

Der Hedgehog-Rezeptor Patched als molekularer Schalter der Hämatopoiese

Dissertation
zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Kai Dittmann

März 2007

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Wienands möchte ich im Besonderen für das in mich gesetzte Vertrauen in den vergangenen Jahren und seine große Kooperationsbereitschaft danken. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und fachlicher Rat haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Prof. Dr. Heidi Hahn möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und ihre vielen Ideen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Frey danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates.

Ich möchte mich bei Anette, Herbert, Rainer, Markus, Nadine sowie bei allen anderen ehemaligen Kollegen aus Bielefeld für die schöne Zeit bedanken.

Für die vorbildliche Pflege meiner Bielefelder Tiere und die hervorragende Zusammenarbeit möchte ich Chris ganz herzlich danken. Außerdem danke ich Dr. Axel Ziesenis, dass er die Unterbringung meiner Tiere ermöglicht hat.

Meinen Kommilitonen und Freunden Björn, Dirk, Elmar, Heide, Nicole, Norman, Simone, Sylke, Tabea und Veronika danke ich für die schöne Studienzeit und so manchem Kontakt, der auch weit darüber hinaus besteht.

Bei Ingo und Annika möchte ich mich für die schöne Zeit bedanken, in denen wir uns eine Laborbank geteilt haben und viel Spaß hatten. Besonders danke ich Annika für die gemeinsamen Kaffeepausen. Außerdem danke ich Nadine, Christian, Markus, Thomas und Kerstin sowie Gökhan, Alex, Konti, Anna, Niklas, Maren, Amina, Verena, Ines, Sebastian, Christoph und allen anderen Göttinger Kollegen für die lustige Zeit im Labor und dem Diplomandenteam für die Ausrichtung der Badmintonturniere.

Ein ganz besonderer Dank geht an Ablis im fernen Uigurien, der mit seinem sehr speziellen Humor und so mancher uigurischen Weisheit sehr zur Auflockerung des Laboralltags beigetragen hat.

Cora danke ich für die Hilfe beim Transfer meiner Bielefelder Tiere nach Göttingen und so manch' interessantem Gespräch nicht nur in Mausfragen.

Ein ganz großer Dank geht an Michael, auf den ich immer zählen konnte und der mir bei allen FACS-Fragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ganz besonders möchte ich der lieben Anja für die tolle Zeit der gemeinsamen Arbeit danken, die diese Dissertation erst ermöglicht hat. Ich hatte selten so viel Spaß im Labor!
P.S.: Ich freue mich schon auf die nächsten „Urlaubstage“!

Mein allergrößter Dank aber gilt meinen Eltern und meinem kleinen, großen Bruder. Danke für eure uneingeschränkte Unterstützung nicht nur während des Studiums und in allen Lebenslagen. Ihr habt immer an mich geglaubt und gebt mir einen unglaublich starken Halt. Euch möchte ich diese Arbeit widmen!

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2002 bis Januar 2005 an der Universität Bielefeld in der Abteilung Biochemie und Molekulare Immunologie und von Februar 2005 bis November 2006 an der Georg-August-Universität Göttingen in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. J. Wienands durchgeführt. Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 521) unterstützt.

Teile dieser Dissertation sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Uhmann A.*, Dittmann K.*, Nitzki F., Dressel R., Koleva M., Frommhold A., Zibat A., Binder C., Adham I., Nitsche M., Heller T., Armstrong V., Schulz-Schaeffer W., Wienands J.#, Hahn H.# (2007) The Hedgehog receptor Patched controls lymphoid lineage commitment. *Blood* (* these authors contributed equally, # corresponding authors)

Engelke M., Engels N., Dittmann K., Wienands J. (2007) Ca²⁺ signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev*, in press

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Hämatopoiese im Knochenmark.....	2
2.2 B-Zell-Entwicklung im Knochenmark.....	4
2.3 B-Zell-Reifung in der Milz.....	8
2.4 T-Zell-Entwicklung im Thymus.....	9
2.5 Die Sonic hedgehog/Patched-Signalkaskade.....	12
2.6 Rolle der Sonic hedgehog/Patched-Signalkaskade in der Hämatopoiese.....	15
2.7 Die biallelische <i>Ptch</i> -Inaktivierung in adulten Mäusen.....	16
3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
4 Material und Methoden.....	19
4.1 Material.....	19
4.1.1 Allgemein verwendete Puffer.....	19
4.1.2 Antikörper.....	19
4.1.3 Enzyme.....	20
4.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	20
4.1.5 Chemikalien und Reagenzien.....	21
4.1.6 Geräte.....	22
4.1.7 Oligonukleotide.....	23
4.1.8 Computersoftware.....	24
4.1.9 Mauslinien.....	24
4.2 Methoden.....	25
4.2.1 Arbeiten mit Mausmodellen.....	25
4.2.1.1 Haltung und Zucht von Labormäusen.....	25
4.2.1.2 Schwanzbiopsie und Ohrlochmarkierung.....	25
4.2.1.3 Blutentnahme.....	25
4.2.1.4 Intraperitoneale Injektion von Tamoxifen.....	26
4.2.1.5 Bestrahlung und Transplantation von Mäusen.....	26

4.2.2 Arbeiten mit primären Zellen.....	27
4.2.2.1 Isolierung von Knochenmarkszellen.....	27
4.2.2.2 Cytospin-Präparate von Knochenmarkszellen.....	27
4.2.2.3 Aufreinigung <i>lineage</i> -negativer (Lin^-) Knochenmarkszellen.....	28
4.2.2.4 Aufreinigung von Lymphozyten aus Blutproben.....	28
4.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	29
4.2.3.1 DNA-Isolierung aus Maus-Schwanzbiopsien.....	29
4.2.3.2 Isolierung von RNA aus Knochenmarksproben.....	29
4.2.3.3 Reverse Transkription.....	30
4.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
4.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	31
4.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
4.2.4 Durchflusszytometrie.....	32
4.2.4.1 Erythrozyten-Lyse von Milzpräparationen und Blutproben.....	32
4.2.4.2 Zellzählung.....	33
4.2.4.3 Vorbereitung von Geweben für die durchflusszytometrische Analyse.....	33
4.2.4.4 Identifizierung der ETP im Thymus.....	34
4.2.4.5 Zellzyklusanalyse <i>in vivo</i> mittels BrdU-Inkorporation.....	35
4.2.5 Zellkultur.....	36
4.2.5.1 Zellkultur zur Bestimmung des Differenzierungspotentials der kolonie-bildenden Einheiten (<i>colony-forming unit</i> , CFU) Lin^- Knochenmarkszellen.....	36
4.2.6 Histologische Untersuchungen.....	36
4.2.6.1 Fixierung und Einbettung von Organen für Paraffinschnitte.....	36
4.2.6.2 Anfertigung von Paraffinschnitten.....	37
4.2.6.3 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.....	37
4.2.6.4 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten.....	37
5 Ergebnisse.....	38
5.1 Initiale Charakterisierung <i>Ptch</i> -defizienter Tiere und Histologie des Thymus.....	38
5.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zell-Populationen im Thymus von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen.....	42
5.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung der frühen T-Zell-Vorläufer im Thymus von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen.....	48

5.4 Durchflusszytometrische Charakterisierung der B-Zell-Entwicklung in der Milz von Ptch-defizienten Mäusen.....	51
5.5 Charakterisierung der frühen B-Zell-Entwicklung im Knochenmark von Ptch-defizienten Mäusen.....	55
5.6 Charakterisierung der B-, T- und NK-Zellen im Blut sowie der NK-Zellen in der Milz von Ptch-defizienten Mäusen.....	60
5.7 Analyse der Hämatopoiese im Knochenmark Ptch-defizienter Tiere.....	65
5.8 Expressionsanalyse essentieller Regulatoren der lymphoiden Linie in Lin ⁻ Knochenmark Ptch-defizienter Tiere.....	72
5.9 Analyse der Zellzyklusprogression von Lin ⁻ Knochenmark Ptch-defizienter Tiere.....	75
5.10 Analyse des Differenzierungspotentials der koloniebildenden Einheiten (<i>colony-forming unit</i> , CFU) von Lin ⁻ Knochenmarkszellen.....	78
5.11 Transplantation Lin ⁻ Knochenmarkszellen in immundefiziente Rezipienten.....	80
6 Diskussion.....	84
6.1 Regulation der T-Zell-Lymphopoiese durch die Shh/Ptch-Signalkaskade.....	84
6.2 Essentielle Rolle der Shh/Ptch-Signalkaskade für die lymphoide Linie.....	87
6.3 Shh/Ptch-assoziierte Regulation des Zellzyklus im Stammzellkompartiment.....	89
6.4 Das Stromazellkompartiment im Knochenmark als Ptch-abhängiger Regulator der lymphoiden Linie.....	90
6.5 Regulation der lymphoiden Linie durch Ptch-vermittelte Signale.....	91
6.6 Ausblick.....	93
7 Literatur.....	94
8 Anhang.....	122
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	122
8.2 Tabellenverzeichnis.....	122

Abkürzungen

A	Adenin
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
BASH	<i>B-cell adapter containing a SH2-domain</i> , auch als SLP-65 oder BLNK bezeichnet
BCR	<i>B-cell antigen receptor</i> , B-Zell-Antigenrezeptor
BFU-E	<i>burst-forming unit-erythroid</i>
BLNK	<i>B-cell linker</i> , auch als SLP-65 oder BASH bezeichnet
Bmp	<i>bone morphogenic protein</i>
bp	<i>base pair</i> , Basenpaar
BrdU	5-Brom-2'-Deoxy-Uridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
BSAP	<i>B-cell-specific activator protein</i> , auch als Pax5 bezeichnet
C	Cytosin
c-Kit	Genprodukt des <i>c-Kit</i> Proto-Onkogens, CD117
CD21	Komplementrezeptor Typ 2
CD24	<i>heat stable antigen</i> , HSA
CD25	α -Kette des Interleukin-2 Rezeptor, IL-2R α
CD43	Ly-48, Leukosialin, Sialophorin
CD44	<i>Phagozytose-Glycoprotein-1</i> , PGP-1
cDNA	komplementäre DNA
CFU	<i>colony-forming unit</i> , koloniebildende Einheiten
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i> , allgemeiner lymphoider Vorläufer
CMP	<i>common myeloid progenitor</i> , allgemeiner myeloider Vorläufer
Cos2	<i>costal 2</i>
Cre	<i>causing recombination</i>
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
D _H	<i>heavy-chain diversity</i>
Dhh	Desert hedgehog
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt-negativ für CD4 und CD8 (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Deoxyribonukleotidtriphosphate
Disp	Dispatched
EBF	<i>early B-cell factor</i> , auch als OLF1 bezeichnet
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
ER	<i>estrogen receptor</i> , Östrogenrezeptor
ETP	<i>early T cell progenitor</i> , früher T-Zell-Vorläufer
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> , Lichtstreuung nach vorne
Flt3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
Flt3L	Ligand von Flt3
FTOC	<i>fetal thymic organ culture</i>
Fu	<i>fused</i>
g	Erdbeschleunigung, $9,81 \text{ m/s}^2$
G	Guanin
GMP	<i>granulocyte/macrophage progenitor</i> , Granulozyten/ Makrophagen Vorläufer
Gy	Gray, Energiedosis pro bestrahlten Gewebes, $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Joule/kg} = 100 \text{ rad}$
h	Stunde
HE	Hematoxylin/Eosin
Hh	Hedgehog
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> , hämatopoietische Stammzelle
Ig α	CD79a, <i>mb-1</i> Genprodukt
Ig β	CD79b, <i>B29</i> Genprodukt
IgH	schwere Immunglobulinkette
IgL	leichte Immunglobulinkette
Ihh	Indian hedgehog
IL-7	Interleukin-7
IL-7R α	α -Kette des Interleukin-7 Rezeptors, CD127
IVC	<i>individually ventilated cages</i>
J _H	<i>heavy-chain junction</i>
kb	Kilobasen

L	Liter
Lin	<i>lineage</i> , liniendeterminiert, festgelegte Entwicklungslinie
LMPP	<i>lymphoid-primed multipotential progenitor</i>
LoxP	<i>locus of crossover x from bacteriophage P1</i>
Ly6A/E	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus A/E</i> , auch als Sca-1 bezeichnet
M-CSFR	<i>macrophage colony stimulating factor receptor</i>
MEP	<i>megakaryocyte/erythrocyte progenitor</i> , Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
min	Minute
MPP	<i>multipotent progenitor</i> , multipotenter Vorläufer
NBCCS	<i>Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome</i>
NK	<i>natural killer</i> , Natürliche Killerzellen
ntc	<i>no template control</i>
OD	optische Dichte
4-OHT	4-Hydroxy-Tamoxifen
OLF1	<i>olfactory-1</i> , auch als EBF bezeichnet
Pax5	<i>paired boxed protein 5</i> , auch als BSAP bezeichnet
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Prä-BCR	<i>pre-B-cell antigen receptor</i> , Prä-B-Zell-Rezeptor
Prä-TCR	<i>pre T-cell receptor</i> , Prä-T-Zell-Rezeptor
pT α	<i>pre T-cell α chain</i> , Ersatz- α -Kette
Ptch	Patched
Ptch2	Patched 2
<i>Rag-1/-2</i>	<i>recombination activation genes</i> , rekombinationsaktivierende Gene
Sca-1	<i>stem cell antigen-1</i> , auch als Ly6A/E bezeichnet
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCF	<i>stem cell factor</i> ; Ligand der Rezeptortyrosinkinase c-Kit
Shh	Sonic hedgehog
Shh-C	C-terminale katalytische Domäne von Shh

Shh-N	N-terminale Domäne von Shh
SLP-65	<i>SH2-domain containing leukocyte protein of 65 kDa</i> , auch als BLNK oder BASH bezeichnet
Smo	Smoothened
SSC	<i>side scatter</i> , seitwärts gerichtete Lichtstreuung
Sufu	<i>suppressor of fused</i>
T	Thymin
T1 B-Zellen	<i>transitional B cell of type 1</i> , transitionale B-Zellen vom Typ 1
T2 B-Zellen	<i>transitional B cell of type 2</i> , transitionale B-Zellen vom Typ 2
TCR	<i>T-cell antigen receptor</i> , T-Zell-Antigenrezeptor
TCR- β	<i>T cell receptor β</i> , β -Kette des T-Zell-Rezeptors
T _m	Schmelztemperatur
<i>Trc8</i>	<i>translocation in renal carcinoma on chromosome 8</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V	Volt
Vdr	Vitamin D-Rezeptor
V _H	<i>heavy-chain variable</i>
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
W	Watt
Wnt	<i>wingless; int-1, mouse mammary virus integration site 1</i>
wt	Wildtyp

1 Zusammenfassung

Der Hedgehog (Hh)-Rezeptor Patched (Ptch) ist bereits während der Embryogenese essentiell, so dass Ptch-defiziente Embryonen aufgrund schwerer Entwicklungsdefekte *in utero* sterben. Heterozygote Keimbahnmutationen sind im Gegensatz dazu nicht letal, sondern prädisponieren für die Entwicklung von Tumoren. Die durch Ptch vermittelte Regulation der Hh/Ptch-Signalkaskade ist somit sowohl während der Embryogenese als auch für den adulten Organismus notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von Ptch in adulten konditional Ptch-defizienten Mäusen studiert. Nach der biallelischen Inaktivierung von *Ptch* wurde eine starke Reduktion des Thymusvolumens beobachtet. Anhand durchflusszytometrischer Analysen konnte der Verlust der CD4⁺CD8⁺ Thymozyten nachgewiesen werden. Durch die Analyse früher Entwicklungsstadien von Thymozyten wurde eine Blockade der T-Zell-Entwicklung im DN1-Stadium identifiziert, die dem Verlust der frühen T-Zell-Vorläufer (*early T cell progenitor*, ETP) im Thymus zugewiesen werden konnte. Die intrathymische T-Zell-Entwicklung ist von der kontinuierlichen Erneuerung der ETP abhängig, welche ausgehend vom Knochenmark den Thymus besiedeln. In Milzen Ptch-defizienter Tiere wurde der Verlust der T1 B-Zellen nachgewiesen, welche ausgehend vom Knochenmark in die Milz einwandern. Im Knochenmark konnte durch den Verlust der B-Zellen in frühen Entwicklungsstadien ein Defekt der B-Zell-Lymphopoese gezeigt werden. Als Ursache der blockierten Lymphozytenentwicklung wurde ein Differenzierungsdefekt der allgemeinen Vorläuferzellen der lymphoiden Linie (*common lymphoid progenitor*, CLP) identifiziert. Im Stammzellkompartiment konnte als Ursprung des CLP-Defekts der Expressionsverlust essentieller Regulatoren der Differenzierung von hämatopoietischen Stammzellen zu CLP und weiter zur lymphoiden Linie detektiert werden. CLP Ptch-defizienter Tiere zeigen eine stark reduzierte Zellzyklusprogression, die zum CLP-Defekt und damit zum Verlust der lymphoiden Linie beiträgt. Im Gegensatz dazu ist die Entwicklung der myeloiden Linie nach Inaktivierung von *Ptch* nicht beeinträchtigt. Dies konnte zusätzlich durch die unveränderte koloniebildende Aktivität myeloider Vorläuferzellen *in vitro* bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit der Hh-Rezeptor Ptch als molekularer Schalter der Differenzierung von CLP zur lymphoiden Linie identifiziert werden. Zusätzlich wurde dem Stromazellkompartiment im Knochenmark erstmals eine essentielle Funktion als Ptch-abhängiger Induktor für die Entwicklung der lymphoiden Linie zugewiesen, wohingegen sich die myeloide Linie Ptch-unabhängig entwickelt.

2 Einleitung

Der Prozess der Bildung und Reifung der Blutzellen im Organismus wird als Hämatopoese (griechisch: *haima*, Blut; *poiesis*, Herstellung) bezeichnet. Alle Zelltypen des Blutes und des Immunsystems stammen ursprünglich von pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSC) im Knochenmark ab. Die Existenz von HSC wurde bereits vor mehr als 40 Jahren experimentell bewiesen. Nach Transplantation von Knochenmark aus Spendertieren in letal bestrahlte Rezipienten wurde die vollständige Regeneration des blutbildenden Systems beobachtet (Till und McCulloch, 1963). HSC besitzen umfassendes Potential zur Selbsterneuerung und differenzieren über multipotente Vorläuferzellen zu Zellen der myeloiden und lymphoiden Linie. Die Differenzierungsschritte von HSC über verschiedene Stadien von Vorläuferzellen und weiter zu liniendeterminierten Zellpopulationen werden durch entwicklungspezifische Signale gesteuert. Diese werden u. a. über Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren und Cytokine vermittelt (zur Übersicht: Busslinger, 2004; Kondo *et al.*, 2003; Laiosa *et al.*, 2006).

2.1 Hämatopoese im Knochenmark

Nach dem Akashi-Kondo-Weissman-Modell der frühen Hämatopoese im Knochenmark des adulten Organismus differenzieren pluripotente HSC zunächst zu multipotenten Vorläuferzellen (*multipotent progenitor*, MPP). Ausgehend von MPP entwickeln sich liniendeterminierte allgemeine Vorläuferzellen der lymphoiden (*common lymphoid progenitor*, CLP) und myeloiden Linie (*common myeloid progenitor*, CMP) (Kondo *et al.*, 1997; Akashi *et al.*, 2000; zur Übersicht: Laiosa *et al.*, 2006). HSC und MPP gehören keiner festgelegten Entwicklungslinie (*lineage*, Lin) an und sind im adulten Knochenmark durch die Expression der Rezeptortyrosinkinase c-Kit (Genprodukt des *c-Kit* Proto-Onkogens, CD117) und Sca-1 (*stem cell antigen-1*, auch als *lymphocyte antigen 6 complex, locus A/E*, Ly6A/E bezeichnet) charakterisiert ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^+$) (Kondo *et al.*, 1997; Uchida und Weissman, 1992). Die initiale Differenzierung der HSC zu MPP wird durch die Expression der Transkriptionsfaktoren PU.1 (Spi-1) und Ikaros begleitet (Iwasaki *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 1997; Klug *et al.*, 1998). Die weitere Entwicklung zu Zellen der myeloiden oder lymphoiden Linie erfolgt durch die differentielle Expression von *PU.1*. So benötigt die Differenzierung zu CMP eine hohe PU.1 Expression, während CLP diesen Transkriptionsfaktor nur gering exprimieren

(Akashi *et al.*, 2000; DeKoter und Singh, 2000). Die Bildung des CLP und deren weitere Differenzierung zu allen Zellen der lymphoiden Linie wird durch die zusätzliche Expression von *Ikaros* begünstigt (Georgopoulos *et al.*, 1994; zur Übersicht: Georgopoulos, 2002; Smale und Dorshkind, 2006).

Zusätzlich zu den Transkriptionsfaktoren PU.1 und Ikaros wird die Differenzierung des MPP zum CLP durch die entwicklungspezifische Expression von Transmembranrezeptoren reguliert. Die Expression der Rezeptortyrosinkinase Flt3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) führt im $\text{Lin}^{-}\text{c-Kit}^{+}\text{Sca-1}^{+}$ Stammzellkompartiment zum Verlust der Selbsterneuerungskapazität und initiiert in MPP dessen Differenzierung zum CLP (Adolfsson *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 2001; Sitnicka *et al.*, 2002). Bezüglich der Expression von Flt3 wurde zwischen MPP und CLP eine weitere Zellpopulation der frühen Hämatopoese identifiziert, die als LMPP (*lymphoid-primed multipotential progenitor*) bezeichnet wird (Adolfsson *et al.*, 2005; Smale und Dorshkind, 2006). Im Gegensatz zu MPP haben LMPP bereits ihr Differenzierungspotential zu Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläuferzellen (*megakaryocyte/erythrocyte progenitor*, MEP) verloren, besitzen aber weiterhin die Kapazität zu anderen Populationen der myeloiden und lymphoiden Linie zu differenzieren. Der Flt3^{+} LMPP differenziert zum CLP, der durch die zusätzliche Expression der α -Kette des Interleukin-7 Rezeptors (IL-7R α) gekennzeichnet ist (Adolfsson *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 1997). Eine modifizierte Version des Akashi-Kondo-Weissman Modells der frühen Hämatopoese zeigt Abbildung 1.

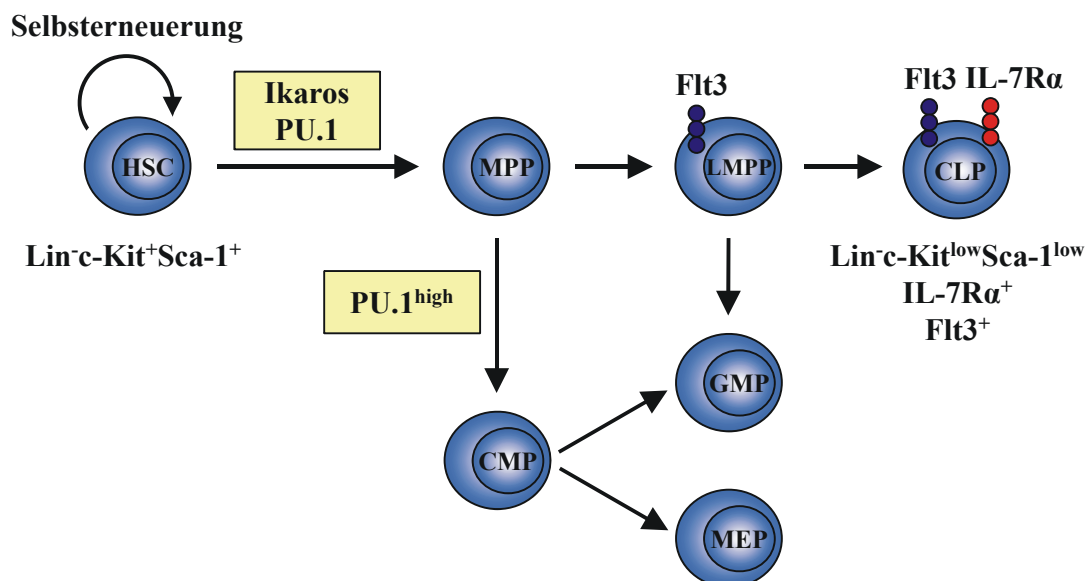


Abbildung 1: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildung 1: Modell der frühen Hämatopoese im Knochenmark.

HSC mit Fähigkeit zur Selbsterneuerung differenzieren zu multipotenten Vorläuferzellen (MPP). Ausgehend von MPP entwickeln sich LMPP, die weiter zu allgemeinen Vorläuferzellen der lymphoiden Linie (CLP) differenzieren. Außerdem entwickeln sich aus MPP allgemeine Vorläufer der myeloiden Linie (CMP), welche zu Granulozyten/Makrophagen Vorläuferzellen (GMP) und Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläuferzellen (MEP) differenzieren (Abbildung erstellt in Anlehnung an: Busslinger, 2004; Kondo *et al.*, 2003; Laiosa *et al.*, 2006; Linton und Dorshkind, 2005; Nagasawa, 2006; Singh *et al.*, 2005; Smale und Dorshkind, 2006).

2.2 B-Zell-Entwicklung im Knochenmark

Die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark wird durch die Umordnung und Expression der Gene für die schwere und leichte Immunglobulinkette begleitet. Die Zellen in den verschiedenen Entwicklungsstadien lassen sich anhand der Expression von Transkriptionsfaktoren und Oberflächenproteinen charakterisieren (zur Übersicht: Busslinger, 2004; Laiosa *et al.*, 2006). Die frühen Entwicklungsstadien der B-Zellen im Knochenmark der adulten Maus wurden 1991 durch die Definition der Fraktionen A bis D bestimmt (Abbildung 2) (Hardy *et al.*, 1991). Alle B-Zellen exprimieren eine spezifische Variante der Tyrosinphosphatase CD45 (B220/CD45R) auf ihrer Zelloberfläche (Coffman und Weissman, 1981). Bei der Differenzierung von Flt3⁺ MPP zu Flt3⁺IL-7R α ⁺ CLP der lymphoiden Linie werden die rekombinationsaktivierenden Gene *Rag-1* und *Rag-2* (*recombination activation genes*) exprimiert. Dadurch wird die Umordnung des Lokus für die schwere Immunglobulinkette (IgH), die Rekombination von D_H (*heavy-chain diversity*) und J_H (*heavy-chain junction*), initiiert (Igarashi *et al.*, 2002). Die anschließende Expression von B220 geht mit der Differenzierung des CLP zu CLP-2 einher (Li *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2003; Tudor *et al.*, 2000). CLP-2 entsprechen dem frühesten B-Zell-Stadium im Knochenmark und werden deshalb auch als Prä-Pro-B-Zellen bezeichnet (Hardy *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1996). Der nächste Differenzierungsschritt zu frühen Pro-B-Zellen wird durch die zusätzliche Expression des B-Zell-Corezeptors CD19 auf der Zelloberfläche begleitet (Krop *et al.*, 1996; Rickert *et al.*, 1995). Außerdem wird in frühen Pro-B-Zellen die Rekombination der D_H und J_H Gensegmente abgeschlossen. Direkt daran anschließend erfolgt in den Zellen des späten Pro-B-Zell-Stadium die weitere Umgruppierung des IgH Lokus durch Verknüpfung von V_H (*heavy-chain variable*) mit DJ_H. Eine produktive VDJ_H-Genumordnung in späten Pro-B-Zellen führt zur Expression einer intakten schweren μ -Kette auf der Zelloberfläche und initiiert die Entwicklung zu Zellen des Prä-B-Zell-Stadium (Hardy *et al.*, 1991). Die auf der Zelloberfläche von Prä-B-Zellen exprimierten schweren μ -Ketten sind nicht kovalent mit den Ersatz-leichten-Ketten

$\lambda 5$ und VpreB assoziiert (Karasuyama *et al.*, 1990; Kudo und Melchers, 1987; Tsubata und Reth, 1990; Winkler *et al.*, 1995). In der Maus wurde allerdings auch eine Population von Prä-B-Zellen identifiziert, die μ -Ketten aber weder $\lambda 5$ noch VpreB exprimieren (Su *et al.*, 2003). Durch weitere Assoziation mit den Signalmolekülen Iga (CD79a, *mb-1* Genprodukt) und Ig β (CD79b, *B29* Genprodukt) wird der als Prä-B-Zell-Rezeptor (*pre-B-cell antigen receptor*, Prä-BCR) bezeichnete Komplex vervollständigt (Hermanson *et al.*, 1988; Koyama *et al.*, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1988; Torres *et al.*, 1996). In Prä-BCR⁺ Zellen werden *Rag-1* und *Rag-2* nur schwach exprimiert, wodurch keine weitere Umordnung des Lokus für die schwere Kette stattfindet (Grawunder *et al.*, 1995). Der Prä-BCR ist ein wichtiger Kontrollpunkt der Differenzierung vom Pro- zum Prä-B-Zell-Stadium. Die Signalleitung durch den Prä-BCR stimuliert die proliferative Zellexpansion und induziert die Differenzierung zu kleinen Prä-B-Zellen. Nach erneuter Expression von *Rag-1* und *Rag-2* erfolgt die Rekombination der Gensegmente der leichten Immunglobulinkette (IgL) (Loffert *et al.*, 1996; Meffre *et al.*, 2000; Mombaerts *et al.*, 1992). Die Ersatz-leichten-Ketten $\lambda 5$ und VpreB des Prä-BCR werden nach erfolgreicher Rekombination der Gene für leichten Ketten entweder durch κ - oder λ -leichte Ketten ersetzt (Karayusama *et al.*, 1994; Melchers *et al.*, 1993; Reth, 1991). Schwere und leichte Ketten bilden ein IgM-Molekül und werden zusammen mit dem Iga/Ig β -Heterodimer in 1:1-Stöchiometrie als B-Zell-Antigenrezeptor (*B-cell antigen receptor*, BCR) auf der Zelloberfläche exprimiert (Schamel und Reth, 2000). Dadurch differenzieren Prä-B-Zellen zu unreifen IgM⁺ B-Zellen (Meffre *et al.*, 2004). Neben Pro-, Prä- und unreifen B-Zellen zirkulieren im Knochenmark reife, immunkompetente B-Zellen. Diese sogenannten rezirkulierenden B-Zellen haben bereits die Milz passiert und exprimieren neben IgM als weiteres Immunglobulin IgD auf ihrer Zelloberfläche (Förster *et al.*, 1989). Durch die kombinierte Expressionsanalyse von B220, IgM und CD43 (Ly-48, Leukosialin, Sialophorin) lassen sich Pro-, Prä-, unreife und rezirkulierende B-Zellen voneinander unterscheiden (Hardy *et al.*, 1991). Pro-B-Zellen sind B220⁺CD43⁺IgM⁻, Prä-B-Zellen B220⁺CD43⁻IgM⁻, unreife B-Zellen B220⁺CD43⁻IgM⁺ und rezirkulierende B-Zellen B220^{high}CD43⁻IgM⁺IgD^{low-high} (Abbildung 2).

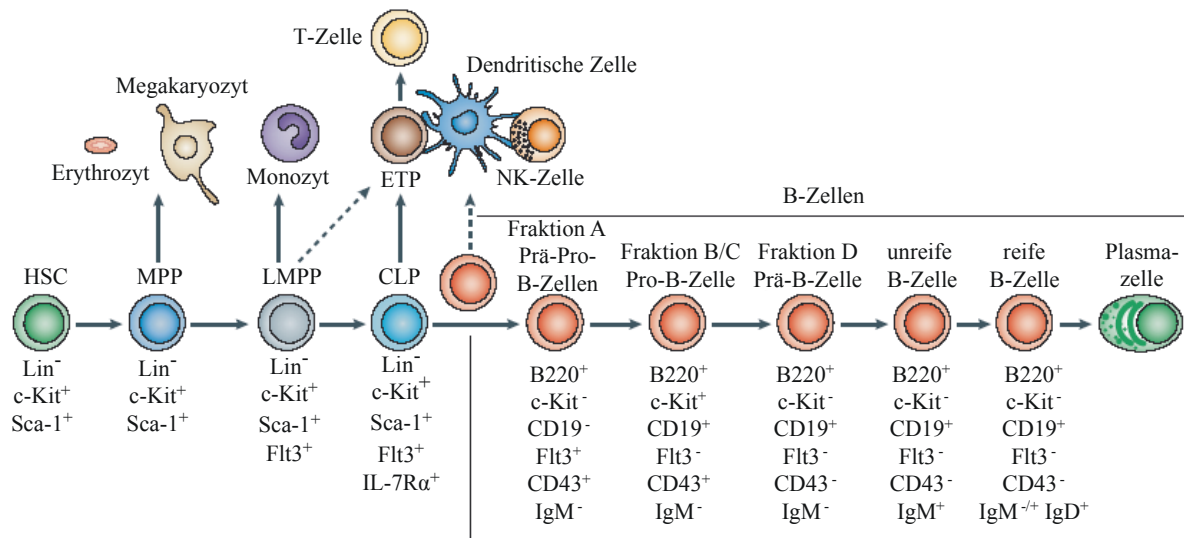


Abbildung 2: Übersicht der Zellen des hämatopoietischen Systems mit Fokus auf das Expressionsprofil der B-Zellen in den verschiedenen Entwicklungsstadien.

Ausgehend von pluripotenten HSC differenzieren die multipotenten Vorläuferzellen MPP und LMPP zu allgemeinen Vorläufern der lymphoiden Linie (CLP). Der CLP differenziert als erstes Stadium der B-Zell-Entwicklung zu Prä-Pro-B-Zellen und weiter über Pro-B-Zellen und Prä-B-Zellen zu unreifen B-Zellen (Hardy *et al.*, 1991). Diese verlassen das Knochenmark und differenzieren in der Peripherie zu reifen B-Zellen und Antikörpersezernierenden Plasmazellen (ETP, *early T cell progenitor*; NK, *natural killer*) (modifizierte Abbildung in Anlehnung an Nagasawa *et al.*, 2006).

Neben der entwicklungspezifischen Umordnung und Expression der Gene für die schwere und leichte Immunglobulinkette wird die Lymphopoese der B-Zellen im Knochenmark durch die sequentielle Expression von Transkriptionsfaktoren reguliert. Für die Differenzierung von CLP zu unreifen B-Zellen sind besonders die drei Transkriptionsfaktoren E2A, EBF (*early B-cell factor*, auch als *olfactory-1*, OLF1 bezeichnet) und Pax5 (*paired boxed protein 5*, auch als *B-cell-specific activator protein*, BSAP bezeichnet) essentiell (zur Übersicht: Busslinger, 2004; Laiosa *et al.*, 2006; Matthias und Rolink, 2005; Hagman und Lukin, 2005). Der Verlust eines jeden dieser Transkriptionsfaktoren führt zur Blockierung der B-Zell-Entwicklung bei der Differenzierung der Zellen vom Pro- zum Prä-B-Zell-Stadium. Das Gen *E2A* codiert die alternativen Spleißvarianten der *helix-loop-helix* Transkriptionsfaktoren E12 und E47, die zusammen als E2A bezeichnet werden (Murre *et al.*, 1989). In E2A-defizienten Mäusen ist die Entwicklung der Zellen im Pro-B-Zell-Stadium blockiert und es findet keine Umlagerung der D_H-J_H Gensegmente am IgH Locus statt (Bain *et al.*, 1994; Zhuang *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu E2A wird der Transkriptionsfaktor EBF nur in Pro-B-Zellen, Prä-B-Zellen und reifen B-Zellen des hämatopoietischen Systems exprimiert (Hagman *et al.*, 1993). Die Inaktivierung von *EBF* in Mäusen führt zu einem Differenzierungsblock der

frühen B-Zell-Entwicklung, der mit dem E2A-defizienter Mäuse vergleichbar ist (Lin und Grosschedl, 1995). Anhand vielfältiger Studien konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren E2A und EBF die Expression der Ersatz-leichten-Ketten $\lambda 5$ und VpreB, der Signalkomponenten I α und I β als auch Rag-1 und Rag-2 regulieren (Gisler und Sigvardsson, 2002; O’Riordan und Grosschedl, 1999; Sigvardsson *et al.*, 1997; Sigvardsson, 2000; Sigvardsson *et al.*, 2002).

Zur Differenzierung der B-Zellen in frühen Entwicklungsstadien ist neben E2A und EBF die nachgeschaltete Expression des Transkriptionsfaktors Pax5 essentiell (Abbildung 3). Pax5 wird im hämatopoietischen System ausschließlich von Zellen im Pro-B-Zell-Stadium bis zu reifen B-Zellen exprimiert (Adams *et al.*, 1992). In Pax5-defizienten Mäusen ist die B-Zell-Entwicklung im frühen Pro-B-Zell-Stadium im Knochenmark blockiert. Pax5-defiziente B-Zellen exprimieren unverändert E2A und EBF und die Umlagerung der D_H und J_H Gensegmente des IgH Locus ist nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu ist die Umlagerung des V_H Gensegments inhibiert, so dass keine erfolgreiche VDJ_H-Rekombination möglich ist (Nutt *et al.*, 1997; Nutt *et al.*, 1999; Urbanek *et al.*, 1994). Außerdem aktiviert Pax5 die Expression von Genen, die für essentielle Komponenten der Signalleitung des Prä-BCR codieren. Dies sind zum einen das signalleitende I α und der Corezeptor CD19 (Nutt *et al.*, 1997; Nutt *et al.*, 1998; Fitzsimmons *et al.*, 1996; Kozmik *et al.*, 1992). Zum anderen ist es SLP-65 (*SH2-domain containing leukocyte protein of 65 kDa*, auch BLNK (*B-cell linker*) oder BASH (*B-cell adapter containing a SH2-domain*) genannt, das zentrale Adapterprotein der Signalleitung von Prä-BCR und BCR (Fu *et al.*, 1998; Goitsuka *et al.*, 1998; Schebesta *et al.*, 2002; Wienands *et al.*, 1998). Die Bedeutung von CD19 und SLP-65 als entscheidende Zielgene von Pax5 konnte auch durch CD19/SLP-65-defiziente Mäuse gezeigt werden, die einen identischen Block in der B-Zell-Entwicklung aufweisen wie Pax5-defiziente Mäuse (Hayashi *et al.*, 2003). Auf molekularer Ebene ist Pax5 nicht nur an der Aktivierung B-Zell-spezifischer Gene beteiligt, sondern reprimiert auch die Expression der Gene *M-CSFR* (*macrophage colony stimulating factor receptor*) und *Notch1*. Dadurch sind die Zellen der B-Zell-Linie nicht mehr zur Bindung des myeloiden Cytokins M-CSF oder des für die T-Zell-Entwicklung essentiellen Notch1-Liganden befähigt (Nutt *et al.*, 1999; Radtke *et al.*, 2004; Souabni *et al.*, 2002). In Pax5-defizienten Pro-B-Zellen wird eine starke Expression von Notch-1 beobachtet, wodurch diesen Zellen vermutlich die Fähigkeit vermittelt wird zu T-Zellen zu differenzieren (Souabni *et al.*, 2002).

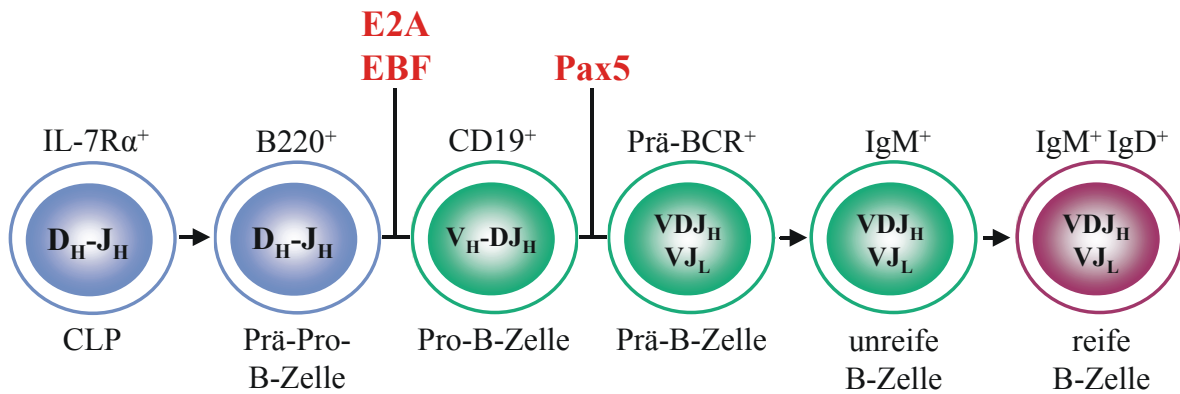


Abbildung 3: Charakterisierung der B-Zell-Lymphopoese anhand entwicklungs-spezifischer Oberflächenproteine und dem Status der V(D)J-Rekombination.

In CLP beginnt die Umordnung des Lokus für die schwere Immunglobulinkette (IgH) durch Rekombination von D_H und J_H. In Pro-B-Zellen erfolgt durch weitere Umgruppierung des IgH Lokus die Verknüpfung von V_H mit DJ_H. Eine produktive VDJ_H-Genumordnung führt zur Expression einer intakten schweren μ -Kette. Nach Assoziation der μ -Kette mit den Ersatz-leichten-Ketten λ_5 und VpreB wird der Prä-B-Zell-Rezeptor auf Prä-B-Zellen exprimiert. Die Ersatz-leichten-Ketten werden nach Rekombination von V_L und J_L (VJ_L) am Lokus für leichte Immunglobulinketten durch κ - oder λ -leichte Ketten ersetzt. Dies führt zur Expression von IgM auf unreifen und reifen B-Zellen (modifizierte Abbildung nach Hagman und Lukin *et al.*, 2005).

2.3 B-Zell-Reifung in der Milz

Die meisten Entwicklungsschritte der B-Zell-Lymphopoese finden im Knochenmark durch die Differenzierung von CLP zu unreifen IgM⁺ B-Zellen statt. Unreife B-Zellen differenzieren im Knochenmark zu transitionalen B-Zellen vom Typ 1 (*transitional B cell of type 1*, T1 B-Zellen), die durch passiven Transport über die Blutbahn in die Milz einwandern (Carsetti *et al.*, 1995; Jacobsen und Osmond, 1990). In der Milz findet die abschließende Reifung der B-Zellen statt. Dabei wird neben IgM auch IgD auf der Zelloberfläche exprimiert (Yuan und Witte, 1988). Außerdem wird der Komplementrezeptor CD21 exprimiert, der zusammen mit CD19 und CD81 einen Corezeptor auf der Zelloberfläche von B-Zellen bildet (Tedder *et al.*, 1994). Die Reifungsstadien der B-Zellen in der Milz werden neben CD21, IgM und IgD durch die Expressionsanalyse von CD24 (*heat stable antigen*, HSA) charakterisiert (Su und Rawlings, 2002). T1 B-Zellen sind durch eine hohe Expression von IgM und eine schwache Expression von IgD gekennzeichnet und exprimieren CD24 aber kein CD21 (IgM^{high}IgD^{low}CD24⁺CD21⁻). Durch zusätzliche Expression von CD21 und erhöhte Expression von IgD differenzieren T1 B-Zellen zu transitionalen B-Zellen des Typ 2 (*transitional B cell of type 2*, T2 B-Zellen) (IgM^{high}IgD^{high}CD24⁺CD21⁺). Sowohl T1 als auch T2 B-Zellen differenzieren zu reifen B-Zellen, die durch eine geringe Expression von

CD21 und CD24 gekennzeichnet sind, wohingegen IgM und IgD stark exprimiert werden ($\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{high}}\text{CD24}^{\text{low}}\text{CD21}^{\text{low}}$) (Loder *et al.*, 1999; Petro *et al.*, 2002; Su und Rawlings, 2002). Im Gegensatz zu T1 und T2 B-Zellen können reife B-Zellen die Milz verlassen und zirkulieren im Organismus. Im Knochenmark werden diese rezirkulierende B-Zellen durch die Expressionsanalyse von IgM und IgD von den sich im Knochenmark entwickelnden B-Zellen unterschieden (Hardy *et al.*, 1991).

2.4 T-Zell-Entwicklung im Thymus

Sowohl B- als auch T-Lymphozyten stammen von HSC im Knochenmark ab, wo die Lymphopoese der B-Zellen größtenteils auch beendet wird. Im Gegensatz dazu wandern frühe T-Zell-Vorläufer (*early T cell progenitor*, ETP) aus dem Knochenmark über die Blutbahn in den Thymus ein und differenzieren dort zu T-Zellen. Die ETP im Thymus besitzen keine Selbsterneuerungskapazität und müssen daher ständig aus Vorläuferzellen im Knochenmark nachgebildet werden (Donskoy und Goldschneider, 1992; Foss *et al.*, 2001; Goldschneider *et al.*, 1986, zur Übersicht: Schwarz und Bhandoola, 2006; Bhandoola und Sambandam, 2006). ETP differenzieren zum einen aus den CLP der lymphoiden Linie, zum anderen werden sie ausgehend von HSC, MPP und LMPP gebildet (Adolfsson *et al.*, 2001; Adolfsson *et al.*, 2005; Allman *et al.*, 2003; Christensen und Weissman, 2001; Kondo *et al.*, 1997). In Abwesenheit von CLP können die ETP vollständig aus HSC, MPP und LMPP gebildet werden (Abbildung 4). In Ikaros-defizienten Mäusen sind aufgrund eines Blocks in der frühen Hämatopoese keine CLP im Knochenmark nachweisbar und somit findet keine B-Zell-Lymphopoese statt. Die Population der ETP im Thymus wird aber weiterhin gebildet und die T-Zell-Lymphopoese findet uneingeschränkt statt (Allman *et al.*, 2003).

Bezüglich der Expression von CD4 und CD8, Corezeptoren des T-Zell-Antigenrezeptors (*T-cell antigen receptor*, TCR), lassen sich vier Hauptpopulationen unreifer und reifer T-Zellen definieren. Thymozyten sind bezüglich CD4 und CD8 zuerst doppelt-negativ (DN, $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$), anschließend doppelt-positiv (DP, $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$) und differenzieren letztendlich zu reifen, CD4 oder CD8 einfach-positiven (SP, CD4^+ oder CD8^+) T-Zellen (Abbildung 4). Zur weiteren Klassifizierung wird die DN-Population aufgrund der differentiellen Expression von CD44 (Phagozytose-Glycoprotein-1, PGP-1) und CD25 (α -Kette des Interleukin-2 Rezeptors, IL-2R α) in vier Stadien unterteilt (Godfrey *et al.*, 1993; Godfrey *et al.*, 1994; Pearse *et al.*, 1989). In der DN1-Population ($\text{CD44}^+\text{CD25}^-$) sind die ETP enthalten, welche eine starke Expression von c-Kit aufweisen, aber nur geringe

Mengen linienspezifischer Marker exprimieren. ETP sind daher als $\text{Lin}^{\text{low}}\text{CD25}^{\text{c-Kit}}^{\text{high}}$ definiert. Durch zusätzliche Expression von CD25 auf der Zelloberfläche werden Zellen der DN2-Population ($\text{CD44}^+\text{CD25}^+$) gebildet. In dieser und der darauffolgenden DN3-Population ($\text{CD44}^-\text{CD25}^+$) werden durch Expression der Transkriptionsfaktoren Rag-1 und Rag-2 die Gensegmente für die β -Kette umgelagert (Oettinger *et al.*, 1990). Analog der V(D)J-Rekombination der schweren Immunglobulinkette der B-Zellen werden zuerst D_{β} -Gensegmente mit J_{β} -Gensegmenten verknüpft. Nach weiterer Rekombination von DJ_{β} -Gensegmenten mit V_{β} -Gensegmenten werden β -Ketten mit Ersatz- α -Ketten (*pre T-cell α chain*, pT α) zusammen mit CD3 als Prä-T-Zell-Rezeptor (*pre T-cell receptor*, Prä-TCR) auf der Zelloberfläche exprimiert (Wilson und McDonald, 1995). Während der weiteren Differenzierung zu Zellen der DN4-Population werden *Rag-1* und *Rag-2* gering exprimiert, wodurch die weitere Umordnung des Lokus für die β -Kette unterbleibt (Turka *et al.*, 1991; Wayne *et al.*, 1994). Die Expression der β -Kette im Prä-TCR-Komplex auf der Zelloberfläche wird als β -Selektion bezeichnet. Diese Zellen können durch Rekombination der Gensegmente der α -Kette weiter zu $\alpha\beta$ T-Zellen differenzieren. Nahezu parallel zu den Gensegmenten für β -Ketten werden auch Gensegmente für γ - und δ -Ketten umgelagert, wodurch die Bildung von $\gamma\delta$ T-Zellen initiiert wird. Die meisten T-Zellen differenzieren zu $\alpha\beta$ T-Zellen, da die β -Gensegmente bereits produktiv rekombiniert sind und der $\alpha\beta$ Prä-TCR exprimiert wird, bevor die Rekombination der γ - und δ -Gensegmente erfolgt (Bonneville *et al.*, 1989; Geisler *et al.*, 1988; Fehling *et al.*, 1995).

Die Thymozyten der DN1- und DN2-Population sind durch eine starke Expression von c-Kit charakterisiert. Zusätzlich exprimieren alle Zellen der DN-Populationen IL-7R. Vor der Expression des Prä-TCR der Zellen des DN3-Stadiums erfolgt die Stimulation der Thymozyten über die vom Thymuskortex sezernierten Cytokine SCF (*stem cell factor*; Ligand der Rezeptortyrosinkinase c-Kit) und IL-7 (Interleukin-7) (Godfrey *et al.*, 1992; Muegge *et al.*, 1993). Sowohl in c-Kit- als auch SCF-defizienten Mäusen ist die DN-Population deutlich reduziert (Rodewald *et al.*, 1995). Dieser Defekt in der frühen T-Zell-Entwicklung ist ebenso in IL-7- und IL-7R-defizienten Mäusen gezeigt worden (Moore *et al.*, 1996; Peschon *et al.*, 1994; Maki *et al.*, 1996).

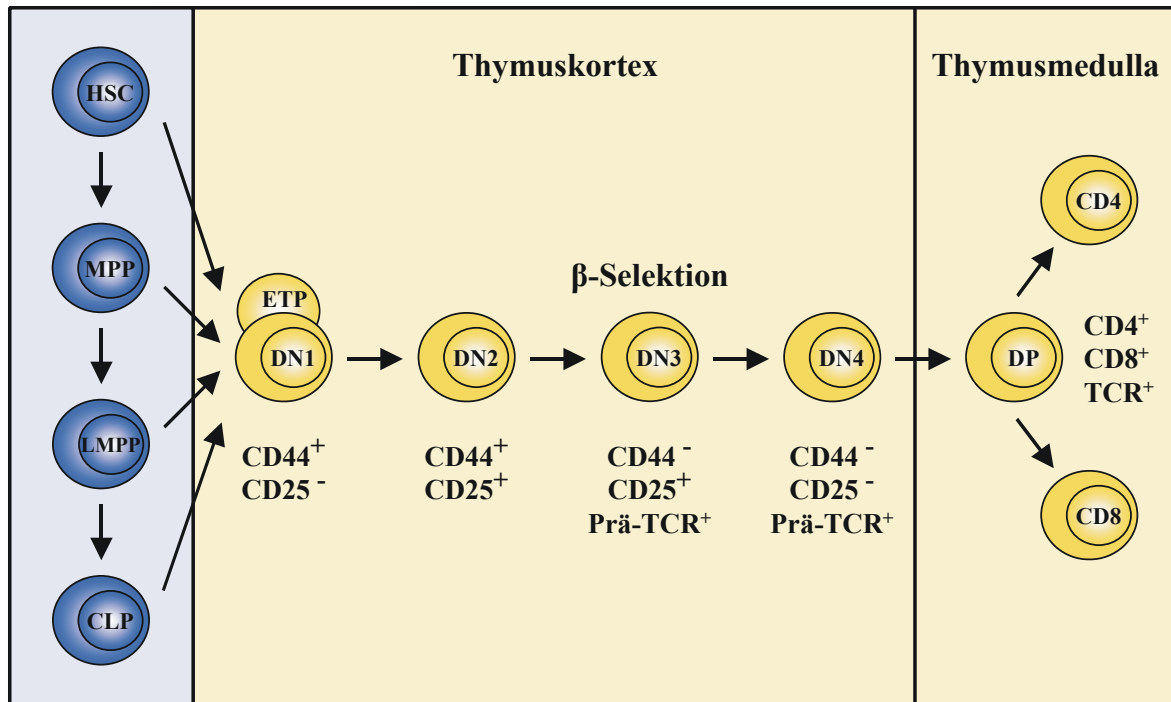


Abbildung 4: Modell der T-Zell-Entwicklung im Thymus.

Ausgehend von HSC, MPP, LMPP und CLP im Knochenmark (blaues Feld) differenzieren ETP und besiedeln den Thymus. Im Thymuskortex entwickeln sich die Zellen der frühen Stadien der T-Zell-Entwicklung. Anhand der Expression von CD44 (Phagozytose-Glycoprotein-1, PGP-1) und CD25 (α -Kette des Interleukin-2 Rezeptors, IL2R α) werden die Zellen in vier DN-Stadien (doppelt-negativ für CD4 und CD8) unterteilt. Nach β -Selektion der Zellen im DN3-Stadium (CD44⁻CD25⁺) wird der Prä-T-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Zellen im DN4-Stadium (CD44⁻CD25⁻) wandern vom Thymuskortex zur Thymusmedulla und differenzieren zu DP-Zellen (doppelt-positiv für CD4 und CD8). DP-Zellen differenzieren letztendlich zu CD4- oder CD8-einfach-positiven T-Zellen (Abbildung erstellt in Anlehnung an: Bhandoola und Sambandam, 2006; Germain, 2002; Linton und Dorshkind, 2004; Weerkamp *et al.*, 2006).

Die Entscheidung, ob multipotente Vorläuferzellen innerhalb der lymphoiden Linie zu B- oder T-Zellen differenzieren, wird u. a. von Signalen reguliert, die über transmembran gebundene Rezeptoren der Notch-Familie vermittelt werden. Bei Säugetieren wurden bisher vier verschiedene Notch-Rezeptoren (Notch1-4) identifiziert (zur Übersicht: Radtke *et al.*, 2004). Bereits für die frühe Lymphopoese der T-Zellen sind über Notch1 vermittelte Signale essentiell (Radtke *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000, zur Übersicht: Maillard *et al.*, 2005). Den Thymus besiedelnde ETP besitzen einen aktiven Notch1-Signalweg, der sowohl für deren Bildung aus multipotenten Vorläuferzellen im Knochenmark als auch die Differenzierung zu T-Lymphozyten im Thymus notwendig ist (Sambandam *et al.*, 2005). Durch Notch1 werden außerdem Signale vermittelt, die die B-Zell-Entwicklung inhibieren (Pui *et al.*, 1999). In Notch1-defizienten Mäusen entwickeln sich in den Thymus einwandernde multipotente Vorläuferzellen zu B-Zellen (Wilson *et al.*, 2001). Durch die

Abwesenheit von Notch1-vermittelten Signalen ist die T-Zell-Entwicklung in einem frühen Stadium blockiert und führt dadurch zur intrathymischen Akkumulation von B-Lymphozyten. Eine aktive Signalleitung über Notch1 begünstigt somit die Lymphopoese der T-Zellen, wohingegen das Fehlen bzw. die Inhibition von Notch1-vermittelten Signalen (z. B. durch die Expression von *Pax5* im Knochenmark (Souabni *et al.*, 2002; Cotta *et al.*, 2003)) die B-Zell-Lymphopoese unterstützt.

2.5 Die Sonic hedgehog/Patched-Signalkaskade

Bei der genetischen Analyse von *Drosophila melanogaster* Larven identifizierten Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus die Gene *Hedgehog* (*Hh*) und *Patched* (*Ptc*) (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). *Hh* gehört zu Familie der Segmentpolaritätsgene, die während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus für die Regulation der Differenzierung und Proliferation der Zellen essentiell sind. In Vertebraten wurden drei zu *Hh* homologe Gene identifiziert, *Desert hedgehog* (*Dhh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) und *Sonic hedgehog* (*Shh*) (Marigo *et al.*, 1995; Echelard, 1993; Chang *et al.*, 1994). Zu *Ptc* von *D. melanogaster* wurden in Vertebraten ebenfalls drei homologe Gene identifiziert, *Patched* (*Ptch*), *Patched 2* (*Ptch 2*) und *translocation in renal carcinoma on chromosome 8* (*Trc8*) (Gemmil *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 1999).

In Vertebraten wird *Shh* sowohl in embryonalen als auch adulten Geweben exprimiert. *Shh* besitzt die größte biologische Aktivität der drei Hh-Proteine und agiert mit *Ptch* in einem gemeinsamen Signalweg (Pathi *et al.*, 2001; zur Übersicht: Ruiz i Altaba *et al.*, 2002a; Ruiz i Altaba *et al.*, 2002b; Cohen, 2003). *Shh* wird von signalsendenden Zellen im Gewebeverband in den Interzellularraum sekretiert. Dazu wird *Shh* zunächst intrazellulär als Protein von 45 kDa synthetisiert. Die C-terminale katalytische Domäne (*Shh*-C, 25 kDa) bewirkt anschließend die autokatalytische Spaltung von *Shh*. Die N-terminale Domäne (*Shh*-N, 20 kDa) ist ein Signalpeptid, welches während der Autokatalyse C-terminal mit Cholesterol sowie N-terminal durch Palmitoylierung modifiziert wird (Bumcrot *et al.*, 1995; Chamoun *et al.*, 2001; Ingham, 2000; Lee *et al.*, 1994; Pepinsky *et al.*, 1998; Porter *et al.*, 1995; Porter *et al.*, 1996). Das aktivierte *Shh*-N wird durch Dispatched (*Disp*), einem Transmembranprotein mit 12 hydrophoben membrandurchspannenden Domänen, in den extrazellulären Raum abgegeben (Burke *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2002).

Bei einer potentiell signalempfangenden Zelle wird in Abwesenheit von Shh-N die Aktivität von Smoothed (Smo) durch eine katalytische Interaktion mit Ptch blockiert (Denef *et al.*, 2000; Taipale *et al.*, 2002). Dabei bewirkt bereits ein Ptch-Molekül eine nahezu 80%ige Reduktion der Aktivität von 45 Smo-Molekülen (Taipale *et al.*, 2002). Ptch ist ein Membranprotein mit 12 Transmembrandomänen, sowohl der N- als auch der C-Terminus liegt intrazellulär. Ptch besitzt zwei große hydrophile extrazelluläre Schleifen, über die die Bindung zum Liganden Shh-N vermittelt wird (Hooper und Scott, 1989; Marigo *et al.*, 1996). Durch Bindung von Shh-N an seinen Rezeptor Ptch wird die inhibierende Funktion von Ptch zu Smo aufgehoben und führt zu dessen Aktivierung (Alcedo *et al.*, 2000; Chen und Struhl, 1998; Murone *et al.*, 1999; Stone *et al.*, 1996). Smo transduziert somit das über Shh-N vermittelte Signal der signalsendenden Zelle zur signalempfangenden Zelle. Smo ist ein Transmembranprotein mit sieben hydrophoben membrandurchspannenden Domänen und besitzt einen extrazellulären N-Terminus sowie einen intrazellulären C-Terminus (Alcedo *et al.*, 1996; van den Heuvel und Ingham, 1996). Die Aktivierung von Smo bewirkt die Freisetzung von cytoplasmatisch gebundenen Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie (Gli1, Gli2 und Gli3). Diese Transkriptionsfaktoren sind beim inaktiven Shh/Ptch-Signalweg durch einen Komplex aus Cos2 (*costal 2*), Fu (*fused*) und Sufu (*suppressor of fused*) an Mikrotubuli im Cytoplasma gebunden (Ding *et al.*, 1999; Pearse *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu Cos2, Fu und Sufu, die auch nach Stimulation des Signalwegs im Cytoplasma verbleiben, werden die Gli Transkriptionsfaktoren in den Zellkern transportiert und initiieren dort die Transkription ihrer Zielgene. In Vertebraten ist dies zum einen Ptch, die inhibierende Komponente des Shh/Ptch-Signalwegs, und zum anderen Proteine der Wnt (*wingless*; *int-1*, *mouse mammary virus integration site 1*)- und Bmp (*bone morphogenic protein*)-Familie. Die Gli-abhängige Expression von *Ptch* resultiert in einem Anstieg der Ptch-Konzentration in der Zellmembran. Dadurch wird das Verhältnis von ungebundenem Ptch zu Shh-N/Ptch-Aggregaten erhöht, so dass Smo erneut inhibiert wird (Chen und Struhl, 1996). Durch diesen negativen Rückkopplungsmechanismus wird die Inaktivierung der Shh/Ptch-Signalkaskade nach Shh-Stimulation initiiert. Somit ist die Kontrolle der Signalkaskade gewährleistet und der Shh/Ptch-Signalweg der Zelle wird für eine erneute Stimulation mit Shh-N in den unstimulierten Zustand zurückgesetzt (Abbildung 5).

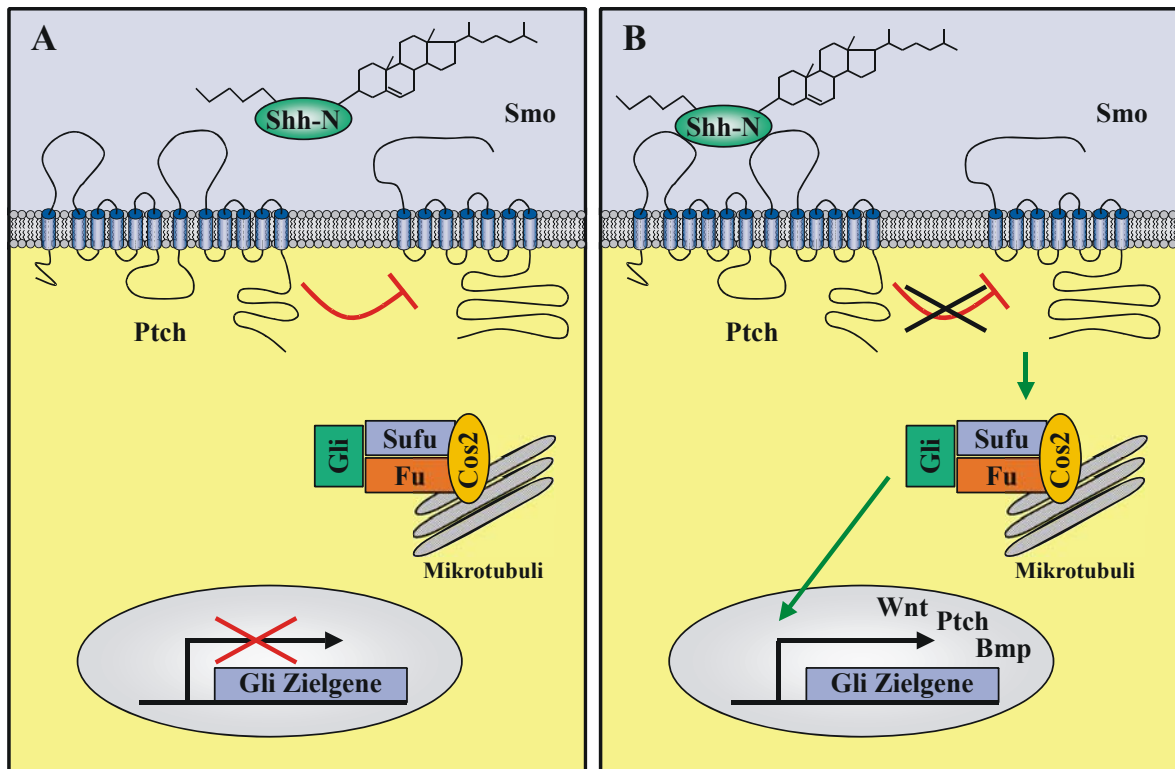


Abbildung 5: Modell der Sonic hedgehog/Patched-Signalkaskade.

(A) Der Rezeptor Ptch ist ohne Bindung seines Liganden Shh-N aktiv und inhibiert Smo. Dadurch kann der Komplex aus Cos2, Fu und Sufu nicht aktiviert werden, die Gli Transkriptionsfaktoren bleiben cytosolisch gebunden und die Gli-Zielgene im Zellkern werden nicht transkribiert. (B) Durch Bindung von Shh-N an seinen Rezeptor Ptch wird die Inhibition von Smo aufgehoben. Aktives Smo führt zur Freisetzung von Gli Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern die Transkription von *Ptch* und Genen der *Wnt*- und *Bmp*-Familie initiieren (Abbildung erstellt in Anlehnung an: Cohen, 2003; Daya-Grosjean und Couvé-Privat, 2005; Ingham und Placzek, 2006; Ruiz i Altaba *et al.*, 2002a; Sanai *et al.*, 2005; Wetmore, 2003).

Der Shh/Ptch-Signalweg ist sowohl für die Regulation der Embryonalentwicklung als auch für die Homöostase der Gewebe im adulten Organismus essentiell (zur Übersicht: Wetmore, 2003). Die unkontrollierte Aktivierung der Signalkaskade durch mutationsbedingte Inaktivierung von *Ptch* oder aktivierende Mutationen in *Gli* oder *Smo* ist bei Säugetieren mit der Genese von Tumoren assoziiert (Lam *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 1989; zur Übersicht: Athar *et al.*, 2006; Evangelista *et al.*, 2006; Rubin und de Sauvage, 2006; Sanai *et al.*, 2005). Durch heterozygote Keimbahnmutation von *PTCH* (humane chromosomale Region 9q22.3) wird das sogenannte Gorlin-Goltz-Syndrom (*Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome*, NBCCS) ausgelöst, welches durch unterschiedliche Entwicklungsstörungen und eine hohe Suszeptibilität für die Bildung von Tumoren charakterisiert ist (Gorlin und Goltz, 1960; Hahn *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996). Neben NBCCS werden auch Medulloblastome (Tumore des Kleinhirns) und

Rhabdomyosarcome (Tumore der Skelettmuskulatur) gebildet (Goodrich *et al.*, 1997; Hahn *et al.*, 1998). Außerdem führen auch somatische Mutationen in *PTCH* zur Entwicklung von Tumoren (Bridge *et al.*, 2000; Tostar *et al.*, 2006). Bei *PTCH* handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen, denn bei vielen Tumoren wurden biallelische Mutationen in *PTCH* nachgewiesen (zur Übersicht: Lindström *et al.*, 2006).

2.6 Rolle der Sonic hedgehog/Patched-Signalkaskade in der Hämatopoese

Der Hh-Signalweg ist bereits in den HSC im Knochenmark an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Roy und Ingham, 2002). Durch erste Arbeiten in Maus und Zebrafisch wurde gezeigt, dass dieser Signalweg für die Ausprägung des hämatopoietischen Systems während der Embryogenese essentiell ist und auch zur Proliferation von HSC im adulten Organismus beiträgt (Dyer *et al.*, 2001; Gering und Patient, 2005; Bhardwaj *et al.*, 2001). Shh kontrolliert die Proliferation und Differenzierung humaner hämatopoietischer Zellen durch Regulation von BMP-4 (*bone morphogenetic protein 4*) (Bhardwaj *et al.*, 2001). In heterozygot *Ptch*-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass in HSC durch die erhöhte Aktivität des Hh-Signalwegs der Zellzyklus stimuliert und dadurch die Expansion der Zellen induziert wird (Trowbridge *et al.*, 2006). Im Vergleich zu Wildtyp (wt) Tieren wurde bei heterozygot *Ptch*-defizienten Mäusen eine deutlich erhöhte Zahl der HSC detektiert, wohingegen keine Veränderung bezüglich der Anzahl reifer hämatopoietischer Zellen im Knochenmark beobachtet wurde.

Während der Lymphopoese der T-Zellen im Thymus werden *Ptch* und *Smo* von den DN-Thymozyten aller Entwicklungsstadien exprimiert (Outram *et al.*, 2000). Shh wird von Thymus-Epithelzellen exprimiert. Das vom Epithel ausgesandte Shh-Signal wird über *Ptch* von den DN-Thymozyten empfangen. Die Expression von *Ptch* und *Smo* variiert in den DN-Thymozyten entsprechend der verschiedenen Differenzierungsstadien (Andaloussi *et al.*, 2006; zur Übersicht: Varas *et al.*, 2003; Benson *et al.*, 2004). Die Zellen im DN1-Stadium exprimieren geringe Menge *Smo* und *Ptch* mRNA, auf Proteinebene lässt sich auf der Zelloberfläche keine signifikante Menge *Smo* detektieren (Outram *et al.*, 2000; Andaloussi *et al.*, 2006). Während der Differenzierung der Zellen vom DN1- zum DN2-Stadium verstärkt sich die Expression von *Ptch* und *Smo* und verringert sich wiederum bei den Zellen im DN3- und DN4-Stadium (Andaloussi *et al.*, 2006). Der Anteil *Smo*⁺ Zellen dieser Differenzierungsstadien nimmt sukzessive ab (Outram *et al.*, 2000). In den im DN1-Stadium enthaltenen ETP ist die Expression von *Smo* vergleichbar zu den Zellen der DN2-Population. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Shh/*Ptch*-Signalkaskade an der

Differenzierung der Thymozyten vom DN1- zum DN2-Stadium und von DN-Thymozyten zu CD4⁺CD8⁺-Thymozyten beteiligt ist. Durch konditional Smo-defiziente Mäuse wurde gezeigt, dass der Hh-Signalweg ein essentieller Positivregulator der Proliferation, Differenzierung sowie für das Überleben der frühen T-Zell-Vorläufer ist (Andaloussi *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu diesen ersten Arbeiten bezüglich der Rolle des Shh/Ptch-Signalwegs in der Lymphopoiese der T-Zellen im Thymus wurde bisher in keiner Arbeit eine Beteiligung dieses Signalwegs während der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark beschrieben.

2.7 Die biallelische *Ptch*-Inaktivierung in adulten Mäusen

Aufgrund der essentiellen Rolle von Ptch während der Embryonalentwicklung sterben Ptch-defiziente Embryonen bereits *in utero* (Goodrich *et al.*, 1997; Hahn *et al.*, 1998). Um die biallelische Gendeletion in adulten Mäusen zu studieren, wird daher mit einer Technik zur induzierten Inaktivierung von Genen, dem Cre (*c*ausing *r*ecombination)/LoxP (*l*ocus of *c*rossover *x* from *b*acteriophage *P*1)-System, gearbeitet (Gu *et al.*, 1993; Kuhn *et al.*, 1995; Rajewsky *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die Mauslinie *Ptch*^{flx/flx}*ROSA26CreERT2*^{+/-} (*Ptch*^{flx/flx}*ERT2*^{+/-}) verwendet und analysiert. Tiere dieser Linie besitzen anstelle der wt *Ptch*-Allele genetisch manipulierte *Ptch*-Allele, welche in den Introns 7 und 9 jeweils eine *LoxP*-Konsensussequenz aufweisen (*Ptch*^{flx}-Allel). Durch die Expression einer aktiven Cre-Rekombinase wird die konservative Rekombination der DNA zwischen den beiden *LoxP*-Sequenzen, hier die Exone 8 und 9 des *Ptch*^{flx}-Allels, katalysiert (Abbildung 6) (Hamilton und Abremski, 1984; Sternberg *et al.*, 1981; Sternberg und Hamilton, 1981). Diese Deletion (*Ptch*^{del}-Allel) führt zu einer Leserasterverschiebung im *Ptch*-Gen und damit zur Translation eines unfunktionalen Ptch-Proteins.

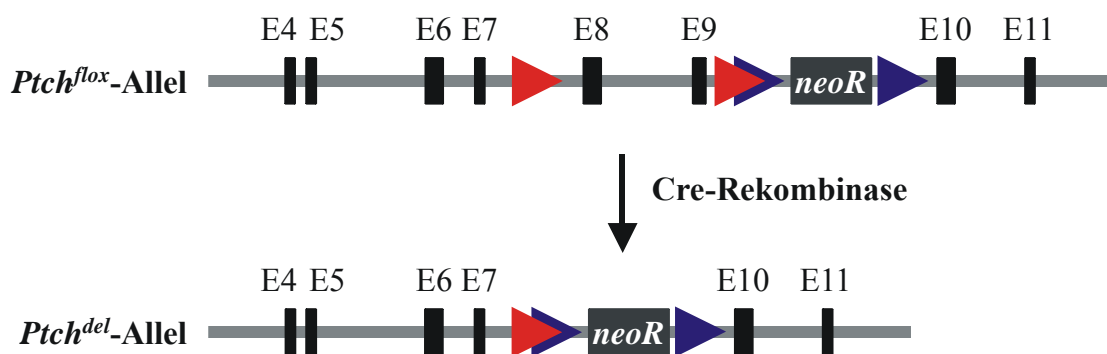


Abbildung 6: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildung 6: Cre-vermittelte Deletion der Exone 8 und 9 im *Ptch*^{fllox}-Allel.

Im *Ptch*^{fllox}-Allel befinden sich in den Introns 7 und 9 *LoxP*-Konsensussequenzen (rot). Durch Cre-vermittelte Rekombination der *LoxP*-Sequenzen wird die Deletion der Exone 8 und 9 (E8 und E9) induziert. Im Intron 9 ist eine *frr*-Sequenz-flankierte (blau) Neomycin-Resistenzkassette (*neoR*) eingefügt.

Bei den verwendeten *Ptch*^{fllox/fllox}*ERT2*^{+/-} Mäusen erfolgt die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen Promotors im *ROSA26* Locus (Friedrich und Soriano, 1991), welcher eine nahezu ubiquitäre Expression im Organismus, speziell auch in hämatopoietischen Zellen, vermittelt (Mao *et al.*, 1999; Mao *et al.*, 2001; Soriano *et al.*, 1999; Zambrowicz *et al.*, 1997). Die endogenen Transkripte des *ROSA26* Locus haben im Organismus nur eine untergeordnete Aufgabe, denn die Inaktivierung des Locus führt zu keiner offensichtlichen Veränderung des Phänotyps. Das in den *ROSA26* Locus integrierte *CreERT2*-Gen codiert für eine induzierbare Variante der Cre-Rekombinase. So besitzt die CreERT2-Rekombinase zwei Ligandenbindungsdomänen des humanen Östrogenrezeptors (*estrogen receptor*, *ER*), welche durch drei Punktmutationen (G400V, M543A und L544A) insensitiv gegenüber endogenem Östrogen sind (el Marjou *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2001; Indra *et al.*, 1999). Erst durch die Gabe der synthetischen Östrogenagonisten 4-Hydroxytamoxifen oder Tamoxifen wird die CreERT2-Rekombinase aktiviert und die biallelische Deletion der Exone 8 und 9 des *Ptch*^{fllox}-Gens bewirkt. Tiere der Linie *Ptch*^{fllox/fllox}*ERT2*^{+/-} werden nach Tamoxifenapplikation daher als *tPtch*^{-/-} Mäuse bezeichnet.

3 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Einfluss von Ptch-vermittelten Signalen auf die Entwicklung der Zellen des hämatopoietischen Systems war zu Beginn der vorliegenden Arbeit weitgehend unbekannt. Ausgehend von der initial beobachteten Reduktion des Thymus nach Inaktivierung von *Ptch* in adulten Mäusen sollte im Rahmen dieser Arbeit der zugrunde liegende Defekt identifiziert und charakterisiert werden.

Dazu sollten die Thymozyten in den verschiedenen T-Zell-Entwicklungsstadien durchflusszytometrisch erfasst werden. Außerdem sollten die Zellen des hämatopoietischen Systems in Knochenmark und Milz bezüglich Ptch-assoziiierter Einflüsse analysiert werden. In diesem Kontext wurde zum Ziel gesetzt die verschiedenen Zellpopulationen durchflusszytometrisch zu identifizieren und molekularbiologisch sowie funktionell zu charakterisieren.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Allgemein verwendete Puffer

PBS	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 8,4 mM Na ₂ HPO ₄
PBST	PBS mit 0,1 % Tween 20
Tris/HCl	0,5-1,5 M Tris; auf pH 6,8-8,8 eingestellt mit 1 M HCl
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0
TBE	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 1 mM EDTA
MACS-Puffer	PBS, pH 7,2; 0,5 % BSA; 2 mM EGTA

4.1.2 Antikörper

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Verwendung
Ratte-anti-Mensch-CD3	Serotec GmbH	Immunhistochemie
Ratte-anti-Mensch-B220	BD Pharmingen™	Immunhistochemie
Ratte-anti-Maus-CD3-FITC	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD4-Biotin	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD8 α -PE	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD8 α -PE-Cy7	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD19-FITC	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD19-PE	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD21-FITC	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD24-PE	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD25/IL-2R α -FITC	BD Pharmingen™	FACS-Analyse

Antikörper	Hersteller	Verwendung
Ratte-anti-Maus-CD43/Ly-48-Biotin	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD44-PE-Cy5	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD45R/B220-PE	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD45R/B220-PE-Cy5	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD45R/B220-PE-Cy7	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-IgD-FITC	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-TCR-β-FITC	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-IgM-PE	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ziege-anti-Maus-IgM-RPE	Southern Biotech.	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD117/c-Kit-Biotin	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-CD127/IL-7Rα-PE	BD Pharmingen™	FACS-Analyse
Ratte-anti-Maus-Sca-1/Ly-6A/E-FITC	BD Pharmingen™	FACS-Analyse

Biotin-markierte Antikörper wurden zur durchflusszytometrischen Detektion zusätzlich mit Streptavidin-PE, Streptavidin-PE-Cy5, Streptavidin-PE-Cy7 (BD Pharmingen™) oder Streptavidin-FITC (Southern Biotechnology) gekoppelt.

4.1.3 Enzyme

<i>Taq</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>Taq</i> PCR Mastermix Kit	Quiagen, Hilden
Pfu DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
reverse Transkriptase SuperScriptII	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

4.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Annexin V-PE <i>apoptosis detection kit</i>	BD Biosciences Pharmingen™, USA
EasySep® <i>mouse hematopoietic progenitor cell enrichment kit</i>	CellSystems®, St. Katharinen
FITC BrdU <i>flow kit</i>	BD Biosciences Pharmingen™, USA
MethoCult™ 03434	StemCell Technologies, USA

4.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Agar Agar	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma, Dreieich
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis-(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DMEM	Gibco, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching (A); Gibco, Karlsruhe
GeneRuler™ 1 kb DNA ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glycerin (87 %)	Roth, Karlsruhe
4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Montagemedium (Immuno Mount)	Shandon Corp., Waltham, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Nuklease-freies Wasser	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA, Pasching (A)
RPMI 1640 (+ GlutaMax™)	PAA, Pasching (A); Gibco, Karlsruhe
SeaKEM LE Agarose	BMA, Rockland, USA
TRIZOL Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Dreieich
Trypan Blue Stain 0,4 %	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe

Alle Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad (für analytische Zwecke, *per analysis*, p. A.) bezogen.

4.1.6 Geräte

Autoklaven	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Begasungsbrutschrank HERAcell 150	Heraeus, Hanau
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Desinfektor-G 7736	Miele, Gütersloh
Durchflusszytometer BD FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson, Heidelberg
Electrophoresis Power Supply-EPS 301	Amersham Biosciences, München
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Feinwaage R160P	Sartorius, Göttingen
Fotokamera COOLPIX 995	Nikon, Düsseldorf
Gel Imager	Intas, Göttingen
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss, Jena
Mikroskop Leitz DMIL	Leitz, Wetzlar
MilliQ-Anlage	MembraPure GmbH, Bodenheim
PCR Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
PCR Mastercycler epgradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW GmbH, Wien, Österreich
Sicherheitswerkbank HERAsafe Typ H	Heraeus, Hanau
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
UV-Wasseraufbereitungssystem arium 611	Sartorius, Göttingen
Wasserbad W6/W12	Medigen, MS-Laborgeräte, Wiesloch
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge für Cytospin [®] (Cytospin [®] 2)	Shandon Corp., Waltham, USA
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau

4.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Transkript	<i>annealing</i>	Fragment	Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
<i>PU.1</i>	58 °C	391 bp	<i>PU.1-F</i>	CGGATGTGCTTCCCTTATCAAAC
			<i>PU.1-R</i>	TGACTTTCTTCACCTCGCCTGTC
<i>Ikaros</i>	54 °C	464 bp	<i>Ikaros-F</i>	CACTACCTCTGGAGCACAGC
			<i>Ikaros-R</i>	TCTGAGGCATAGAGCTCTTA
<i>Flt3</i>	54 °C	624 bp	<i>Flt3-F</i>	TCTTGAGACCGTTACAAACC
			<i>Flt3-R</i>	ATGTCTGTTCCGAACAACCTC
<i>IL-7Rα</i>	58 °C	315 bp	<i>IL-7Rα-F</i>	TTACTTCAAAGGCTTCTGGAG
			<i>IL-7Rα-R</i>	CTGGCTTCAACGCCTTTCACCTCA
<i>EBF</i>	54 °C	649 bp	<i>EBF-F</i>	CAAGACAAGAACCCTGAAATG
			<i>EBF-R</i>	GTAACCTCTGGAAGCCGTAGT
<i>Rag-1</i>	58 °C	554 bp	<i>Rag-1-F</i>	TGCAGACATTCTAGCACTCTGGCC
			<i>Rag-1-R</i>	ACATCTGCCTTCACGTCGATCCGG
<i>Rag-2</i>	58 °C	513 bp	<i>Rag-2-F</i>	CACATCCACAAGCAGGAAGTACAC
			<i>Rag-2-R</i>	TCCCTCGACTATACACCACGTCAA
<i>Gli1</i>	60 °C	419 bp	<i>Gli1-F</i>	TGCACCAAGCGCTACACAGATCCCA
			<i>Gli1-R</i>	AGCTGATGCAGCTGATCCAGCCTA
<i>Gli2</i>	54 °C	320 bp	<i>Gli2-F</i>	CGGGATATTGATGTCTCTCTC
			<i>Gli2-R</i>	AGTGGTCAGATAGTGCCTG
<i>Gli3</i>	58 °C	400 bp	<i>Gli3-F</i>	GAAGGAACAACCCTAGTCAAGGAGGA
			<i>Gli3-R</i>	AAAGCCTTGTTGCAGCCCTCAT
<i>wt Ptch</i>	55 °C	731 bp ^{wt}	<i>mPtc11</i>	AAAGCCGAAGTTGGCCATGGGTAC
<i>Ptch^{del}</i>		451 bp ^{del}	<i>mPtc7R</i>	TGTCCTGTTTCACTGAATGC
β -Aktin	58 °C	646 bp	β -actin-F	CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG
			β -actin-R	TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Quiagen GmbH (Hilden) und MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

4.1.8 Computersoftware

Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, San Rose, USA
Adobe Reader 6.0	Adobe Systems, San Rose, USA
BD CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACSDiva™	Becton Dickinson, Heidelberg
CorelDRAW Graphics Suite 12.0	Corel Corporation Limited
FlowJo 6.1.1	Treestar, Inc., Ashland, USA
Intas GDS	Intas, Göttingen
Mac OS 9.2	Apple Computer, Inc.
Microsoft Office 2000	Microsoft GmbH

4.1.9 Mauslinien

C57/BL6

Bei C57/BL6 Mäusen handelt es sich um einen Inzuchtstamm mit schwarzer Fellfarbe.

ROSA26CreERT2^{+/-}

Die Mauslinie *ROSA26CreERT2^{+/-}* exprimiert ein Tamoxifen-induzierbare CreERT2-Rekombinaseprotein unter der Kontrolle des endogenen *ROSA26* Promotors (Friedrich und Soriano, 1991). Die Tiere wurden freundlicherweise von Anton Berns, Netherland Cancer Institut, Amsterdam zur Verfügung gestellt.

Ptch^{lox/lox}ROSA26CreERT2^{+/-}

Tiere der Linie *Ptch^{lox/lox}ROSA26CreERT2^{+/-}* (*Ptch^{lox/lox}ERT2^{+/-}*) besitzen anstelle der wt *Ptch*-Allele genetisch manipulierte *Ptch*-Allele, welche in den Introns 7 und 9 jeweils eine *LoxP*-Konsensussequenz aufweisen (*Ptch^{lox}*-Allel). Durch die Expression einer aktiven CreERT2-Rekombinase nach Tamoxifengabe wird die konservative Rekombination der DNA zwischen den beiden *LoxP*-Sequenzen, hier die Exone 8 und 9 des *Ptch^{lox}*-Allels, katalysiert (Abbildung 6). Die Deletion (*Ptch^{del}*-Allel) führt zu einer Leserasterverschiebung im *Ptch*-Gen und damit zur Translation eines unfunktionalen *Ptch*-Proteins.

C57/BL *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}*

C57/BL *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}* bezeichnet eine *Rag-2*- und *γc*-defiziente Mauslinie mit dem genetischen Hintergrund des C57/BL Inzuchtstamms. Durch die Inaktivierung von *Rag-2* und *γc* können diese Tiere weder B- und T-Zellen noch NK-Zellen bilden (Cao *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1999; Greenberg und Riddell, 1999; Shinkai *et al.*, 1992).

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit Mausmodellen

4.2.1.1 Haltung und Zucht von Labormäusen

Die Tiere wurden alleine oder in Gruppen in Makrolonkäfigen des Typs II und III (TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) gehalten (Genetischer Arbeitsbereich S1, Institut für Humangenetik, Universität Göttingen). Dabei wurde sowohl die Temperatur mit 20 ± 2 °C als auch die relative Luftfeuchtigkeit mit 50 ± 10 % möglichst konstant gehalten. Außerdem wurde ein zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus (Hell-Phase von 6.00-18.00 Uhr MEZ) eingehalten. Die Tiere erhielten permanenten Zugang zu Nahrung in Form von pelletierter Zuchtdiät (Alleinfutter für Mäuse-Zucht, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Leitungswasser.

Die für Repopulationsexperimente verwendeten immundefizienten *Rag-2^{-/-} γc^{-/-}* Mäuse wurden in einzeln ventilierten Käfigen (*individually ventilated cages*, IVC) in einen separaten Raum gehalten. IVC-Systeme werden mit sterilfiltrierter Zuluft unter Überdruck betrieben und ermöglichen somit den Schutz von Tieren mit hohem Hygienestatus vor mikrobiellen Kontaminationen. Sämtliche Versorgungsmaterialien der Tiere wurden desinfiziert oder sterilisiert (Autoklav). Die Arbeiten mit den Tieren als auch das Umsetzen in neue Käfige erfolgte unter einer Reinluftwerkbank.

4.2.1.2 Schwanzbiopsie und Ohrlochmarkierung

Die Kennzeichnung der Tiere erfolgte 4 Wochen nach der Geburt durch Ohrlochmarkierungen. Parallel dazu wurden Schwanzbiopsien (2-3 mm der Schwanzspitze) für die nachfolgende Genotypisierung der Tiere genommen.

4.2.1.3 Blutentnahme

Für wiederholte Blutentnahmen erfolgte diese aus dem retroorbitalen Venenplexus des Auges mit heparinisierten Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (Brand, Wertheim). Bei Finalversuchen wurde das Blut direkt durch Herzpunktion mittels Kanüle und Spritze der zuvor durch zervikale Dislokation (Genickbruch) oder CO₂-Narkose getöteten Tiere entnommen. Bei beiden Methoden wurde das Blut direkt in EDTA-Röhrchen aufgenommen und im Eppendorf-Thermomixer bei Raumtemperatur für 5 min geschüttelt. Anschließend wurden die Blutproben bis zur Analyse auf Eis gelagert.

4.2.1.4 Intraperitoneale Injektion von Tamoxifen

Die Inaktivierung von *Ptch* erfolgte durch Aktivierung der Cre-Rekombinase in der Mauslinie *Ptch^{lox/flox}ERT2^{+/-}* mittels Tamoxifeninjektion. Dazu wurde Tamoxifen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) als Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mg/mL in 96 % Ethanol angesetzt und diese zur Injektion 1:10 in sterilem Sonnenblumenöl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verdünnt (Endkonzentration Tamoxifen 10 mg/mL) (Imai *et al.*, 2001). Bis zur Verwendung wurde die Emulsion bei -20 °C gelagert.

Zur Injektion wurden 8 Wochen alte Tiere im Genick fixiert und an 5 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 100 µL der Tamoxifenemulsion intraperitoneal injiziert. Dazu wurden sterile Spritzen Omnifix[®]-F 1 mL 1 x 100 0,01 mL/1,0 mL (B. Braun, Melsungen) mit 25G x 5/8 Kanüle verwendet. Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren wurde ebenfalls 100 µL der Tamoxifenemulsion injiziert, Lösungsmittel-behandelten Kontrolltieren wurde eine Ethanol/Sonnenblumenöl-Emulsion ohne Tamoxifen injiziert.

4.2.1.5 Bestrahlung und Transplantation von Mäusen

Zur Analyse des Differenzierungspotentials Lin^{-} Knochenmarkszellen wurden diese aus Spendertieren isoliert und in ausgewachsene immundefiziente *Rag^{-/-} γ c^{-/-}* Mäuse (Taconic Germantown, NY, USA) transplantiert. Die *Rag-2^{-/-} γ c^{-/-}* Mäuse wurden in speziellen einzeln ventilierten Käfigen (*individually ventilated cages*, IVC) in einen separaten Raum gehalten (4.2.1.1). Vor der Transplantation wurden die Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 3,5 Gy bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte dabei pro Tag fraktioniert in zwei Dosen von 1,75 Gy, so dass die Tiere einer Gesamtstrahlendosis von 7 Gy ausgesetzt wurden. Am darauffolgenden Tag wurden Lin^{-} Knochenmarkszellen unter der Reinluftwerkbank aus Spendertieren isoliert (4.2.2.3) und in sterilem PBS aufgenommen. Die zuvor bestrahlten *Rag^{-/-} γ c^{-/-}* Mäuse wurden bis zum Einsetzen der Narkose in eine Isoflurankammer gesetzt und anschließend über einen Aufsatz kontinuierlich in Isofluran-Narkose gehalten. Vor der Injektion wurde der Schwanz der Maus zur besseren Darstellung der Schwanzvene in handwarmes Wasser gehalten. Anschließend wurden pro Tier 400.000 Lin^{-} Knochenmarkszellen in 200 µL PBS intravenös injiziert (Bhattacharya *et al.*, 2006). Direkt nach der Injektion wurde die Narkose durch Erhöhung der zugeführten Sauerstoffkonzentration aufgehoben.

7 Wochen nach der Transplantation wurde mit Hilfe von heparinisierten Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (Brand, Wertheim) Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus des Auges abgenommen und in EDTA-Röhrchen aufgefangen. Zum Nachweis der B- und T-Zellen im peripheren Blut wurden jeweils 1 μL anti-B220-PE-Cy5, anti-CD8-PE-Cy7, anti-CD4-Biotin und Streptavidin-FITC in 10 μL PBS aufgenommen und anschließend mit 50 μL Vollblut gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde 1 mL BD *FACS Lysing Solution* hinzugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen für 4 min bei 300 g wurden diese zweimal mit 3 mL PBS gewaschen, in 600 mL PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

4.2.2 Arbeiten mit primären Zellen

4.2.2.1 Isolierung von Knochenmarkszellen

Zuerst wurden die Tiere durch zervikale Dislokation (Genickbruch) oder CO_2 -Narkose getötet. Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden Ober- und Unterschenkelknochen der Mäuse präpariert und mittels Labortüchern (21 x 20 cm, Kimberly-Clark[®], Surrey, UK) von Muskelresten befreit. Beide Seiten des Knochens wurden anschließend mit einer Schere abgeschnitten, damit das Knochenmark frei zugänglich war. Danach wurde das Knochenmark mittels einer RPMI 1640 gefüllten 10 mL-Spritze mit aufgesetzter Kanüle (23G x 11/4 0,60 x 30 mm) aus dem Knochen in eine Petrischale gespült. Durch mehrmaliges Aufziehen der Zellsuspension wurden die Zellen vereinzelt und anschließend bei 300 g und 4 °C für 4 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 mL PBS aufgenommen und die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

4.2.2.2 Cytospin-Präparate von Knochenmarkszellen

Zuerst wurden wie unter 4.2.2.1 beschrieben Knochenmarkszellen aus den Ober- und Unterschenkelknochen der Tiere isoliert. Zur Anfertigung der Cytospin-Präparate wurden anschließend jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen in 200 μL PBS aufgenommen. Mikroskopische Objektträger des Typs Superfrost[®]-Plus wurden danach mit gelochten Filterkarten und einer Probenkammer versehen und mit der Zellsuspension befüllt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Shandon Cytospin[®] 2 Zytocentrifuge für 10 min bei RT und 100 g. Durch die Zentrifugalkräfte werden die Zellen aus der Probenkammer auf einen definierten Bereich des Objektträgers sedimentiert. Das PBS wird dabei über die dem Objektträger

aufgelegten Filterkarte absorbiert. Nach dem entfernen der Probenkammer und der Filterkarte wurden die so gewonnenen Präparate auf den Objektträgern für 10 min bei RT getrocknet und standen für die anschließende panoptische Färbung nach Pappenheim zur Verfügung. Anschließend wurden die Präparate mikroskopisch begutachtet.

4.2.2.3 Aufreinigung lineage-negativer (Lin⁻) Knochenmarkszellen

Zur Aufreinigung hämatopoietischer Stammzellen und nicht-liniendeterminierter Vorläuferzellen (Lin⁻ Knochenmarkszellen) wurde zuerst wie unter 4.2.2.1 beschrieben Gesamtknochenmark aus Ober- und Unterschenkel der Maus isoliert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Lin⁻ Knochenmarkszellen unter Verwendung des EasySep[®] *mouse hematopoietic progenitor enrichment cocktail* nach dem Prinzip der Negativselektion. Dazu wurden $1 \cdot 10^7$ Knochenmarkszellen in 100 μ L Puffer (PBS, 2 % BSA, 2 mM EDTA, 5 % Rattenserum) resuspendiert und in 12 x 75 mm Polystyrol-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 μ L einer Mischung monoklonaler Antikörper gegen die Mausantigene CD5, CD11b/Mac-1, CD45R/B220, Ly-6G/Gr-1, TER119 und 7-4 wurde der Ansatz für 15 min im Kühlschrank (4-8 °C) inkubiert. Anschließend wurde nacheinander 10 μ L EasySep[®] *biotin selection cocktail* und 10 μ L EasySep[®] *magnetic nanoparticles* (wurden vor der Zugabe gemischt) dazugegeben und nach jeder Zugabe 15 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde der Ansatz mittels Puffer (PBS, 2 % BSA, 2 mM EDTA) auf ein Gesamtvolumen von 2,5 mL aufgefüllt. Zur Abtrennung aller liniendeterminierten Zellen wurde der Ansatz dann für 5 min in einen EasySep[®] Magneten gestellt und der Überstand vorsichtig in ein neues Polystyrol-Röhrchen dekantiert. Nach Wiederholung dieses Aufreinigungsschritts wurde die Zellzahl bestimmt und die Lin⁻ Knochenmarkszellen für durchflusszytometrische Messungen (4.2.4.3), zur Bestimmung des Differenzierungspotentials der koloniebildenden Einheiten der myeloiden Linie (4.2.5.1), reverse Transkription (4.2.3.3) oder Repopulationsexperimente (Aufreinigung der Lin⁻ Knochenmarkszellen unter der Reinluftwerkbank, siehe 4.2.1.5) verwendet.

4.2.2.4 Aufreinigung von Lymphozyten aus Blutproben

Zur Aufreinigung von B- und T-Zellen aus Blutproben wurden zunächst die Erythrozyten unter Verwendung von FACS *Lysing Solution* (Becton Dickinson, Heidelberg) lysiert (4.2.4.1). Anschließend wurden T-Zellen durch Positivselektion unter Verwendung von CD90 (Thy1.2) *Micro Beads* aufgereinigt, für B-Zellen wurden CD19 *Micro Beads* verwendet (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach). Die Separation der jeweiligen

Population erfolgte unter Verwendung von MS MACS[®] *Cell Separation Columns* (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach), die mit maximal $2 \cdot 10^8$ Zellen beladen wurden und die Aufreinigung von bis zu $1 \cdot 10^7$ über *Micro Beads* magnetisch markierter Zellen erlauben. Durch anschließende Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde der Aufreinigungserfolg kontrolliert. Die isolierten Zellen der T-Zell-Aufreinigung wurden dazu mit Ratte-anti-Maus-CD3-FITC inkubiert. Für die B-Zell-Aufreinigung wurde Ratte-anti-Maus-CD45R/B220-PE verwendet (beide BD Pharmingen[™]).

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 DNA-Isolierung aus Maus-Schwanzbiopsien

Als Probenmaterial für die Extraktion der DNA wurden von den Mäusen Schwanzbiopsien genommen (4.2.1.2). Die Schwanzspitzen wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäßen mit 300 µL Schwanzspitzenpuffer und 10 µL einer 10 mg/mL Stammlösung Proteinase K (Promega, Mannheim) versetzt. Anschließend wurden die Proben über Nacht unter Schütteln (Eppendorf Thermomixer, 450 rpm) bei 55 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Proteinase K durch Inkubation bei 95 °C für 10 min inaktiviert. Nach kurzer Zentrifugation wurde 1 µL des Überstandes als *template* für die PCR-Diagnostik eingesetzt.

Die isolierte genomische DNA ist ohne weitere Aufreinigungsschritte zur Amplifikation von kleinen PCR-Produkten bis ca. 1000 bp verlässlich einsetzbar. Die Lagerung der Schwanzspitzen-Lysate erfolgte bei 4 °C.

Schwanzspitzenpuffer: 1 mM Tris/HCl, 5 mM KCl, 0,45% (v/v) NP40,
0,45% (v/v) Tween 20, Lagerung bei 4 °C

4.2.3.2 Isolierung von RNA aus Knochenmarksproben

In RPMI 1640 aufgenommene Einzelzellsuspensionen von Gesamtknochenmark (4.2.2.1) und Lin⁻ Knochenmark (4.2.2.3) wurden zuerst für 4 min und 300 g abzentrifugiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach erneutem abzentrifugieren wurde das Zellpellet in 200 µL TRIZOL Reagent (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) resuspendiert und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 40 µL Chloroform zugegeben, kräftig gemischt und für weitere 3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz dann für 4 min bei 4000 g und 4 °C abzentrifugiert. Darauffolgend wurde die obere wässrige Phase in

ein neues Gefäß überführt und mit 1 mL Isopropanol gemischt. Die Präzipitation der RNA erfolgte anschließend durch Inkubation des Ansatzes bei -20 °C für 15 min oder über Nacht und einem Zentrifugationsschritt für 35 min bei 16000 g. Danach wurde das RNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 20 bis 100 µL RNase-freiem destillierten Wasser aufgenommen. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration (4.2.3.5) wurden zur Kontrolle 500 ng bis 2 µg zur Agarose-Gelelektrophorese (4.2.3.6) eingesetzt um Degradierung der RNA auszuschließen.

4.2.3.3 Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription kann mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die reverse Transkription von Gesamt-RNA aus Knochenmarkspalten (4.2.2.1) wurde mit der reversen Transkriptase SuperScriptII und oligo-dT-Primern durchgeführt, die durch komplementäre Basenpaarung an polyadenylierte RNA binden. Die reverse Transkription erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µL. Zuerst wurden 1 bis 2 µg Gesamt-RNA mit 250 ng oligo-dT-Primern gemischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurden 100 mM DTT (Dithiothreitol, Endkonzentration 10 mM, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 10 mM dNTP-Mix (Endkonzentration 0,5 µM) und 5x *first strand buffer* (Endkonzentration 1x, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zugegeben. Darauf folgend wurde der Ansatz erst für 10 min bei 25 °C und anschließend für 2 min bei 42 °C inkubiert und 1 µL der Reversen Transkriptase SuperScript II (200 U/µL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) hinzugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 42 °C für 1 h und wurde danach durch Inkubation des Ansatzes für 10 min bei 70 °C gestoppt.

4.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts wurden zunächst anhand der Sequenzinformation flankierender Abschnitte Oligonukleotide synthetisiert. Es wurden vorzugsweise Oligonukleotide mit einer Länge von 18 bis 24 Nukleotiden und einem GC-Gehalt von 40 bis 60 % verwendet. Die Berechnung der Anlagerungstemperatur erfolgte anhand folgender Näherungsformel für die Schmelztemperatur (T_m) doppelsträngiger DNA: $T_m = 2\text{ °C} (A + T) + 4\text{ °C} (C + G)$.

Nach Anlagerung der Oligonukleotide an den DNA-Strang erfolgt die Synthese des zur Matrize komplementären DNA-Strangs ausgehend von den 3'OH-Ende des

Oligonukleotids. Diese Synthese erfolgte unter Verwendung der DNA-Polymerase I aus dem thermophilen Bakterium *thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) bei dessen Temperaturoptimum von 72 °C. Die Hitzebeständigkeit dieser DNA-Polymerase erlaubt die wiederholte Temperaturerhöhung auf 94 °C zur Denaturierung der während eines Reaktionszyklus neu synthetisierten doppelsträngigen DNA.

Für einen 20 µL PCR-Ansatz wurden 10 bis 100 ng DNA-*template* mit 10 µL 2x *Taq* PCR Master Mix (Quiagen, Hilden), 0,4 µL *sense*-Oligonukleotid (50 pmol/µL) und 0,4 µL *antisense*-Oligonukleotid (50 pmol/µL) versetzt und bis zum Gesamtvolumen mit ddH₂O aufgefüllt. Die PCR wurde im *Mastercycler epgradient* (Eppendorf, Hamburg) nach folgendem allgemeinen PCR-Programm durchgeführt:

1. initiale Denaturierung: 94 °C, 4 min
2. Denaturierung: 94 °C, 45 s
3. Anlagerung der Oligonukleotide: 50 bis 68 °C, 45 s
4. Elongation: 72 °C, Dauer entsprechend der Größe des DNA-Abschnitts
5. 25 bis 35 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
6. Finaler Elongationsschritt: 72 °C, 10 min
7. Kühlung der Proben: 16 °C

4.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA wurde photometrisch durch Bestimmung der Absorptionsmaxima der Probe bei 260 und 280 nm bestimmt (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg). Unter Verwendung einer Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm entspricht eine Extinktion oder optische Dichte bei 260 nm (OD_{260nm}) von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/mL bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/mL. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 und 280 nm ($OD_{260nm/280nm}$) dient zur Kontrolle der Verunreinigung der Nukleinsäure mit Protein und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

4.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung der Agarosegele wurden durch Erhitzen in einer Mikrowelle 1-2 %ige Agarose-Lösungen in TAE-Puffer hergestellt und mit 6 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen zur

Visualisierung der Wanderung im Gel und zur Beschwerung der DNA mit 6x DNA-Auftragungspuffer versetzt. Neben den Proben wurde in eine weitere Tasche ein DNA-Größenstandard aufgetragen (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*, MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Der Gellauf erfolgte idealerweise mit einer Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand. Ethidiumbromid interkaliert zwischen benachbarte Basenpaare doppelsträngiger DNA und lässt sich unter Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) durch eine spezifische Fluoreszenz (590 nm) visualisieren.

6x DNA-Auftragungspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 15 % (w/v) Ficoll

TAE-Puffer (50x): 2 M Tris/CH₃COOH, pH 7,8; 1 M CH₃COOH, 1 M Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 8,0

4.2.4 Durchflusszytometrie

4.2.4.1 Erythrozyten-Lyse von Milzpräparationen und Blutproben

Zellsuspensionen aus Milzzellen wurden vor der durchflusszytometrischen Analyse einer Erythrozyten-Lyse unterzogen. Der Lysepuffer wurde vor jedem Experiment durch Mischen von Lösung A und Lösung B im Verhältnis 9:1 frisch angesetzt. Zunächst wurden die Zellen pelletiert (4 min, 300 g) und anschließend vorsichtig in 1 mL Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Nach exakt 2 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension vorsichtig mit 1 mL FCS unterschichtet und umgehend abzentrifugiert (4 min, 300 g). Bei passender Lysezeit wurde ein leicht rötlich gefärbtes Pellet erhalten. Bei vollständig weißen Pellets wurde die Lyse mit einer neuen Probe und verkürzter Lysezeit wiederholt. Eine zu lange Lysezeit führt neben der Lyse der Erythrozyten zu einer unerwünschten Schädigung der Lymphozyten-Populationen der Milz. Nach Entfernen des Überstandes der Lyse wurde das Zellpellet zweimal mit 10 mL RPMI 1640 gewaschen.

Erythrozyten-Lysepuffer: Lösung A: 0,16 M NH₄Cl (sterilfiltriert)

Lösung B: 0,17 M Tris/HCl, pH 7,8 (sterilfiltriert)

Für die Analyse von Zellpopulationen im peripheren Blut wurden die Erythrozyten nach der Antikörperfärbung unter Verwendung von FACS *Lysing Solution* (Becton Dickinson,

Heidelberg) lysiert. Dazu wurden 50 μL EDTA-Vollblut (4.2.1.3) mit 1 mL FACS *Lysing Solution* (1:10-Verdünnung der Stammlösung mit ddH₂O) gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen für 4 min bei 300 g wurden diese zweimal mit 3 mL PBS gewaschen, in 600 μL PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

4.2.4.2 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 μL Zellsuspension in einer Kavität einer Mikrotiterplatte mit 90 μL Trypanblau gemischt. Tote Zellen werden durch Trypanblau visualisiert, da dieses durch die geschädigte Zellmembran in das Cytosol der Zelle eindringt und dieses tiefblau anfärbt (Ausschlussfärbung). Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer und eines Mikroskops wurde dann die Zahl lebender Zellen bestimmt. Dazu wurden 4 Großquadrate der Zählkammer ausgezählt und die Zellkonzentration nach folgender Formel berechnet:

$$x = \frac{N}{Q \cdot V_K} \cdot \frac{V_G}{V_Z}$$

x = Zellkonzentration [Zellen/mL]

N = Anzahl der gezählten Zellen [Zellen]

Q = Anzahl der ausgezählten Großquadrate

V_K = Kammervolumen über einem Großquadrat = 10^4 mL

V_G = eingesetztes Gesamtvolumen (Trypanblau und Zellsuspension) [mL]

V_Z = Volumen der eingesetzten Zellsuspension [mL]

Die Zellzahl ergibt sich dann durch Multiplikation der Zellkonzentration mit dem Volumen der Zellsuspension in mL.

4.2.4.3 Vorbereitung von Geweben für die durchflusszytometrische Analyse

Zuerst wurden die Tiere mittels CO₂-Narkose getötet, die Bauchdecke und der Brustkorb eröffnet und sowohl Milz als auch Thymus präpariert. Die Organe wurden direkt nach der Entnahme in eine mit 10 mL RPMI 1640 (+ GlutaMax™) gefüllte Petrischale gelegt. Anschließend wurden die Organe mittels eines Stempels einer 10 mL-Spritze durch ein Gewebesieb (*Cell Strainer* 100 μm Nylon, BD Falcon™) gedrückt und zerkleinert. Zur weiteren Vereinzelung der Zellen wurde die Zellsuspension mit einer Spritze mehrmals

durch eine aufgesetzte Kanüle (21G 11/2 0,8 x 40 mm) gesaugt. Einzelzellsuspensionen von Milz, Thymus und Knochenmark (4.2.2.1) wurden danach bei 300 g und 4 °C für 4 min abzentrifugiert, das Zellpellet in 10 mL PBS resuspendiert und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Die Zellsuspension der Milz wurde außerdem einer Erythrozyten-Lyse (4.2.4.1) unterzogen. Darauffolgend wurden die Zellzahl bestimmt (4.2.4.2) und $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Färbung eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in 50 μ L PBS resuspendiert und für jeden Färbeschritt 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Färbung wurden die Zellen durch Zugabe von 500 μ L PBS gewaschen, abzentrifugiert und in 600 μ L PBS resuspendiert. Bis zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Alle durchflusszytometrischen Messungen der Zellsuspensionen erfolgten unter Verwendung des BD LSR II Durchflusszytometers (Becton Dickinson, Heidelberg, ausgestattet mit einem blauen Laser und einem UV-Laser). Die Aufnahme der Daten erfolgte mit der Software BD FACSDiva™ (Becton Dickinson, Heidelberg) und deren Auswertung mit dem Programm FlowJo (Treestar, Inc.).

4.2.4.4 Identifizierung der ETP im Thymus

Zuerst wurden die Tiere durch zervikale Dislokation (Genickbruch) oder CO₂-Narkose getötet. Danach wurde der Thymus präpariert, zur Entfernung von Blutresten in 10 mL RPMI 1640 gespült und in eine Petrischale mit 10 mL RPMI 1640 gelegt. Anschließend wurde der Thymus unter Verwendung von 2 Pinzetten zerkleinert, die Zellsuspension abzentrifugiert und das Zellpellet in 10 mL PBS aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 50 μ L PBS resuspendiert, mit 25 μ g Ratte-anti-Maus-CD16/CD32 (BD Pharmingen™) versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen erneut in 50 μ L PBS aufgenommen und mit jeweils 15 μ L Lin-FITC (Mischung aus FITC-markierten Antikörpern gegen CD3, CD8 α , CD8 β , Ter119, CD19, B220, CD11c, NK1.1), CD25-PE und c-Kit-APC versetzt und für 45 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 600 μ L PBS aufgenommen. Die durchflusszytometrische Analyse von mindestens 6 Millionen Zellen erfolgte unter Verwendung eines FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Parallel diente das Knochenmark einer jungen C57/BL6 Maus als Positivkontrolle und wurde entsprechend dem angegebenen Protokoll gefärbt und analysiert.

4.2.4.5 Zellzyklusanalyse *in vivo* mittels BrdU-Inkorporation

Die Proliferationsrate von Zellen lässt sich anhand der Inkorporation des Thymidinanalogons 5-Brom-2'-Deoxy-Uridin (BrdU) in neu synthetisierte DNA beim Übergang von der G0/G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus verfolgen (Dean *et al.*, 1984; Miltenburger *et al.*, 1987; Sasaki *et al.*, 1989). Zur Bestimmung der Proliferationsrate *in vivo* wurde den zu analysierenden Tieren im Zeitabstand von 20 min jeweils 1 mg BrdU (100 µL einer 10 mg/mL Stammlösung in sterilem Dulbecco's PBS, FITC BrdU Flow Kit, BD Pharmingen™) intraperitoneal injiziert. Exakt 3 h nach der jeweiligen Injektion wurden die Tiere mittels zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet, die Knochenmarkszellen aus Ober- und Unterschenkel isoliert (4.2.2.1) und auf Eis gelagert. Anschließend wurden aus $2 \cdot 10^7$ Zellen Gesamtknochenmark von jedem Tier die Lin⁻ Knochenmarkszellen aufgereinigt (4.2.2.3). Nach Abzentrifugation der Zellen für 4 min bei 300 g und 4 °C wurde das Zellpellet in 50 µL PBS resuspendiert, in lichtgeschützte Reaktionsgefäße überführt und nach Zugabe von 1 µL anti-Sca-1-Biotin und 1 µL Streptavidin-PE (BD Pharmingen™) für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µL PBS zugegeben und die Zellen erneut bei 300 g für 4 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 µL PBS resuspendiert und für die zweite extrazelluläre Färbung mit jeweils 1 µL anti-c-Kit-Biotin und Streptavidin-PE-Cy7 versetzt. Nach Inkubation für 15 min auf Eis wurde erneut 500 µL PBS hinzugegeben und die Zellen für 4 min bei 300 g abzentrifugiert.

Für die anschließende intrazelluläre Färbung wurden die Zellen zur Fixierung und Permeabilisierung mit 100 µL BD *Cytofix/Cytoperm Buffer* resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 mL BD *Perm/Wash Buffer* versetzt und erneut abzentrifugiert. Nach Resuspendieren der Zellen in 100 µL BD *Cytoperm Plus Buffer* wurde weitere 10 min auf Eis inkubiert. Darauffolgend wurden die Zellen erneut mit 1 mL BD *Perm/Wash Buffer* gewaschen, zur Refixierung mit 100 µL BD *Cytofix/Cytoperm* resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit 1 mL BD *Perm/Wash Buffer* wurden die Zellen zur Freisetzung und anschließenden Färbung des zuvor in die DNA inkorporierten BrdU in 100 µL DNase-Lösung (300 µg/mL in Dulbecco's PBS) resuspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert (Carayon und Bord, 1992; Gonchoroff *et al.*, 1986). Danach wurden die Zellen erneut mit 1 mL BD *Perm/Wash Buffer* gewaschen. Nach resuspendieren der Zellen in 50 µL BD *Perm/Wash Buffer* mit 1 µL anti-BrdU wurde der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert und wiederum mit 1 mL BD *Perm/Wash Buffer* gewaschen. Für die Färbung der Gesamt-DNA zur Analyse des

Zellzyklus wurden die Zellen außerdem mit 20 µL 7-Amino-Actinomycin D-Lösung (7-AAD) versetzt. Abschließend wurden die Zellen in 1 mL BD *Perm/Wash Buffer* resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

4.2.5 Zellkultur

4.2.5.1 Zellkultur zur Bestimmung des Differenzierungspotentials der koloniebildenden Einheiten (*colony-forming unit*, CFU) Lin⁻ Knochenmarkszellen

Zur detaillierten Analyse des Differenzierungspotentials der myeloiden Vorläuferzellen wurden Lin⁻ Knochenmarkszellen aufgereinigt (4.2.2.3) und bezüglich ihrer koloniebildenden Aktivität charakterisiert. Alle Arbeitsschritte beginnend mit der Präparation der Tiere wurden unter einer Reinluftwerkbank durchgeführt. Parallel dazu wurden pro Tier 5 mL zuvor bei -20 °C gelagerter Methylcellulose-Matrix mit SCF (*stem cell factor*), IL-3, IL-6 und Erythropoietin (MethoCult™ 03434, StemCell Technologies) im Kühlschrank (4-8 °C) aufgetaut. Nach gründlichem Mischen von 8000 Lin⁻ Knochenmarkszellen pro Tier mit 5 mL Methylcellulose-Matrix wurden mittels Spritze mit aufgesetzter Kanüle (18G x 11/2 1,20 x 40 mm) dreimal 1,1 mL der Mischung in unbeschichteten 35 mm Zellkulturschalen ausgesät und für 8 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Bei mikroskopischer Betrachtung anhand der charakteristischen Morphologie wurden die CFU der Granulozyten (CFU-G), der Makrophagen (CFU-M) und gemischter Kolonien aus Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM) klassifiziert und ausgezählt. Außerdem wurden die CFU mit multipotentem Differenzierungspotential für Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Megakaryozyten (CFU-GEMM) und die von erythroiden Vorläuferzellen abstammenden Kolonien (*burst-forming unit-erythroid*, BFU-E) bestimmt.

4.2.6 Histologische Untersuchungen

4.2.6.1 Fixierung und Einbettung von Organen für Paraffinschnitte

Direkt nach der Präparation wurden die Organe in 4 % Paraformaldehyd in PBS aufgenommen und für mindestens 48 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Organe mit Hilfe eines Gewebereinbett- und Entwässerungsautomaten entwässert. Die Einbettung in Paraffin erfolgte maschinell mit Hilfe eines Paraffinspenders und der Ausgießstation *Tissue Block Dispenser* PAG 12.

4.2.6.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden aus den Paraffinblöcken mit einem Schlittenmikrotom angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Superfrost, Menzel, Braunschweig) übertragen und über Nacht bei RT getrocknet. Für die anschließenden immunhistologischen Antikörperfärbungen wurde das Paraffin der Schnitte entfernt. Dazu wurden die Paraffinschnitte für 20 min in 100 %igem Xylol inkubiert. Danach wurden die Schnitte zuerst in einer 1:1-Mischung aus Ethanol und Xylol und anschließend in Ethanol abnehmender Konzentration (2x 99 %, 1x 70 % und 1x 50 %) geschwenkt. Abschließend wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser gespült.

4.2.6.3 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung werden in Gewebeschnitten Zellkerne dunkelblau/violett und das Zytoplasma rosa angefärbt. Getrocknete Paraffinschnitte wurden für 3 min in Meyer's Hämatoxylin-Lösung (Sigma, Dreieich) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Durch Oxidation des gebundenen Hämalauns wird dabei die entgültige Farbstoffentwicklung erreicht. Danach wurden die Schnitte für 20 s in 1 %igen Eosin-Lösung in 50 % Ethanol inkubiert und anschließend mit Wasser (MilliQ-Anlage, MembraPure GmbH, Bodenheim) gewaschen. Zur vollständigen Entwässerung wurde der Schnitt kurz in Xylol geschwenkt. Danach wurden die Schnitte mit Pertex Montagemedium (Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf) eingedeckt. Zur abschließenden Härtung des Montagemediums wurde das Präparat für 15 min bei 55 °C im Brutschrank gelagert.

4.2.6.4 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Für immunhistochemische Färbungen wurden die Paraffinschnitte (4.2.6.2) zuerst mit Citratpuffer (10 mM Natriumcitrat, pH 6,0) in einer Mikrowelle (700 W, 1x 4 min, 4x 3 min) inkubiert. Danach wurde der Objektträger in destilliertem Wasser auf RT abgekühlt, in TBS-T (0,1 % Triton X-100) gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 1 h in PBS/10 % FCS inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte mit TBS-T gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper in einer feuchten Kammer inkubiert.

5 Ergebnisse

5.1 Initiale Charakterisierung *Ptch*-defizienter Tiere und Histologie des Thymus

Die funktionelle Charakterisierung von *Ptch* im Mausmodell war bisher nur in frühen Stadien der Embryonalentwicklung möglich, da *Ptch*-defiziente Embryonen bereits am Tag 9,0 bis 10,5 *in utero* sterben. Dies ist u. a. durch Defekte in der Entwicklung des Neuralrohrs und des Herzens bedingt (Goodrich *et al.*, 1997; Hahn *et al.*, 1998). Die Funktionsanalyse von *Ptch* beschränkte sich daher auf *in vitro*-Studien und Mausmodelle mit heterozygoter *Ptch*-Mutation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter Verwendung einer konditional *Ptch*-defizienten Maus (*Ptch*^{fl^{ox}/fl^{ox}}*ERT2*^{+/-}) die Funktion von *Ptch* im adulten Tier analysiert. Die Inaktivierung von *Ptch* erfolgt in diesem Mausmodell mittels einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase unter Verwendung des Cre-*loxP* Systems (Abbildung 6) (Kuhn *et al.*, 1995). Zur Induktion der *Ptch* Nullmutation wurden *ROSA26CreERT2*^{+/-} Mäuse (A. Berns, Netherland Cancer Institute, Amsterdam) mit *Ptch*^{fl^{ox}/fl^{ox}} Mäusen verpaart. *ROSA26CreERT2*^{+/-} Mäuse exprimieren ein CreERT2-Rekombinaseprotein unter der Kontrolle des endogenen *ROSA26*-Promotors (Friedrich und Soriano, 1991), welche erst durch die Bindung von Tamoxifen aktiviert wird.

Zur Induktion der *Ptch*-Defizienz wurden adulte *Ptch*^{fl^{ox}/fl^{ox}}*ERT2*^{+/-} Tiere im Alter von 8 Wochen mit einer Gesamtdosis von 5 mg Tamoxifen (jeweils 1 mg Tamoxifen intraperitoneal an fünf aufeinander folgenden Tagen) behandelt (Imai *et al.*, 2001). Die daraus resultierenden *Ptch*-defizienten Tiere werden im Folgenden auch als *tPtch*^{-/-} Mäuse bezeichnet. Zur Kontrolle möglicher systemimmanenter Effekte, die nicht mit der biallelischen *Ptch*-Inaktivierung assoziiert sind, wurden parallel *Ptch*^{fl^{ox}/fl^{ox}}*ERT2*^{+/-} Tiere mit Lösungsmittel (Emulsion aus Ethanol und Sonnenblumenöl) behandelt (Lösungsmittel-Kontrolle). Außerdem wurden zur Überwachung eines möglichen Einflusses von Tamoxifen in Kombination mit einer aktiven Cre-Rekombinase *Ptch*^{+/+}*ERT2*^{+/-} Mäuse mit Tamoxifen behandelt (Tamoxifen-Kontrolle). 10 Tage nach der ersten Tamoxifengabe wurden bei der Beobachtung der *tPtch*^{-/-} Mäuse erste phänotypische Veränderungen im Vergleich mit Kontrolltieren beobachtet. Die Tiere verloren zunehmend an Gewicht (bis zu 20 % nach 20 Tagen) und begannen sich intensiv zu putzen. Das Erscheinungsbild des Fells verschlechterte sich zunehmend und das damit einhergehende starke Putzen der Mäuse führte ventral durch Verlust der Behaarung zu kahlen Hautstellen (Abbildung 7).

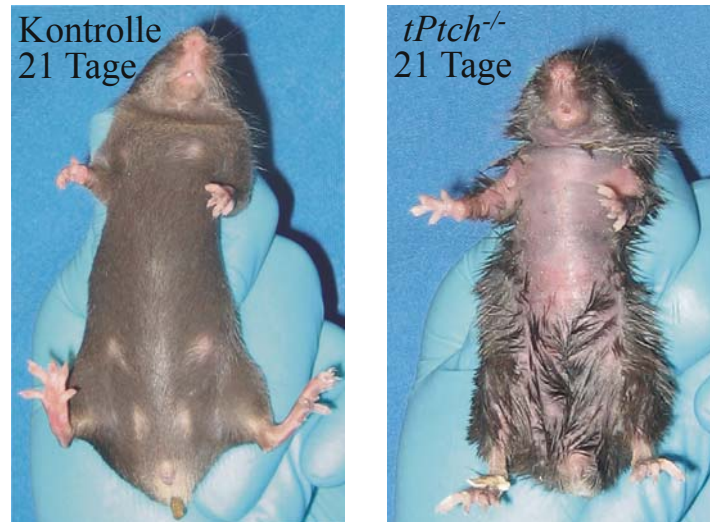


Abbildung 7: Veränderung des Fells von Ptch-defizienten Mäusen.

Ein *tPtch*^{-/-} Tier 21 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (rechts) im Vergleich mit einem Lösungsmittel-behandelten Kontrolltier (links). Deutlich zu erkennen ist bei dem *tPtch*^{-/-} Tier die Verschlechterung der Fellstruktur, welche mit einem stark ausgeprägten Putztrieb und einem ventralen Verlust des Fells einher geht.

Aufgrund des sich zunehmend verschlechternden Allgemeinzustandes wurden die Ptch-defizienten Tiere 23 Tage nach der ersten Tamoxifengabe getötet. Für alle folgenden Experimente wurden die Tiere 15 bzw. 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe analysiert. Durch histologische Untersuchungen von perfundierten Ptch-defizienten Tieren konnte gezeigt werden, dass die offensichtlichen Abnormalitäten der Haut mit starker Proliferation der intrafollikulären und follikulären Epidermis einher gehen (Doktorarbeit A. Uhmman 2006, Institut für Humangenetik, Universität Göttingen).

Bei der Betrachtung der inneren Organe der Ptch-defizienten Tiere zeigte sich ab dem 15. Tag nach der ersten Tamoxifengabe eine Verkleinerung des Thymus im Vergleich zu den Thymi der Kontrolltiere. Bis zum 19. Tag nach dem Start der Induktion der *Ptch*-Deletion verstärkte sich die Reduktion des Organs zunehmend (Abbildung 8A). Die Thymi von Kontrolltieren zeigten in dem Beobachtungszeitraum von 19 Tagen und auch darüber hinaus keine Reduktion des Volumens (Abbildung 8A und B). Durch die verwendeten Kontrolltiere konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Verkleinerung des Thymus unabhängig vom Lösungsmittel sowie von Tamoxifen in Kombination mit einer aktiven Cre-Rekombinase ist.

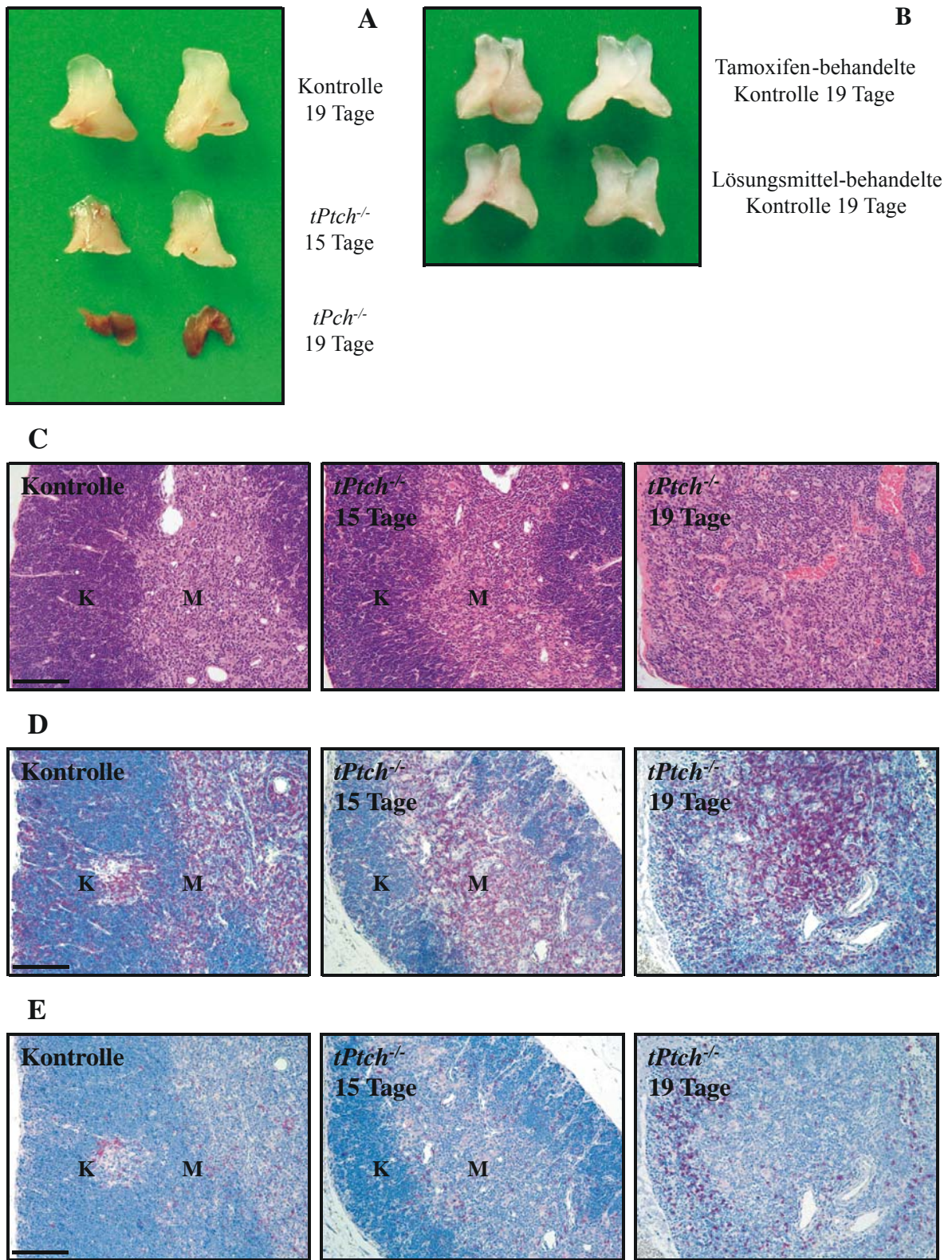


Abbildung 8: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildung 8: Die induzierte Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier führt zu histologischen Anomalien der Gewebestruktur und Zellularität des Thymus und resultiert in der Verkleinerung des Organs.

(A) Vergleich der Thymi von Lösungsmittel-behandelten Kontrolltieren (oben) mit Thymi von *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 Tage (Mitte) und 19 Tage (unten) nach der ersten Tamoxifengabe. (B) Thymi von Tamoxifen- und Lösungsmittel-behandelten Kontrolltieren 19 Tage nach der ersten Injektion. (C) Hematoxylin/Eosin (HE)-gefärbte Thymus-Paraffinschnitte von *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 Tage (Mitte) und 19 Tage (rechts) nach der ersten Tamoxifengabe im Vergleich zu einem Lösungsmittel-behandelten Kontrolltier (links). (D) anti-CD3 gefärbte Paraffinschnitte der Thymi von *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 (Mitte) und 19 Tage (rechts) nach der ersten Tamoxifengabe im Vergleich zu einem Kontrolltier. (E) anti-B220 gefärbte Paraffinschnitte der Thymi von *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 (Mitte) und 19 Tage (rechts) nach der ersten Tamoxifengabe im Vergleich zu einem Kontrolltier. Maßstab 2 mm, K=Kortex, M=Medulla.

(Die Anfertigung der Präparate erfolgte mit Unterstützung und nach Anleitung von Anke Frommhold, Institut für Humangenetik, Universität Göttingen und deren Begutachtung mit Hilfe von Dr. W. Schulz-Schaeffer, Abteilung Neuropathologie, Universitätsklinikum Göttingen).

Die histologische Charakterisierung der Thymi von *Ptch*-defizienten Mäusen erfolgte durch Hematoxylin/Eosin (HE)-Färbungen von Paraffinschnitten. 15 Tage nach Induktion der *Ptch*-Deletion zeigte sich eine Reduktion der Thymusrinde (Kortex). Nach 19 Tagen war in der HE-Färbung keine Abgrenzung mehr zwischen dem Kortex und dem Mark des Thymus (Medulla) zu erkennen (Abbildung 8C). Zur Charakterisierung der B- und T-Zell-Populationen wurden die Paraffinschnitte der Thymi außerdem immunhistologisch analysiert, indem diese mit Antikörpern gegen B220 und CD3 gefärbt wurden. In den Thymi von *Ptch*-defizienten Mäusen blieb die Population der markständigen T-Zellen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe weitestgehend erhalten, wohingegen ein nahezu vollständiger Verlust der T-Zellen im Thymuskortex detektiert wurde (Abbildung 8D). Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung der B220⁺ B-Zell-Population beobachtet werden (Abbildung 8E). Durch die Färbung der Lymphozytenpopulationen konnten Kortex und Medulla der Thymi von *Ptch*-defizienten Mäusen auch am Tag 19 nach der ersten Tamoxifeninjektion noch unterschieden werden. Dies war im Gegensatz dazu in den HE-gefärbten Paraffinschnitten zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich.

Der Verlust der im Thymuskortex befindlichen unreifen T-Zellen bei *Ptch*-defizienten Tieren deutet auf einen Defekt in der T-Zell-Entwicklung im Thymus hin. Im Gegensatz dazu scheinen die reifen T-Zellen in der Thymusmedulla nicht beeinflusst zu sein.

5.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zell-Populationen im Thymus von Ptch-defizienten Mäusen

Der Thymus ist bei allen Säugetieren das zentrale Organ der Reifung der T-Zellen im Organismus. Grundlage der T-Zell-Entwicklung sind dabei die aus dem Knochenmark einwandernden frühen T-Zell-Vorläufer (*early T cell progenitor*, ETP) (Allman *et al.*, 2003; Shortman und Wu, 1996). Die den Thymus besiedelnden ETP entwickeln sich zuvor im Knochenmark ausgehend vom allgemeinen lymphatischen Vorläufer (*common lymphoid progenitor*, CLP) (Kondo *et al.*, 1997). Außerdem differenzieren ETP aus den hämatopoietischen Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSC) und davon abgeleiteten multipotenten Vorläuferzellen (Bhandoola und Sambandam, 2006).

Der Verlauf der T-Zell-Entwicklung im Thymus wurde im Rahmen dieser Arbeit durchflusszytometrisch anhand der Expression von entwicklungspezifisch exprimierten Oberflächenmolekülen verfolgt. Die Klassifizierung von unreifen und reifen Thymozyten erfolgte dabei in der FACS-Analyse anhand der Expression von CD4 und CD8. Thymozyten sind bezüglich CD4 und CD8 zuerst doppelt-negativ (DN, CD4⁻CD8⁻), anschließend doppelt-positiv (DP, CD4⁺CD8⁺) und differenzieren weiter zu reifen, CD4 oder CD8 einfach-positiven (SP, CD4⁺ oder CD8⁺) T-Zellen. Die DN-Population wurde außerdem bezüglich der Expression der Adhäsionsmoleküle CD44 (*Phagocytose-Glycoprotein-1*, PGP-1) und CD25 (α -Kette des Interleukin-2 Rezeptors, IL-2R α) analysiert und demzufolge in die vier Stadien DN1 bis DN4 unterteilt (Godfrey *et al.*, 1993; Godfrey *et al.*, 1994; Pearse *et al.*, 1989). Ab dem DN3-Stadium (CD44⁻CD25⁺) exprimieren Thymozyten außerdem CD3 und die β -Kette des T-Zell-Rezeptors (*T cell receptor β* , TCR- β) auf ihrer Oberfläche, durch deren Nachweis ebenfalls frühe DN-Stadien von späten Stadien der T-Zell-Entwicklung unterschieden wurden.

Zur Analyse der T-Zell-Entwicklung wurden die Thymozyten von Ptch-defizienten Tieren sowie Kontrolltieren simultan mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD44 und CD25 gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte bei Ptch-defizienten Tieren bereits bei der Charakterisierung der Zellen bezüglich Granularität (seitwärts gerichtete Lichtstreuung, *side scatter*, SSC) und Größe (Lichtstreuung nach vorne, *forward scatter*, FSC) eine drastische Reduktion der Population der Thymozyten (Abbildung 10, links). Im statistischen Mittel war die Anzahl der Thymozyten im SSC/FSC *dot plot* in Thymi von Ptch-defizienten Mäusen 15 bzw. 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe um das 13- bzw. 20-fache reduziert (Abbildung 9).

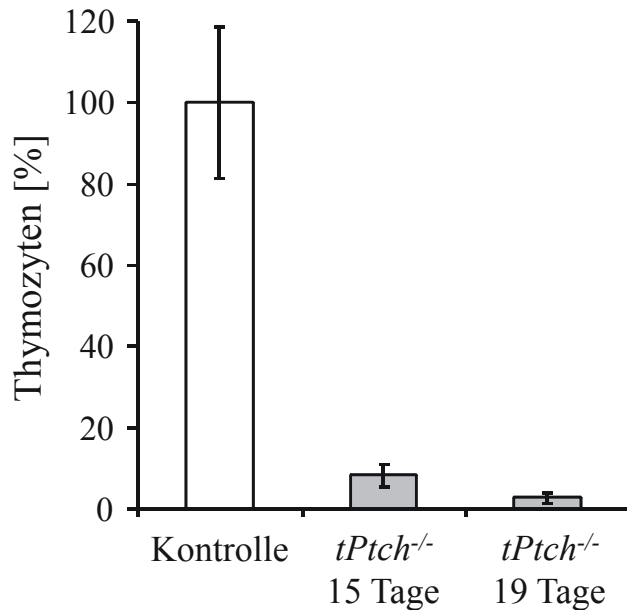


Abbildung 9: Verlust der T-Zell-Population im Thymus von *tPtch*^{-/-} Mäusen.

Die relative Anzahl der Thymozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurde die Zellpopulation im SSC/FSC *dot plot* anhand ihrer Größe und Granularität identifiziert (zur Erläuterung siehe Abbildung 10 (links), die durch den Kreis markierte Zellpopulation). Die relative Thymozytenzahl in Thymi von *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 (*tPtch*^{-/-} 15 Tage) und 19 Tage (*tPtch*^{-/-} 19 Tage) nach der ersten Tamoxifengabe im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (n=4 *tPtch*^{-/-} 15 Tage, n=3 *tPtch*^{-/-} 19 Tage, n=16 Kontrolle, für die Kontrolle wurden die Werte von neun Tamoxifen- und sieben Lösungsmittel-behandelten Tieren beider Zeitpunkte zusammengefasst).

Bei der Expressionsanalyse von CD4 und CD8 konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der T-Zell-Population in dem nahezu vollständigen Verlust der CD4CD8 DP T-Zellen begründet ist (Abbildung 10, Mitte). Dieser Effekt war bereits 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe signifikant und nach 19 Tagen war die Population nicht mehr existent. Parallel dazu nahm auch die absolute Zahl der CD4 und CD8 SP T-Zellen deutlich ab (Abbildung 12B). Durch den vollständigen Verlust der CD4CD8 DP waren diese in der durchflusszytometrischen Analyse allerdings relativ überrepräsentiert (Abbildung 10, Mitte). Zusätzlich wurden die Thymozyten bezüglich der Expression von CD3 und TCR-β analysiert. Dabei wurde bei *Ptch*-defizienten Mäusen eine starke Reduktion der CD3⁻ und TCR-β⁻ Thymozyten nachgewiesen, wohingegen die Population der CD3⁺ und TCR-β⁺ Zellen 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe unverändert erhalten blieb (Abbildung 11, links und Mitte). Durch diese Daten wurden die Ergebnisse der Expressionsanalyse bezüglich CD4 und CD8 zusätzlich bestätigt. Es konnte somit gezeigt werden, dass bei *Ptch*-defizienten Mäusen die frühen Stadien der T-Zell-Entwicklung im Thymus betroffen sind.

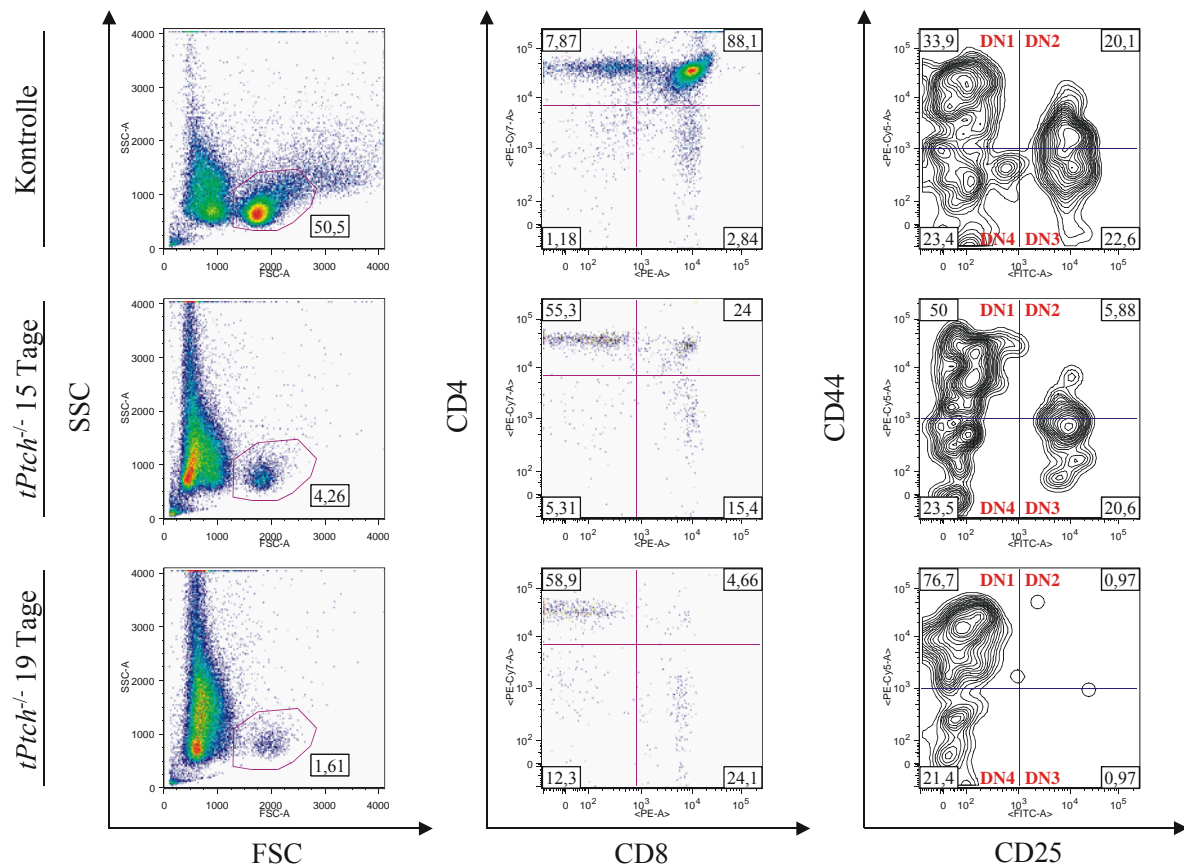


Abbildung 10: Reifungsdefekt der T-Zellen im Thymus von *tPtch*^{-/-} Mäusen.

Einzelzellensuspensionen der Thymi von *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 (*tPtch*^{-/-} 15 Tage) und 19 Tage (*tPtch*^{-/-} 19 Tage) nach der ersten Tamoxifengabe und von Kontrolltieren (dargestellt ist ein Lösungsmittel-behandeltes Tier 15 Tage nach der ersten Injektion) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4, CD8, CD44 und CD25 inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Im SSC/FSC *dot plot* (links) ist die Thymozytenpopulation durch einen Kreis markiert. Die unterschiedlichen T-Zell-Entwicklungsstadien der Thymozytenpopulation wurden im *dot plot* aufgrund der Expression von CD4 und CD8 analysiert (Mitte). Die CD4 und CD8 doppelt-negativen Zellen (DN, Quadrant unten links) wurden zusätzlich zur Definition der Stadien DN1 bis DN4 bezüglich der Expression von CD44 und CD25 analysiert (rechts). Die relativen prozentualen Anteile der jeweiligen Populationen sind in den markierten Feldern angegeben. Die Abbildung entspricht einem repräsentativen Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten.

Grundsätzlich könnte die veränderte Thymozytenpopulation in *Ptch*-defizienten Tieren durch Apoptose der frühen T-Zell-Vorläufer oder durch einen Block in der Entwicklung der T-Zellen begründet sein. Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurde mittels Fluorochrom-markiertem Annexin V die Lokalisation des Membranphospholipids Phosphatidylserin als Apoptose-Marker auf der Zelloberfläche der Thymozyten analysiert (Vermes *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1995; Koopman *et al.*, 1994). Bei apoptotischen Zellen wird Phosphatidylserin von der cytoplasmatischen zur extrazellulären Seite der

Plasmamembran translokalisiert und kann durch Annexin V, einem 35-36 kDa großen Ca^{2+} -abhängigen Phospholipid-bindenden Protein, detektiert werden (Raynal *et al.*, 1994). Bei *Ptch*-defizienten Mäusen konnte keine signifikante Erhöhung Annexin V-positiver Thymozyten im Vergleich zu Kontrolltieren detektiert werden (Abbildung 11, rechts). Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass der Verlust früher T-Zell-Stadien nach Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier nicht durch Induktion von Apoptose erfolgt, sondern vermutlich mit einem Block in der T-Zell-Entwicklung im Thymus assoziiert ist.

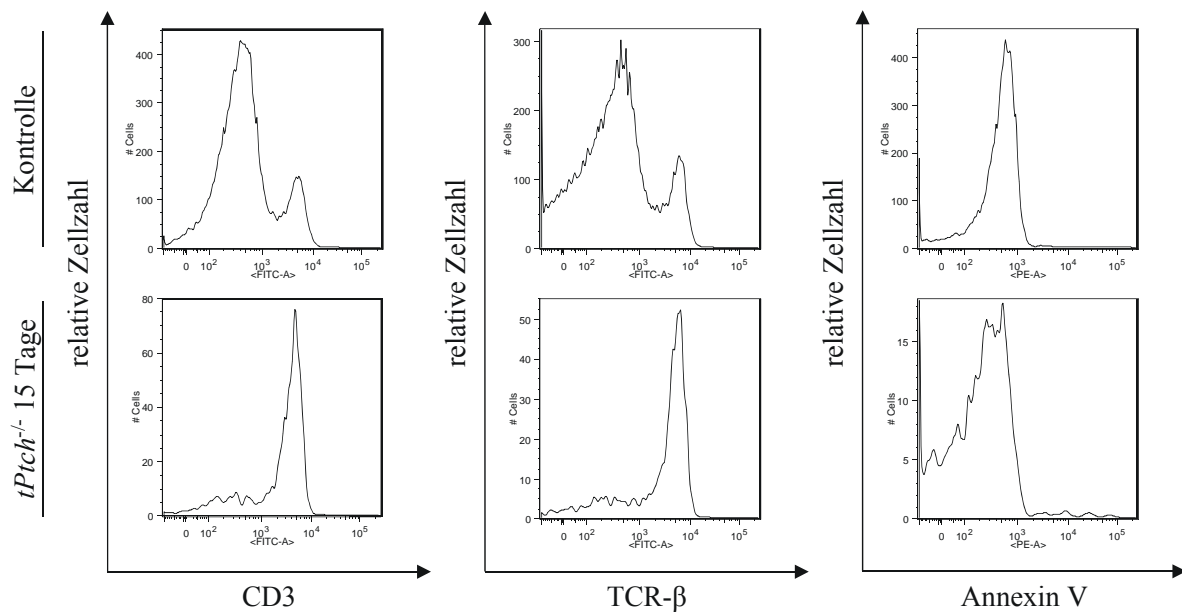


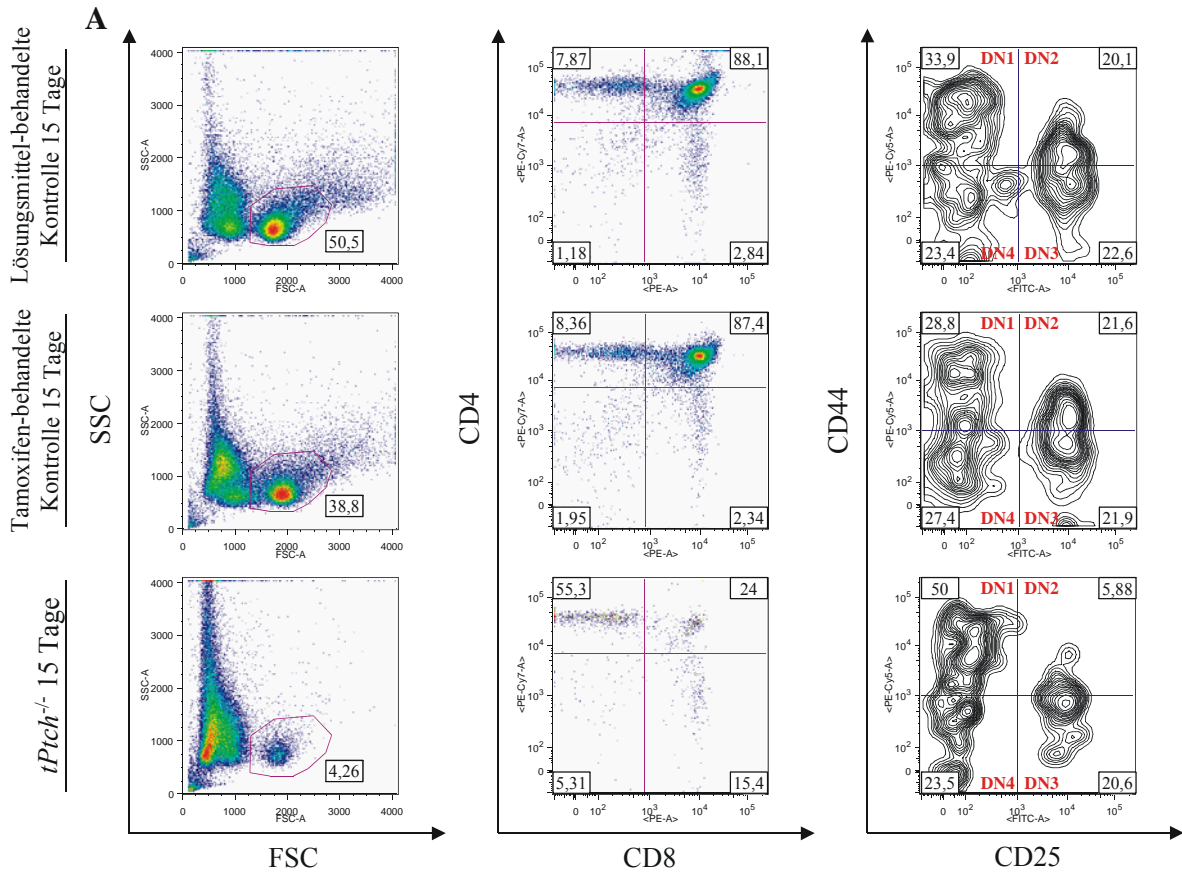
Abbildung 11: Der Verlust der Zellen in frühen T-Zell-Entwicklungsstadien im Thymus von *Ptch*-defizienten Mäusen korreliert nicht mit Apoptose.

Die Thymozyten von Kontrolltieren (dargestellt ist ein Lösungsmittel-behandeltes Tier 15 Tage nach der ersten Injektion) und *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 Tage nach der ersten Tamoxifen-Gabe (*tPtch*^{-/-} 15 Tage) wurden bezüglich der Expression der Oberflächenproteine CD3 und TCR-β sowie Annexin V analysiert. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen der Thymi mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD3 (links), TCR-β (Mitte) und Annexin V (rechts) inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Expressionsprofile der drei Proteine bezüglich der Thymozytenpopulationen, die zuvor im SSC/FSC *dot plot* ausgewählt wurden (zur Erläuterung siehe Abbildung 10, links). Die Abbildung entspricht einem repräsentativen Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten.

Zur weiteren Charakterisierung des Defekts in den frühen Stadien der T-Zell-Entwicklung wurden die Zellen durchflusszytometrisch anhand weiterer Marker definiert. Dazu wurde die im CD4/CD8 *dot plot* identifizierte Population der DN-Entwicklungsstadien bezüglich der Expression von CD44 und CD25 analysiert. Die Zellen der DN1-Population (CD44⁺CD25⁻) sind durch die Expression von CD44 gekennzeichnet, die DN2-

Differenzierung (CD44⁺CD25⁺) geht mit der zusätzlichen Expression von CD25 einher. In den nachfolgenden Stadien DN3 (CD44⁻CD25⁺) und DN4 (CD44⁻CD25⁻) wird zunächst die Expression von CD44 und anschließend von CD25 herunterreguliert. Bei *Ptch*-defizienten Tieren war bereits 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe eine Reduktion der DN2-Population von 20 % bei Kontrolltieren auf 6 % zu beobachten (Abbildung 10, rechts). Nach 19 Tagen war ein vollständiger Verlust der Zellen in den Fraktionen DN2 und DN3 zu beobachten. Zusammengefasst zeigten diese Daten einen Differenzierungsdefekt zwischen dem DN und DP Stadium in der T-Zell-Entwicklung im Thymus von *Ptch*-defizienten Mäusen. Außerdem konnte der Entwicklungsdefekt auf das DN1-Stadium bzw. die Differenzierung vom DN1- zum DN2-Stadium eingegrenzt werden.

Zu allen Experimenten von *Ptch*-defizienten Tieren wurden für beide Zeitpunkte Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelte Kontrolltiere mitgeführt. Sowohl 15 als auch 19 Tage nach der ersten Injektion wurde kein Effekt der Komponenten zur Induktion der Inaktivierung von *Ptch* auf die verschiedenen T-Zell-Populationen im Thymus beobachtet. Abbildung 12A zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse von Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren 15 Tage nach der ersten Injektion im Vergleich zu einem entsprechenden *Ptch*-defizienten Tier. Unter 12B sind die absoluten Zahlen zu diesem Experiment angegeben. Zusätzlich werden exemplarisch die absoluten Zahlen für ein Experiment 19 Tage nach der ersten Injektion gezeigt, bei denen das Ergebnis nach 15 Tagen bezüglich der Kontrollen bestätigt wird. Dadurch wird außerdem der bereits zuvor in Abbildung 10 gezeigte Verlust der DN2- und DN3-Population 19 Tage nach dem Induktionsstart der *Ptch*-Deletion anhand der absoluten Zahlen belegt (Abbildung 12B, roter Kasten). Folglich wird der beobachtete Differenzierungsblock in den frühen Stadien der T-Zell-Entwicklung im Thymus der *Ptch*-defizienten Mäuse alleinig durch die *Ptch*-Defizienz induziert und nicht durch systemimmanente Effekte moduliert.



B

Fraktion	15 Tage			19 Tage		
	Lösungsmittel-behandelte Kontrolle	Tamoxifen-behandelte Kontrolle	<i>tPtch</i> ^{-/-}	Lösungsmittel-behandelte Kontrolle	Tamoxifen-behandelte Kontrolle	<i>tPtch</i> ^{-/-}
gesamter Thymus	12,3 x 10 ⁷	4,80 x 10 ⁷	4,90 x 10 ⁷	14,0 x 10 ⁷	12,0 x 10 ⁷	0,15 x 10 ⁷
Lymphozyten	6,21 x 10 ⁷	1,86 x 10 ⁷	0,21 x 10 ⁷	7,46 x 10 ⁷	5,12 x 10 ⁷	0,02 x 10 ⁷
CD4/CD8 SP CD4 ⁺	4,9 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁶	1,16 x 10 ⁶	9,85 x 10 ⁶	2,59 x 10 ⁶	0,14 x 10 ⁶
SP CD8 ⁺	1,76 x 10 ⁶	0,44 x 10 ⁶	0,32 x 10 ⁶	2,99 x 10 ⁶	2,12 x 10 ⁶	0,06 x 10 ⁶
DP	5,47 x 10 ⁷	1,63 x 10 ⁷	0,05 x 10 ⁷	6,04 x 10 ⁷	4,57 x 10 ⁷	0,001 x 10 ⁷
DN	7,33 x 10 ⁵	3,63 x 10 ⁵	1,11 x 10 ⁵	1,35 x 10 ⁶	5,53 x 10 ⁵	0,30 x 10 ⁵
CD44/CD25 DN1	2,48 x 10 ⁵	1,05 x 10 ⁵	0,56 x 10 ⁵	6,19 x 10 ⁵	2,35 x 10 ⁵	0,23 x 10 ⁵
DN2	1,47 x 10 ⁵	0,79 x 10 ⁵	0,07 x 10 ⁵	1,85 x 10 ⁵	0,41 x 10 ⁵	-
DN3	1,66 x 10 ⁵	0,8 x 10 ⁵	0,23 x 10 ⁵	3,16 x 10 ⁵	1,10 x 10 ⁵	-
DN4	1,72 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵	0,26 x 10 ⁵	2,32 x 10 ⁵	1,68 x 10 ⁵	0,06 x 10 ⁵

Abbildung 12: Der Verlust der frühen T-Zell-Populationen im Thymus von *tPtch*^{-/-} Mäusen ist unabhängig von den Induktionsbedingungen der Inaktivierung von *Ptch*. (A) Einzelzellsuspensionen von Thymi aus Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren und *tPtch*^{-/-} Tieren 15 Tage nach der ersten Injektion wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4, CD8, CD44 und CD25 inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Im SSC/FSC dot plot (links) ist die Thymozytenpopulation durch einen Kreis markiert. Die unterschiedlichen T-Zell-Entwicklungsstadien der Thymozytenpopulation wurden im dot plot aufgrund der

Expression von CD4 und CD8 analysiert (Mitte). Die CD4 und CD8 doppelt-negativen Zellen (DN, Quadrant unten links) wurden zusätzlich bezüglich der Expression von CD44 und CD25 analysiert (rechts). (B) Absolute Zahlen der unter (A) dargestellten Analyse der verschiedenen T-Zell-Populationen 15 Tage nach der ersten Injektion (links) und einer entsprechenden Analyse 19 Tage nach Injektionsbeginn (rechts). Zusätzlich ist der Verlust der DN2- und DN3-Population bei *tPtch*^{-/-} Tieren 19 Tage nach der ersten Injektion hervorgehoben (roter Kasten).

5.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung der frühen T-Zell-Vorläufer im Thymus von *Ptch*-defizienten Mäusen

Anhand der durchflusszytometrischen Analyse der Thymozyten in *Ptch*-defizienten Mäusen wurde ein Block für das DN1-Stadium (CD4⁻CD8⁻CD25⁻CD44⁺) der T-Zell-Entwicklung im Thymus identifiziert (Abschnitt 5.2). Diese Zellfraktion ist allerdings nicht exklusiv für T-Zell-Vorläufer, sondern enthält durch Vorläufer für B-Zellen, myeloide Zellen sowie natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen (DC) ein multiples Differenzierungspotential (Ardavin *et al.*, 1993; Benlagha *et al.*, 2002; Matsuzaki *et al.*, 1996; Porritt *et al.*, 2004). Daher lässt sich der Verlust der frühen T-Zell-Entwicklungsstadien DN2 und DN3 im Thymus von *Ptch*-defizienten Tieren nicht eindeutig auf einen Differenzierungsdefekt der ETP im DN1-Stadium eingrenzen. Eine weitere Alternative ist ein früherer Differenzierungsdefekt im Knochenmark, der ebenfalls zum Verlust der ETP in der DN1-Population führen würde. Beide Möglichkeiten würden ein ähnliches Bild in der durchflusszytometrischen Analyse liefern. In der adulten Maus sind die ETP im Thymus langfristig nicht in der Lage die T-Zell-Entwicklung aufrecht zu erhalten, sie benötigen kontinuierlichen Ersatz aus dem Knochenmark (Goldschneider *et al.*, 1986). Ausgehend von HSC, MPP und CLP wandern sich entwickelnde ETP durch die Blutbahn und besiedeln den Thymus (Kondo *et al.*, 1997; Allman *et al.*, 2003). Die ETP entsprechen phänotypisch nicht vollständig dem DN1-Phänotyp, ein Teil dieser Zellen exprimiert zusätzlich CD4 auf der Oberfläche (Ismaili *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1991). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse können ETP minimal als Lin^{low}CD25^c-Kit^{high} definiert werden (Bhandoola und Sambandam, 2006).

Zur Charakterisierung der in den Thymus einwandernden ETP wurde im Rahmen dieser Arbeit die durchflusszytometrische Detektion dieser Zellen in *Ptch*-defizienten Tieren etabliert (nach Protokollen von A. Bhandoola, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA). Im Thymus eines adulten Tiers entspricht nur ca. jede 10.000-ste Zelle einem ETP (Bhandoola und Sambandam, 2006).

Neben einigen weiteren Vorläuferzellen sind sämtliche anderen Zellen bereits zu definierten Zelltypen differenziert und gehören einer festgelegten Entwicklungslinie (*lineage*) an. Zur Abtrennung dieser liniendeterminierten Zellen in der FACS-Analyse wurde eine Mischung von Antikörpern eingesetzt, die gegen *lineage*-Marker gerichtet sind. Anhand der Expression von c-Kit und *lineage*-Markern wurden im *dot plot* zunächst alle Thymozyten ausgewählt, die nur in geringem Maße *lineage*-positiv (*lineage*^{low}) sind (Abbildung 13A, links). Dabei wurden besonders die Zellen mit hoher c-Kit-Expression (c-Kit^{high}) mit einbezogen, da diese größtenteils den ETP entsprechen. Die nachfolgende Darstellung der ausgewählten Zellen im c-Kit/CD25 *dot plot* liefert in Fraktion I die ETP. Die Fraktionen II und III entsprechen den Populationen DN2 bzw. DN3 (Abbildung 13A, rechts).

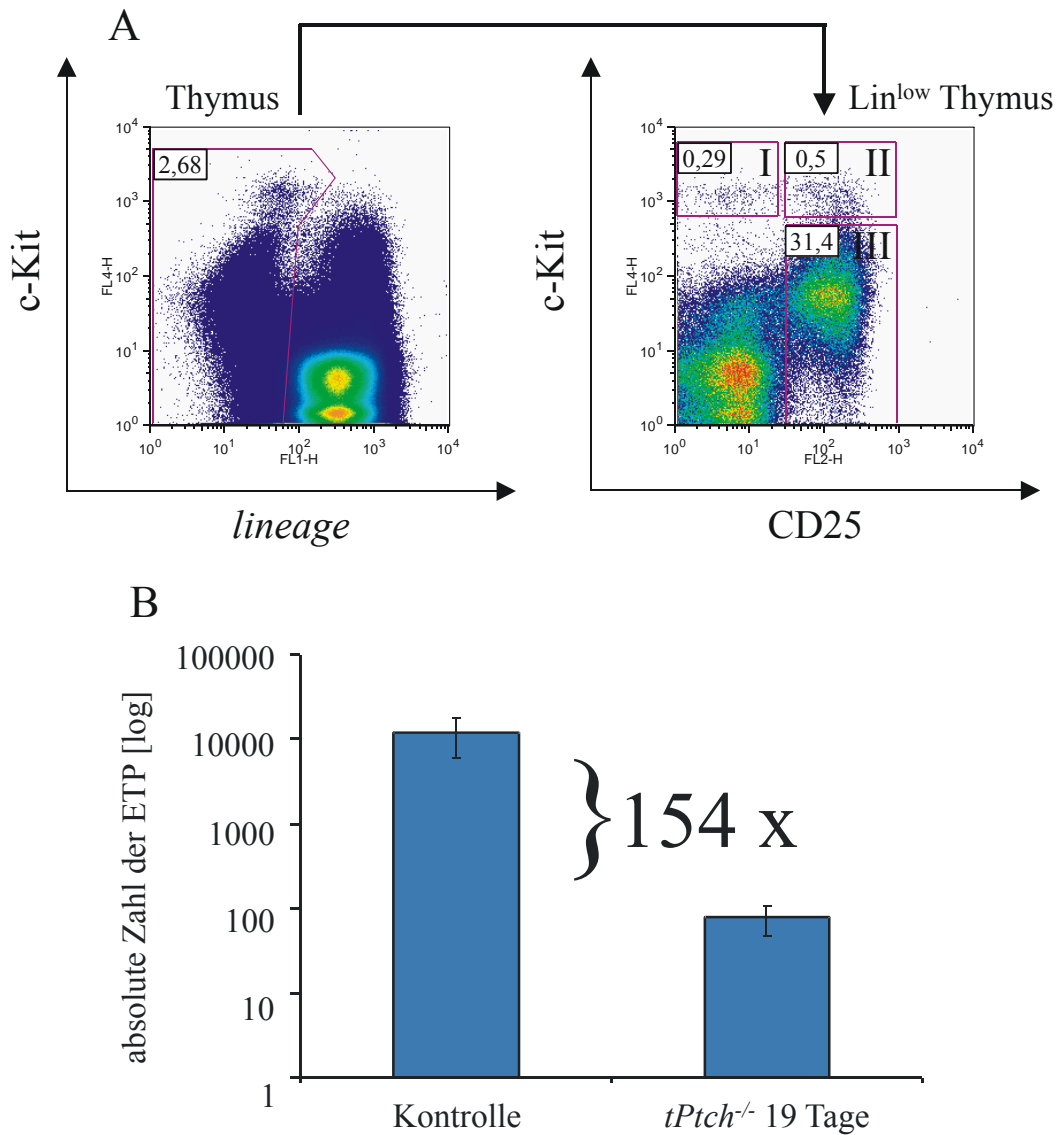


Abbildung 13: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildung 13: Verlust der ETP im Thymus von Ptch-defizienten Mäusen.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der Thymuszellen einer Kontrollmaus zur Bestimmung der frühen T-Zell-Vorläufer (*early T cell progenitor*, ETP). Dazu wurden die Thymozyten mit Antikörpern gegen c-Kit, CD25 und *lineage* inkubiert. Im SSC/FSC *dot plot* wurde zuerst anhand von Größe und Granularität die ETP enthaltende Population identifiziert und anschließend aufgrund der Expression von c-Kit und Markern für *lineage* aufgetrennt. Anschließend wurden alle *lineage*-negativen Zellen bezüglich ihrer Expression von c-Kit und CD25 dargestellt und dadurch die Fraktionen I (ETP), II (DN2) und III (DN3) identifiziert. Die relativen prozentualen Anteile der jeweiligen Fraktion sind in den markierten Feldern angegeben.

(B) Zur Bestimmung der ETP wurden die Thymi von drei *tPtch*^{-/-} Tieren 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe und drei Kontrolltieren (ein Tamoxifen- und zwei Lösungsmittel-behandelte Kontrolltiere 19 Tage nach der ersten Injektion) wie in (A) beschrieben analysiert. Im Vergleich zu Kontrolltieren ist die absolute Zahl der ETP bei *tPtch*^{-/-} Tieren um das 154-fache reduziert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

Mit dieser Methode wurde die absolute Zahl der ETP in Thymi von Ptch-defizienten Tieren 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe und von Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren 19 Tage nach der ersten Injektion verglichen. Es zeigte sich ein nahezu vollständiger Verlust der ETP in den Thymi von Ptch-defizienten Mäusen. Im Vergleich zu Kontrolltieren war die absolute Zahl der ETP in den Thymi von Ptch-defizienten Tieren um das 154-fache reduziert (Abbildung 13B). Damit konnte gezeigt werden, dass der durch die Ptch-Defizienz induzierte Block in der intrathymischen T-Zell-Entwicklung auf ein Ausbleiben einwandernder ETP aus dem Knochenmark zurückzuführen ist.

5.4 Durchflusszytometrische Charakterisierung der B-Zell-Entwicklung in der Milz von Ptch-defizienten Mäusen

Sowohl T- als auch B-Lymphozyten entwickeln sich ausgehend vom CLP als gemeinsamen Vorläufer der lymphoiden Linie im Knochenmark. Die Lymphopoiese der B-Lymphozyten findet auch größtenteils im Knochenmark statt. Die im Knochenmark von Pro-B-Zellen über Prä-B-Zellen gebildeten unreifen B-Zellen wandern zur vollständigen Reifung über den Blutstrom in die Milz ein und differenzieren dort zu reifen B-Zellen (zur Übersicht: Carsetti, 2000). Als eines der ersten Proteine exprimieren B-Zellen B220/CD45R (Maus/Mensch) auf ihrer Oberfläche. Dieses Protein wird während der gesamten Lymphopoiese vom Stadium der Pro-B-Zelle im Knochenmark bis zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle exprimiert und dient bei durchflusszytometrischen Analysen zur Identifizierung dieser Lymphozyten. In der Milz wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Reifungsstadien bezüglich des Expressionsmusters von CD21 (Komplementrezeptor Typ 2) und CD24 (*heat stable antigen*, HSA) definiert. Die ersten aus dem Knochenmark in die Milz einwandernden B-Lymphozyten sind transitionale B-Zellen vom Typ 1 (*transitional B cell of type 1*, T1 B-Zellen), die CD24 aber kein CD21 exprimieren (B220⁺CD24⁺CD21⁻). Diese entwickeln sich anschließend zu transitionalen B-Zellen des Typs 2 (*transitional B cell of type 2*, T2 B-Zellen), die zusätzlich zu CD24 auch CD21 exprimieren (B220⁺CD24⁺CD21⁺). Sowohl T1 als auch T2 B-Zellen können in der Milz zur dritten B-Zell-Population der reifen B-Zellen differenzieren, die durch eine geringe Expression von CD24 und CD21 gekennzeichnet sind (B220⁺CD24^{low}CD21^{low}) (Loder *et al.*, 1999; zur Übersicht: Carsetti, 2000; Niiro und Clark, 2002; Rolink *et al.*, 2004). Die B-Zell-Populationen der Milz wurden außerdem anhand der Expression von IgM und IgD durchflusszytometrisch identifiziert. T1 B-Zellen sind durch eine hohe Expression von IgM und eine schwache Expression von IgD gekennzeichnet (B220⁺IgM^{high}IgD^{low}). Im Gegensatz dazu ist sowohl für T2 B-Zellen als auch reife B-Zellen eine starke Expression beider Oberflächenproteine charakteristisch (B220⁺IgM^{high}IgD^{high}) (Loder *et al.*, 1999).

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der B-Zell-Populationen der Milz wurde anhand der Expressionsanalyse von B220, CD21 und CD24 für Ptch-defiziente Tiere 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe ein nahezu vollständiger Verlust der T1 B-Zell-Population nachgewiesen. Im Gegensatz dazu blieb die Population der T2 B-Zellen unverändert, wohingegen die reifen B-Zellen relativ überrepräsentiert waren (Abbildung 14, links). Zur

Bestätigung dieses Ergebnisses wurden die B-Zell-Populationen zusätzlich anhand der Expression von IgD und IgM identifiziert. Durch diese Analyse konnte erneut die deutliche Abnahme der Population der T1 B-Zellen in der Milz von *Ptch*-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Die T2 B-Zellen und reifen B-Zellen werden in der Expressionsanalyse von IgD und IgM zusammen erfasst. Bei *Ptch*-defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren war deren relative Zahl überrepräsentiert (Abbildung 14, rechts).

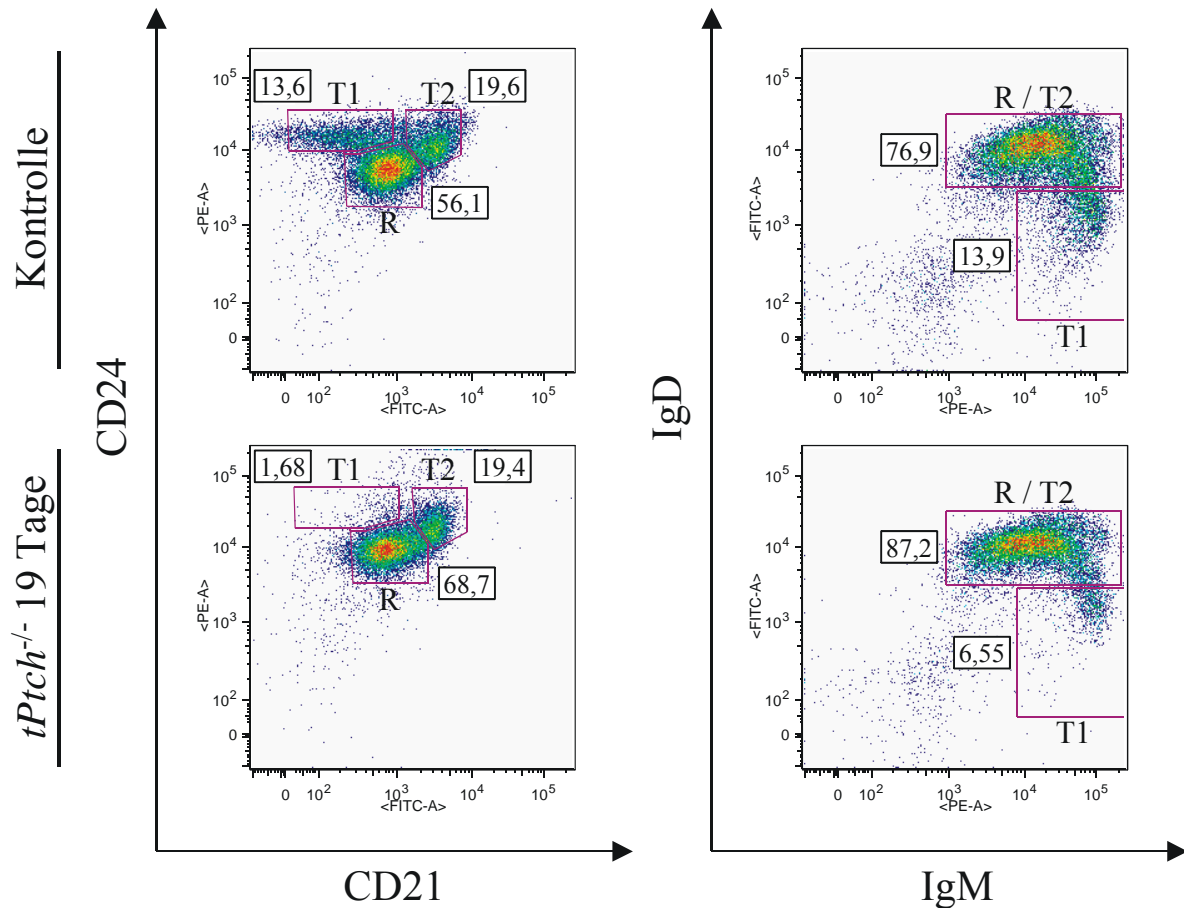
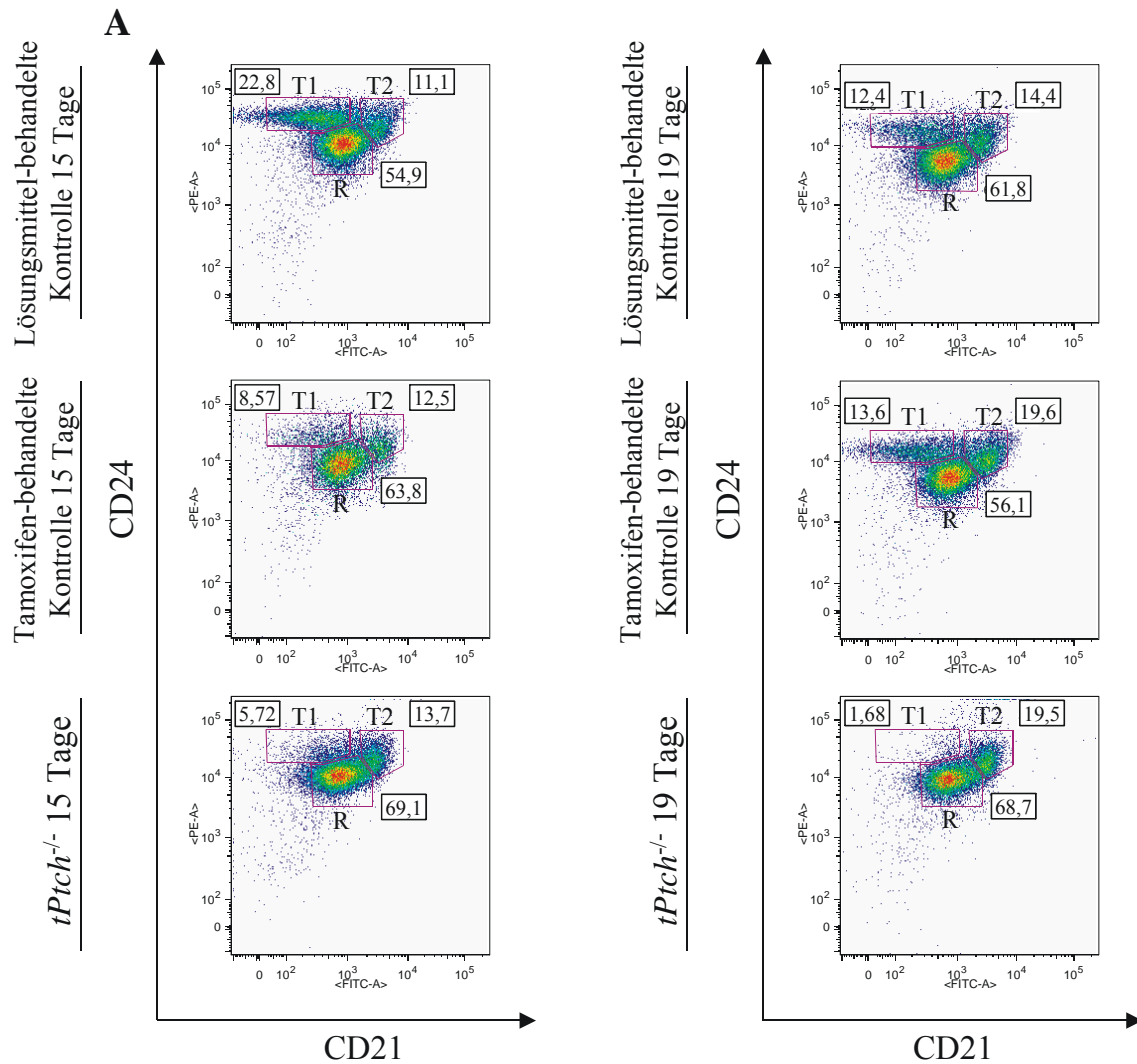


Abbildung 14: Verlust der T1 B-Zell-Population in der Milz von *tPtch*^{-/-} Mäusen.

Analyse der unterschiedlichen B-Zell-Populationen der Milz eines Lösungsmittel-behandelten Kontrolltiers und einer *tPtch*^{-/-} Maus 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe. Einzelzellsuspensionen der Milz wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine B220, CD21, CD24 sowie B220, IgM und IgD inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Zur Darstellung der einzelnen B-Zell-Populationen wurden zuerst alle B-Zellen über die Expression des Markers B220 identifiziert. In dem CD24/CD21 dot plot sind die B-Zell-Populationen T1 (*transitional type 1*, B220⁺CD24⁺CD21⁻), T2 (*transitional type 2*, B220⁺CD24⁺CD21⁺) und reife B-Zellen (R, B220⁺CD24^{low}CD21^{low}) gekennzeichnet. Im IgD/IgM dot plot sind die T1 B-Zellen (B220⁺IgM^{high}IgD^{low}) sowie die reifen (R)/T2 B-Zellen (B220⁺IgM^{low}IgD^{high}/B220⁺IgM^{high}IgD^{high}) getrennt voneinander markiert. Die relativen prozentualen Anteile der jeweiligen Populationen sind in den markierten Feldern angegeben. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten.

Zu beachten ist, dass in den Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe ein Reduktion der T1 B-Zellen beobachtet wurde, die bei Lösungsmittel-behandelten Kontrolltieren ausblieb (Abbildung 15, links). Folglich reagieren die T1 B-Zellen auf die Behandlung mit Tamoxifen bzw. der Kombination aus Tamoxifen und einer aktiven Cre-Rekombinase sensitiv. Dieser systemimmanente Effekt war allerdings nach 19 Tagen nicht mehr detektierbar (Abbildung 15, rechts). Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die T1 B-Zell-Population in den Tamoxifen-behandelten Kontrollen vollständig regeneriert und war nicht mehr von denen der Lösungsmittel-behandelten Kontrolltiere zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu war die Population der T1 B-Zellen in den Ptch-defizienten Tieren 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe fast vollständig verschwunden (Abbildung 15, rechts). Diese Daten belegen die Sensitivität der T1 B-Zellen gegenüber Tamoxifen und den damit verbundenen Einflüssen auf den Organismus. Dieser Effekt lässt sich aber eindeutig gegenüber dem durch die Ptch-Defizienz induzierten Verlust der Population der T1 B-Zellen in Ptch-defizienten Tieren abgrenzen.

**B**

Fraktion	15 Tage			19 Tage		
	Lösungsmittel-behandelte Kontrolle	Tamoxifen-behandelte Kontrolle	<i>tPtch</i> ^{-/-}	Lösungsmittel-behandelte Kontrolle	Tamoxifen-behandelte Kontrolle	<i>tPtch</i> ^{-/-}
gesamte Milz	5,20 x 10 ⁷	2,80 x 10 ⁷	6,80 x 10 ⁷	12,5 x 10 ⁷	5,2 x 10 ⁷	2,00 x 10 ⁷
B220-positive Zellen	2,54 x 10 ⁷	0,62 x 10 ⁷	2,79 x 10 ⁷	4,96 x 10 ⁷	2,17 x 10 ⁷	0,63 x 10 ⁷
T1	5,79 x 10 ⁶	0,53 x 10 ⁶	1,59 x 10 ⁶	6,15 x 10 ⁶	2,95 x 10 ⁶	0,10 x 10 ⁶
T2	2,82 x 10 ⁶	0,78 x 10 ⁶	3,82 x 10 ⁶	7,14 x 10 ⁶	4,25 x 10 ⁶	1,22 x 10 ⁶
M	1,39 x 10 ⁷	0,39 x 10 ⁷	1,93 x 10 ⁷	3,07 x 10 ⁷	1,22 x 10 ⁷	0,43 x 10 ⁷

Abbildung 15: T1 B-Zellen reagieren sensitiv auf Tamoxifen, dieser Effekt ist jedoch zwei Wochen nach der letzten Injektion vollständig kompensiert.

(A) Analyse der unterschiedlichen B-Zell-Populationen der Milz von *tPtch*^{-/-} Tieren sowie Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren 15 Tage (Bilder linke Seite) und 19 Tage (Bilder rechte Seite) nach der ersten Injektion. Zuerst wurden Einzelzellsuspensionen mit Antikörpern gegen B220, CD21, CD24 sowie B220, IgM und IgD inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Zur Darstellung der B-Zell-

Populationen wurden die B-Zellen über die Expression des Markers B220 identifiziert. In dem CD24/CD21 *dot plot* sind die B-Zell-Populationen T1 (*transitional type 1*, B220⁺CD24⁺CD21⁻), T2 (*transitional type 2*, B220⁺CD24⁺CD21⁺) und reife B-Zellen (R, B220⁺CD24^{low}CD21^{low}) einzeln gekennzeichnet. Die relativen prozentualen Anteile der jeweiligen Populationen sind in den markierten Feldern angegeben. Die Abbildung entspricht einem repräsentativen Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten. (B) Absolute Zahlen der unter (A) dargestellten Analysen der verschiedenen B-Zell-Populationen 15 Tage (links) und 19 Tage (rechts) nach der ersten Injektion.

5.5 Charakterisierung der frühen B-Zell-Entwicklung im Knochenmark von Ptch-defizienten Mäusen

Die Zellen in den frühen Stadien der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark sind durch temporäre Expression spezifischer Oberflächenmarker gekennzeichnet (Hardy *et al.*, 1991). Durchflusszytometrisch wurden die verschiedenen Populationen der B-Zell-Lymphopoese zunächst durch die Expressionsanalyse von B220, CD43 und IgM dargestellt. Die Pro-B-Zellen repräsentieren dabei das erste direkt aus CLP differenzierte Zellstadium der B-Zell-Linie im Knochenmark. Pro-B-Zellen sind durch die simultane Expression von B220 und CD43 gekennzeichnet, exprimieren aber kein IgM auf der Zelloberfläche (B220^{low}CD43⁺IgM⁻). Bei der weiteren Entwicklung zu Zellen des Prä-B-Zell-Stadiums nimmt die Expression von CD43 ab. Im Gegensatz dazu nimmt die Expression von B220 und IgM über das Stadium der Prä-B-Zellen bis zu den unreifen B-Zellen kontinuierlich zu. Unreife B-Zellen sind durch eine starke Expression von B220 und der mittleren bis starken Expression von IgM gekennzeichnet, wohingegen CD43 nicht mehr exprimiert wird (B220^{high}CD43⁻IgM^{low-high}). Im Knochenmark befinden sich außerdem reife, immunkompetente B-Zellen. Diese rezirkulierenden B-Zellen haben bereits die Milz passiert und exprimieren neben IgM als zweites membrangebundenes Immunglobulin IgD auf ihrer Zelloberfläche (B220^{high}CD43⁻IgM^{low}IgD^{high}) (zur Übersicht: Busslinger, 2004; Nagasawa, 2006).

Bei der durchflusszytometrischen Analyse des Knochenmarks der Ptch-defizienten Tiere wurde eine Abnahme der Fraktion der gesamten Lymphozyten im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet (Abbildung 16, links). Die weitere Charakterisierung der einzelnen B-Zell-Populationen der Lymphozytenfraktion bezüglich der Expression von B220 und CD43 zeigte eine Abnahme der relativen Zahl der Pro-B-Zellen und einen nahezu vollständigen Verlust der Prä-B-Zellen (Abbildung 16, Mitte, Fraktionen I und II). Im Gegensatz dazu war die relative Zahl der in einer Fraktion erfassten unreifen und reifen, rezirkulierenden B-Zellen überrepräsentiert (Abbildung 16, Mitte, Fraktion III). Die

Abnahme bzw. der Verlust der Pro- und Prä-B-Zellen konnte anhand der simultanen Expressionsanalyse von B220 und IgM zusätzlich bestätigt werden (Abbildung 16, rechts, Fraktion I). Bei der Analyse der Oberflächenproteine B220 und IgM werden die beiden frühen Stadien der Lymphopoiese der B-Zellen (Pro- und Prä-B-Zellen) in einer Fraktion erfasst. Im Gegensatz zur Expressionsanalyse von B220 und CD43 ermöglicht die Kombination mit IgM allerdings die Differenzierung der unreifen von den reifen, rezirkulierenden B-Zellen. Demnach gehen in *Ptch*-defizienten Mäusen zusätzlich zu den Pro- und Prä-B-Zellen auch die unreifen B-Zellen verloren (Abbildung 16, rechts, Fraktion II). Daher ist der prozentuale Anteil der rezirkulierenden B-Zellen überrepräsentiert (Abbildung 16, rechts, Fraktion III). Anhand dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die *Ptch*-Defizienz des adulten Tieres zum Verlust aller frühen Entwicklungsstadien der B-Zellen von den Pro-B-Zellen bis zu den unreifen B-Zellen führt.

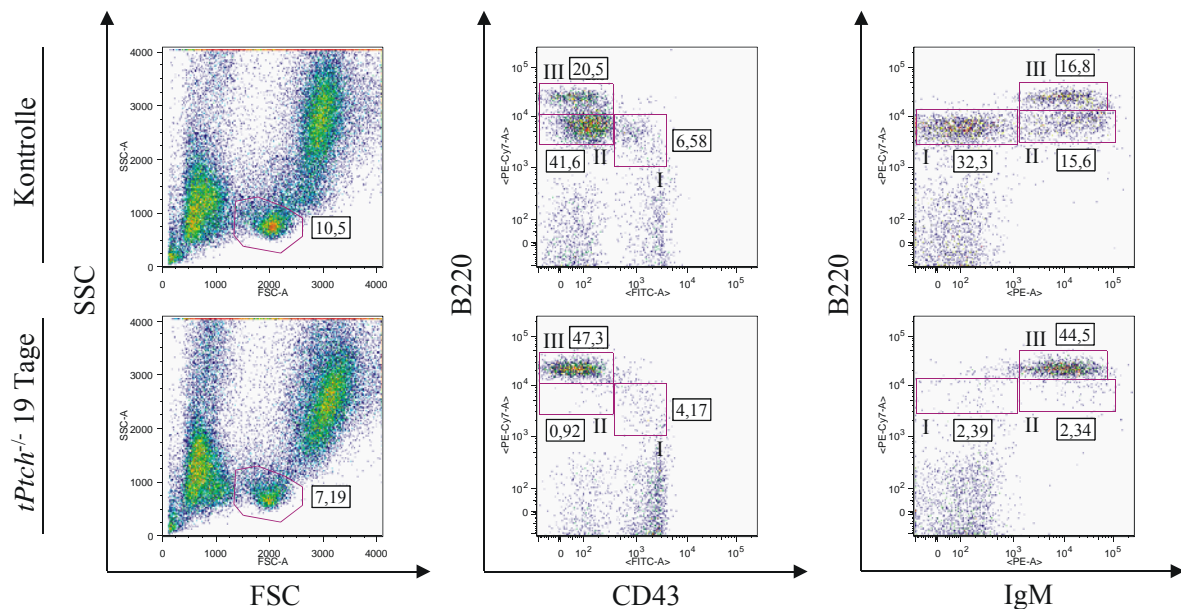
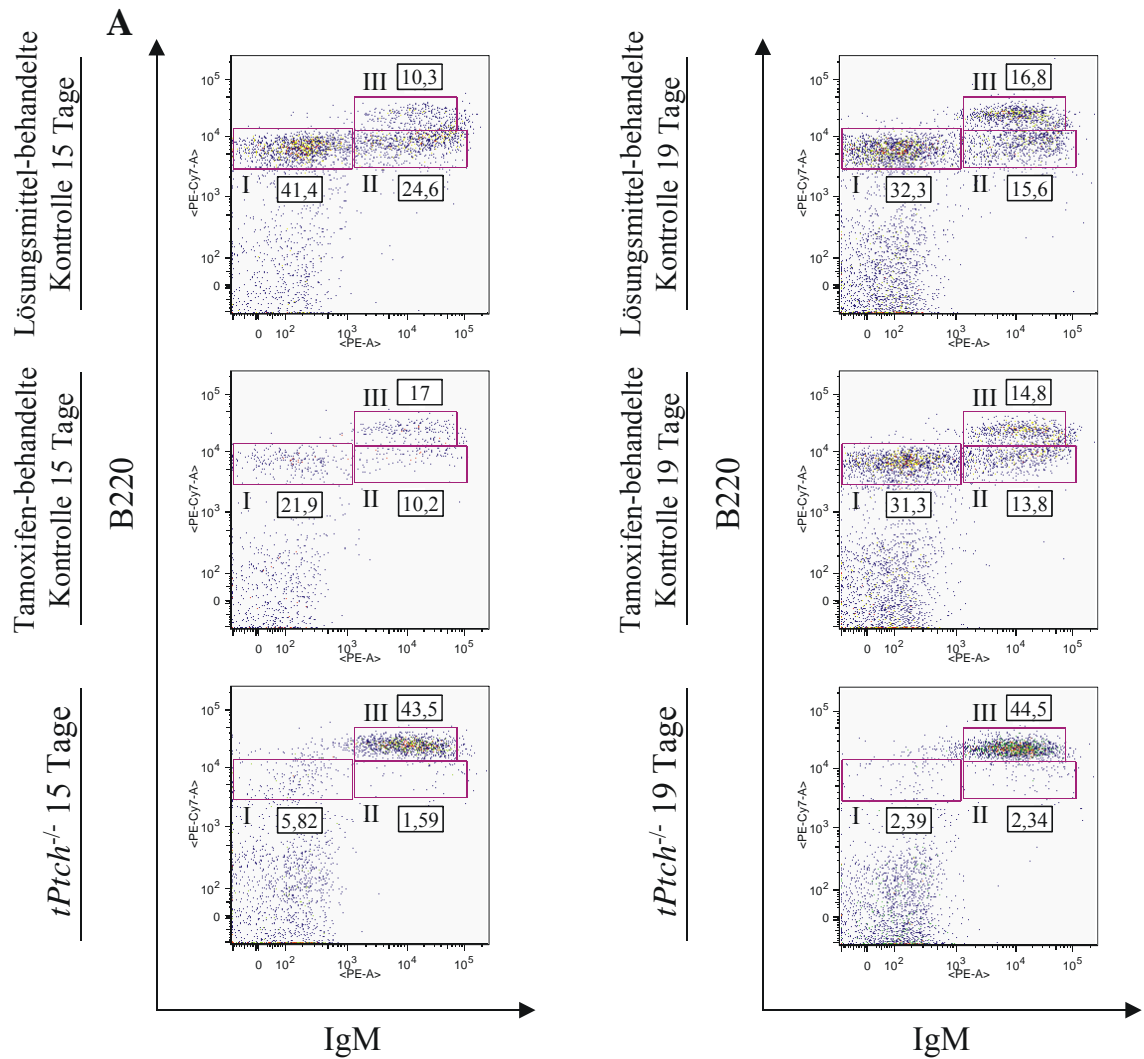


Abbildung 16: Defekt in der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark von *Ptch*-defizienten Mäusen.

Das Knochenmark von *tPtch*^{-/-} Mäusen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe und von Kontrolltieren (dargestellt ist ein Lösungsmittel-behandeltes Kontrolltier 19 Tage nach der ersten Injektion) wurde zur Analyse der einzelnen B-Zell-Populationen isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine B220, CD43 und IgM inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse eines Lösungsmittel-behandelten Kontrolltiers 19 Tage nach der ersten Injektion wurde mit der eines *tPtch*^{-/-} Tiers 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe verglichen. Im SSC/FSC *dot plot* des Gesamtknochenmarks (links) ist die Lymphozytenpopulation markiert, die in den weiteren Auftragsungen (Mitte und rechts) verwendet wird. Im *dot plot* mit der Analyse der Expression von B220 und CD43 (Mitte) entspricht die Fraktion I den Pro-B-Zellen (B220⁺CD43⁺), Fraktion II den Prä-B-Zellen (B220⁺CD43⁻) und Fraktion III den unreifen und außerdem den reifen, rezirkulierenden B-Zellen (B220^{high}CD43⁻). Im B220/IgM *dot*

plot (rechts) werden ebenfalls drei Populationen unterschieden. Fraktion I entspricht den Pro- und Prä-B-Zellen (B220⁺IgM⁻), Fraktion II den unreifen B-Zellen (B220⁺IgM⁺) und Fraktion III den reifen, rezirkulierenden B-Zellen (B220^{high}IgM⁺). Die relativen prozentualen Anteile der markierten Populationen sind in den Bildern angegeben. Die abgebildeten Daten entsprechen einem repräsentativen Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten.



B

Fraktion	15 Tage			19 Tage		
	Lösungsmittel-behandelte Kontrolle	Tamoxifen-behandelte Kontrolle	<i>tPtch</i> ^{-/-}	Lösungsmittel-behandelte Kontrolle	Tamoxifen-behandelte Kontrolle	<i>tPtch</i> ^{-/-}
gesamtes Knochenmark	3,60 x 10 ⁷	1,20 x 10 ⁷	4,20 x 10 ⁷	3,40 x 10 ⁷	2,90 x 10 ⁷	3,20 x 10 ⁷
Lymphozyten	2,50 x 10 ⁶	0,64 x 10 ⁶	2,38 x 10 ⁶	3,57 x 10 ⁶	3,05 x 10 ⁶	2,30 x 10 ⁶
Fraktion I	1,04 x 10 ⁶	0,14 x 10 ⁶	0,14 x 10 ⁶	1,15 x 10 ⁶	0,95 x 10 ⁶	0,05 x 10 ⁶
Fraktion II	0,62 x 10 ⁶	0,07 x 10 ⁶	0,04 x 10 ⁶	0,56 x 10 ⁶	0,42 x 10 ⁶	0,05 x 10 ⁶
Fraktion III	0,26 x 10 ⁶	0,11 x 10 ⁶	1,04 x 10 ⁶	0,60 x 10 ⁶	0,45 x 10 ⁶	1,02 x 10 ⁶

Abbildung 17: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildung 17: Tamoxifen inhibiert transient die Entwicklung der frühen B-Zellen im Knochenmark.

(A) Analyse der unterschiedlichen B-Zell-Populationen im Knochenmark von *tPtch*^{-/-} Tieren sowie Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren 15 Tage (Bilder linke Seite) und 19 Tage (Bilder rechte Seite) nach der ersten Injektion. Einzelzellsuspensionen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine B220, CD43 und IgM inkubiert. Die im SSC/FSC *dot plot* des Gesamtknochenmarks identifizierte Lymphozytenpopulation (siehe Abbildung 16) wurde zur weiteren Charakterisierung im B220/IgM *dot plot* analysiert. Fraktion I entspricht den Pro- und Prä-B-Zellen (B220⁻IgM⁻), Fraktion II den unreifen B-Zellen (B220⁺IgM⁺) und Fraktion III den reifen, rezirkulierenden B-Zellen (B220^{high}IgM⁺). Die relativen prozentualen Anteile der markierten Populationen sind in den Bildern angegeben. Die abgebildeten Daten entsprechen einem repräsentativen Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten. (B) Absolute Zahlen der unter (A) dargestellten Analyse der verschiedenen B-Zell-Populationen 15 Tage (links) und 19 Tage (rechts) nach der ersten Injektion.

Wie bereits für die B-Zell-Populationen der Milz wurde auch für die B-Zellen im Knochenmark ein negativer Effekt von Tamoxifen auf die Ausprägung der einzelnen Fraktionen beobachtet. So wurde bei Tamoxifen-behandelten im Gegensatz zu Lösungsmittel-behandelten Kontrolltieren 15 Tage nach der ersten Injektion eine Reduktion der Pro-, Prä- und unreifen B-Zellen beobachtet. Dieser Effekt war aber, wie bereits bei der Analyse der B-Zellen der Milz, 19 Tage nach Injektionsbeginn vollständig kompensiert (Abbildung 17). Folglich korreliert der Verlust aller frühen Stadien der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark eindeutig mit der induzierten *Ptch*-Defizienz im adulten Tier.

Zur weiteren Abgrenzung der sich im Knochenmark des adulten Tiers entwickelnden B-Zellen von den reifen, rezirkulierenden B-Zellen wurde die simultane Expression von IgM und IgD analysiert. Dabei wurde bei *Ptch*-defizienten Tieren bereits 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe mehr als eine Verdopplung des relativen Anteils der rezirkulierenden B-Zellen (IgM⁺IgD⁺) beobachtet. Bis zum Endpunkt der Analyse nach 19 Tagen war der relative Anteil der rezirkulierenden B-Zellen in *Ptch*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollen um das dreifache angestiegen (Abbildung 18, rechts). Folglich konnte die bereits zuvor in der Expressionsanalyse bezüglich B220 und IgM identifizierte Zellfraktion über die Expression von IgD zweifelsfrei den rezirkulierenden B-Zellen zugewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass durch die Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier die B-Zell-Entwicklung vollständig zum Erliegen kommt. Die weiterhin vorhandenen rezirkulierenden B-Zellen belegen zusätzlich, dass kein Migrationsdefekt vom Knochenmark zur Milz und zurück zum Knochenmark besteht und reife B-Zellen nicht schneller sterben.

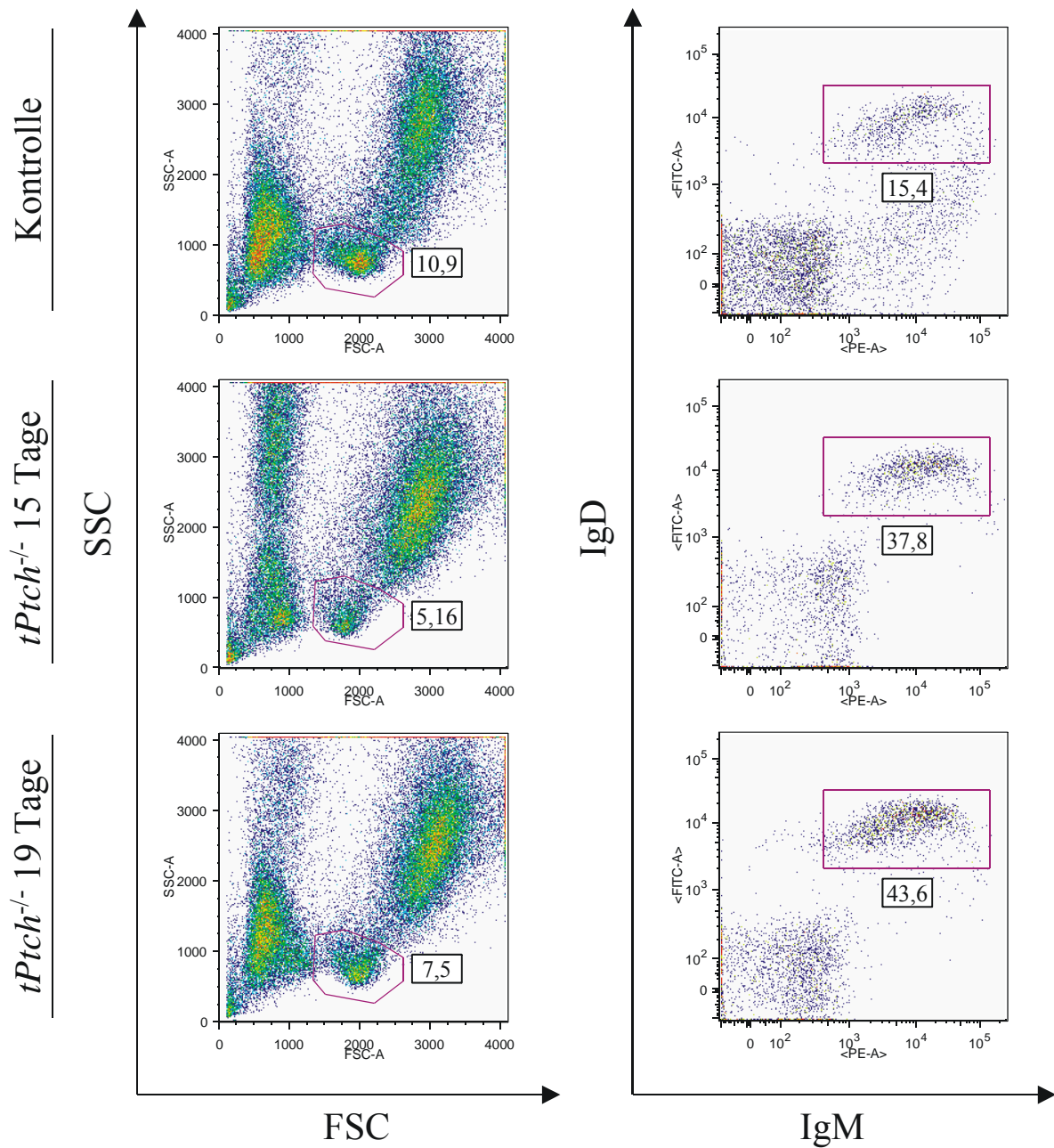


Abbildung 18: Zunahme der rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark von *Ptch*-defizienten Mäusen.

Durchflusszytometrische Analyse von Gesamtknochenmark, welches aus *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 Tage (Mitte) und 19 Tage (unten) nach der ersten Tamoxifengabe und einem Lösungsmittel-behandelten Kontrolltier 19 Tage nach der ersten Injektion (oben) isoliert wurde. Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine IgD und IgM inkubiert. Im SSC/FSC *dot plot* des Gesamtknochenmarks (links) ist die Lymphozytenpopulation markiert, die in einem weiteren *dot plot* bezüglich der Expression von IgD und IgM analysiert wurde (rechts). Im IgD/IgM *dot plot* sind die rezirkulierenden B-Zellen (IgD⁺IgM⁺) markiert. Die relativen prozentualen Anteile der markierten Lymphozytenpopulation und der rezirkulierenden B-Zellen sind in den Bildern angegeben. Die abgebildeten Daten entsprechen einem repräsentativen Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten.

5.6 Charakterisierung der B-, T- und NK-Zellen im Blut sowie der NK-Zellen in der Milz von Ptch-defizienten Mäusen

Durch die Analyse der verschiedenen Entwicklungsstadien der Lymphozyten in Knochenmark, Milz und Thymus im adulten Tier konnte in Ptch-defizienten Mäusen ein Block in der Lymphopoiese der B- und T-Zellen identifiziert werden. Die meisten im Blut zirkulierenden reifen B- und T-Lymphozyten haben eine Lebensdauer von mehreren Wochen, Gedächtnis-B-Zellen überleben mehrere Jahre im Organismus. Die Charakterisierung der im Blut zirkulierenden B- und T-Zellen erfolgte anhand der Expression von CD4, CD8 und B220. Dabei wurde zunächst bei Ptch-defizienten Tieren 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe eine deutliche Reduktion der B-, T- und NK-Zellen enthaltenen Fraktion um bis zu 80 % im Vergleich mit entsprechenden Kontrollen beobachtet (Abbildung 19 und 20, links). Die weitere Charakterisierung dieser Population zeigte die Abnahme der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie der B220⁺ B-Zellen im peripheren Blut von Ptch-defizienten Mäusen (Abbildung 19, Mitte und rechts). Die relativen Anteile der peripheren CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei Ptch-defizienten Tieren sind gegenüber Kontrollen unverändert, da beide T-Zell-Populationen in gleicher Relation abnehmen. Im CD4/CD8 *dot plot* wird die deutliche Abnahme der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei Ptch-defizienten Tieren ersichtlich (Abbildung 19, Mitte). Wie bereits zuvor bei der Analyse der B-Zellen in Knochenmark und Milz ist 19 Tage nach der Injektion auch im peripheren Blut beim Vergleich von Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrollen kein negativer Effekt der Induktionsbedingungen auf die Populationen zu detektieren (Abbildung 19, rechts).

Die nachgewiesene Abnahme der B- und T-Zellen im peripheren Blut von Ptch-defizienten Tieren ist eine Folge der bereits zuvor über die Analyse der entsprechenden Populationen in Thymus, Milz und Knochenmark identifizierten Defekte in der Lymphopoiese. Für diese Zellpopulationen im peripheren Blut lässt sich daher bei einem längeren Beobachtungszeitraum als 19 Tage eine weitere Abnahme postulieren, aufgrund des zunehmend schlechten Allgemeinzustands der Tiere wurde aber von Analysen zu späteren Zeitpunkten abgesehen.

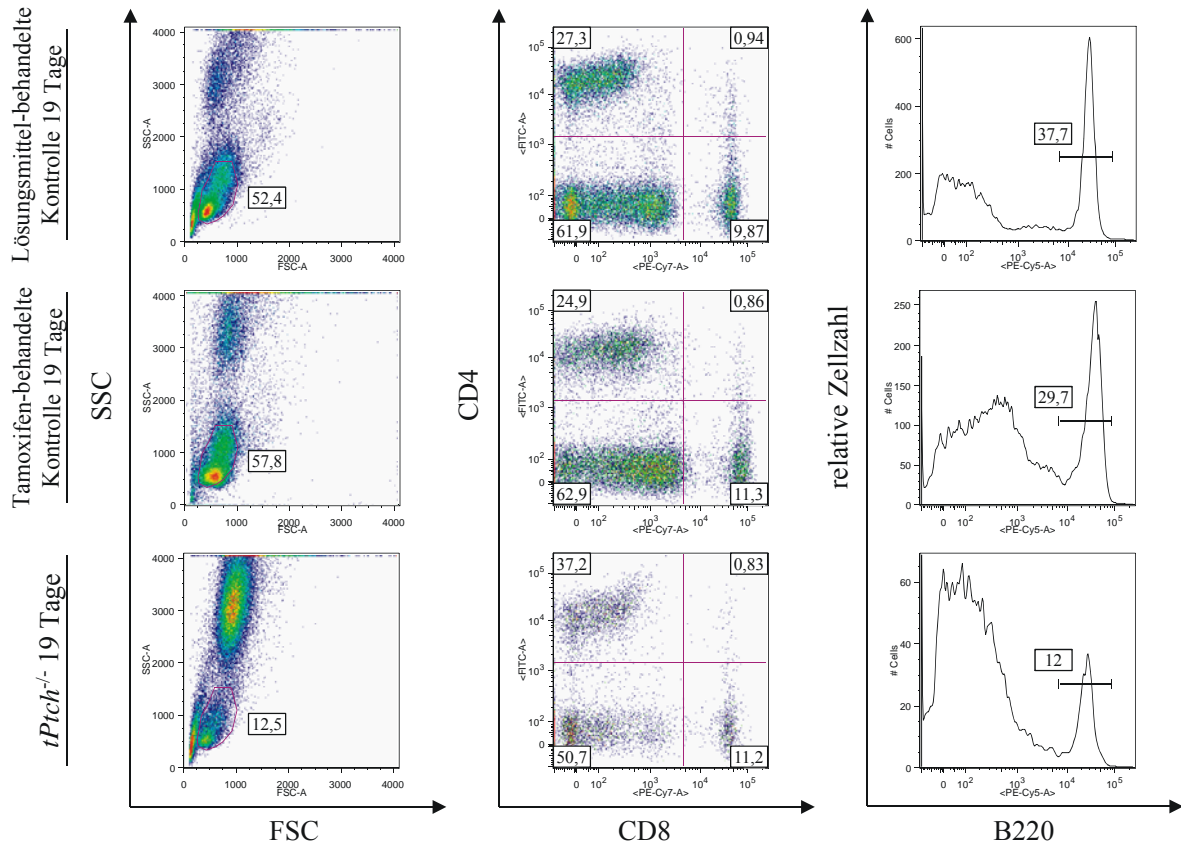


Abbildung 19: Reduktion der B- und T-Zellen im Blut von *Ptch*-defizienten Mäusen.

Zur Analyse der B- und T-Zellen im peripheren Blut von *tPch*^{-/-} Mäusen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe sowie Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren nach der ersten Injektion wurden in EDTA-Lösung aufgenommene Blutproben verwendet. Nach Inkubation des EDTA-Blutes mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine B220, CD4 und CD8 und anschließender Lyse der Erythrozyten wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Im SSC/FSC *dot plot* (links) wurde die B- und T-Zellen enthaltende Population ausgewählt und über die Expression von CD4 und CD8 die T-Zellen (Mitte) bzw. über die Expression von B220 die B-Zellen (Bilder rechts) identifiziert. Die relativen prozentualen Anteile der markierten Populationen sind in den Bildern angegeben. Die Abbildung entspricht einem repräsentativen Ergebnis von 5 unabhängigen Experimenten.

Als dritter Zelltyp der lymphoiden Linie differenzieren Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wie B- und T-Zellen aus gemeinsamen Vorläufern im Knochenmark (Rosmaraki *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum Menschen wurde für den Nachweis von murinen NK-Zellen bisher kein spezifisches Antigen identifiziert (Moretta und Moretta, 2004). Außerdem ist zu beachten, dass NK-Zellen auch Oberflächenproteine exprimieren, die in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern zur Charakterisierung von dendritischen Zellen sowie B- und T-Zellen verwendet werden. Zur Identifizierung von NK-Zellen aus den hier verwendeten Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund hat sich der Nachweis des Lektins NK1.1 (NKR-P1C, Ly55) in Kombination mit weiteren Markern bewährt (Kim *et al.*, 2000). In der Fraktion der NK1.1-positiven Zellen sind nicht ausschließlich NK-Zellen enthalten, da ein Teil der CD4⁺ T-Zellen ebenfalls NK1.1 exprimiert. Diese T-Zellen wurden daher zuvor über CD3-Markierung identifiziert und von den NK-Zellen separiert. Neben NK1.1 exprimieren reife NK-Zellen der adulten Maus die Integrine Mac-1 (CD11b, $\alpha_M\beta_2$) und DX5 ($\alpha_2\beta_1$) (Kim *et al.*, 2002; Lanier *et al.*, 1986). In der adulten Maus lassen sich NK-Zellen folglich als CD3⁻NK1.1⁺Mac-1⁺DX5⁺ eindeutig bestimmen.

Zuerst wurden die NK-Zellen im Blut von Ptch-defizienten Tieren analysiert. Im Vergleich zu Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrollen 19 Tage nach der ersten Injektion wurde dabei eine deutliche Abnahme der NK-Zellen nachgewiesen (Abbildung 20, Werte rechts). In den anschließenden Analysen der NK-Zell-Population in der Milz bestätigte sich dieses Ergebnis (Abbildung 21, Werte rechts).

Somit ist neben der vollständig zum Erliegen kommenden Lymphopoese der B- und T-Zellen auch die Entwicklung der NK-Zellen in Ptch-defizienten Tieren gestört.

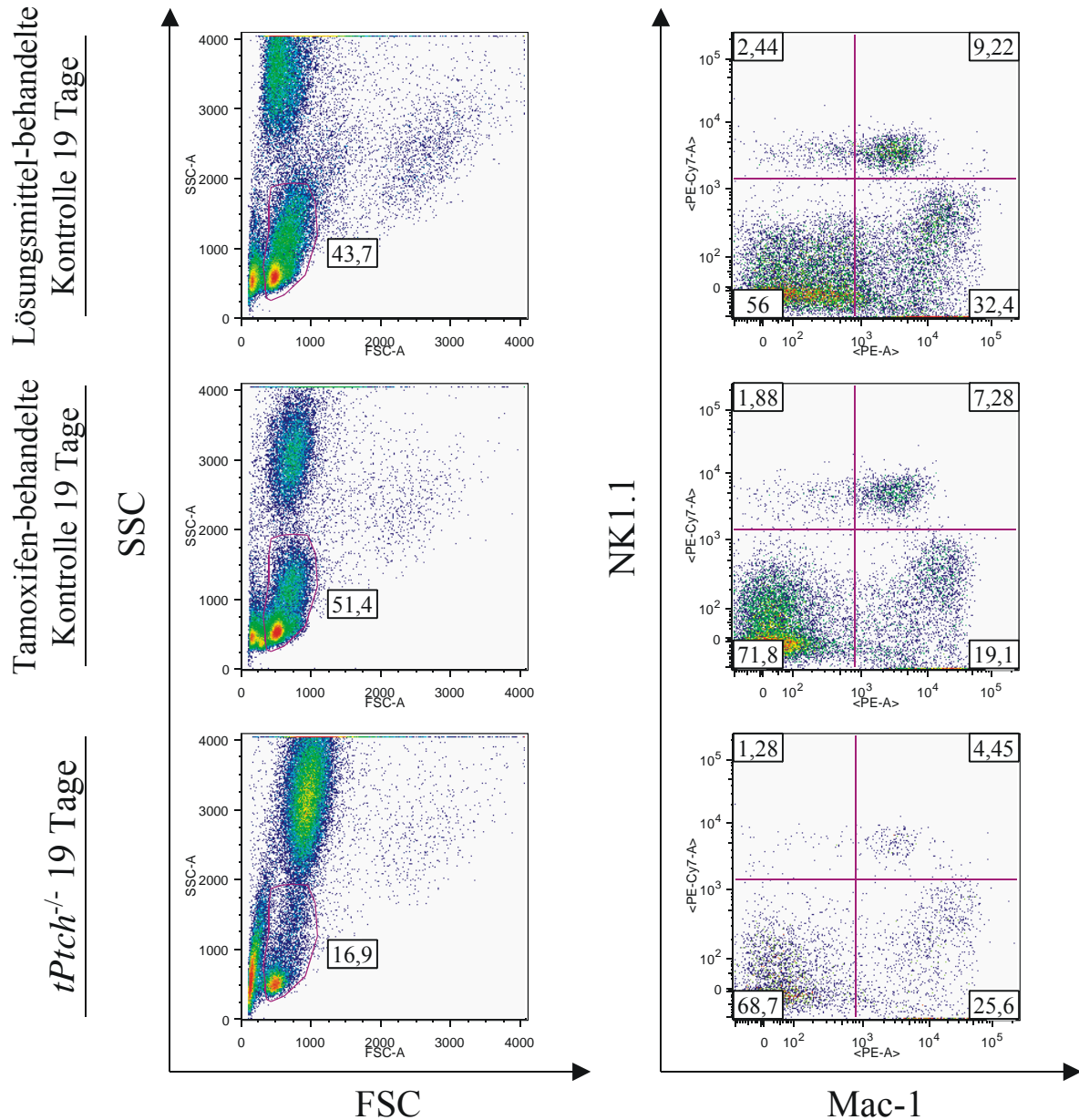


Abbildung 20: Reduktion der NK-Zellen im Blut von *tPtch*^{-/-} Mäusen.

Zur Analyse der NK-Zellen im Blut von *tPtch*^{-/-} Mäusen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe sowie Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren nach der ersten Injektion wurden die Blutproben in EDTA-Lösung aufgenommen. Die Proben wurden anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine CD3, NK1.1 und Mac-1 inkubiert und nach Lyse der Erythrozyten durchflusszytometrisch analysiert. Im SSC/FSC dot plot (links) wurde die B-, T- und NK-Zellen enthaltende Population ausgewählt. Die darin enthaltenen CD3-negativen Zellen wurden anschließend zur Bestimmung der NK-Zellen (CD3⁻NK1.1⁺Mac-1⁺) bezüglich der Expression von NK1.1 und Mac-1 analysiert. Die relativen prozentualen Anteile der markierten Populationen sind in den Bildern angegeben. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten.

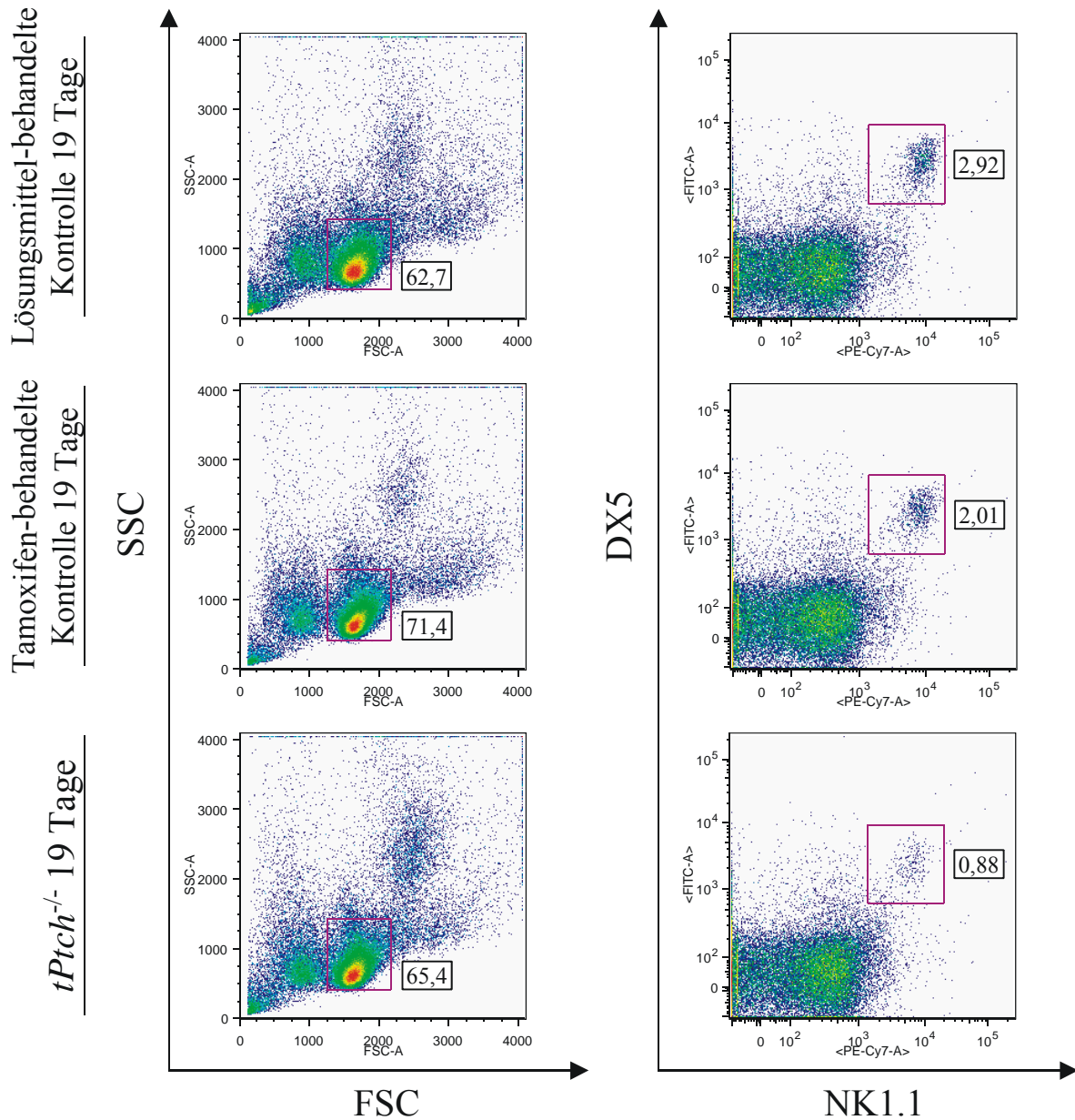


Abbildung 21: Reduktion der NK-Zellen in der Milz von *Ptch*-defizienten Mäusen.

Analyse der NK-Zellen in der Milz von Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren 19 Tage nach der ersten Injektion (oben und Mitte) und einer *tPtch*^{-/-} Maus 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (unten). Dazu wurden Einzelzellsuspensionen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine CD3, DX5 und NK1.1 inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Zunächst wurde im SSC/FSC *dot plot* die NK-Zellen enthaltende Population ausgewählt (links) und anschließend die CD3-negativen Zellen in einem weiteren *dot plot* über die Expressionsanalyse von DX5 und NK1.1 als NK-Zellen identifiziert (rechts). Die relativen prozentualen Anteile der NK-Zellen (DX5⁺NK1.1⁺) sind im DX5/NK1.1 *dot plot* in den markierten Feldern angegeben. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten.

5.7 Analyse der Hämatopoese im Knochenmark *Ptch*-defizienter Tiere

Im Knochenmark wird die Hämatopoese durch die sequentielle Expression von Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren gesteuert. Der Transkriptionsfaktor PU.1 ist an der Differenzierung von CMP und CLP aus HSC beteiligt (Iwasaki *et al.*, 2005), die zusätzliche Expression des Transkriptionsfaktors Ikaros begünstigt die Bildung von CLP (Smale und Dorshkind, 2006). Daran anschließend wird die Rezeptortyrosinkinase Flt3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) exprimiert. Der CLP ist darauffolgend durch die zusätzliche Expression der α -Kette des Interleukin-7 Rezeptors (IL-7R α) gekennzeichnet. In der murinen Hämatopoese ist die Aktivierung der über IL-7R vermittelten Signalkaskade für die weitere Differenzierung des CLP zu B-Zell-Vorläufern unerlässlich. Daran anschließend führt die Expression des frühen B-Zell-Transkriptionsfaktors EBF (*early B cell factor 1*) zur Expression von Rag-1/2 (*recombination activating gene 1/2*), wodurch die V(D)J-Rekombination initiiert wird. Für die weitere Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark ist der Transkriptionsfaktor Pax5 essentiell, dessen Expression ebenfalls von EBF reguliert wird (zur Übersicht: Busslinger, 2004).

Zur weiteren Definition des Defekts in der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark von *Ptch*-defizienten Tieren (Abschnitt 5.5) wurde das Expressionsmuster der beschriebenen Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren bestimmt. Zunächst wurde die Expression der frühen Transkriptionsfaktoren *PU.1* und *Ikaros* sowie der Rezeptortyrosinkinase *Flt3* mittels RT-PCR aus RNA von Gesamtknochenmark analysiert. Dabei zeigte die Expression dieser Transkripte in *Ptch*-defizienten Tieren keinen Unterschied zu Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu wurde eine deutlich reduzierte Expression von *IL-7R α* , *EBF*, *Rag-1*, *Rag-2* und *Pax5* nachgewiesen (Abbildung 22). Sowohl *IL-7R α* als auch *EBF*, *Rag-1*, *Rag-2* und *Pax5* sind für die Regulation der Differenzierungsprozesse der frühen B-Zell-Entwicklung im Knochenmark adulter Tiere essentiell. Anhand dieser Daten lässt sich in Kombination mit den zuvor durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnissen der postulierte Block in der frühen Entwicklung der B-Zellen bestätigen. Außerdem impliziert die reduzierte Expression von *IL-7R α* , dass der CLP als Ursprung aller Zellen der lymphoiden Linie direkt betroffen ist und für dessen Bildung die Expression von *Ptch* essentiell ist.

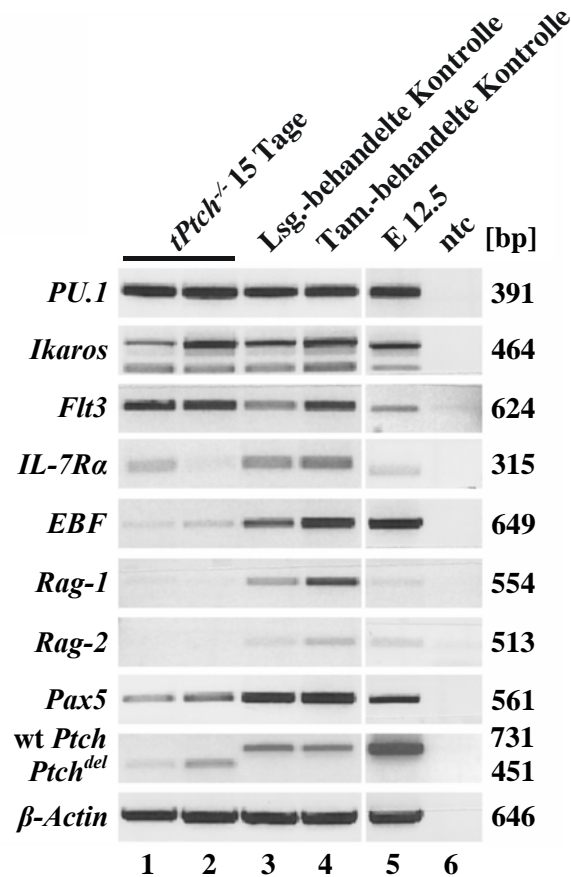


Abbildung 22: Die Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier führt im Knochenmark zum Verlust der Expression essentieller Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren der B-Zell-Entwicklung.

RNA aus dem Knochenmark von zwei *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (Spur 1 und 2) und von jeweils einem Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltier 15 Tage nach der ersten Injektion (Spur 3 und 4) wurde zur Expressionsanalyse mittels RT-PCR verwendet. Als Positivkontrolle für die jeweilige PCR wurde cDNA aus embryonaler RNA (E 12.5, der Embryo wurde 12,5 Tage nach der Kopulation entnommen) als Matrize verwendet (Spur 5). Bei der Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA ddH₂O verwendet (ntc, *no template control*) (Spur 6). Die verwendeten Oligonukleotidpaare sind in Tabelle 2 (4. Material und Methoden) aufgeführt und die amplifizierten Gentranskripte im Text beschrieben. Neben der Expressionsanalyse der aufgeführten für die Hämatopoiese relevanten Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren wurde auch der *Ptch* Locus analysiert. Der Nachweis von *Ptch^{del}* Transkripten in der RT-PCR-Analyse zeigt die effiziente Rekombination am *Ptch* Locus im Knochenmark von *tPtch*^{-/-} Tieren 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe. Zur Überprüfung der eingesetzten cDNA wurden *β-Aktin* Transkripte amplifiziert.

Zur weiteren Definition des postulierten CLP-Defekts im Knochenmark von *Ptch*-defizienten Tieren wurde die Fraktion der Stamm- und Vorläuferzellen isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Sowohl HSC als auch die Vorläufer der lymphoiden und myeloiden Linie exprimieren keine linienspezifischen Oberflächenproteine und werden folglich unter dem Oberbegriff *lineage*-negative Zellen (Lin^-) zusammengefasst. Die Aufreinigung der Lin^- Zellen des Knochenmarks erfolgte vor der FACS-Analyse durch Negativselektion unter Verwendung von Antikörpern (monoklonale Antikörper gegen folgende Mausantigene: CD5, CD11b/Mac-1, CD45R/B220, Ly-6G/Gr-1, TER119 und 7-4), die gegen Oberflächenproteine der liniendeterminierten hämatopoietischen Zellen gerichtet sind.

In der durchflusszytometrischen Analyse wurden im SSC/FSC *dot plot* in der Fraktion der kleinen, nicht-granulären Lin^- Knochenmarkszellen sowohl die HSC als auch die Vorläuferzellen der lymphoiden und myeloiden Linie erhalten (Abbildung 23, links) (Porse *et al.*, 2005). Die weitere Differenzierung der verschiedenen Populationen der Stamm- und Vorläuferzellen Lin^- Knochenmarkszellen erfolgte durch die Expressionsanalyse der Rezeptortyrosinkinase c-Kit (Genprodukt des *c-Kit* Proto-Oncogens, CD117) und Sca-1 (*stem cell antigen-1*, auch als *lymphocyte antigen 6 complex, locus A/E*, Ly6A/E bezeichnet). Für die in einer Fraktion erfassten HSC und MPP ist eine simultan hohe Expression von c-Kit und Sca-1 charakteristisch ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{high}} \text{Sca-1}^{\text{high}}$, Abbildung 23, Fraktion III). Die anschließende Differenzierung zu den Vorläuferzellen der myeloiden und lymphoiden Linie ist mit dem nahezu vollständigen Verlust der Expression von Sca-1 verbunden. Die Fraktion der CLP ist außerdem durch eine Reduktion der Expression von c-Kit gekennzeichnet ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{low}} \text{Sca-1}^{-/\text{low}}$, Abbildung 23, Fraktion II), wohingegen die Vorläufer der myeloiden Linie (MEP und GMP) weiterhin eine hohe Expression von c-Kit aufweisen ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{high}} \text{Sca-1}^{-/\text{low}}$, Abbildung 23, Fraktion I) (Katayama *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 1992; zur Übersicht: Metcalf, 1999). Außerdem sind die CLP in Fraktion II durch die zusätzliche Expression von IL-7Ra charakterisiert (Kondo *et al.*, 1997).

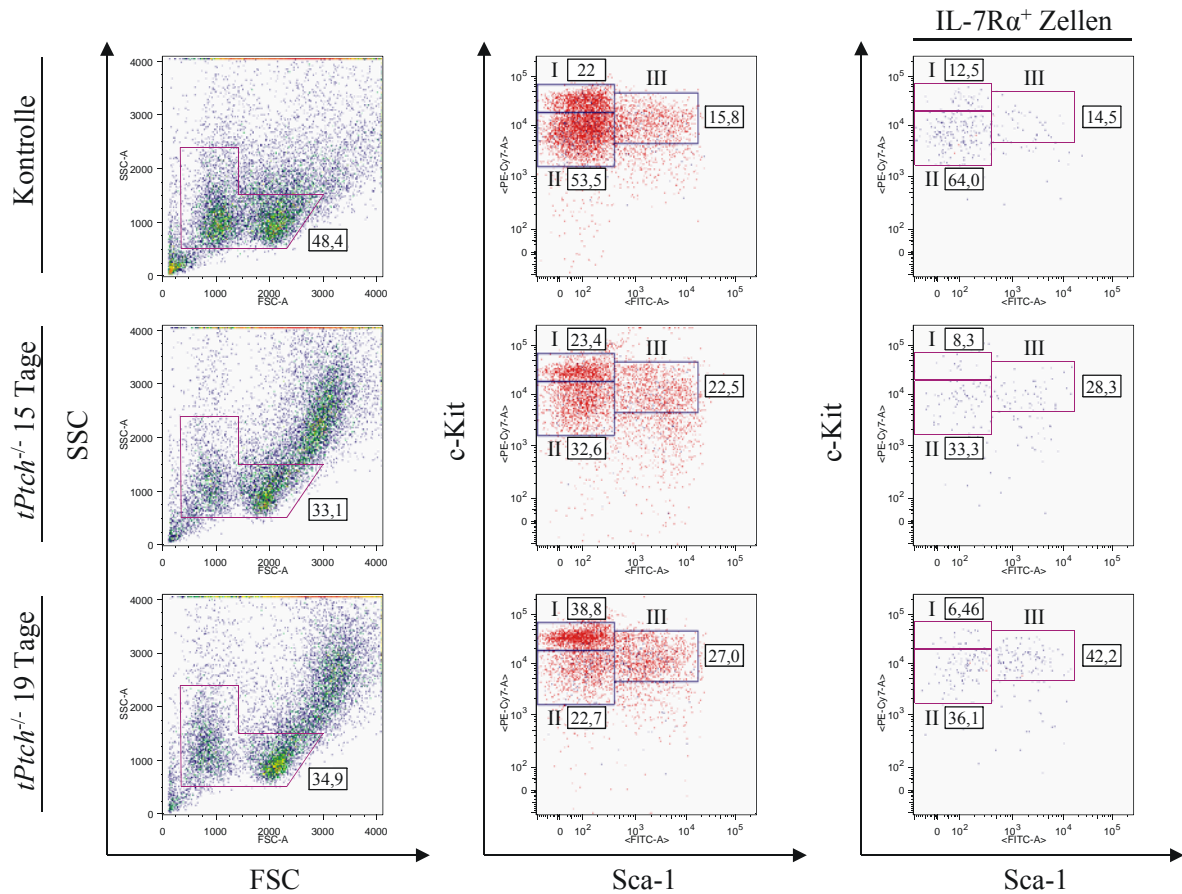


Abbildung 23: Differenzierungsdefekt der lymphoiden Linie im CLP-Stadium des Knochenmarks von *Ptch*-defizienten Mäusen.

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden Lin^- Knochenmarkszellen von *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 Tage (Mitte) und 19 Tage (unten) nach der ersten Tamoxifengabe sowie von einem Lösungsmittel-behandelten Kontrolltier 19 Tage nach der ersten Injektion (oben) verwendet. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine c-Kit, Sca-1 und IL7-R α inkubiert. Die Lin^- Knochenmarkszellen wurden zunächst im SSC/FSC *dot plot* dargestellt (links). Die im SSC/FSC *dot plot* der Lin^- Knochenmarkszellen identifizierte Population der kleinen, nicht-granulären Zellen (Porse *et al.*, 2005) wurde zur weiteren Charakterisierung im c-Kit/Sca-1 *dot plot* analysiert (Mitte und rechts). In rot sind alle Lin^- Knochenmarkszellen dargestellt (Mitte), zusätzlich sind die IL-7R α ⁺-Zellen in blau gekennzeichnet (Mitte und rechts). Fraktion I entspricht den Vorläufern der myeloiden Linie ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{high}} \text{Sca-1}^{-/\text{low}}$), Fraktion II enthält die CLP-Population ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{low}} \text{Sca-1}^{-/\text{low}}$) und Fraktion III entspricht den HSC und MPP ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^{\text{high}} \text{Sca-1}^{\text{high}}$). Die relativen prozentualen Anteile der markierten Populationen sind in den Bildern angegeben. Die abgebildeten Daten entsprechen einem repräsentativen Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten.

Die durchflusszytometrische Analyse von Lin⁻ Knochenmarkszellen zeigte, dass bei *Ptch*-defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren sowohl die HSC/MPP-enhaltende Fraktion III (Lin⁻c-Kit^{high}Sca-1^{high}) als auch die Fraktion I der myeloiden Vorläufer (Lin⁻c-Kit^{high}Sca-1^{-/low}) in der relativen Zahl überrepräsentiert war (Abbildung 23, Mitte). Im Gegensatz dazu wurde eine deutliche Abnahme der durch eine geringe Expression von c-Kit und Sca-1 gekennzeichneten Fraktion II (Lin⁻c-Kit^{low}Sca-1^{-/low}) detektiert, in der die CLP enthalten sind. Durch die zusätzliche Analyse der Expression von IL-7R α konnte gezeigt werden, dass der fortschreitende Verlust der Fraktion II (Abbildung 23, Mitte) mit der Abnahme der Anzahl der CLP korreliert (Abbildung 23, rechts). Auf Basis dieser Daten kann geschlossen werden, dass durch die Inaktivierung von *Ptch* ein Differenzierungsblock der frühen Vorläuferzellen der lymphoiden Linie induziert wird und das Entwicklungsstadium des CLP direkt betroffen ist. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass sich die Vorläuferzellen der myeloiden Linie in *Ptch*-defizienten Tieren bis 19 Tage nach der Induktion uneingeschränkt entwickeln.

Wie bereits bei den Analysen zuvor wurde auch bei der Charakterisierung von Lin⁻ Knochenmarkszellen zu allen Experimenten Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelte Kontrolltiere mitgeführt. Dies ist besonders für die CLP (Fraktion II) essentiell, da dieses Zellstadium die unmittelbare Vorstufe der folgenden liniendeterminierten Zellstadien der B-Zellen im Knochenmark repräsentiert, für die im Rahmen dieser Arbeit ein negativer Effekt von Tamoxifen identifiziert wurde. Im Gegensatz zu den Populationen der B-Zellen in Knochenmark und Milz konnte aber für die direkten Vorläuferzellen in Fraktion II kein Einfluss von Tamoxifen auf diese Fraktion festgestellt werden (Abbildung 24 und 25). Dies gilt sowohl für die beiden Analysezeitpunkte 15 und 19 Tage als auch für die separat anhand der Expressionsanalyse von IL-7R α dargestellten CLP. Außerdem wurde in sämtlichen Analysen kein Effekt von Lösungsmittel oder Tamoxifen in Kombination mit einer aktiven Cre-Rekombinase auf die Fraktion III mit den HSC und MPP sowie der Fraktion I der myeloiden Vorläuferzellen detektiert.

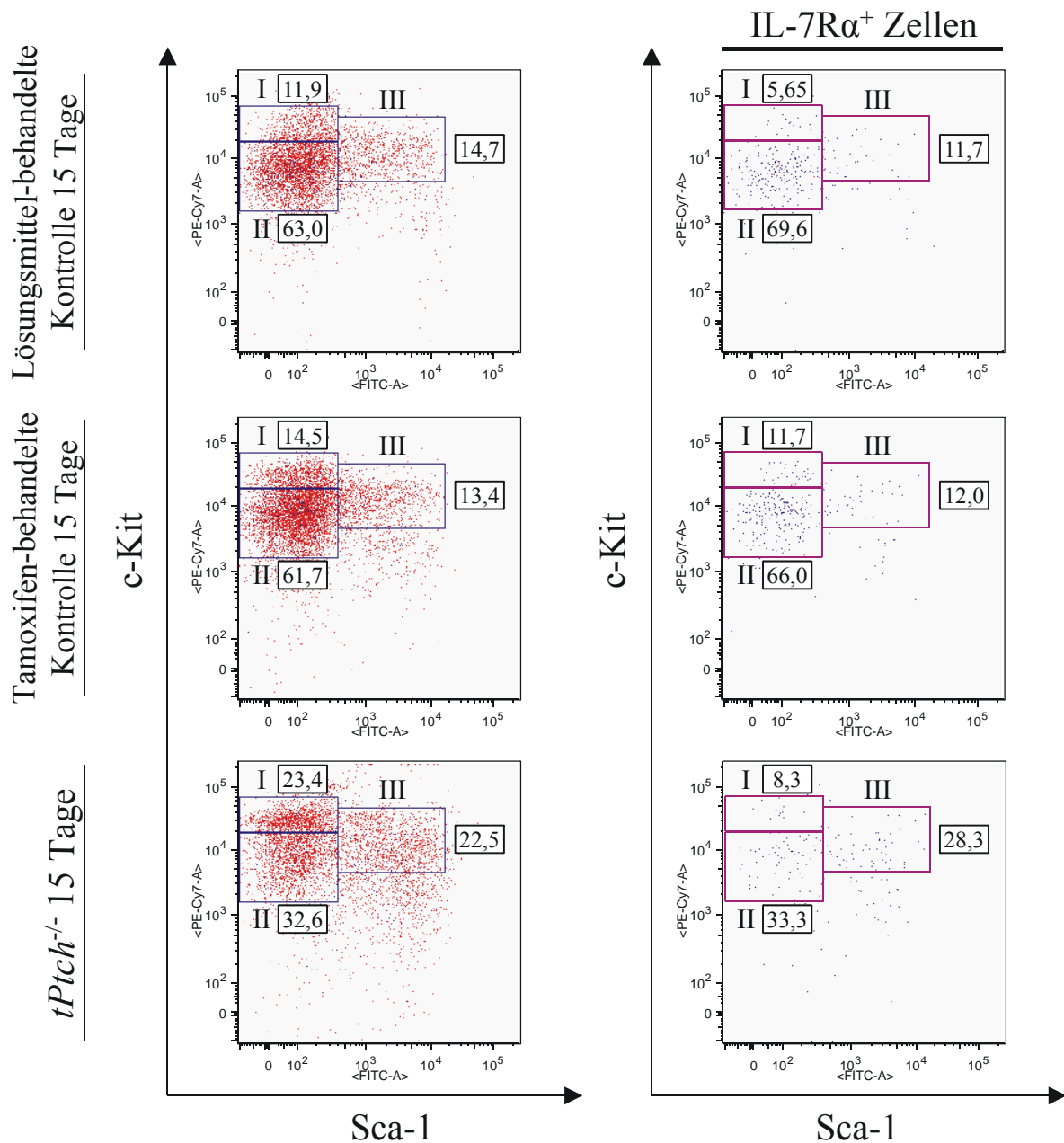


Abbildung 24: Die Fraktionen Lin⁻ Knochenmarkszellen von Kontrolltieren sind 15 Tage nach der ersten Injektion unverändert.

Die Lin⁻ Knochenmarkszellen von *tPtch*^{-/-} Mäusen 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe sowie von Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelte Kontrolltieren 15 Tage nach der ersten Injektion wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen c-Kit, Sca-1 und IL-7Rα inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die im SSC/FSC dot plot identifizierten Populationen der Vorläufer wurden anhand der Expression von c-Kit und Sca-1 charakterisiert. Die gesamten Lin⁻ Knochenmarkszellen sind rot dargestellt (links), die IL-7Rα⁺-Zellen zusätzlich in blau (links und rechts). Fraktion I enthält die Vorläufer der myeloiden Linie (Lin⁻c-Kit^{high}Sca-1^{-low}), Fraktion II die CLP-Population (Lin⁻c-Kit^{low}Sca-1^{-low}) und Fraktion III entspricht den HSC und MPP (Lin⁻c-Kit^{high}Sca-1^{high}). Die relativen prozentualen Anteile der markierten Populationen sind in den Bildern angegeben. Die abgebildeten Daten entsprechen einem repräsentativen Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten.

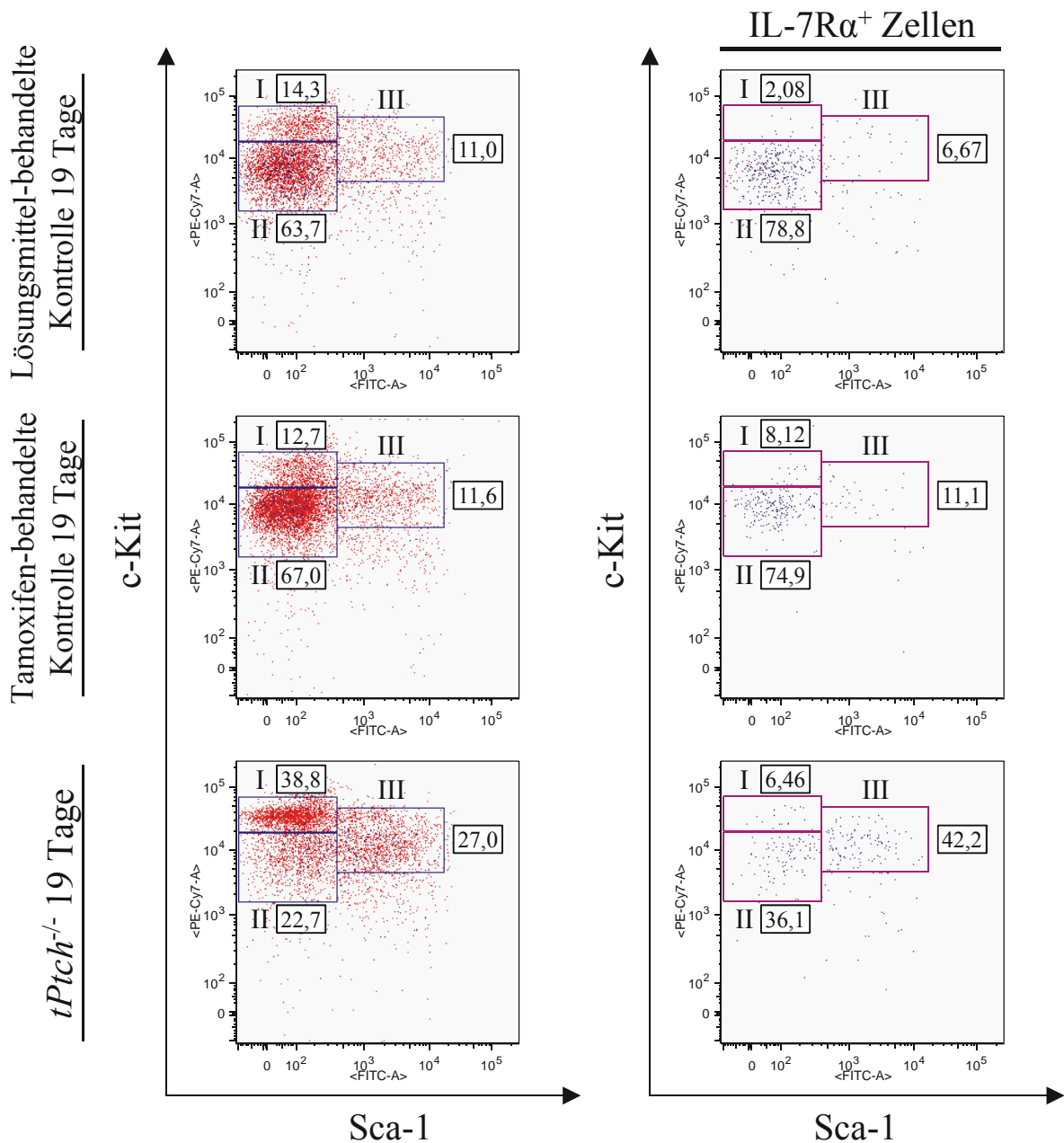


Abbildung 25: Die Fraktionen Lin⁻ Knochenmarkszellen von Kontrolltieren sind 19 Tage nach der ersten Injektion unverändert.

Lin⁻ Knochenmarkszellen von *tPtch*^{-/-} Mäusen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe sowie von Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelte Kontrolltieren 19 Tage nach der ersten Injektion wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen c-Kit, Sca-1 und IL-7Rα inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die im SSC/FSC dot plot identifizierten Populationen der Vorläufer wurden anhand der Expression von c-Kit und Sca-1 charakterisiert. Die gesamten Lin⁻ Knochenmarkszellen sind rot dargestellt (links), die IL-7Rα⁺-Zellen zusätzlich in blau (links und rechts). Fraktion I enthält die Vorläufer der myeloiden Linie (Lin⁻c-Kit^{high}Sca-1^{low}), Fraktion II die CLP-Population (Lin⁻c-Kit^{low}Sca-1^{low}) und Fraktion III entspricht den HSC und MPP (Lin⁻c-Kit^{high}Sca-1^{high}). Die relativen prozentualen Anteile der markierten Populationen sind in den Bildern angegeben. Die abgebildeten Daten entsprechen einem repräsentativen Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten.

5.8 Expressionsanalyse essentieller Regulatoren der lymphoiden Linie in Lin⁻ Knochenmarkszellen Ptch-defizienter Tiere

Anhand der durchflusszytometrischen Analyse von Lin⁻ Knochenmarkszellen konnte gezeigt werden, dass durch Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier die Entwicklung des CLP als zentrales Ausgangsstadium aller folgenden Zellstadien der lymphoiden Linie direkt betroffen ist. Zur weiteren Bestätigung des Defekts in den frühen Stadien der Hämatopoiese wurden die Lin⁻ Knochenmarkszellen mittels RT-PCR bezüglich der Expression der Transkriptionsfaktoren *PU.1*, *Ikaros* und *EBF* und der Rekombinasen *Rag-1* und *Rag-2* sowie der Rezeptoren *Flt3* und *IL-7R α* analysiert. Für die frühe B-Zell-Entwicklung im Knochenmark ist die koordinierte Expression der Transkriptionsfaktoren *PU.1*, *Ikaros*, *EBF*, *E2A* und *Pax5* unabdingbar (zur Übersicht: O’Riordan und Grosschedl, 2000). Der in allen Lin⁻ Knochenmarkszellen exprimierte Transkriptionsfaktor *PU.1* reguliert die initiale hämatopoietische Entwicklung und ist für die Differenzierung der HSC zu Vorläuferzellen der lymphoiden als auch der myeloiden Linie essentiell (Iwasaki *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1997). Zur Bildung der Vorläufer der myeloiden Linie aus HSC wird eine hohe Expression von *PU.1* benötigt. Das Zellstadium des GMP ist direkt dadurch gekennzeichnet. Im Vergleich dazu exprimiert der CLP als allgemeiner Vorläufer der lymphoiden Linie nur ein geringes Maß an *PU.1* (Akashi *et al.*, 2000; Iwasaki *et al.*, 2005; zur Übersicht: Dahl und Simon, 2003; Laiosa *et al.*, 2006).

Bei der Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors *PU.1* zeigte sich 19 Tage nach der initialen Induktion der *Ptch*-Deletion kein Unterschied in Lin⁻ Knochenmarkszellen von *Ptch*-defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 26). Somit wird auch in *Ptch*-defizienten Lin⁻ Knochenmarkszellen *PU.1* als initialer Transkriptionsfaktor der Hämatopoiese für die lymphoide und myeloide Linie exprimiert. Neben *PU.1* wird auch der Transkriptionsfaktor *Ikaros* bereits in HSC exprimiert. *Ikaros* ist für die Differenzierung zum CLP und die anschließende B-Zell-Entwicklung essentiell. Beim Verlust einer der beiden Transkriptionsfaktoren ist die von hämatopoietischen Vorläuferzellen im Knochenmark ausgehende Differenzierung zu B-Zellen blockiert (Georgopoulos *et al.*, 1994; McKercher *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996). Im Vergleich zur unveränderten Expression von *PU.1* wurde in *Ptch*-defizienten Tieren eine stark verminderte Expression von *Ikaros* detektiert. Neben den Transkriptionsfaktoren *PU.1* und *Ikaros* ist anschließend die Expression des Transkriptionsfaktors *EBF* für die Entwicklung der lymphoiden Linie in Richtung B-Lymphozyten notwendig. In Lin⁻

Knochenmarkszellen von *Ptch*-defizienten Tieren wurden keine Transkripte von *EBF* nachgewiesen (Abbildung 26).

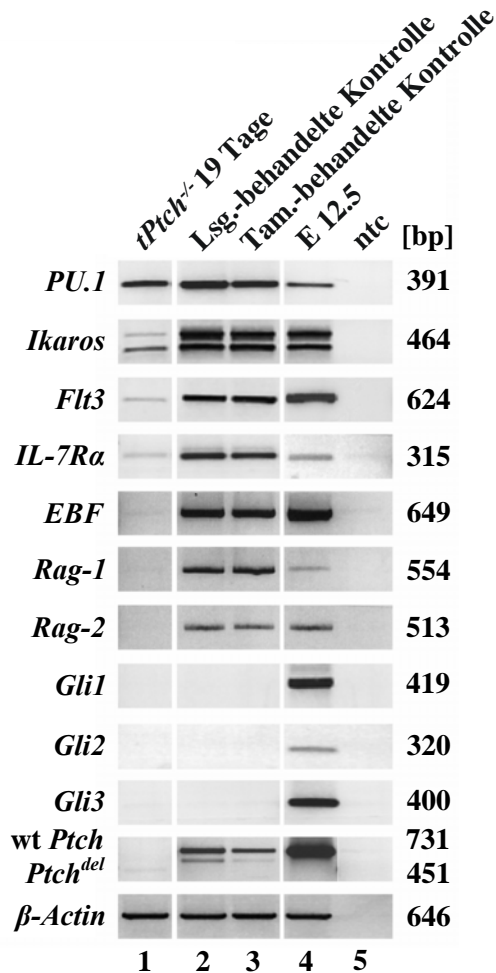


Abbildung 26: Die Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier führt in Lin^- Knochenmarkszellen zum Verlust der Expression essentieller Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren der lymphoiden Linie.

RNA aus Lin^- Knochenmarkszellen von *tPtch*^{-/-} Mäusen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (Spur 1) sowie Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren 19 Tage nach der ersten Injektion (Spur 2 und 3) wurde zur Expressionsanalyse mittels RT-PCR verwendet. Als Positivkontrolle für die jeweilige RT-PCR wurde cDNA aus embryonaler RNA (E 12.5, der Embryo wurde 12,5 Tage nach der Kopulation entnommen) als Matrize verwendet (Spur 4). Bei der Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA ddH₂O verwendet (*ntc*, *no template control*) (Spur 5). Die verwendeten Oligonukleotidpaare sind in Tabelle 2 (4. Material und Methoden) aufgeführt und die amplifizierten Transkripte im Text beschrieben. Neben der Expressionsanalyse der aufgeführten für die Hämatopoiese relevanten Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren wurde auch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren des Shh-Signalwegs *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* analysiert. Der Nachweis von *Ptch*^{del} Transkripten in der RT-PCR-Analyse zeigt die effiziente Rekombination am *Ptch* Locus in *tPtch*^{-/-} Tieren 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe. Zur Überprüfung der eingesetzten cDNA wurden *β-Aktin* Transkripte amplifiziert.

Neben der Expression von Transkriptionsfaktoren wie *PU.1*, *Ikaros* und *EBF* ist auch die Stimulation lymphoider Vorläufer mit Cytokinen für deren Erhalt und Differenzierung notwendig. Für die Entwicklung der B- und T-Zellen sind neben anderen Cytokinen besonders der Flt3-Ligand (Flt3L) und IL-7 essentiell (Baird *et al.*, 1999; zur Übersicht: Di Santo und Rodewald, 1998). Die Expression der Rezeptortyrosinkinase Flt3 führt zur schnellen Differenzierung von MPP und den nachfolgenden Zellstadien der B- und T-Zell-Linie. In Flt3- und Flt3L-defizienten Mäusen ist die Population der CLP deutlich reduziert, wohingegen HSC und CMP unvermindert vorliegen. Folglich ist Flt3 und sein Ligand für die Bildung und den Erhalt des CLP essentiell (Adolfsson *et al.*, 2001; Mackarechtschian *et al.*, 1995; Sitnicka *et al.*, 2002). In *Ptch*-defizienten Tieren ist die Transkription von *Flt3* im Vergleich zu Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren 19 Tage nach der ersten Injektion drastisch reduziert. Parallel zu der Expression von *Flt3* sind auch nahezu keine Transkripte von *IL-7Ra* nachweisbar (Abbildung 26). Beide Cytokinrezeptoren sind für die Bildung und den Erhalt von CLP und die sich daraus initial ableitende Entwicklung der B-Lymphozyten unabkömmlich (Kondo *et al.*, 1997; Sitnicka *et al.*, 2003). Der CLP ist außerdem das erste Zellstadium im Knochenmark, in dem die Aktivität von V(D)J-Rekombinasen nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu ist in den Vorläuferzellen der myeloiden Linie keine V(D)J-Rekombinase aktiv (Borghesi *et al.*, 2004). In Lin^{-} Knochenmarkszellen von *Ptch*-defizienten Tieren sind 19 Tage nach Induktion der *Ptch*-Deletion keine Transkripte der V(D)J-Rekombinasen Rag-1 und Rag-2 nachweisbar.

Zusammengenommen belegt die Expressionsanalyse CLP-essentieller Transkriptionsfaktoren und Cytokinrezeptoren, dass in *Ptch*-defizienten Tieren die Lymphopoiese blockiert ist. In Kombination mit den zuvor durchflusszytometrisch gewonnenen Daten konnte dadurch der CLP als das durch *Ptch*-Defizienz betroffene Zellstadium identifiziert werden. Somit führt die Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier zum Block der Hämatopoiese in Richtung der Generierung des CLP. Dadurch konnte im Rahmen dieser Arbeit der Hedgehog-Rezeptor *Ptch* als ein essentielles Schaltelement in Richtung der lymphoiden Linie der Hämatopoiese identifiziert werden. Weiter lässt sich aus den bisherigen Daten ableiten, dass *Ptch* für die Differenzierung zwischen lymphoider und myeloider Linie notwendig ist.

Im Rahmen der Expressionsanalyse Lin⁻ Knochenmarkszellen wurde auch die Expression von *Ptch* kontrolliert. Dabei konnte wie erwartet nach Induktion der *Ptch*-Deletion kein Transkript für den wildtypischen *Ptch*-Genlocus nachgewiesen werden (Abbildung 26). Der Verlust von funktionellem *Ptch* entspricht der Aktivierung der Shh/*Ptch*-Signalkaskade und resultiert in erhöhter Transkription von *Gli* (Dahmane *et al.*, 1997; Xuan, 2006; zur Übersicht: Ruiz i Altaba, 2002; Wetmore, 2003). Sowohl in Lin⁻ Knochenmarkszellen von *Ptch*-defizienten Tieren als auch von Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren wurde keine Expression der drei *Gli*-Transkriptionsfaktoren *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* nachgewiesen (Abbildung 26). Der Verlust von *Ptch* in Lin⁻ Knochenmarkszellen führt nicht zur Aktivierung der klassischen Shh/*Ptch*-Signalkaskade (Abbildung 5). Auch in Anwesenheit von *Ptch* in den Kontrolltieren ist der klassische Shh/*Ptch*-Signalweg in diesen Zellen nicht aktiv. Es lässt sich somit neben der bekannten Rolle von *Ptch* in der Shh/*Ptch*-Signalkaskade eine weitere Funktion dieses Rezeptors in einem alternativen Signalweg vermuten.

5.9 Analyse der Zellzyklusprogression von Lin⁻ Knochenmarkszellen *Ptch*-defizienter Tiere

Neben dem Einfluss der *Ptch*-Defizienz auf die Differenzierung der Vorläuferzellen im Knochenmark in Richtung der Generierung des CLP ist auch eine veränderte Zellzyklusprogression denkbar. Der Verlust der Differenzierungskapazität der lymphoiden Linie könnte zumindest teilweise dadurch begründet sein. Die Zellzyklusprogression der Zellen lässt sich anhand der Inkorporation des Thymidinanalogons 5-Brom-2'-Deoxy-Uridin (BrdU) in neu synthetisierte DNA beim Übergang von der G₀/G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus verfolgen (Dean *et al.*, 1984; Miltenburger *et al.*, 1987; Sasaki *et al.*, 1989). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode nun mit der Analyse der einzelnen Fraktionen Lin⁻ Knochenmarkszellen kombiniert. Zur Bestimmung der Zellzyklusprogression *in vivo* wurde den Tieren zunächst 1 mg BrdU intraperitoneal injiziert und exakt nach 3 Stunden die Lin⁻ Knochenmarkszellen isoliert. Die Zellen wurden anschließend intrazellulär zur Darstellung des inkorporierten BrdU mit fluoreszenzmarkiertem anti-BrdU und zur Analyse der Gesamt-DNA mit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) inkubiert. Zur Charakterisierung der einzelnen Zellfraktionen der Lin⁻ Knochenmarkszellen wurden die Zellen außerdem mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen c-Kit und Sca-1 angefärbt. Bei der Analyse der BrdU-Inkorporation

wurde bei *Ptch*-defizienten Tieren anhand der Reduktion der S-Phasen im Gegensatz zu Kontrolltieren eine verringerte Zellzyklusprogression für die Gesamtheit Lin^- Knochenmarkszellen detektiert (Abbildung 27).

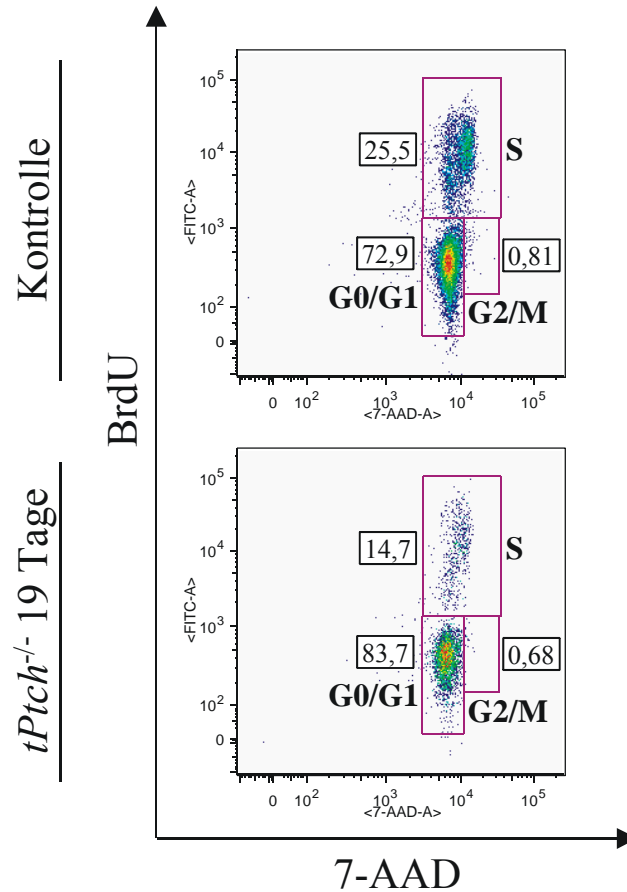


Abbildung 27: Reduktion der Zellzyklusprogression in Lin^- Knochenmarkszellen von *Ptch*-defizienten Mäusen.

Zuerst wurde *tPtch*^{-/-} Mäusen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe und Kontrolltieren 1 mg des Thymidinanalogs 5-Brom-2'-Desoxy-Uridin (BrdU) intraperitoneal injiziert. 3 Stunden nach der Injektion wurden die Lin^- Knochenmarkszellen isoliert und extrazellulär mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen c-Kit und Sca-1 sowie intrazellulär mit einem gegen BrdU gerichteten fluoreszenzmarkierten Antikörper und 7-AAD inkubiert. Im BrdU/7-AAD dot plot sind die verschiedenen Stadien des Zellzyklus markiert. Es werden in den Fraktionen die G0/G1-Phase (Ruhephase (G0) und postmitotische Phase oder Präsynthesephase (G1)) von der S-Phase (Synthesephase) und der G2/M-Phase (prämitotische Phase oder Postsynthesephase (G2) und Mitosephase (M)) unterschieden. Die relativen prozentualen Anteile der Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus sind in den Bildern angegeben.

Bei der weiteren Analyse der Populationen der Vorläuferzellen zeigte sich aber, dass nicht alle Fraktionen gleichermaßen betroffen sind. Eine Reduktion der S-Phasen wurde in der Fraktion der HSC/MPP detektiert (Abbildung 28, links). Diese Vorläuferzellen können sowohl zur weiteren Entwicklung der lymphoiden als auch myeloiden Linie beitragen. Bei

den sich aus der HSC/MPP-Fraktion entwickelnden liniendeterminierten Fraktionen zeigte sich nur bei der CLP-Fraktion eine deutliche Reduktion der S-Phasen in *Ptch*-defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 28, Mitte). Im Gegensatz dazu war die Proliferationsrate der myeloiden Linie nahezu unverändert (Abbildung 28, rechts). Somit wurde durch die Analyse der Zellzyklusprogression bestätigt, dass die *Ptch*-Defizienz im adulten Tier mit einem Differenzierungsdefekt der lymphoiden Linie assoziiert ist, wohingegen sich die Zellen der myeloiden Linie unverändert entwickeln.

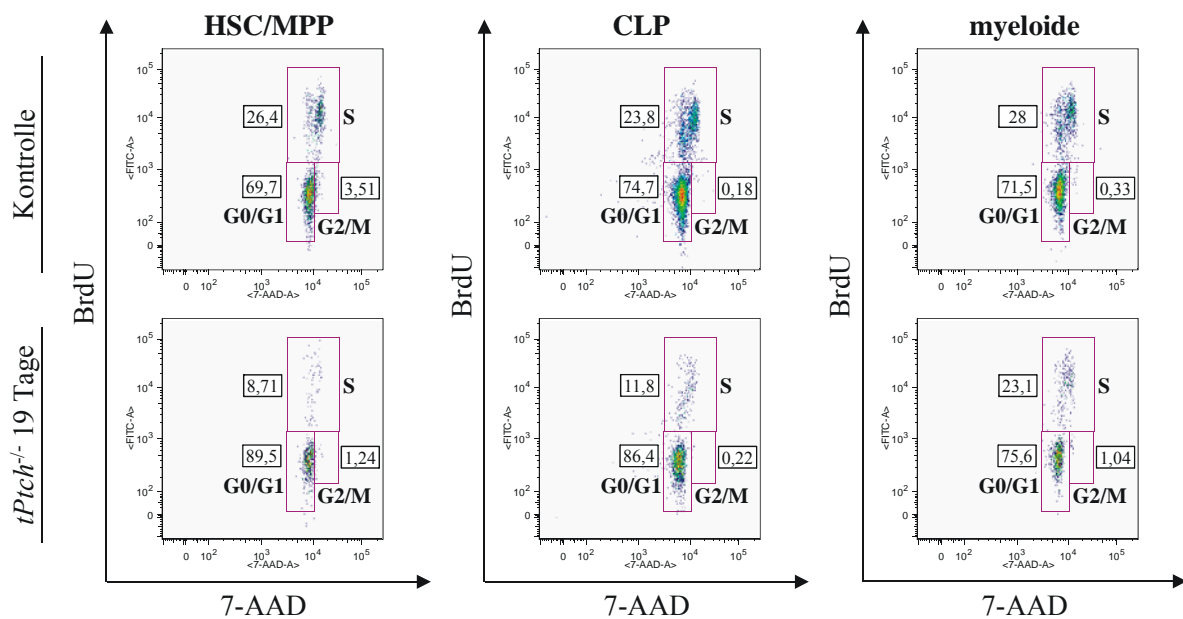


Abbildung 28: Die Inaktivierung von *Ptch* führt zu einer reduzierten Zellzyklusprogression der für die lymphoide Linie determinierten CLP-Fraktion.

Zuerst wurde *tPtch*^{-/-} Mäusen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe und entsprechenden Kontrolltieren 1 mg des Thymidinanalogs 5-Brom-2'-Desoxy-Uridin (BrdU) intraperitoneal injiziert. 3 Stunden nach der Injektion wurden die Lin⁻ Knochenmarkszellen isoliert und extrazellulär mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen c-Kit und Sca-1 sowie intrazellulär mit einem gegen BrdU gerichteten fluoreszenzmarkierten Antikörper und 7-AAD inkubiert. Anhand der Expression von c-Kit und Sca-1 wurden die HSC/MPP-Fraktion (Lin⁻c-Kit^{high}Sca-1^{high}), die CLP-Fraktion (Lin⁻c-Kit^{low}Sca-1^{low}) sowie die Fraktion mit den Vorläufern der myeloiden Linie (Lin⁻c-Kit^{high}Sca-1^{low}) identifiziert (zur Erläuterung siehe Abbildung 23). Im BrdU/7-AAD dot plot sind die verschiedenen Stadien des Zellzyklus markiert. Es werden in den Fraktionen die G0/G1-Phase (Ruhephase (G0) und postmitotische Phase oder Präsynthesephase (G1)) von der S-Phase (Synthesephase (S)) und der G2/M-Phase (prämitotische Phase oder Postsynthesephase (G₂) und Mitosephase (M)) unterschieden. Die relativen prozentualen Anteile der Phasen sind in den Bildern angegeben.

5.10 Analyse des Differenzierungspotentials der koloniebildenden Einheiten (*colony-forming unit*, CFU) von Lin⁻ Knochenmarkszellen

Die bisherigen Resultate haben gezeigt, dass die Entwicklung des CLP bzw. der Zellen der lymphoiden Linie in *Ptch*-defizienten Tieren blockiert ist. Demgegenüber konnte bisher kein Hinweis auf eine gestörte Entwicklung der Zellen der myeloiden Linie erhalten werden. Um diesen Befund zu überprüfen wurde das Differenzierungspotential der myeloiden Vorläuferzellen in Lin⁻ Knochenmarkszellen bezüglich ihrer koloniebildenden Aktivität analysiert. Dies erfolgte *in vitro* durch Auszählung der sich aus einzelnen Vorläuferzellen entwickelnden koloniebildenden Einheiten (*colony-forming unit*, CFU). Dazu wurden Lin⁻ Knochenmarkszellen in einer Methylzellulose-Matrix mit SCF (*stem cell factor*), IL-3, IL-6 und Erythropoietin ausgesät und kultiviert. Anhand der charakteristischen Morphologie wurden die CFU der Granulozyten (CFU-G), der Makrophagen (CFU-M) und gemischter Kolonien aus Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM) klassifiziert und ausgezählt. Außerdem wurden die CFU mit multipotentem Differenzierungspotential für Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Megakaryozyten (CFU-GEMM) und die von erythroiden Vorläuferzellen abstammenden Kolonien (*burst-forming unit-erythroid*, BFU-E) bestimmt. Dabei zeigte sich 19 Tage nach der ersten Injektion kein signifikanter Einfluss der Inaktivierung von *Ptch* auf das Differenzierungspotential der CFU für Granulozyten, Makrophagen und gemischter Kolonien beider Zelltypen (Tabelle 3). Ebenfalls unverändert zeigten sich die CFU-GEMM und BFU-E von *Ptch*-defizienten Tieren im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *Ptch* keinen Einfluss auf das Differenzierungspotential der myeloiden Vorläuferzellen und somit auf die Entwicklung der Zellen der myeloiden Linie hat.

	Kontrollen			<i>tPtch</i> ^{-/-} 19 Tage			
	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	P-Wert
CFU-GEMM	0,6	0,8	5	0,5	0,5	4	0,810985
CFU-GM	16,9	6,4	5	13,9	6,8	4	0,312278
CFU-G	45,8	6,0	5	48,5	12,2	4	0,394041
CFU-M	62,8	5,7	5	61,7	15,7	4	0,635421
BFU-E	2,8	1,8	5	2,3	1,4	4	0,533895

Tabelle 3: Die Vorläuferzellen der myeloiden Linie des Knochenmarks besitzen nach Inaktivierung von *Ptch* weiterhin uneingeschränktes Differenzierungspotential.

Aus *tPtch*^{-/-} Mäusen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe sowie von Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren wurden die Lin⁻ Knochenmarkszellen isoliert. In Triplets wurden jeweils 2000 Lin⁻ Knochenmarkszellen in Methylzellulose-Medium mit SCF (*stem cell factor*), IL-3, IL-6 und Erythropoietin (METHOCULT™ GF M3434) ausgesät und über 8 Tage bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl der zu koloniebildenden Einheiten (*colony-forming units*, CFU) differenzierten Granulozyten- (CFU-G), Makrophagen- (CFU-M) und Granulozyten/Makrophagen-Vorläufern (CFU-GM) sowie Granulozyten/Erythrozyten/ Makrophagen/Megakaryozyten (CFU-GEMM) und Kolonien erythroider Vorläuferzellen (*burst-forming unit-erythroid*, BFU-E) wurde ausgezählt. Die Anzahl der analysierten Tiere ist unter (n) angegeben. Der P Wert wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet (bei P-Werten < 0,05 liegt ein signifikanter Unterschied vor).

5.11 Transplantation Lin⁻ Knochenmarkszellen in immundefiziente Rezipienten

Die Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier resultiert in einem Entwicklungsdefekt des CLP im Knochenmark und folglich zum Verlust der lymphoiden Linie. In konditional *Ptch*-defizienten Tieren erfolgt die Inaktivierung von *Ptch* im gesamten Organismus mit hoher Rekombinationsrate und ist somit im verwendeten Mausmodell nicht Zelltypspezifisch. Folglich kann in diesem System nicht zwischen zellautonomen und heterologen Defekten, die durch eine veränderte Interaktion verschiedener Zelltypen ausgelöst werden können, unterschieden werden.

Zur Differenzierung zwischen diesen beiden Möglichkeiten wurden Lin⁻ Knochenmarkszellen aus *Ptch*-defizienten Tieren in *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}* Mäuse transplantiert. Diese Tiere können weder B- noch T-Zellen aus endogenen HSC bilden (Cao *et al.*, 1995; Shinkai *et al.*, 1992). Vor der Injektion der Lin⁻ Knochenmarkszellen wurden die Tiere fraktioniert an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Gesamtdosis von 7 Gy bestrahlt. Am folgenden Tag wurden Lin⁻ Knochenmarkszellen aus *Ptch*-defizienten Tieren sowie Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren aufgereinigt. Anschließend wurden 400.000 Lin⁻ Knochenmarkszellen von jedem Tier über die Schwanzvene in *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}* Tiere injiziert.

Nach 7 Wochen wurde den transplantierten *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}* Tieren aus dem retroorbitalen Venenplexus des Auges Blut entnommen und B- und T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Als Negativkontrolle diente eine Blutprobe einer untransplantierten *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}* Maus, bei der weder B- noch T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen wurden (Abbildung 29, oben). Sowohl mit Lin⁻ Knochenmarkszellen aus Tamoxifen- als auch aus Lösungsmittel-behandelten Kontrolltieren wurden die *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}* Tiere effizient repopuliert. Es wurden sowohl reife CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als auch B-Zellen (Nachweis über anti-B220) im peripheren Blut detektiert (Abbildung 29, Mitte und rechts). Folglich haben sich aus der Population der Lin⁻ Knochenmarkszellen Vorläuferzellen der lymphoiden Linie im Knochenmark der immundefizienten Rezipienten angesiedelt, aus denen sich B- und T-Zellen entwickeln konnten. Bei der Transplantation Lin⁻ Knochenmarkszellen aus *Ptch*-defizienten Tieren in *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}* Tiere erfolgte ebenfalls eine effiziente Repopulation, denn es konnten zu den Kontrolltieren vergleichbare Mengen B- und T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden (Abbildung 29, unten).

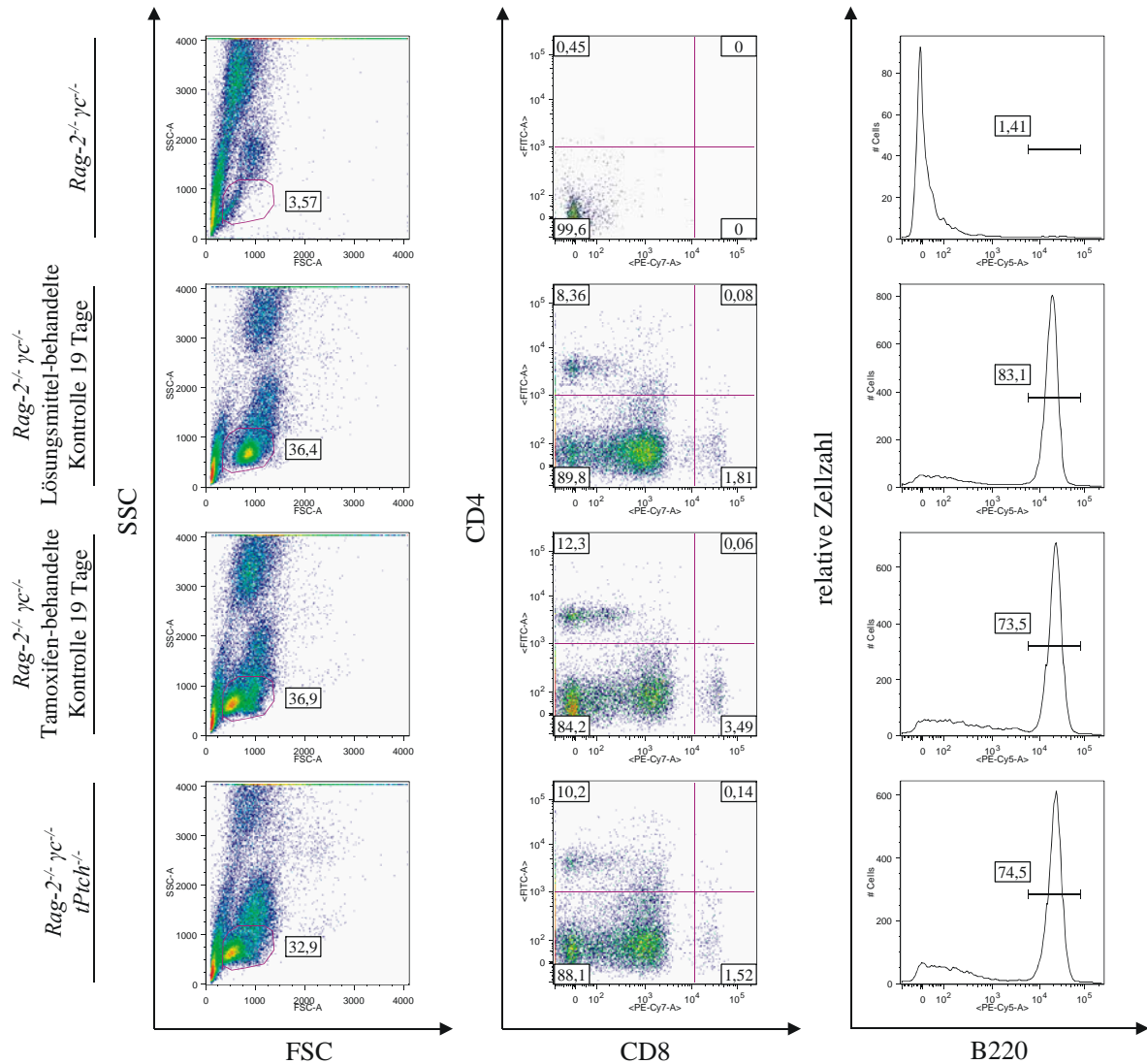


Abbildung 29: Lin⁻ Knochenmarkszellen aus *Ptch*-defizienten Spendertieren repopulieren die lymphoide Linie in *Ptch* exprimierenden Rezipienten.

Zur Analyse des Differenzierungspotentials von Lin⁻ Knochenmarkszellen von *tPtch*^{-/-} Mäusen in einem *Ptch* exprimierenden Mausstamm wurden Repopulationsexperimente in *Rag-2*^{-/-}*γc*^{-/-} Mäusen durchgeführt. Aus *tPtch*^{-/-} Mäusen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe sowie Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren 19 Tage nach der ersten Injektion wurden Lin⁻ Knochenmarkszellen isoliert und 400.000 Zellen intravenös in bestrahlte (7 Gy) *Rag-2*^{-/-}*γc*^{-/-} Mäusen injiziert. 7 Wochen nach der Transplantation wurden Blutproben der Tiere mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und B220 inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. In *Rag-2*^{-/-}*γc*^{-/-} Mäusen, die mit Lin⁻ Knochenmarkszellen aus Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren transplantiert wurden, konnten im peripheren Blut reife CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen als auch B220⁺ B-Zellen nachgewiesen werden (Mitte). In *Rag-2*^{-/-}*γc*^{-/-} Mäusen, die mit Lin⁻ Knochenmarkszellen aus *tPtch*^{-/-} Mäusen transplantiert wurden, konnten im peripheren Blut ebenfalls reife CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen sowie B220⁺ B-Zellen nachgewiesen werden (unten). Als Negativkontrolle wurden Blutproben von untransplantierten *Rag-2*^{-/-}*γc*^{-/-} Mäusen verwendet, in denen keine B- und T-Zellen detektiert wurden (oben). Jedes Repopulationsexperiment wurde mit 3 Mäusen pro Gruppe durchgeführt und lieferte identische Ergebnisse.

Bei der Transplantation von *Ptch*-defizienten Lin^- Knochenmarkszellen ist allerdings zu beachten, dass die Induktion der *Ptch*-Inaktivierung mittels einer konditionalen Strategie im adulten Tier erfolgt ist. Auch bei dem verwendeten *ROSA26CreERT2*-System mit hohen Rekombinationseffizienz ist die weitere Anwesenheit einiger wildtypischer HSC möglich. Außerdem besitzen HSC aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung ein hohes und nachhaltiges Repopulationspotential. Zur erfolgreichen Rekonstitution bestrahlter Empfängertiere sind wenige bis hin zu einer einzigen wildtypischen HSC ausreichend (Krause *et al.*, 2001). Demnach ist bei der Transplantation *Ptch*-defizienter Lin^- Knochenmarkszellen dieses Szenario theoretisch möglich.

Aus diesem Grund wurden aus dem Blut mittels positiver Selektion B- und T-Zellen aufgereinigt und mittels *real-time* PCR deren Rekombinationsrate anhand des prozentualen Anteils deletierter *Ptch* Allele bestimmt. Dabei wurde nach Transplantation *Ptch*-defizienter Lin^- Knochenmarkszellen eine nahezu vollständige Inaktivierung sämtlicher *Ptch* Allele der sich in *Rag-2^{-/-} γ C^{-/-}* Tieren entwickelnden B- und T-Zellen nachgewiesen (Abbildung 30).

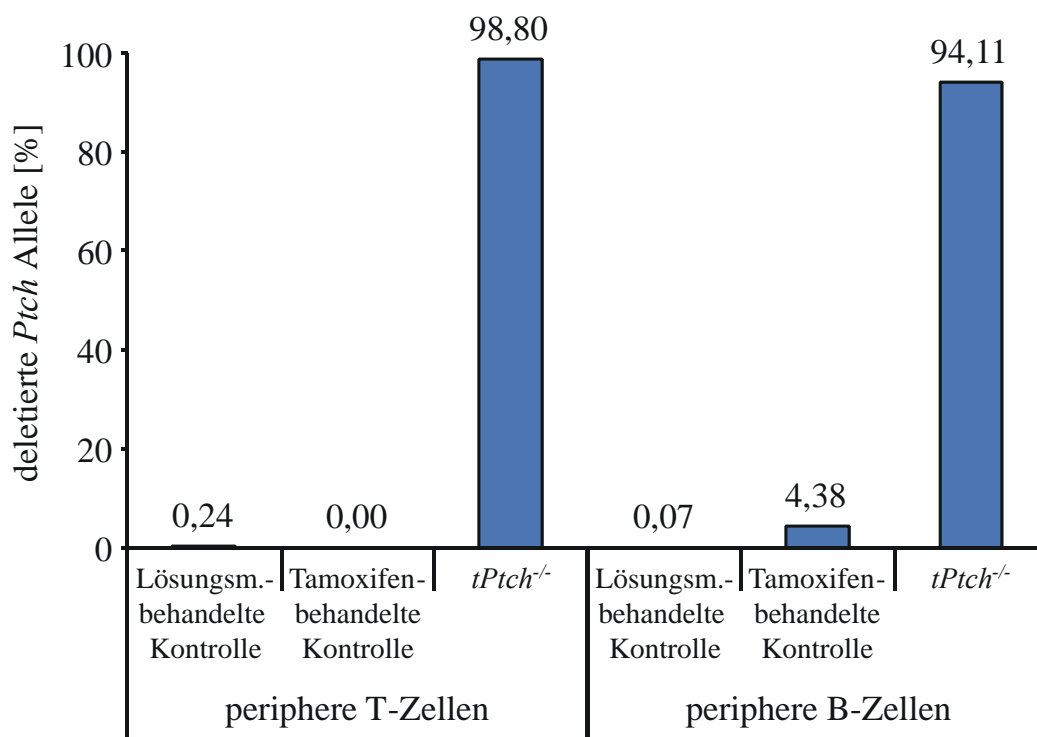


Abbildung 30: Aus *Ptch*-defizienten Lin^- Knochenmarkszellen entwickelte B- und T-Zellen besitzen nahezu vollständig deletierte *Ptch* Allele.

Immundefizienten *Rag-2^{-/-} γ C^{-/-}* Tiere wurden Lin^- Knochenmarkszellen aus *tPtch*^{-/-} Tieren oder Lösungsmittel- und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren 19 Tage nach der ersten Injektion über die Schwanzvene injiziert. Aus peripherem Blut wurden mittels positiver Selektion B- und T-Zellen aufgereinigt und daraus genomische DNA isoliert. Durch quantitative *real time* PCR wurde anschließend der prozentuale Anteil deletierter *Ptch* Allele bestimmt. Jedes Repopulationsexperiment wurde mit 3 Mäusen pro Gruppe

durchgeführt und lieferte identische Ergebnisse. (Die Bestimmung der Rekombinationsrate erfolgte in Zusammenarbeit mit Anja Uhmann, Institut für Humangenetik, Universität Göttingen).

In *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}* Tieren wird sowohl in der Thymusanlage als auch in den Stromazellen des Knochenmarks *Ptch* exprimiert. Durch die Interaktion mit diesem bezüglich *Ptch* wildtypischen Knochenmark erlangten die eingewanderten *Ptch*-defizienten Lin⁻ Knochenmarkszellen ihr Proliferations- und Differenzierungspotential zurück. Durch Reaktivierung des Zellzyklus wurde die lymphoide Linie in den vormals immundefizienten Tieren repopuliert. Folglich ist die endogene Expression von *Ptch* in den CLP für die Hämatopoiese der lymphoiden Linie abkömmlich. Vielmehr wurde durch dieses Experiment meiner Arbeit das Stromazellkompartiment im Knochenmark als Ursprung des Differenzierungsdefekts der lymphoiden Linie nach Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier identifiziert.

6 Diskussion

Unter Verwendung einer konditional *Ptch*-defizienten Maus konnte in dieser Arbeit die Funktion von *Ptch* im adulten Tier analysiert werden. Nach der biallelischen Inaktivierung von *Ptch* wurde bei den Tieren eine starke Reduktion des Thymusvolumens und der nahezu vollständige Verlust $CD4^+CD8^+$ Thymozyten beobachtet. Durch Charakterisierung der DN-Thymozyten wurde eine Blockade der frühen T-Zell-Entwicklung der Zellen im DN1-Stadium identifiziert. Dieser Defekt wird durch den Verlust der ETP ausgelöst, die vom Knochenmark in den Thymus einwandern. Neben der Blockade der intrathymischen T-Zell-Entwicklung ist auch die B-Zell-Reifung durch die *Ptch*-Defizienz betroffen. So konnte in Milzen von *Ptch*-defizienten Tieren der Verlust der T1 B-Zellen gezeigt werden, welche ausgehend vom Knochenmark die Milz besiedeln. Durch Charakterisierung der Zellpopulationen im Knochenmark konnte weiter gezeigt werden, dass die Lymphopoiese der B-Zellen blockiert ist. In Studien zur Zellularität des Stammzellkompartiments im Knochenmark wurde als Ursache des Entwicklungsdefektes ein Differenzierungsblock der CLP identifiziert. Somit konnte gezeigt werden, dass der CLP, die Ausgangspopulation aller Zellen der lymphoiden Linie, durch die Inaktivierung von *Ptch* direkt betroffen ist. Der CLP-Defekt konnte weiter durch den Expressionsverlust essentieller Regulatoren der Differenzierung von HSC zu CLP bestätigt und erklärt werden. Außerdem ist die Inaktivierung von *Ptch* mit einer stark reduzierten Zellzyklusprogression der CLP assoziiert, die ebenfalls zum Verlust der Zellen der lymphoiden Linie beiträgt. Im Gegensatz dazu wird die Zellzyklusprogression der Vorläuferzellen der myeloiden Linie nicht durch die *Ptch*-Defizienz moduliert und deren Entwicklung findet uneingeschränkt statt. Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit der Shh-Rezeptor *Ptch* als molekularer Schalter der Differenzierung von CLP zur lymphoiden Linie identifiziert. Zusätzlich konnte dem Stromazellkompartiment im Knochenmark eine essentielle Funktion als *Ptch*-abhängiger Regulator der lymphoiden Linie zugewiesen werden.

6.1 Regulation der T-Zell-Lymphopoiese durch die Shh/*Ptch*-Signalkaskade

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Ptch*-vermittelte Signale für die T-Zell-Lymphopoiese im Thymus essentiell sind. Dadurch lassen sich die Ansätze zur Beschreibung der Funktion der Shh/*Ptch*-Signalkaskade während der intrathymischen T-Zell-Entwicklung entscheidend erweitern. Bisher war bekannt, dass die sich im Thymus

entwickelnden DN-Thymozyten sowohl *Ptch* als auch *Smo* exprimieren (Outram *et al.*, 2000). Bei der Differenzierung findet eine Interaktion mit den Thymus-Epithelzellen statt, die Shh exprimieren. Für *Ptch*-defiziente Tiere konnte ein Differenzierungsdefekt der Thymozyten vom DN1- zum DN2-Stadium sowie der Zellen vom DN4-Stadium zu $CD4^+CD8^+$ Thymozyten gezeigt werden (Abbildung 10). Ähnliche Ergebnisse wurden parallel zu dieser Arbeit für Shh-defiziente Mausembryonen sowie konditional *Smo*-defiziente Tiere erhalten (Andaloussi *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2004). In Abwesenheit von Shh *in vitro* (*fetal thymic organ culture*, FTOC mit anti-Shh-Antikörpern) ist die Differenzierungsrate von DN- zu DP-Thymozyten erhöht. Hohe Konzentrationen von Shh bewirken im Gegensatz dazu einen Differenzierungsblock der Zellen im DN3-Stadium nach der Umlagerung der Gensegmente für die β -Kette des Prä-TCR (Outram *et al.*, 2000). Die Shh/*Ptch*-Signalkaskade ist somit an der Differenzierung von DN- zu DP-Thymozyten im Thymus beteiligt (Abbildung 31).

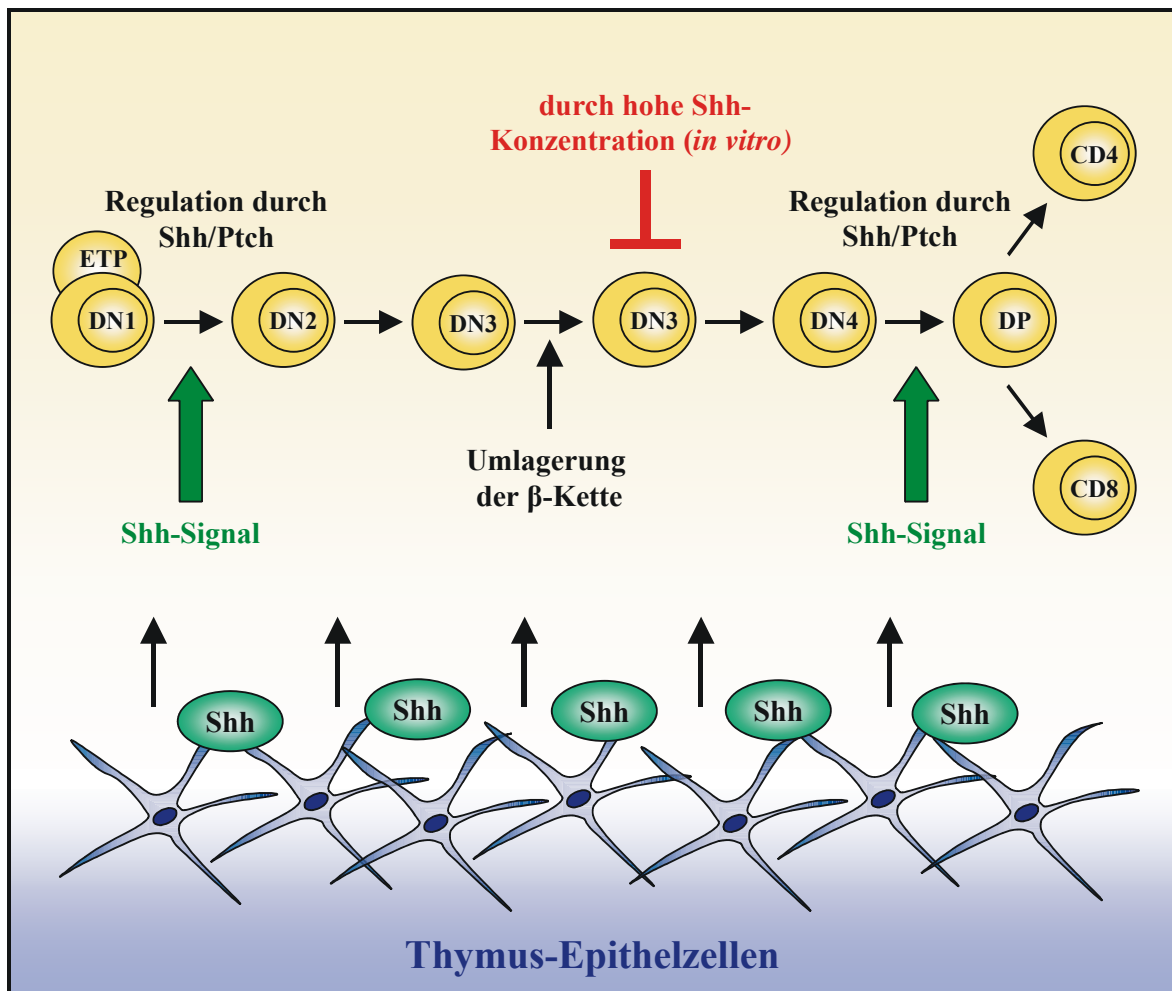


Abbildung 31: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildung 31: Regulation der T-Zell-Entwicklung durch die Shh/Ptch-Signalkaskade.

Im Thymus wird Shh von den Thymus-Epithelzellen exprimiert. $CD4^-CD8^-$ DN-Thymozyten exprimieren Ptch und Smo. Die Shh/Ptch-Signalkaskade reguliert die Differenzierung der Zellen von DN1- zum DN2-Stadium und von DN-Thymozyten zu $CD4^+CD8^+$ Thymozyten. Durch hohe Konzentrationen von Shh erfolgt ein Differenzierungsblock der Zellen im DN3-Stadium nach Umlagerung der für die β -Kette codierenden Gensegmente (Abbildung erstellt in Anlehnung an: Outram *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2004 und Ergebnisse dieser Arbeit).

Anhand der Charakterisierung der ETP in der DN1-Population im Thymus Ptch-defizienter Tiere konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass der für die Thymozyten des DN1-Stadiums postulierte Differenzierungsblock der intrathymischen T-Zell-Entwicklung durch den Verlust der ETP in dieser Zellfraktion ausgelöst wird (Abbildung 13). Folglich kann das Modell der T-Zell-Lymphopoiese bezüglich der Rolle der Shh/Ptch-Signalkaskade entscheidend erweitert werden. Die Shh/Ptch-Signalkaskade ist nicht nur an der Differenzierung der Zellen vom DN1- zum DN2-Stadium und von DN zu $CD4^+CD8^+$ T-Zellen beteiligt, sondern ist auch für die kontinuierliche Erneuerung der in den Thymus einwandernden ETP essentiell (Abbildung 32). Adulte Ptch-defiziente Tiere als auch Shh-defiziente Mausembryonen zeigen identische intrathymische Differenzierungsdefekte der T-Zell-Lymphopoiese. In Abwesenheit von Ptch ist Smo und damit der Shh/Ptch-Signalweg konstitutiv aktiv (Ptch-defiziente Tiere). Im Gegensatz dazu ist ohne Shh bei Anwesenheit von Ptch keine Aktivierung der Signalkaskade möglich (Shh-defiziente Tiere). Trotz der konstitutiv aktiven bzw. inaktiven Shh/Ptch-Signalkaskade wurden für beide Mausmodelle identische Differenzierungsdefekte der intrathymischen T-Zell-Entwicklung gezeigt. Demnach kann postuliert werden, dass die T-Zell-Lymphopoiese im Thymus auf die Feinregulation der Shh/Ptch-Signalkaskade angewiesen ist. Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass die Expression von Ptch und Smo in den einzelnen Populationen der DN-Thymozyten entwicklungspezifisch variiert und somit eine zusätzliche Möglichkeit der Regulation des Signalwegs bietet (Andaloussi *et al.*, 2006). Neben der Shh/Ptch-Signalkaskade sind über Notch-Rezeptoren vermittelten Signale für die Differenzierung der DN-Thymozyten im Thymus essentiell. Im Knochenmark wird außerdem die Entscheidung, ob CLP innerhalb der lymphoiden Linie zu B- oder T-Zellen differenzieren, über Notch1-vermittelte Signale reguliert (Radtke *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000; zur Übersicht: Radtke *et al.*, 2004; Maillard *et al.*, 2005) (Abbildung 32).

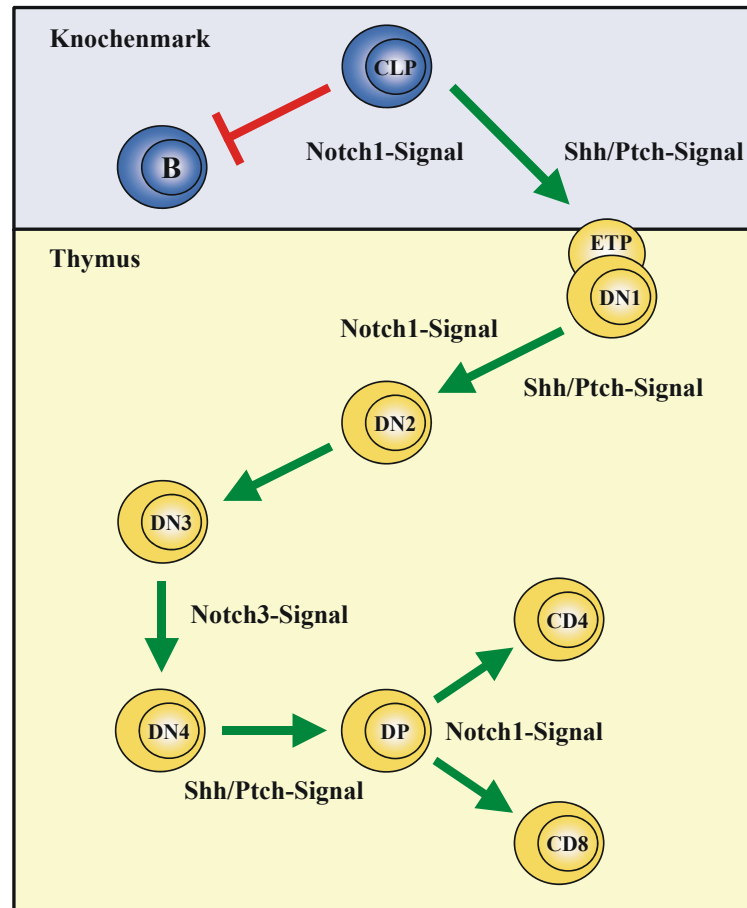


Abbildung 32: Regulation der T-Zell-Lymphopoese durch Notch- und Shh/Ptch-Signale. Durch Notch1-vermittelte Signale wird die T-Zell-Lymphopoese begünstigt, wohingegen die B-Zell-Entwicklung inhibiert wird. Für die Bildung der ETP im Thymus ist eine intakte Shh/Ptch-Signalkaskade notwendig. Notch1- und Shh/Ptch-Signale vermitteln die Differenzierung der T-Zell-Vorläufer vom DN1- zum DN2-Stadium. Unter dem Einfluss von Notch3-Signalen differenzieren Thymozyten im DN3-Stadium zu Zellen im DN4-Stadium. Für die weitere Entwicklung zu DP-Zellen wird ein aktiver Shh/Ptch-Signalweg benötigt. Die Differenzierung von DP-Zellen zu CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen erfolgt durch einen aktiven Notch1-Signalweg (Abbildung erstellt in Anlehnung an: Benson *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004; Guidos, 2002; Radtke *et al.*, 2004 und Ergebnisse dieser Arbeit).

6.2 Essentielle Rolle der Shh/Ptch-Signalkaskade für die lymphoide Linie

Neben dem Block der T-Zell-Lymphopoese im Thymus konnte in Ptch-defizienten Tieren auch der Verlust der T1 B-Zellen in der Milz gezeigt werden (Abbildung 14). T1 B-Zellen werden während der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark gebildet und wandern zur Reifung durch passiven Transport über die Blutbahn in die Milz ein (Carsetti *et al.*, 1995; Jacobsen und Osmond, 1990). T1 B-Zellen bilden die Grundlage der B-Zell-Reifung in der Milz und differenzieren zu T2 sowie reifen B-Zellen (Loder *et al.*, 1999). Im Gegensatz zum Verlust der T1 B-Zellen in Ptch-defizienten Tieren wurde am Tag 19 nach der ersten Tamoxifeninjektion keine Reduktion der T2 B-Zellen und reifen B-Zellen in der Milz

beobachtet (Abbildung 14). Dies ist dadurch zu erklären, dass T1 B-Zellen innerhalb der Milz sowohl zu T2 als auch reifen B-Zellen differenzieren. Außerdem entwickeln sich T2 B-Zellen zu reifen B-Zellen. Dadurch wurden in *Ptch*-defizienten Tieren innerhalb des begrenzten Beobachtungszeitraums von 19 Tagen trotz des Verlustes der T1 B-Zellen die Populationen der T2 und reifen B-Zellen in der Milz aufrecht erhalten. Für spätere Zeitpunkte nach der ersten Tamoxifengabe lässt sich für *Ptch*-defiziente Tiere die Reduktion der T2 B-Zellen als auch der langlebigeren reifen B-Zellen in der Milz postulieren. Dies würde letztendlich zur Verkleinerung der Milz führen, wie es durch die Blockade der T-Zell-Lymphopoiese für den Thymus gezeigt wurde.

Die B-Zell-Lymphopoiese findet größtenteils im Knochenmark statt. In *Ptch*-defizienten Tieren konnte im Knochenmark eine starke Reduktion aller Zellen der frühen B-Zell-Entwicklungsstadien nachgewiesen werden (Abbildung 16). Als Ursache des Verlustes der Zellen der lymphoiden Linie wurde ein Differenzierungsdefekt der CLP im Knochenmark identifiziert (Abbildung 23). Dadurch zeigt diese Arbeit erstmalig, dass die *Shh/Ptch*-Signalkaskade für die Regulation der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark des adulten Tiers essentiell ist. Die Analyse Lin^- Knochenmarkszellen *Ptch*-defizienter Tiere zeigte ferner, dass die Expression essentieller Komponenten (*Ikaros*, *EBF*, *Rag-1*, *Rag-2*, *Flt3*, *IL-7Ra* und *Pax5*) der Differenzierung von HSC zu CLP im Knochenmark *Ptch*-defizienter Tiere stark beeinträchtigt bzw. nicht mehr nachweisbar sind. CLP repräsentieren innerhalb des hämatopoietischen Systems ausgehend von HSC die erste IL-7Ra^+ Zellpopulation. Durch den Expressionsverlust von *IL-7Ra* konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung zum CLP direkt betroffen ist. Folglich resultiert die Inaktivierung von *Ptch* im Knochenmark des adulten Tiers in einem Differenzierungsdefekt der CLP, so dass die Lymphopoiese zu B- und T-Lymphozyten nicht mehr stattfinden kann (Abbildung 33).

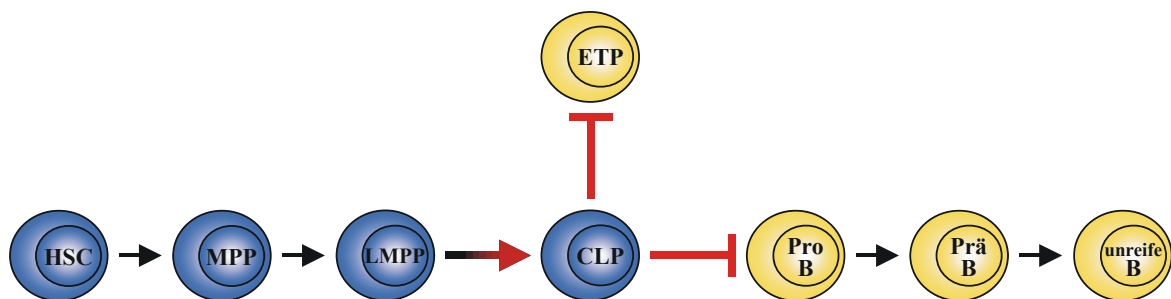


Abbildung 33: Verlust der B- und T-Zell-Lymphopoiese in *Ptch*-defizienten Tieren.

Die Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier führt zu einem Differenzierungsdefekt des CLP. Dieser Defekt resultiert sowohl im Verlust der B-Zell-Lymphopoiese im Knochenmark als auch durch den Verlust der ETP zur Blockade der T-Zell-Lymphopoiese im Thymus.

Im Gegensatz zur reduzierten Expression essentieller Regulatoren der lymphoiden Linie wurde keine veränderte Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 in Lin⁻ Knochenmarkszellen *Ptch*-defizienter Tiere nachgewiesen. PU.1 reguliert die initiale hämatopoietische Entwicklung und ist für die Differenzierung der HSC zu Vorläuferzellen der lymphoiden und myeloiden Linie notwendig (Iwasaki *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995). Für die Differenzierung von HSC zu CLP ist eine geringe Expression von PU.1 ausreichend, wohingegen für die Entwicklung der Vorläuferzellen der myeloiden Linie eine hohe Expression von PU.1 benötigt wird (Akashi *et al.*, 2000; zur Übersicht: Laiosa *et al.*, 2006). In *Ptch*-defizienten Tieren findet demnach entsprechend der unveränderte Expression von *PU.1* die uneingeschränkte Differenzierung von HSC zu Vorläuferzellen der myeloiden Linie statt. In der durchflusszytometrischen Analyse Lin⁻ Knochenmarkszellen *Ptch*-defizienter Tiere konnte dieses durch die unveränderte Population der myeloiden Vorläuferzellen bestätigt werden (Abbildung 23). Dieser Befund wurde ferner durch die Bestimmung des Differenzierungspotentials der myeloiden Linie untermauert. Die koloniebildende Aktivität myeloider Vorläuferzellen ist im Knochenmark *Ptch*-defizienter Tiere nicht betroffen (Tabelle 3). Damit wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von *Ptch* keinen Einfluss auf die Entwicklung der myeloiden Vorläuferzellen und somit auf die Differenzierung zu allen Zellen der myeloiden Linie hat.

6.3 Shh/*Ptch*-assoziierte Regulation des Zellzyklus im Stammzellkompartiment

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Hh/*Ptch*-Signalkaskade sowohl während der Embryonalentwicklung als auch während der Hämatopoiese im adulten Organismus an der proliferativen Zellexpansion durch Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Detmer *et al.*, 2005; Lowrey *et al.*, 2002; zur Übersicht: Neumann, 2005; Roy und Ingham, 2002). In heterozygot *Ptch*-defizienten Tieren wurde in Lin⁻ Knochenmarkszellen die Induktion des Zellzyklus beobachtet. Außerdem wurde durch starke Expression von Gli1 die Aktivierung der Shh/*Ptch*-Signalkaskade nachgewiesen (Trowbridge *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu wurde bei der Analyse *Ptch*-defizienter Tiere in Lin⁻ Knochenmarkszellen eine verminderte Zellzyklusprogression und keine Expression von Gli1 nachgewiesen (Abbildung 26 und 27). Die differentielle Analyse der lymphoiden und myeloiden Vorläuferzellen zeigte ferner eine verminderte Proliferationsrate der CLP, während bei myeloiden Vorläuferzellen keine Veränderung detektiert wurde (Abbildung 28). Der Verlust der Zellen der lymphoiden Linie nach Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier wird somit auch durch eine verminderte Zellzyklusprogression in CLP induziert.

6.4 Das Stromazellkompartiment im Knochenmark als *Ptch*-abhängiger Regulator der lymphoiden Linie

Durch die Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier wird ein Differenzierungsdefekt der CLP im Knochenmark induziert, so dass *Ptch* in dieser Arbeit als essentieller Regulator der lymphoiden Linie identifiziert wurde. Zur weiteren Charakterisierung des CLP-Defekts wurden Lin⁻ Knochenmarkszellen aus *Ptch*-defizienten Tieren in *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}* Mäuse transplantiert, um zwischen einem zellautonomen oder heterolog bedingten Defekt zu unterscheiden (Cao *et al.*, 1995; Shinkai *et al.*, 1992). Im *Ptch*⁺ Stromazellkompartiment der *Rag-2^{-/-}γc^{-/-}* Mäuse konnten CLP aus *Ptch*-defizienten Tieren die lymphoide Linie vollständig repopulieren (Abbildung 29 und 30). Folglich ist die endogene Expression von *Ptch* für hämatopoietische Zellen im CLP-Stadium für die Differenzierung zu Zellen der lymphoiden Linie abkömmlich. Somit liegt kein zellautonomer CLP-Defekt vor, sondern ein durch die Inaktivierung von *Ptch* bedingter heterologer Defekt, der mit einer gestörten Interaktion zwischen den CLP und den Knochenmarks-Stromazellen assoziiert ist. Dadurch wurde in dieser Arbeit das Stromazellkompartiment im Knochenmark als *Ptch*-abhängiger Induktor der B- und T-Zell-Lymphopoese identifiziert.

Die Summe der Ergebnisse dieser Arbeit erlaubt damit die Erweiterung des Modells der Bildung des hämatopoietischen Systems. Durch Notch1-vermittelte Signale erfolgt die Differenzierung zu B- oder T-Lymphozyten. In Notch-1 exprimierenden CLP ist die Differenzierung zu B-Zellen zugunsten der T-Zell-Lymphopoese blockiert (Pui *et al.*, 1999). Die vorgeschaltete Entscheidung zur Bildung der lymphoiden Linie erfolgt durch die Shh/*Ptch*-Signalkaskade. Außerdem ist dafür ein *Ptch*⁺ Stromazellkompartiment notwendig, welches durch Interaktion mit den CLP die Grundlage der lymphoiden Linie im adulten Tier bildet (Abbildung 34).

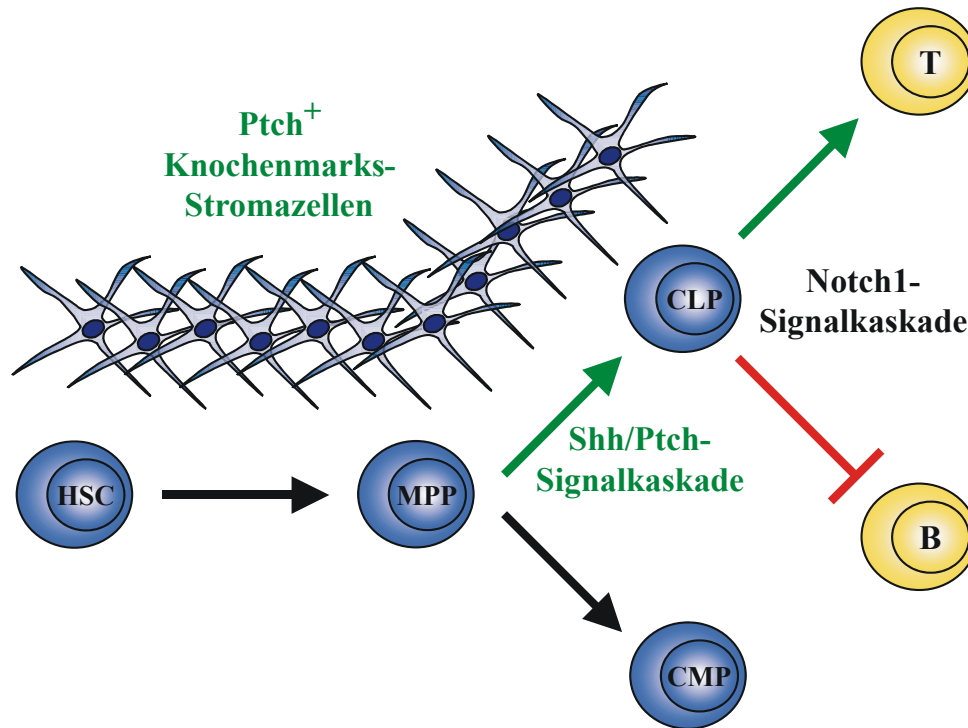


Abbildung 34: Regulation der Hämatopoiese durch die Shh/Ptch-Signalkaskade.

Für die Bildung des CLP als Grundlage der lymphoiden Linie während der Hämatopoiese im Knochenmark ist die Shh/Ptch-Signalkaskade in Kombination mit einem Ptch⁺ Stromazellkompartiment essentiell. Durch Regulation Notch1-vermittelter Signale erfolgt die weitere Differenzierung zu B- oder T-Lymphozyten.

6.5 Regulation der lymphoiden Linie durch Ptch-vermittelte Signale

Der Verlust von funktionellem Ptch führt nach dem Modell der kanonischen Shh/Ptch-Signalkaskade zur Aktivierung des Signalwegs und resultiert in erhöhter Transkription von *Gli* (Abbildung 5) (Dahmane *et al.*, 1997; Xuan, 2006; zur Übersicht: Ruiz i Altaba, 2002; Wetmore, 2003). Demnach sollte in Ptch-defizienten Tieren durch die fehlende inhibitorische Funktion von Ptch gegenüber Smo der Signalweg konstitutiv aktiv sein und folglich *Gli* exprimiert werden. Demgegenüber konnte aber gezeigt werden, dass in Lin⁻ Knochenmarkszellen von Ptch-defizienten Tieren als auch Lösungsmittel und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren, die wt Ptch in Lin⁻ Knochenmarkszellen exprimieren, keiner der drei *Gli*-Transkriptionsfaktoren *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* exprimiert wird (Abbildung 26). Im Gegensatz dazu wurde in heterozygot Ptch-defizienten Tieren in Lin⁻ Knochenmarkszellen eine starke, konstitutive Expression von *Gli1* nachgewiesen (Trowbridge *et al.*, 2006). Dies führt bei heterozygot Ptch-defizienten Tiere in Lin⁻ Knochenmarkszellen zur Stimulation der Zellzyklusprogression und zum Anstieg der absoluten Zahl dieser Zellpopulation, wobei keine Veränderung der Zellen der lymphoiden

und myeloiden Linie beobachtet wurde. In Kombination mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Differenzierung von HSC zu CLP und weiter die Entwicklung der lymphoiden Linie nicht oder nicht ausschließlich durch den kanonischen Shh/Ptch-Signalweg erfolgt. Dieses Ergebnis wird auch dadurch gestützt, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass der CLP zur Bildung der lymphoiden Linie keiner endogenen Expression von *Ptch* bedarf, sondern dafür auf ein $Ptch^+$ Stromazellkompartiment angewiesen ist (Abbildung 29 und 30). Folglich scheint *Ptch* für die Lymphopoese einen bisher unbekanntem nicht-kanonischen Signalweg zu regulieren. Zur Shh/Ptch-Signalkaskade ist die Wnt-Signalkaskade verwandt, für die bereits neben dem kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg auch nicht-kanonische Signalwege beschrieben worden sind (zur Übersicht: Korswagen, 2002; Kuhl, 2002; Huelsken und Birchmeier, 2001). Bei der Genese von Basaliomen wurde weiterführend die wechselseitige Regulation der beiden Signalkaskaden beschrieben (Bonifas, 2001; Saldanha, 2004). Bezüglich der Shh/Ptch-Signalkaskade könnte eine mögliche Erklärung für einen nicht-kanonischen *Ptch*-vermittelten Signalweg sein, dass kürzlich in einer Arbeit gezeigt wurde, dass $Ptch^+$ Zellen auch zur Inhibition von Smo befähigt sind, wenn *Ptch* und Smo nicht auf einer Zelle lokalisiert sind (Bijlsma *et al.*, 2006). Diese nicht-zellautonome Inhibition von Smo wird vermutlich über ein Oxysterol vermittelt, für das *Ptch* eine zelluläre Transportfunktion besitzt. Sowohl durch den *Ptch*-abhängigen Transport von Oxysterolen in den interzellulären Raum als auch durch die Gabe von Vitamin D₃ (einem Oxysterol) konnte die Aktivität von Smo inhibiert werden (Bijlsma *et al.*, 2006). Oxysterole binden außerdem an den Vitamin D-Rezeptor (Vdr). Durch Vdr-vermittelte Signale wird sowohl die Zellproliferation inhibiert als auch die Zelldifferenzierung stimuliert (zur Übersicht: DeLuca, 2004; Kato, 2000). Als alternativer *Ptch*-vermittelter Signalweg ist in diesem Kontext auch die Aktivierung des Vdr denkbar. Bei ausreichender Vdr-Expression der CLP lässt sich somit die zusätzliche Stimulation von CLP in Stammzellnischen der Knochenmarks-Stromazellen über Vdr-vermittelte Signale postulieren. Diese möglichen Vdr-Signale, die durch die *Ptch*-assoziierte Sekretion von Oxysterolen in den Interzellularraum ausgelöst werden könnten, besitzen während der Hämatopoese nur eine untergeordnete Funktion. In Vdr-defizienten Mäusen konnte die nahezu unveränderte Ausbildung des hämatopoietischen Systems gezeigt werden (Mathieu *et al.*, 2001; O'Kelly *et al.*, 2002). Bezüglich der Stimulation der CLP im Stromazellkompartiment lässt sich weiter spekulieren, dass *Ptch*-vermittelte Signale an der Initiation der V(D)J-Rekombination beteiligt sind. Dadurch würde ein essentieller

Differenzierungsstimulus der CLP entfallen und die Bildung der lymphoiden Linie würde nicht erfolgen.

6.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *Ptch* im adulten Organismus durch einen heterolog bedingten Differenzierungsblock der CLP im Knochenmark zum Verlust der B- und T-Zell-Lymphopoese führt. Zur weiteren Charakterisierung zellautonomer Funktionen der Shh/*Ptch*-Signalkaskade während der Hämatopoese sollten *Ptch*^{flx/flx}-Mäuse mit Mauslinien verpaart werden, welche die zelltypspezifische Expression einer Cre-Rekombinase ermöglichen. Für die Analyse der T-Zell-Lymphopoese im Thymus ist dafür die *CD4*-Cre-Mauslinie ein geeignetes Modellsystem (Lee *et al.*, 2001; Wolfer *et al.*, 2001). Zur weiteren Charakterisierung *Ptch*-defizienter B-Lymphozyten in *Ptch*⁺ Zellkompartimenten ist die kürzlich publizierte *mb1*-Cre-Mauslinie das effizienteste Modellsystem (Hobeika *et al.*, 2006). In *mb1*-Cre-Mäusen wird eine Cre-Rekombinase in Zellen ab dem Pro-B-Zell-Stadium im Knochenmark bis zu reifen Plasmazellen kontinuierlich exprimiert und ermöglicht somit die Funktionsanalyse von *Ptch* in der B-Zell-Entwicklung, nachdem die Zellen das CLP-Stadium bereits passiert haben. Bisher wurde kein Mausmodell mit Stromazell-spezifischer Expression einer Cre-Rekombinase etabliert. Daher könnte zunächst die Cokultivierung von wt und *Ptch*-defizienten Knochenmarkszellen mit wt und *Ptch*-defizienten B-Zell-Populationen *in vitro* zur weiteren Analyse der Funktion der Shh/*Ptch*-Signalkaskade bei dieser Zell-Zell-Interaktion beitragen. Die damit erzielten Ergebnisse könnten dann *in vivo* durch wechselseitige Transplantationen Lin⁻ Knochenmarkszellen zwischen *Ptch*^{flx/flx}*ERT2*^{+/-}-Mäusen und wt Tieren überprüft und weiter charakterisiert werden.

7 Literatur

Adams B., Dörfler P., Aguzzi A., Kozmik Z., Urbanek P., Maurer-Fogy I., Busslinger M. (1992) Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev* **6**, 1589-1607.

Adolfsson J., Borge O. J., Bryder D., Theilgaard-Monch K., Astrand-Grundstrom I., Sitnicka E., Sasaki Y., Jacobsen S.E. (2001) Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin-Sca1+c-kit⁺ stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* **15**, 659-669.

Adolfsson J., Mansson R., Buza-Vidas N., Hultquist A., Liuba K., Jensen C. T., Bryder D., Yang L., Borge O. J., Thoren L. A., Anderson K., Sitnicka E., Sasaki Y., Sigvardsson M., Jacobsen S. E. (2005) Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 160-162.

Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I. L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197.

Alcedo J., Ayzenzon M., Von Ohlen T., Noll M., Hooper J. E. (1996) The Drosophila smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* **86**, 221-232.

Alcedo J., Zou Y., Noll M. (2000) Posttranscriptional regulation of smoothened is part of a self-correcting mechanism in the Hedgehog signaling system. *Mol Cell* **6**, 457-465.

Allman D., Sambandam A., Kim S., Miller J. P., Pagan A., Well D., Meraz A., Bhandolla A. (2003) Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nature Immunol* **4**, 168-174.

Ardavin C., Wu L., Li C. L., Shortman K. (1993) Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* **362**, 761-763.

-
- Athar M., Tang X., Lee J. L., Kopelovich L., Kim A. L. (2006) Hedgehog signalling in skin development and cancer. *Exp Dermatol* **15**, 667-677.
- Bain G., Maandag E. C. R., Izon D. J., Amsen D., Kruisbeek A. M., Weintraub B. C., Krop I., Schlissel M. S., Feeney A. J., van Roon M. (1994) E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* **79**, 885-892.
- Baird A. M., Gerstein R. M., Berg L. J. (1999) The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* **11**, 157-166.
- Benlagha K., Kyin T., Beavis A., Teyton L., Bendelac A. (2002) A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* **296**, 553-555.
- Benson R. A., Lowrey J. A., Lamb J. R., Howie S. E. M. (2004) The Notch and sonic hedgehog signalling pathways in immunity. *Mol Immunol* **41**, 715-725.
- Bhandoola A., Sambandam A. From stem cell to T cell: one route or many? (2006) *Nat Rev Immunol* **6**, 117-126.
- Bhardwaj G., Murdoch B., Wu D., Baker D. P., Williams K. P., Chadwick K., Ling L. E., Karanu N., Bhatia M. (2001) Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* **2**, 172-180.
- Bhattacharya D., Rossi D. J., Bryder D., Weissman I. L. (2006) Purified hematopoietic stem cell engraftment of rare niches corrects lymphoid deficiencies without host conditioning. *J Exp Med* **203**, 73-85.
- Bijlsma M. F., Spek C. A., Zivkovic D., van de Water S., Rezaee F., Peppelenbosch M. P. (2006) Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol* **4**, e232.

Bonifas J. M., Pennypacker S., Chuang P. T., McMahon A. P., Williams M., Rosenthal A., De Sauvage F. J., Epstein E. H. Jr. (2001) Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol* **116**, 739-742.

Bonneville M., Ishida I., Mombaerts P., Katsuki M., Verbeek S., Berns A., Tonegawa S. (1989) Blockage of alpha beta T-cell development by TCR gamma delta transgenes. *Nature* **342**, 931-934.

Borghesi L., Hsu L. Y., Miller J. P., Anderson M., Herzenberg L., Herzenberg L., Schlissel M. S., Allman D. (2004) B lineage-specific regulation of V(D)J recombinase activity is established in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* **199**, 491-502.

Bridge J. A., Liu J., Weibolt V., Baker K. S., Perry D., Kruger R., Qualman S., Barr F., Sorensen P., Triche T., Suijkerbuijk R. (2000) Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: an intergroup rhabdomyosarcoma study. *Genes Chromosomes Cancer* **27**, 337-344.

Bumcrot D. A., Takada R., McMahon A. P. (1995) Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol Cell Biol* **15**, 2294-2303.

Burke R., Nellen D., Bellotto M., Hafen E., Senti K. A., Dickson B. J., Basler K. (1999) Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* **99**, 803-815.

Busslinger M. (2004) Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* **22**, 55-79.

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. (1995) Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* **2**, 223-238.

-
- Carayon P., Bord A. (1992) Identification of DNA-replicating lymphocyte subsets using a new method to label the bromo-deoxyuridine incorporated into the DNA. *J Immunol Meth* **147**, 225-230.
- Carsetti R. (2000) The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *J Exp Med* **191**, 5-8.
- Carsetti R., Köhler G., Lamers M. C. (1995) Transcriptional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* **181**, 2129-2140.
- Carvalho T. L., Mota-Santos T., Cumano A., Demengeot J., Vieira P. (2001) Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7^{-/-} mice. *J Exp Med* **194**, 1141-1150.
- Chamoun Z., Mann R. K., Nellen D., von Kessler D. P., Bellotto M., Beachy P. A., Basler K. (2001) Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* **293**, 2080-2084.
- Chang D. T., Lopez A., von Kessler D. P., Chiang C., Simandl B. K., Zhao R., Seldin M. F., Fallon J. F., Beachy P. A. (1994) Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development* **120**, 3339-3353.
- Chen Y., Struhl G. (1998) In vivo evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex. *Development* **125**, 4943-4948.
- Christensen J. L., Weissman I. L. (2001) Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 14541-14546.
- Coffman R. L., Weissman I. L. (1981) B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* **289**, 681-683.

-
- Cohen M. M. Jr. (2003) The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A* **123**, 5-28.
- Cotta C. V., Zhang Z., Kim H. G., Klug C. A. (2003) Pax5 determines B- versus T-cell fate and does not block early myeloid-lineage development. *Blood* **101**, 4342-4346.
- Dahl R., Simon M. C. (2003) The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol Dis* **31**, 229-233.
- Dahmane N., Lee J., Robins P., Heller P., Ruiz i Altaba A. (1997) Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* **389**, 876-881.
- Daya-Grosjean L., Couvé-Privat S. (2005) Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett* **225**, 181-192.
- Dean P. N., Dolbeare F., Gratzner H., Rice G. C., Gray J. W. (1984) Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd. *Cell Tissue Kinet* **17**, 427-436.
- DeKoter R. P., Hyun-Jun L., Singh H. (2002) PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* **16**, 297-309.
- DeKoter R. P., Singh H. (2000) Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* **288**, 1439-1441.
- DeLuca H. F. (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* **80**, 1689S-1696S.
- Denef N., Neubuser D., Prez L., Cohen S. M. (2000) Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell* **102**, 521-531.
- Detmer K., Thompson A. J., Garner R. E., Walker A. N., Gaffield W., Dannawi H. (2005) Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors. *Blood Cells Mol Dis* **34**, 60-70.

Ding Q., Fukami S., Meng X., Nishizaki Y., Zhang X., Sasaki H., Dlugosz A., Nakafu M., Hui C. (1999) Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol* **9**, 1119-1122.

Di Santo J. P. (2006) Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* **24**, 257-286.

Di Santo J. P., Rodewald H. R. (1998) In vivo roles of receptor tyrosine kinases and cytokine receptors in early thymocyte development. *Curr Opin Immunol* **10**, 196-207.

Dyer M. A., Farrington S. M., Mohn D., Munday J. R., Baron M. H. (2001) Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development* **128**, 1717-1730.

Echelard Y., Epstein D. J., St-Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J. A., McMahon A. P. (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**, 1417-1430.

el Marjou F., Janssen K. P., Chang B. H., Li M., Hindie V., Chen L., Louvard D., Chambon P., Metzger D., Robine S. (2004) *Genesis* **39**, 186-193.

Evangelista M., Tian H., de Sauvage F. J. (2006) The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 5924-5928.

Fehling H. J., Krotkova A., Saint-Ruf C., von Boehmer H. (1995) Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* **375**, 795-798.

Fitzsimmons D., Hodsdon W., Wheat W., Maira S.-M., Wasylyk B., Hagman J. (1996) Pax-5 (BSAP) recruits Ets protooncogene family proteins to form functional ternary complexes on a B cell-specific promoter. *Genes Dev* **10**, 2198-2211.

Friedrich G. und Soriano P. (1991) Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* **5**, 1513-1523.

-
- Förster I., Vieira P., Rajewsky K. (1989) Flow cytometric analysis of cell proliferation dynamics in the B cell compartment of the mouse. *Int Immunol* **1**, 321-331.
- Fu C., Turck C. W., Kurosaki T., Chan A. C. (1998) BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* **9**, 93-103.
- Garcia S., Di Santo J., Stockinger B. (1999) Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* **11**, 163-171.
- Geisler C., Larsen J. K., Plesner T. (1988) Identification of alpha beta and gamma delta T cell receptor-positive cells. *Scand J Immunol* **28**, 741-745.
- Gemmill R. M., West J. D., Boldog F., Tanaka N., Robinson L. J., Smith D. I., Li F., Drabkin H. A. (1998) The hereditary renal cell carcinoma 3;8 translocation fuses *FHIT* to a *patched*-related gene, TRC8. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9572-9577.
- Georgopoulos K. (2002) Hematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and Ikaros. *Nat Rev Immunol* **2**, 162-174.
- Georgopoulos K., Bigby M., Wang J.-H., Molnar A., Wu P., Winandy S., Sharpe A. (1994) The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* **79**, 143-156.
- Gering M., Patient R. (2005) Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev Cell* **8**, 389-400.
- Germain R. N. (2002) T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309-322.
- Gisler R., Sigvardsson M. (2002) The human V-preB promoter is a target for coordinated activation by early B cell factor and E47. *J Immunol* **168**, 5130-5138.
- Godfrey D. I., Kennedy J., Mombaerts P., Tonegawa S., Zlotnik A. (1994) Onset of TCR- β gene rearrangement and role of TCR- β expression during CD3⁺CD4⁺CD8⁻ thymocyte differentiation. *J Immunol* **152**, 4783-4792.

-
- Godfrey D. I., Kennedy J., Suda T., 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.
- Godfrey D. I., Zlotnik A., Suda T. (1992) Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. *J Immunol* **149**, 2281-2285.
- Goitsuka R., Fujimura Y., Mamada H., Umeda A., Morimura T., Uetsuka K., Doi K., Tsuji S., Kitamura D. (1998) BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. *J Immunol* **161**, 5804-5808.
- Goldschneider I., Komschlies K. L., Greiner D. L. (1986) Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors. *J Exp Med* **163**, 1-17.
- Gonchoroff N. J., Katzmann J. A., Currie R. M., Evans E. L., Houck D. W., Kline B. C., Greipp P. R., Loken M. R. (1986) S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine. Role of DNase pretreatment. *J Immunol Meth* **93**, 97-101.
- Goodrich L. V., Milenkovic L., Higgins K. M., Scott M. P. (1997) Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277** (5329), 1109-1113.
- Gorlin R. J., Goltz R. W. (1960) Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med* **262**, 908-912.
- Gounari F., Aifantis I., Martin C., Fehling H. J., Hoeflinger S., Leder P., von Boehmer H., Reizis B. (2002) Tracing lymphopoiesis with the aid of a pT α -controlled reporter gene. *Nat Immunol* **3**, 489-496.
- Grawunder U., Leu T. M., Schatz D. G., Werner A., Rolink A. G., Melchers F., Winkler T. H. (1995) Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* **3**, 601-608.

Greenberg P., Riddell S. (1999) Deficient cellular immunity-finding and fixing the defects. *Science* **285**, 546-551.

Grindley J. C., Bellusci S., Perkins D., Hogan B. L. (1997) Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. *Dev Biol* **188**, 337-348.

Gu H., Zou Y. R., Rajewsky K. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155-1164,

Guidos C. J. (2002) Notch signaling in lymphocyte development. *Semin Immunol* **14**, 395-404.

Hagman J., Belanger C., Travis A., Turck C. W., Grosschedl R. (1993) Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev* **7**, 760-773.

Hagman J., Lukin K. (2005) Early B-cell factor 'pioneers' the way for B-cell development. *Trends Immunol* **18**, 127-134.

Hahn H., Wicking C., Zaphiropoulos P. G., Gailani M. R., Shanley S., Chidambaram A., Vorechovsky I., Holmberg E., Uden A. B., Gillies S., Negus K., Smyth I., Pressman C., Leffell D. J., Gerrard B., Goldstein A. M., Dean M., Toftgard R., Chenevix-Trench B., Wainwright B., Bale A. E. (1996) Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* **85**, 841-851.

Hahn H., Wojnowski L., Zimmer A. M., Hall J., Miller G., Zimmer A. (1998) Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med* **4**, 619-622.

Hamilton D. L., Abremski K. (1984) Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* **178**, 481-486.

-
- Hardy R. R., Carmack C. E., Shinton S. A., Kemp J. D., Hayakawa K. (1991) Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* **173**, 1213-1225.
- Hayashi K., Yamamoto M., Nojima T., Goitsuka R., Kitamura D. (2003) Distinct signaling requirements for D μ selection, IgH allelic exclusion, pre-B cell transition, and tumor suppression of B cell progenitors. *Immunity* **18**, 825-836.
- Hermanson G. G., Eisenberg D., Kincade P. W., Wall R. (1988) B29: a member of the immunoglobulin gene superfamily exclusively expressed on beta-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 6890-6894.
- Hobeika E., Thiemann S., Storch B., Jumaa H., Nielsen P. J., Pelanda R., Reth M. (2006) Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 13789-13794.
- Hooper J. E., Scott M. P. (1989) The Drosophila patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* **59**, 751-765.
- Huelsken J., Birchmeier W. (2001) New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 547-553.
- Igarashi H., Gregory S. C., Yokota T., Sakaguchi N., Kincade P. W. (2002) Transcription from the Rag1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in the bone marrow. *Immunity* **17**, 117-130.
- Imai T., Jiang M., Chambon P. und Metzger D. (2001) Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 224-228.
- Indra A. K., Warot X., Brocard J., Bornert J. M., Xiao J. H., Chambon P., Metzger D. (1999) Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* **27**, 4324-4327.

-
- Ingham P. W. (2000) How cholesterol modulates the signal. *Curr Biol* **10**, R180-R183.
- Ingham P. W., Placzek M. (2006) Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet* **7**, 841-850.
- Ismaili J., Antica M., Wu L. (1996) CD4 and CD8 expression and T cell antigen receptor gene rearrangement in early intrathymic precursor cells. *Eur J Immunol* **26**,731-737.
- Iwasaki H., Somoza C., Shigematsu H., Duprez E. A., Iwasaki-Arai J., Mizuno S., Arinobu Y., Geary K., Zhang P., Dayaram T., Fenyus M. L., Elf S., Chan S., Kastner P., Huettner C. S., Murray R., Tenen D. G., Akashi K. (2005) Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* **106**, 1590-1600.
- Jacobsen K., Osmond D. G. (1990) Microenvironmental organization and stromal cell associations of B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow. *Eur J Immunol* **20**, 2395-2404.
- Johnson R. L., Rothman A. L., Xie J., Goodrich L. V., Bare J. W., Bonifas J. M., Quinn A. G., Myers R. M., Cox D. R., Epstein E. H. Jr, Scott M. P. (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* **272**, 1668-1671.
- Karasuyama H., Kudo A., Melchers F. (1990) The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med* **172**, 969-972.
- Karasuyama H., Rolink A., Shinkai Y., Young F., Alt F. W., Melchers F. (1994) The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell* **77**, 133-143.
- Katayama N., Shih J. P., Nishikawa S., Kina T., Clark S. C., Ogawa M. (1993) Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors. *Blood* **82**, 2353-2360.

-
- Kato S. (2000) The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J Biochem* **127**, 717-722.
- Khan M., Seppala M., Zoupa M., Cobourne M. T. (2007) Hedgehog pathway gene expression during early development of the molar tooth root in the mouse. *Gene Expr Patterns* **7**, 239-243.
- Kim S., Iizuka K., Aguila H. L., Weissman I. L., Yokoyama W. M. (2000) *In vivo* natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2731-2736.
- Kim S., Iizuka K., Kang H. S., Dokun A., French A. R., Greco S., Yokoyama W. S. (2002) *In vivo* developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* **3**, 523-528.
- Klug C. A., Morrison S. J., Masek M., Hahn K., Smale S. T., Weissman I. L. (1998) Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 657-662.
- Kondo M., Weissman I. L., Akashi K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672.
- Koopman G., Reutelingsperger C. P., Kuijten G. A., Keehnen R. M., Pals S. T., van Oers M. H. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**, 1415-1420.
- Korswagen H. C. (2002) Canonical and non-canonical Wnt signaling pathways in *Caenorhabditis elegans*: variations on a common signaling theme. *Bioessays* **24**, 801-810.
- Koyama M., Ishihara K., Karasuyama H., Cordell J. L., Iwamoto A., Nakamura T. (1997) CD79 alpha/CD79 beta heterodimers are expressed on pro-B cell surfaces without associated mu heavy chain. *Int Immunol* **9**, 1767-1772.

-
- Kozmik Z., Wang S., Dörfler P., Adams B., Busslinger M. (1992) The promotor of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol* **12**, 2262-2672.
- Krause D. S., Theise N. D., Collector M. I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Neutzel S., Sharkis S. J. (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369-377.
- Krop I., Shaffer A. L., Fearon D. T., Schlessel M. S. (1996) The signaling activity of murine CD19 is regulated during cell development. *J Immunol* **157**, 48-56.
- Kudo A., Melchers F. (1987) A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *EMBO J* **6**, 2267-2272.
- Kuhl M. (2002) Non-canonical Wnt signaling in Xenopus: regulation of axis formation and gastrulation. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 243-249.
- Kuhn R., Schwenk F., Aquet M., Rajewsky K. (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427-1429.
- Laiosa C. V., Stadtfeld M., Graf T. (2006) Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* **24**, 705-738.
- Lam C. W., Xie J., To K. F., Ng H. K., Lee K.C., Yuen N. W., Lim P. L., Chan L. Y., Tong S. F., McCormick F. (1999) A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas. *Oncogene* **18**, 833-836.
- Lanier L. L., Phillips J. H., Hackett J. Jr., Tutt M., Kumar V. (1986) Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* **137**, 2735-2739.
- Lee J. J., Ekker S. C., von Kessler D. P., Porter J. A., Sun B. I., Beachy P. A. (1994) Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* **266**, 1528-1537.

-
- Lee P. P., Fitzpatrick D. R., Beard C., Jessup H. K., Lehar S., Makar K. W., Perez-Melgosa M., Sweetser M. T., Schlissel M. S., Nguyen S., Cherry S. R., Tsai J. H., Tucker S. M., Weaver W. M., Kelso A., Jaenisch R., Wilson C. B. (2001) A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* **15**, 763-774.
- Li Y. S., Hayakawa K., Hardy R. R. (1993) The regulated expression of B lineage-associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med* **178**, 951-960.
- Li Y. S., Wasserman R., Hayakawa K., Hardy R. R. (1996) Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* **5**, 527-535.
- Lin H., Grosschedl R. (1995) Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* **376**, 263-267.
- Lindström E., Shimokawa T., Toftgård R., Zaphiropoulos P. G. (2006) PTCH mutations: distribution and analyses. *Hum Mutat* **27**, 215-219.
- Linton P. J., Dorshkind K. (2004) Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* **5**, 133-139.
- Loder F., Mutschler B., Ray R. J., Paige C. J., Sideras P., Torres P., Lamers M. C., Carsetti R. (1999) B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* **190**, 75-89.
- Loffert D., Ehrlich A., Muller W., Rajewsky K. (1996) Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity* **4**, 133-144.
- Lowrey J. A., Stewart G. A., Lindey S., Hoyne G. F., Dallman M. J., Howie S. E., Lamb J. R. (2002) Sonic hedgehog promotes cell cycle progression in activated peripheral CD4(+) T lymphocytes. *J Immunol* **169**, 1869-1875.

-
- Ma Y., Erkner A., Gong R., Yao S., Taipale J., Basler K., Beachy P. A. (2002) Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell* **111**, 63-75.
- Mackarehtschian K., Hardin J. D., Moore K. A., Boast S., Goff S. P., Lemischka I. R. (1995) Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* **3**, 147-161.
- Maillard I., Fang T., Pear W. S. (2005) Regulation of lymphoid development, differentiation and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol* **23**, 945-974.
- Maki K., Sunaga S., Ikuta K. (1996) The V-J recombination of T cell receptor-gamma genes is blocked in interleukin-7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* **184**, 2423-2427.
- Maki K., Sunaga S., Komagata Y., Kodaira Y., Mabuchi A., Karasuyama H., Yokomuro K., Miyazaki J. I., Ikuta K. (1996) Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7172-7177.
- Mao X., Fujiwara Y., Orkin S. H. (1999) Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5037-5042.
- Mao X., Fujiwara Y., Chapdelaine A., Yang H., Orkin S.H. (2001) Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood* **97**, 324-326.
- Marigo V., Davey R. A., Zuo Y., Cunningham J. M., Tabin C. J. (1996) Biochemical evidence that Patched is the Hedgehog receptor. *Nature* **384**, 176-179.
- Marigo V., Roberts D. J., Lee S. M., Tsukurov O., Levi T., Gastier J. M., Epstein D. J., Gilbert D. J., Copeland N. G., Seidman C. E. *et al.*, (1995) Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the Drosophila segment polarity gene hedgehog. *Genomics* **28**, 44-51.

Martin C. H., Aifantis I., Scimone M. L., von Boehmer H., Gounari F. (2003) Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat Immunol* **4**, 866-873.

Martin S. J., Reutelingsperger C. P., McGahon A. J., Rader J. A., van Schie R.C., LaFace D. M., Green D. R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**, 1545-1556.

Mathieu C., van Etten E., Gysemans C., Decallonne B., Kato S., Laureys J., Depovere J., Valckx D., Verstuyf A., Bouillion R. (2001) In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. *J Bone Miner Res* **16**, 2057-2065.

Matsuzaki Y., Gytoku J., Ogawa M., Nishikawa S., Katsura Y., Gachelin G. (1993) Characterisation of c-Kit positive intrathymic stem cells that are restricted to lymphoid differentiation. *J Exp Med* **178**, 1283-1292.

Matthias P., Rolink A. G. (2005) Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* **5**, 497-508.

McKenna H. J., Stocking K. L., Miller R. E., Brasel K., De Smedt T., Marakovsky E., Maliszewski C. R., Lynch D. H., Smith J., Pulendran B., Roux E. R., Teepe M., Lyman S. D., Peschon J. J. (2000) Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**, 3489-3497.

McKercher S. R., Torbett B. E., Anderson K. L., Henkel G. W., Vestal D. J., Baribault H., Klemsz M., Feeney A. J., Wu G. E., Paige C. J., Maki R. A. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* **15**, 5647-5658.

Melchers F., Karasuyama H., Haasner D., Bauer S., Kudo A., Sakaguchi N., Jameson B., Rolink A. (1993) The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* **14**, 60-68.

Meffre E., Casellas R., Nussenzweig M. C. (2000) Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol* **1**, 379-385.

Metcalf D. (1999) Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct? *Ann N Y Acad Sci* **872**, 289-304.

Miller J. P., Izon D., DeMuth W., Gerstein R., Bhandoola A., Allman D. (2002) The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. *J Exp Med* **196**, 705-711.

Miltenburger H. G., Sachse G., Schliermann M. (1987) S-phase detection with a monoclonal antibody. *Dev Biol Stand* **66**, 91-99.

Mombaerts P., Iacomini J., Johnson R. S., Herrup K., Tonegawa S., Papaioannou V. E. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-877.

Moore T. A., von Freeden-Jeffrey U., Murray R., Zlotnik A. (1996) Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7 ^{-/-} mice. *J Immunol* **157**, 2366-2373.

Moretta L., Moretta A. (2004) Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* **23**, 255-259.

Morgan B., Sun L., Avitahl N., Andrikopoulos K., Ikeda T., Gonzales E., Wu P., Nebel S., Georgopoulos K. (1997) Ailos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J* **16**, 2004-2013.

Muegge K., Vila M. P., Durum S. K. (1993) Interleukin-7: a cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor beta gene. *Science* **261**, 93-95.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., 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.

-
- Murre C., McCaw P. S., Baltimore D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *dautherless*, *MyoD*, and *myc* proteins. *Cell* **56**, 777-783.
- Murone M., Rosenthal A., de Sauvage F. J. (1999) Sonic hedgehog signaling by the Patched-Smoothed receptor complex. *Curr Biol* **9**, 76-84.
- Nagasawa T. (2006) Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* **6**, 107-116.
- Neumann C. J. (2005) Hedgehogs as negative regulators of the cell cycle. *Cell Cycle* **4**, 1139-1140.
- Nihiro H., Clark E. A. (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* **2**, 946-956.
- Nüsslein-Volhard C., Weischaus E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
- Nutt S. L., Heavey B., Rolink A. G., Busslinger M. (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* **401**, 556-562.
- Nutt S. L., Morrison A. M., Dörfler P., Rolink A., Busslinger M. (1998) Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J* **17**, 2319-2333.
- Nutt S. L., Urbanek P., Rolink A., Busslinger M. (1997) Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the *IgH* locus. *Genes Dev* **11**, 476-491.
- Oettinger M. A., Schatz D. G., Gorka C., Baltimore D. (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517-1523.

-
- Okada S., Nakauchi H., Nagayoshi K., Nishikawa S., Miura Y., Suda T. (1992) In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* **80**, 3044-3050.
- O'Kelly J., Hisatake J., Hisataka Y., Bishop J., Norman A., Koeffler H. P. (2002) Normal myelopoiesis but abnormal T lymphocyte responses in vitamin D receptor knockout mice. *J Clin Invest* **109**, 1091-1099.
- O'Riordan M., Grosschedl R. (1999) Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* **11**, 21-31.
- O'Riordan M., Grosschedl R. (2000) Transcriptional regulation of early B-lymphocyte differentiation. *Immunol Rev* **175**, 94-103.
- Outram S. V., Varas A., Pepicelli C. V., Crompton T. (2000) Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocytes. *Immunity* **13**, 187-197.
- Pathi S., Pagan-Westphal S., Baker D. P., Garber E. A., Rayhorn P., Bumcrot D., Tabin C. J., Blake Pepinsky R., Willimas K. P. (2001) Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev* **106**, 107-117.
- Pearse R. V. II, Collier L. S., Scott M. P., Tabin C. J. (1999) Vertebrate homologs of Drosophila suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators. *Dev Biol* **212**, 323-336.
- Pearse M., Wu L., Egerton M., Wilson A., Shortman K., Scollay R. (1989) A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 1614-1618.
- Peschon J. J., Morrissey P. J., Grabstein K. H., Ramsdell F. J., Marakovsky E., Gliniak B. C., Park L. S., Ziegler S. F., Williams D. E., Ware C. B., Meyer J. D., Davison B. L. (1994) Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* **180**, 1955-1960.

-
- Petro J. B., Gerstein R. M., Lowe J., Carter R. S., Shinnars N., Khan W. N. (2002) Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J Biol Chem* **277**, 48009-48019.
- Porse B. T., Bryder D., Theilgaard-Monch K., Hasemann M. S., Anderson K., Damgaard I., Jacobsen S. E. und Nerlov C. (2005) Loss of C/EBP alpha cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage. *J Exp Med* **202**, 85-96.
- Porter J. A., von Kessler D. P., Ekker S. C., Young K. E., Lee J. J., Moses K., Beachy P. A. (1995) The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* **374**, 363-366.
- Porter J. A., Young K. E., Beachy P.A. (1996) Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* **274**, 255-259.
- Pui J. C., Allman D., Xu L., DeRocco S., Karnell F. G., Bakkour S., Kee J. Y., Kadesch T., Hardy R. R., Aster J. C., Pear W.S. (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**, 299-308.
- Radtke F., Wilson A., Mancini S. J., MacDonald H. R. (2004) Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* **5**, 247-253.
- Radtke F., Wilson A., Stark G., Bauer M., van Meerwijk J., MacDonald H. R., Aguet M. (1999) Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547-558.
- Rajewsky K., Gu H., Kuhn R., Betz U. A., Muller W., Roes J., Schwenk F. (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest* **98**, 600-603.
- Raynal P., Pollard H. B. (1994) Annexins: The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1197**, 63-93.

-
- Reth M. (1991) Regulation of B-cell development by pre-B-cell receptors. *Curr Biol* **1**, 198-199.
- Rickert R. C., Rajewsky K., Roes J. (1995) Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* **376**, 352-355.
- Roberts W. M., Douglass E. C., Peiper S. C., Houghton P. J., Look A.T. (1989) Amplification of the gli gene in childhood sarcomas. *Cancer Res* **49**, 5407-5413.
- Rodewald H. R., Kretzschmar K., Swat W., Takeda S. (1995) Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo. *Immunity* **3**, 313-319.
- Rolink A. G., Andersson J., Melchers F. (2004) Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development. *Immunol Rev* **197**, 41-50.
- Rosmaraki E. E., Douagi I., Roth C., Colucci F., Cumano A., Di Santo J. P. (2001) Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol* **31**, 1900-1909.
- Roy S., Ingham P. W. (2002) Hedgehogs tryst with the cell cycle. *J Cell Sci* **115**, 4393-4397.
- Rubin L. L., de Sauvage F. J. (2006) Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 1026-1033.
- Ruiz i Altaba A., Palma V., Dahmane N. (2002) Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* **3**, 24-33.
- Ruiz i Altaba A., Sanchez P., Dahmane N. (2002) Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* **2**, 361-372.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

-
- Sakaguchi N., Kashiwamura S., Kimoto M., Thalmann P., Melchers F. (1988) B lymphocyte lineage restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. *EMBO J* **7**, 3457-3464.
- Saldanha G., Ghura V., Potter L., Fletcher A. (2004) Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *Br J Dermatol* **151**, 157-164.
- Sambandam A., Maillard I., Zediak V. P., Xu L., Gerstein R. M., Aster J. C., Pear W. S., Bhandoola A. (2005) Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* **6**, 663-670.
- Sanai N., Alvarez-Buylla A., Berger M. S. (2005) Neuronal stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* **353**, 811-822.
- Sasaki K., Murakami T., Takahashi M. (1989) Flow cytometric analysis of cell proliferation kinetics using the anti-BrdUrd antibody. *Gan To Kagaku Ryoho* **16**, 2338-2344.
- Schamel W. W., Reth M. (2000) Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* **13**, 5-14.
- Schebesta M., Pfeffer P. L., Busslinger M. (2002) Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the *BLNK* gene. *Immunity* **17**, 473-485.
- Scott E. W., Fisher R. C., Olson M. C., Kehrl E. W., Simon M. C., Singh H. (1997) PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity* **6**, 437-447.
- Scott E. W., Simon M.C., Anastasi J., Singh H. (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**, 1573-1577.
- Shah D. K., Hager-Theodorides A. L., Outram S.V., Ross S. E., Varas A., Crompton T. (2004) Reduced thymocyte development in sonic hedgehog knockout embryos. *J Immunol* **172**, 2296-2306.

Shinkai Y., Rathbun G., Lam K. P., Oltz E. M., Stewart V., Mendelsohn M., Charron J., Datta M., Young F., Stall A. M., Alt F.W. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-867.

Shortman K., Wu L. (1996) Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol* **14**, 29-47.

Sigvardsson M. (2000) Overlapping expression of early B-cell factor and basic helix-loop-helix proteins as a mechanism to dictate B-lineage-specific activity of the $\lambda 5$ promoter. *Mol Cell Biol* **20**, 3640-3654.

Sigvardsson M., Clark D. R., Fitzsimmons D., Doyle M., Akerblad P., Breslin T., Bilke S., Li R., Yeaman C., Zhang G., Hagman J. (2002) Early B-cell factor, E2A, and Pax-5 cooperate to activate the early B-cell-specific mb-1 promoter. *Mol Cell Biol* **22**, 8539-8551.

Sigvardsson M., O'Riordan M., Grosschedl R. (1997) EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity* **7**, 25-36.

Singh H., Medina K. L., Pongubala J. M. R. (2005) Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 4949-4953.

Sitnicka E., Brakebusch C., Martensson I.-L., Svensson M., Agace W. W., Sigvardsson M., Buza-Vidas N., Bryder D., Cilio C. M., Ahlenius H., Maraskovsky E., Peschon J. J., Jacobsen S. E. W. (2003) Complementary signaling through flt3 and Interleukin-7 receptor α is indispensable for fetal and adult B cell genesis *J Exp Med* **198**, 1495-1506.

Sitnicka E., Bryder D., Theilgaard-Monch K., Buza-Vidas N., Adolfsson J., Jacobsen S. E. (2002) Key role of flt3 Ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* **17**, 463-472.

Smale S. T., Dorshkind K. (2006) Hematopoiesis flies high with Ikaros. *Nat Immunol* **7**, 367-369.

-
- Smyth I., Narang M. A., Evans T., Heimann C., Nakamura Y., Chenevix-Trench G., Pietsch T., Wicking C., Wainright B. J. (1999) Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet* **8**, 291-297.
- Soriano P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**, 70-71.
- Souabni A., Cobaleda C., Schebesta M., Busslinger M. (2002) Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing *Notch1*. *Immunity* **17**, 781-793.
- Stamatakis D., Ulloa F., Tsoni S. V., Mynett A., Briscoe J. (2005) A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev* **19**, 626-641.
- Sternberg N., Hamilton D. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* **150**, 467-486.
- Sternberg N., Hamilton D., Hoess R. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol* **150**, 487-507.
- Stone D. M., Hynes M., Armanini M., Swanson T. A., Gu Q., Johnson R. L., Scott M. P., Pennica D., Goddard A., Philips H., Noll M., Hooper J.E., de Sauvage F., Rosenthal A. (1996) The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* **384**, 129-134.
- Su T. T., Rawlings D. J. (2002) Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J Immunol* **168**, 2101-2110.
- Su Y. W., Flemming A., Wossning T., Hobeika E., Reth M., Jumma H. (2003) Identification of a pre-BCR lacking surrogate light chain. *J Exp Med* **198**, 1699-1706.
- Taipale J., Cooper M. K., Maiti T., Beachy P. A. (2002) Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* **418**, 892-897.

Tedder T. F., Zhou L. J., Engel P. (1994) The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today* **15**, 437-442.

Till J. E., McCulloch E. A. (1963) Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo. *Radiat Res* **18**, 96-105.

Torres R. M., Flaswinkel H., Reth M., Rajewsky K. (1996) Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science* **272**, 1804-1808.

Tostar U., Malm C. J., Meis-Kindblom J. M., Kindblom L. G., Toftgard R., Uden A. B. (2006) Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol* **208**, 17-25.

Traver D., Akashi K., Manz M., Merad M., Miyamoto T., Engleman E. G., Weissman I. L. (2000) Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* **290**, 2152-2154.

Trowbridge J. J., Scott M. P., Bhatia M. (2006) Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to hematopoietic regeneration. *Proc Acad Sci USA* **103**, 14134-14139.

Tsubata T., Reth M. (1990) The products of pre-B cell-specific genes (λ 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* **172**, 973-976.

Tudor K. S., Payne K. J., Yamashita Y., Kincade P.W. (2000) Functional assessment of precursors from murine bone marrow suggests a sequence of early B lineage differentiation events. *Immunity* **12**, 335-345.

Turka L. A., Schatz D. G., Oettinger M. A., Chun J. J., Gorka C., Lee K., McCormack W. T., Thompson C. B. (1991) Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science* **253**, 778-781.

-
- Uchida N., Weissman I. L. (1992) Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* **175**, 175-184.
- Urbanek P., Wang Z.-Q., Fetka I., Wagner E. F., Busslinger M. (1994) Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* **79**, 901-912.
- van den Heuvel M., Ingham P. W. (1996) Smoothed encodes a receptor-like serpentine proteine required for Hedgehog signalling. *Nature* **382**, 547-551.
- Varas A., Hager-Theodorides A. L., Sacedón R., Vicente A., Zapata A. G., Crompton T. (2003) The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol* **24**, 197-206.
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Meth* **184**, 39-51.
- Wang J. H., Nichogiannopoulou A., Wu L., Sun L., Sharpe A. H., Bigby M., Georgopoulos K. (1996) Selektive defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* **5**, 537-549.
- Wayne J., Suh H., Misulovin Z., Sokol K. A., Inaba K., Nussenzweig M. C. (1994) A regulatory role for recombinase activating genes, RAG-1 and RAG-2, in T cell development. *Immunity* **1**, 95-107.
- Weerkamp F., Pike-Overzet K., Staal F. J. T. (2006) T-sing progenitors to commit. *Trends Immunol* **27**, 125-131.
- Wetmore C. (2003) Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 34-42.
- Wienands J. (2005) Unraveling B cell receptor mechanics. *Nat Immunol* **6**, 1072-1074.

Wienands J., Schweikert J., Wollscheid B., Jumaa H., Nielsen P. J., Reth M. (1998) SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med* **188**, 791-795.

Wilson A., Ferrero I., MacDonald H. R., Radtke F. (2000) Cutting edge: An essential role for Notch-1 in the development of both thymus-independent and -dependent T cells in the gut. *J Immunol* **165**, 5397-5400.

Wilson A., MacDonald H. R. (1995) Expression of genes encoding the pre-TCR and CD3 complex during thymus development. *Int Immunol* **7**, 1659-1664.

Wilson A., MacDonald H. R., Radtke F. (2001) Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* **194**, 1003-1012.

Winkler T. H., Rolink A., Melchers F., Karasuyama H. (1995) Precursor B cells of mouse bone marrow express two different complexes with the surrogate light chain on the surface. *Eur J Immunol* **25**, 446-450.

Wolfer A., Bakker T., Wilson A., Nicolas M., Ioannidis V., Littman D. R., Lee P. P., Wilson C. B., Held W., MacDonald H. R., Radtke F. (2001) Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8 T cell development. *Nat Immunol* **2**, 235-241.

Wu L., Scollay R., Egerton M., Pearse M., Sprangrude G. J., Shortman K. (1991) CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature* **349**, 71-74.

Xuan Y. H., Jung H. S., Choi Y. L., Shin Y. K., Kim H. J., Kim K. H., Kim W. J., Lee Y. J., Kim S. H. (2006) Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. *Mod Pathol* **19**, 1139-1147.

Yuan D., Witte P. L. (1988) Transcriptional regulation of mu and delta gene expression in bone marrow pre-B and B lymphocytes. *J Immunol* **140**, 2808-2814.

Zambrowicz B. P., Imamoto A., Fiering S., Herzenberg L. A., Kerr W. G., Soriano P. (1997) Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 3789-3794.

Zhang X. M., Ramalho-Santos M., McMahon A. P. (2001) Smoothened mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node. *Cell* **105**, 781-792.

Zhuang Y., Soriano P., Weintraub H. (1994) The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* **79**, 875-884.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Modell der frühen Hämatopoese im Knochenmark.....	3
Abbildung 2	Übersicht der Zellen des hämatopoietischen Systems mit Fokus auf das Expressionsprofil der B-Zellen in den verschiedenen Entwicklungsstadien.....	6
Abbildung 3	Charakterisierung der B-Zell-Lymphopoese anhand entwicklungsspezifischer Oberflächenproteine und dem Status der V(D)J-Rekombination.....	8
Abbildung 4	Modell der T-Zell-Entwicklung im Thymus.....	11
Abbildung 5	Modell der Sonic hedgehog/Patched-Signalkaskade.....	14
Abbildung 6	Cre-vermittelte Deletion von Exon 8 und 9 im <i>Ptch^{fllox}</i> -Allel.....	16
Abbildung 7	Veränderungen des Fells von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen.....	39
Abbildung 8	Die induzierte Inaktivierung von <i>Ptch</i> im adulten Tier führt zu histologischen Anomalien der Gewebestruktur und Zellularität des Thymus und resultiert in der Verkleinerung des Organs.....	40
Abbildung 9	Verlust der T-Zell-Population im Thymus von <i>tPtch^{-/-}</i> Mäusen.....	43
Abbildung 10	Reifungsdefekt der T-Zellen im Thymus von <i>tPtch^{-/-}</i> Mäusen.....	44
Abbildung 11	Der Verlust der Zellen in frühen T-Zell-Entwicklungsstadien im Thymus von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen korreliert nicht mit Apoptose.....	45
Abbildung 12	Der Verlust der frühen T-Zell-Populationen im Thymus von <i>tPtch^{-/-}</i> Mäusen ist unabhängig von den Induktionsbedingungen der Inaktivierung von <i>Ptch</i>	47
Abbildung 13	Verlust der ETP im Thymus von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen.....	49
Abbildung 14	Verlust der T1 B-Zell-Population in der Milz von <i>tPtch^{-/-}</i> Mäusen.....	52
Abbildung 15	T1 B-Zellen reagieren sensitiv auf Tamoxifen, dieser Effekt ist jedoch zwei Wochen nach der letzten Injektion vollständig kompensiert.....	54
Abbildung 16	Defekt in der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen.....	56
Abbildung 17	Tamoxifen inhibiert transient die Entwicklung der frühen B-Zellen im Knochenmark.....	57
Abbildung 18	Zunahme der rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen.....	59
Abbildung 19	Reduktion der B- und T-Zellen im Blut von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen.....	61
Abbildung 20	Reduktion der NK-Zellen im Blut von <i>tPtch^{-/-}</i> Mäusen.....	63

Abbildung 21	Reduktion der NK-Zellen in der Milz von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen.....	64
Abbildung 22	Die Inaktivierung von <i>Ptch</i> im adulten Tier führt im Knochenmark zum Verlust der Expression essentieller Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren der B-Zell-Entwicklung.....	66
Abbildung 23	Differenzierungsdefekt der lymphoiden Linie im CLP-Stadium des Knochenmarks von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen.....	68
Abbildung 24	Die Fraktionen Lin ⁻ Knochenmarkszellen von Kontrolltieren sind 15 Tage nach der ersten Injektion unverändert.....	70
Abbildung 25	Die Fraktionen Lin ⁻ Knochenmarkszellen von Kontrolltieren sind 19 Tage nach der ersten Injektion unverändert.....	71
Abbildung 26	Die Inaktivierung von <i>Ptch</i> im adulten Tier führt in Lin ⁻ Knochenmarkszellen zum Verlust der Expression essentieller Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren der lymphoiden Linie.....	73
Abbildung 27	Reduktion der Zellzyklusprogression in Lin ⁻ Knochenmarkszellen von <i>Ptch</i> -defizienten Mäusen.....	76
Abbildung 28	Die Inaktivierung von <i>Ptch</i> führt zu einer reduzierten Zellzyklusprogression der für die lymphoiden Linie determinierten CLP-Fraktion.....	77
Abbildung 29	Lin ⁻ Knochenmarkszellen aus <i>Ptch</i> -defizienten Spendertieren repopulieren die lymphoide Linie in <i>Ptch</i> exprimierenden Rezipienten.....	81
Abbildung 30	Aus <i>Ptch</i> -defizienten Lin ⁻ Knochenmarkszellen entwickelte B- und T-Zellen besitzen nahezu vollständig deletierte <i>Ptch</i> Allele.....	82
Abbildung 31	Regulation der T-Zell-Entwicklung durch die Shh/ <i>Ptch</i> -Signalkaskade.....	85
Abbildung 32	Regulation der T-Zell-Lymphopoiese durch Notch- und Shh/ <i>Ptch</i> -Signale.....	87
Abbildung 33	Verlust der B- und T-Zell-Lymphopoiese in <i>Ptch</i> -defizienten Tieren.....	88
Abbildung 34	Regulation der Hämatopoiese durch die Shh/ <i>Ptch</i> -Signalkaskade.....	91

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Auflistung der verwendeten Primärantikörper.....	19
Tabelle 2	Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.....	23
Tabelle 3	Die Vorläuferzellen der myeloiden Linie des Knochenmarks besitzen nach Inaktivierung von <i>Ptch</i> weiterhin uneingeschränktes Differenzierungspotential.....	79

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Kai Dittmann
Geburtsdatum 9. April 1974
Geburtsort Bünde
Familienstand ledig

Schulbildung

1980-1984 Grundschule Kirchlengern
1984-1990 Realschule Bünde-Mitte
Abschluss: Fachoberschulreife
1990-1993 Gymnasium am Markt in Bünde
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

1993-1996 Ausbildung zum Chemielaboranten, Fakultät für Chemie, Didaktik der Chemie I, Universität Bielefeld, Prof. Dr. H. Wenck
1996-2001 Studium der Biochemie an der Universität Bielefeld
05/2001-01/2002 Diplomarbeit in der Abteilung Biochemie und Molekulare Immunologie der Universität Bielefeld, Prof. Dr. J. Wienands, Thema der Diplomarbeit: „Funktionsanalyse der Proteininteraktionsdomänen des intrazellulären Adapterproteins SLP-65“
Abschluss: Diplom-Biochemiker
22.03.-02.04.2004 Versuchstierkundlicher Kurs mit Prüfung am Tierschutzinformationszentrum für die Biomedizinische Forschung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (TIZ-BIFO)

Berufserfahrung

02/2002-02/2005 wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Biochemie und Molekulare Immunologie der Universität Bielefeld, Prof. Dr. J. Wienands
seit 02/2005 wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie der Georg-August-Universität Göttingen, Bereich Humanmedizin, Prof. Dr. J. Wienands

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter ausschließlicher Nutzung der aufgeführten Materialien, Methoden und Literaturquellen an der Universität Bielefeld und an der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. J. Wienands angefertigt zu haben.

Bielefeld, den 26.03.2007

Kai Dittmann

