sollte das auch zu deutlich höherem *Engraftment* in NSG-Mäusen führen.

An HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass *Numb* für die Zellmigration funktionell wichtig ist (Nishimura und Kaibuchi, 2007). Insofern könnte der *Knockdown* von *Numb* zu Migrationsdefekten führen, was vermutlich im Maus-Repopulierungsexperiment das *Homing* der Zellen ins Knochenmark beeinflussen würde. Somit es vor Durchführung von Repopulierungsexperimenten sinnvoll, nach *Numb/Numblike-Knockdown* in CD34<sup>+</sup> Zellen deren Fähigkeit, ins Knochenmark von Mäusen einzuwandern, durch sogenannte *Homing*-Experimente zu direkt zu quantifizieren (Görgens *et al.*, 2012). Des Weiteren könnten Migrationsdefekte, z. B. durch intrafemorale Injektion der Zellen direkt ins Knochenmark der Mäuse, umgangen werden. Ein Vorteil der Testung im Maus-Repopulierungsansatz wäre zudem die Möglichkeit, die Rolle von *Numb* in lymphatischen Differenzierungsprozessen zu untersuchen.

### 4.3 Numb und der Notch-Signalweg

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob Numb in humanen HSVZ, ähnlich wie z.B. bei der in der Einleitung erwähnten SOP-Entwicklung von *Drosophila melanogaster*, als Antagonist des Notch-Signalweges fungiert. Die Ergebnisse der analog zu den oben beschriebenen Versuchen nach Numb-Überexpression durchgeführten Experimente nach Induktion des Notch-Signalweges durch Expression der intrazellulären Domäne von Notch-1 (Notch1-ICD) deuteten teilweise darauf hin. So führte die Expression von Notch1-ICD im CFC-Ansatz zu weniger roten und mehr CFU-MIX Kolonien, also zu tendenziell ähnlichen Effekten wie nach *Knockdown* von *Numb* und *Numblike*. Nach Numb-Überexpression war der Effekt genau umgekehrt (mehr rote, weniger CFU-MIX Kolonien), was in Übereinstimmung mit Vordaten aus der Dissertation von Gregor von Levezow (von Levezow, 2008) auf eine zu Notch antagonistische Wirkweise von Numb hindeutete.

Die transiente Expression von Notch1-ICD in CD34<sup>+</sup> Zellen hatte in Vorarbeiten (von Levezow, 2008) zu einer erhöhten LTC-IC Rate geführt, die stabile, lentivirale Expression in dieser Arbeit führte führte dagegen zu einer fast völligen Depletion von Zellen mit LTC-IC Potenzial. Einerseits könnte das dadurch erklärt werden, dass die stabile Aktivierung des Notch-Signalweges in diesem *in vitro* Langzeitkulturverfahren die Differenzierung primitiver myeloischer Zellen blockiert, andererseits spricht die gleichzeitige drastische Abnahme der Expression von CD133 innerhalb weniger Tage dafür, dass durch Aktivierung des Notch-Signalweges multipotente CD133<sup>+</sup> Zellen in die erythro-myeloische Differenzierung (CD133<sup>low</sup>) gedrängt werden. Somit würde die deutlich erhöhte Rate an CFU-MIX Kolonien Zellen mit EMP-Potenzial repräsentieren. Im Weiteren wird durch den aktivierten Notch-Signalweg anscheinend die erythrozytäre Differenzierung inhibiert. Diese Vermutung wird durch den Befund gestützt, dass in der murinen Hämatopoese die Aktivierung des Notch-Signalweges zu vermehrter Differenzierung in Richtung der MEP-Linie führt, dann aber die erythrozytäre Differenzierung blockiert und die megakaryozytäre Entwicklung fördert (Mercher *et al.*, 2008). Ähnliche Effekte wurden auch für die humane erythro-megakaryozytäre Zelllinie K562 beschrieben (Lam *et al.*, 2000; Ishiko *et al.*, 2005). In diesem Kontext scheint also die Induktion des Notch-Signalweges zur Numb-Überexpression gegenteilige Effekte zu haben. Während

Numb die erythrozytäre Differenzierung fördert, wird diese durch Notch inhibiert. In diesem Kontext wäre es interessant zu untersuchen, ob die Induktion von Notch bzw. die Überexpression von Numb in humanen HSVZ die megakaryozytäre Differenzierung beeinflussen. Entsprechende Versuche konnten aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden, da die letzten Ergebnisse und damit genauere Erkenntnisse über das neue hämatopoetische Modell erst kurz vor Beendigung dieser Arbeit vorlagen.

Um zu testen, ob Numb die Aktivierung des Notch-Signalweges in CD34<sup>+</sup> Zellen verhindert, wurden Numb-überexprimierende und zur Kontrolle dnMAML1-exprimierende CD34<sup>+</sup> Zellen unter Notch-induzierenden (OP9-DL1) und nicht-induzierenden (OP9-GFP) Bedingungen kultiviert und an Kulturtag 6 analysiert. Der im vorherigen Abschnitt bereits diskutierte Effekt, dass nach Kokultivierung mit der Linie OP9-DL1 mehr Zellen mit erythrozytärem Potenzial in der CD133<sup>+</sup> Fraktion (mutmaßlich multipotente Zellen) zu finden waren, wurde durch die Expression von dnMAML1 aufgehoben. Das spricht dafür, dass dieser Effekt direkt durch Aktivierung des Notch-Signalweges hervorgerufen wurde und dass die Aktivierung des Notch-Signalweges effizient durch dnMAML1 verhindert wurde. Insofern hätte die Numb-Expression, sofern Numb die Notch-Aktivierung verhindert, zu ähnlichen Effekten führen müssen. Die Quantifizierung der Expression der Notch-Zielgene *Hes1*, *Hey1* und *Deltex1* ergab allerdings, dass deren Hochregulierung zwar nach Expression von dnMAML1 verhindert wurde, aber in Numb-überexprimierenden CD34<sup>+</sup> Zellen sogar stärker induziert wurde. Somit legen die Ergebnisse nahe, dass Numb in der humanen Hämatopoese eine wichtige funktionelle Rolle spielt, diese aber nicht durch direkte Antagonisierung des Notch-Signalweges erfolgt.

Die Aktivierung des Notch-Signalweges kann allerdings bei der Selbsterneuerung multipotenter HSVZ und bei der Differenzierung, je nach Linienentscheidung in der Hämatopoese, unterschiedliche Bedeutungen haben und auch unterschiedlich reguliert werden. Neben der bereits erwähnten verstärkten Expansion humaner HSZ durch Induktion von Notch-Aktivität mittels Dll1 ist z.B. bekannt, dass durch die Kokultivierung von HSVZ mit der Linie OP9-DL1 die T-Zell Differenzierung induziert wird (La Motte-Mohs *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde durch Kokultivierung humaner HSVZ mit verschiedenen stark Dll1- und Delta-like4 (Dll4)-exprimierenden Stromazelllinien gezeigt, dass sowohl die Liganden selbst als auch die

Expressionsstärke des Liganden auf der signalgebenden Zelle das Linien-Differenzierungspotenzial im lymphatisch-myelolischen Kompartiment verändern können (Mohtashami *et al.*, 2010). Weitere Arbeiten zeigen, dass die Notch-Aktivität z.B. bei der T-Zell-Reifung im Thymus eine andere Bedeutung als in der HSZ-Nische im Knochenmark hat (Roozen *et al.*, 2012). Da die Expression der Notch-Zielgene in Präparationen aus der gesamten CD34<sup>+</sup> Fraktion analysiert wurde, kann folglich grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, dass Numb bei einzelnen Linienentscheidungen wie z.B. der T-Zell Spezifikation, funktionell doch als Antagonist des Notch-Signalweges wirkt.

Da dies, wie bereits ausgeführt, in der humanen Hämatopoese nicht grundsätzlich der Fall zu sein scheint, sollte der zugrundeliegende Mechanismus, wie Numb Zellschicksalsentscheidungen in humanen HSVZ reguliert, näher untersucht werden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, legen kürzlich veröffentlichte Daten nahe, dass die Antagonisierung des Notch-Signalweges in *Drosophila* durch den Kofaktor Sanpodo vermittelt wird (Couturier *et al.*, 2012; Giebel und Wodarz, 2012). Es wäre also denkbar, dass die Numb-Funktion im humanen hämatopoetischen System ebenfalls von weiteren, bislang nicht identifizierten Kofaktoren abhängt, über deren differenzielle Expression bzw. konditionale Aktivität Entscheidungsprozesse reguliert werden könnten.

#### **4.4 Numb in der Maus-Hämatopoese**

Die Funktion von Numb und Notch innerhalb der Hämatopoese wird seit Jahren aufgrund teilweise widersprüchlicher Daten kontrovers diskutiert. Während, wie bereits in der Einleitung beschrieben, einige Veröffentlichungen auf eine funktionelle Rolle des Notch-Signalweges beim Erhalt von HSZ hindeuten (Calvi *et al.*, 2003; Duncan *et al.*, 2005; Bigas *et al.*, 2012), wurde diese Rolle in anderen Veröffentlichung in Frage gestellt. So wurde nach Ausschalten der Funktion von RBPjk und auch nach Expression von dnMAML1 im Maus-Knochenmark kein Einfluss auf den Selbsterhalt adulter HSZ detektiert (Radtke *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2002; Maillard *et al.*, 2008). Ebenfalls wurde, wie bereits erwähnt, nach genomischer, *Mx1-Cre*-vermittelter Deletion von *Numb* und *Numblike* im Maus-Knochenmark kein Effekt auf die gesamte Hämatopoese festgestellt (Wilson *et al.*, 2007). Allerdings wird

bei Verwendung des *Mx1-Cre*-Systems die genomische Deletion nicht in allen hämatopoetischen Zellen und vor allem nicht in den frühesten definitiven HSZ erreicht (Kuhn *et al.*, 1995; Gan *et al.*, 2010). Auch wurde gezeigt, dass minimale Mengen (ca. 5% der normalen Expressionshöhe) von Numb in der Maus-Embryogenese für die normale Entwicklung der Mäuse ausreichend sind (Petersen *et al.*, 2006), während der globale *Knockout* von *Numb* embryonal letal ist (Zilian *et al.*, 2001). Weiterhin wurde kürzlich in Mäusen nach ektopter Expression einer dominant-negativen Numb-Varianten *in vivo* beschrieben, dass Numb bei der T-Zell-Entwicklung in Mäusen eine wichtige Rolle spielt (Aguado *et al.*, 2010).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten, vor allem die mutmaßliche Expansion primitiver humaner HSVZ nach *Knockdown*, zeigen eine wichtige Funktion von Numb in der humanen Hämatopoese auf. Die hochrangige Veröffentlichung dieser Daten ist allerdings vor dem Hintergrund der in der Maus-Hämatopoese beschriebenen funktionellen Neutralität von Numb (Wilson *et al.*, 2007) nicht unproblematisch. Deshalb wurden in dieser Arbeit *Numb/Numblike Knockout*-Mäuse unter Verwendung des *Vav-iCre*-Transgens, das eine effiziente genomische Inaktivierung in allen hämatopoetischen Zellen ermöglicht (de Boer *et al.*, 2003), generiert. Auch bei diesen Mäusen ließen sich allerdings im Vergleich mit Kontrolltieren nur marginale Effekte erkennen. Während im peripheren Blut und bei der T-Zell-Reifung im Thymus keine Unterschiede festgestellt werden konnten, war im Knochenmark der Mäuse die Zahl der Vorläuferzellen mit GMP-Potenzial und der megakaryozytär-erythrozytären (Pre-MegE) bzw. erythrozytären (CFU-E) Vorläufer leicht reduziert. Hinsichtlich der Zahl der späteren Vorläufer dieser Linien sowie der reifen Blutzellen wurden allerdings keine Unterschiede festgestellt. Das spricht dafür, dass Numb keine essentielle Rolle bei der Maus-Hämatopoese spielt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Funktion von Numb und Numblike von anderen funktionell verwandten, aber nicht homologen Proteinen oder bislang nicht identifizierten Faktoren kompensiert wird. Der gefundene marginale Effekt auf die megakaryozytäre und erythrozytäre Differenzierung passt prinzipiell gut zu den *in vitro* Ergebnissen im humanen System. Insofern könnte eine Kompensation durch andere Faktoren dazu geführt haben, dass sich nur die normalerweise am stärksten durch Numb beeinflussten Zellschicksalsentscheidungen bei der Reifung in der MegE-Linie nach *Numb*-Inaktivierung detektieren lassen. Dafür spricht, dass wie bereits

oben erwähnt bei *in vivo* Versuchen im Maussystem eine wichtige Funktion von Numb für die T-Zell-Reifung gezeigt werden konnte (Aguado *et al.*, 2010), diese aber nach *Knockout* von *Numb* und *Numblike* bei Verwendung des *Mx1-Cre* Systems (Wilson *et al.*, 2007) und auch in dieser Arbeit nicht detektiert wurde. Dagegen spricht allerdings, dass bei der neuralen Entwicklung von Mäusen der *Knockout* von *Numb* und *Numblike* zu einer gestörten Selbsterneuerung neuraler Stammzellen führte, somit wären solche kompensatorischen Faktoren im neuralen Gewebe mutmaßlich nicht vorhanden (Petersen *et al.*, 2002). Da Numb unter anderem auch an der Sortierung intrazellulärer Vesikel, sogenannter Endosomen, beteiligt ist (Santolini *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2004) und sich in den letzten Jahren die Hinweise mehren, dass durch die Sekretion von Vesikeln auch Proteine von einer Zelle zur anderen transportiert werden können (Vlassov *et al.*, 2012), kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Numb über extrazelluläre Vesikel von nicht-hämatopoetischen Zellen (z.B. Stromazellen im Knochenmark) in hämatopoetische Zellen transportiert wird. Da wie erwähnt geringe Numb-Mengen zur Kompensation des Funktionsverlustes ausreichend sind (Petersen *et al.*, 2006), könnte das erklären, warum die genomische Inaktivierung von *Numb* (und *Numblike*) in hämatopoetischen Zellen zu keinem deutlich erkennbaren Defekt führt. Zur Testung dieser Hypothese sollte überprüft werden, ob tatsächlich kein Numb bzw. Numblike-Protein im Knochenmark der Mäuse mehr vorhanden ist.

Zusammenfassend deuten, zumindest im humanen System, alle Ergebnisse auf eine wichtige Funktion von Numb bei Zellschicksalsentscheidungen in der Hämatopoese hin. Es erscheint durchaus möglich, dass Numb, ähnlich wie bei der in der Einleitung beschriebenen SOP-Entwicklung in *Drosophila*, auch in der humanen Hämatopoese binäre Zellschicksalsentscheidungen beeinflusst. Auch weil sowohl Numb als auch CD133 asymmetrisch in mitotischen humanen HSVZ verteilt werden (Fonseca *et al.*, 2008; Nteliopoulos und Gordon, 2012), wäre auf Basis der Daten aus beiden Projekten folgendes Szenario denkbar: Normalerweise teilen sich *in vitro* ca. 30% der Zellen asymmetrisch (Beckmann *et al.*, 2007). Tochterzellen initial multipotenter Teilungen, die höhere Mengen CD133 und geringere Mengen Numb erhalten, würden zur LMPP, die anderen zur EMP spezifiziert. Die Überexpression von Numb führt möglicherweise nach der Teilung zu einem erhöhten Anteil Numb-positiver



Zellen, deshalb würde das EMP-Potenzial häufiger realisiert. Im Weiteren würde die Numb-Überexpression die Entscheidung MEP *versus* EoBP häufiger in Richtung MEP entscheiden, was dazu passt, dass der Anteil erythrozytärer Vorläufer erhöht war. Der *Knockdown* von *Numb* führt dagegen möglicherweise zu vermehrten symmetrischen Zellteilungen, nach denen in Ermangelung der Induktion der Differenzierung durch Numb das multipotente Potenzial häufiger erhalten bleibt. Diese Überlegung wird durch die gleichzeitig erhöhten Frequenzen von Zellen mit LTC-IC- und CFU-MIX-Potenzial gestützt. Die Funktion von Numb bei diesen Entscheidungen ist scheinbar unabhängig von Notch. Auch wurde zwischen den einzelnen Numb-Isoformen kein funktioneller Unterschied gefunden.

In diesem Kontext sollte erwähnt werden, dass in Experimenten in unserer Arbeitsgruppe, auch in CD34<sup>+</sup> Zellen, in denen CD63 asymmetrisch verteilt war, Numb im Widerspruch zu Ergebnissen einer anderen Gruppe (Nteliopoulos und Gordon, 2012) nie asymmetrisch verteilt gefunden wurde. Die Frage, ob Numb asymmetrisch verteilt wird, sollte also in weiteren Versuchen, ggfs. mit verschiedenen Antikörpern oder eGFP-Fusionsproteinen einzelner Numb-Isoformen näher untersucht werden.

#### 4.5 Ausblick

Vor dem Hintergrund des redefinierten humanen hämatopoetischen Modells haben sich, wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten an entsprechender Stelle beschrieben, neue Fragen hinsichtlich der Funktion von Numb ergeben. Demnach sollten bezüglich der weiteren funktionellen Aufklärung der Rolle von Numb bei einzelnen Entscheidungsprozessen in hämatopoetischen Differenzierungslinien weiterführende Experimenten durchgeführt werden. Von besonderem Interesse sind hierbei, wie erwähnt, die Entscheidung zwischen EoBP- und MEP-Linie und die Rolle von Numb bei der Entscheidung zwischen megakaryozytärer und erythrozytärer Differenzierung. Da sich gezeigt hat, dass Numblike in HSVZ zumindest teilweise zu Numb funktionell redundant ist, sollte die Funktion von Numblike auch genauer untersucht werden. Neben weiteren *in vitro* Experimenten nach *Knockdown* und Überexpression von Numb und Numblike wäre vor allem die Analyse genetisch manipulierter CD34<sup>+</sup> Zellen im Maus-Repopulierungsansatz sinnvoll, da dies die

gleichzeitige Analyse verschiedener hämatopoetischer Linien ermöglicht. Vor dem Hintergrund des neuen hämatopoetischen Modells sollten bei Experimenten *in vitro* die Fraktionen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> getrennt voneinander analysiert werden.

Die umfassende immunphänotypische Analyse der Fraktionen CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>low</sup> im Kontext bereits beschriebener, linienspezifisch exprimierter Oberflächenmarker sollte des Weiteren ein genaueres Verständnis über die im neuen Modell beschriebenen Zellqualitäten ermöglichen. Erste Versuche hierzu haben bereits gezeigt, dass Zellen des für den CMP beschriebenen Immunphänotyps sowohl der CD133<sup>+</sup> als auch der CD133<sup>low</sup> Fraktion zuzuordnen sind (vgl. Abb. 39). Durch die konsequente Testung der Entwicklungspotenziale von auf diese Weise identifizierbaren immunphänotypischen Subpopulationen sollte es möglich sein, Markerkombinationen zur prospektiven Isolierung definierter Progenitor-Zellqualitäten (z.B. des EMP) zu beschreiben. Darüber hinaus könnte in den auf diese Weise isolierbaren Zellen die Expressionsanalyse von Transkriptionsfaktoren näheren Aufschluss über die der hämatopoetischen Linienspezifikation zugrundeliegenden Prozesse geben.

## 5 Zusammenfassung

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) müssen in der Lage sein, die tägliche Produktion von Milliarden von spezialisierten Blutzellen aufrecht zu erhalten. Sie stellen die bislang am besten untersuchten somatischen Stammzellen dar, aber die Mechanismen, die ihre Entwicklung und ihre Differenzierung regulieren, sind weitgehend unklar. Vordaten aus unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass Numb, eine aus *Drosophila* als Antagonist des Notch-Signalweges bekannte Zellschicksalsdeterminante, auch an der Zellschicksalsspezifikation humaner hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) beteiligt ist.

Da der Notch-Signalweg ein wichtiger Faktor beim Selbsterhalt von HSZ in Säugern ist, war das primäre Ziel dieser Arbeit, die Funktion von Numb in humanen HSVZ (CD34<sup>+</sup> Zellen) näher zu untersuchen und die Frage zu klären, ob Numb in der humanen Hämatopoese, ebenso wie in *Drosophila*, als Notch-Antagonist fungiert. In Übereinstimmung mit Vordaten aus unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Numb die Aufrechterhaltung primitiver Zellschicksale unterdrückt und die erythrozytäre Differenzierung induziert. Hingegen führte der funktionelle *Knockdown* von Numb und dem homologen *Numblike* zu höheren Anteilen primitiver hämatopoetischer Zellen. Weiterhin deutet sich an, dass Numb in humanen HSVZ nicht als Notch-Antagonist fungiert. Zudem wurde beobachtet, dass die Überexpression von Numb zu einer Herunterregulierung von CD133 führt, einem Oberflächenmarker, der auf dem Großteil humaner CD34<sup>+</sup> Zellen ko-exprimiert wird.

Um ein besseres Verständnis der erhaltenen Daten zu ermöglichen, entschlossen wir uns zur Analyse der Entwicklungspotenziale der Fraktionen CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> (CD133<sup>+</sup>) und CD34<sup>+</sup>CD133<sup>low</sup> (CD133<sup>low</sup>) in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Assays. Unerwarteterweise waren alle getesteten Linienpotenziale immer einer Fraktion zuzuordnen: HSVZ mit myeloischem und lymphatischem Langzeitpotenzial, CFU-GM Potenzial und SCID-repopulierende Zellen wurden nur in der CD133<sup>+</sup> Fraktion detektiert. Hingegen fanden sich erythrozytäre, megakaryozytäre und CFU-MIX Potenziale in der CD133<sup>low</sup> Fraktion. Da Kolonien beider Fraktionen Granulozyten enthielten, wurde im Weiteren die Komposition Granulozyten-enthaltender Kolonien u. a. durchflusszytometrisch und mittels RT-PCR umfassend analysiert. Es zeigte sich, dass Neutrophile exklusiv von CD133<sup>+</sup> Zellen gebildet wurden, während CD133<sup>low</sup> Zellen Basophile und Eosinophile hervorbringen.

Zusammenfassend deutet das im Gegensatz zum klassischen Modell, das die strikte Trennung erythro-myeloischer von lymphatischen Zellen voraussagt, auf ein neues humanes hämatopoetisches Modell hin. Demnach erfolgt die erste Linienauftrennung zwischen erythro-myeloischen (CD133<sup>low</sup>) und lymphatisch-myeloischen (CD133<sup>+</sup>) Linienpotenzialen. Somit entstehen die verschiedenen Granulozyten-Subtypen in getrennten Linien. Eosinophile und Basophile werden von erythro-myeloischen Progenitoren (EMP), Neutrophile von Zellen mit LMPP-Potenzial (lymphoid-primed multipotent progenitors) gebildet.

In einem Teilprojekt wurden zur funktionellen Analyse von Numb in der Maus-Hämatopoese *Numb/Numblike Knockout* Mäuse generiert. Die Mäuse waren lebensfähig, und ihre Hämatopoese war nur marginal beeinflusst, was nahelegt, dass Numb im hämatopoetischen System der Maus keine wichtige Rolle spielt.

## Abstract

Hematopoietic stem cells (HSCs) are required to sustain the daily production of billions of specialized blood cells fulfilling different functions. Even though they represent the best-studied somatic stem cell entity so far, there are many unresolved questions regarding the mechanisms that control their development including their differentiation. Preliminary studies in our group suggested that Numb, a cell fate determinant known from *Drosophila* as antagonist of the Notch signaling pathway, is involved in cell fate specification processes in human hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs), too.

Since the Notch signaling pathway was shown to be essentially involved in mammalian HSC maintenance, the initial aim of this thesis was to further investigate the role of Numb and to clarify its potential involvement in regulation of the Notch signaling pathway in human HSPCs, i.e. CD34<sup>+</sup> cells. In accordance with previous results from our group, it could be demonstrated that over-expression of Numb suppresses primitive hematopoietic cell fates and induces erythroid differentiation, while the functional knockdown of *Numb* and its homolog *Numbl* increased the content of primitive hematopoietic cells. Additional experimental data indicated that Numb function in human HSPCs is independent of Notch signaling. We further observed that over-expression of Numb resulted in downregulation of CD133, a surface marker expressed on the majority of human CD34<sup>+</sup> cells.

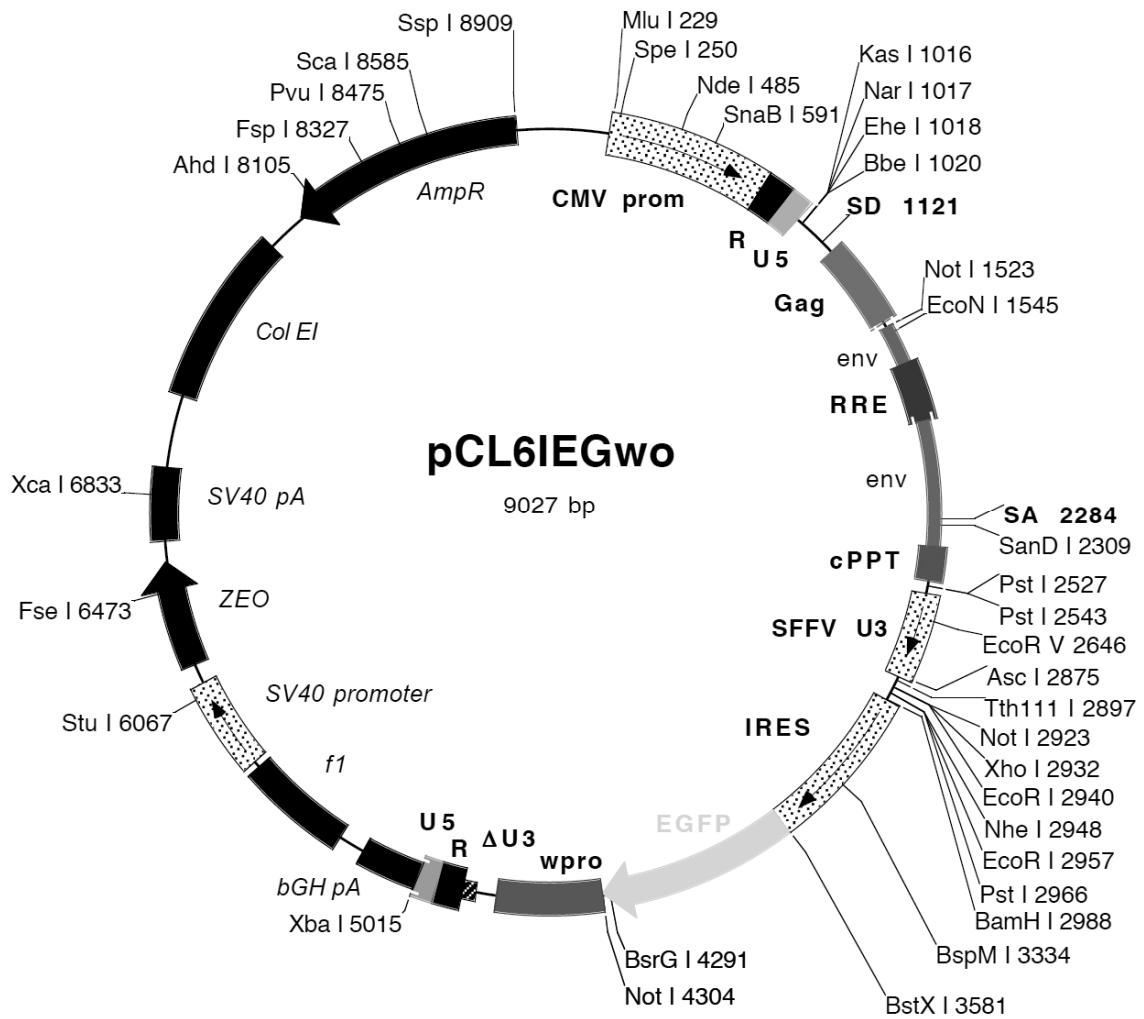
To facilitate profound interpretation of results in this context, we decided to compare the developmental capacities of the subpopulations CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> (CD133<sup>+</sup>) and CD34<sup>+</sup>CD133<sup>low</sup> (CD133<sup>low</sup>) in different functional assays *in vitro* and *in vivo*. Unexpectedly, almost all lineage potentials tested turned out to be limited to one of the two subpopulations: HSPCs with long-term myeloid, long-term lymphoid and granulocyte-macrophage colony-forming (CFU-GM) potentials as well as NOD/SCID-repopulating cells exclusively were detected in the CD133<sup>+</sup> fraction. In contrast, most cells with erythroid, megakaryocytic and CFU-MIX potentials were found in the CD133<sup>low</sup> fraction. Since granulocytes were formed within colonies from both populations, we comprehensively compared the composition of granulocyte-containing colonies by different methods including flow-cytometry and RT-PCR. We identified neutrophils to derive exclusively from CD133<sup>+</sup> cells, while CD133<sup>low</sup> cells mainly gave rise to basophils and eosinophils.

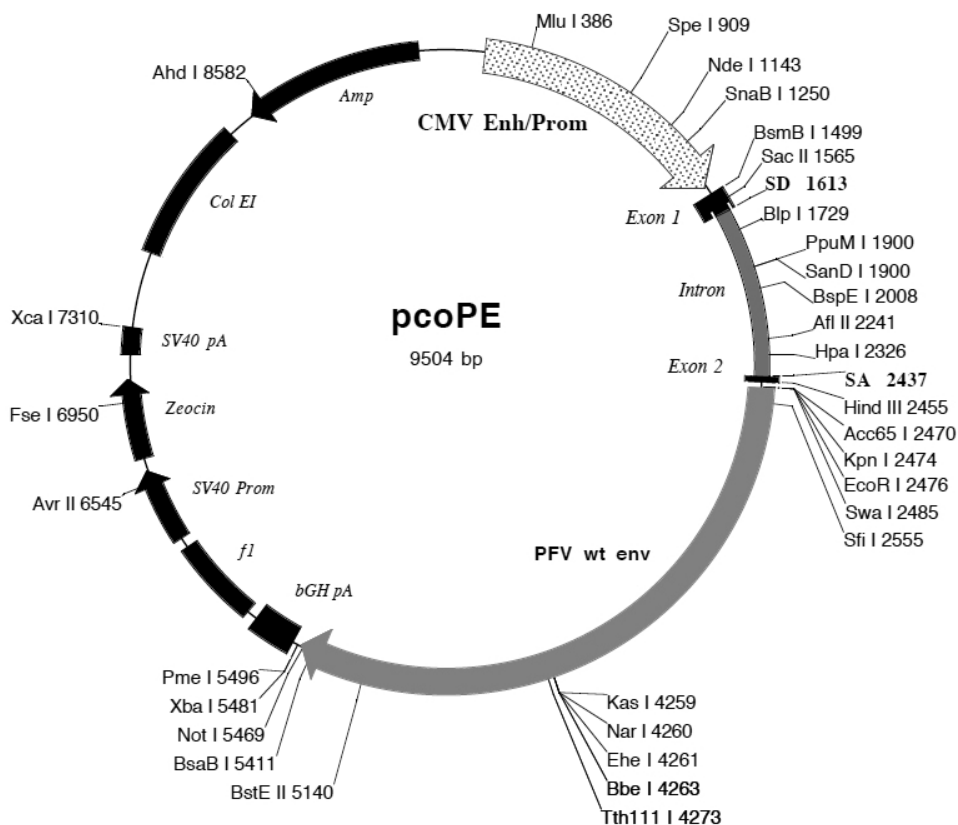
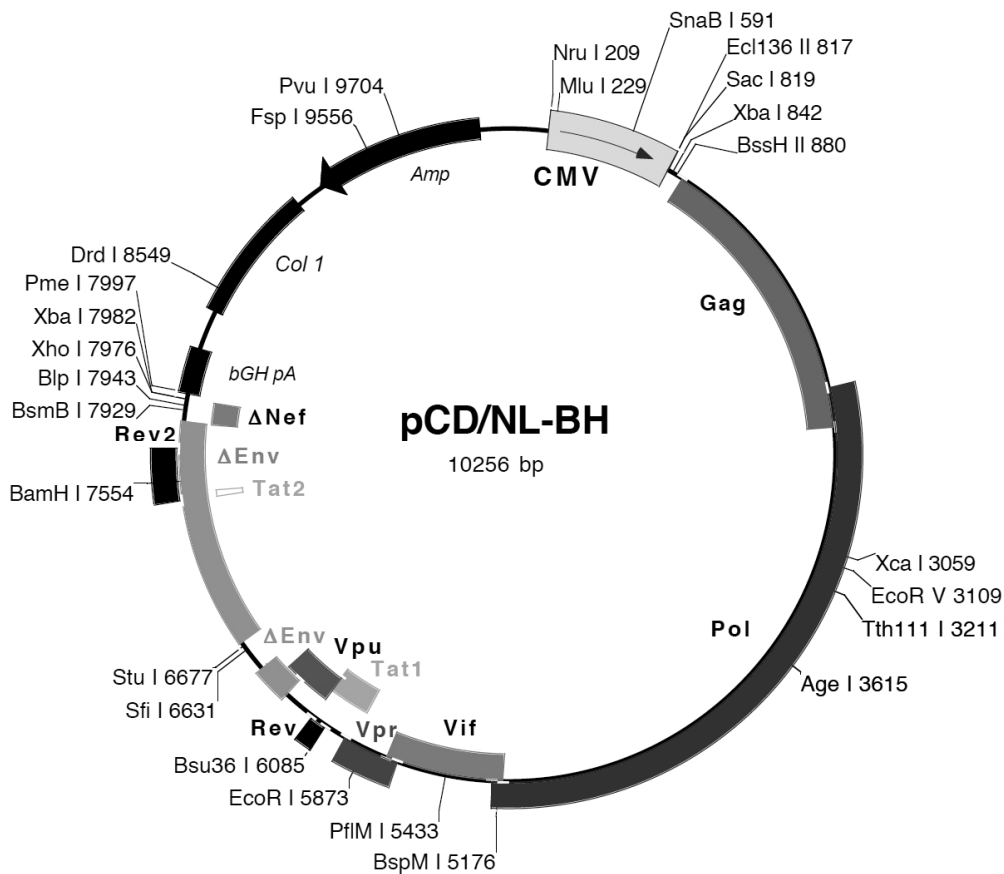
Taken together, in contrast to the classical model that postulates the first lineage separation to occur between erythro-myeloid and lymphoid cell fates, our data suggest a revised model of human hematopoiesis. Accordingly, the first lineage branch point is marked by segregation of erythro-myeloid (CD133<sup>low</sup>) from lympho-myeloid (CD133<sup>+</sup>) potentials. Furthermore, the different granulocyte subtypes arise in distinct lineages, with eosinophils and basophils developing from erythro-myeloid progenitors (EMPs), while neutrophils develop from lymphoid-primed multipotent progenitors (LMMPs).

In another sub-project of the thesis, we generated Numb/Numbl knock-out mice to study the role of Numb in mouse hematopoiesis. The mice were viable and we detected only mild effects, indicating that Numb doesn't seem to be essentially involved in cell fate specification processes in mouse HSPCs.

## 6 Anhang

### Plasmidkarten





## Literaturverzeichnis

- Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., *et al.* (2005). Identification of Flt3<sup>+</sup> lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306.
- Aguado, R., Martin-Blanco, N., Caraballo, M., and Canelles, M. (2010). The endocytic adaptor Numb regulates thymus size by modulating pre-TCR signaling during asymmetric division. *Blood* **116**, 1705-1714.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197.
- Al-Hajj, M. (2007). Cancer stem cells and oncology therapeutics. *Curr Opin Oncol* **19**, 61-64.
- Alexander, C.M., Puchalski, J., Klos, K.S., Badders, N., Ailles, L., Kim, C.F., Dirks, P., and Smalley, M.J. (2009). Separating stem cells by flow cytometry: reducing variability for solid tissues. *Cell Stem Cell* **5**, 579-583.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* **227**, 271-278.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149-161.
- Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M.F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D.G., Austen, K.F., and Akashi, K. (2005). Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18105-18110.
- Arinobu, Y., Mizuno, S., Chong, Y., Shigematsu, H., Iino, T., Iwasaki, H., Graf, T., Mayfield, R., Chan, S., Kastner, P., *et al.* (2007). Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. *Cell Stem Cell* **1**, 416-427.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776.
- Ballas, Z.K., and Rasmussen, W. (1990). NK1.1<sup>+</sup> thymocytes. Adult murine CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup> thymocytes contain an NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD5<sup>hi</sup>, CD44<sup>hi</sup>, TCR-V beta 8<sup>+</sup> subset. *J Immunol* **145**, 1039-1045.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211.
- Bani-Yaghoob, M., Kubu, C.J., Cowling, R., Rochira, J., Nikopoulos, G.N., Bellum, S., and Verdi, J.M. (2007). A switch in numb isoforms is a critical step in cortical development. *Dev Dyn* **236**, 696-705.
- Banu, N., Wang, J.F., Deng, B., Groopman, J.E., and Avraham, H. (1995). Modulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin: the c-Mpl ligand. *Blood* **86**, 1331-1338.
- Baron, F., and Storb, R. (2004). Allogeneic hematopoietic cell transplantation as treatment for hematological malignancies: a review. *Springer Semin Immunopathol* **26**, 71-94.
- Baron, M.L., Gauchat, D., La Motte-Mohs, R., Kettaf, N., Abdallah, A., Michiels, T., Zuniga-Pflucker, J.C., and Sekaly, R.P. (2008). TLR Ligand-Induced Type I IFNs Affect Thymopoiesis. *J Immunol* **180**, 7134-7146.
- Becker, A.J., Mc, C.E., and Till, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**, 452-454.
- Beckmann, J., Scheitza, S., Wernet, P., Fischer, J.C., and Giebel, B. (2007). Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* **109**, 5494-5501.
- Bell, J.J., and Bhandoola, A. (2008). The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* **452**, 764-767.
- Bender, J.G., Unverzagt, K., Walker, D.E., Lee, W., Smith, S., Williams, S., and Van Epps, D.E. (1994). Phenotypic analysis and characterization of CD34<sup>+</sup> cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol* **70**, 10-18.
- Bensinger, W.I. (2012). Allogeneic transplantation: peripheral blood vs. bone marrow. *Curr Opin Oncol* **24**, 191-196.

- Bigas, A., D'Altri, T., and Espinosa, L. (2012). The Notch Pathway in Hematopoietic Stem Cells. *Curr Top Microbiol Immunol*.
- Boisset, J.C., and Robin, C. (2012). On the origin of hematopoietic stem cells: progress and controversy. *Stem Cell Res* 8, 1-13.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7297-7301.
- Boyce, J.A., Friend, D., Matsumoto, R., Austen, K.F., and Owen, W.F. (1995). Differentiation in vitro of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. *J Exp Med* 182, 49-57.
- Boyer, L., Robert, A., Proulx, C., and Pineault, N. (2008). Increased production of megakaryocytes near purity from cord blood CD34+ cells using a short two-phase culture system. *J Immunol Methods* 332, 82-91.
- Brummendorf, T.H., Dragowska, W., Zijlmans, J., Thornbury, G., and Lansdorp, P.M. (1998). Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells. *J Exp Med* 188, 1117-1124.
- Bruno, E., Briddell, R., and Hoffman, R. (1988). Effect of recombinant and purified hematopoietic growth factors on human megakaryocyte colony formation. *Exp Hematol* 16, 371-377.
- Brunstein, C.G., Barker, J.N., Weisdorf, D.J., DeFor, T.E., Miller, J.S., Blazar, B.R., McGlave, P.B., and Wagner, J.E. (2007). Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood* 110, 3064-3070.
- Brunstein, C.G., and Wagner, J.E. (2006). Umbilical cord blood transplantation and banking. *Annu Rev Med* 57, 403-417.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringham, F.R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.
- Cao, X., Shores, E.W., Hu-Li, J., Anver, M.R., Kelsall, B.L., Russell, S.M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., Bloom, E.T., *et al.* (1995). Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2, 223-238.
- Carotta, S., Dakic, A., D'Amico, A., Pang, S.H., Greig, K.T., Nutt, S.L., and Wu, L. (2010). The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity* 32, 628-641.
- Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., *et al.* (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315, 1687-1691.
- Chen, M.J., Yokomizo, T., Zeigler, B.M., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2009). Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 457, 887-891.
- Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., and Shaper, J.H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133, 157-165.
- Couturier, L., Vodovar, N., and Schweisguth, F. (2012). Endocytosis by Numb breaks Notch symmetry at cytokinesis. *Nat Cell Biol* 14, 131-139.
- de Boer, J., Williams, A., Skavdis, G., Harker, N., Coles, M., Tolaini, M., Norton, T., Williams, K., Roderick, K., Potocnik, A.J., *et al.* (2003). Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol* 33, 314-325.
- de Celis, J.F., Mari-Beffa, M., and Garcia-Bellido, A. (1991). Cell-autonomous role of Notch, an epidermal growth factor homologue, in sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 632-636.
- De Smedt, M., Hoebeker, I., Reynvoet, K., Leclercq, G., and Plum, J. (2005). Different thresholds of Notch signaling bias human precursor cells toward B-, NK-, monocytic/dendritic-, or T-cell lineage in thymus microenvironment. *Blood* 106, 3498-3506.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., *et al.* (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.



- de Wynter, E.A., Buck, D., Hart, C., Heywood, R., Coutinho, L.H., Clayton, A., Rafferty, J.A., Burt, D., Guenechea, G., Bueren, J.A., *et al.* (1998). CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* **16**, 387-396.
- DeKoter, R.P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* **288**, 1439-1441.
- DeKoter, R.P., Walsh, J.C., and Singh, H. (1998). PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J* **17**, 4456-4468.
- Delaney, C., Heimfeld, S., Brashem-Stein, C., Voorhies, H., Manger, R.L., and Bernstein, I.D. (2010). Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* **16**, 232-236.
- Demoulin, T., Abdallah, A., Kettaf, N., Baron, M.L., Gerarduzzi, C., Gauchat, D., Gratton, S., and Sekaly, R.P. (2008). Reversible blockade of thymic output: an inherent part of TLR ligand-mediated immune response. *J Immunol* **181**, 6757-6769.
- Denburg, J.A., Telizyn, S., Messner, H., Lim, B., Jamal, N., Ackerman, S.J., Gleich, G.J., and Bienenstock, J. (1985). Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood* **66**, 312-318.
- Despres, D., Goldschmitt, J., Aulitzky, W.E., Huber, C., and Peschel, C. (1995). Differential effect of type I interferons on hematopoietic progenitor cells: failure of interferons to inhibit IL-3-stimulated normal and CML myeloid progenitors. *Exp Hematol* **23**, 1431-1438.
- Dho, S.E., French, M.B., Woods, S.A., and McGlade, C.J. (1999). Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem* **274**, 33097-33104.
- Dorn, I., Lazar-Karsten, P., Boie, S., Ribbat, J., Hartwig, D., Driller, B., Kirchner, H., and Schlenke, P. (2008). In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. *Transfusion* **48**, 1122-1132.
- Dorrell, C., Gan, O.I., Pereira, D.S., Hawley, R.G., and Dick, J.E. (2000). Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood* **95**, 102-110.
- Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., and Dick, J.E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* **11**, 585-593.
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., and Dick, J.E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120-136.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H., and Calos, M.P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**, 379-387.
- Duhrsen, U., Villeval, J.L., Boyd, J., Kannourakis, G., Morstyn, G., and Metcalf, D. (1988). Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* **72**, 2074-2081.
- Duncan, A.W., Rattis, F.M., DiMascio, L.N., Congdon, K.L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J.M., Willert, K., Gaiano, N., *et al.* (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* **6**, 314-322.
- Dy, M., Pacilio, M., Arnould, A., Machavoine, F., Mayeux, P., Hermine, O., Bodger, M., and Schneider, E. (1999). Modulation of histidine decarboxylase activity and cytokine synthesis in human leukemic cell lines: relationship with basophilic and/or megakaryocytic differentiation. *Exp Hematol* **27**, 1295-1305.
- Dzierzak, E. (2002). Hematopoietic stem cells and their precursors: developmental diversity and lineage relationships. *Immunol Rev* **187**, 126-138.
- Essers, M.A., Offner, S., Blanco-Bose, W.E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M.A., and Trumpp, A. (2009). IFN $\alpha$  activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* **458**, 904-908.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
- Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**, 523-534.

- Fonseca, A.V., Bauer, N., and Corbeil, D. (2008). The stem cell marker CD133 meets the endosomal compartment--new insights into the cell division of hematopoietic stem cells. *Blood Cells Mol Dis* 41, 194-195.
- French, M.B., Koch, U., Shaye, R.E., McGill, M.A., Dho, S.E., Guidos, C.J., and McGlade, C.J. (2002). Transgenic expression of numb inhibits notch signaling in immature thymocytes but does not alter T cell fate specification. *J Immunol* 168, 3173-3180.
- Freund, D., Oswald, J., Feldmann, S., Ehninger, G., Corbeil, D., and Bornhauser, M. (2006). Comparative analysis of proliferative potential and clonogenicity of MACS-immunomagnetic isolated CD34+ and CD133+ blood stem cells derived from a single donor. *Cell Prolif* 39, 325-332.
- Frise, E., Knoblich, J.A., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). The Drosophila Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11925-11932.
- Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12355-12358.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3, 459-473.
- Gan, T., Jude, C.D., Zaffuto, K., and Ernst, P. (2010). Developmentally induced Mll1 loss reveals defects in postnatal haematopoiesis. *Leukemia* 24, 1732-1741.
- Gekas, C., Dieterlen-Lievre, F., Orkin, S.H., and Mikkola, H.K. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 8, 365-375.
- Gho, M., Bellaiche, Y., and Schweisguth, F. (1999). Revisiting the Drosophila microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell. *Development* 126, 3573-3584.
- Giebel, B., and Punzel, M. (2008). Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biol Chem* 389, 813-824.
- Giebel, B., and Wodarz, A. (2012). Notch signaling: numb makes the difference. *Curr Biol* 22, R133-135.
- Giebel, B., Zhang, T., Beckmann, J., Spanholtz, J., Wernet, P., Ho, A.D., and Punzel, M. (2006). Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. *Blood* 107, 2146-2152.
- Goardon, N., Marchi, E., Atzberger, A., Quek, L., Schuh, A., Soneji, S., Woll, P., Mead, A., Alford, K.A., Rout, R., *et al.* (2011). Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 19, 138-152.
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150, 4244-4252.
- Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat Struct Mol Biol* 14, 295-300.
- Görgens, A. (2008). Funktionelle Charakterisierung des Einflusses des Par/aPKC-Komplexes und Cdc42 auf Zellpolarität, Migration und Zellschicksal humaner hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Görgens, A., Beckmann, J., Ludwig, A.K., Möllmann, M., Dürig, J., Horn, P.A., Rajendran, L., and Giebel, B. (2012). Lipid raft redistribution and morphological cell polarization are separable processes providing a basis for hematopoietic stem and progenitor cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1121-1132.
- Görgens, A., and Giebel, B. (2010). Self-Renewal of Primitive Hematopoietic Cells: A Focus on Asymmetric Cell Division, Chapter 3 in *Umbilical Cord Blood: A Future for Regenerative Medicine?* Editors: Suzanne Kadereit, Gerald Udolph. World Scientific Publishing, 51-75.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Gray, G.E., Mann, R.S., Mitsiadis, E., Henrique, D., Carcangiu, M.L., Banks, A., Leiman, J., Ward, D., Ish-Horowitz, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol* 154, 785-794.
- Greiner, D.L., Shultz, L.D., Yates, J., Appel, M.C., Perdrizet, G., Hesselton, R.M., Schweitzer, I., Beamer, W.G., Shultz, K.L., Pelsue, S.C., *et al.* (1995). Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. *Am J Pathol* 146, 888-902.

- Gu, H., Zou, Y.R., and Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73, 1155-1164.
- Guo, F., Gopaul, D.N., and van Duyne, G.D. (1997). Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389, 40-46.
- Guo, M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* 17, 27-41.
- Guruharsha, K.G., Kankel, M.W., and Artavanis-Tsakonas, S. (2012). The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* 13, 654-666.
- Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K., and Honjo, T. (2002). Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* 14, 637-645.
- Han, W., Ye, Q., and Moore, M.A. (2000). A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 95, 1616-1625.
- Hao, Q.L., George, A.A., Zhu, J., Barsky, L., Zielinska, E., Wang, X., Price, M., Ge, S., and Crooks, G.M. (2008). Human intrathymic lineage commitment is marked by differential CD7 expression: identification of CD7-lympho-myeloid thymic progenitors. *Blood* 111, 1318-1326.
- Hao, Q.L., Thiemann, F.T., Petersen, D., Smogorzewska, E.M., and Crooks, G.M. (1996). Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood* 88, 3306-3313.
- Hara, H., Noguchi, K., Kohsaki, M., Senba, M., and Nagai, K. (1980). Murine hemopoietic colonies in culture containing normoblasts, macrophages and megakaryocytes from adult spleen cells. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi* 43, 84-91.
- Harigae, H., Takahashi, S., Suwabe, N., Ohtsu, H., Gu, L., Yang, Z., Tsai, F.Y., Kitamura, Y., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1998). Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes Cells* 3, 39-50.
- Hartenstein, V., and Posakony, J.W. (1990). A dual function of the Notch gene in *Drosophila* sensillum development. *Dev Biol* 142, 13-30.
- Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J., and Rethwilm, A. (1998). Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol* 72, 6307-6314.
- Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., and Selkoe, D.J. (2008). Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol* 6, e257.
- Hermine, O., Mayeux, P., Titeux, M., Mitjavila, M.T., Casadevall, N., Guichard, J., Komatsu, N., Suda, T., Miura, Y., Vainchenker, W., *et al.* (1992). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin act competitively to induce two different programs of differentiation in the human pluripotent cell line UT-7. *Blood* 80, 3060-3069.
- Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y., and Matsuzaki, F. (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* 377, 627-630.
- Hofmeister, C.C., Zhang, J., Knight, K.L., Le, P., and Stiff, P.J. (2007). Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant* 39, 11-23.
- Holmes, R., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2009). The OP9-DL1 system: generation of T-lymphocytes from embryonic or hematopoietic stem cells in vitro. *Cold Spring Harb Protoc* 2009, pdb prot5156.
- Huang, S., Law, P., Francis, K., Palsson, B.O., and Ho, A.D. (1999). Symmetry of initial cell divisions among primitive hematopoietic progenitors is independent of ontogenic age and regulatory molecules. *Blood* 94, 2595-2604.
- Huizinga, T.W., van der Schoot, C.E., Jost, C., Klaassen, R., Kleijer, M., von dem Borne, A.E., Roos, D., and Tetteroo, P.A. (1988). The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature* 333, 667-669.
- Humphries, R.K., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (1981). Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3629-3633.
- Humphries, R.K., Jacky, P.B., Dill, F.J., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (1979). CFU-S in individual erythroid colonies derived in vitro from adult mouse marrow. *Nature* 279, 718-720.

- Ibrahim, S.F., and van den Engh, G. (2007). Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 106, 19-39.
- Iscove, N.N., and Nawa, K. (1997). Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion. *Curr Biol* 7, 805-808.
- Ishiko, E., Matsumura, I., Ezoe, S., Gale, K., Ishiko, J., Satoh, Y., Tanaka, H., Shibayama, H., Mizuki, M., Era, T., *et al.* (2005). Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem* 280, 4929-4939.
- Ito, C.Y., Kirouac, D.C., Madlambayan, G.J., Yu, M., Rogers, I., and Zandstra, P.W. (2010). The AC133+CD38-, but not the rhodamine-low, phenotype tracks LTC-IC and SRC function in human cord blood ex vivo expansion cultures. *Blood* 115, 257-260.
- Iwasaki, H., Mizuno, S., Arinobu, Y., Ozawa, H., Mori, Y., Shigematsu, H., Takatsu, K., Tenen, D.G., and Akashi, K. (2006). The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev* 20, 3010-3021.
- Jacobson, L.O., Simmons, E.L., Marks, E.K., and Eldredge, J.H. (1951). Recovery from radiation injury. *Science* 113, 510-511.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355-358.
- Johnson, G.R., and Metcalf, D. (1977). Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 3879-3882.
- Julius, M.H., Masuda, T., and Herzenberg, L.A. (1972). Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 1934-1938.
- Katz, F.E., Tindle, R., Sutherland, D.R., and Greaves, M.F. (1985). Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. *Leuk Res* 9, 191-198.
- Kawamoto, H., Ikawa, T., Masuda, K., Wada, H., and Katsura, Y. (2010). A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunol Rev* 238, 23-36.
- Kawamoto, H., and Katsura, Y. (2009). A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol* 30, 193-200.
- Kawamoto, H., Ohmura, K., Fujimoto, S., and Katsura, Y. (1999). Emergence of T cell progenitors without B cell or myeloid differentiation potential at the earliest stage of hematopoiesis in the murine fetal liver. *J Immunol* 162, 2725-2731.
- Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 19, 1129-1155.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.
- Kitagawa, M., Oyama, T., Kawashima, T., Yedvobnick, B., Kumar, A., Matsuno, K., and Harigaya, K. (2001). A human protein with sequence similarity to *Drosophila* mastermind coordinates the nuclear form of notch and a CSL protein to build a transcriptional activator complex on target promoters. *Mol Cell Biol* 21, 4337-4346.
- Kodama, H., Nose, M., Niida, S., and Nishikawa, S. (1994). Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol* 22, 979-984.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., and May, W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
- La Motte-Mohs, R.N., Herer, E., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2005). Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood* 105, 1431-1439.
- Lam, L.T., Ronchini, C., Norton, J., Capobianco, A.J., and Bresnick, E.H. (2000). Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of human K562 erythroleukemic cells by notch-1. *J Biol Chem* 275, 19676-19684.

- Lapidot, T., Pflumio, F., Doedens, M., Murdoch, B., Williams, D.E., and Dick, J.E. (1992). Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 255, 1137-1141.
- Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J.C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X.L., Kato, I., *et al.* (1996). Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2, 1329-1337.
- Larsson, C., Lardelli, M., White, I., and Lendahl, U. (1994). The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. *Genomics* 24, 253-258.
- Leary, A.G., Strauss, L.C., Civin, C.I., and Ogawa, M. (1985). Disparate differentiation in hemopoietic colonies derived from human paired progenitors. *Blood* 66, 327-332.
- Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K.E., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Von Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D.A., *et al.* (2003). Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther* 14, 509-519.
- Lewis, I.D., and Verfaillie, C.M. (2000). Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 28, 1087-1095.
- Li, Y.P., Paczesny, S., Lauret, E., Poirault, S., Bordigoni, P., Mekhloufi, F., Hequet, O., Bertrand, Y., Ou-Yang, J.P., Stoltz, J.F., *et al.* (2008). Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J Immunol* 180, 1598-1608.
- Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R., and Shelton, E. (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 12, 197-201.
- Lukens, M.V., van de Pol, A.C., Coenjaerts, F.E., Jansen, N.J., Kamp, V.M., Kimpen, J.L., Rossen, J.W., Ulfman, L.H., Tacke, C.E., Viveen, M.C., *et al.* (2010). A systemic neutrophil response precedes robust CD8(+) T-cell activation during natural respiratory syncytial virus infection in infants. *J Virol* 84, 2374-2383.
- Magee, J.A., Piskounova, E., and Morrison, S.J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21, 283-296.
- Magin, S. (2007). Funktionelle Analyse des Stammzellmarkers Prominin-1 und endosomal assoziierter Proteine in humanen hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Maillard, I., Fang, T., and Pear, W.S. (2005). Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol* 23, 945-974.
- Maillard, I., Koch, U., Dumortier, A., Shestova, O., Xu, L., Sai, H., Pross, S.E., Aster, J.C., Bhandoola, A., Radtke, F., *et al.* (2008). Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 356-366.
- Maillard, I., Weng, A.P., Carpenter, A.C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Xu, L., Allman, D., Aster, J.C., and Pear, W.S. (2004). Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions. *Blood* 104, 1696-1702.
- Majeti, R., Park, C.Y., and Weissman, I.L. (2007). Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* 1, 635-645.
- Mansson, R., Hultquist, A., Luc, S., Yang, L., Anderson, K., Kharazi, S., Al-Hashmi, S., Liuba, K., Thoren, L., Adolfosson, J., *et al.* (2007). Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity* 26, 407-419.
- Manz, M.G. (2007). Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity* 26, 537-541.
- Manz, M.G., Miyamoto, T., Akashi, K., and Weissman, I.L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11872-11877.
- Matsumoto, K., Yasui, K., Yamashita, N., Horie, Y., Yamada, T., Tani, Y., Shibata, H., and Nakano, T. (2000). In vitro proliferation potential of AC133 positive cells in peripheral blood. *Stem Cells* 18, 196-203.
- Mayani, H. (2010). Notch signaling: from stem cell expansion to improving cord blood transplantation. *Expert Rev Hematol* 3, 401-404.
- Mazurier, F., Doedens, M., Gan, O.I., and Dick, J.E. (2003). Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* 9, 959-963.

- McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res* 13, 115-125.
- McGill, M.A., Dho, S.E., Weinmaster, G., and McGlade, C.J. (2009). Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *J Biol Chem* 284, 26427-26438.
- McGill, M.A., and McGlade, C.J. (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 278, 23196-23203.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.
- Medvinsky, A., Rybtsov, S., and Taoudi, S. (2011). Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development* 138, 1017-1031.
- Medvinsky, A.L., Samoylina, N.L., Muller, A.M., and Dzierzak, E.A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64-67.
- Meiering, C.D., and Linial, M.L. (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev* 14, 165-176.
- Mercher, T., Cornejo, M.G., Sears, C., Kindler, T., Moore, S.A., Maillard, I., Pear, W.S., Aster, J.C., and Gilliland, D.G. (2008). Notch signaling specifies megakaryocyte development from hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 314-326.
- Miller, J.S., Verfaillie, C., and McGlave, P. (1992). The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture. *Blood* 80, 2182-2187.
- Misquitta-Ali, C.M., Cheng, E., O'Hanlon, D., Liu, N., McGlade, C.J., Tsao, M.S., and Blencowe, B.J. (2010). Global profiling and molecular characterization of alternative splicing events misregulated in lung cancer. *Mol Cell Biol* 31, 138-150.
- Mizrak, D., Brittan, M., and Alison, M.R. (2008). CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 214, 3-9.
- Mizutani, T., Tsuji, K., Ebihara, Y., Taki, S., Ohba, Y., Taniguchi, T., and Honda, K. (2008). Homeostatic erythropoiesis by the transcription factor IRF2 through attenuation of type I interferon signaling. *Exp Hematol* 36, 255-264.
- Mlynek, M.L., and Leder, L.D. (1986). Lineage infidelity in chronic myeloid leukemia. Demonstration and significance of hybridoid leukocytes. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 51, 107-114.
- Mochizuki, H., Schwartz, J.P., Tanaka, K., Brady, R.O., and Reiser, J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J Virol* 72, 8873-8883.
- Mohtashami, M., Shah, D.K., Nakase, H., Kianizad, K., Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2010). Direct comparison of Dll1- and Dll4-mediated Notch activation levels shows differential lymphomyeloid lineage commitment outcomes. *J Immunol* 185, 867-876.
- Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S., *et al.* (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 406, 369-375.
- Moore, K.A., Ema, H., and Lemischka, I.R. (1997). In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* 89, 4337-4347.
- Moore, M.A., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18, 279-296.
- Moore, M.A., Williams, N., and Metcalf, D. (1973). In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: characterization of the colony-forming cells. *J Natl Cancer Inst* 50, 603-623.
- Mori, Y., Iwasaki, H., Kohno, K., Yoshimoto, G., Kikushige, Y., Okeda, A., Uike, N., Niuro, H., Takenaka, K., Nagafuji, K., *et al.* (2009). Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med* 206, 183-193.
- Morrison, S.J., Shah, N.M., and Anderson, D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287-298.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Myers, C.D., Katz, F.E., Joshi, G., and Millar, J.L. (1984). A cell line secreting stimulating factors for CFU-GEMM culture. *Blood* 64, 152-155.
- Nakahata, T., Spicer, S.S., and Ogawa, M. (1982). Clonal origin of human erythro-eosinophilic colonies in culture. *Blood* 59, 857-864.

- Nerlov, C., and Graf, T. (1998). PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* 12, 2403-2412.
- Nerlov, C., Querfurth, E., Kulesa, H., and Graf, T. (2000). GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* 95, 2543-2551.
- Nie, J., Li, S.S., and McGlade, C.J. (2004). A novel PTB-PDZ domain interaction mediates isoform-specific ubiquitylation of mammalian Numb. *J Biol Chem* 279, 20807-20815.
- Niebuhr, B., Iwanski, G.B., Schwieger, M., Roscher, S., Stocking, C., and Cammenga, J. (2009). Investigation of C/EBPalpha function in human (versus murine) myelopoiesis provides novel insight into the impact of CEBPA mutations in acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia* 23, 978-983.
- Nishimura, T., and Kaibuchi, K. (2007). Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Dev Cell* 13, 15-28.
- Nissen-Druey, C., Tichelli, A., and Meyer-Monard, S. (2005). Human hematopoietic colonies in health and disease. *Acta Haematol* 113, 5-96.
- Nolta, J.A., Thiemann, F.T., Arakawa-Hoyt, J., Dao, M.A., Barsky, L.W., Moore, K.A., Lemischka, I.R., and Crooks, G.M. (2002). The AFT024 stromal cell line supports long-term ex vivo maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors. *Leukemia* 16, 352-361.
- Notta, F., Doulatov, S., and Dick, J.E. (2009). Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2Rgc-null recipients. *Blood* 115, 3704-3707.
- Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poepl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333, 218-221.
- Novershtern, N., Subramanian, A., Lawton, L.N., Mak, R.H., Haining, W.N., McConkey, M.E., Habib, N., Yosef, N., Chang, C.Y., Shay, T., *et al.* (2011). Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell* 144, 296-309.
- Nteliopoulos, G., and Gordon, M.Y. (2012). Protein Segregation Between Dividing Hematopoietic Progenitor Cells in the Determination of the Symmetry/Asymmetry of Cell Division. *Stem Cells Dev*.
- Oh, I.H., and Humphries, R.K. (2012). Concise review: Multidimensional regulation of the hematopoietic stem cell state. *Stem Cells* 30, 82-88.
- Ohishi, K., Varnum-Finney, B., and Bernstein, I.D. (2002). Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. *J Clin Invest* 110, 1165-1174.
- Petersen, P.H., Tang, H., Zou, K., and Zhong, W. (2006). The enigma of the numb-Notch relationship during mammalian embryogenesis. *Dev Neurosci* 28, 156-168.
- Petersen, P.H., Zou, K., Hwang, J.K., Jan, Y.N., and Zhong, W. (2002). Progenitor cell maintenance requires numb and numbl like during mouse neurogenesis. *Nature* 419, 929-934.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.
- Pierzchalski, A., Mittag, A., and Tarnok, A. (2011). Introduction A: recent advances in cytometry instrumentation, probes, and methods--review. *Methods Cell Biol* 102, 1-21.
- Pike, B.L., and Robinson, W.A. (1970). Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J Cell Physiol* 76, 77-84.
- Poch, T., Hermansky, F., and Lodrova, V. (1973). A contribution to the simultaneous appearance of basophilic and eosinophilic granules in chronic myelocytic leukemia. *Neoplasma* 20, 413-417.
- Poirault-Chassac, S., Six, E., Catelain, C., Lavergne, M., Villeval, J.L., Vainchenker, W., and Lauret, E. (2010). Notch/Delta4 signaling inhibits human megakaryocytic terminal differentiation. *Blood* 116, 5670-5678.
- Prasad, V.K., Mendizabal, A., Parikh, S.H., Szabolcs, P., Driscoll, T.A., Page, K., Lakshminarayanan, S., Allison, J., Wood, S., Semmel, D., *et al.* (2008). Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes. *Blood* 112, 2979-2989.
- Pronk, C.J., Rossi, D.J., Mansson, R., Attema, J.L., Norddahl, G.L., Chan, C.K., Sigvardsson, M., Weissman, I.L., and Bryder, D. (2007). Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell* 1, 428-442.
- Punzel, M., Gupta, P., Roodell, M., Mortari, F., and Verfaillie, C.M. (1999a). Factor(s) secreted by AFT024 fetal liver cells following stimulation with human cytokines are important for human LTC-IC growth. *Leukemia* 13, 1079-1084.

- Punzel, M., Moore, K.A., Lemischka, I.R., and Verfaillie, C.M. (1999b). The type of stromal feeder used in limiting dilution assays influences frequency and maintenance assessment of human long-term culture initiating cells. *Leukemia* 13, 92-97.
- Punzel, M., Wissink, S.D., Miller, J.S., Moore, K.A., Lemischka, I.R., and Verfaillie, C.M. (1999c). The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro. *Blood* 93, 3750-3756.
- Punzel, M., Zhang, T., Liu, D., Eckstein, V., and Ho, A.D. (2002). Functional analysis of initial cell divisions defines the subsequent fate of individual human CD34(+)CD38(-) cells. *Exp Hematol* 30, 464-472.
- Purton, L.E., and Scadden, D.T. (2007). Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell Stem Cell* 1, 263-270.
- Radsak, K., Fuhrmann, R., Franke, R.P., Schneider, D., Kollert, A., Brucher, K.H., and Drenckhahn, D. (1989). Induction by sodium butyrate of cytomegalovirus replication in human endothelial cells. *Arch Virol* 107, 151-158.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10, 547-558.
- Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67, 687-699.
- Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T., and Skoultschi, A.I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* 13, 1398-1411.
- Reugels, A.M., Boggetti, B., Scheer, N., and Campos-Ortega, J.A. (2006). Asymmetric localization of Numb:EGFP in dividing neuroepithelial cells during neurulation in *Danio rerio*. *Dev Dyn* 235, 934-948.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Rhyu, M.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76, 477-491.
- Rocha, V., Cornish, J., Sievers, E.L., Filipovich, A., Locatelli, F., Peters, C., Remberger, M., Michel, G., Arcese, W., Dallorso, S., *et al.* (2001). Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 97, 2962-2971.
- Rongvaux, A., Willinger, T., Takizawa, H., Rathinam, C., Auerbach, W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Eynon, E.E., Stevens, S., *et al.* (2011). Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2378-2383.
- Roozen, P.P., Brugman, M.H., and Staal, F.J. (2012). Differential requirements for Wnt and Notch signaling in hematopoietic versus thymic niches. *Ann N Y Acad Sci* 1266, 78-93.
- Rossi, D.J., Jamieson, C.H., and Weissman, I.L. (2008). Stem cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 132, 681-696.
- Ruzankina, Y., and Brown, E.J. (2007). Relationships between stem cell exhaustion, tumour suppression and ageing. *Br J Cancer* 97, 1189-1193.
- Sambandam, A., Maillard, I., Zediak, V.P., Xu, L., Gerstein, R.M., Aster, J.C., Pear, W.S., and Bhandoola, A. (2005). Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* 6, 663-670.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santolini, E., Puri, C., Salcini, A.E., Gagliani, M.C., Pelicci, P.G., Tacchetti, C., and Di Fiore, P.P. (2000). Numb is an endocytic protein. *J Cell Biol* 151, 1345-1352.
- Sato, T., Tang, T.C., Reubins, G., Fei, J.Z., Fujimoto, T., Kienlen-Campard, P., Constantinescu, S.N., Octave, J.N., Aimoto, S., and Smith, S.O. (2009). A helix-to-coil transition at the epsilon-cut site in the transmembrane dimer of the amyloid precursor protein is required for proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1421-1426.
- Schmitt, T.M., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17, 749-756.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.



- Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 703-713.
- Shih, C.C., Hu, M.C., Hu, J., Medeiros, J., and Forman, S.J. (1999). Long-term ex vivo maintenance and expansion of transplantable human hematopoietic stem cells. *Blood* 94, 1623-1636.
- Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A., and Orkin, S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J* 16, 3965-3973.
- Shultz, L.D., Ishikawa, F., and Greiner, D.L. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7, 118-130.
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., *et al.* (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174, 6477-6489.
- Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T.V., Greiner, D.L., *et al.* (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154, 180-191.
- Siegal, G. (1999). The surprisingly flexible PTB domain. *Nat Struct Biol* 6, 7-10.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963). The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol* 62, 327-336.
- Six, E.M., Bonhomme, D., Monteiro, M., Beldjord, K., Jurkowska, M., Cordier-Garcia, C., Garrigue, A., Dal Cortivo, L., Rocha, B., Fischer, A., *et al.* (2007). A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus. *J Exp Med* 204, 3085-3093.
- Smith, C.A., Dho, S.E., Donaldson, J., Tepass, U., and McGlade, C.J. (2004). The cell fate determinant numb interacts with EHD/Rme-1 family proteins and has a role in endocytic recycling. *Mol Biol Cell* 15, 3698-3708.
- Socolovsky, M., Nam, H., Fleming, M.D., Haase, V.H., Brugnara, C., and Lodish, H.F. (2001). Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 98, 3261-3273.
- Spana, E.P., and Doe, C.Q. (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* 121, 3187-3195.
- Spana, E.P., and Doe, C.Q. (1996). Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 17, 21-26.
- Spanholtz, J. (2005). Die Bedeutung der Schicksalsdeterminante NUMB für die Entwicklung humaner hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Struhl, G., and Adachi, A. (1998). Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* 93, 649-660.
- Struhl, G., and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-525.
- Suda, J., Suda, T., and Ogawa, M. (1984a). Analysis of differentiation of mouse hemopoietic stem cells in culture by sequential replating of paired progenitors. *Blood* 64, 393-399.
- Suda, T., Suda, J., and Ogawa, M. (1984b). Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2520-2524.
- Sugaya, K., Sasanuma, S., Nohata, J., Kimura, T., Fukagawa, T., Nakamura, Y., Ando, A., Inoko, H., Ikemura, T., and Mita, K. (1997). Gene organization of human NOTCH4 and (CTG)<sub>n</sub> polymorphism in this human counterpart gene of mouse proto-oncogene *Int3*. *Gene* 189, 235-244.
- Summers, Y.J., Heyworth, C.M., de Wynter, E.A., Hart, C.A., Chang, J., and Testa, N.G. (2004). AC133+ G0 cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and a capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells in vitro. *Stem Cells* 22, 704-715.
- Sutherland, H.J., Eaves, C.J., Eaves, A.C., Dragowska, W., and Lansdorp, P.M. (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 74, 1563-1570.
- Sutherland, H.J., Eaves, C.J., Lansdorp, P.M., Thacker, J.D., and Hogge, D.E. (1991). Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. *Blood* 78, 666-672.

- Sutherland, H.J., Lansdorp, P.M., Henkelman, D.H., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3584-3588.
- Suzuki, T., Yokoyama, Y., Kumano, K., Takanashi, M., Kozuma, S., Takato, T., Nakahata, T., Nishikawa, M., Sakano, S., Kurokawa, M., *et al.* (2006). Highly efficient *ex vivo* expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein. *Stem Cells* 24, 2456-2465.
- Tan, J.B., Visan, I., Yuan, J.S., and Guidos, C.J. (2005). Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nat Immunol* 6, 671-679.
- Tedder, T.F., and Isaacs, C.M. (1989). Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 143, 712-717.
- Temin, H.M., and Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.
- Teramura, M., Kobayashi, S., Hoshino, S., Oshimi, K., and Mizoguchi, H. (1992). Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis *in vitro*. *Blood* 79, 327-331.
- Terstappen, L.W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P.M., and Loken, M.R. (1991). Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 77, 1218-1227.
- Thomas, E.D., Lochte, H.L., Jr., Lu, W.C., and Ferrebee, J.W. (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 257, 491-496.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Till, J.E., and McCulloch, E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.
- Tindle, R.W., Nichols, R.A., Chan, L., Campana, D., Catovsky, D., and Birnie, G.D. (1985). A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognises myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crises, and reacts with immature cells in normal bone marrow. *Leuk Res* 9, 1-9.
- Toriya, M., Tokunaga, A., Sawamoto, K., Nakao, K., and Okano, H. (2006). Distinct functions of human numb isoforms revealed by misexpression in the neural stem cell lineage in the *Drosophila* larval brain. *Dev Neurosci* 28, 142-155.
- Traganos, F. (1984a). Flow cytometry: principles and applications. I. *Cancer Invest* 2, 149-163.
- Traganos, F. (1984b). Flow cytometry: principles and applications. II. *Cancer Invest* 2, 239-258.
- Tran, J., Brenner, T.J., and DiNardo, S. (2000). Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila* spermatogenesis. *Nature* 407, 754-757.
- Vaccari, T., and Bilder, D. (2005). The *Drosophila* tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev Cell* 9, 687-698.
- Varnum-Finney, B., Brashem-Stein, C., and Bernstein, I.D. (2003). Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood* 101, 1784-1789.
- Verdi, J.M., Bashirullah, A., Goldhawk, D.E., Kubu, C.J., Jamali, M., Meakin, S.O., and Lipshitz, H.D. (1999). Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10472-10476.
- Verdi, J.M., Schmandt, R., Bashirullah, A., Jacob, S., Salvino, R., Craig, C.G., Program, A.E., Lipshitz, H.D., and McGlade, C.J. (1996). Mammalian NUMB is an evolutionarily conserved signaling adapter protein that specifies cell fate. *Curr Biol* 6, 1134-1145.
- Vieira, P., and Cumano, A. (2004). Differentiation of B lymphocytes from hematopoietic stem cells. *Methods Mol Biol* 271, 67-76.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.
- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., and Conrad, R. (2012). Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 1820, 940-948.
- von Levetzow, G. (2008). Funktionelle Untersuchung der Zellschicksalsdeterminante numb. Dissertation im Fachbereich Biologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

- von Levetzow, G., Spanholtz, J., Beckmann, J., Fischer, J., Kogler, G., Wernet, P., Punzel, M., and Giebel, B. (2006). Nucleofection, an efficient nonviral method to transfer genes into human hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev* 15, 278-285.
- Wada, H., Masuda, K., Satoh, R., Kakugawa, K., Ikawa, T., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2008). Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* 452, 768-772.
- Wan, S., Cato, A.M., and Skaer, H. (2000). Multiple signalling pathways establish cell fate and cell number in *Drosophila* malpighian tubules. *Dev Biol* 217, 153-165.
- Wang, J.C., Doedens, M., and Dick, J.E. (1997). Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* 89, 3919-3924.
- Wang, L.D., and Wagers, A.J. (2012). Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 643-655.
- Ward, E.J., and Skeath, J.B. (2000). Characterization of a novel subset of cardiac cells and their progenitors in the *Drosophila* embryo. *Development* 127, 4959-4969.
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., and Huttner, W.B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12425-12430.
- Weil, S.C., and Hrisinko, M.A. (1987). A hybrid eosinophilic-basophilic granulocyte in chronic granulocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 87, 66-70.
- Willinger, T., Rongvaux, A., Strowig, T., Manz, M.G., and Flavell, R.A. (2011). Improving human hematolymphoid-system mice by cytokine knock-in gene replacement. *Trends Immunol* 32, 321-327.
- Wilson, A., Ardiet, D.L., Saner, C., Vilain, N., Beermann, F., Aguet, M., Macdonald, H.R., and Zilian, O. (2007). Normal hemopoiesis and lymphopoiesis in the combined absence of numb and numblake. *J Immunol* 178, 6746-6751.
- Worton, R.G., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1969). Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. *J Cell Physiol* 74, 171-182.
- Wu, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., and Griffin, J.D. (2000). MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* 26, 484-489.
- Wu, M., Kwon, H.Y., Rattis, F., Blum, J., Zhao, C., Ashkenazi, R., Jackson, T.L., Gaiano, N., Oliver, T., and Reya, T. (2007). Imaging hematopoietic precursor division in real time. *Cell Stem Cell* 1, 541-554.
- Xie, T., and Spradling, A.C. (1998). decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* 94, 251-260.
- Xie, T., and Spradling, A.C. (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* 290, 328-330.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D.W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012.
- Zeng, C., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1998). Delta and Serrate are redundant Notch ligands required for asymmetric cell divisions within the *Drosophila* sensory organ lineage. *Genes Dev* 12, 1086-1091.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.
- Zhong, W., Feder, J.N., Jiang, M.M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis. *Neuron* 17, 43-53.
- Zhong, W., Jiang, M.M., Schonemann, M.D., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2000). Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6844-6849.
- Zhong, W., Jiang, M.M., Weinmaster, G., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1997). Differential expression of mammalian Numb, Numblake and Notch1 suggests distinct roles during mouse cortical neurogenesis. *Development* 124, 1887-1897.
- Zilian, O., Saner, C., Hagedorn, L., Lee, H.Y., Sauberli, E., Suter, U., Sommer, L., and Aguet, M. (2001). Multiple roles of mouse Numb in tuning developmental cell fates. *Curr Biol* 11, 494-501.

- Zlotnik, A., Godfrey, D.I., Fischer, M., and Suda, T. (1992). Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J Immunol* *149*, 1211-1215.
- Zwahlen, C., Li, S.C., Kay, L.E., Pawson, T., and Forman-Kay, J.D. (2000). Multiple modes of peptide recognition by the PTB domain of the cell fate determinant Numb. *EMBO J* *19*, 1505-1515.
- Zweifel, M.E., and Barrick, D. (2001). Studies of the ankyrin repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch receptor. 1. Solution conformational and hydrodynamic properties. *Biochemistry* *40*, 14344-14356.

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Peter Horn bedanken, der mir die Möglichkeit gab, dieses Thema am Institut für Transfusionsmedizin zu bearbeiten und trotz eines vollen Terminkalenders immer ansprechbar war. Nicht zuletzt durch die hervorragende Ausstattung des Instituts wurden die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente erst möglich gemacht.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Johannes Fischer für die Möglichkeit, meine Promotion im ITZ in Düsseldorf zu beginnen und so manche Hilfe am Zellsorter.

Vielen Dank an alle Ärzte, Schwestern und Hebammen der Frauenklinik, besonders Prof. Rainer Kimmig, für die stetige Versorgung mit Nabelschnurblut und Prof. Dietrich Beelen für die Bereitstellung von humanem Knochenmark.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Bernd Giebel, der mir in seiner Arbeitsgruppe die Möglichkeit gab, mich mit den im Laufe der Zeit mannigfaltigen Projekten zu befassen. Danke für die intensive, persönliche und motivierende Betreuung, die es mir ermöglichte, viele Methoden zu lernen und zu verbessern und die Experimente durchzuführen, die mich am meisten interessierten, ohne das Ziel aus den Augen zu verlieren.

In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch besonders bei PD Dr. Michael Punzel für viele hilfreiche Tipps zur *in vitro* Kultur und bei Helmut Hanenberg und seinen Mitarbeitern Conny Wiek und Marcel Freund für Hilfe beim lentiviralen System. Danke auch an Dr. Michael Cross für hilfreiche Diskussionen und Korrekturen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Jan Dürig, vor allem für die Einführung in hämatologische Färbungen und deren Interpretation sowie so manche hilfreiche Diskussion, und seinem Mitarbeiter Michael Möllmann, ohne den die Maus-Repopulierungsversuche nicht möglich gewesen wären. Weiterhin vielen Dank an Carina Kirste und die Kolleginnen im HO-Labor für die freundliche Hilfe bei Zytospin und Färbungen.

Ein ebenfalls besonderer Dank gilt Dr. Joachim Göthert für die andauernde, geduldige Hilfe bei der Generierung der *Knockout*-Mäuse und seiner Mitarbeiterin Stefanie Weber für die gute Unterstützung und Hilfe und die Durchführung der Maus-Analysen.

Ferner danke ich Prof. Georg Iliakis für die Möglichkeit zur Bestrahlung von Zellen, den Mitarbeitern des Zentralen Tierlabors, besonders Dr. Philipp Dammann, für die vielfältige Unterstützung bei Planung und Haltung, PD Dr. Ludger Klein-Hitpass für die Hilfe bei der Durchführung von Expressionsanalysen und Prof. Verdon Taylor für die Bereitstellung der „Nb+L loxP“-Mäuse. Danke auch an Delia Cosgrove für die Ermöglichung der Teilnahme am BIOME-Programm und dessen Organisation.

Ich möchte meinen Dank auch an alle Mitarbeiter des Instituts aussprechen, die die freundliche Zusammenarbeit und die kompetente Unterstützung und Hilfe, die sie mir haben zukommen lassen, im Besonderen Dr. Hannes Klump für manch guten Tipp und hilfreiche Gespräche.

Ganz, ganz besonders bedanken möchte ich mich bei allen, die den Laboralltag mit mir geteilt haben: Danke Jule und Gregor für die schöne Zeit in Düsseldorf und vor allem Simon für gute Kicker-Pausen. Danke besonders an Liska, Anna, Sören und Stefan für viele, viele gemeinsame Tage im Labor, an die ich mich wegen der immer netten Atmosphäre immer gern zurückerinnern werde, eure Hilfsbereitschaft und den Zusammenhalt. Vielen Dank auch allen ehemaligen und neu hinzugekommenen Mitstreitern Esther, Silja, Friederike, Stefan, Johannes, Matt, Michael, Nan, Marcus, Mareike, Thorsten, Kyra, Daniel und allen, die ich jetzt, kurz vor Abgabe, möglicherweise vergesse.

Ein Dank geht auch an die gesamte AG Klump, die meine Zeit im Institut sehr bereichert hat: Danke an Melanie, Kristin, Corinna und Nadine, und natürlich an Susanne, für so manche Hilfe.

Danke an alle für die schöne Zeit, viel Spaß, aufmunternde Worte und die gute Zusammenarbeit!

Ein besonderer Dank geht auch an meine Familien und alle, die dazugehören. Besonderen Dank an die gesamte Schwiegerfamilie Schmidt für den Rückhalt! Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern Angelika und Detlef und meinem Bruder René bedanken, die mich immer unterstützt haben. Danke für Interesse, Beistand und Rückhalt.

Mein letzter und größter Dank gilt meiner Frau Sandra für die Geduld, das Verständnis, wenn es wieder einmal viel später wurde, die stetige Unterstützung und Liebe. Danke, dass es dich gibt!

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## Artikel

**Görgens, A.**, und Giebel, B. (2010). Self-Renewal of Primitive Hematopoietic Cells: A Focus on Asymmetric Cell Division, Kapitel 3 in "Umbilical Cord Blood: A Future for Regenerative Medicine?" Editoren: Suzanne Kadereit, Gerald Udolph. World Scientific Publishing, 51-75.

**Görgens, A.**, Beckmann, J., Ludwig, A.K., Möllmann, M., Dürig, J., Horn, P.A., Rajendran, L., und Giebel, B. (2012). Lipid raft redistribution and morphological cell polarization are separable processes providing a basis for hematopoietic stem and progenitor cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1121-1132.

**Görgens, A.**, Radtke, S., Möllmann, M., Cross, M., Dürig, J., Horn, P.A., und Giebel, B. (2012). Revision of the human hematopoietic tree: Granulocyte subtypes derive from distinct hematopoietic lineages (zur Veröffentlichung eingereicht).

## Kongressbeiträge

**Görgens, A.**, und Giebel, B.: Functional characterization of the impact of the Par/aPKC-Complex and Cdc42 on cell fate decisions, polarity and migration in human hematopoietic stem and progenitor cells. Summer School "Mechanisms of Early Differentiation", September 2008, Barsinghausen.

Horsch, L., **Görgens, A.**, von Levetzow, G., Hanenberg, H., und Giebel, B.: Functional characterization of the impact of the Par/aPKC-Complex and Cdc42 on cell fate decisions, polarity and migration in human hematopoietic stem and progenitor cells. Summer School "Mechanisms of Early Differentiation", September 2008, Barsinghausen.

Spanholtz, J., von Levetzow, G., **Görgens, A.**, Beckmann, J., Fischer, J., Punzel, M., und Giebel, B.: NUMB, a cell fate determinant known from *Drosophila melanogaster*, inhibits maintenance of primitive human hematopoietic cell fates. Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO, SGMO und SGH, Oktober 2008, Wien, Österreich.

**Görgens, A.**, Horn, P.A., und Giebel, B.: Functional characterization of the impact of the Par/aPKC-Complex and Cdc42 on cell fate decisions, polarity and migration in human hematopoietic stem and progenitor cells. 5th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, März 2009, Aachen.

Zeidler, S., von Levetzow, G., **Görgens, A.**, Hanenberg, H., Horn, P.A., und Giebel, B.: Analysis of transcription factors differentially expressed in the primitive human hematopoietic compartment. 5th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, März 2009, Aachen.

Horsch, L., **Görgens, A.**, von Levetzow, G., Hanenberg, H., Horn, P.A., Fischer, J., und Giebel, B.: Adopting the endothelial colony forming cell system to functionally analyze mechanisms regulating the self-renewal capacity of somatic stem and progenitor cells. 5th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, März 2009, Aachen.



**Görgens, A.**, Horn, P.A., und Giebel, B.: Functional characterization of the impact of the Par/aPKC-Complex and Cdc42 on cell fate decisions, polarity and migration in human hematopoietic stem and progenitor cells. GfE Graduate School "Molecular Cell Dynamics", Mai 2009, Münster.

**Görgens, A.**, Spanholtz, J., von Levetzow, G., Beckmann, J., Horn, P.A., Fischer, J., Punzel, M., und Giebel, B.: Numb, a cell fate determinant known from *Drosophila melanogaster*, inhibits maintenance of primitive human hematopoietic cell fates. ISCCR Meeting, Juli 2009, Barcelona, Spanien.

**Görgens, A.**, Horn, P.A., und Giebel, B.: Functional characterization of the impact of the Par/aPKC-Complex and Cdc42 on cell fate decisions, polarity and migration in human hematopoietic stem and progenitor cells. Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO, SGMO und SGH, Oktober 2009, Mannheim.

Horsch, L., **Görgens, A.**, von Levetzow, G., Hanenberg, H., Horn, P.A., Fischer, J., und Giebel, B.: Adopting the endothelial colony forming cell system to functionally analyze mechanisms regulating the self-renewal capacity of somatic stem and progenitor cells. Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO, SGMO und SGH, Oktober 2009, Mannheim.

Jansen, S., **Görgens, A.**, Horn, P.A. und Giebel, B.: Impacts of tetraspanins on primitive human hematopoietic cells. Combined Meeting of the ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT, November 2009, Hannover.

**Görgens, A.**, Beckmann, J., Rajendran, L., Horn, P.A., und Giebel, B.: Functional analyses of cell polarity organization in human hematopoietic stem and progenitor cells. XVIII. Wilsede Meeting "Modern Trends in Human Leukemia and Cancer", Juni 2010, Wilsede.

**Görgens, A.**, Spanholtz, J., von Levetzow, G., Ludwig, A.K., Beckmann, J., Horn, P.A., Fischer, J., Punzel, J., und Giebel, B.: Numb, a cell fate determinant known from *Drosophila*, inhibits maintenance of human primitive hematopoietic cell fates. SFB Symposium "Membrane Dynamics of the Cell", September 2010, Düsseldorf.

**Görgens, A.**, Beckmann, J., Rajendran, L., Horn, P.A., und Giebel, B.: Functional analyses of cell polarity organization in human hematopoietic stem and progenitor cells. 5<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Stem Cell Research, Oktober 2010, Lübeck.

Jansen, S., von Levetzow, G., **Görgens, A.**, Hanenberg, H., Horn, P.A., und Giebel, B.: Analysis of transcription factors differentially expressed in the primitive human hematopoietic compartment. 5<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Stem Cell Research, Oktober 2010, Lübeck.

Radtke, S., **Görgens, A.**, Punzel, M., Horn, P.A., Giebel, B.: Establishment of an extended *in vitro* assay to detect the most primitive human hematopoietic cells at a clonal level. 5<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Stem Cell Research, Oktober 2010, Lübeck.

**Görgens, A.**, Beckmann, J., Rajendran, L., Horn, P.A., und Giebel, B.: Functional analyses of cell polarity organization in human hematopoietic stem and progenitor cells. 6th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, April 2011, Essen.

**Görgens, A.**, Spanholtz, J., von Levetzow, G., Beckmann, J., Horn, P.A., Fischer, J., Punzel, J., und Giebel, B.: Numb, a cell fate determinant known from *Drosophila*, inhibits maintenance of human primitive hematopoietic cell fates. 6th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, April 2011, Essen.

Jansen, S., von Levetzow, G., **Görgens, A.**, Hanenberg, H., Horn, P.A., und Giebel, B.: Analysis of transcription factors differentially expressed in the primitive human hematopoietic compartment. 6th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, April 2011, Essen.

Radtke, S., **Görgens, A.**, Punzel, M., Horn, P.A., Giebel, B.: Establishment of an extended *in vitro* assay to detect the most primitive human hematopoietic cells at a clonal level. 6th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, April 2011, Essen.

**Görgens, A.**, Beckmann, J., Rajendran, L., Horn, P.A., und Giebel, B.: Functional analyses of cell polarity organization in human hematopoietic stem and progenitor cells. 44<sup>th</sup> Annual Congress of the German Society for Transfusion Medicine and Immunohematology, September 2011, Hannover.

Radtke, S., **Görgens, A.**, Punzel, M., Horn, P.A., Giebel, B.: Establishment of an extended *in vitro* assay to detect the most primitive human hematopoietic cells at a clonal level. 44<sup>th</sup> Annual Congress of the German Society for Transfusion Medicine and Immunohematology, September 2011, Hannover.

**Görgens, A.**, Radtke, S., Möllmann, M., Schmidt, M., Dürig, J., Horn, P.A., Giebel, B.: Functional Analyses of human CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> and CD133<sup>low/-</sup>CD34<sup>+</sup> cells challenge the existence of human common myeloid progenitor cells. Stem Cells in Development and Disease, September 2011, Berlin.

**Görgens, A.**, Spanholtz, J., von Levetzow, G., Fischer, J., Horn, P.A., und Giebel, B.: Numb, a cell fate determinant known from *Drosophila*, inhibits maintenance of human primitive hematopoietic cell fates. Stem Cells in Development and Disease, September 2011, Berlin.

**Görgens, A.**, Radtke, S., Möllmann, M., Dürig, J., Horn, P.A., Giebel, B.: Functional Analyses of human CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> and CD133<sup>low/-</sup>CD34<sup>+</sup> cells challenge the existence of human common myeloid progenitor cells. Joint CSH Asia/ISSCR Conference on Cellular Programs & Reprogramming, Oktober 2011, Suzhou, China.

**Görgens, A.**, Radtke, S., Möllmann, M., Dürig, J., Horn, P.A., Giebel, B.: Functional Analyses of human CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> and CD133<sup>low/-</sup>CD34<sup>+</sup> cells challenge the existence of human common myeloid progenitor cells. XIX. Wilsede Meeting "Modern Trends in Human Leukemia and Cancer", Juni 2012, Wilsede.

**Görgens, A.**, Spanholtz, J., von Levetzow, Fischer, J., Horn, P.A., und Giebel, B.: Numb, a cell fate determinant known from *Drosophila*, inhibits maintenance of human primitive hematopoietic cell fates. XIX. Wilsede Meeting “Modern Trends in Human Leukemia and Cancer”, Juni 2012, Wilsede.

Radtke, S., **Görgens, A.**, Horn, P. A., Giebel, B.: Establishment of an extended *in vitro* assay to analyse the developmental potential of the most primitive human hematopoietic cells at a clonal level. XIX. Wilsede Meeting “Modern Trends in Human Leukemia and Cancer”, Juni 2012, Wilsede.

**Görgens, A.**, Radtke, S., Möllmann, M., Dürig, J., Horn, P. A., Giebel, B.: Functional Analyses of human CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> and CD133<sup>low/-</sup>CD34<sup>+</sup> cells challenge the existence of human common myeloid progenitor cells. 41<sup>st</sup> Annual Scientific Meeting of the ISEH, August 2012, Amsterdam, Niederlande.

**Görgens, A.**, Göbel, M., Möllmann, M., Ludwig, A.K., Dührsen, U., Horn, P. A., Dürig, J., und Giebel, B.: Lipid raft redistribution and morphological cell polarization are separable processes providing a basis for hematopoietic stem and progenitor cell migration. 41<sup>st</sup> Annual Scientific Meeting of the ISEH, August 2012, Amsterdam, Niederlande.

Göbel, M., Möllmann, M., **Görgens, A.**, Giebel, B., Dührsen, U., und Dürig, J.: Toll-like receptor 9 agonists induce polarization and migration of chronic lymphocytic leukemia cells. Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO, SGMO und SGH+SSH, Oktober 2012, Stuttgart.

## Eidesstattliche Erklärungen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Funktionelle Analyse von Numb und Redefinition der humanen hämatopoetischen Hierarchie“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von André Görgens befürworte.

Essen, den 31.08.2012

\_\_\_\_\_

(PD Dr. rer. nat. Bernd Giebel)

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 31.08.2012

\_\_\_\_\_

(André Görgens)

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 31.08.2012

\_\_\_\_\_

(André Görgens)