

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -

Endomucin-Expression und -Stammzellfunktionalität in Hämatopoese und Leukämie

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Rauwald, Linn
aus Berlin

2018

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang E. Berdel
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Serve

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2018

*Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang E. Berdel
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Serve*

ZUSAMMENFASSUNG

Endomucin-Expression und -Stammzellfunktionalität in Hämatopoese und Leukämie

Rauwald, Linn

Die Identifikation und Isolation von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) anhand von Oberflächenmarkern hat Bedeutung sowohl für die Grundlagenforschung, beispielsweise zur funktionellen und molekularen Erfassung der Mechanismen von Selbsterneuerung und Differenzierung, als auch für die klinische Anwendung, insbesondere in der Transplantationsmedizin. Endomucin ist ein Sialomucin, welches ursprünglich als Oberflächenantigen endothelialer Zellen identifiziert wurde. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Endomucin in der physiologischen und pathologischen Hämatopoese zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass murines Endomucin auch auf Zellen des hämatopoetischen Systems der Maus vorkommt, nämlich auf unreifen Zellen des Lin⁻Scal⁺ckit⁺ hämatopoetischen Stammzellpools. Endomucin wird mit zunehmender Reife nicht mehr exprimiert und kann somit als muriner Stammzellmarker genutzt werden. Weiterhin konnte erstmals dargestellt werden, dass Endomucin auch beim Menschen auf Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird und hier speziell in der CD34-positiven Fraktion angereichert ist, in der die meisten HSCs enthalten sind. Der Nachweis gelang mittels FACS-Analysen, RT-PCR und Tissue Array. Zellen, welche sowohl den Oberflächenmarker CD34 als auch das Oberflächenantigen Endomucin koexprimieren, wiesen in *in vitro* Assays Stammzellcharakteristika auf. Diese waren gekennzeichnet durch eine initial langsame Wachstumsrate, jedoch im Folgenden verlängerte Überlebenszeit durch anhaltende Selbsterneuerung und Proliferation. Darüber hinaus erreichten CD34⁺Endomucin⁺ Zellen, in verschiedenen Zellzahlen in NOD/SCID-Mäuse transplantiert, stets ein höheres Engraftment als CD34⁺Endomucin⁻ Zellen (Genehmigungsbescheid zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren vom 14.04.2003, Az.: 50.0835.1.0 (G25/2003)). Diese neuen Ergebnisse legen nahe, dass CD34⁺Endomucin⁺ Zellen länger anhaltende und ausgeprägtere funktionelle Stammzeleigenschaften besitzen als CD34⁺Endomucin⁻ Zellen und somit Endomucin einen echten hämatopoetischen Stammzellmarker innerhalb der Population der CD34⁺ Zellen darstellt. Die gleiche Methodik wurde erstmalig an hämatopoetischen Stammzellerkrankungen angewandt. Hier konnte eine hohe Endomucin-Expression in immortalisierten Zelllinien und Knochenmarkproben von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) nachgewiesen werden, während bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) die Endomucin-Konzentrationen niedrig waren. Zusätzlich durchgeführte statistische Analysen konnten keine Korrelation zwischen Endomucin-Expression und verschiedenen Krankheitsparametern und -verläufen von AML-Patienten feststellen.

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2018

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Endomucin-Expression und -Stammzellfunktionalität in Hämatopoese und Leukämie

in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A des Universitätsklinikums Münster unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang E. Berdel

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Linn Rauwald

Hamburg, den 29.07.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Hämatopoese	1
1.1.1 Hämatopoetische Stammzellen	1
1.1.2 Entstehung des hämatopoetischen Systems	5
1.1.3 Identifikation primitiver hämatopoetischer Zellen	5
1.1.4 Regulation der Hämatopoese	8
1.1.5 Korrelation zur Klinik	10
1.2 Akute myeloische Leukämie	13
1.3 Akute lymphatische Leukämie	20
1.4 Endomucin	22
2 Zielsetzung	28
3 Material und Methoden	29
3.1 Material	29
3.1.1 Geräte	29
3.1.2 Kunststoffwaren und Einwegartikel	31
3.1.3 Programme und Datenbanken	32

3.1.4	Chemikalien und Reagenzien	32
3.1.5	Zellkulturmedien und Zusätze	35
3.1.6	Puffer und Lösungen	37
3.1.7	Enzyme	40
3.1.8	Primer und Oligonukleotide	41
3.1.9	Antikörper	41
3.1.10	Zelllinien	42
3.1.11	Patientenproben	44
3.2	Zellbiologische Methoden	45
3.2.1	Zellkultur	45
3.2.2	Gefrierkonservierung von Zellen	45
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl	45
3.2.4	Aufbereitung von Nabelschnurblut mittels Ficollseparation	46
3.2.5	Colony Assay	46
3.2.6	Durchflusszytometrie	47
3.2.7	Transplantation in NOD/SCID-Mäuse	48
3.2.8	Tissue Array	50
3.3	Proteinbiochemische Methoden	52
3.3.1	Protein-Lysate	52
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Test)	52
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
3.3.4	Western Blot	53
3.4	Molekularbiologische Methoden	55
3.4.1	RNA-Isolierung	55

3.4.2	Bestimmung der Konzentration von RNA und DNA	56
3.4.3	DNase-Behandlung	56
3.4.4	Reverse Transkription	56
3.4.5	Real-time RT-PCR (Taqman)	57
3.5	Datenanalyse und Statistik	60
4	Ergebnisse.....	61
4.1	Expression von Endomucin auf murinen hämatopoetischen Zellen	61
4.2	Expression von Endomucin auf humanen Zellen	62
4.3	Colony Assays	68
4.4	Transplantation in NOD/SCID Mäuse	69
4.5	Tissue Array	73
4.5.1	Vergleich der Expression von Endomucin zwischen Proben aus normalem Knochenmark, CD34+ Zellen und AML-Knochenmark	74
4.5.2	Endomucin auf Tumorzelllinien	75
4.6	Endomucin in der ALL	77
5	Diskussion.....	79
5.1	Endomucin in der Hämatopoese	79
5.2	Endomucin und die leukämische Stammzelle	82
6	Zusammenfassung.....	85

7	Literaturverzeichnis.....	87
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	95
9	Danksagungen.....	97
10	Lebenslauf.....	98
11	Genehmigungsbescheid gemäß § 8 Tierschutzgesetz.....	100

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
AGM	Aorta-Gonaden-Mesonephros
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AKC	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure
BMP-4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CBF	<i>Core-binding-factor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMP	<i>Common myeloid progenitor</i>
CSF	<i>Colony-Stimulating Factor</i>
CFU-S	<i>Colony-forming unit – spleen</i>
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ct-Wert	<i>Cycle Threshold</i>
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
Na-EDTA	Ethylendiamintetraessigsäuresalz
ETO	<i>Eight-Twenty-One</i>
FAB	<i>French-American–British</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i> = Durchflusszytometrie

FAM	6-Carboxy- Fluorescein
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> = Fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward angle light scatter</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FLT3-LM	Längenmutation der FMS-ähnlichen Tyrosinkinase 3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GMP	Granulozyten/Makrophagen Progenitor
Gy	Gray
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HEV	hochendotheliale Venolen
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
ICH	Immunhistochemie
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
KM	Knochenmark
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth</i> Medium
LDH	Lactatdehydrogenase
Lin ⁻	<i>Lineage negative</i>
LSC	Leukämische Stammzelle
LT-HSC	<i>Long-term</i> hämatopoetische Stammzellen
MEP	Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitor
MLL	<i>Mixed-Lineage Leukemia</i>
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MPP	Multipotente Progenitorzelle
MRD	Minimale Resterkrankung
MUC	Mucin

MYH	<i>Myosin Heavy Chain</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	<i>Nonobese diabetic</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS Tween
PE	Phycoerythrin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
PML	Promyelozytenleukämie
POX	Peroxidase
p.t.	Post transplantationem
PTD	Partielle Tandemduplikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAR α	<i>Retinoic Acid Receptor α</i>
RIPA-Puffer	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR
Sca1	<i>Stem cell antigen 1</i>
SCID	<i>Severe combined immune-deficient</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfat</i>
S.E.	<i>Standard Error</i>
SOB-Medium	<i>Super Optimal Broth</i> Medium
SRC	<i>SCID repopulating cells</i>
SSC	<i>Sideward angle light scatter</i>
ST-HSC	<i>Short-term hämatopoetische Stammzellen</i>
Tab.	Tabelle

TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Im menschlichen Organismus werden täglich ca. 1 Billionen (10^{12}) Blutzellen, darunter 200 Milliarden Erythrozyten und 70 Milliarden Neutrophile, gebildet, um den normalen Verbrauch an Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten zu kompensieren.^[40, 45] Neben der kontinuierlichen hohen Produktivität kann sich die Blutproduktion zusätzlich schnell und stabil besonderen Belastungen wie Blutungen oder Infektionen anpassen und die Homöostase aufrechterhalten. Diesen komplexen und fein abgestimmten Prozess nennt man Hämatopoese. Beim erwachsenen gesunden Menschen findet die Hämatopoese im Knochenmark statt. Die aktive Menge an Knochenmark beträgt etwa 2600g und enthält schätzungsweise $1,3 \times 10^{12}$ Markzellen.^[67] Die Bedeutung der Hämatopoese sowie die typische Lebensdauer der reifen Blutzellen der einzelnen Reifungslinien lassen sich an den Auswirkungen einer Knochenmarksschädigung verdeutlichen: Granulozyten, Teil der Infektabwehr, bleiben nur 6-7 Stunden intravaskulär, so dass es zunächst zu einem Granulozyten-Abfall kommt.^[49, 166] So ist z.B. die Chemotherapie-induzierte Zytopenie eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität in der Behandlung von Krebs.^[158] Eine Thrombozytopenie erscheint bei einer mittleren Lebensspanne der Thrombozyten von 10 Tagen erst danach und erhöht das Blutungsrisiko.^[33] Erythrozyten, u.a. Sauerstoff- und CO_2 -Transporter, haben mit 120 Tagen die längste Lebenserwartung, ein Produktionsausfall führt zur Anämie.^[154]

1.1.1 Hämatopoetische Stammzellen

Die Basis der Hämatopoese bildet ein relativ kleiner Pool von Knochenmarkzellen, die hämatopoetischen Stammzellen (HSC), welche 0,05-0,5 % aller Zellen des Knochenmarks ausmachen.^[19, 67, 181] Die hämatopoetischen Stammzellen haben die Fähigkeit, in alle Zelltypen jeder Reifungslinie der Hämatopoese zu differenzieren, und bilden so die Spitze des klassischen hierarchischen hämatopoetischen Modells (Abb. 1).

Die Existenz der hämatopoetischen Stammzelle wurde erstmals 1909 vom russischen Militärarzt Alexander Maximow postuliert. Maximows Stammzellkonzept sah eine einzige, morphologisch einem Lymphozyten entsprechende Zellart als Ursprung aller Blutzellen vor,

welche je nach Aufenthaltsort unterschiedliche Differenzierungsprodukte liefern könne.^[115] Eine genauere Identifizierung der HSC begann Anfang der 1950er Jahre auf der Suche nach Therapien für die Auswirkungen von Körperbestrahlung^[52, 113] und die erste putative HSC wurde 1961 durch Till und McCulloch beschrieben, die colony-forming unit-spleen (CFU-S). Damit konnte die Existenz von frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen demonstriert werden, welche nach Transplantation in bestrahlte Mäuse multilineäre hämatopoetische Kolonien (CFU-S) in der Milz hervorbringen.^[169] Becker et al. erkannten 1963 den klonalen Ursprung von hämatopoetischen Zellen der Maus.^[8] Mit Beginn der 80er Jahre sammelten sich die Daten verschiedener Forschergruppen, dass es sich bei CFU-S-Zellen nicht um HSCs handelt, sondern um reifere differenziertere Vorläuferzellen.^[78, 84, 85, 141] Der Beweis für die Präsenz der eigentlichen HSCs wurde 1990 von Jordan und Lemischka gebracht, indem sie fetale Zellen aus der Leber von Mäusen durch Retroviren markierten und deren Nachkommenschaft in transplantierten Mäusen *in vivo* verfolgten.^[86] Ein weiterer Wendepunkt in der Identifizierung der hämatopoetischen Stammzelle ergab sich durch die Anwendung der Durchflusszytometrie (FACS), mit deren Hilfe HSCs basierend auf ihrem Expressionsmuster an Zelloberflächenmolekülen erfolgreich angereichert werden konnten.^[160] Dies führte zu rapiden Entwicklungen in der Charakterisierung von HSCs. Dennoch ist die exakte Identität der HSCs bis heute nicht vollständig aufgeschlüsselt.

In der aktuellen, allgemein anerkannten Definition handelt es sich bei HSCs um multipotente erwachsene Stammzellen, die sich durch drei einzigartige und wichtige Fähigkeiten auszeichnen: Zum einen besitzen HSCs die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, d.h. sie können über die gesamte Lebensdauer des Organismus ihre Stammzellpopulation erhalten, indem bei der Teilung in zwei Tochterzellen mindestens eine ebenfalls eine multipotente Stammzelle ist. Zum anderen haben hämatopoetische Stammzellen eine extensive Proliferations- und Differenzierungskapazität und können eine große Nachkommenschaft von allen Reifungslinien des hämatopoetischen Systems entwickeln. Die dritte Eigenschaft wird als Goldstandard zur Definition einer HSC verwendet, denn sie fasst das gesamte Potential von HSCs zusammen: die Fähigkeit der Rekonstitution des gesamten lymphohämatopoetischen Systems und der Etablierung einer stabilen Langzeithämatopoese bei Individuen in Aplasie durch Bestrahlung oder Chemotherapie. Da das "gesamte lymphohämatopoetische System" auch hämatopoetische Stammzellen beinhaltet, beinhaltet die strenge Definition des Goldstandards von HSCs auch die Fähigkeit, die Hämatopoese in sekundären Rezipienten zu rekonstituieren. Der Goldstandard eines HSC-Assays besteht also in der Transplantation von Individuen, der Beobachtung ihrer hämatopoetischen Rekonstitution und der erneuten

Transplantation mit HSC aus diesen Individuen auf neue Rezipienten.^[47, 57, 59, 95, 125, 135, 158, 177] Weitere Merkmale von Stammzellen sind eine hohe Motilität, die Bildung von Pseudopodien, Expression zahlreicher Zytokinrezeptoren in niedriger Dichte und die Annahme, dass sich die meisten Stammzellen in einem ruhenden, den Zellzyklus nicht durchlaufenden Status (G₀) befinden.

Innerhalb der Population der Stammzellen findet man je nach Autor 2-3 Zellklassen, für die zwar die Definition der Rekonstitutionsfähigkeit zutrifft, die sich aber in ihrer hämatopoetischen Rekonstitutionskinetik nach einer Transplantation unterscheiden. Kurzlebige Zellen, sogenannte *Short-term* HSCs (ST-HSC), sind für das kurzfristige Engraftment (hämatopoetisch suffizientes „Anwachsen“ des Transplantats beim Rezipienten) nach Transplantation verantwortlich, allerdings auf einem niedrigen Level ohne die Fähigkeit des Langzeitüberlebens (< 3 Monate).^[66] Sie begründen auch keine Re-Transplantationsfähigkeit. *Long-term* HSCs (LT-HSCs) sind für die lebenslange Hämatopoese nach Transplantation zuständig, die jedoch erst ca. 3 Monate nach Rekonstitution einsetzt.^[59, 95, 125, 158, 177]

Das klassische Modell zur Beschreibung von Zelldifferenzierung und Selbsterneuerung sowie der Beziehung der einzelnen Zellreifungslinien untereinander ist das hierarchische Modell, welches die Unterscheidung der einzelnen Zellen anhand von Oberflächenmarkern berücksichtigt (Abb.1). LT-HSCs bringen ST-HSCs hervor, welche wiederum multipotente Progenitorzellen (MPPs) hervorbringen, die ihre Selbsterneuerungskapazität verloren haben.^[59, 95, 125, 177] Multipotente Vorläuferzellen teilen sich in Progenitor-Zellen, die in der Bandbreite ihrer Entwicklungsmöglichkeiten beschränkt, also oligopotent sind, darunter die myeloischen (common myeloid progenitor, CMP) und die lymphoiden (common lymphoid progenitor, CLP) Vorläuferzellen. Am Ende der Reifungsketten stehen die terminal differenzierten Blutzellen, welche sich nicht mehr teilen können und nach einer bestimmten Zeitspanne (siehe oben) absterben.^[59, 67, 95, 135, 145, 158, 177]

Neuere Studien distanzieren sich allerdings zunehmend von der klassischen linearen Progenitor/Stammzell-Hierarchie. Aktuelle Daten weisen darauf hin, dass sich das Oberflächenrezeptorexpressionsmuster von Knochenmarkzellen während des Zellzyklus-Transits kontinuierlich verändern kann und z.B. das Wiedererlangen von Stammzeleigenschaften von bereits liniengeprägten Zellen möglich ist.^[145, 146, 158] Weiterhin konnte die Existenz von Progenitorzellen mit lymphoidem Expressionsmuster nachgewiesen werden, die noch myeloisch differenzieren konnten.^[111] Und schließlich ist spätestens seit der Erstbeschreibung von induzierten pluripotenten Stammzellen bewiesen, dass

Dedifferenzierung möglich ist.^[155, 165] Diese Untersuchungen eröffnen die Möglichkeit der Manipulation von Stammzell-Eigenschaften in beide Richtungen der Differenzierung. Dieser Flexibilität der Entwicklungsmöglichkeiten (die sogenannte Plastizität) und den alternativen Entwicklungspfaden, die sich aus diesen Beobachtungen ergeben, soll ein sogenanntes plastisches Stammzellkonzept gerecht werden, in dem die Linien-Zugehörigkeit und die Differenzierungs-Kapazität von Stammzellen molekularen und im Prinzip umkehrbaren Mechanismen zugeschrieben wird.

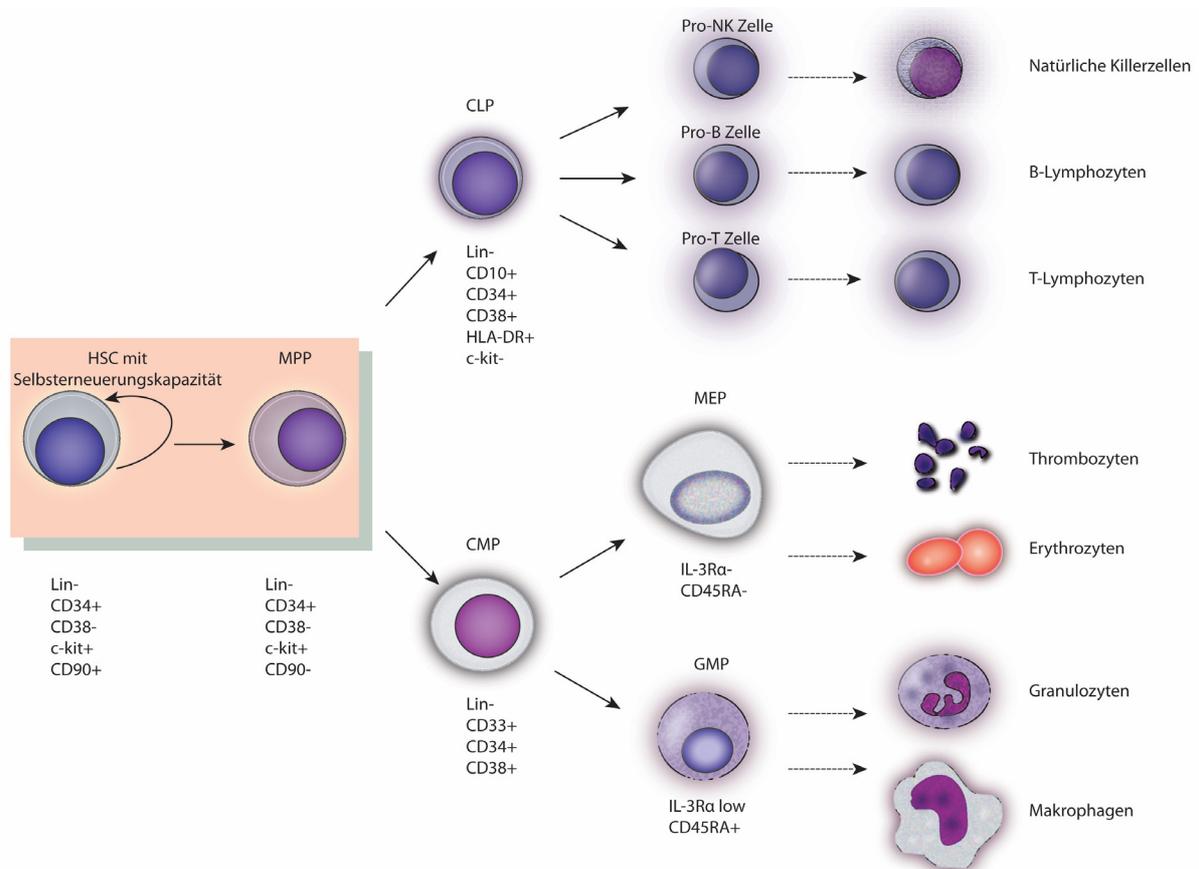


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hierarchie der Hämatopoese beim erwachsenen Menschen (basierend auf^[59, 76, 112]). Die angezeigten Zellpopulationen können aufgrund ihres Zelloberflächen-Phänotyps isoliert werden. Eine phänotypische Differenzierung zwischen LT-HSCs und ST-HSCs steht noch aus. Nicht alle Differenzierungsstufen sind dargestellt. MPP, Multipotente Progenitorzelle; CLP, common lymphoid progenitor, CMP, common myeloid progenitor, GMP, Granulozyten/Makrophagen Progenitor; MEP, Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitor.

1.1.2 Entstehung des hämatopoetischen Systems

Der Ursprung des hämatopoetischen Systems liegt in dem Mesoderm, einer der drei Keimschichten des Embryos. Die genauen Schritte, wie aus der mesodermalen Entwicklung die Hämatopoese geboren wird, sind größtenteils unbekannt, jedoch gibt es Hinweise für einen der HSC vorgeschalteten Vorläufer, den sie mit Endothelzellen gemeinsamen hat, den Hämangioblasten.^[95, 134, 135] Ein bekannter regulierender Wachstumsfaktor in diesem Zusammenhang ist das sog. *bone morphogenetic protein 4* (BMP-4). Sowohl die ersten HSCs als auch die ersten Endothelzellvorläufer in der Embryogenese treten transient extra-embryonal in Blutinseln des Dottersacks auf (primitive Hämatopoese). Die definitive Hämatopoese findet später in der Aorta/Gonaden/Mesonephros (AGM)-Region innerhalb des Embryos statt. Die Beziehung zwischen primitiver und definitiver Hämatopoese ist noch nicht geklärt. Sowohl im Dottersack als auch im AGM konnten definitive hämatopoetische Zellen nachgewiesen werden. Ob Dottersack und AGM-HSCs unabhängig voneinander entstehen und gemeinsam die fetale Leber kolonisieren, ob alle fetalen hämatopoetischen Leberzellen mit dem Umweg über die AGM aus dem Dottersack stammen oder die AGM-Region die einzige Quelle von adulten HSCs ist, die daraufhin die fetale Leber besiedeln, ist noch Gegenstand von Diskussionen.^[57, 95, 125, 134, 135] Die Übernahme der embryonalen Hämatopoese durch die fetale Leber ereignet sich ab der Mitte der Gestation, bis fetale Leber-HSCs in das Knochenmark migrieren. Die Milz unterstützt den Übergang von Leber- zu Knochenmark-Hämatopoese. Dadurch ist das Knochenmark mit seinen Intersinusoidalräumen hauptverantwortlich für die Erzeugung von Blutzellen während der kompletten postnatalen Phase.^[57, 95, 125, 134] Allerdings lassen sich beim Erwachsenen HSCs auch im peripheren Blut, in Nabelschnurblut und in geringen Zahlen auch in Leber und Milz finden.^[158] Dabei kann die Hämatopoese unter pathologischen Bedingungen wieder von Leber und Milz übernommen werden.

1.1.3 Identifikation primitiver hämatopoetischer Zellen

Die Daten über HSCs und Progenitorzellen basieren auf den Ergebnissen von funktionellen Studien *in vitro* (zum Beispiel Koloniebildungs-Assays und Knochenmarklangzeit-Kulturen) und *in vivo* (zum Beispiel Transplantations-Untersuchungen in der Maus; für humane HSCs werden Xenotransplantations-Modelle in immundefizienten Mäusen verwendet), sowie auf

der Charakterisierung der Oberflächenmarkerexpression. Aktuell ist die Durchflusszytometrie (FACS) die gängige Methode zur Anreicherung und Charakterisierung von HSCs. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Oberflächenantigene der humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.^[59] Im Gegensatz zu reiferen Blutzellen fehlt allen HSCs die Linienprägung, also die Expression von linienspezifischen Oberflächenmarkern (lineage negative: Lin⁻).

Der wichtigste Positiv-Marker für menschliche Zellen mit Stammzeleigenschaften ist das 1984 von Civin und Kollegen entdeckte Sialomucin CD34,^[3, 30, 91] das sowohl auf adulten Stammzellen als auch auf HSCs in der embryonalen Entwicklung vorkommt.^[42, 152] CD34-positive hämatopoetische Zellen sind in der Lage, das gesamte hämatopoetische System in myeloablatierten Individuen zu rekonstituieren.^[11, 31] CD34 ist außerdem noch auf endothelialen Zellen von kleinen Gefäßen lokalisiert^[50] und fungiert bei entsprechender Glykosylierung als einer der Hauptliganden für L-Selektin im Rahmen des Leukozyten-Homings z.B. bei entzündlichen Prozessen.^[7, 105, 144] Ca. 40% der Fälle von akuter myeloischer Leukämie (AML) exprimieren CD34 (einer hoch malignen Erkrankung, bei der Mutationen in hämatopoetischen Vorläuferzellen zur Besiedlung des Knochenmarks durch reifungsgestörte, proliferationsfähige sogenannte "leukämische Blasten" führen).^[30, 97] Die Funktion von CD34 in der Hämatopoese ist noch nicht vollständig geklärt. CD34 scheint eine Rolle in der Adhäsion von hämatopoetischen Zellen zum Stroma zu spielen^[73, 164] und könnte so die Lokalisation und Adhäsion von Stamm- und Progenitorzellen an das Knochenmark steuern,^[97] eine Beteiligung an Signalwegen wird aber ebenfalls vorgeschlagen.^[46] Darüber hinaus reduziert sich die Koloniebildungsaktivität bei CD34-Ausfall, eine intakte Hämatopoese kann in diesem Fall jedoch immer noch stattfinden.^[26]

Die CD34⁺ Population hämatopoetischer Zellen ist allerdings sehr heterogen: nur 1-10% sind Lin⁻, 90-99% koexprimieren das Antigen CD38. CD38 tritt mit der Differenzierung von primitiven hämatopoetischen Zellen und dem damit einhergehenden Verlust der Rekonstitutionskapazität an der Zelloberfläche auf. Deswegen werden die primitivsten humanen hämatopoetischen Zellen zur CD34⁺CD38⁻Lin⁻ Fraktion gerechnet. Interessanterweise wurden auch Populationen von CD34⁻CD38⁻Lin⁻ Zellen gefunden, welche komplettes Langzeit-Engraftment-Potential besaßen und in CD34⁺ Zellen differenzieren konnten (0,2% aller CD34⁻ Zellen).^[12, 43, 140, 185] Als weiterer Positivmarker erwies sich deshalb CD133 bzw. AC133 als nützlich, der nicht nur auf den meisten CD34⁺ Zellen nachzuweisen ist, sondern auch auf der CD34⁻CD38⁻Lin⁻ Zellfraktion identifiziert werden konnte und somit - zusammen mit weiteren Markern - primitive hämatopoetischen Zellen beschreibt.^[41, 55, 120, 182] Einzelne Oberflächenmarker sind also vermehrt auf bestimmten

Subpopulationen von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu beobachten. Dabei sind jedoch alle bisher identifizierten “Stammzellmarker” nicht spezifisch für bestimmte Subpopulationen. Daher versucht man, Kombinationen dieser Marker zu verwenden, um Stammzell-typische Muster zu beschreiben. Aber auch hier zeigen die funktionellen Untersuchungen, dass HSC auf Grund ihrer Oberflächenstruktur nicht zuverlässig isoliert, sondern nur angereichert werden können.^[143]

Die Anstrengungen zur Beschreibung des humanen HSC-Phänotyps resultierten in der Identifikation von einer Reihe von Antigen-Kombinationen: $CD34^+Lin^-HLA-DR^-$, $CD34^+Lin^-Th-1^+$, $CD34^+c-kit^+CD38^-CD33^-Rho123^-$, $CD34^+Lin^-KDR^+$, $CD133^+Lin^-ALDH^{hi}$, $CD34^+CD38^-Lin^-Rho123^{low}$ und $CD34^+CD133^+[CD53^+CD62L^+CD63^-CD71^{low}]$.^[59, 67, 95, 125, 131, 158]

Tabelle 1: Oberflächenmarker auf humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (nach ^[59, 112, 168]), GMP, Granulozyten/Makrophagen Progenitoren; MEP, Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitoren

Zellpopulation	Phänotyp
HSC (mit Fähigkeit zur Selbsterneuerung)	Lin^- , $CD34^+$, $CD38^-$, $c-kit^+$, $CD90^+$
MPP (ohne Fähigkeit zur Selbsterneuerung)	Lin^- , $CD34^+$, $CD38^-$, $c-kit^+$, $CD90^-$
Zusätzliche Stammzellmarker	$CD49f^+$, $CD133^+$, $ALDH^{high}$, $HLA-DR^{low}$, $CD33^-$, $Rho123^-$, $CD71^-$, $CD62L^+$, $CD53^+CD63^-$, $CD45RA^-$
CLP	Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $CD10^+$, $HLA-DR^+$, $c-kit^-$, $Thy1.1^-$, $CD7^+$
CMP	Lin^- , $CD34^+$, $CD38^+$, $IL-3R\alpha^{low}$, $CD45RA^-$, $CD16^-$, $CD32^-$
GMP	$IL-3R\alpha^{low}$, $CD45RA^+$
MEP	$IL-3R\alpha^-$, $CD45RA^-$

Murine Oberflächenmarker für Stammzellen und Progenitorzellen unterscheiden sich von den humanen. CD34 eignet sich z.B. nicht für die Charakterisierung von murinen HSCs, da die Expression vom Aktivierungsstatus der Zelle abhängt. Murine LT-HSCs können durch das Antigenmuster $Lin^-Sca1^+c-kit^+Thy-1^{low}L-7Ra^-FLK2^-CD34^{-/low}$ charakterisiert werden, ST-

HSCs durch $\text{Lin}^- \text{Mac1}^{\text{low}} \text{Sca1}^+ \text{c-kit}^+ \text{Thy-1}^{\text{low}} \text{IL-7Ra}^- \text{FLK2}^+ \text{CD34}^-$ und MPP durch $\text{Lin}^- \text{Mac1}^{\text{low}} \text{Sca1}^+ \text{c-kit}^+ \text{Thy-1}^- \text{IL-7Ra}^- \text{FLK2}^+ \text{CD34}^+$.^[59, 95, 158, 168]

Die Anreicherung von Stammzellen durch solche Kombinationen ist im humanen und murinen System unterschiedlich groß. Die besten Marker-Kombinationen im murinen System erreichen - bei strenger Stammzell-Definition - etwa eine Reinheit von 10-20%, im humanen System von 5-10%. Somit kommt der Identifikation neuer Stammzellmarker eine hohe Bedeutung zu.

1.1.4 Regulation der Hämatopoese

Die Hämatopoese wird durch ein komplexes Zusammenspiel von intrinsischen genetischen Prozessen der Blutzellen und extrinsischen Einflüssen reguliert. Dieses Zusammenspiel entscheidet, welchen der fünf möglichen Entwicklungswege HSCs, Progenitorzellen und reifere Zellen als nächstes belegen: ruhender Status, Proliferation, Differenzierung, Selbsterneuerung oder Apoptose. Durch Änderung der Relation dieser Stellgrößen zueinander kann die Blutzell-Produktion in jede entsprechende Richtung geleitet werden. Die meisten Stammzellen und viele Progenitorzellen befinden sich unter normalen Bedingungen im Ruhezustand in der G_0 -Phase des Zellzyklus. Mit zunehmender Reife nimmt auch der Anteil der Zellen im Ruhezustand ab.^[70, 130]

Von den extrinsischen Signalen sind Zytokine wohl am besten erforscht. Bei Zytokinen handelt es sich um eine große Familie an Glykoproteinen, die durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit konsekutiver Aktivierung eines Signalwegs ihren Einfluss geltend machen können (Abb. 2). Dabei ist eine Unterscheidung in Positiv-Regulatoren wie Colony-stimulating factors (CSF) und Interleukine sowie Negativ-Regulatoren wie Transforming growth factor β (TGF- β) und Tumor Nekrose Faktor (TNF) möglich.^[150] Darüber hinaus lässt sich noch zwischen linienspezifischen und breit wirksamen Zytokinen differenzieren. Zytokine modulieren auch Funktionen wie Migration und Adhärenz von Stammzellen.

Eine andere Klasse extrinsischer Regulatoren ist die Klasse der Chemokine. Chemokine steuern Blutzell-Fortbewegung und -Homing, können aber auch als Wachstumsfaktoren agieren, und spielen eine Rolle bei Entzündungen, Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung.

Eine wichtige extrinsische Einflussgröße ist die Interaktion mit dem hämatopoetischen Microenvironment, also dem umgebende Gewebe aus extrazellulärer Matrix, hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen, Nährstoffen, Vitaminen und physikalischen Einflüssen wie Scherkräfte und Sauerstoffgehalt.

Neben den genannten extrinsischen Signalen sind intrinsische Prozesse für die Regulation der Hämatopoese entscheidend. Anhand von Genexpressionsprofilen lassen sich hämatopoetische Zellen ihrem Platz in der Differenzierungshierarchie zuordnen. Dabei sind Gene, die mit dem eingeschlagenen Reifungspfad assoziiert sind, hochreguliert, während Gene anderer hämatopoetischer Linien stillgelegt sind.^[59, 95, 150, 158, 183]

Die Interaktion zwischen diesen Genen und den extrinsischen Faktoren ist noch nicht vollständig geklärt und ist Basis vieler Diskussionen. Die verschiedenen Theorien lassen sich in zwei Hauptrichtungen unterteilen, nämlich intrinsische und instruktive. Instruktive Modelle postulieren extrinsische Faktoren wie Zytokine und Microenvironment als Entscheidungsträger über das Schicksal einer hämatopoetischen Zelle. Intrinsische Modelle lassen sich nochmals in ein stochastisches und ein deterministisches Konzept klassifizieren. Diese nehmen an, dass die Entwicklungsrichtung einer hämatopoetischen Zelle entweder festgelegt und vorhersehbar ist (deterministisch) oder zufällig eintritt (stochastisch).^[1, 16, 70, 125, 127, 130, 131, 158]

Im Endeffekt konvergieren alle Signaltransduktionswege, egal ob intrinsisch oder extrinsisch, auf der Ebene der Genexpression und dem Knotenpunkt der Hämatopoese, nämlich dem Zusammenspiel von Positiv- und Negativ-Transkriptionsfaktoren. Diese sind ähnlich den extrinsischen Faktoren und den intrazellulären Signalwegen sehr komplex und noch nicht vollständig erforscht (Abb. 2).

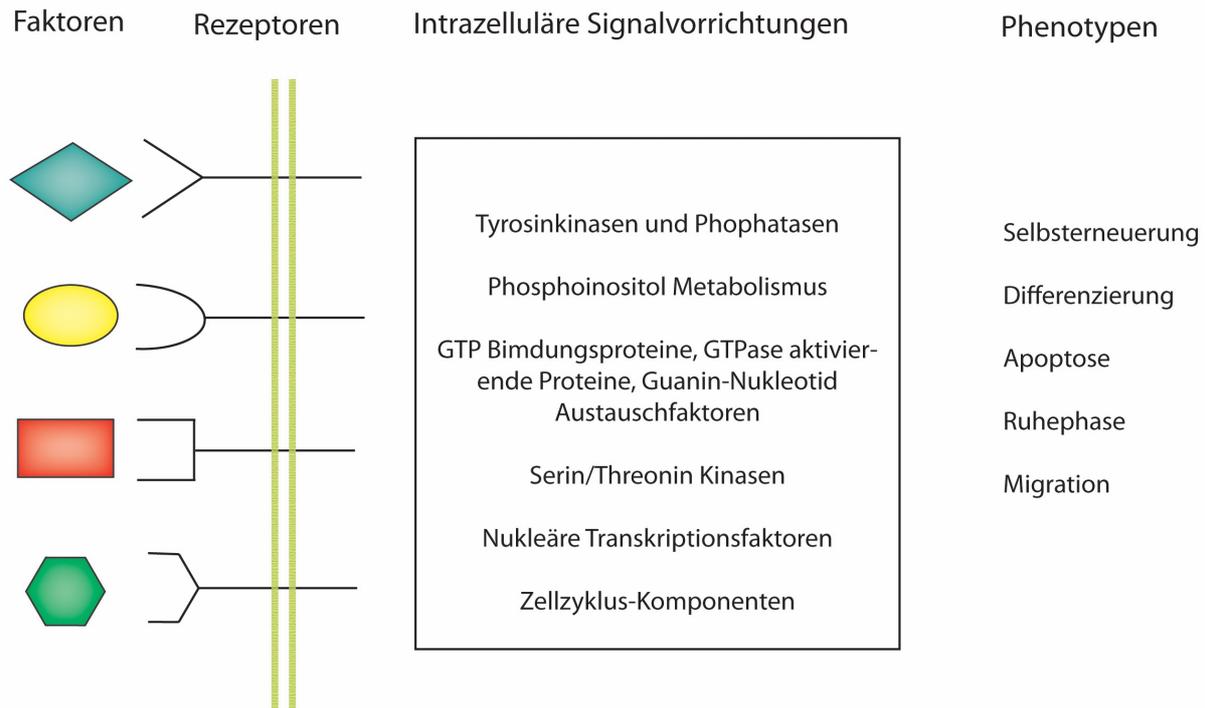


Abb. 2: Signalkomponenten in der Steuerung von hämatopoetischem Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und spezialisierten Funktionen (nach ^[174]). Extrazelluläre Faktoren binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese starten eine intrazelluläre Signalkaskade bestehend aus Tyrosinkinasen, Phosphatasen, Erhöhung des Phosphoinositol-Umsatzes usw. und führen zur Veränderung von Transkriptionsfaktoren und Zellzykluselementen und somit zur Neuregelung der Genexpression.

1.1.5 Korrelation zur Klinik

Das zunehmende Verständnis des hämatopoetischen Prozesses und des Stammzellkonzepts beeinflusst die Medizin in verschiedenster Weise. Störungen der Hämatopoese resultieren in einer Reihe von Erkrankungen wie Leukämie, aplastische Anämie, Myelodysplasie, Lymphome und myeloproliferative Erkrankungen. Die Kenntnis der physiologischen Abläufe der Hämatopoese ist Voraussetzung zur Kenntnis der Pathophysiologie dieser Erkrankungen und öffnet so neue Möglichkeiten in Diagnostik, Klassifikation, stadiengerechter Therapie und Nachsorge. So lässt sich durch Anwendung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Hormonen (z.B. Erythropoetin und G-CSF) eine Chemotherapie-induzierte Zytopenie verkürzen und somit ihre Morbidität und Mortalität senken. Durch die Charakterisierung der Gene im Zusammenhang mit der normalen und der leukämischen Hämatopoese gelang die Identifizierung molekularer Marker für die Leukämie. Zusammen mit

Zelloberflächenmarkern von hämatopoetischen und leukämischen Zellen haben sich Fortschritte in der Abschätzung der Prognose, der Wahl der angemessenen Therapie und der Diagnostik einer minimalen Resterkrankung ergeben. Außerdem dient das *Know-how* der Pathogenese von Leukämien als Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente. Ein Beispiel, das für die Entwicklung von zielgerichteten Therapien für bösartige Erkrankungen paradigmatisch war, ist die Entwicklung des BCR-ABL-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib. Dieses Medikament hat die Therapie der Philadelphia-positiven chronischen myeloischen Leukämie (CML) revolutioniert und wäre ohne das Verständnis der CML als Stammzell-Erkrankung nicht gefunden worden.^[47, 119]

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist eine wichtige therapeutische Maßnahme bei vielen Erkrankungen. Sie erfolgt entweder als sogenannte “autologe Stammzell-Transplantation”, also im Rahmen einer Therapie, bei der die Stammzellen zunächst vom späteren Empfänger gewonnen und ihm dann wieder gegeben werden, oder als “allogene Stammzelltransplantation”, bei der die Transplantation von einem Spender erfolgt. Die autologe Stammzell-Transplantation ist eine reine Stammzell-Ersatztherapie und wird in der Regel dann durchgeführt, wenn Patienten eine stark stammzell-toxische Behandlung erhalten sollen, meist im Rahmen von dosis-eskalierter zytotoxischer Therapie bei malignen Erkrankungen. Heute wird eine solche Therapie bei malignen Lymphomen, beim Multiplen Myelom und in sehr wenigen ausgewählten Fällen von soliden Tumoren durchgeführt. HSCs werden dafür durch Behandlung mit Zytokinen (G-CSF) ins periphere Blut mobilisiert, durch Leukapherese gewonnen und eingefroren. Die Patienten werden dann der eskalierten zytotoxischen Therapie unterzogen. Nach Ende der Therapie werden die HSCs den Patienten wieder intravenös infundiert, was zu einer raschen Regeneration der Hämatopoese (in der Regel innerhalb von 10 Tagen) führt.

Die allogene Stammzelltransplantation wird am häufigsten bei malignen Erkrankungen der Hämatopoese (AML, Myelodysplasien, seltener: B-Zell-Neoplasien), aber auch bei Knochenmarkversagen (Aplastische Anämie, Strahlen-Unfälle) oder bei angeborenen Systemerkrankungen der Hämatopoese (Sichelzell-Anämie, Thalassämie) durchgeführt. Wichtigstes Therapie-Prinzip für die Anwendung bei Patienten mit malignen Erkrankungen ist die Ko-Transplantation von HSCs zur Regeneration der Hämatopoese und von Immun-Effektor-Zellen (allen voran NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen), die durch die Allo-Reaktion vor allem gegenüber hämatopoetischem Empfängergewebe eine Abstoßung des malignen Geschehens verursachen sollen.

Bei beiden Formen der Stammzelltransplantation werden schon heute Oberflächen-Antigene zur Anreicherung von erwünschten Zellen und zur Depletion von unerwünschten Zellen angewandt ^[31]. Zudem wird beispielsweise die Zahl der CD34-positiven Zellen (die ja zwar eine Anreicherung von HSCs darstellen, die jedoch HSCs noch immer in einer Frequenz von <1:1000 enthalten) als Surrogat-Parameter für den HSC-Gehalt in den Transplantaten verwendet. Stammzellen lassen sich jedoch bisher *in vitro* nicht vermehren und mit großer Reinheit herstellen, was eine Vielzahl von Problemen bei ihrer Anwendung begründet. Beide Formen der Stammzell-Therapie würden also von einer besseren Charakterisierung von Stammzell-Eigenschaften und damit von einer besseren Möglichkeit zur Isolation von Stammzellen profitieren.^[6, 20, 47, 67, 95, 119, 125, 177]

1.2 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene maligne Neoplasie ausgehend von einer primitiven, myeloisch determinierten Vorläuferzelle, welche aufgrund von genetischen Veränderungen in ihrem Apoptose- und Differenzierungsverhalten beeinträchtigt ist und klonal expandiert. Die abnormen, funktionell unreifen Leukämie-Zellen akkumulieren aufgrund ihres Überlebensvorteils im Knochenmark und meist auch im Blut. Dort können sie lichtmikroskopisch wegen ihrer Myeloblasten entsprechenden Morphologie als leukämische Blasten identifiziert werden.

Die AML tritt mit einer Inzidenz von 2-3 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner/Jahr auf und steigt mit dem Lebensalter an.^[29] Ein besonders steiler Anstieg der Neuerkrankungsrate ergibt sich ab 45 Jahren, so dass die AML mit 80 % die häufigste akute Leukämie des Erwachsenenalters ist, während sie bei Kindern nur 20 % der akuten Leukämien ausmacht.

Als mitverantwortlich für die Mutationen in der transformierten Progenitorzelle werden eine Reihe von Noxen angesehen, welche bei Exposition mit einer erhöhten Inzidenz der AML assoziiert sind. Zu den Noxen gehören Chemikalien wie Benzol und seine Derivate, Rauchen, Zytostatika, insbesondere Alkylanzien und Topoisomerase-II-Inhibitoren sowie Strahlung z.B. durch eine Atombombe oder therapeutische Bestrahlung. Ab 1 Gy besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Inzidenz und Strahlendosis.^[107, 139, 148] Ein weiterer Risikofaktor ist eine genetische Prädisposition im Rahmen von Erkrankungen wie dem Down-Syndrom,^[51] der aplastischen Anämie,^[132] der Ataxia teleangiectatica,^[175] der Osteogenesis imperfecta^[60] oder der Fanconi-Anämie.^[5]

Trotz der Erkenntnis über den ätiologischen Zusammenhang mit den genannten Risikofaktoren geht man davon aus, dass die Entstehung einer AML ein eher multifaktorieller und auch mehrstufiger Prozess ist, der durch die Aktivierung von Onkogenen und Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen zur Transformation einer Vorläuferzelle in eine „leukämische Stammzelle“ führt. Eine einzelne genetische Veränderung ist nicht in der Lage, eine Leukämie zu induzieren. Vielmehr geht die heute akzeptierte und durch eine Vielzahl von re-sequenzierten AML-Fällen bestätigte Theorie davon aus, dass mehrere sogenannte “Driver-Mutationen” in einer hämatopoetischen Vorläuferzelle zusammenkommen müssen, dass eine AML entstehen kann. Diese Mutationen sind in Genen zu finden, deren Funktion komplementär ist. So sind zum Beispiel sehr häufig Mutationen in Signal-vermittelnden Proteinen (wie etwa in der Rezeptortyrosinkinase FLT3 oder in Ras) in Kombination mit

Mutationen in epigenetisch modifizierenden Enzymen (wie etwa DNMT3A oder IDH1/2) und in Transkriptionsfaktoren (wie RUNX1 oder C/EBPalpha) zu finden. Selten kommen jedoch Mutationen in Genen gleichzeitig vor, die ähnliche Funktionen in Zellen erfüllen (wie etwa gleichzeitig in Ras und FLT3).^[34, 48, 118, 167]

Über 300 wiederkehrende chromosomale Translokationen wurden bei Leukämien identifiziert.^[92] In den meisten Fällen resultieren diese Mutationen in der Expression von Fusionsproteinen, die Transkriptionsfaktoren betreffen und die damit die intrinsischen Expressionsprogramme in HSCs stören, die für eine normale Ausreifung der Zellen essentiell sind.

Die ursprüngliche transformierte Zelle wird „leukämische Stammzelle“ (LSC) genannt. Ungeklärt ist noch die Frage, bei welcher Vorläuferzelle in der Hierarchie der Hämatopoese es sich um die LSC handelt, in der also die für die Entstehung der AML verantwortlichen Aberrationen aufgetreten sind, und welche Zellen aus der Nachkommenschaft dieser Zelle die Fähigkeit besitzen, den Tumor zu reinitiiieren. Hierzu gibt es zwei unterschiedliche Modelle. Das eine Modell geht davon aus, dass jede Vorläuferstufe der Hämatopoese dazu in der Lage ist, maligne zu entarten und dabei die Fähigkeit zur Selbsterneuerung zu erlangen und somit auch jede Tumorzelle die Kapazität hat, den Tumor zu erneuern. Je nachdem, auf welcher Entwicklungsstufe sich die Transformation vollzieht, gibt es einen anderen Phänotyp mit einem anderen Reifegrad.

Das andere Modell besagt, dass nur primitive pluripotente Stammzellen die leukämischen Stammzellen sind. Diese Zellen haben eine hohe Selbsterneuerungskapazität und eine lange Lebensdauer, so dass sie leichter die für die Entwicklung einer AML benötigte Anzahl an Mutationen ansammeln können. Die Heterogenität der AML bezüglich der unterschiedlichen möglichen Differenzierungsgrade erklärt dieses Modell durch die Vielzahl an kausalen Mutationen, die in der LSC auftreten können. Entsprechend den resultierenden Genprodukten wird der Reifegrad festgelegt. Gestützt wird diese These durch Mäuse-Versuche,^[14] in denen nur Zellen mit primitivem Immunphänotyp Repopulationseigenschaften zeigten, unabhängig davon, welchen Reifegrad die vorherrschende Masse an leukämischen Zellen hatte.^[35, 65, 118, 138]

Als Folge der Proliferation der leukämischen Blasten werden die normalen Zellen der Myelopoese, Megakaryopoese und Erythropoese im Knochenmark zunehmend verdrängt. Die resultierende Anämie führt zu den Symptomen Schwindel, Müdigkeit, Leistungsminderung, Blässe, Tachykardie, Tachypnoe, Kopfschmerzen und Belastungsdyspnoe. Der Mangel an

Thrombozyten erklärt Symptome wie Petechien, Epistaxis, Zahnfleischbluten und Sugillationen oder eine disseminierte intravasale Gerinnung. Fehlen reife, funktionsfähige Granulozyten im Sinne einer Granulozytopenie, kommt es zur Infektneigung, besonders durch opportunistische Erreger, mit Fieber und vermehrtem Schwitzen. Weitere Symptome einer akuten myeloischen Leukämie, ausgelöst durch das starke Blastenwachstum, sind Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Knochenschmerz, Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie und extramedulläre Organmanifestationen, sog. Chlorome, wie z.B. Haut- und Zahnfleischinfiltrate, oder der Befall des ZNS. Auch paraneoplastische Syndrome wie das Sweet-Syndrom oder das Pyoderma gangraenosum sind beschrieben.^[53]

Liegt der Verdacht auf eine AML vor, gibt es mehrere diagnostische Instrumente zur Sicherung, Klassifikation und Klärung der prognostischen Bedeutung der Diagnose. Diese Instrumente sind die Zytomorphologie, die Zytochemie, die Immunphänotypisierung, die Zytogenetik und die Molekulargenetik. Grundlage der Diagnosestellung einer AML bilden die Zytomorphologie und Zytochemie. Laut der French-American–British (FAB) Co-operative Group müssen zur Diagnosestellung einer AML mindestens 30 % der Zellen im Knochenmarksausstrich Blasten sein.

Je nachdem, welche Morphologie und Anfärbbarkeit der Blasten vorliegt, lässt sich die AML dann in eine der 11 Subgruppen der 1976 etablierten und 1985 revidierten FAB-Klassifikation einteilen.^[9, 10]

Anhand von Tabelle 2 ist ersichtlich, dass die Subgruppen der FAB-Klassifikation nur bedingt den genetischen Veränderungen der AML entsprechen. Da jedoch die zytogenetischen Aberrationen jeweils eine eigene prognostische und therapeutische Relevanz besitzen, wurde von der WHO 2001 eine neue Klassifikation vorgeschlagen, die für die Einteilung eine genetische Charakterisierung der AML mit hinzuzieht und so an der Prognose orientiert ist (Tabelle 3).

Tabelle 2: FAB-Klassifikation und Assoziation der Subtypen mit genetischen Veränderungen und deren Häufigkeit. Typische Befunde stark grau hinterlegt.^[9, 10]

FAB-Subtyp	Granulozytopoese	Monozytopoese	Erythropoese	Immunologische Marker	Zyto-genetisch	Molekular-genetisch	Häufigkeit
M0	< 10% POX < 3%	< 20%	< 50%	Myeloisch positiv lymphatisch negativ			
M1	< 10% POX >3%	< 20%	< 50%		t(8;21)	AML1/ETO	1,7%
M2	> 10%	< 20%	< 50%		t(8;21)	AML1/ETO	12,5%
M3	Hypergranulär Auer-Stäbchen	< 20%	< 50%	HLA-DR negativ	t(15;17)	PML/RAR α	98%
M3v	Mikrogranulär Monozytoide Kerne	< 20%	< 50%	HLA-DR negativ	t(15;17)	PML/RAR α	
M4	> 20%	> 20%	< 50%				
M4eo	> 20% Abnorme Eosinophilie	> 20%	< 50%		inv(16) t(16;16)	CBF β /MYH11	100%
M5a	< 20%	> 80% unreif	< 50%		11q23- Aberration	MLL- Aberration	31%
M5b	< 20%	> 80% reif	< 50%		11q23- Aberration	MLL- Aberration	17%
M6	> 30%	Variabel	> 50%				
M7	> 30% Megakaryoblasten	Variabel	< 50%	CD41/CD61 positiv			

Tabelle 3: WHO-Klassifikation der AML.^[76]

1. AML mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen

AML mit Translokation t(8;21)(q22;q22), *AML1/ETO*

Akute Promyelocytenleukämie (AML mit t(15;17)(q22;q11-12), *PML/RAR-α* und Varianten)

AML mit abnormen Eosinophilen im Knochenmark (inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), *CBF-β/MYH11*)

AML mit 11q23(*MLL*)-Abnormalitäten

2. AML mit multilineärer Dysplasie

mit vorangegangenem myelodysplastischen Syndrom

ohne vorangegangenes myelodysplastisches Syndrom

3. AML und myelodysplastisches Syndrom, therapieassoziiert

assoziiert mit alkylierenden Substanzen

assoziiert mit Epidopophyllotoxin (Topoisomerase II Inhibitor)

andere Typen

4. AML ohne weitere Spezifizierung

AML mit minimaler Differenzierung

AML ohne Ausreifung

AML mit Ausreifung

Akute myelomonozytäre Leukämie

Akute monozytäre Leukämie

Akute erythroide Leukämie

Akute megakaryozytäre Leukämie

Akute basophile Leukämie

Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Myeloisches Sarkom

Die WHO-Klassifikation teilt die AML in vier Untergruppen ein, wobei die vierte Untergruppe im Wesentlichen der FAB-Klassifikation entspricht. Eine weitere Änderung der WHO ist die Neulegung der Grenze zur Diagnosestellung von 30 % Blasten im Knochenmark auf 20%.^[21]

Als Grundlage für die Zytomorphologie dient die Aspiration von Knochenmark. Anhand des Knochenmarkausstriches in Pappenheim-Färbung können Zelldichte, Zellmorphie im Sinne von leukämischen Blasten sowie der Anteil anderer Zellen der hämatopoetischen Linie beurteilt und die Diagnose Leukämie bestätigt werden. Eventuell ist schon eine Diagnose einer bestimmten AML-Subgruppe möglich. Zytochemische Färbungen mit Myeloperoxidase erlauben die Zuordnung zur myeloischen Reihe, α -Naphthylacetatesterase-positive Zellen gehören zur monozytären Reihe.

Für die Immunphänotypisierung werden die Oberflächenantigene der leukämischen Zellen mit monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern konjugiert und mittels Fluorescence-Activated Cell Sorting analysiert, so dass anhand des Oberflächenantigenmusters eine Charakterisierung hinsichtlich der hämatopoetischen Zellreihe und des Differenzierungsstadiums möglich wird. Dieses Verfahren wird eingesetzt zur Diagnosesicherung, bei Unsicherheiten in der Klassifikation der AML aufgrund morphologischer Unschärfe, wie es bei den FAB-Klassen M0 und M1 gegenüber unreifer Lymphoblastenleukämien der Fall sein kann, und zur Diagnostik einer AML mit der FAB-Gruppe M7. Auch zur Erkennung einer bilineären Leukämie oder einer biphänotypischen Leukämie ist die Immunphänotypisierung hilfreich.^[87]

Die Zytogenetik ist die Methode mit der wichtigsten prognostischen Bedeutung und sollte deswegen bei jedem Patienten durchgeführt werden.^[27, 76] Bei etwa 50 % der erwachsenen Patienten lässt sich eine chromosomale Veränderung in der leukämischen Population finden.^[126] Die verschiedenen Chromosomenaberrationen haben meist eine eigene Morphologie sowie einen eigenen charakteristischen klinischen Verlauf, weshalb sie die Grundlage für die WHO-Klassifikation sind. Die wichtigsten Anomalien sind:

- die Translokation t(8;21) (q22;q22) mit dem Fusionsprotein AML1/ETO und die Inversion inv(16) (p13;q22) mit dem Fusionsprotein CBF β /MYH11, welche die „core-binding“ Transkriptionsfaktoren CBF α und CBF β betreffen, so dass die myeloide Differenzierung inhibiert wird.

- die Translokation t(15;17) (q21;q11) mit dem Fusionsprotein PML/RAR α , das aus der Verschmelzung des Retinolsäurerezeptors (RAR α) mit dem möglicherweise als Tumorsuppressor wirkenden PML entsteht und durch Transkriptionshemmung einen Differenzierungsstopp bewirkt. Die resultierende Promyelozytenleukämie (AML M3) kann aufgrund der Pathogenese gezielt mit all-trans-Retinolsäure (ATRA) therapiert werden.
- Translokation, die das MLL-Gen (mixed lineage leukemia) auf Chromosom 11q23 mit über 40 beschriebenen Translokationspartnern betreffen und zur mangelnden Differenzierung und Apoptose führen.
- die Inversion inv(3) (q21q26) bzw. die Translokation t(3;3) (q21q26), welche meist mit einer Dysmegakaryopoese einhergeht
- Aberrationen an Chromosom 5 und 7
- die Trisomie 3

Die Karyotypisierung erlaubt eine Analyse des gesamten Chromosomensatzes, ist aber begrenzt in ihrer Auflösung (eine sichtbare Bande entspricht 150 Genen) und ihrer Sensitivität (abhängig von der Anzahl an beurteilten Metaphasen). Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bietet zwar eine hohe Auflösung, eignet sich allerdings weniger als Screening-Methode, sondern nur bei gezielten Fragestellungen, z.B. Verlaufskontrollen einer bekannten Aberration.

Obwohl 50 % der Patienten keine identifizierbaren Karyotypaberrationen aufweisen, können trotzdem molekulare Veränderungen vorliegen. Diese können durch molekulargenetische Analysen mit einer hohen Sensitivität und Spezifität gefunden werden, allerdings nicht im Rahmen eines Screenings, sondern wenn man gezielt nach bestimmten Mutationen sucht. Deshalb eignen sich molekulargenetische Detektionsverfahren vor allem zum Monitoring einer minimalen Resterkrankung (MRD) und zur Früherkennung von Rezidiven. Beispiele für molekulargenetische Mutationen bei der AML sind Längenmutation der FMS-ähnlichen Tyrosinkinase 3 (FLT3-LM) oder die partielle Tandemduplikation des MLL-Gens (MLL-PTD).^[53, 61, 68, 76]

Der Karyotyp der leukämischen Zellen ist neben dem Alter des Patienten der wichtigste Prognosefaktor. Die Translokationen t(15;17), t(8;21) und die Inversion inv(16) sind mit einer guten Prognose assoziiert, während komplexe Aberrationen und Aberrationen der Chromosomen 3, 5, 7 und 11 eher eine schlechte Prognose bedeuten. Ein normaler Karyotyp und die Trisomie 8 sind mit einer intermediären Prognose assoziiert.^[76]

1.3 Akute lymphatische Leukämie

Ebenso wie die akute myeloische Leukämie ist die die akute lymphatische Leukämie (ALL) eine maligne Vorläuferzellerkrankung. Die entartete Zellpopulation besteht aus Blasten aus dem Knochenmark, dem lymphatischen System oder dem Thymus, die phänotypisch verschiedenen Reifestadien der lymphatischen Entwicklung entsprechen, jedoch funktionell inaktiv sind. Die Erkrankung entsteht durch genetische Läsionen in hämatopoetischen Vorläuferzellen, welche eine T-Zell- oder B-Zell-Entwicklung einschlagen werden. Diese Mutationen führen zu unbegrenzter Selbsterneuerung und Arrest auf einer Reifestufe.

Die Inzidenz der ALL liegt bei 1,1/100 000 im Jahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 12 Jahren und fast zwei Drittel aller Fälle werden bei Kindern diagnostiziert. Während unter intensiver Chemotherapie Heilungsraten bei Kindern von 85-90% erreicht werden, liegen diese im Erwachsenenalter bei 40-50 %, abhängig vom genetischen Subtyp und der klinischen Präsentation bei Diagnose.

Zur Diagnosestellung der ALL gehört die Beurteilung der Blastenmorphologie, die Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie und die Identifikation zytogenetisch-molekularer Aberrationen. Die French-American-British Co-operative Group unterscheidet drei ALL-Subtypen anhand von morphologischen Kriterien, die Gruppen L1, L2 und L3, wobei nur die Gruppe L3 durch die Übereinstimmung mit der reifen B-ALL klinisch bedeutsam ist. Diese Unterteilung wurde von der World Health Organization durch eine auf Immunphänotypisierung basierende Klassifikation abgelöst (Tabelle 4). Dabei erfolgt zunächst eine Zuordnung zur B- oder T-Linie. Weiterhin kann nach dem Reifegrad in pro-B-ALL, c-ALL, prä-B-ALL und reife B-ALL sowie in pro-T-ALL, prä-T-ALL und reife T-ALL differenziert werden. Von therapeutischer Konsequenz ist allerdings nur die Unterteilung in Vorläufer-B-ALL, reife B-ALL und T-ALL.^[36, 82, 144]

Tabelle 4: Immunphänotypische Klassifikation der ALL.^[82] CALLA, *common ALL antigen*.

B-Linien-ALL		T-Linien-ALL	
Pro-B-ALL	CD19/CD79a/CD22	Pro-T-ALL	CD7
Common ALL	CD10 (CALLA)	Prä-T-ALL	CD2, CD5, CD8
Prä-B-ALL	zytoplasmatisches IgM	Kortikale T-ALL	CD1a
Reife B-ALL	zytoplasmatisches Oberflächen-Ig, oder Ketten	oder Reife T-ALL	Oberflächen-CD3 (und ein anderer T-Zell-Marker)

1.4 Endomucin

Endomucin ist ein Typ I integrales Membranprotein und gehört wie CD34 zur Klasse der Sialomucine. Mucine sind Glykoproteine mit einem hohen Anteil an O- und N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden (60-90% Kohlenhydrate 1,4,7) und einem hohen Molekulargewicht ($2-20 \times 10^5$ Da).^[72, 79, 149] Das charakteristische Merkmal von Mucinen sind Tandem-repeat-Domänen als Grundgerüst des Moleküls: Wiederholungen von Serin-, Threonin- und Prolinreichen Sequenzen, wobei die Serin- und Threoninreste als O-Glykosylierungsstellen fungieren.^[122, 149]

Während Mucine zunächst nur als Hauptkomponente des von Epithelzellen sezernierten Mucus bekannt waren, wurde später gezeigt, dass einige Zelloberflächen-assoziierte Mucine integrale Membranproteine sind.^[122, 149, 162] So lassen sich Mucine klassifizieren in membrangebundene Proteine mit Tandem-repeats, sezernierte Proteine mit Tandem-repeats und Mucine ohne Tandem-repeats, zu denen auch Endomucin gehört.^[149]

Eine andere Möglichkeit der Einteilung ist die Unterscheidung zwischen Epithelialen Mucinen (MUC-1 bis MUC-8) und Leukozyten/Endothelialen Mucinen, welche auch Sialomucine genannt werden und Sialinsäure enthalten.^[18, 156]

Die Funktion von Mucinen wird durch ihre dichte Besetzung mit O-glykosidisch gebundenen Seitenketten bestimmt. Diese verlängern das Gerüst der Mucine so sehr, dass sie aus der Glykokalix herausragen und optimal von außen erreichbar sind. Dadurch können Mucine einer Zelle pro-adhäsive und anti-adhäsive Eigenschaften verleihen. Anti-adhäsive Wechselwirkungen entstehen durch ihre negative Ladung und ihre komplexe Struktur. Pro-adhäsiv wirken Mucine, indem sie als Liganden für Zellen dienen, die entsprechende Rezeptoren besitzen.^[156] Auf Epithelzellen sezerniert, etablieren Mucine so - neben einer Erhöhung der hygroskopischen Eigenschaft von Mucus - eine selektive molekulare Barriere gegen Pathogene und beeinflussen als Membranproteine im Rahmen der Zell-Zell-Interaktion und Signaltransduktion entzündliche Prozesse, Differenzierung, Reifung, Aktivierung von B- und T-Zellen und Metastasierung.^[54, 72, 79, 81]

Endomucin wurde erstmals 1999 bei Mäusen auf der Suche nach Endothel-spezifischen Antigenen mittels Expression Cloning identifiziert. Morgan et al. entwickelten monoklonale Antikörper gegen Oberflächenmoleküle einer Maus-Endotheliom-Zelllinie und entdeckten

dabei ein 75 kDa großes Oberflächenantigen, welches sich spezifisch auf Endothelien in jedem Gewebe des Körpers finden ließ.

Murines Endomucin wurde charakterisiert als ein 248 Aminosäuren langes Typ I integrales Membranprotein, codiert durch einen ORF von 744 Basenpaaren, das eine 157 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne, eine 23 Aminosäuren lange transmembranöse Domäne und eine 48 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne besitzt. N-terminal wird Endomucin bis nach der Insertion des Peptids in das Endoplasmatische Retikulum durch eine 20 Aminosäuren lange Signalsequenz flankiert. In der zytoplasmatischen Domäne sind 3 putative Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen, was an eine Involvierung von Endomucin in die Signaltransduktion denken lässt. 35 % der Aminosäuren in der extrazellulären Domäne weisen Serin- und Threoninreste auf, welche auf eine mögliche Mucin-typische starke O-Glykosylierung hinweisen. Des Weiteren enthält die extrazelluläre Domäne zwei Stellen, an denen eine N-Glykosylierung stattfinden könnte. Für die Zugehörigkeit von Endomucin zur Gruppe der Sialomucine spricht die Sensitivität von murinem Endomucin für O-Sialoglykoprotein Endopeptidase sowie die dichte Bestückung mit Sialinsäure-reichen O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten, welche für die Formation des Epitops notwendig sind. Die Reduktion des Molekulargewichts bei Entfernung der Kohlenhydratseitenketten weist ebenfalls auf eine dichte Glykosylierung von Endomucin hin.^[123]

Kinoshita und Kollegen berichteten 2001 von zwei cDNA-Sequenzen für humanes Endomucin, Endomucin-1 und -2 genannt.^[93] Das humane Endomucin -1 wurde später von Samulowitz et al. dahingehend korrigiert, dass es sich um ein murines Gen handelt und somit dem ebenfalls von Kinoshita identifizierten murinem Endomucin -1 entspricht, welches 39 Nukleotide mehr besitzt als die murine Variante von Morgan et al.^[151, 172]

Sowohl die murine als auch die humane Variante gemäß Kinoshita kodieren für ein Protein aus 261 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 27,8 und 27,5 kDa. In glykosyliertem Zustand erhöht sich das Molekulargewicht auf 80-100 kDa bei murinem und 90-120 kDa bei humanem Endomucin, da beide Proteine in der extrazellulären Domäne reich an Serin-, Threonin- und Prolinresten sind. Die Aminosäuresequenzen von murinem und humanem Endomucin zeigen insgesamt eine Homologie von 53%, die meisten Übereinstimmungen lassen sich in der zytoplasmatischen Domäne mit 96% und in der transmembranösen Domäne (86%) finden; die Signalsequenzen haben eine Homologie von 40% und die extrazelluläre Domäne von 38%. Subzelluläre Lokalisationsversuche und das

Vorhandensein einer putativen transmembranösen Komponente legen nahe, dass Endomucin nicht sezerniert wird, sondern als Typ I integrales Membranprotein vorliegt.^[93]

Ueno et al. identifizierten insgesamt vier Varianten von murinem Endomucin, Endomucin -1a, -1b, -1c und -1d genannt, indem eine „verschachtelte“ *nested* PCR mit cDNAs von E10.5 dorsaler Aorta, erwachsener Niere und Herz angewandt wurde. Dabei zeigte sich, dass Endomucin -1a dem von Kinoshita vorgelegten murinem “Endomucin-1” entspricht und Endomucin -1b mit einer Deletion von 39 Nukleotiden bzw. 13 Aminosäuren in der zytoplasmatischen Domäne des Moleküls mit der murinen Endomucin-Sequenz von Morgan et al. übereinstimmt. Endomucin -1c fehlt ein Fragment von 114 Nukleotiden aus der zytoplasmatischen Domäne von Endomucin -1a und Endomucin -1d weist sowohl die 39-Nukleotid-Deletion von Endomucin -1b als auch die 114-Nukleotid-Deletion von Endomucin -1c auf. Ueno et al gehen davon aus, dass es sich bei allen vier Sequenzen um Splice-Varianten aus demselben Endomucin-Gen handelt. Die Variante 1a wird dabei am stärksten exprimiert.^[172]

Im Rahmen ihrer Suche nach potentiellen Markern für Tumorangio-genese isolierten Liu, Shao et al. ebenfalls humanes Endomucin. Ihre Sequenzanalyse ergab, dass humanes Endomucin auf Chromosom 4 liegt, 21 stark basische Aminosäuren, 20 stark saure Aminosäuren, 78 hydrophobe Aminosäuren und 106 polare Aminosäuren besitzt, die 36 Serinreste und 42 Threoninreste beinhalten, und der isoelektrische Punkt bei 7,93 liegt. Aminosäuren 1-190 stellen die extrazelluläre Domäne dar, Aminosäuren 191-214 den transmembranösen Teil und Aminosäuren 215-261 sind die zytoplasmatische Sequenz. Humanes Endomucin hat sechs N-Glykosylationsstellen, neun Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen, vier Caseinkinase II Phosphorylierungsstellen und sechs N-Myristoylationsstellen, wovon drei Proteinkinase C- und eine Caseinkinase II-Stellen in der zytoplasmatischen Domäne lokalisiert sind. Liu, Shao et al. geben eine Homologie von humanem zu murinem Endomucin von 63% auf dem Nukleotid-Level und 49% auf dem Peptid-Level an.^[108]

2002 veröffentlichten Samulowitz et al. neben der von Kinoshita et al identifizierten humanen Endomucin-Sequenz (“Endomucin-2”, open reading frame 783 bp/261 aa) drei weitere mögliche Splice-Varianten für humanes Endomucin (Abb. 3). Analog zu der von Ueno et al beschriebenen Splice-Varianten bei murinem Endomucin fehlt der zweitlängsten Isoform ebenfalls ein 13 Aminosäuren langes Exon (Exon 5). Die dritte mögliche Splicevariante c besitzt kein Exon 6, 7 und 8 und damit ebenso wie Isoform d (kein Exon 7 und 8) keine transmembranöse Domäne. Damit stellen die Isoformen c und d sezernierte Proteine dar sofern sie translatiert werden.^[151]

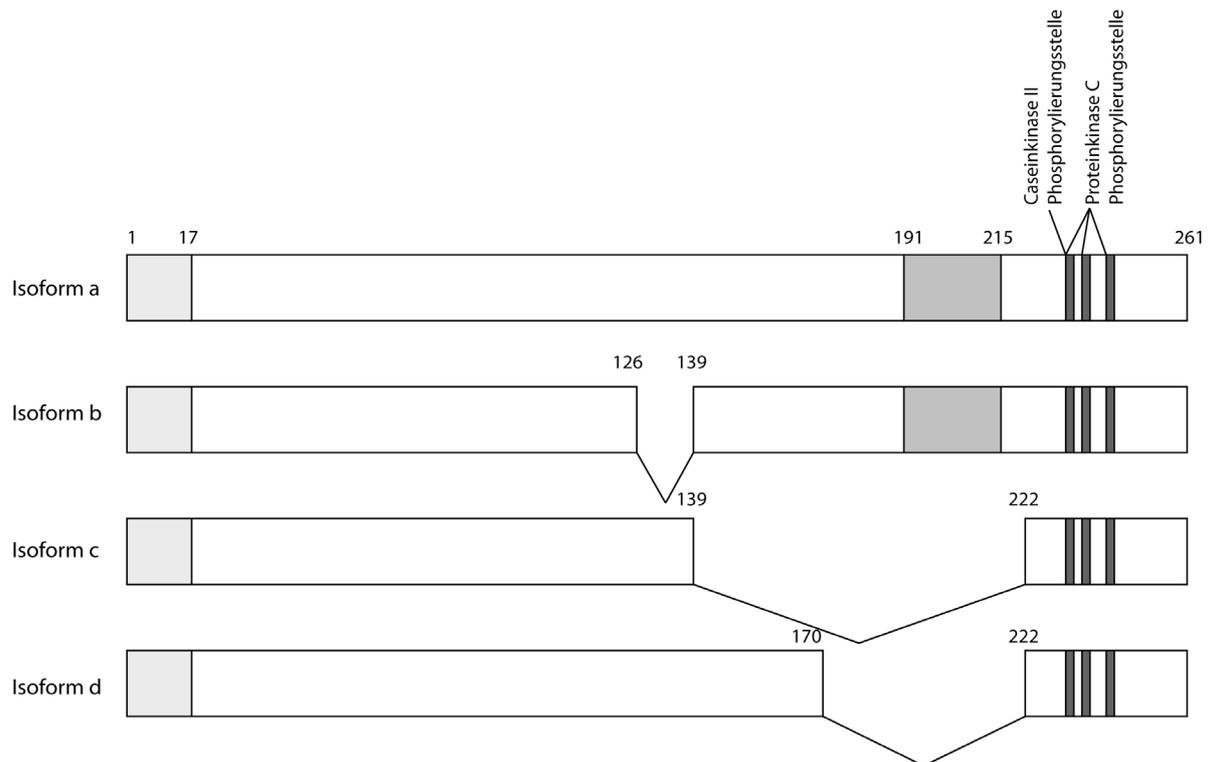


Abb. 3: Schematische Darstellung der vier Splicevarianten von humanem Endomucin (nach ^[108, 151]). Die Formation enthält ein Signalpeptid von 16 AS (Aminosäuren) (#1-16, hellgrau hinterlegt) und eine transmembranöse Domäne von 24 AS (#191-214, dunkelgrau hinterlegt). Im zytoplasmatischen Teil sind drei Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen (#232-234, #236-238, #241-243) und eine Caseinkinase II-Phosphorylierungsstelle gekennzeichnet. Isoform b fehlen AS #126-138, Isoform c AS #139-222 und Isoform d #170-222.

Wie bereits erwähnt, wurde murines Endomucin zunächst auf vaskulären Endothelzelloberflächen in zahlreichen Geweben erwachsener Mäuse entdeckt, darunter Venen und Kapillaren, allerdings nicht Aorta und Arteriolen.^[123] Beim Menschen ist Endomucin zusätzlich auch, aber schwächer, auf arteriellen Endothelien exprimiert und lässt sich somit besonders gut in gefäßreichen Organen wie Herz, Niere und Lunge detektieren.^[93, 99, 108] Weiterhin konnte Endomucin auf der luminalen Seite von high endothelial venules (HEV, hochendotheliale Venolen) in lymphatischen Organen nachgewiesen werden, allerdings durch spezielle Oligosaccharide spezifisch modifiziert.^[89, 151]

Expressionsanalysen für Endomucin in Geweben aus verschiedenen Entwicklungsstufen des Mausembryos ergaben, dass Endomucin schon ab *embryo day* 8.0 (Entwicklungsstufe des 8 Tage alten Mausembryos) auf Kapillaren und größeren Blutgefäßen exprimiert wird. Ab

embryo day 8.5-11.0 wird Endomucin auf dem Endothel der dorsalen Aorta sowie auch auf nicht-endothelialen Zellen gebildet, nämlich auf putativen hämatopoetischen Progenitorzellen in Zellclustern assoziiert zur luminalen Oberfläche. Allerdings reduziert sich die Expression von murinem Endomucin auf der Aorta während der weiteren Entwicklung des Embryos und ist ab *embryo day* 15.5 und auf der Aorta der erwachsenen Maus nur noch fokal und schwach nachweisbar.^[18, 172]

Im Knochenmark der Maus stießen Matsubara et al. auf Endomucin auf nicht-liniengeprägten hämatopoetischen Zellen mit murinem HSC-Phänotyp, nämlich auf CD34⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ Zellen. Endomucin⁺ CD34⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ Zellen zeigten die höchste Effizienz in der Bildung von Kolonien und hatten die höchste multilineare Differenzierungskapazität. Im *in vivo* Modell etablierten nur Endomucin-positive Zellen nach Transplantation eine stabile Langzeitrepopulation. Ähnliche Ergebnisse konnten für Endomucin-positive hämatopoetische Zellen im Maus-Embryo gezeigt werden.^[114] Ob eine Expression von Endomucin auf humanen hämatopoetischen Zellen stattfindet, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Samulowitz und Koll. beschrieben Endomucin ebenfalls auf dem Endothel von Lymphgefäßen ansässig sowie auf dem Epithel und auf ekkrinen und apokrinen Drüsen der Haut.^[151] Die Expression auf nicht-endothelialen Zellen wurde allerdings durch Kuhn et al. bei der Untersuchung der Verteilung von Endomucin in humaner Haut nicht bestätigt.^[99]

Auf allen anderen Zelltypen des Körpers ist Endomucin nicht zu lokalisieren^[18, 151] und ist somit ein für Endothel und, zumindest bei der Maus, für primitive hämatopoetische Zellen spezifisches Antigen.

Die Frage nach der Funktion von Endomucin ist noch nicht vollständig geklärt. Abhängig vom Zelltyp, auf dem es exprimiert wird, sowie von seiner Glykosylierung und Sulfatierung scheint Endomucin verschiedene, teilweise sogar entgegengesetzte Rollen zu spielen.

Auf Endothel-Zellen konnte für Endomucin im Rahmen von Rollen (engl. Rolling, temporäre Anheftung) und Adhäsion von Leukozyten eine pro-adhäsive Funktion nachgewiesen werden. Mit entsprechender Glykosylierung ist Endomucin als Träger des MECA-79-Epitops Ligand für L-Selektin, ähnlich dem strukturell eng verwandten CD34.^[7, 89, 151] MECA 79 definiert eine Gruppe von Oligosacchariden, die zusammen ein L-Selektin-reaktives Epitop bilden und auf Glykoproteinen auf der Endotheloberfläche von HEVs vorkommen. Dort vermitteln sie das Auswandern von Lymphozyten in periphere Lymphknoten.^[161] Endomucin lässt sich sowohl von Antikörpern gegen L-Selektin als auch gegen MECA-79 anfärben. Da Endomucin auf Venen aller untersuchter Gewebe vorkommt, könnte es bei chronischen

Entzündungen durch die Ausbildung des MECA-79-Epitops für die Leuko-Diapedese von Bedeutung sein. In der Tat unterstützt Endomucin *in vitro* L-Selektin-abhängiges Rolling unter physiologischen Bedingungen, wenn entsprechende Kohlenhydrat-modifizierende Enzyme vorliegen.^[89]

Andere Studien weisen auf eine anti-adhäsive Wirkung von Endomucin hin. Überexpression von Endomucin inhibiert die Adhäsion von humanen embryonalen Nieren-Zellen und Endothelzellen zur Oberfläche der Petrischale sowie die Zell-Zell-Aggregation dieser Zellen. Durch die vorherige Beschichtung der Kulturschale mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie Laminin, Kollagen-I und Fibronectin konnte dieser Effekt aufgehoben werden. Da auch der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporine den anti-adhäsiven Effekt von Endomucin unterdrückt, ist eine Beteiligung von Endomucin in intrazellulären anti-adhäsiven Signalgeschehnissen wahrscheinlicher als eine physikalische Verhinderung von Zellkontakten.^[93, 172] Die anti-adhäsive Rolle von Endomucin wäre im Zusammenhang der Ablösung früher HSCs von ihrem Ursprungsgewebe, der dorsalen Aorta, plausibel. Darüber hinaus wurde entgegen den Ergebnissen von Samulowitz et al. gezeigt, dass die Endomucin-Expression auf ruhenden, nicht-entzündeten Endothel-Zellen die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten *in vitro* verhindert und durch pro-inflammatorische Zytokine herunterreguliert wird.^[184]

Weiterhin ist wie bei CD34 eine Involvierung von Endomucin in die Signaltransduktion möglich,^[164] denn Endomucin weist 3 putative Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen und eine Caseinkinase II-Phosphorylierungsstelle auf.^[108, 123] Auch die große Homologie der zytoplasmatischen Domäne zwischen murinem und humanem Endomucin unterstützt diese Hypothese. Außerdem scheint Endomucin eine wichtige Rolle in der Angiogenese zu spielen, da endotheliales Zellwachstum, Migration und Röhrenbildung nach Unterdrückung seiner Genexpression beeinträchtigt waren.^[90, 137]

2 Zielsetzung

Das Sialomucin Endomucin ist in seiner Eigenschaft als Marker von Endothelien entlang des Gefäßbaums hinreichend untersucht und etabliert. Das Vorkommen von Endomucin auf Zellen des hämatopoetischen Systems wurde bis jetzt lediglich in einer Studie von Matsubara et al. beschrieben und zwar nur für die Hämatopoese der Maus. Über Vorkommen und Rolle auf humanen Blutzellen ist bisher nichts bekannt.

Wesentliches Ziel vorliegender Arbeit ist zu klären, ob Endomucin tatsächlich eine Rolle als Oberflächenmarker in der murinen und humanen Hämatopoese spielt und welchem Reifegrad diese Zellen angehören. Da humane hämatopoetische Stammzellantigene selten sind und bisher die Kombination von mehreren Positiv- und Negativmarkern nur eine Anreicherung von hämatopoetischen Stammzellen erlaubt, jedoch keine reine HSC-Population identifizieren kann, ist von großem Interesse, ob Endomucin ähnlich dem ihm verwandten Sialomucin CD34 auf Zellen, die nach immunphänotypischer und funktioneller Definition hämatopoetische Stammzellen darstellen, exprimiert wird.

Die Endomucin-Produktion soll dazu auf mRNA-Level, Proteinlevel und auf der Zelloberfläche untersucht werden. Herausselektierte Endomucin-positive Zellen sollen in *in vitro* und *in vivo* Funktionsanalysen auf typische Stammzeleigenschaften hin untersucht werden, nämlich Selbsterneuerungsfähigkeit, Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit sowie Rekonstitution aller Blutzellen bei Individuen in Aplasie.

Der zweite Teil vorliegender Arbeit beschäftigt sich mit der möglichen Relevanz von Endomucin in der Klinik. Ist Endomucin Oberflächenmolekül auf HSCs, ist auf diesem Befund aufbauend zu analysieren, ob Endomucin auch auf Zellen hämatopoetischer Stammzellerkrankungen wie der akuten myeloischen Leukämie und der akuten lymphatischen Leukämie vorkommt. Darüber hinaus sollen mittels Korrelationsanalysen Zusammenhänge zwischen Endomucin-Expression und den Parametern verschiedener Krankheitsverläufe der AML ermittelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

ABI PRISM 7700 Sequence Detector	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Begasungsbrutschrank Cytoperm	Heraeus Sepatech, Osterode
Bio Dancer	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Blockthermostat BT200	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Cleanbench Hera Safe	Heraeus Sepatech, Osterode
Cryofuge M 7000	Heraeus Sepatech, Osterode
Elektroporationsküvetten	Eurogentec, Seraing, Belgien
Elektrophoresekammer Sub Cell GT	BioRad, München
Entwicklermaschine Agfa Curix 60	Agfa-Gevaert, Mortsels, Belgien
EpiChemie ³ Darkroom	Intas, Göttingen
FACS Calibur	Becton Dickinson, San José, USA
FACSVantage SE Systems	Becton Dickinson Labware, San José, USA
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan	Zeiss, Göttingen
Innova 4230, Refrigerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, USA
Labofuge M	Heraeus Sepatech, Osterode

Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
Mini-Protean II	Bio-Rad, München
Phasenkontrastmikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop IM 35	Zeiss, Jena
pH-Meter MP225	Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Schweiz
Pipettboy	Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald
Pipette Typ Reference 1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Pac 200/300	Bio-Rad, München
Pulse Generator EPI 2500	Dr. Fischer, Heidelberg
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sigma 4K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode
Sterilbank VFB 1806	Clan Laf, Dänemark
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-1202 Spectrophotometer	Shimadzu
UV-Transilluminator Gel Doc 1000	Bio-Rad, München
Vortex VF2	IKA-Labortechnik, Staufen
Waage Mettler AM100	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Waage Mettler PM2000	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Wasserbad Typ 1004	GFL mbH, Burgwedel
Zählkammer Thoma, Tiefe 0,100 mm, 0,0025 mm ²	Marienfeld laboratory glasware, Lauda-Königshofen

3.1.2 Kunststoffwaren und Einwegartikel

96-Well-PCR-Platten	Abgene, Epsom, Großbritannien
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Home
FACS-Tubes	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Falcon Blue Max Centrifuge Tubes (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Falcon Serologische Pipetten	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Filter Millex-GV, Millex-FG	Millipore
Gel Blotting Paper	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
Halb-Mikro-Küvetten, 10x4 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Immobilon™PVDF Transfer Membran	Millipore Corporation, Bedford, USA
Injekt® Solo Einmalspritzen steril	B/Braun Melsungen AG, Melsungen
MicroAmp Optical 96- well reaction plate	PE Applied Biosystems, USA
MicroAmp Optical caps	PE Applied Biosystems, USA
Millipore low protein filter, Ø 0,4 µm	Millipore, Corporation, Bedford, USA
Nunc Cryotubes	Nunc GmbH, Wiesbaden
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Round Bottom Tubes	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikware für die Zellkultur	NUNC Brand Products, Roskilde, Dänemark

SDS-PAGE Ready Gel, 4%, 15%	BioRad, München
Sterican® Einmal-Injektions-Kanülen	B/Braun Melsungen AG, Melsungen

3.1.3 Programme und Datenbanken

Adobe® Illustrator®	Adobe® Systems Inc. San Jose, USA
Adobe® Photoshop®	Adobe® Systems Inc. San Jose, USA
Cellquest®	Becton Dickinson, Heidelberg
Chromas	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
EndNote X	Thomson
Microsoft® Office Excel 2003	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® Office Word 2003	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NEBcutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
NCBI Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Primer Express®	Applied Biosystems
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Sequence Detector v1.6	Applied Biosystems, USA
SPSS 16.0	SPSS Inc., Chicago, USA

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

10x DNase I Reaktionspuffer	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
10× Puffer 2	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
10× Puffer 3	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

40 % Glucose-Lösung (steril)	B/Braun Melsungen AG, Melsungen
5× LR Clonase™-Reaktions-Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
5× T4 DNA-Ligase Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
5-Amino-2,3-dihydro-1,4-Phthalzinedion	Sigma, Taufenkirchen
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Eurogentec, Seraing, Belgien
Ampicillin	Sigma, Taufenkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufenkirchen
Buprenorphin (Temgesic®)	Essex Pharma GmbH, München
Biocoll-Trennlösung	Biochrom AG, Berlin
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Carprofen (Rimadyl®)	Pfizer Pharma GmbH, New York, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
dATP, dTTP, dCTP, dGTP (100 mM)	Eppendorf, Hamburg
Desoxycholat	Sigma, Taufenkirchen
DEPC (Pyrokohlensäurediethylester)	Canberra-Packard GmbH, Dreieich
dH ₂ O	Zentralapotheke der Universitätskliniken, Münster
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufenkirchen
Ethanol 99,8%	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäuresalz (Na-EDTA)	Serva, Heidelberg
FACS Lysing solution	Becton Dickinson, Heidelberg

Heparin (Liquemin [®])	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Zentralapotheke der Universitätskliniken, Münster
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	B/Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanamycin-Disulfat	Merck, Darmstadt
Lipofectamine [™] Transfection Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lymphoprep [™]	Axis-Shield, Oslo, Dänemark
Methanol	Honeywell, Morristown, NJ, USA
M-MLV-RT 5x-Reaktionspuffer	Promega GmbH, Mannheim
Natriumnitrat (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
NP40 (Igepal CA-630)	Sigma, Taufenkirchen
<i>p-coumaric acid</i>	Sigma, Taufenkirchen
Pfu 10× Reaktionspuffer	Promega GmbH, Mannheim
PLUS [™] Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Polybrene [®]	Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA
Proteinase Inhibitor Complete [™]	Boehringer, Mannheim
Propidiumiodid	Sigma, Taufenkirchen
qPCR [™] Mastermix for SYBR [®] Green I QGS	Eurogentec, Seraing, Belgien
qPCR [™] Mastermix Quick Gold Star	Eurogentec, Seraing, Belgien
Random Primer (3μg/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sephadex G-50	GE Healthcare Home
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma, Taufenkirchen

Tris Base	Sigma, Taufenkirchen
Tris-HCl	Sigma, Taufenkirchen
TRIzol® Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Gibco, Carlsbad, CA, USA
Tween-20	Merck, Darmstadt
Xylen Cyanol FF	Sigma, Taufenkirchen

Nicht aufgeführte Standardchemikalien waren von höchstem käuflichen Reinheitsgrad und stammten von den Firmen Sigma-Aldrich (Milwaukee, USA), Amersham Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg), Riedel-de-Häen (Seelze), Bio-Rad (München) oder Merck (Darmstadt).

3.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 5: Verwendete Medien und Zusätze.

Medium/Zusatz	Hersteller
GIBCO®RPMI 1640 Medium ohne L Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium mit 20 mM HEPES	Biochrom AG, Berlin
Fötales Kälber Serum (<i>fetal calf serum</i> , FCS) (vor Verwendung 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100x) 10000 U, 10 mg/ml in PBS	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
L-Glutamin 29,3 mg/ml in normal saline (200 mM)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom AG, Berlin

WEHI (IL3-haltiger Überstand der Zelllinie WEHI 3B)	Kultivierung von WEHI 3B in IMDM mit 10% FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und β -Mercaptoethanol ($2,5 \times 10^{-5}$ M), Zentrifugation (400 g, 5 min), Sterilfiltration, Lagerung bei -20 °C
GIBCO® DMEM (high glucose)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
GIBCO® IMDM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Complete Methylcellulose Medium with Agar Leukocyte Conditioned Media and Erythropoetin	StemCell Technologies Inc, Vancouver, Kanada
Metolose	Shin-Etsu Chemical Co., Tokyo, Japan
ES-Cell-FCS, an embryonalen Stammzellen getestet	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Conditioned Medium (Überstand der murinen Fibroblastenzelllinie L-cells)	Kultivierung von L-cells in DMDM mit 10% FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 4mM Glutamin bis zur Konfluenz. Waschen der Zellen mit PBS, Inkubation mit 2 ml Trypsin für 2-5 min und Aufnahme der Zellen in 8 ml PBS. Je 300 μ l der Suspension werden in 10 ml DMEM gegeben und bei 37 °C kultiviert. Abnahme des Überstands nach 4 Tagen (Charge 1) und nach 7 Tagen (Charge 2). Sterilfiltration der Chargen und Mischen im Verhältnis 1:2.
IL-3	Eigene Herstellung des Labors für molekul. Hämatologie/Onkologie der med. Klinik und Poliklinik A, UKM
Humanes rekombinantes Erythropoetin	Sigma, Taufenkirchen
Transferrin	Eigene Herstellung des Labors für molekul. Hämatologie/Onkologie der med. Klinik und Poliklinik A, UKM
Lipids cholesterol rich	Sigma, Taufenkirchen
Linoleic Acid, Oleic Acid, Arachidinic Acid	Sigma, Taufenkirchen
Monothioglycerol	Sigma, Taufenkirchen
Humanes rekombinantes Insulin	Sigma, Taufenkirchen
Humanes rekombinantes IL-6	CellSystems Biotechnologie, St. Katharinen
Rekombinanter muriner Stammzellfaktor	CellSystems Biotechnologie, St. Katharinen

3.1.6 Hergestellte Puffer und Lösungen

5x Running-Buffer (pH 8.3)	0,125 M Tris Base 0,96 M Glycin 0,5 % SDS in ddH ₂ O
5x SDS gel loading Buffer (Laemmli-Buffer)	1 M Tris-HCL (pH 6.8) 2,5 ml SDS 3,75 g Glycerol 12,5 ml Bromphenol 50 mg β-Mercaptoethanol 500μl add 50 ml H ₂ O
50x TAE-Puffer	242 g Tris-Base 51 ml Eisessig 50 μM EDTA aufgefüllt auf 1 l H ₂ O
6x DNA-Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylen Cyanol FF 30 % Glycerol
Ammoniumchlorid- Kaliumhydrogencarbonat- (AKC-) Puffer	4,145 g NH ₄ Cl 0,5 g KHCO ₃ 0,0186 g EDTA ad 500 ml H ₂ O
DEPC-Wasser	1:1000 DEPC in Wasser, zweimal autoklaviert
dNTPs (10 mM)	10 μl dATP, 10 μl dTTP, 10 μl dCTP, 10 μl dGTP 60 μl H ₂ O

<i>Enhancer</i>	0,11% (w/v) <i>p-coumaric acid</i> in DMSO
FACS-Puffer	0,5 % humanes Serumalbumin 0,1 % NaN ₃ in PBS
LB-Medium und –Agar	12,5 g LB 7,5 g Agar (nur für Platten) 500 ml H ₂ O
Luminol	0,025 % (w/v) 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-Phthalzinedion in 0,1 M Tris (pH 6,8)
Methylcellulose nach Dr. F. Kiefer (MPI Münster), selbstsynthetisiert (Ansatz mit 90 ml)	50 % Methylcellulose 10 % ES-Cell-FCS 5 % BSA 15 % Conditioned Medium 1,5 % IL3 0,76 % Transferrin 0,05 % Erythropoetin 0,1 % Lipid (cholesterol rich) 0,025 % Lipid (Linoleic Acid, Oleic Acid, Arachidinic Acid) 0,1 % Monothioglycerol 0,1 % humanes rekombinantes Insulin 0,011% humanes rekombinantes IL6 0,0125 % rekombinanter muriner Stammzellfaktor mit IMDM auf 100 % auffüllen

Milchpulverlösung	1:20 Milchpulver in PBST
PBS	0,8 % (w/v) NaCl 0,02 % (w/v) KCL 0,025 % (w/v) KH ₂ PO ₄ 0,135 % (w/v) KH ₂ PO ₄ •H ₂ O
PBST	0,1 % Tween-20 in PBS
Proteinase Inhibitor	1 Tablette Proteinase Inhibitor Complete™ in 2ml H ₂ O auflösen
Radioimmunoprecipitation assay Puffer (RIPA-Puffer)	150 mM NaCl 1 % NP 40, 0,5 % Desoxycholat 0,1 % Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) 50 mM Tris (pH 8.0)
Self-made Luminol	1,6 ml Luminol 25 µl Enhancer 2,5 µl H ₂ O ₂
SOB-Medium	20 g/l Bactotrypton 5 g/l Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄

SOC-Medium	20 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 2 mM Glukose in SOB-Medium
------------	--

Transferpuffer	3,03 g Tris-Base 14,3 g Glycin 200 ml Methanol 800 ml ddH ₂ O
----------------	---

3.1.7 Enzyme

BamH1	New England Biolabs, Ipswich, USA
-------	-----------------------------------

DNase I (2 U/μl)	New England Biolabs, Ipswich, USA
------------------	-----------------------------------

LR Clonase TM -Enzym-Mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
-------------------------------------	----------------------------

M-MLV-Reverse Transkriptase H (-) Point Mutant (20 U/μl)	Promega, Madison, USA
---	-----------------------

Pfu DNA Polymerase (3 U/μl)	Promega, Madison, USA
-----------------------------	-----------------------

RNAse Out TM Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
---	----------------------------

T4 DNA Ligase (3 U/μl)	Promega, Madison, USA
------------------------	-----------------------

Taq DNA Polymerase	QIAGEN GmbH, Hilden
--------------------	---------------------

XhoI	New England Biolabs, Ipswich, USA
------	-----------------------------------

3.1.8 Primer und Oligonucleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

Tabelle 6: Primer und Sonden für Real-time PCR und Sequenzierung.

Name	Sequenz (5' to 3')	Basen
hu-EMCN fw Primer	GGG TGG AAA AAA TGC AAG CA	20
hu-EMCN rev Primer	GCA ATA ACC ACC GGC AAA AT	20
hu-EMCN fw Primer 2 RT	TGG TGG GTT TGT ACC GAA TGT	21
hu-EMCN rev Primer 2 RT	TCA GAC TGA GGT TGATCA TTT CCA	24
hu Endomucin Probe	FAM-TTC AGC AAC CAG CCG GTC TTA TTC CAG TA-TAMRA	29
mu-EMCN fw Primer	AAG ATT GCA ACC ACT CCA TCA A	22
mu-EMCN rev Primer	ACA ACC AGC GCG ATA ACC A	19
fw RT GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	19
rev RT GAPDH	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	20
GAPDH Probe	VIC-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-TAMRA	20
Fw BamH1 pENTR1A Endomucin	CGG GAT CCC GAT GGA ACT GCT TCA AGT GAC	30
Rev XhoI pENTR1A Endomucin	CCG CTC GAG CGG TCA GTT CTT GGT TTT TCC TTG	33

3.1.9 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Label	Spender-Spezies	Herkunft	Verwendung Verdünnung
L6H10 Endomucin	-	Rat	Dr. Friedemann Kiefer (Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster)	

Purified IgG2a, κ Monoclonal Immunglobulin Isotype	-	Rat	BD Biosciences Pharmingen	Isotypenkontrolle
AffiniPure Anti-Rat IgG (H+L)	FITC	Goat	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	FACS Sekundärantikörper
Fragment AffiniPure F(ab') ₂ Anti- Rat IgG (H+L)	Peroxidase	Donkey	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	Westernblot
α -Aktin	-	Mouse	Sigma, Taufenkirchen	Westernblot
Fragment AffiniPure F(ab') ₂ Anti- Mouse IgG (H+L)	Peroxidase	Goat	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	Westernblot
CD34 (Anti-HPCA-2)	PE	Mouse	Becton Dickinson Immunocytometry Systems	FACS
IgG1, κ	PE	Mouse	BD Biosciences Pharmingen	Isotypenkontrolle
Anti-Human CD45	FITC	Mouse	BD Biosciences Pharmingen	FACS
IgG1, κ	FITC	Mouse	BD Biosciences Pharmingen	Isotypenkontrolle
Anti-Mouse CD45	PE	Rat	BD Biosciences Pharmingen	FACS
IgG2b, κ	PE	Rat	BD Biosciences Pharmingen	Isotypenkontrolle

3.1.10 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete eukaryotische und prokaryotische Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung
HL-60	Humane Zelllinie der akuten myeloischen Leukämie, promyelozytärer Zelltyp. C-Myc positiv ^[56]

KG-1	Humane Zelllinie der akuten myeloischen Leukämie, myeloblastärer Zelltyp ^[94]
NB-4	Humane Zelllinie der akuten myeloischen Leukämie, promyelozytärer Zelltyp. Trägt t(15;17) PML-RARA Fusionsgen ^[102]
U-937	Humane histiozytäre Lymphom-Zelllinie ^[163]
Kasumi-1	Humane Zelllinie der akuten myeloischen Leukämie, myeloblastärer Zelltyp (AML FAB M2). Trägt t(8;21) AML1-ETO Fusionsgen ^[4]
KCL-22	Humane Zelllinie der chronischen myeloischen Leukämie in Blastenkrise, Philadelphia-Chromosom positiv ^[98]
32D-Zellen	Murine myeloische Progenitor-Zelllinie. IL-3-abhängig ^[64, 173]
CD34 ⁺ Zellen	Humane hämatopoetische Knochenmark-Zellen, aufgereinigt auf CD34
Escheria coli DH5 α	E.coli, F α 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYAaegF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rKi,mK+), phoA, supE44, α -thi-1, gyrA96, relA1
PlateE-Zellen	Retrovirus-Verpackungszelllinie mit stabil integrierten Kopien von viralen Strukturgenen (gag, pol, env) und EF1 α -Promotor. Stammen von 293T-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) ab ^[124]
SC1	Murine Fibroblasten-Zelllinien aus Wildtypmaus-Embryos ^[71]
HMEC-1	Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie ^[2]
HCT	Humane kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie ^[170]
HEK 293	Humane embryonale Nieren-Zelllinie ^[63]
Hela	Humane Zervix Adenokarzinom Zelllinie ^[153]
Jurkat	Humane Zelllinie der akuten lymphatischen Leukämie, T-lymphozytärer Zelltyp ^[62]
K562	Humane Zelllinie der chronischen myeloischen Leukämie in Blastenkrise, Philadelphia-Chromosom positiv ^[110]
mC6 2	Hybridomzelllinie ^[186]
ML-1	Humane Zelllinie der akuten myeloblastischen Leukämie ^[133]
MV4-11	Humane akute biphänotypische Leukämie-Zelllinie, B-lymphozytär und myelomonozytärer Zelltyp ^[101]
U87	Humane neuronale Glioblastom-Zelllinie ^[142]

3.1.11 Patientenproben

Patientenproben stammen von Patienten, welche in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A, Universitätsklinikum Münster, behandelt wurden. Knochenmarksproben wurden von gesunden Spendern gesammelt. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Nabelschnurblut erhielt ich durch die freundliche Unterstützung der Hebammen und Ärzte des Clemenshospitals Münster. Das Nabelschnurblut wurde bei einer natürlichen Geburt direkt nach der Abnabelung durch Punktion der Nabelvene gewonnen. Ein Ethikvotum für die wissenschaftliche Verwendung von Stammzellen gesunder Spender, Nabelschnurblut und Patientenproben liegen vor (Ethikvotum 2007-524-f-S, Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 07.03.2008).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

Um standardisierte homogene Zelllinien kultivieren zu können, ist steriles Arbeiten mit einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank nötig sowie die Kultivierung bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂-Anteil in einem Inkubator. Als Medium für humane Zelllinien (HL60, NB4, Kasumi) wurde RPMI 1640 unter Zugabe von 10 % FCS (fetal calf serum), 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Die 32D Zellen wurden in RPMI 1640 mit 20 mM HEPES (komplettiert mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Natriumpyruvat) und 10 % WEHI kultiviert. Für Plate E Zellen und SC1-Zellen wurde DMEM (High Glucose) mit 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FCS eingesetzt.

3.2.2 Gefrierkonservierung von Zellen

Um Zellvorräte anzulegen wurden Zellen bei -80°C gefrierkonserviert. Dabei wurden die Zellen nach Zentrifugation in einem Konservierungsmedium bestehend aus 1,8 ml FCS und 10 % kryoprotektivem Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Zum langsamen Herunterkühlen wurden die Kryoröhrchen mehrmals in Zellulose eingewickelt und dann bei -80°C weggefroren.

Zum Auftauen wurden die Zellen kurz in 37°C warmen Wasserbad geschwenkt, in 10 ml Medium aufgenommen, zentrifugiert (400 g, 5 min, Raumtemperatur), der Überstand abgenommen und in dem entsprechenden Medium resuspendiert.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung wurden tote Zellen markiert, da die Zellmembran toter Zellen defekt und somit durchlässig für Trypanblau ist. Die Zellzahl wurde nach der Auszählung der vier Großquadrate einer Neubauer Zählkammer folgendermaßen berechnet:

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

X = Zellkonzentration [Zellen/ml]; N = gezählte Zellzahl; Q = Anzahl der ausgezählten Großquadrate; $V_K = 10\text{-}4$ ml (Kammervolumen über einem Großquadrat); V_G = eingesetztes Gesamtvolumen [ml]; V_Z = Volumen der eingesetzten Zellsuspension [ml]

3.2.4 Aufbereitung von Nabelschnurblut mittels Ficollseparation

Jeweils maximal 15 ml des Nabelschnurblutes wurden mit sterilem PBS auf 35 ml verdünnt. Mit dem verdünnten Nabelschnurblut wurden dann jeweils 15 ml Lymphoprep/ Biocoll-Lösung vorsichtig überschichtet und bei 400 g 20 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert. Die sich daraufhin gebildete Interphase wurde entnommen, abzentrifugiert (400 g, 5 min, Raumtemperatur), mit 40 ml PBS gewaschen und mit 2 ml AKC-Puffer 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 40 ml PBS wurde das Pellet in 2ml RPMI-Medium aufgenommen und mittels Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden dann entweder zu RNA- oder Protein-Lysate weiterverarbeitet oder für Colony Assays verwendet.

3.2.5 Colony Assay

Die Koloniebildungsversuche gehören zu den funktionellen Assays und ermöglichen Aussagen zu Eigenschaften und hämatopoetisch-proliferativem Potential von Zellen, die dann als sogenannte Kolonien bildende Einheiten (colony-forming units, CFU) bezeichnet werden.

Aufgereinigte humane $CD34^+$ Zellen bzw. mittels Ficollseparation aufgearbeitetes Nabelschnurblut wurden in PBS aufgenommen, gezählt und mit einer Färbung mit FACS-Antikörpern gegen Endomucin und ggf. CD34 behandelt (s. Kap. 3.2.6). Anschließend wurden die Proben mittels eines Fluorescence-Activated Cell Sorter in Fraktionen sortiert. Je nachdem, welche Färbung angewandt wurde, waren dies eine Endomucin-Oberflächenantigen-positive Fraktion, eine Endomucin-Oberflächenantigen-negative Fraktion, eine CD34-positive Fraktion oder eine CD34- und Endomucin-positive Fraktion. Die Fraktionen wurden in verschiedenen Zellzahlen (siehe Ergebnisse) eingesetzt, mit je 4 ml Humaner Methylcellulose Komplett kultiviert und je 1 ml auf einer 35 mm Petrischale

ausgestrichen (in dreifacher Ausführung). Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen bei 37 °C und 5% CO₂ erfolgte eine mikroskopische Quantifizierung der gewachsenen Kolonien sowie mehrere Replatings der Zellen. Hierfür wurde je 1ml PBS in jede der drei Petrischalen eines Ansatzes gegeben, die Methylcellulose der drei Petrischalen zusammengeführt und für 10 min bei 400 g und RT zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl PBS resuspendiert. Dann wurden die Zellkonzentrationen der verschiedenen Ansätze ermittelt und jeweils eine bestimmte Zellzahl der Ansätze auf 4 ml Humaner Methylcellulose Komplette gebracht. Danach erfolgte wie zuvor eine siebentägige Inkubationszeit mit nachfolgender Auswertung. Die Ergebnisse wurden auf einer weiteren, nach den Angaben von Dr. Friedemann Kiefer (Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster) selbstsynthetisierten Methylcellulose, welche eine individuelle Zytokingabe erlaubt, reproduziert (s. Kap. 3.1.6).

3.2.6 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence-Activated Cell Sorter) lassen sich die einzelnen Zellen einer Zellsuspensionen innerhalb eines Durchflusssystems hinsichtlich ihres Streulicht- und ihres Fluoreszenzverhaltens charakterisieren und zusätzlich noch sortieren. Dabei lassen sich über das Streulichtverhalten Aussagen zu Größe (forward angle light scatter, FSC) und Granularität (sideward angle light scatter, SSC) der einzelnen Zelle machen. Dadurch ist eine Diskrimination zwischen lebendigen Zellen und Zellschrott oder zwischen verschiedenen Zellpopulationen in einer gemischten Probe möglich. Anhand des Fluoreszenz-Musters können Aussagen über die spezifische Expression von Oberflächenantigenen einer Zelle gemacht werden.

Dafür werden die Zellen mit monoklonalen Antikörper gefärbt, welche entweder selbst Fluorochrome-konjugiert sind oder primäre Antikörper für die relevante Spezifität, welche im nachfolgenden Schritt mit Fluorochrome-konjugierten Antikörpern gekoppelt werden. Übliche Fluorochrome sind FITC (fluorescein isothiocyanate) und PE (phycoerythrin) (Tabelle 7).

Die Zellsuspension wird während der Messung über eine Kapillare aufgesogen und in einen feinen Flüssigkeitsstrahl innerhalb einer Hüllflüssigkeit umgewandelt, so dass die Zellen einzeln den Analysepunkt am Laser passieren. Das Laser-Licht wird gestreut und regt zusätzlich die Fluoreszenzfarbstoffe an. Photodetektoren messen sowohl das gestreute Licht

als auch die emittierten Photonen. Ein Computer kann die Daten analysieren und sowohl als ein- als auch als zweiparametrische Histogramme darstellen. Dabei können sog. „Regions of Interest“ (Gates) definiert werden, um gewisse Zellpopulationen für weitere Histogramme und Auswertungen auswählen zu können. Einige Durchflusszytometer sind zusätzlich noch in der Lage die so charakterisierten Zellen physikalisch zu trennen und zu sortieren.

Zur Vorbereitung von Zellen für die FACS-Analyse wurden 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und jeweils 5×10^5 Zellen mit dem monoklonalen Antikörper (rat-Endomucin-Ak (L6H10)) bzw. mit einer Isotypenkontrolle (IgG2a) 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die verwendeten Antikörper werden im Kapitel 3.1.9 (Tabelle 7) im Detail erläutert. Anschließend wurden überschüssige Antikörper durch Waschen mit 500 µl PBS (Zentrifuge: 400 g, 4°C, 5 min) entfernt. Das dabei gewonnene Zellpellet wurde mit dem sekundären Antikörper (anti-rat-Antikörper, FITC-konjugiert, 1 µl auf 200 µl PBS) resuspendiert. Im Falle einer Doppelfärbung wurde hier noch ein weiterer Antikörper hinzugegeben (CD34-Ak (Anti-HPCA-2), PE-konjugiert). Es erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 30 min bei 4°C und Dunkelheit. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen, in ein Messgefäß überführt und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt, um ein Ausbleichen der Färbung zu verhindern.

3.2.7 Transplantation in NOD/SCID-Mäuse

Die Transplantation humaner Zellen in immunsupprimierte Mäuse dient als Modell zur Abschätzung der Langzeitrepopulationsfähigkeit hämatopoetischer Zellen und somit zur Identifikation und Charakterisierung von humanen Stammzellen, sowohl normale als auch leukämische.^[103] Dabei sollte der Empfänger das Transplantat nicht durch eine Immunreaktion eliminieren und ein passendes Microenvironment für Engraftment und Differenzierung bieten. Bosma und Carrol entdeckten, dass Mäuse mit der Mutation im scid-Gen einen schwerwiegenden Defekt der B- und T-Lymphozyten haben und etablierten SCID (= severe combined immune-deficient)-Mäuse in der Xenotransplantation. Der Defekt beruht auf einem Rekombinationsunvermögen für Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene.^[17] Da SCID-Mäuse noch eine Restimmunität besitzen durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), das Komplementsystem und myeloide Zellen, wurden aus den SCID-Mäusen durch Rückkreuzung NOD (nonobese diabetic)/SCID Mäuse entwickelt. Diese weisen Defekte im

Komplementsystem sowie in der Makrophagenfunktion auf und haben geringere Anzahl an NK-Zellen. Aufgrund des Lymphozyten-Defekts bilden sie keinen Autoimmundiabetes aus.^[157] Wegen ihrer guten Engraftment-Kapazität und der niedrigen benötigten Dosis an Transplantat-Zellen bilden NOD/SCID-Mäuse zur Zeit den Goldstandard für *in vivo* Hämatopoese-Modelle und primitive humane Vorläuferzellen mit dem Potential zur multilineären Repopulation in SCID und NON/SCID-Mäusen werden SCID repopulierende Zellen (SRC=SCID repopulating cells) genannt.^[12, 88, 104, 116, 117]

Alle Experimente wurden freundlicherweise durch Dr. Marc Hotfilder und seine Arbeitsgruppe (Pädiatrische Hämatologie/Onkologie, Universität Münster) gemäß Tierschutzgesetz § 8 Abs. 2 durchgeführt und unterlagen sterilen Bedingungen an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank. Eine Genehmigung der Bezirksregierung Münster (Genehmigungsbescheid zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren/Tierschutz vom 14.04.2003, Az.: 50.0835.1.0 (G25/2003)) liegt vor. Die unter festgelegten mikrobiellen Konditionen und in individuell klimatisierten (HEPA-gefilterte Luft) Mikroisolatoren gehaltenen NOD/SCID-Mäuse wurden im Alter von 8-14 Wochen subletal mit einer Dosis von 3,75 Gy aus einer Cobalt-60-Quelle bestrahlt und am nächsten Tag transplantiert. Die zu transplantierenden auf CD34 aufgereinigten Knochenmarkszellen wurden aufgetaut und in einer Zellzahl von $2,3 \times 10^7$ Zellen entsprechend den Angaben in Kap. 3.2.6 mit einer FACS-Färbung gegen Endomucin versehen und in eine Endomucin-Oberflächenantigen-positive und eine Endomucin-Oberflächenantigen-negative Sektion sortiert. Je Sektion wurden $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 und 1×10^5 Zellen in 0,5 ml RMPI-Medium mit 20 % FCS in je zwei Mäuse intrafemoral injiziert. Für die Transplantation wurden die Mäuse mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (2,5 % Isofluran und 0,5 l O₂ pro Minute) anästhesiert und mit 3 µg Buprenorphin oder 50 ng Carprofen pro 10 g Körpergewicht via subkutaner Injektion analgesiert. Die Punktion fand am rechten Femur mit einer 25 oder 27 G Nadel statt. Bis zu 30 µl Probenvolumen wurden mit einer 0,5 ml Insulinspritze (27 oder 30 G) langsam injiziert. Nach 6 Wochen wurden die Mäuse wieder mit einer 25 oder 26 G Nadel femoral punktiert. Knochenmark wurde mit einer 25 G Nadel aspiriert und in 400 µl PBS Puffer mit 10 % Heparin gelagert.

Um die humanen hämatopoetischen Zellen in den transplantierten Mäusen zu quantifizieren und charakterisieren, wurde das aspirierte murine Knochenmark via Durchflusszytometrie ausgewertet. Dabei wurden zuerst die Erythrozyten lysiert (FACS Lysing solution) und die Zellen mit Antikörpern in sättigender Konzentration entsprechend den Anweisungen in Kap.

3.2.6 inkubiert. Humane anti-CD45-FITC-Antikörper sollten die humanen Zellen im murinen Knochenmark identifizieren, während murine anti-CD45-PE-Antikörper gegen murine Knochenmarkszellen gerichtet waren (Tabelle 7).

3.2.8 Tissue Microarray-Herstellung und Immunhistochemie

Tissue Microarrays (TMA) sind Zusammenstellungen verschiedener Gewebepräparate eingebracht in einen einzigen Paraffinblock. TMAs ermöglichen die Analyse von bis zu 1000 Proben gleichzeitig. Durch Verwendung mehrerer Schnitte desselben TMA-Paraffinblocks kann die gleiche Gewebebiopsie sowohl histologisch, auf DNA- (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)), RNA- (RNA-in-situ-Hybridisierung) oder Protein-Level (Immunhistochemie (ICH)) untersucht werden.

Für die Herstellung eines TMA werden morphologisch repräsentative oder blastenreiche Regionen einer in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe (in diesem Fall Knochenmarkstanzbiopsien) mittels eines Giemsa gefärbten Schnittpräparates ausgewählt und aus dem Donor-Paraffinblock gestanzt (Durchmesser 0,6 mm, Höhe 3-4 mm). Die ausgestanzten Biopsien werden in einen neuen und leeren Rezipienten-Paraffinblock (45 x 20 mm) eingebracht. Durch digitale Präzisionssteuerung können die Proben in kontrollierten Abständen platziert werden und ergeben ein Gewebsraster von einigen hundert bis eintausend Biopsien pro Array. Von jedem Tissue Array-Block können 200-300 aufeinanderfolgende Schnitte von 4-8 µm Dicke erzeugt werden. Dadurch können Biopsien von einer großen Anzahl von Patienten auf verschiedene molekulare Marker konsekutiv gescreent werden.

In dieser Arbeit wurde die vorliegende Methode zur immunhistochemischen Analyse benutzt. Konstruktion des Tissue Microarrays und immunhistochemische Färbung und Auswertung wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Horst Bürger (Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie, Universität Münster) durchgeführt. Im konkreten Experiment wurden Knochenmarkbiopsien von 172 Patienten mit primärer unbehandelter AML, 10 Proben mit angereicherten CD34-positiven Knochenmarkszellen, 19 verschiedene Zelllinien (Tabelle 8) und 72 Knochenmarkstanzbiopsien von gesunden Patienten im Array angeordnet. Pro Patient/Biopsie wurden zwei Stanzen eingesetzt um die intratumorale Heterogenität von Endomucin zu analysieren. Die 4 µm dicken Schnittpräparate des Rezipienten-Paraffinblocks wurden auf SuperFrost/Plus Objektträger aufgebracht und mit Xylene deparaffiniert. Im

Anschluss wurden die Tissue Array-Schnitte rehydriert und in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) für 10 min bei 121 °C autoklaviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Schnittpräparate mit dem Primärantikörper gegen Endomucin L6H10 (Tabelle 7) inkubiert. Zur Detektion wurde die D-APAAP Methode verwandt. Endomucin-Expression wurde als positiv oder negativ eingestuft.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Protein-Lysate

Um Gesamtzelllysate zu gewinnen wurden die Zellen abzentrifugiert (400 g, 5 min, Raumtemperatur), mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend 30 min auf Eis in Radioimmunoprecipitation assay Puffer (RIPA-Puffer – enthält 150 mM NaCl, 1 % NP 40, 0,5 % Desoxycholat, 0,1 % Sodium Dodecyl Sulfat (SDS), 50 mM Tris (pH 8.0))mit Proteinase Inhibitor und 1mM Sodium Orthovanadat lysiert. Danach wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C mit 17900 g zentrifugiert. Der resultierende proteinhaltige Überstand konnte direkt weiterverwendet oder bei –80 °C eingefroren werden.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Test)

Der Proteingehalt der Proben wurde vor jeder SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit dem BCA-Test bestimmt. Diese Methode kombiniert die Biuret-Reaktion, die die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischer Lösung beschreibt, mit der colorimetrischen Detektion der entstandenen Cu^{1+} -Ionen durch eine Chelatkomplexbildung mit je zwei Molekülen Bicinchoninsäure, wodurch sich ein violetter Komplex bildet. Dieser Komplex zeigt eine Absorption bei 562 nm, die fast linear zur Proteinkonzentration ist und somit photometrisch bestimmt werden kann. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration dient eine Eichgrade, die mit Hilfe einer BSA-Standardreihe erstellt wird.^[159]

Zunächst wurde die Proteinstandardreihe mit BSA-Lösungen der Konzentration 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1mg/ml, 0,5 mg/ml und 0,25 mg/ml erstellt. Dann wurde das Testreagenz angesetzt. Beim BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Bonn) müssen die gegebenen Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 50:1 gemischt werden. Je 1 ml dieses Gemisches wurde mit je 5µl der Probe bzw. der Standardreihe versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 562 nm gemessen und unter Verwendung der Kalibrationskurve der Standardreihe die Proteinkonzentration errechnet.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) ermöglicht die Auftrennung eines Gemisches von Proteinen anhand deren Molekulargewicht. Als Träger dient ein hochvernetztes Polyacrylamidgel mit definierter Porengröße, das die Proteine entlang eines elektrischen Feldes durchlaufen, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekularmasse der Proteine ist. Durch den Vergleich der Wanderungstrecken mit mitgelaufenen Markerproteinen mit bekanntem Molekulargewicht ist eine Identifikation einzelner Proteine möglich.^[100]

Im Rahmen der Probenvorbereitung wurden je 30 µg des Proteingemisches mit RIPA-Puffer auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt, 1:5 mit 5x SDS gel loading Buffer versetzt und zusammen mit dem Proteinmarker 5 min bei 95°C erhitzt.

Als Standard wurde der Restained Protein marker, broad range der Firma Cell Signalling Technologies, USA mit Proteinbanden bei 175/83/62/47,5/32,5/25/16,5/6,5 kDa verwendet.

Das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet mit seinem Fettsäureanteil an die hydrophoben Bereiche der Proteine, die durch die Hitzebehandlung in Untereinheiten zerfallen sind, entfaltet diese und gibt ihnen somit eine negative Ladung. Dadurch wandern die Proteine während der Elektrophorese in Richtung der Anode. Das Mercaptoethanol spaltet zusätzlich noch die Disulfidbrücken.

Die vorbereiteten Proben sowie 10 µl des Standards wurden auf ein Gradientengel der Firma BioRad (Ready Gel, 4%, 15%) aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde in den ersten 15 min bei 70 V, dann bei 120 V durchgeführt. Erreicht der Bromphenolblau-Farbstoff des Ladepuffers den Boden des Gels, ist die Elektrophorese beendet.

3.3.4 Western Blot

Die Western-Blotting-Technik impliziert den Transfer der in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine mittels eines angelegten elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran und die Detektion von bestimmten Proteinen durch spezifische Antikörper.^[171]

Vor dem eigentlichen Transfer muss die Membran 15 s lang in Methanol aktiviert und zusammen mit dem Polyacrylamidgel, zwei Filterpapieren und Schwämmen in Transferpuffer 5 min getränkt werden. Dann wird die Membran ohne Luftblasen auf das Gel gelegt und

zwischen den Filterpapieren und den Schwämmen in die Blot-Kassette eingebracht. Die Blotkassette kommt zusammen mit einem Eistank und Transferpuffer in die Western-Blot-Kammer. Die Übertragung erfolgt bei 4 °C entweder für 3 h bei 60 V oder über Nacht bei 22 V. Der Erfolg ist an den transferierten farbigen Proteinbanden des Markers auf der PVDF-Membran zu erkennen.

Nach einem 10 min Waschschrift mit PBST wurde die zusätzliche Bindungskapazität der Membran durch eine 5 % Milchpulverlösung für 1 h auf dem Schüttler blockiert. Dann erfolgten drei weitere Waschschriffe mit PBST.

Der primäre, spezifische Antikörper (rat-Endomucin-Ak (L6H10), 2,5 µg/ml) wurde zusammen mit der Membran eingeschweißt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder insgesamt dreimal mit PBST für je 10 min gewaschen und für eine weitere Stunde mit einem sekundären, Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper (Donkey anti Rat, 1:10 000) bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBST und PBS konnten die Antikörper-konjugierten Proteine auf der PVDF-Membran mittels „Self-made“-Luminol oder dem ECL Advance Kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) detektiert werden. Dabei oxidiert die Meerrettichperoxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das Luminol und setzt somit Licht frei, welches zur Belichtung eines Röntgenfilms benutzt werden kann und so die Proteinbanden visualisiert.

Als Ladekontrolle der Proteinproben wurde die Membran in einem zweiten Färbeverfahren mit Aktin-Ak (1:6500) sowie einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Goat anti Mouse-Ak (1:10 000) inkubiert. Die verwendeten Antikörper werden im Kapitel 3.1.9 (Tabelle 7) im Detail erläutert.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolierung

Die Isolation der RNA wurde mit TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe), einer Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt.^[28]

1. Homogenisation

Um RNA aus Zellen extrahieren zu können müssen die Zellen als Zellpellet zuerst in Trizol aufgenommen werden. Dabei wurden 1ml Trizol pro 1×10^7 Zellen verwendet. Nach fünfminütiger Inkubationszeit bei RT konnten die Zellen bei -80°C eingefroren oder sofort weiterbehandelt werden.

2. Phasenseparation

Pro 1 ml verwendeten Trizol wurden 200 μl Chloroform dazugegeben und für etwa 15 s durch Schütteln vermischt. Dann folgte eine Inkubationszeit von 2-3 min bei RT. Das Gemisch wurde darauf für 15 min bei 4°C und 12 000 g zentrifugiert, so dass sich drei Phasen bildeten.

3. RNA-Fällung

Die oberste, wässrige und klare Phase wurde abgenommen, mit 500 μl Isopropanol (pro 1 ml Trizol) vermischt und wieder geschüttelt. Anschließend wurde 10 min bei RT inkubiert und 10 min bei 4°C und 12 000 g zentrifugiert.

4. Waschen der RNA

Nachdem der gesamte entstandene Überstand verworfen worden war, wurde die präzipitierte RNA 2x mit je 1 ml (pro 1 ml Trizol) 75% Ethanol gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 7500 g und 4°C). Der ethanolische Überstand wurde dabei entfernt und anschließend wurde das RNA-Pellet bei RT getrocknet bis sämtliches Ethanol verdunstet war. Nach Zugabe von 20 μl DEPC RNase freiem Wasser konnte die Probe im 60°C warmen Wasserbad 10 min inkubieren und dann die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt werden.

3.4.2 Bestimmung der Konzentration von RNA und DNA

Mittels einer 1:60 Verdünnung der Nukleinsäure-Probe wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Da die optische Dichte von 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg /ml DNA bei ihrem Absorptionsmaximum von 260 nm definitionsgemäß 1 entspricht, ergibt der OD₂₆₀-Wert multipliziert mit 40 µg/ml bzw. 50 µg/ml und multipliziert mit der Verdünnung die Nukleinsäure-Konzentration in µg/ml. Zusätzlich kann die Reinheit der Probe durch Berechnung des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt werden, welcher zwischen 1,8 und 2 liegen soll.

3.4.3 DNase-Behandlung

Da in der isolierten RNA-Probe noch Kontaminationen durch DNA sein können und diese falsche Ergebnisse in den folgenden Experimenten erzeugen können, muss vor der reversen Transkription eine Behandlung mit DNase durchgeführt werden.

Dazu wurden 1 µg der RNA-Probe mit 1 µl 10x DNase I Reaktionspuffer und 1µl DNase I (bei 1 U/µl) vermischt und mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 15 min bei RT inkubiert. Die DNase I wurde dann durch Zugabe von 1 µl einer 25 mM EDTA-Lösung inaktiviert. Nach 10 minütiger Inkubation bei 65 °C war die RNA bereit für die Reverse Transkription.

3.4.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription bietet die Möglichkeit RNA in ihre komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Als Grundlage dient das Prinzip der komplementären Basenpaarung katalysiert durch eine DNA-Polymerase wie bei der normalen Replikation. Da hier als Matrize eine RNA dient, wird ein spezielles Enzym benötigt, welches aus Retroviren stammt, die RNA-abhängige DNA-Polymerase Reverse Transkriptase. Diese synthetisiert in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen nach Anlagerung eines Primers unter Verwendung von Desoxynukleosidtriphophaten (dNTPs) einen komplementären DNA-Strang.

Die reverse Transkription erfolgte nach dem Protokoll der Firma Promega, bei dem die Polymerase dem moloney murine leukemia-Virus (M-MLV) entstammt und als Primer ein

Thymin-Oligonucleotid verwendet wird, welcher spezifisch am PolyA-Sequenz am 3'-Ende der mRNA anhybridisiert, so dass rRNA und tRNA nicht transkribiert werden.

Jeweils 1 µg DNase-behandelte RNA wurde mit 1 µl Random Primer, 1 µl RNaseOUT™ und 14,75 µl DEPC-behandeltem Wasser versetzt. Durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 70 °C für 5 min wurde die mRNA denaturiert, dann für weitere 5 min auf Eis gesetzt und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl M-MLV-5x-Reaktionspuffer, 1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase und 1,25 µl dNTPs (10mM) erfolgten zwei weitere Inkubationsperioden von 1 h bei 42 °C und anschließend 15 min bei 70 °C. Die fertige cDNA wurde mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.5 Real-time RT-PCR (Taqman)

Um Aussagen über die Expression von Endomucin in verschiedenen Zellpopulationen auf dem Level der Transkription machen zu können wurde die Methode der Real-time RT-PCR eingesetzt. Sie kombiniert Amplifikation, Detektion und Quantifizierung vom mRNA, nachdem diese wie oben beschrieben in cDNA transkribiert worden ist. Schlüsselenzym ist eine temperaturstabile DNA-abhängige DNA-Polymerase, in den meisten Fällen die Taq DNA Polymerase mit 5'-3'-Exonuclease-Aktivität. Diese benötigt Template-spezifische Primer, die sich an die beiden Endpunkte des Amplikons anlagern und somit für die Spezifität der Reaktion sorgen. Um das amplifizierte Produkt zu detektieren wurden zwei verschiedene Techniken eingesetzt.

Beim TaqMan™ Probe-Ansatz hybridisiert zusätzlich zu den Primern ein drittes Oligonucleotid, die Sonde, an die Zielsequenz. Die Sonde besitzt an ihrem 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (FAM (6-Carboxy-Fluorescein)), dessen Fluoreszenz durch einen Quencherfarbstoff, der an ihrem 3'-Ende lokalisiert ist (TAMRA (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin)), durch die räumlich Nähe unterdrückt wird. Während der Expansion des Primers durch die Taq DNA Polymerase hydrolysiert deren Exonuclease-Aktivität die Sonde und setzt somit den Reporterfarbstoff frei. Durch die fehlende Unterdrückung entsteht ein relativer Anstieg der Reporterfluoreszenz, welcher durch den ABI PRISM 7700 Sequence Detektor in Echtzeit gemessen wird.

Ungebundene Sonden können die Messung nicht verfälschen, da die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität doppelstrangspezifisch ist und die Sonden somit intakt bleiben.

Die zweite Detektionsmethode, die angewandt wurde, nutzt den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Da dieser Farbstoff ungebunden wenig Fluoreszenz abgibt, entsteht während des Denaturierungsschritts des PCR-Zyklus nur ein schwaches Fluoreszenzsignal. Im Polymerisationsschritt nimmt die Fluoreszenz dann zu. Deswegen wird immer nur am Ende eines jeden PCR-Zyklus die entstandene Fluoreszenz gemessen, welche somit proportional zur Anzahl vorhandener Doppelstränge ist.

Wichtig ist hierbei die Spezifität der Primer. Die verwendeten Primer werden im Kapitel 3.1.8 (Tabelle 6) im Detail erläutert.

Sowohl beim TaqMan™ Probe-Ansatz als auch beim SYBR Green Ansatz wird der Anstieg der Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus aufgezeichnet und in einer Amplifikationskurve in Relation zur Zykluszahl dargestellt. Je höher die Kopienzahl der Ziel-cDNA in der Probe zu Reaktionsbeginn ist, desto weniger Amplifikationszyklen werden gebraucht um einen Schwellenwert zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal als statistisch signifikant gegenüber dem Hintergrund gilt. Dieser Wert wird Threshold Cycle, kurz Ct-Wert, genannt und tritt in der exponentiellen Phase der Amplifikation auf. Bei einem PCR-System mit 100% Effizienz verringert sich der Ct-Wert um 1, wenn sich die Startkopienzahl verdoppelt. Die relative Konzentration lässt sich durch den Vergleich der Ct-Werte mit den Ct-Werten einer selbsthergestellten Standardreihe berechnen. Dividiert man die Werte der relativen Konzentration durch die Ct-Werte einer endogenen Referenz, also mRNA mit konstanter Expression, hier GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), erhält man das normalisierte Expressionsniveau, das den Schluss auf die Unterschiede in der initialen mRNA-Menge der einzelnen Proben zulässt.^[22, 58, 74, 77, 109, 128, 180]

Die Reaktionsansätze für die Real-time RT-PCR wurden nach folgendem Protokoll erstellt und in eine 96 well-Platte pipettiert (Tabelle 9).

Tabelle 9: TaqMan-Ansätze mit und ohne Sonde.

	TaqMan™ Probe-Ansatz	SYBR® Green-Ansatz
cDNA	2,5 µl	2,5 µl
Mastermix (eurogentec, Applied Biosystems)	6,25 µl	6,25 µl
5'-Primer (10 µM)	0,3 µl	0,3 µl
3'-Primer (10 µM)	0,3 µl	0,3 µl
Sonde (5 µM)	0,3 µl	0,3 µl
H ₂ O	2,85 µl	3,15 µl

Die PCR erfolgte mittels des ABI PRISM 7700 Sequence Detector nach folgendem Programm:

1. 50 °C, 2 min
2. 95 °C, 3 min
3. 95 °C, 15 s (Denaturierung)
4. 60 °C, 1 min (Annealing und Extension)

Schritt 3. und 4. werden 40-mal wiederholt entsprechend der PCR-Zyklenzahl. Ein zusätzlicher Extensionsschritt bei 72 °C entfällt, da die verwendete Taq DNA-Polymerase bereits ab >55°C genügend Aktivität zeigt.

3.5 Datenanalyse und Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmont, USA) und SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Sofern nicht anders angegeben, wurden Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Korrelationsanalysen wurden mittels Student's T-Test, einfaktorieller Varianzanalyse, Chi-Quadrat-Test und Kaplan-Meier-Methode durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant interpretiert.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von Endomucin auf murinen hämatopoetischen Zellen

Über die Expression von Endomucin in der Hämatopoese war zur Zeit der Bearbeitung dieser Arbeit wenig bekannt. Daher führten wir zunächst in verschieden weit ausgereiften Subpopulationen der Hämatopoese Untersuchungen zur Expression von Endomucin aus. Folgende Subpopulationen wurden untersucht, die für diese Arbeit von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe aus Maus-Knochenmark isoliert wurden: 1. Lin⁻Sca1⁺c-kit⁺-Zellen, 2. Lin⁻Sca1⁻c-kit⁺ Zellen, 3. Lin⁻Sca1⁻c-kit⁻ Zellen, 4. Lin⁺Sca1⁻c-kit⁻ Zellen. Die Bestimmung der Endomucin mRNA-Expression erfolgte wie unter Materialien und Methoden beschrieben mittels quantitativer real-time RT PCR mit Hilfe der SYBR[®] Green-Methode. Die Auswertung basiert auf der Δ Ct-Methode.

In allen Versuchsreihen zeigte sich die höchste Endomucin-Expression in Lin⁻Sca1⁺c-kit⁺ Zellen. Lin⁻Sca1⁻c-kit⁺ Zellen wiesen im Durchschnitt nur 4,8 % des Endomucin-mRNA-Gehaltes der Lin⁻Sca1⁺c-kit⁺ Zellen auf. Lin⁻Sca1⁻c-kit⁻ Zellen exprimierten im Durchschnitt nur 0,6 % der Endomucin-mRNA-Menge von Lin⁻Sca1⁺c-kit⁺ Zellen. Lin⁺Sca1⁻c-kit⁻ Zellen exprimierten kaum oder gar kein Endomucin (Abb. 4).

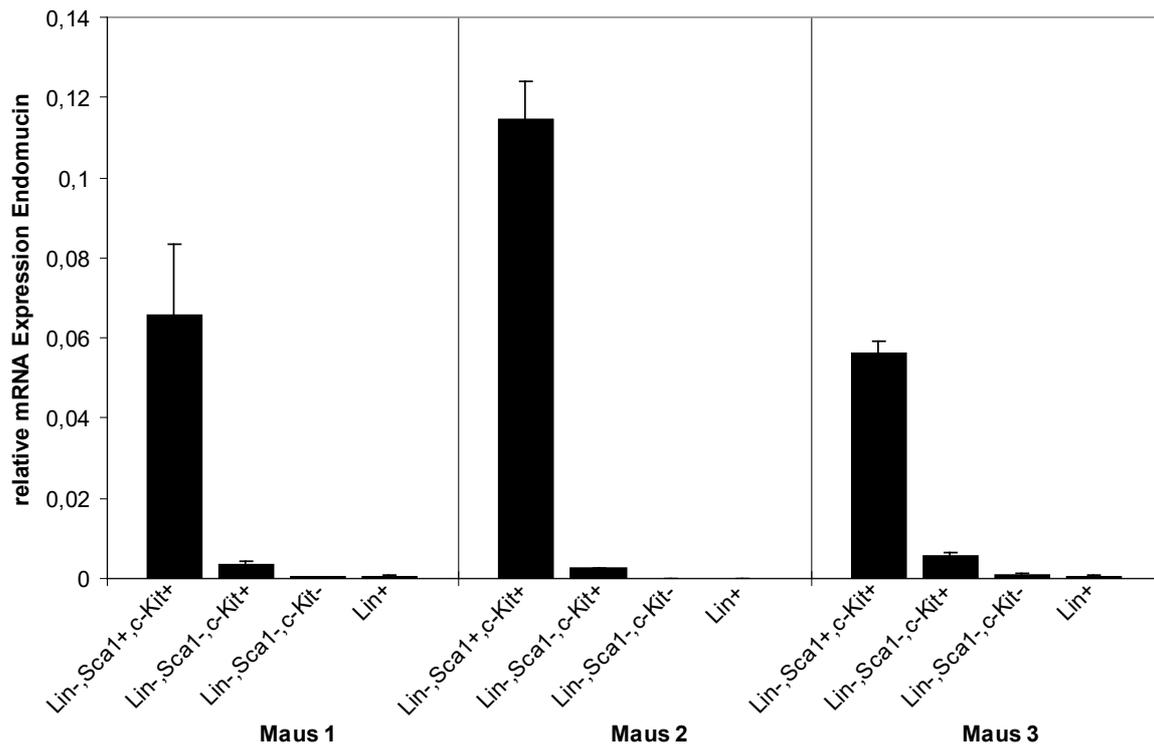


Abb. 4: mRNA-Expressionslevel von murinem Endomucin in primitiven murinen hämatopoetischen Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung zweier Versuchsreihen aus dem Knochenmark von drei Mäusen mit je vier Zellpopulationen aus Lin⁻Sca1⁺c-kit⁺ Zellen, Lin⁻Sca1⁻c-kit⁺ Zellen, Lin⁻Sca1⁻c-kit⁻ Zellen und Lin⁺Sca1⁻c-kit⁻ Zellen. Die RT-PCR wurde im SYBR[®] Green Format durchgeführt und das Ergebnis als normalisiertes Expressionsniveau in Relation zum GAPDH-Level angegeben.

Damit konnte zum einen bestätigt werden, dass Endomucin auch ein Oberflächenantigen auf hämatopoetischen Zellen der Maus ist. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass mit Zunahme des Reifegrades und zunehmender Differenzierung die Expression von Endomucin herunterreguliert wird. Der große Unterschied der Endomucin-Expression in unreifen, HSC-angereicherten Populationen und der reiferen Subpopulationen weist auf eine mögliche Rolle von Endomucin als muriner Stammzellmarker hin.

4.2 Expression von Endomucin auf humanen Zellen

Aufbauend auf den Ergebnissen in der murinen Hämatopoese stellte sich die Frage nach dem Expressionsmuster von Endomucin in humanen Vorläuferzellen. Es sollte geklärt werden, ob Endomucin ebenfalls auf humanen Zellen des hämatopoetischen Systems vorkommt und

welchen Phänotyp und Differenzierungsgrad diese Zellen besitzen. Als Versuchsmaterial wurde normales humanes Knochenmark verwandt. Als Aufreinigungsmarker für humane Progenitor-Zellen verwendeten wir CD34. Zudem untersuchten wir die Expression von Endomucin in verschiedenen AML Zell-Linien (Tabelle 8). Als Positiv-Kontrolle verwandten wir HMEC1-Zellen, eine Zell-Linie aus humanen mikrovaskulären Endothelzellen, für welche die Expression von Endomucin bekannt war.^[93, 99, 108] Wie bereits für den Nachweis der murinen Endomucin mRNA-Level verwendeten wir wieder die in den Materialien und Methoden beschriebene real time RT-PCR.

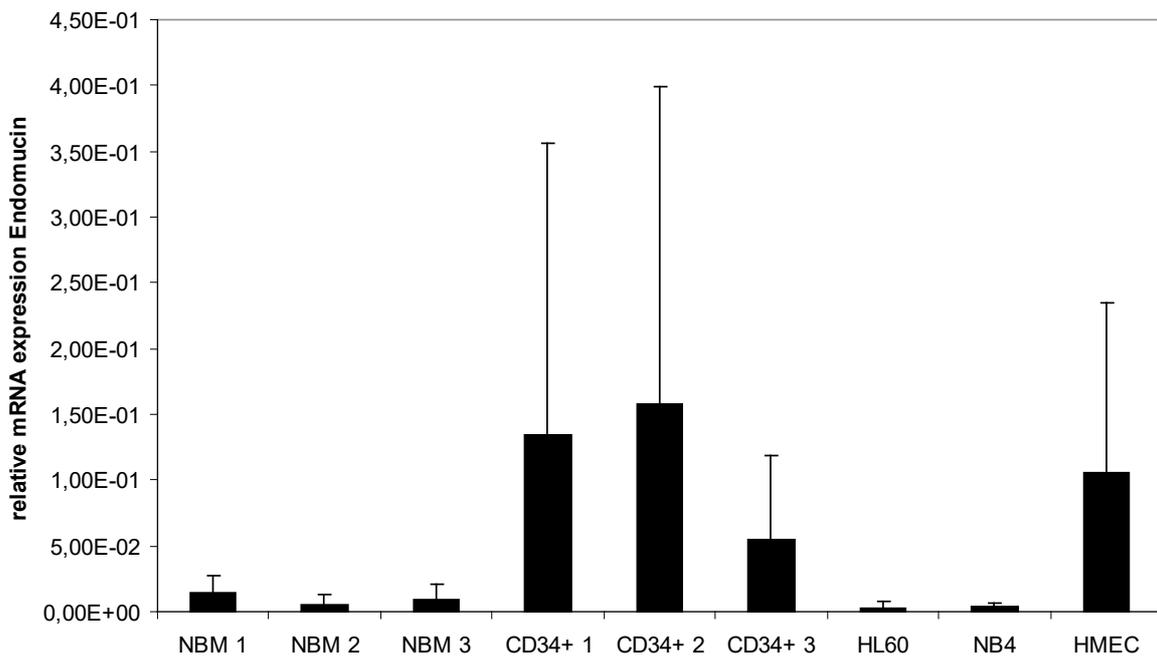


Abb. 5: Real-time PCR zur Analyse von Endomucin in humanen hämatopoetischen Zellen. Insgesamt wurden in mehreren Versuchsreihen die humanen Zelllinien HL-60, NB-4, KG-1 (nicht gezeigt), Kasumi-1 (nicht gezeigt), U-937 (nicht gezeigt) und KCl-22 (nicht gezeigt), Knochenmarkzellen gesunder Probanden (NBM 1-3), CD34⁺ Knochenmarkzellen (CD34⁺ 1-3) und als Positivkontrolle HMEC-1-Zellen untersucht. RT-PCR-Analysen wurden sowohl im SYBR[®] Green Format als auch im TaqMan[™] Probe erstellt und erbrachten übereinstimmende Ergebnisse. Angegeben ist jeweils das normalisierte Expressionsniveau in Relation zum GAPDH-Level.

Während in humanen immortalisierten Zelllinien keine signifikante Endomucin-Expression gemessen werden konnte, ließ sich Endomucin in Zellpopulationen des humanen hämatopoetischen Systems in unterschiedlicher Stärke nachweisen (Abb. 5):

Die höchste relative Endomucin mRNA-Expression zeigte sich in CD34⁺ Zellen. Im Durchschnitt ergab sich sogar eine höhere Endomucin mRNA-Menge als in den endothelialen HMEC-1-Zellen. Zellen aus dem normalen Knochenmark hingegen wiesen nur einen geringen Gehalt an Endomucin mRNA auf. Berücksichtigt man, dass in gesundem Knochenmark nur weniger als 0,05-0,5 % aller Zellen Progenitorzellen sind,^[19, 67, 181] unterstützt dieses Resultat die These, dass Endomucin auch beim Menschen vermehrt von Stammzell-angereicherten Populationen exprimiert wird. Dies würde mit den Ergebnissen bei der Maus übereinstimmen.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden FACS-Analysen verschiedener humaner leukämischer Zelllinien und aus Knochenmark selektierter CD34⁺ Zellen durchgeführt.

2 x 10⁷ CD34⁺ Zellen wurden mit dem Anti-Endomucin-Antikörper L6H10 sowie dem FITC-gelabelten anti-rat-Antikörper, der gegen L6H10 gerichtet ist, gefärbt. Weitere 2 x 10⁶ CD34⁺ Zellen wurden mit einem Kontrollantikörper desselben Isotyps wie L6H10 inkubiert sowie mit demselben Sekundärantikörper. In der Auswertung wurden nur die lebendigen Zellen berücksichtigt, welche anhand von Größe und Granularität diskriminiert werden konnten. Die Zellen wurden im Anschluss mittels eines Sorters in Endomucin-positive und -negative Fraktionen separiert und für funktionelle Assays verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt.

Auch mit der FACS-Methode ließ sich eine eindeutige Endomucin-Produktion auf humanen hämatopoetischen Zellen nachweisen. 8,36 % ± 5,58 % der CD34⁺-Zellen gehörten zu der Subpopulation, die eindeutig positiv für Endomucin gated werden konnte. Durch die schwache Anfärbung der Zellen durch die Isotypenkontrolle konnte das Ergebnis verifiziert werden. Von auf CD34 aufgereinigten Zellen besitzen nur weniger als 20 % Progenitor-Eigenschaften wie Koloniebildungsaktivität und weniger als 0,1 % sind HSCs.^[181] Ob die gemessene Überschneidung von CD34-Expression und Endomucin-Expression bei hämatopoetischen Zellen im Bereich des HSC-Anteils stattfindet, sollte durch funktionelle Assays geklärt werden.

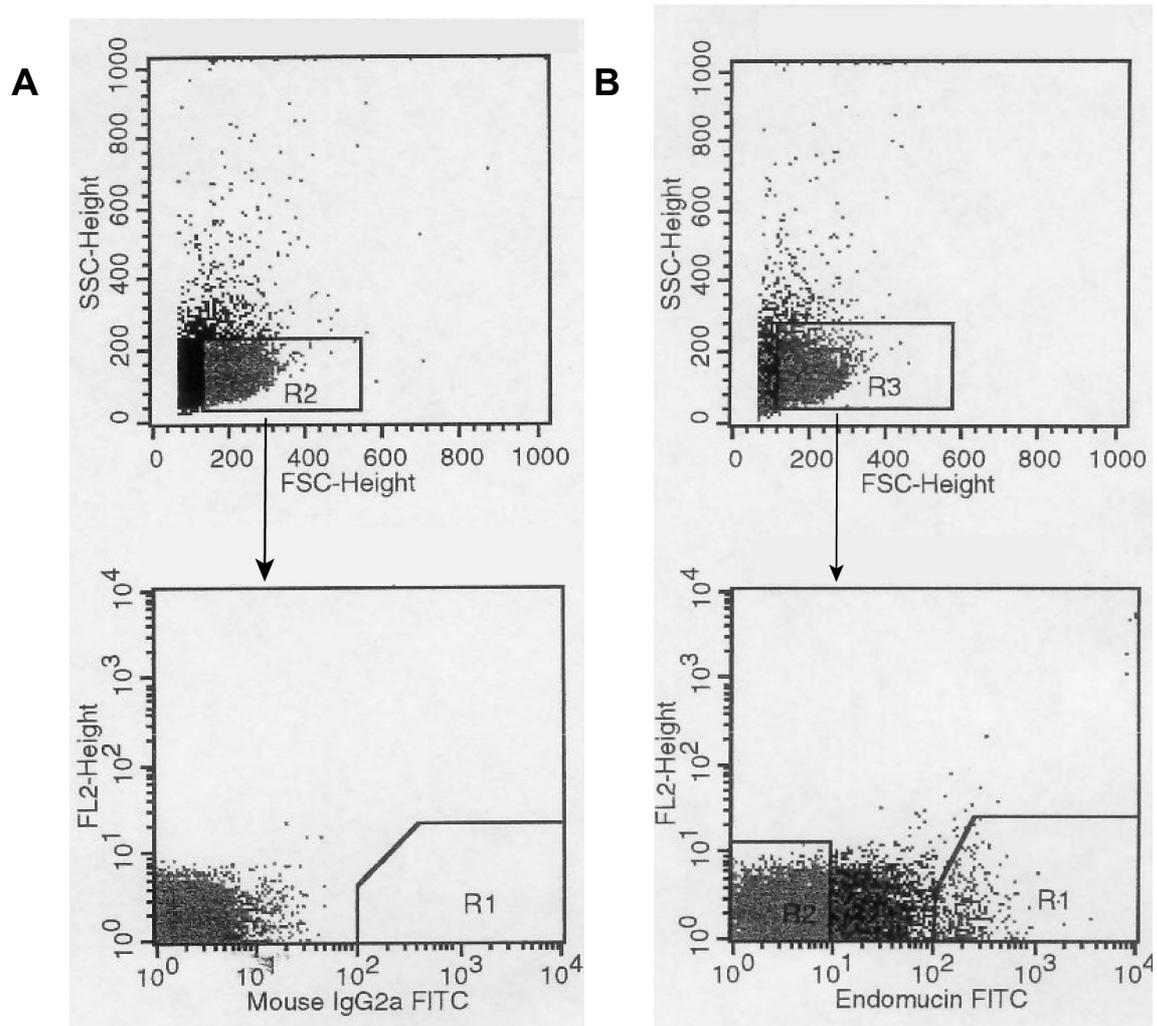
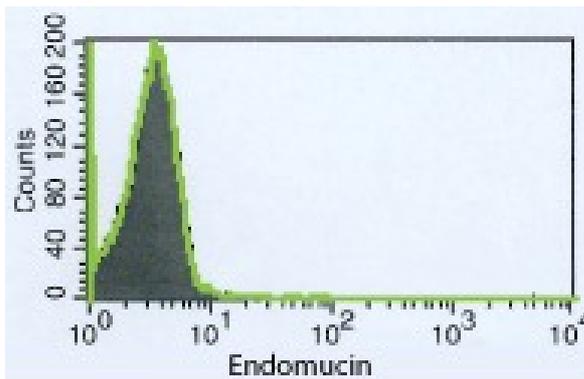
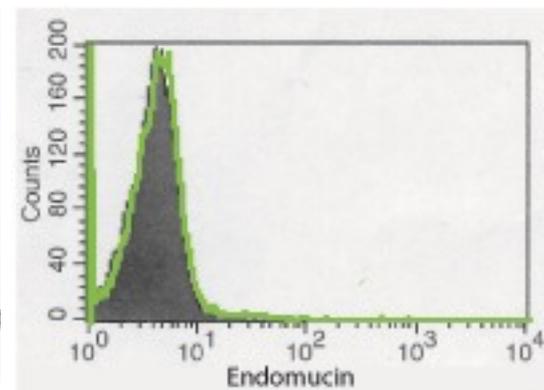
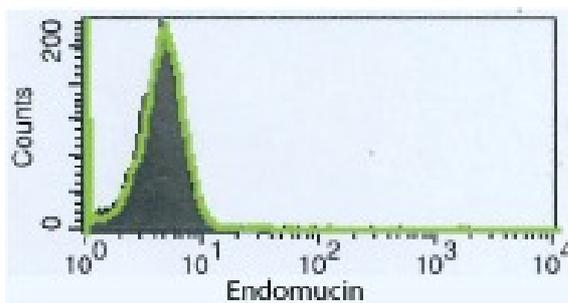


Abb. 6: FACS-Analysen von CD34⁺ Zellen auf Endomucin. (A) CD34⁺ Zellen gefärbt mit IgG2a Isotypenkontrolle. Im R2 Gate befinden sich nach Größe und Granularität nur lebendige Zellen. Gate R1 liegt im Endomucin-positiven Fluoreszenz-Bereich. (B) CD34⁺ Zellen gefärbt mit Anti-Endomucin-Antikörper. Gate R3 schließt nicht lebendige Zellen aus, Gate R1 umfasst CD34⁺Endomucin⁺ Zellen, Gate R2 CD34⁺Endomucin⁻ Zellen.

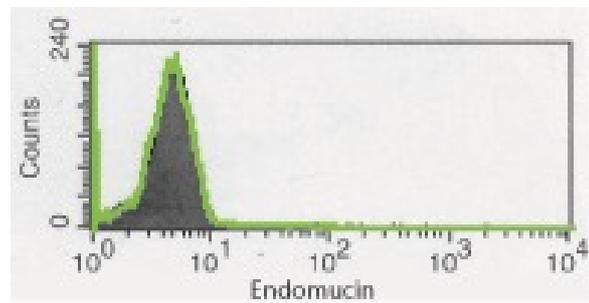
Bei den Zelllinien handelte es sich um die promyelozytäre Zelllinien NB-4, die AML-Zelllinie HL-60 und die humane histiozytäre Lymphom-Zelllinie U937 mit den Subklonen U937-PMT und U937-PR9. Als Positivkontrolle wurden wieder endotheliale HMEC-1-Zellen verwendet. Die Färbung erfolgte mit dem Anti-Endomucin-Antikörper L6H10 sowie einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper. Die Zellcounts der Antikörper-konjugierten Zellen wurden mit den Zellcounts der ungefärbten Zellen in einem Overlay analysiert. Die Overlays sind in Abb. 7 gezeigt.



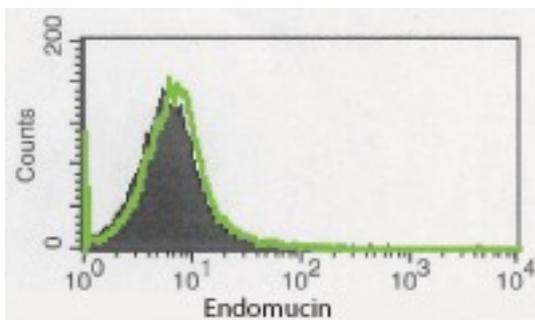
HL-60



NB-4



U-937-pmt



U-937-pr9

HMEC-1

Abb. 7: FACS-Analysen von humanen Leukämie-Zelllinien auf Endomucin-Expression. Abgebildet sind Overlays zwischen Endomucin-gefärbten Zellen und ungefärbten Zellen. Die hier dargestellten AML-Zelllinien HL-60, NB-4 und die Lymphomzelllinie U-937 mit den Subklonen U-937-pmt und U-937-pr9 zeigten keine Endomucin-Expression, während in der Positivkontrolle HMEC-1 eine leichte Rechtsverschiebung abzugrenzen ist.

Bei keiner der humanen Leukämie-Zelllinien konnte ein Fluoreszenzunterschied zwischen den gefärbten und den ungefärbten Zellpopulationen beobachtet werden. Auch auf anderen leukämischen Zelllinien (Kasumi, KCL-22, Daten hier nicht dargestellt) konnte Endomucin nicht detektiert werden. Das Overlay der Positivkontrolle HMEC-1 zeigt dagegen eine leichte Rechtsverschiebung des Peaks bei den mit Antikörpern markierten Zellen. Das weist darauf hin, dass Endomucin auf der Zelloberfläche der leukämischen Zelllinien nicht exprimiert wird. Was sich also in der Real-time PCR auf dem mRNA-Level schon erkennen ließ, konnte mittels der Durchflusszytometrie bestätigt werden.

Tumorzelllinien verlieren im Zuge des Immortalisierungsprozesses einige der Charakteristika der nativen Tumorzellen, von denen sie abstammen. So gibt es für das Stammzellantigen CD34, welches häufig auf AML-Blasten exprimiert wird, nur wenige von der AML abstammende Zelllinien, auf deren Oberfläche CD34 zu finden ist. Diese Befunde lassen sich also entweder so deuten, dass die AML-Zellen aufgrund ihrer Immortalisierung Endomucin nicht mehr transkribieren, oder, dass Endomucin sehr selektiv auf unreifen, nicht differenzierten Blutzellen vorkommt und generell nicht auf AML-Zellen.

Der Unterschied in der Expressionsausprägung der Positivkontrolle in der Real-time PCR und der FACS-Analyse lässt sich zum einen darauf zurückführen, dass aufgrund fehlender Kopplung des L6H10-Antikörpers eine indirekte Färbung durchgeführt werden musste, zum anderen darauf, dass die Expression von Endomucin auf der Zelloberfläche generell schwächer ist als auf dem RNA-Level.

Um die in der Real-time PCR und im FACS generierten Daten noch auf dem Proteinlevel zu belegen, wurden umfangreiche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen durchgeführt und Western Blots angefertigt. Probenmaterial wurde aus den humanen Zelllinien HL-60, U-937, KG-1, KCL-22 und Kasumi-1 sowie aus gesundem Knochenmark, dem Knochenmark verschiedener Patienten mit AML und aus auf CD34 aufgereinigten Zellen gewonnen.

Dabei lieferten die Westernblots leider keine eindeutigen Resultate, da sich der Antikörper an zu viele Proteinbanden anlagerte, unter denen Endomucin nicht mehr identifiziert werden konnte. Demnach eignet sich der monoklonale rat-Endomucin-Antikörper (L6H10) nicht für die Western Blot-Technik, der somit nicht weiter nachgegangen wurde.

4.3 Colony Assays

Um die funktionellen Charakteristika Endomucin-positiver hämatopoetischer Zellen hinsichtlich Wachstumsverhalten, Koloniebildung und Langzeitüberleben zu analysieren wurden $CD34^+$ humane Knochenmarkzellen in eine Endomucin⁺ und eine Endomucin⁻ Fraktion geteilt und in Methylcellulose-Kulturen ausgesät. Nach einer Woche wurden die entstandenen Kolonienzahlen ermittelt und die Zellen unter denselben Bedingungen wie in der Primärkultur wieder ausplattiert (Abb. 8).

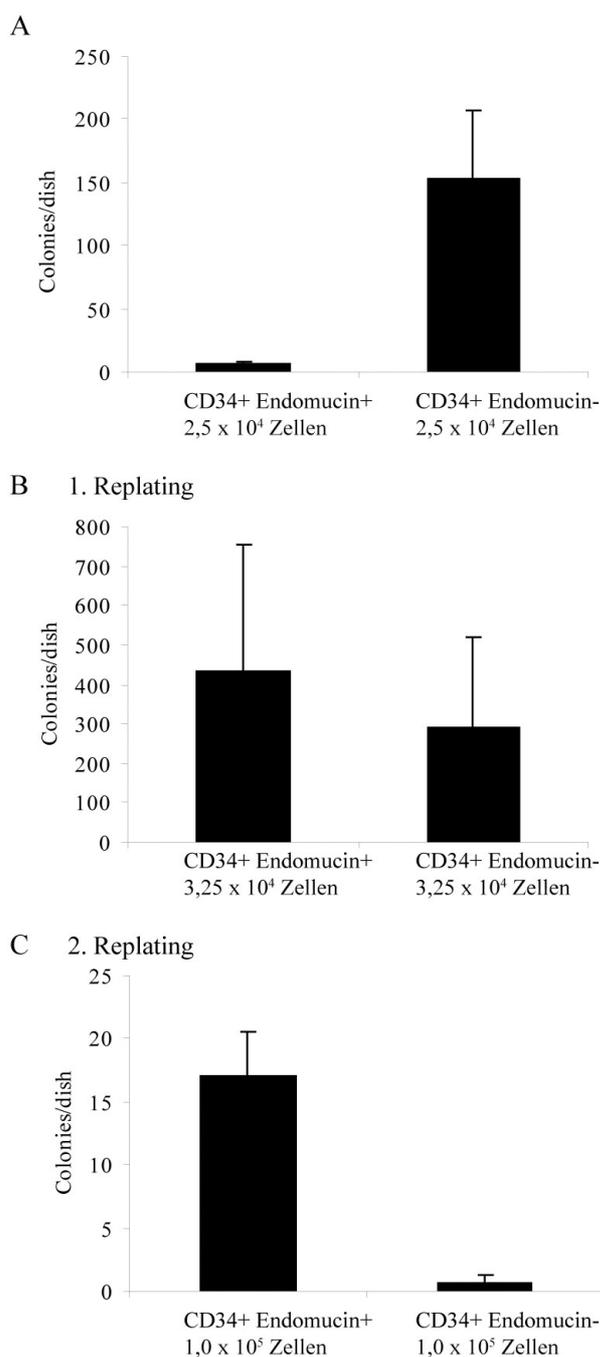


Abb. 8: Colony Assay von $CD34^+$ Endomucin⁻ Zellen und $CD34^+$ Endomucin⁺ Zellen mit 2 Replatings

(A) Je Zellpopulation wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen entsprechend der Beschreibung im Methodenteil ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Woche wurden die Kolonienzahlen ermittelt ($p < 0,05$ beim Vergleich der primären Plating Effizienz von $CD34^+$ Endomucin⁻ Zellen und $CD34^+$ Endomucin⁺ Zellen).

(B) 1. Replating mit $3,25 \times 10^4$ Zellen pro Petrischale. Nach einer Inkubationszeit von einer Woche wurden die Kolonienzahlen ermittelt (kein signifikanter Unterschied)

(C) 2. Replating mit 1×10^5 Zellen pro Petrischale. Nach einer Inkubationszeit von einer Woche wurden die Kolonienzahlen ermittelt ($p < 0,05$ beim Vergleich der Replating Effizienz von $CD34^+$ Endomucin⁻ Zellen und $CD34^+$ Endomucin⁺ Zellen).

Angegeben ist die durchschnittliche Kolonienzahl pro Petrischale ($n=3$) mit Standardabweichung. Weitere Versuchsreihen mit anderen Zellzahlen beim Aussäen sowie alternativer Methylcellulose lieferten übereinstimmende Ergebnisse.

CD34⁺Endomucin⁺ Zellen wuchsen nach dem ersten Aussäen langsamer als CD34⁺Endomucin⁻ Zellen und brachten weniger Kolonien hervor. Nach dem ersten Replating allerdings stieg die Koloniebildungsaktivität der CD34⁺Endomucin⁺ Fraktion deutlich an und lag 1,5 fach über der der CD34⁺Endomucin⁻ Fraktion. Nach einem zweiten Replating tendierten die Kolonienzahlen der CD34⁺Endomucin⁻ Zellen gegen Null, während CD34⁺Endomucin⁺ Zellen weiterhin die Fähigkeit besaßen, hohe Kolonienzahlen zu produzieren (25,5 fach höher als die Kontrolle; p=0,02) und somit über einen längeren Zeitraum eine *in vitro* Hämatopoese aufrechtzuerhalten.

In weiteren Versuchen wurden die Colony Assays um CD34⁻ Endomucin⁺ und CD34⁻ Endomucin⁻ Zellen erweitert (Daten hier nicht dargestellt). Nach dem oben beschriebenen Replating-Regime wiesen CD34⁺Endomucin⁺ Zellen die höchste Replating-Effizienz auf, gefolgt von CD34⁻ Endomucin⁺ Zellen und danach CD34⁺Endomucin⁻ Zellen. CD34⁻ Endomucin⁻ Zellen generierten die niedrigsten Kolonienzahlen in allen Ansätzen. Somit enthält die durch die Koexpression von CD34 und Endomucin gekennzeichnete Zellpopulation primitivere hämatopoetische Zellen mit den Charakteristika der langsamen Proliferation, jedoch längerem Überleben durch Selbsterneuerung.

4.4 Transplantation in NOD/SCID Mäuse

Nachdem die *in vitro*-Experimente gezeigt hatten, dass die Expression von Endomucin auf mit dem Immunphänotyp von humanen und murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen korreliert und dass Endomucin-positive, CD34-positive Zellen einen primitiveren Vorläufer-Phänotyp zeigen als Endomucin-negative/CD34-positive Zellen, wollten wir wissen, ob in mehr definitiven *in vivo*-Versuchen hämatopoetische Stammzellen in der Endomucin-positiven Fraktion gefunden werden können. Während das Erneuerungspotential, das in *in vitro* Assays nachgewiesen wird, in Wochen gezählt wird, wird *in vivo* Assays Erneuerungspotential in Monaten gemessen.^[37] Zudem gehört zur Definition von Stammzellen auch die funktionelle Komponente, nämlich die Bildung einer multilineären Nachkommenschaft und damit die Fähigkeit zur Repopulation des Knochenmarks myeloablativer Individuen.^[47, 57, 59, 95, 125, 135, 158, 177] Die Transplantation in NOD/SCID Mäuse wird derzeit zu diesem Zweck am häufigsten verwendet. Transplantiert wurden humane CD34⁺ Knochenmarkszellen, welche zuvor in Endomucin⁺ und Endomucin⁻ Populationen

unterteilt worden waren (siehe Methoden). In der Auswertung wurden die Zellen des murinen Knochenmarks 6 Wochen p.t. auf die Expression von humanem und murinem CD45 hin untersucht. CD45, auch „common leukocyte antigen“ (allgemeines Leukozytenantigen) genannt, ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase und kommt auf fast allen kernhaltigen Zellen des hämatopoetischen Systems vor. Damit lässt er sich als Marker für humane Blutzellen im murinem Knochenmark verwenden.

Von den insgesamt 12 zu transplantierenden Mäusen schlug eine Transplantation fehl und drei weitere Mäuse starben im Vorfeld der Knochenmarkanalyse, so dass sie nicht in der Auswertung berücksichtigt wurden. Die durchflusszytometrischen Analysen der Knochenmarkspunktate der transplantierten Mäuse sind in Abb. 9 und Tabelle 10 dargestellt. Der Anteil an humanen CD45⁺ Zellen im Knochenmark der NOD/SCID Empfänger mit 1×10^5 CD34⁺Endomucin⁺ Zellen betrug 56,66 % und 23,05 % gegenüber 1,94 % und 1,83 % bei CD34⁺Endomucin⁻ Zellen. Alle vier Mäuse entwickelten eine murine Hämatopoese mit einer Quote an murinen CD45⁺ Zellen von $12,23 \% \pm 3,45 \%$. Die Mäuse mit einer transplantierten Zellzahl von 5×10^4 Zellen zeigten bei den CD34⁺Endomucin⁺ Zellen eine CD45-Expression auf 8,27% und bei den CD34⁺Endomucin⁻ Zellen auf 2,76 % der Zellen. Im Knochenmark der Mäuse mit $2,5 \times 10^4$ Transplantatzellen ließ sich nur eine starke murine Hämatopoese nachweisen. Die Variabilität in den Prozentzahlen der CD45⁺ Zellen ist durch die relativ kurze Zeit zwischen Transplantation und Auswertung zu erklären, erst ab 10-12 Wochen p.t. stabilisieren sich die Werte.^[136] Mit diesen Ergebnissen konnte eindeutig gezeigt werden, dass Endomucin auf CD34⁺ Zellen nicht nur zur Selbsterneuerung fähige Zellen, sondern auch den rekonstituierenden Anteil markiert.

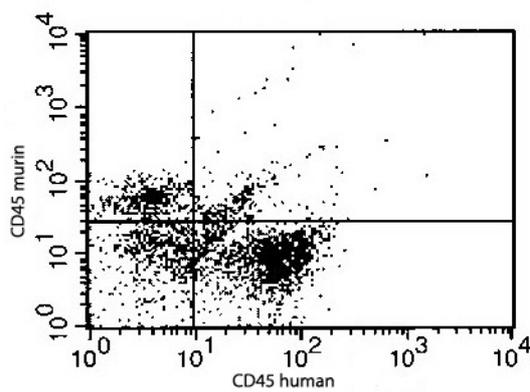
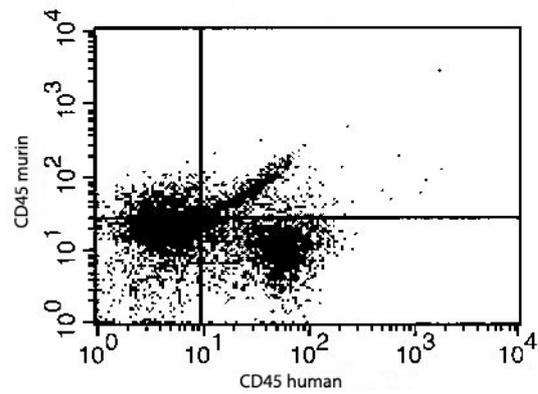
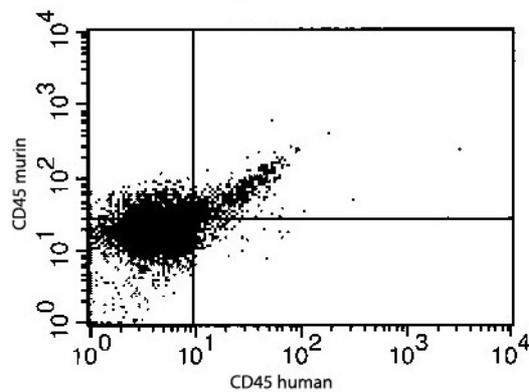
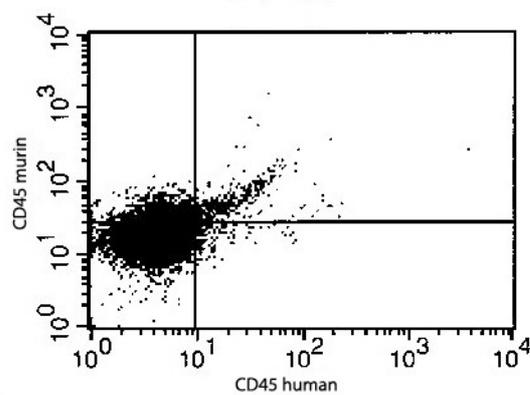
CD34⁺Endmucin⁺**Maus 1****Maus 2****CD34⁺Endomucin⁻****Maus 3****Maus 4**

Abb. 9: Immunphänotyp der Knochenmarksproben von mit $1,0 \times 10^5$ Zellen transplantierten NOD/SCID Mäusen. Maus 1 und Maus 2 wurden 1×10^5 CD34⁺Endomucin⁺ Zellen, Maus 3 und 4 1×10^5 CD34⁺Endomucin⁻ Zellen transplantiert. Mit CD34⁺Endomucin⁺ Zellen transplantierte NOD/SCID Mäuse wiesen einen hohen Anteil humaner CD45⁺ Zellen auf. Prozentangaben sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Ergebnisse der Transplantation humaner CD34⁺Endomucin⁺ Zellen und CD34⁺Endomucin⁻ Zellen in NOD/SCID Mäuse. Die Repopulationsfähigkeit der transplantierten Zellen wurde quantifiziert mittels FACS-Analyse des Anteils humaner CD45⁺ Zellen und muriner CD45⁺ Zellen am Knochenmark der Mäuse.

Transplantierte Zellzahl		CD45 human [%]	CD45 murin [%]
1.0 × 10 ⁵	Maus 1 CD34 ⁺ Endomucin ⁺	56.66	15.11
1.0 × 10 ⁵	Maus 2 CD34 ⁺ Endomucin ⁺	23.05	8.15
1.0 × 10 ⁵	Maus 3 CD34 ⁺ Endomucin ⁻	1.94	15.07
1.0 × 10 ⁵	Maus 4 CD34 ⁺ Endomucin ⁻	1.83	10.85
5.0 × 10 ⁴	Maus 5 CD34 ⁺ Endomucin ⁺	12.04	8.27
5.0 × 10 ⁴	Maus 6 CD34 ⁺ Endomucin ⁻	3.13	27.18
2.5 × 10 ⁴	Maus 7 CD34 ⁺ Endomucin ⁺	4.91	4.87
2.5 × 10 ⁴	Maus 8 CD34 ⁺ Endomucin ⁻	2.38	33.74

4.5 Tissue Array

Der Tissue Array erlaubte die Analyse der Expression von Endomucin innerhalb einer großen Anzahl von Stanzchen aus normalem und leukämischen Knochenmark sowie die Korrelation von Endomucin-Expression zu verschiedenen Krankheitsverläufen und Subtypen der AML. Des Weiteren wurden verschiedenen Tumorzelllinien (Tabelle 8) und CD34+ Zellen auf ihre Endomucin-Expression hin untersucht.

Die Beurteilung erfolgte anhand der immunhistochemischen Anfärbbarkeit auf Endomucin. Dabei wurde eine positive Expression in schwach und stark differenziert (Abb. 10). In der Auswertung ergab sich in beiden Proben des jeweiligen Spenders eine Homogenität bezüglich der Anfärbbarkeit, so dass die Auswertungen nur eine Stanze pro Person berücksichtigen.

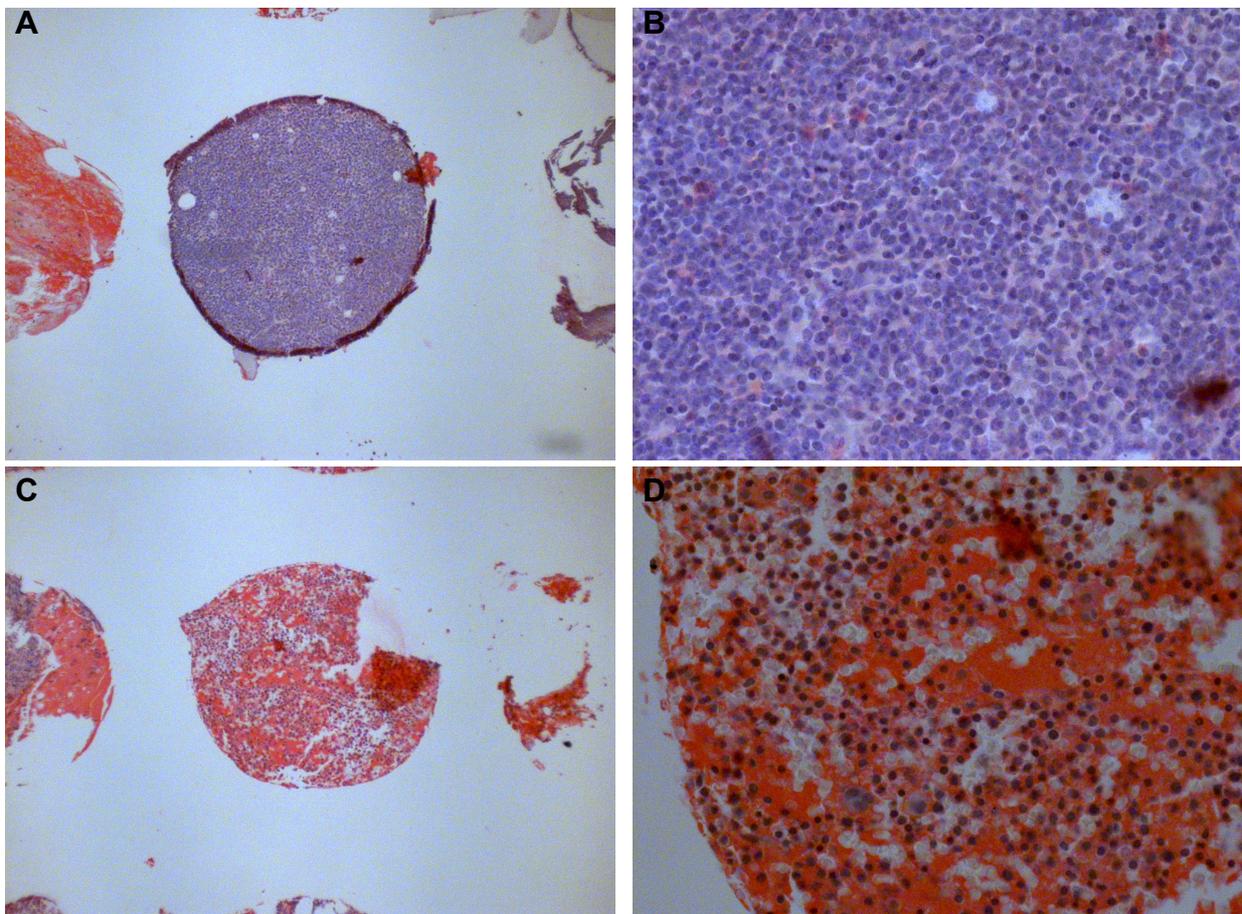


Abb. 10: (A+B) Negative immunhistochemische Färbung einer Knochenmarksstanzbiopsie auf Endomucin. (A) 40fache Vergrößerung. (B) 100fache Vergrößerung.

(C+D) Positive immunhistochemische Färbung einer Knochenmarksstanzbiopsie auf Endomucin. (C) 40fache Vergrößerung. (D) 100fache Vergrößerung

4.5.1 Vergleich der Expression von Endomucin zwischen Proben aus normalem Knochenmark, CD34+ Zellen und AML-Knochenmark

Während Knochenmark ein heterogenes Gemisch verschiedener Zellreihen und Reifungsstadien hämatopoetischer Zellen darstellt, handelt es sich bei CD34⁺ Zellen um eine Population mit höherem Anteil an unreifen Zellen. Dieser Zusammenhang ist mit den Resultaten des Tissue Arrays vereinbar: der prozentuale Anteil der Proben mit schwacher Färbung, also der Proben mit einem nur geringen Anteil Endomucin produzierender Zellen bzw. mit Zellen mit nur geringer Endomucin-Produktion, ist ausgeprägter im normalen Knochenmark als bei den CD34-positiven Zellen (Tabelle 11). Dagegen besaßen die Proben der CD34⁺ Zellen den höchsten Prozentsatz an Stansen mit starker Endomucin-Expression.

Tabelle 11: Statistische Auswertung der Ergebnisse des Tissue Microarrays. Angegeben sind die absoluten Häufigkeiten (*Count*), die erwarteten Häufigkeiten (*Expected Count*) und der Prozentanteil der jeweiligen Färbung an der Gesamtzahl der Proben der jeweiligen Knochenmarksart (*Percentage*).

		Endomucin Färbung				
		keine Färbung	schwache Färbung	Starke Färbung	Total	
Art des KM	AML	Count	44	86	12	142
		Expected Count	40.4	81.4	20.2	142.0
		Percentage	31.0%	60.6%	8.5%	100.0%
	normales KM	Count	13	31	15	59
		Expected Count	16.8	33.8	8.4	59.0
		Percentage	22.0%	52.5%	25.4%	100.0%
	CD34+	Count	3	4	3	10
		Expected Count	2.8	5.7	1.4	10.0
		Percentage	30.0%	40.0%	30.0%	100.0%
Total	Count	60	121	30	211	
	% of Total	28.4%	57.3%	14.2%	100.0%	

Die Biopsien von AML Patienten zeigten im Vergleich zu gesundem Knochenmark einen höheren Prozentsatz an negativen oder an schwach Endomucin exprimierenden Proben. Die Ergebnisse vermitteln, dass sich Endomucin offensichtlich nicht als genereller AML-Marker eignet. Statistische Analysen mittels SPSS sollten klären, ob dennoch ein Zusammenhang zwischen den wenigen stark positiven Patientenproben und einzelnen AML-Subtypen oder Krankheitsverläufen besteht. Korrelationsanalysen zur Endomucin-Expression wurden durchgeführt hinsichtlich der FAB-Klasse, Outcome, leukämischer Blastenanteil im Knochenmark und im Blut vor und während der Therapie, Blutbild bei Diagnosestellung, LDH-Konzentration bei Diagnosestellung, Alter bei Diagnosestellung, Existenz von genetischen Aberrationen (z.B. Translokation t(8;21), Translokation t(15;17), Inversion inv(16), Deletion del(5q), Monosomie 7 oder Trisomie 8) sowie Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen. Insgesamt konnte ein statistischer Zusammenhang zwischen Endomucin-Expression und einem dieser Parameter ausgeschlossen werden.

4.5.2 Endomucin auf Tumorzelllinien

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der einzelnen Zelllinien auf Endomucin sind in Tabelle 12 dargestellt. Sämtliche ursprünglich aus akuten myeloischen Leukämien gewonnenen Zelllinien wiesen nur eine schwache Endomucin-Expression auf, darunter die Zelllinie 32D nativ oder mit den Genen für humanes FLT3 Wildtyp, eine Rezeptortyrosinkinase, deren Mutation ITD zu 30% in der AML vorkommt, und für MNK 1, eine Serin-Threonin-Kinase mit potenzieller Rolle in der AML, des Weiteren die Zelllinien MC6 und ML 1. Auch die CML-Zelllinie K562 bot nur eine schwache Endomucin-Färbung. Tumorzelllinien solider Tumoren zeigten eine starke Expression von Endomucin. Bemerkenswerterweise konnte in den Leukämiezelllinien mit lymphatischem Phänotyp (JURKAT, MV411) eine starke Endomucin-Produktion demonstriert werden.

Tabelle 12: Immunhistochemische Anfärbbarkeit verschiedener Tumorzelllinien auf Endomucin.

Zelllinie	L6H10-Anfärbbarkeit
32 D parental	schwach
32 D hFLT3 WT	schwach
HCT P53 +/+	stark
HCT P53 -/-	stark
HEK 293	schwach
Hela	stark
JURKAT	stark
K562	schwach
mC6 2	schwach
ML 1	schwach
32 D + MNK 1	stark
MV411	stark
NB4	nicht auswertbar
NIH3T3	nicht auswertbar
Oci AML5	nicht auswertbar
T47 D 1	nicht auswertbar
U87 + Ly	stark
U87 ohne Ly	stark
U 937	stark

4.6 Endomucin in der ALL

Endomucin hatte sich in den vorherigen Versuchen als nicht charakteristisch für die AML erwiesen, jedoch hatten sich Hinweise aus dem Tissue Array ergeben, dass Endomucin auf Leukämien mit lymphatischem Phänotyp exprimiert wird. Real-time PCR-Messungen sollten klären, ob Endomucin tatsächlich auf Knochenmarkproben von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie vorhanden ist oder nur auf immortalisierten Zelllinien. Das Endomucin-mRNA-Level von ALL-Proben sollte weiterhin mit dem von AML-Patientenproben und der Positivkontrolle HMEC-1 verglichen werden. Die Daten sämtlicher Messungen sind in Abb. 11 zusammengefasst.

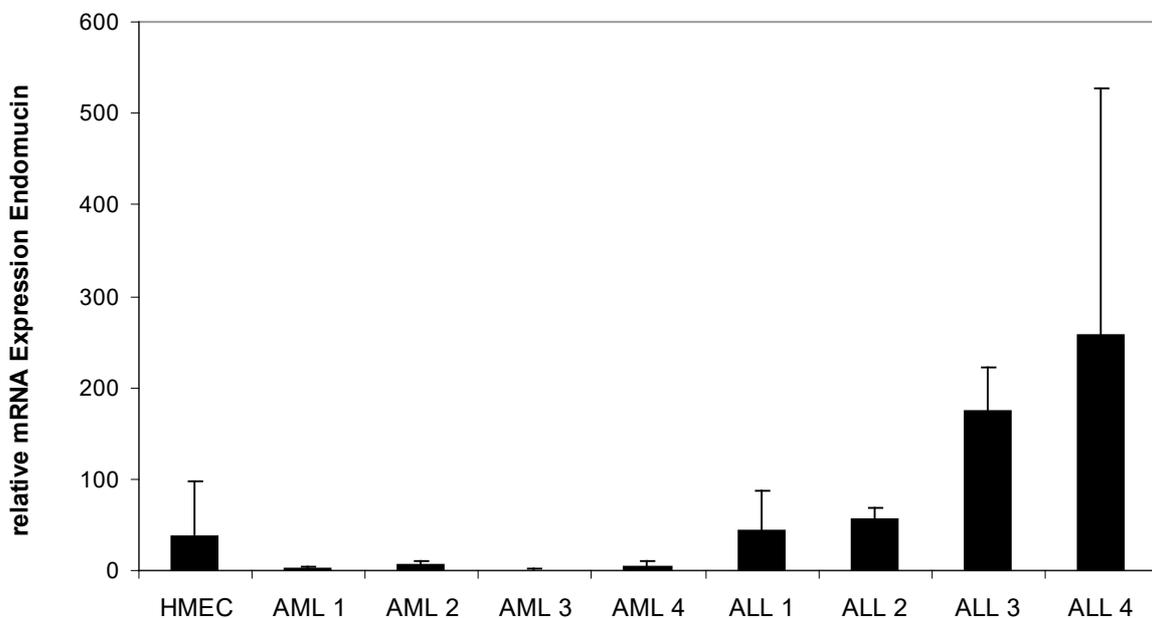


Abb. 11: Vergleich der mRNA-Expressionslevel von Endomucin zwischen Knochenmarksproben von ALL-Patienten und Knochenmarksproben von AML-Patienten. HMEC-1-Zellen fungierten als Positivkontrolle. Angegeben ist jeweils das normalisierte Expressionsniveau in Relation zum GAPDH-Level der einzelnen Patientenproben.

ALL-Patientenproben hatten im Mittel 2,4- bis 46-fach höhere Endomucin-mRNA-Level als AML-Patientenproben. Interessanterweise überstieg die relative Endomucin-mRNA-Expression in manchen ALL-Patientenproben sogar diejenige der HMEC-1 Zellen.

Diese Ergebnisse deuten an, dass Endomucin als Oberflächenexpressionsmarker für die ALL dienen kann und Endomucin in der ALL möglicherweise sogar hochreguliert wird. Eine Bestätigung mittels FACS und Tissue Array sowie Korrelationsanalysen analog zur AML sollten Gegenstand nachfolgender Untersuchungen sein.

5 Diskussion

5.1 Endomucin in der Hämatopoese

Die Identifikation und Isolation von hämatopoetischen Stammzellen beschäftigt die Forschung seit Jahrzehnten. Ihre Relevanz liegt zum einen im Rahmen der Grundlagenforschung wie der funktionellen und molekularen Erfassung der Mechanismen von Selbsterneuerung, Differenzierung und Festlegung auf eine Reifungslinie oder Stammzell-Ontogenese. Zum anderen sind Weiterentwicklungen auf diesem Gebiet von großem Nutzen in der klinischen Anwendung wie der Transplantationsmedizin, wo eine genaue Abschätzung des Gehalts an HSCs und Progenitorzellen eines Transplantats oder eine auf den Patienten zugeschnittene Transplantatgröße, -komposition und supportive Therapie ermöglicht wird. Auch in der Zytokintherapie und *ex vivo*-Expansion von Stammzellen ist sie von Interesse.

Bei der Maus ist die Charakterisierung von Knochenmarkszell-Populationen mit einem hohen Gehalt an HSCs bereits weit fortgeschritten. Dabei umfassen Lin⁻Sca1⁺ckit⁺ Zellen im Wesentlichen alle Zellen mit der Fähigkeit zur multilineären Repopulation bei Mäusen in Aplasie. Allerdings etablieren Lin⁻Sca1⁺ckit⁺ Zellen nur in 10-20% aller transplantierten Mäuse eine stabile Langzeithämatopoese.^[136, 176] Es wurde postuliert, dass das als endotheliale Marker bekannte Endomucin auf murinen HSCs vorkommt, Zellen mit Long-term-Repopulationsfähigkeit kennzeichnet und somit als muriner Stammzellmarker genutzt werden kann.^[114] In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig bestätigt werden, dass bei der Maus Endomucin auch auf Zellen des hämatopoetischen Systems vorkommt, nämlich auf den unreifen Zellen des Stammzellpools Lin⁻Sca1⁺ckit⁺ und mit zunehmender Reife nicht mehr exprimiert wird.

Beim Menschen konnte bisher kein einzelner exklusiver molekularer Marker für HSCs identifiziert werden. Kombinationen von Markern erlauben zwar eine Eingrenzung der Zielzellen auf homogenere Subpopulationen. Dennoch ist ein definitiver HSC-Phänotyp, welcher ausschließlich Zellen mit HSC-Eigenschaften enthält, bisher nicht beschrieben. Die reinste humane HSC enthaltende Population erwies sich als immer noch heterogener als ihr murines Gegenstück mit einer geringeren Transplantationseffizienz in immundefizienten Mäusen.^[23]

Die *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass das Membranprotein Endomucin beim Menschen in der Identifikation von HSCs Verwendung finden kann, da CD34⁺Endomucin⁺ Zellen langlebiger sind und ausgeprägtere funktionelle Stammzeleigenschaften besitzen als CD34⁺Endomucin⁻ Zellen und somit die HSC enthaltende Fraktion innerhalb der Population der CD34⁺ Zellen markieren. Hierfür wurde zunächst gezeigt, dass Endomucin - parallel zur Maus - ebenfalls auf Blutzellen in humanem Knochenmark existiert und angereichert in der heterogenen CD34⁺ Population auftritt, was mittels FACS-Analysen, RT-PCR und Tissue Array in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. In der Literatur kann das Oberflächenmolekül CD34 auf sämtlichen HSCs nachgewiesen werden, abgesehen von einer Gruppe mit dem Phänotyp Lin⁻CD34⁻133⁺,^[55] jedoch ist nur ein Bruchteil aller CD34⁺ Zellen eine Stammzelle.^[15, 44, 179]

Der Schlüssel zur Identifikation dieser Stammzelle liegt in ihren funktionellen Eigenschaften: die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, also durch Zellteilung eine zur Mutterzelle identische Zelle zu erschaffen, und zur Proliferation und Differenzierung in alle reifen Blutzellen. Vereint werden diese Eigenschaften in der Fertigkeit, eine vollständige langfristige Hämatopoese zu rekonstituieren. Multipotente Progenitorzellen besitzen zwar die Differenzierungs- und Proliferationskapazität, weniger jedoch die Fähigkeit der Selbsterneuerung. ST-HSCs können sich zwar selbsterneuern, allerdings nur für einen beschränkten Zeitraum von etwa 10 Wochen.^[179] In den funktionellen Assays dieser Arbeit konnte zuerst *in vitro* gezeigt werden, dass hämatopoetische Zellen mit dem Oberflächenantigen Endomucin zur Stamm- und Progenitorzell-Fraktion des Knochenmarks gehören, da sie noch nach zwei aufeinanderfolgenden Replatings die höchste Zahl an Kolonien hervorbrachten. Da hier CD34⁺Endomucin⁺ Zellen die allerhöchste Koloniebildungskapazität aufwiesen, ist es schlüssig, dass die Koexpression von CD34 und Endomucin eine unreifere Subpopulation markiert als die Expression von Endomucin oder CD34 allein. Ähnlich der hämatopoetischen Rekonstitutionskinetik nach Transplantation, in der ST-HSCs kurzfristig, aber zeitlich begrenzt für die Blutbildung zuständig sind und in der nach einer Latenzzeit LT-HSCs diese Rolle übernehmen, übertraf die Proliferation von CD34⁺Endomucin⁻ Zellen die von CD34⁺Endomucin⁺ Zellen nach dem ersten Ausplattieren signifikant. Erst nach weiterem Replating und somit einer Latenzzeit überstieg die Proliferationskapazität der CD34⁺Endomucin⁺ Zellen die von CD34⁺Endomucin⁻ Zellen und hielt auf hohem Level an.

Die Stammzellcharakteristika von CD34⁺Endomucin⁺ Zellen konnten darüber hinaus *in vivo* dargestellt werden durch ihre Kapazität, eine Hämatopoese in myeloablatierten NOD/SCID-

Mäusen zu rekonstituieren. Die Transplantation von $CD34^+Endomucin^+$ Zellen in verschiedenen Zellzahlen über 6 Wochen resultierte stets in einem höheren Engraftment als die Transplantation von $CD34^+Endomucin^-$ Zellen.

Zusammengefasst belegen die erzielten Ergebnisse, dass Endomucin den Anteil unter den $CD34^+$ Zellen markiert, der den größten Stammzellcharakter besitzt, und somit humanes Endomucin in Kombination mit $CD34^+$ ebenso wie murines Endomucin ein potentieller Marker für HSCs ist.

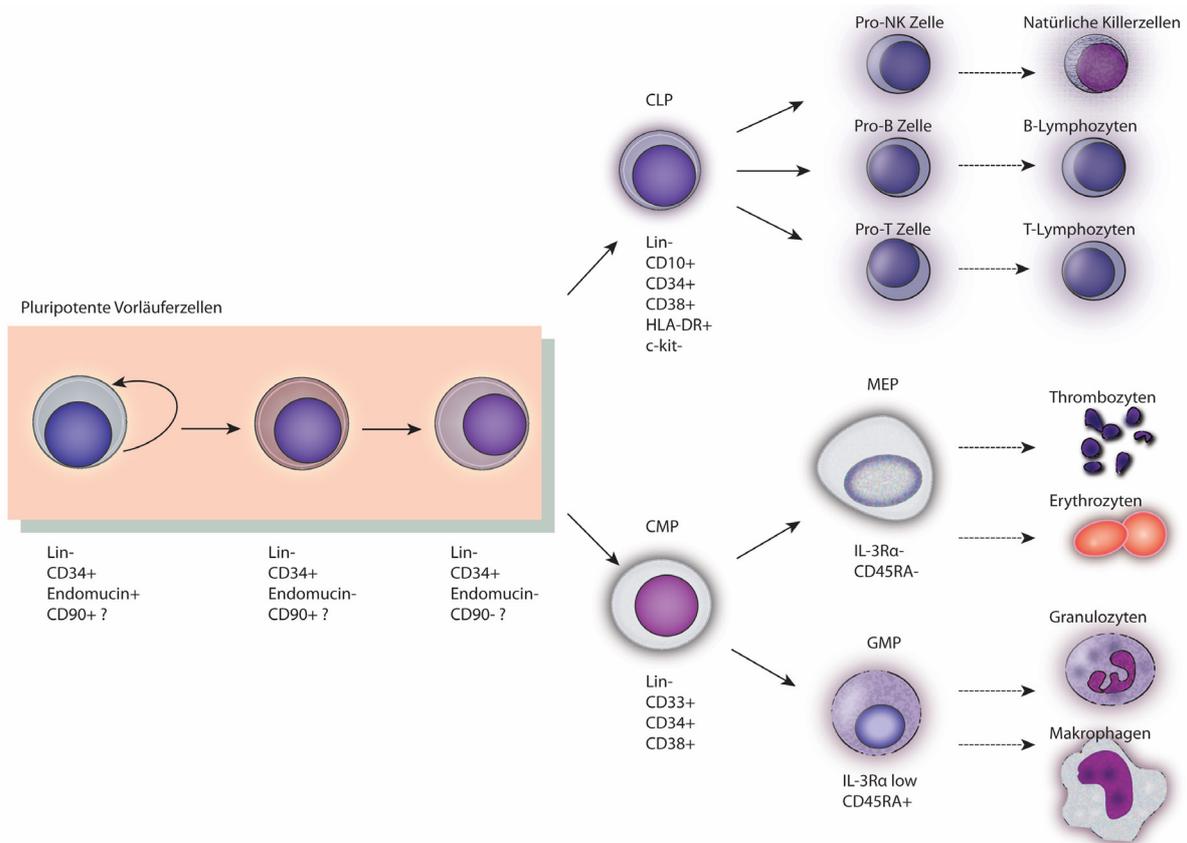


Abb. 12: Potentielles Modell für die Einordnung von Endomucin exprimierenden Zellen in die Hierarchie der Hämatopoese (basierend auf ^[59, 76, 112]). $CD34^+Endomucin^+$ Zellen stellen die primitivsten Stammzellen dar. Eine Zuordnung von $CD34^+Endomucin^-$ Zellen zum Stammzellmarker $CD90$ und somit zur ST-HSC- oder MPP-Zellfraktion steht noch aus. Nicht alle Differenzierungsstufen sind dargestellt. CLP, common lymphoid progenitor, CMP, common myeloid progenitor, GMP, Granulozyten/Makrophagen Progenitor; MEP, Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitor

Um zu klären, ob es sich bei $CD34^+Endomucin^+$ Zellen - analog zur Maus - sogar um LT-HSCs handelt, wie die Proliferationskinetik in den Colony Assays andeutet, sind weitere Repopulationsassays über mehrere Monate notwendig. Des Weiteren sollte die Endomucin-

Expression hämatopoetischer Zellen im Zusammenhang mit der Expression anderer potentieller Stammzellmarker wie CD133⁺^[55] oder CD90 (Thy1)⁺^[112] und CD49f⁺^[129] welche zwischen HSCs und MPP differenzieren sollen, jedoch < 20% Langzeit-Engraftment nach Transplantation auf Einzelzell-Niveau erreichten, sowie auf CD34⁻Lin⁻CD38⁻ Zellen untersucht werden. Wie bereits erwähnt wurden mit CD34⁻Lin⁻CD38⁻ Zellen HSC-Populationen ohne CD34-Expression beschrieben, welche von einigen Autoren als möglicherweise unreifer als CD34⁺ Zellen eingestuft werden, da Lin⁻CD34⁻ Zellen in Repopulationsversuchen am Schaf Lin⁻CD34⁺ Zellen hervorbrachten.^[15] Eine denkbare Einordnung von CD34⁺Endomucin⁺ Zellen in das bestehende hierarchische Hämatopoese-Modell stellt Abb. 12 dar.

5.2 Endomucin und die leukämische Stammzelle

Ebenso wie die Identifikation der hämatopoetischen Stammzelle ist die Identifikation leukämischer Stammzellen wichtig, um neoplastische Zellen innerhalb eines Transplantats aussortieren zu können, Mutationen und Signalwege zu präzisieren, mit denen der Ausbruch der Leukämie begann und die mögliche Ziele für therapeutische Intervention darstellen.

Nach dem meistverbreiteten Modell zum Ursprung von Leukämien ist die leukämische Stammzelle eine primitive pluripotente hämatopoetische Stammzelle mit der Fähigkeit sich selbst zu erneuern und eine aberrant differenzierte Nachkommenschaft zu generieren.^[35] Entsprechend wurden häufig Oberflächenmarker-Kombinationen benigner HSCs wie CD34⁺CD38⁻ oder Lin⁻CD34⁻ auf AML-Zellen mit der Fähigkeit, eine Leukämie in immundefizienten Mäuse auszulösen, gefunden.^[15, 69] Diese Ergebnisse führten hier zu der Hypothese, dass auch Endomucin auf leukämischen Stammzellen exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte in immortalisierten Zelllinien von Patienten mit AML (HL-60, NB-4, KG-1, ML-1, Kasumi-1) keine erhöhte Endomucin-Expression auf mRNA-Level, in FACS-Analysen oder im Tissue Array beobachtet werden. Auch in Knochenmarkproben von Patienten mit AML ließ sich Endomucin nur schwach oder gar nicht nachweisen. Endomucin-Expression korrelierte weder mit dem Vorliegen bestimmter AML Subtypen noch mit unterschiedlichen Krankheitsparametern oder -verläufen.

Der schwache oder negative Endomucin-Nachweis kann für das seltene oder fehlende Vorkommen von Leukämie-initiiierenden Stammzellen (LSC) in der untersuchten

Tumorhauptmasse sprechen bei einem durchschnittlichen Anteil leukämischer Stammzellen am AML-Knochenmark von nur 0,0001-6 %^[69, 178] (Abb. 13, Modell 1) oder für die fehlende Endomucin-Expression auf LSCs der AML (Abb. 13, Modell 2). Auch CD90 (Thy1) konnte nicht auf LSCs der AML nachgewiesen werden.^[13, 121] Vielmehr wurden weitere immunphänotypische Unterschiede von LSCs und HSCs publiziert.^[69, 83] Alternativ dazu kann eine Entstehung der AML-LSC auf einer späteren Differenzierungsstufe als auf der der HSC eine fehlende Endomucin-Expression erklären (Abb. 13, Modell 3). Analog dazu wurde berichtet, dass LSCs der CML in der Phase der leukämischen Blastenkrise von festgelegteren Progenitor-Zellen abstammen.^[25] Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich nur eine schwache Endomucin-Expression in CML-Zelllinien (K562, KCL-22) von Patienten in der Blastenkrise.

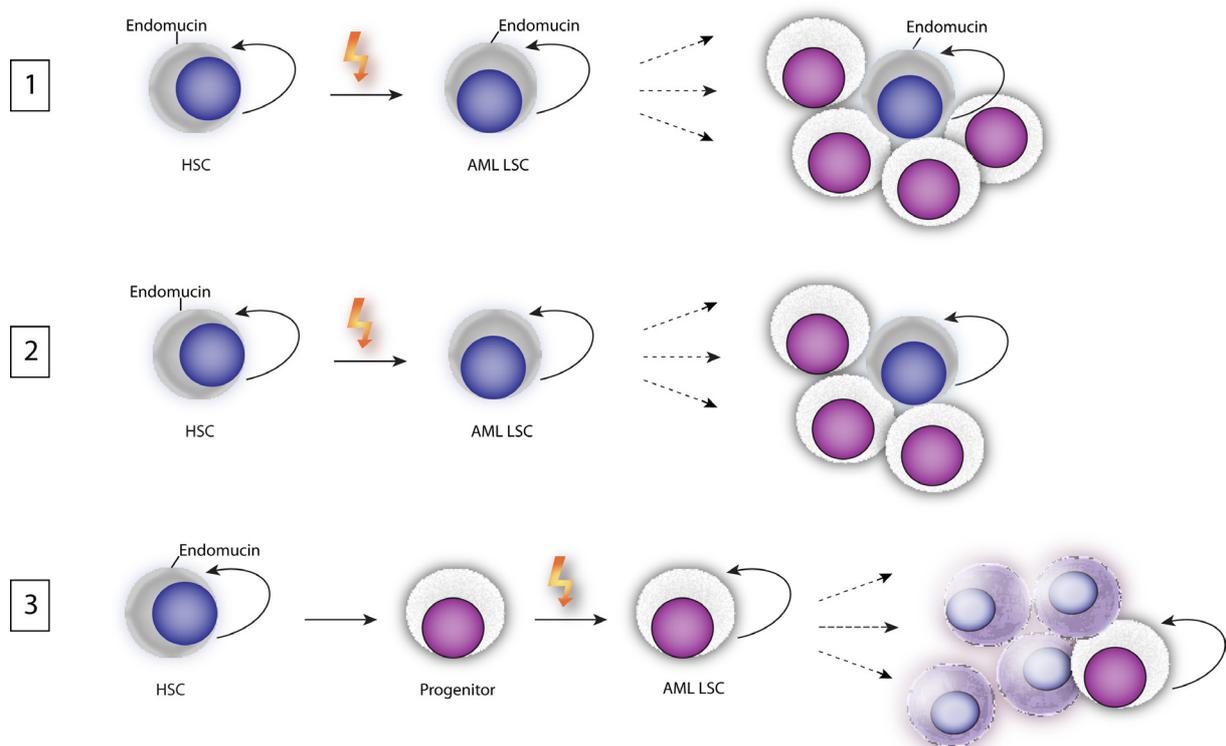


Abb. 13: Denkbare Modelle für Endomucin-Expression in der AML. Modell 1: Die maligne Transformation findet auf der Stufe der HSC statt und Endomucin wird von der leukämischen Stammzelle (LSC) exprimiert, nicht jedoch auf der differenzierteren Nachkommenschaft, welche die Tumorhauptmasse ausmacht. Modell 2: Endomucin wird nach der malignen Transformation nicht mehr exprimiert. Modell 3: Die leukämische Stammzelle stammt von einer reiferen Zelle als der HSC ab, trägt deswegen weder Endomucin noch CD90.

Interessanterweise konnte in humanen Leukämie-Zelllinien mit lymphatischem Phänotyp eine hohe Endomucin-Produktion nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten Knochenmarkproben von Patienten mit ALL gegenüber Proben von AML-Patienten und teilweise auch gegenüber der Referenzkontrolle HMEC-1 eine signifikant höhere Endomucin-Produktion. Im Gegensatz zur AML sind in der ALL Existenz und Charakteristika von leukämischen Stammzellen umstritten. Während einige Berichte das Vorkommen von ALL-LSCs auf das primitive $CD34^+CD38^-CD19^-$ bzw. $CD133^+CD19^-$ Zellkompartiment begrenzen,^[32, 38, 39] fanden andere Gruppen Leukämie induzierende Zellen nur im reiferen $CD19^+$ lymphatischen Kompartiment oder in aberranten $CD19^+CD38^-$ Zellen.^[24, 80] Andere Daten zeigten, dass Blasten verschiedenster Differenzierungsstadien ($CD34^{+/-}$, $CD38^{+/-}$, $CD19^{+/-}$, $CD20^{+/-}$) Leukämien in NOD/SCID-Mäusen erzeugen können.^[96, 106]

Diese Beobachtung könnte durch das Fehlen einer Stammzell-Hierarchie in der ALL zu Gunsten eines stochastischen Modells mit höheren Frequenzen von Leukämie-initiiierenden Zellen, in welchen Stammzellfunktionen unabhängig vom Reifegrad durch endogene und exogene Signale aktiviert werden, erklärt werden.^[147]

Eine erhöhte Nachweisbarkeit von Endomucin ließe sich hiernach durch die höhere Rate an LSCs (1 LSC in 4 Tumorzellen)^[75] in der ALL erklären, wobei die LSC Endomucin durch ihre Abstammung von einer HSC oder durch Reaktivierung eines „Stammzellprogramms“ in einer reiferen Zelle produziert. Ob Endomucin tatsächlich perspektivisch auch als Marker für leukämische Stammzellen eingesetzt werden kann, muss in weiteren Versuchen eruiert werden.

6 Zusammenfassung

Die Identifikation und Isolation von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) anhand von Oberflächenmarkern hat Bedeutung sowohl für die Grundlagenforschung, beispielsweise zur funktionellen und molekularen Erfassung der Mechanismen von Selbsterneuerung und Differenzierung, als auch für die klinische Anwendung, insbesondere in der Transplantationsmedizin.

Während auf Knochenmarkszellen der Maus die Expression des Oberflächenmarkerprofils $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{ckit}$ für das Vorliegen einer murinen HSC spricht, ist die Charakterisierung der humanen HSC bisher nicht so weit fortgeschritten. Endomucin ist ein Sialomucin, welches ursprünglich als Oberflächenantigen endothelialer Zellen identifiziert wurde. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Endomucin in der physiologischen und pathologischen Hämatopoese zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass murines Endomucin auch auf Zellen des hämatopoetischen Systems der Maus vorkommt, nämlich auf unreifen Zellen des $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{ckit}^+$ hämatopoetischen Stammzellpools. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Endomucin mit zunehmender Reife nicht mehr exprimiert wird und somit als muriner Stammzellmarker genutzt werden kann.

Weiterhin konnte erstmals dargestellt werden, dass Endomucin auch beim Menschen auf Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird und hier speziell in der CD34-positiven Fraktion angereichert ist, in der die meisten HSCs enthalten sind. Der Nachweis gelang mittels FACS-Analysen, RT-PCR und Tissue Array. Zellen, welche sowohl den Oberflächenmarker CD34 als auch das Oberflächenantigen Endomucin koexprimieren, wiesen in *in vitro* Assays Stammzellcharakteristika auf. Diese waren gekennzeichnet durch eine initial langsame Wachstumsrate, jedoch im Folgenden verlängerte Überlebenszeit durch anhaltende Selbsterneuerung und Proliferation. Darüber hinaus erreichten $\text{CD34}^+ \text{Endomucin}^+$ Zellen, in verschiedenen Zellzahlen in NOD/SCID-Mäuse transplantiert, stets ein höheres Engraftment als $\text{CD34}^+ \text{Endomucin}^-$ Zellen. Diese neuen Ergebnisse legen nahe, dass $\text{CD34}^+ \text{Endomucin}^+$ Zellen länger anhaltende und ausgeprägtere funktionelle Stammzeleigenschaften besitzen als $\text{CD34}^+ \text{Endomucin}^-$ Zellen und somit Endomucin einen echten hämatopoetischen Stammzellmarker innerhalb der Population der CD34^+ Zellen darstellt.

Die gleiche Methodik wurde erstmalig an hämatopoetischen Stammzellerkrankungen angewandt. Hier konnte eine hohe Endomucin-Expression in immortalisierten Zelllinien und Knochenmarkproben von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) nachgewiesen werden, während bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) die Endomucin-Konzentrationen niedrig waren. Zusätzlich durchgeführte statistische Analysen konnten keine Korrelation zwischen Endomucin-Expression und verschiedenen Krankheitsparametern und -verläufen von AML-Patienten feststellen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Abkowitz JL, Catlin SN, Gutter P (1996) Evidence that hematopoiesis may be a stochastic process in vivo. *Nature medicine* 2: 190-197
- [2] Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99: 683-690
- [3] Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID (1986) Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 67: 842-845
- [4] Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N (1991) Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* 77: 2031-2036
- [5] Auerbach AD, Allen RG (1991) Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 51: 1-12
- [6] Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 2804-2808
- [7] Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA (1994) Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84: 2554-2565
- [8] Becker AJ, Mc CE, Till JE (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197: 452-454
- [9] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33: 451-458
- [10] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Annals of Internal Medicine* 103: 620-625
- [11] Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, Bernstein ID (1988) Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 81: 951-955
- [12] Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE (1998) A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 4: 1038-1045
- [13] Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ (1997) Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 89: 3104-3112
- [14] Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737
- [15] Bonnet D (2001) Normal and leukemic CD34-negative human hematopoietic stem cells. *Reviews in clinical and experimental hematology* 5: 42-61
- [16] Bonnet D (2002) Haematopoietic stem cells. *J Pathol* 197: 430-440
- [17] Bosma MJ, Carroll AM (1991) The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9: 323-350
- [18] Brachtendorf G, Kuhn A, Samulowitz U, Knorr R, Gustafsson E, Potocnik AJ, Fassler R, Vestweber D (2001) Early expression of endomucin on endothelium of the mouse embryo and on putative hematopoietic clusters in the dorsal aorta. *Dev Dyn* 222: 410-419
- [19] Breivik H (1971) Haematopoietic stem cell content of murine bone marrow, spleen, and blood. Limiting dilution analysis of diffusion chamber cultures. *Journal of Cellular Physiology* 78: 73-78
- [20] Brugger W, Henschler R, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L (1994) Positively selected autologous blood CD34+ cells and unseparated peripheral blood progenitor cells mediate identical hematopoietic engraftment after high-dose VP16, ifosfamide, carboplatin, and epirubicin. *Blood* 84: 1421-1426
- [21] Brunning RD, Matutes E, Harris N (2001) Acute myeloid leukemia. In: Jaffe ES HN, Stein H, Vardiman JW (Hrsg) *World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. IARC Press, Lyon
- [22] Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* 25: 169-193
- [23] Cashman JD, Eaves CJ (2000) High marrow seeding efficiency of human lymphomyeloid repopulating cells in irradiated NOD/SCID mice. *Blood* 96: 3979-3981

- [24] Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, Buitenhuis M, Ramirez C, Anderson K, Strombeck B, Garwicz S, Bekassy AN, Schmiegelow K, Lausen B, Hokland P, Lehmann S, Juliusson G, Johansson B, Jacobsen SE (2005) Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nature medicine* 11: 630-637
- [25] Chao MP, Seita J, Weissman IL (2008) Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 73: 439-449
- [26] Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, Broxmeyer HE, Cooper S, Hague N, Moore M, Lasky LA (1996) Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood* 87: 479-490
- [27] Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Lowenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD (2003) Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 21: 4642-4649
- [28] Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162: 156-159
- [29] Christ O, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Buske C (2007) Pathogenese und Biologie der akuten myeloischen Leukämie. *Medizinische Klinik* 102: 290-295
- [30] Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133: 157-165
- [31] Civin CI, Trischmann T, Kadan NS, Davis J, Noga S, Cohen K, Duffy B, Groenewegen I, Wiley J, Law P, Hardwick A, Oldham F, Gee A (1996) Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* 14: 2224-2233
- [32] Cobaleda C, Gutierrez-Cianca N, Perez-Losada J, Flores T, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Sanchez-Garcia I (2000) A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 95: 1007-1013
- [33] Cohen JA, Leeksa CH (1956) Determination of the life span of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphonate. *J Clin Invest* 35: 964-969
- [34] Corces-Zimmerman MR, Majeti R (2014) Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia* 28: 2276-2282
- [35] Corces MR, Chang HY, Majeti R (2017) Preleukemic Hematopoietic Stem Cells in Human Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol* 7: 263
- [36] Cortes JE, Kantarjian HM (1995) Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer* 76: 2393-2417
- [37] Coulombel L (2004) Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 23: 7210-7222
- [38] Cox CV, Evely RS, Oakhill A, Pamphilon DH, Goulden NJ, Blair A (2004) Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* 104: 2919-2925
- [39] Cox CV, Diamanti P, Evely RS, Kearns PR, Blair A (2009) Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL. *Blood* 113: 3287-3296
- [40] Dancy JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA (1976) Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest* 58: 705-715
- [41] de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BI, Testa NG (1998) CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 16: 387-396
- [42] DiGiusto D, Chen S, Combs J, Webb S, Namikawa R, Tsukamoto A, Chen BP, Galy AH (1994) Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood* 84: 421-432
- [43] Donnelly DS, Krause DS (2001) Hematopoietic stem cells can be CD34+ or CD34-. *Leuk Lymphoma* 40: 221-234
- [44] Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE (2012) Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* 10: 120-136
- [45] Erslev A (1983) Production of erythrocytes. McGraw-Hill, New York
- [46] Fackler MJ, Civin CI, Sutherland DR, Baker MA, May WS (1990) Activated protein kinase C directly phosphorylates the CD34 antigen on hematopoietic cells. *J Biol Chem* 265: 11056-11061
- [47] Fey MF (2007) Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol* 18 (Suppl 1): i9-i13
- [48] Fialkow PJ, Janssen JW, Bartram CR (1991) Clonal remissions in acute nonlymphocytic leukemia: evidence for a multistep pathogenesis of the malignancy. *Blood* 77: 1415-1417

- [49] Filyushina ZG (1968) Effect of noradrenalin, acetylcholine, lidase, and rutamine on intravascular life span of granulocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 65: 613-615
- [50] Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75: 2417-2426
- [51] Fong C-t, Brodeur GM (1987) Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 28: 55-76
- [52] Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF (1956) Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 177: 452-454
- [53] Fuchs R (2002) Akute myeloische Leukämie. Therapie-Forschung-Perspektiven 1edn. UNI-MED Verlag AG, Bremen
- [54] Fukuda M, Tsuboi S (1999) Mucin-type O-glycans and leukosialin. *Biochimica et biophysica acta* 1455: 205-217
- [55] Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M (2000) Isolation and characterization of human CD34-Lin- and CD34+Lin- hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 95: 2813-2820
- [56] Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54: 713-733
- [57] Galloway JL, Zon LI (2003) Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Current topics in developmental biology* 53: 139-158
- [58] Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research* 6: 995-1001
- [59] Giebel B, Punzel M (2008) Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biological chemistry* 389: 813-824
- [60] Gilchrist GS, Shore NA (1967) Familial leukemia and osteogenesis imperfecta. *J Pediatr* 71: 115-118
- [61] Gilliland DG (1998) Molecular genetics of human leukemia. *Leukemia* 12 (Suppl 1): S7-S12
- [62] Gillis S, Watson J (1980) Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 152: 1709-1719
- [63] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74
- [64] Greenberger JS, Sakakeeny MA, Humphries RK, Eaves CJ, Eckner RJ (1983) Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 2931-2935
- [65] Grimwade D, Enver T (2004) Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from? *Leukemia* 18: 375-384
- [66] Guenechea G, Gan OI, Dorrell C, Dick JE (2001) Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol* 2: 75-82
- [67] Gunsilius E, Gastl G, Petzer AL (2001) Hematopoietic stem cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 55: 186-194
- [68] Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C (2005) Modern diagnostics in acute leukemias. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 56: 223-234
- [69] Hanekamp D, Cloos J, Schuurhuis GJ (2017) Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int J Hematol* 105: 549-557
- [70] Hao QL, Thiemann FT, Petersen D, Smogorzewska EM, Crooks GM (1996) Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood* 88: 3306-3313
- [71] Hartley JW, Rowe WP (1975) Clonal cells lines from a feral mouse embryo which lack host-range restrictions for murine leukemia viruses. *Virology* 65: 128-134
- [72] Hashimoto M, Tan S, Mori N, Cheng H, Cheng PW (2007) Mucin biosynthesis: molecular cloning and expression of mouse mucus-type core 2 beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase. *Glycobiology* 17: 994-1006
- [73] Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T (1995) The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 12240-12244
- [74] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994
- [75] Heidenreich O, Vormoor J (2009) Malignant stem cells in childhood ALL: the debate continues! *Blood* 113: 4476-4477

- [76] Heilmeier B, Buske C, Spiekermann K, Bohlander S, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Braess J (2007) Diagnostik, Klassifikation und Prognosefaktoren der akuten myeloischen Leukämie. *Medizinische Klinik* 102: 296-308
- [77] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 11: 1026-1030
- [78] Hodgson GS, Bradley TR (1979) Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell? *Nature* 281: 381-382
- [79] Hollingsworth MA, Swanson BJ (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature reviews* 4: 45-60
- [80] Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, Green J, Colman S, Piacibello W, Buckle V, Tsuzuki S, Greaves M, Enver T (2008) Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 319: 336-339
- [81] Hounsell EF, Davies MJ, Renouf DV (1996) O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconjugate journal* 13: 19-26
- [82] Jabbour EJ, Faderl S, Kantarjian HM (2005) Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clinic proceedings* 80: 1517-1527
- [83] Jan M, Chao MP, Cha AC, Alizadeh AA, Gentles AJ, Weissman IL, Majeti R (2011) Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5009-5014
- [84] Jones RJ, Wagner JE, Celano P, Zicha MS, Sharkis SJ (1990) Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature* 347: 188-189
- [85] Jones RJ, Collector MI, Barber JP, Vala MS, Fackler MJ, May WS, Griffin CA, Hawkins AL, Zehnbauser BA, Hilton J, Colvin OM, Sharkis SJ (1996) Characterization of mouse lymphohematopoietic stem cells lacking spleen colony-forming activity. *Blood* 88: 487-491
- [86] Jordan CT, Lemischka IR (1990) Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev* 4: 220-232
- [87] Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, Jasper L, Covinsky MA, Johnson LR, White G (2003) Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. *Archives of pathology & laboratory medicine* 127: 42-48
- [88] Kamel-Reid S, Dick JE (1988) Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 242: 1706-1709
- [89] Kanda H, Tanaka T, Matsumoto M, Umemoto E, Ebisuno Y, Kinoshita M, Noda M, Kannagi R, Hirata T, Murai T, Fukuda M, Miyasaka M (2004) Endomucin, a sialomucin expressed in high endothelial venules, supports L-selectin-mediated rolling. *International immunology* 16: 1265-1274
- [90] Kanki Y, Kohro T, Jiang S, Tsutsumi S, Mimura I, Suehiro J, Wada Y, Ohta Y, Ihara S, Iwanari H, Naito M, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, Minami T (2011) Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression. *Embo J* 30: 2582-2595
- [91] Katz FE, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF (1985) Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. *Leukemia research* 9: 191-198
- [92] Kelly L, Clark J, Gilliland DG (2002) Comprehensive genotypic analysis of leukemia: clinical and therapeutic implications. *Current opinion in oncology* 14: 10-18
- [93] Kinoshita M, Nakamura T, Ihara M, Haraguchi T, Hiraoka Y, Tashiro K, Noda M (2001) Identification of human endomucin-1 and -2 as membrane-bound O-sialoglycoproteins with anti-adhesive activity. *FEBS Lett* 499: 121-126
- [94] Koefler HP, Golde DW (1978) Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* 200: 1153-1154
- [95] Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL (2003) Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual review of immunology* 21: 759-806
- [96] Kong Y, Yoshida S, Saito Y, Doi T, Nagatoshi Y, Fukata M, Saito N, Yang SM, Iwamoto C, Okamura J, Liu KY, Huang XJ, Lu DP, Shultz LD, Harada M, Ishikawa F (2008) CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia* 22: 1207-1213
- [97] Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996) CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87: 1-13
- [98] Kubonishi I, Miyoshi I (1983) Establishment of a Ph1 chromosome-positive cell line from chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Stem Cells* 1: 105-117
- [99] Kuhn A, Brachtendorf G, Kurth F, Sonntag M, Samulowitz U, Metze D, Vestweber D (2002) Expression of endomucin, a novel endothelial sialomucin, in normal and diseased human skin. *J Invest Dermatol* 119: 1388-1393

- [100] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- [101] Lange B, Valtieri M, Santoli D, Caracciolo D, Mavilio F, Gemperlein I, Griffin C, Emanuel B, Finan J, Nowell P (1987) Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines. *Blood* 70: 192-199
- [102] Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R (1991) NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 77: 1080-1086
- [103] Lapidot T, Fajerman Y, Kollet O (1997) Immune-deficient SCID and NOD/SCID mice models as functional assays for studying normal and malignant human hematopoiesis. *J Mol Med (Berl)* 75: 664-673
- [104] Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JCY, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE (1996) Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: Implications for gene therapy. *Nat Med* 2: 1329-1337
- [105] Lasky LA (1995) Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annual review of biochemistry* 64: 113-139
- [106] le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, Wilson K, Rottgers S, Schrauder A, Rosemann A, Irving J, Stam RW, Shultz LD, Harbott J, Jurgens H, Schrappe M, Pieters R, Vormoor J (2008) In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer cell* 14: 47-58
- [107] Levine EG, Bloomfield CD (1992) Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol* 19: 47-84
- [108] Liu C, Shao ZM, Zhang L, Beatty P, Sartippour M, Lane T, Livingston E, Nguyen M (2001) Human endomucin is an endothelial marker. *Biochemical and biophysical research communications* 288: 129-136
- [109] Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408
- [110] Lozzio CB, Lozzio BB (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45: 321-334
- [111] Luc S, Buza-Vidas N, Jacobsen SE (2007) Biological and molecular evidence for existence of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Ann N Y Acad Sci* 1106: 89-94
- [112] Majeti R, Park CY, Weissman IL (2007) Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. *Cell Stem Cell* 1: 635-645
- [113] Makinodan T (1956) Circulating rat cells in lethally irradiated mice protected with rat bone marrow. *Proc Soc Exp Biol Med* 92: 174-179
- [114] Matsubara A, Iwama A, Yamazaki S, Furuta C, Hirasawa R, Morita Y, Osawa M, Motohashi T, Eto K, Ema H, Kitamura T, Vestweber D, Nakauchi H (2005) Endomucin, a CD34-like sialomucin, marks hematopoietic stem cells throughout development. *J Exp Med* 202: 1483-1492
- [115] Maximow A (1909) Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematologica* 8: 125-134
- [116] McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL (1988) The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241: 1632-1639
- [117] McCune JM (1996) Development and applications of the SCID-hu mouse model. *Seminars in Immunology* 8: 187-196
- [118] McKenzie SB (2005) Advances in understanding the biology and genetics of acute myelocytic leukemia. *Clin Lab Sci* 18: 28-37
- [119] Metzeler K, Fritsch S, Buske C, Hiddemann W (2006) Die akute myeloische Leukämie - Auf dem Weg zu einer Pathogenese-orientierten Therapie. *Acute myeloid leukemia - on the way towards pathogenesis-oriented treatment*: 1466-1468
- [120] Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90: 5013-5021
- [121] Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K (2000) AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 7521-7526
- [122] Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK (2001) Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 6: D1192-1206

- [123] Morgan SM, Samulowitz U, Darley L, Simmons DL, Vestweber D (1999) Biochemical characterization and molecular cloning of a novel endothelial-specific sialomucin. *Blood* 93: 165-175
- [124] Morita S, Kojima T, Kitamura T (2000) Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene therapy* 7: 1063-1066
- [125] Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL (1995) The biology of hematopoietic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology* 11: 35-71
- [126] Mrózek K, Heinonen K, Bloomfield CD (2001) Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 19-47
- [127] Muller-Sieburg CE, Sieburg HB (2006) The GOD of hematopoietic stem cells: a clonal diversity model of the stem cell compartment. *Cell Cycle* 5: 394-398
- [128] Muller-Tidow C, Bornemann C, Diederichs S, Westermann A, Klumpen S, Zuo P, Wang W, Berdel WE, Serve H (2001) Analyses of the genomic methylation status of the human cyclin A1 promoter by a novel real-time PCR-based methodology. *FEBS letters* 490: 75-78
- [129] Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, Dick JE (2011) Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333: 218-221
- [130] Ogawa M (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844-2853
- [131] Ogawa M (1994) Hematopoiesis. *J Allergy Clin Immunol* 94: 645-650
- [132] Ohara A, Kojima S, Hamajima N, Tsuchida M, Imashuku S, Ohta S, Sasaki H, Okamura J, Sugita K, Kigasawa H, Kiriyama Y, Akatsuka J, Tsukimoto I (1997) Myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia as a late clonal complication in children with acquired aplastic anemia. *Blood* 90: 1009-1013
- [133] Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Sandberg AA (1986) Cytogenetic characterization of putative human myeloblastic leukemia cell lines (ML-1, -2, and -3): origin of the cells. *Cancer research* 46: 3642-3647
- [134] Orkin SH (1995) Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol* 7: 870-877
- [135] Orkin SH (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature reviews* 1: 57-64
- [136] Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H (1996) Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273: 242-245
- [137] Park-Windhol C, Ng YS, Yang J, Primo V, Saint-Geniez M, D'Amore PA (2017) Endomucin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration, growth, and morphogenesis by modulating VEGFR2 signaling. *Sci Rep* 7: 17138
- [138] Passegue E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 11842-11849
- [139] Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Larsen SO, Andersson M, Daugaard G, Ersboll J, Hansen SW, Hou-Jensen K, Nielsen D, Sigsgaard TC (1993) Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Cytogenetic characteristics of 115 consecutive cases and risk in seven cohorts of patients treated intensively for malignant diseases in the Copenhagen series. *Leukemia* 7: 1975-1986
- [140] Pei X (1999) Who is hematopoietic stem cell: CD34+ or CD34-? *Int J Hematol* 70: 213-215
- [141] Ploemacher RE, Brons RH (1989) Separation of CFU-S from primitive cells responsible for reconstitution of the bone marrow hemopoietic stem cell compartment following irradiation: evidence for a pre-CFU-S cell. *Exp Hematol* 17(3): 263-266
- [142] Ponten J, Macintyre EH (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 74: 465-486
- [143] Povinelli BJ, Rodriguez-Meira A, Mead AJ (2018) Single cell analysis of normal and leukemic hematopoiesis. *Mol Aspects Med* 59: 85-94
- [144] Puri KD, Finger EB, Gaudernack G, Springer TA (1995) Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules. *J Cell Biol* 131: 261-270
- [145] Quesenberry P, Habibian M, Dooner M, Zhong S, Reilly J, Peters S, Becker P, Grimaldi C, Carlson J, Reddy P, Nilsson S, Stewart FM (1998) Chiaroscuro hematopoietic stem cell. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 109: 19-25; discussion 25-16
- [146] Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF (2002) The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood* 100: 4266-4271
- [147] Rehe K, Wilson K, Bomken S, Williamson D, Irving J, den Boer ML, Stanulla M, Schrappe M, Hall AG, Heidenreich O, Vormoor J (2013) Acute B lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. *EMBO molecular medicine* 5: 38-51
- [148] Ron E (1998) Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology. *Radiat Res* 150: S30-41
- [149] Rose MC, Voynow JA (2006) Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiological reviews* 86: 245-278

- [150] Sachs L (1996) The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 4742-4749
- [151] Samulowitz U, Kuhn A, Brachtendorf G, Nawroth R, Braun A, Bankfalvi A, Bocker W, Vestweber D (2002) Human endomucin: distribution pattern, expression on high endothelial venules, and decoration with the MECA-79 epitope. *Am J Pathol* 160: 1669-1681
- [152] Sanchez MJ, Holmes A, Miles C, Dzierzak E (1996) Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* 5: 513-525
- [153] Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97: 695-710
- [154] Shemin D, Rittenberg D (1946) The life span of the human red blood cell. *J Biol Chem* 166: 627-636
- [155] Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S (2017) Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 16: 115-130
- [156] Shimizu Y, Shaw S (1993) Cell adhesion. Mucins in the mainstream. *Nature* 366: 630-631
- [157] Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL (1995) Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154: 180-191
- [158] Smith C (2003) Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* 10: 9-16
- [159] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150: 76-85
- [160] Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241: 58-62
- [161] Streeter PR, Rouse BT, Butcher EC (1988) Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol* 107: 1853-1862
- [162] Strous GJ, Dekker J (1992) Mucin-type glycoproteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 27: 57-92
- [163] Sundstrom C, Nilsson K (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17: 565-577
- [164] Tada J, Omine M, Suda T, Yamaguchi N (1999) A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosine kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells. *Blood* 93: 3723-3735
- [165] Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676
- [166] Tanaka H, Ishikawa K, Nishino M, Shimazu T, Yoshioka T (1996) Changes in granulocyte colony-stimulating factor concentration in patients with trauma and sepsis. *J Trauma* 40: 718-725; discussion 725-716
- [167] The Cancer Genome Atlas Research Network (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 368: 2059-2074
- [168] Tian C, Zhang Y (2016) Purification of hematopoietic stem cells from bone marrow. *Ann Hematol* 95: 543-547
- [169] Till JE, McCulloch EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research* 14: 213-222
- [170] Tompkins WA, Watrach AM, Schmale JD, Schultz RM, Harris JA (1974) Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. *Journal of the National Cancer Institute* 52: 1101-1110
- [171] Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354
- [172] Ueno M, Igarashi K, Kimura N, Okita K, Takizawa M, Nobuhisa I, Kojima T, Kitamura T, Samulowitz U, Vestweber D, Shimomura T, Suda T, Nakashima K, Taga T (2001) Endomucin is expressed in embryonic dorsal aorta and is able to inhibit cell adhesion. *Biochemical and biophysical research communications* 287: 501-506
- [173] Valtieri M, Tweardy DJ, Caracciolo D, Johnson K, Mavilio F, Altmann S, Santoli D, Rovera G (1987) Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol* 138: 3829-3835
- [174] Varmus HE, Lowell CA (1994) Cancer genes and hematopoiesis. *Blood* 83: 5-9

- [175] Viniou N, Terpos E, Rombos J, Vaiopoulos G, Nodaros K, Stamatopoulos K, Meletis J, Yataganas X (2001) Acute myeloid leukemia in a patient with ataxia-telangiectasia: a case report and review of the literature. *Leukemia* 15: 1668-1670
- [176] Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL (2002) Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297: 2256-2259
- [177] Weissman IL (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science (New York, NY)* 287: 1442-1446
- [178] Weissman IL (2008) The E. Donnall Thomas lecture: normal and neoplastic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 849-858
- [179] Weissman IL, Shizuru JA (2008) The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 112: 3543-3553
- [180] Winer J, Jung CKS, Shackel I, Williams PM (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical biochemistry* 270: 41-49
- [181] Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE (2003) Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research* 34: 461-475
- [182] Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012
- [183] Yu J (1996) Regulation and reconstitution of human hematopoiesis. *J Formos Med Assoc* 95: 281-293
- [184] Zahr A, Alcaide P, Yang J, Jones A, Gregory M, dela Paz NG, Patel-Hett S, Nevers T, Koirala A, Lusciuskas FW, Saint-Geniez M, Ksander B, D'Amore PA, Argueso P (2016) Endomucin prevents leukocyte-endothelial cell adhesion and has a critical role under resting and inflammatory conditions. *Nat Commun* 7: 10363
- [185] Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M (1998) Human bone marrow CD34⁻ cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells. *Exp Hematol* 26: 353-360
- [186] Zhu XL, Paul PS, Vaughn E, Morales A (1990) Characterization and reactivity of monoclonal antibodies to the Miller strain of transmissible gastroenteritis virus of swine. *American journal of veterinary research* 51: 232-238

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der Hierarchie der Hämatopoese beim erwachsenen Menschen.....	4
Abb. 2	Signalkomponenten in der Steuerung von hämatopoetischem Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und spezialisierten Funktionen.....	10
Abb. 3	Schematische Darstellung der vier Splicevarianten von humanem Endomucin.....	25
Abb. 4	mRNA-Expressionslevel von murinem Endomucin in primitiven murinen hämatopoetischen Zellen.....	62
Abb. 5	Real-time PCR zur Analyse von Endomucin in humanen hämatopoetischen Zellen.....	63
Abb. 6	FACS-Analysen von CD34 ⁺ Zellen auf Endomucin.....	65
Abb. 7	FACS-Analysen von humanen Leukämie-Zelllinien auf Endomucin-Expression.....	66
Abb. 8	Colony Assay von CD34 ⁺ Endomucin ⁻ Zellen und CD34 ⁺ Endomucin ⁻ Zellen mit 2 Replatings.	68
Abb. 9	Immunphänotyp der Knochenmarksproben von mit 1,0×10 ⁵ Zellen transplantierten NOD/SCID Mäusen.....	71
Abb. 10	(A+B) Negative immunhistochemische Färbung einer Knochenmarksstanzbiopsie auf Endomucin (C+D) Positive immunhistochemische Färbung einer Knochenmarksstanzbiopsie auf Endomucin.....	73
Abb. 11	Vergleich der mRNA-Expressionslevel von Endomucin zwischen Knochenmarksproben von ALL-Patienten und Knochenmarksproben von AML-Patienten.....	77
Abb. 12	Potentiell Modell für die Einordnung von Endomucin exprimierenden Zellen in die Hierarchie der Hämatopoese.....	81
Abb. 13	Denkbare Modelle für Endomucin-Expression in der AML.....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Oberflächenmarker auf humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen.....	7
Tabelle 2	FAB-Klassifikation und Assoziation der Subtypen mit genetischen Veränderungen und deren Häufigkeit.....	16
Tabelle 3	WHO-Klassifikation der AML.....	17
Tabelle 4	Immunphänotypische Klassifikation der ALL.....	21
Tabelle 5	Verwendete Medien und Zusätze.....	35
Tabelle 6	Primer und Sonden für Real-time PCR und Sequenzierung.....	41

Tabelle 7	Verwendete Antikörper.....	41
Tabelle 8	Verwendete eukaryotische und prokaryotische Zelllinien.....	42
Tabelle 9	TaqMan-Ansätze mit und ohne Sonde.....	59
Tabelle 10	Ergebnisse der Transplantation humaner CD34 ⁺ Endomucin ⁺ Zellen und CD34 ⁺ Endomucin ⁻ Zellen in NOD/SCID Mäuse.....	72
Tabelle 11	Statistische Auswertung der Ergebnisse des Tissue Microarrays.....	74
Tabelle 12	Immunhistochemische Anfärbarkeit verschiedener Tumorzelllinien auf Endomucin.....	76

9 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Hubert Serve danke ich für die Überlassung des Themas, für die Betreuung und Bereitstellung des Umfeldes. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang E. Berdel für die Übernahme der Vor-Ort-Betreuung, Beratung und Begutachtung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow danke ich für die Hilfestellungen und die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Labor fertigstellen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Lara Tickenbrock für ihre umfassende Betreuung und ihr Engagement. Ohne ihre wissenschaftliche Anleitung, ihre Geduld, ihre Motivation und ihre Kritik wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Frau Marion Baas und Dr. Sina Hehn wie auch allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich sehr für ihre Unterstützung und Zusammenarbeit.

Dr. Marc Hotfilder und seinen Mitarbeitern danke ich für die Durchführung der tierexperimentellen Maßnahmen.

Prof. Dr. Friedemann Kiefer danke ich für die Bereitstellung des entscheidenden Antikörpers.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern, Birgit Bergmann-Rauwald und Prof. Dr. Johann-Wilhelm Rauwald, meinen Brüdern Urs und Maxim sowie meinem Ehemann Sebastian für die inhaltliche und moralische Unterstützung auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit.

10 Lebenslauf

11 Genehmigungsbescheid gemäß § 8 Tierschutzgesetz



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn

PD Dr. med. Josef Vormoor

Klinik und Poliklinik

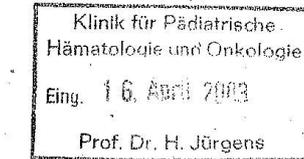
für Kinderheilkunde

- Pädiatrische Hämatologie
und Onkologie -

Universitätsklinikum Münster

Albert-Schweitzer-Str. 33

48129 Münster



Dienstgebäude:
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2104
Telefax: 2115
Raum: 423
Auskunft erteilt:
Frau Stichling
E-Mail:
Kerstin.stichling@bezreg-muenster.nrw.de
AktENZEICHEN:
50.0835.1.0 (G 25/2003)

14 . April 2003

Tierschutz;

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Ihr Antrag vom 10.03.2003, hier eingegangen am 18.03.2003

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d

Sehr geehrter Herr Dr. Vormoor,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der zur Zeit gültigen Fassung (BGBl. I S. 1105, 1818) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

"Funktionelle Analyse der malignen Stammzellen bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) im Kindesalter"

Diese Genehmigung gilt bis zum **31.03.2006**.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

900 Mäuse.

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300
E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525
Konten der Landeskasse Münster:
Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520
Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820
ÖPNV ab Hbf: Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis
Haltestelle Windthorststraße (Haus K), Linie 7 bis Haltestelle Wiener Str. (Haus W).

1/2



Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
PD Dr. med. Josef Vormoor
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33
48129 Münster

Herr
Dr. rer. nat. Marc Hotfilder
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33
48129 Münster

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Ich weise darauf hin, dass diese Genehmigung eine evtl. erforderliche Zustimmung nach dem Gentechnikgesetz für Arbeiten mit transgenen Tieren nicht einschließt.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung

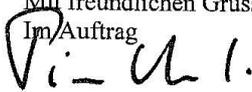
Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen

Im/Auftrag



Dr. Piontkowski



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Herrn
 PD Dr. med. Josef Vormoor
 Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
 - Pädiatrische Hämatologie
 und Onkologie -
 Universitätsklinikum Münster
 Albert-Schweitzer-Str. 33
 48129 Münster

Dienstgebäude:
 Domplatz 6-7
 48143 Münster
 Telefon: 0251 411-0
 Durchwahl: 411-2104
 Telefax: 411-2115
 Raum: C 211
 Auskunft erteilt:
 Dirk Skoff
 E-Mail:
 Dez50@brms.nrw.de
 Aktenzeichen:
 50.0835.1.0 (G 25/2003)

30. März 2006

Tierschutz

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Verlängerung des Tierversuchs:

„Funktionelle Analyse der malignen Stammzellen bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) im Kindesalter“

Antrag vom 27.03.2006

Mein Genehmigungsbescheid vom 14.04.2003 – Az.: 50.0835.1.0 (G 25/2003) –

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Vormoor,

gem. § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a. Versuchsvorhabens bis zum **31.03.2007**.

Die Verlängerung kann jeweils nur über einen Zeitraum von einem Jahr ausgesprochen werden. Der nächste Antrag auf Verlängerung kann bereits im November/Dezember diesen Jahres gestellt werden.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Piontkowski

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de
 Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
 Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411 - 3300
ÖPNV - Haltestellen:
 Domplatz, Linien 2, 10, 11, 12, 14, 20
 Raphaelsklinik, Linien 2, 10, 11, 12 (Haus K)
 Bezirksregierung II, Linie 17 (Haus N)
 Hauptbahnhof, ca. 100 m zu Fuß (Haus S)

Konten der Landeskasse	Deutsche Bundesbank - Filiale Münster	WestLB AG Münster
BLZ:	400 000 00	400 500 00
Konto:	40 001 520	61 820
IBAN:	DE34 4000 0000 0040 0015 20	DE65 4005 0000 0000 0618 20
BIC:	MARKDEF1400	WELADE3M

NRW.



Bezirksregierung Münster

Klinik für Pädiatrische
Hämatologie und Onkologie
Ding. 15. Dez. 2006
Prof. Dr. H. Jürgens

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Herrn
Dr. rer. nat. Marc Hotfilder
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
- Pädiatrische Hämatologie
und Onkologie -
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33
48129 Münster

Dienstgebäude:
Domplatz 6-7
48143 Münster
Telefon: 0251 411-0
Durchwahl: 411-2104
Telefax: 411-2115
Raum: C 211
Auskunft erteilt:
Dirk Skoff
E-Mail:
Dez50@brms.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.1.0 (G 25/2003)

1. Dezember 2006

Tierschutz

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Verlängerung des Tierversuchs:

„Funktionelle Analyse der malignen Stammzellen bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) im Kindesalter“

Antrag vom 28.11.2006

Mein Genehmigungsbescheid vom 14.04.2003 – Az.: 50.0835.1.0 (G 25/2003) –

Sehr geehrter Herr Dr. Hotfilder,

gem. § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a. Versuchsvorhabens bis zum **31.03.2008**.

Die Genehmigungsdauer für o.g. Versuchsvorhaben ist damit bereits zweimal um ein Jahr verlängert worden. Eine weitere Verlängerung ist daher nicht mehr möglich, so dass die Genehmigung am 31.03.2008 ausläuft.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Piontkowski

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de
Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411 - 3300
ÖPNV - Haltestellen:
Domplatz, Linien 2, 10, 11, 12, 14, 20
Bezirksregierung II, Linie 17 (Haus N)

Konten der Landeskasse	Deutsche Bundesbank - Filiale Münster	WestLB AG Münster
BLZ:	400 000 00	400 500 00
Konto:	40 001 520	61 820
IBAN:	DE34 4000 0000 0040 0015 20	DF65 4005 0000 0000 0618 20
BIC:	MARKDEF1400	WELADEF3M