Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Klinik für Hämatologie, Onkologie, Immunologie
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Neubauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

HBP1 - Der Repressor HMG-Box-Transkriptions-Faktor-1 in der Hämatopoese und bei akuter myeloischer Leukämie

---

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Cornelia Link
geboren am 30.09.1983 in Tübingen

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 24.06.2010

Gedruckt mit Genemigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Herr Prof. Dr. Andreas Neubauer

Koreferent: Frau Prof. Dr. Uta-Maria Bauer

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG 3

1. EINLEITUNG 5

1.1. Akute myeloische Leukämie (AML) 5
1.1.1. Definition und Epidemiologie 5
1.1.2. Pathogenese 5
1.1.3. Charakteristik der AML 6
1.1.4. Prognose 6
1.1.5. Therapie 7
1.1.6. Vorarbeiten der AG Neubauer 8

1.2. HBP1 - Der Repressor HMG-Box-Transkriptions-Faktor-1 9
1.2.1. Charakterisierung als HMG-Box-Protein 9
1.2.2. HBP1 im menschlichen Genom 9
1.2.3. HBP1-assoziierte Signalwege 10
1.2.4. HBP1 in Hämatopoese und Leukämogenese 14
1.2.5. Zusammenfassende Übersicht bekannter HBP1-Interaktionen 15

1.3. Hämatopoetische Progenitorzellen 15
1.3.1. Stamm- und Vorläuferzellen der Hämatopoese 15
1.3.2. Antigenexpression hämatopoetischer Progenitorzellen 16

1.4. Ziele und bearbeitete Fragestellung 18

2. METHODEN 19

2.1. Zellkultur 19
2.1.1. Ausgangsmaterial 19
2.1.2. Zellzählung 20
2.1.3. Versuchs-Etablierung zur Analyse der Zellzykluskorrelation 20

2.2. RNA-Extraktion 21

2.3. cDNA-Synthese 22
2.3.1. Zellkulturversuche 22
2.3.2. Sortierte Progenitorzellen 22
2.3.3. Erstellen der Kalibrator-cDNA 24

2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 24
2.4.1. Prinzip der konventionellen PCR 24
2.4.2. Laborprotokoll ß-Actin-PCR 24
2.4.3. Auswertung durch Elektrophorese 25

2.5. Quantitative PCR (qPCR) 26
2.5.1. Prinzip der Detektion 26
2.5.2. Analyse der PCR-Daten 27
2.5.3. Relative Quantifizierung 27
2.5.4. Verwendete qPCR-Primer 28
2.5.5. Versuchsschritte der quantitativen PCR 29
2.5.6. Einstellungen am Cycler 30

2.6. Transfektion mit HBP1-siRNA 31
2.6.1. Genregulation durch siRNAs 31
2.6.2. Ausgangsmaterial und Prinzip der Transfektion 31
2.6.3. siRNA-Transfektion 32
2.6.4. Fluoreszenzmikroskopische GFP-Transfektionskontrolle 33

2.7. Isolation hämatopoetischer Progenitorzellen aus humanem Knochenmark 34
2.7.1. Patientenauswahl 34
2.7.2. Spongiosapräparation und Ficoll-Zellseparation 34
2.7.3. Separation der CD34+ Progenitorzellen 35

2.8. Durchflusszytometrie (Flowzytometrie) 37
2.8.1. Prinzip der Durchflusszytometrie 37
2.8.2. Gating-Prinzip 38
2.8.3. Zellzyklus-Analyse 38
2.8.4. Durchflusszytometrische GFP-Messung 40

2.9. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung 42
2.9.1. Zellsortierung anhand Antigenexpression 42
2.9.2. Antigen-Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern 43
2.9.3. Sortierstrategie 44

3. ERGEBNISSE 46

3.1. HBP1-Screening in verschiedenen Zelllinien 46

3.2. HBP1 und Zellzyklus 48
3.2.1. HBP1-Expression in U937-Zellen nach Serumentzug 48
3.2.2. Zellzyklus-Korrelation 49

3.3. Funktionelle Effekte durch reduzierte HBP1-Expression 52

3.4. HBP1 in hämatopoetischen Progenitorzellen 53

3.5. HBP1-Expression in AML-Erstdiagnosen 56
3.5.1. HBP1-Screening (qPCR) 56
3.5.2. Korrelation mit klinischen Daten 57

4. DISKUSSION 61

4.1. HBP1 in verschiedenen Zelllinien 61

4.2. HBP1 und Zellzyklus 62

4.3. Funktionelle Effekte durch reduzierte HBP1-Expression 63

4.4. HPB1 in hämatopoetischen Progenitorzellen 64
4.4.1. These: HBP1 ist an der Regulation zentraler Stammzelleigenschaften beteiligt 64
4.4.2. These: HBP1 ist an myeloischer Differenzierung beteiligt 66

4.5. HBP1-Expression in Patienten mit AML–Erstdiagnose (Dresdener Studienzentrale) 68

FAZIT – SCHLUSSFOLGERUNG 69

LITERATUR 71

ANHANG 80

Zusammenfassung

Einleitung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung der myeloischen Vorläuferzellen der Hämatopoese und ist die häufigste akute Leukämie des Erwachsenenalters. Die AML wird durch genetische Veränderungen ausgelöst. Dabei werden zwei Klassen genetischer Aberrationen unterschieden. Zur Klasse I gehören Mutationen, die unkontrolliertes Wachstum myeloischer Blasten verursachen, zur Klasse II zählen Mutationen in Differenzierungsgenen der Hämatopoese. Die verschiedenen Genveränderungen definieren AML-Subtypen und sind von prognostischer Bedeutung. Ziel klinischer Forschung ist es, auf Grund pathogenetischer Kenntnisse neue therapeutische Möglichkeiten einer gezielten Therapie für einzelne Risikogruppen schaffen zu können. Die Arbeitsgruppe Neubauer beschäftigt sich mit der prognostisch ungünstigen AML -7/del7q. Es konnte gezeigt werden, dass das Onkogen Ski bei der AML -7/del7q durch Blockade der Vitamin-A vermittelten Differenzierung eine entscheidende Rolle spielt. In einem shRNA-Screening wurde nach weiteren Proteinen gesucht, deren Funktionsausfall zu Verlust der Vitamin-A vermittelten Differenzierbarkeit führt. Bei diesem Screening ist unter anderen das HMG-Box-Protein HBP1 (HMG-Box containing protein 1) aufgefallen.

HBP1

HBP1 ist durch die HMG-Box (High-Mobility-Group) als DNA-bindendes Protein charakterisiert. Im menschlichen Genom liegt HBP1 auf Chromosom 7 (7q22-q31), einer Region, die bei vielen Tumorerkrankungen mutiert ist. HBP1 ist ein Zielgen des Retinoblastoma Proteins (RB) und an der Steuerung von Proliferation und zellulärer Differenzierung beteiligt. Dabei wirkt HBP1 als Zellzyklus-Inhibitor und Repressor Zellzyklus-aktivierender Proteine (N-Myc, Cyclin D1). Durch Inhibition der NADPH-Oxidase reduziert HBP1 die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) und ist demnach an der Regulation einer adäquaten Stressantwort beteiligt. Als Zielprotein der p38-MAP-Kinase ist HBP1 an der Regulation von Zellzyklus-Arrest und Ras-induzierter Seneszenz involviert. Des Weiteren gilt HBP1 als Mediator der Wnt-ß-Catenin-Signalkaskade. Auf verschiedenen Ebenen der Reaktionskaskade wirkt HBP1 als negativ-Regulator der Wnt-ß-Catenin-Signaltransduktion (Wnt-Promotor, ß-Catenine, c-Myc). Zu HBP1 und seiner Funktion in der physiologischen sowie der malignen Hämatopoese ist derzeit wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass HBP1 als aktivierender Transkriptionsfaktor der Myeloperoxidase wirkt. Es wird vermutet, dass die HBP1-Expression in verschiedenen myeloischen Entwicklungsstadien variiert und an der Regulation der Myelopoese beteiligt sein könnte. Diesen Annahmen wird in diesem Dissertationsprojekt nachgegangen.

Ziele und bearbeitete Fragestellung

Die generelle Hypothese dieser Arbeit ist, dass HBP1 eine zentrale Rolle in der myeloischen Differenzierung sowie der Pathogenese der AML einnimmt. Es wurde angenommen, dass eine Expressionsanalyse verschiedener AML-Subtypen eine Korrelation zwischen AML-Entität und HBP1-Expression zulässt. Der Verlust des HBP1-Proteins sollte funktionelle Auswirkungen auf die Wnt-ß-Catenin-Kaskade haben, die für die Leukämogense entscheidend sind. Wir wollten zeigen, dass die HBP1-Expression in den hämatopoetischen Progenitorpopulationen der HSCs

(hematopoietic stem cells), CMPs (common myeloid progenitors) und GMPs (granulocyte/macrophage progenitors) aus gesundem Knochenmark unterschiedlich ausfällt. Bei AML-Patienten wurde eine Korrelation der HBP1-Expression mit Überlebensdaten und AML-Karyotyp vermutet.

Methoden

In einem Screening verschiedener AML-Zelllinien wurde die HBP1-Expression durch quantitative PCR (qPCR) bestimmt. Außerdem wurde ein Versuchsmodell etabliert, das die Korrelation zwischen HBP1-Expression (qPCR) und bestimmten Zellzyklus-Phasen (Druchflusszytometrie) prüfen sollte. In funktionellen Zellkulturversuchen wurde die HBP1-Expression mit siRNAs ausgeschaltet und die Effekte der reduzierten HBP1-Aktivität auf die Wnt-ß-Catenin-Zielgene cMyc und Cyclin D1 (qPCR) untersucht. Gesunde Knochenmarkzellen wurden aus humanen Spongiosa-Proben isoliert und durchflusszytometrisch in die hämatopoetischen Subfraktionen der HSCs, CMPs und GMPs sortiert. In diesen Populationen wurde die HBP1-Expression mit quantitativer PCR bestimmt. In Zusammenarbeit mit der AG Illmer der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums der TU Dresden wurde ein HBP1-Screening mit cDNA-Proben (qPCR) von AML-Patienten durchgeführt und mit klinischen Daten korreliert.

Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die Screening-Untersuchungen in AML-Zelllinien ließen keine eindeutige Interpretation zu, jedoch wurden daraus Versuche zur HBP1-Zellzyklus-Korrelation abgeleitet. Die dabei ermittelten Ergebnisse ließen die Hypothese zu, HBP1 könnte an der Regulation zellulärer Quiescence beteiligt sein. Die funktionellen Versuche zu HBP1 und Interaktionen mit dem Wnt-ß-Catenin-Signalweg zeigten nicht die erwarteten Ergebnisse. Diese Resultate wurden methodisch diskutiert und legen eine andere Versuchsanordnung nahe.

Die Expressionsanalyse in hämatopoetischen Stammzellen lieferte statistisch signifikante Ergebnisse. Wir konnten eine spezifische HBP1-Expression in hämatopoetischen Stammzellen nachweisen ($p= 0,017$). Im Laufe der Differenzierung von den HSCs über die CMPs zu den GMPs zeigte sich ein Abfall der HBP1-Expression. Es wird davon ausgegangen, dass HBP1 an der Regulation zentraler Stammzelleigenschaften (Selbsterneuerung, Quiescence) hämatopoetischer Stammzellen beteiligt ist. Des Weiteren wurde auf Grund bekannter HBP1-Charakteristika gefolgert, dass HBP1 daran beteiligt ist, die hämatopoetische Differenzierung in Richtung der myeloischen Reihe zu lenken. Bei AML-Patienten konnte für Patienten mit geringer oder hoher HBP1-Expression kein Unterschied im Gesamt- und rezidivfreien Überleben gezeigt werden. Auf Grund zu geringer Fallzahlen konnte keine Korrelation zwischen HBP1-Expression und verschiedenen AML-Karyotypen festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern entscheidende Erkenntnisse zum Stellenwert des HMG-Box-Protein HBP1 in der physiologischen Hämatopoese. Die Beteiligung an der Regulation zentraler Stammzelleigenschaften und die Integration in myeloische Differenzierungsprozesse erklären HBP1 zu einem geeigneten Kandidaten, dessen Funktionsausfall oder Mutation am Entstehungsprozess der Leukämie beteiligt sein könnte.

1. Einleitung

1.1. Akute myeloische Leukämie (AML)

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie ist eine klonale Erkrankung hämatopoetischer Vorläuferzellen. Auf Grund verschiedener genetischer Veränderungen ist die Ausdifferenzierung der hämatopoetischen Stammzellen in die verschiedenen Zelllinien und Blutzellen gestört. Leukämische Vorläuferzellen (Blasten) können dem normalen Weg der Hämatopoese nicht folgen und beginnen mit unkoordinierter, klonaler Proliferation. Die überschießende Proliferation einer Blastenpopulation führt zur Verdrängung der normalen Erythropoese, Granulopoese oder Thrombopoese. Im klinischen Bild manifestiert sich dies als Knochenmarkinsuffizienz mit Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie (25;40;129).

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) sind unreife Zellen der myeloischen Reihe (myeloische Blasten) verantwortlich für das leukämische Krankheitsbild. Die myeloischen Vorläuferzellen sind von der kausalen genetischen Fehlregulation betroffen. Nach der WHO-Definition liegt eine Leukämie vor, wenn im Knochenmark oder peripheren Blut ein Anteil von >20% pathologischer Blasten nachgewiesen werden kann (150). Nach Berechnungen trugen Leukämien im Erwachsenenalter im Jahre 2009 mit 3,03% zur gesamten Tumorsterblichkeit in den USA bei (97). Der AML ist für die Jahre 2002-2006 ein Anteil von 28,64% der neu-diagnostizierten Leukämien zuzuschreiben (98), das mediane Alter zum Diagnosezeitpunkt liegt bei 68 Jahren (56).

1.1.2. Pathogenese

Für die Entstehung einer AML sind Mutationen in Genen mit zentraler Funktion in der Myelopoese verantwortlich. Es werden zwei unterschiedliche Klassen genetischer Läsionen unterschieden. Der Klasse I werden Mutationen zugeordnet, die eine überschießende Proliferation der leukämischen Zellen bedingen. Zum Beispiel führen Läsionen in der für die Rezeptortyrosinkinase FLT3 kodierenden Region oder Mutationen des Onkogens Ras zu unkontrolliertem Wachstum leukämischer Blasten. Mutationen der Klasse II betreffen Differenzierungsgene der Hämatopoese. Diese blockieren die normale myeloische Differenzierung. AML-typische Translokationen wie die Fusionsproteine AML1-ETO bei Translokation t(8;21) und PML-RARα bei t(15;17) oder die inv(16)-Translokation führen zu veränderten Transkriptionsfaktoren und gestörter hämatopoetischer Differenzierung. Eine alleinige Klasse-I-Mutation oder eine einzelne Klasse-II-Mutation führen jedoch nicht zur malignen Entartung. Erst im Zusammenspiel der beiden Klassen entsteht eine AML (45;68;119).

1.1.3. Charakteristik der AML

Die Differenzierung zwischen akuter myeloischer und akuter lymphatischer Leukämie erfolgt durch die zytomorphologische und immunologische Diagnostik. Mit Hilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper können auf den Blastenzellen sowohl linienspezifische Antigene nachgewiesen werden als auch Antigene, die den Reifegrad der leukämischen Blasten definieren (15).

Für die akute myeloische Leukämie ist eine große Diversität genetischer Veränderungen bekannt, sodass die auf morphologischen und zytochemischen Charakteristika beruhende French-American-British (FAB) - Klassifikation (16) in der WHO-Klassifikation von 2001 durch zytogenetische und molekulare Kriterien ergänzt wurde (150). Die WHO-Klassifikation der AML berücksichtigt vier Hauptkategorien. Dabei wird zwischen Leukämien mit typischen zytogenetischen Aberrationen, Leukämien mit Dysplasien in mehreren Zellreihen und sekundären, therapie-induzierten Leukämien unterschieden. Einer vierten Kategorie werden akute myeloische Leukämien zugeordnet, die durch fehlende genetische Veränderung keiner der Hauptkategorien zugeordnet werden können. Leukämien dieser vierten Gruppe werden anhand der morphologischen FAB-Kriterien charakterisiert (M0-M7) (25;75;150). Im Fokus dieser Arbeit stehen die genetischen Veränderungen der AML, daher wurde auf eine ausführliche Darstellung der FAB-Klassifikation verzichtet. Die Abbildungen 1a-1c[1] zeigen AML-typische Bilder im Blut- bzw. Knochenmarkausstrich und die charakteristische Myeloperoxidasereaktion (MPO). Die MPO-Aktivität ist ein essentielles diagnostisches Kriterium. Für die Diagnose einer AML müssen >3% der Blasten MPO-positiv sein (55).

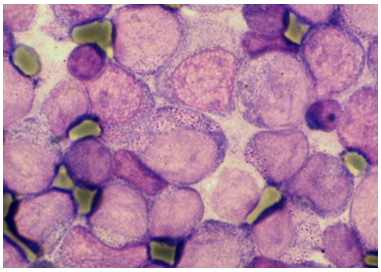


Abbildung 1a:
Knochenmarkausstrich einer AML M2. Es ist eine Gruppe myeloischer Blasten zu sehen, z.T. mit Zytoplasmagranula (Bildmitte).

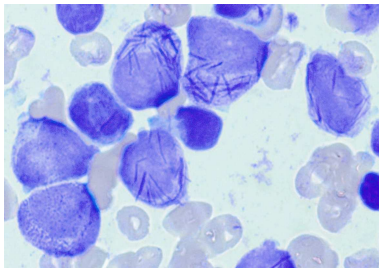


Abbildung 1b:
Peripherer Blutausstrich einer akuten Promyelozytenleukämie. Die Promyelozyten enthalten zahlreiche AML-typische Auerstäbchen.

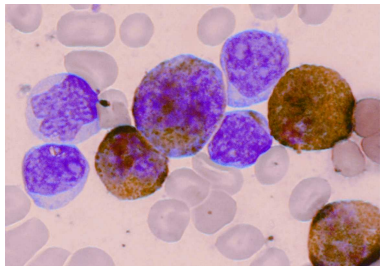


Abbildung 1c:
Myeloperoxidase (MPO)-Reaktion. MPO-positive Blasten zeigen eine gelb-braune Zytoplasmafärbung.

1.1.4. Prognose

Die verschiedenen AML-assoziierten Genveränderungen sind wichtige prognostische Kriterien und definieren zytogenetische Risikogruppen. Da die prognostischen Zuordnung der einzelnen zytogenetischen Aberrationen jedoch vom jeweiligen Therapieregime abhängig ist, gibt es keine allgemeingültige Risikoklassifikation anhand des Karyotyps (53). Jedoch besteht in den großen Therapiestudien ein relativer Konsens über die prognostische Bedeutung einiger Subgruppen. Balancierte chromosomale Translokationen wie t(8;21), t(15;17) oder die Inversion inv(16)/t(16;16) sind mit günstiger Prognose assoziiert. In die als intermediär eingestufte Gruppe gehören Leukämien mit normalem Karyotyp. Zur Gruppe schlechter Prognose zählen

[1] Onkodin (54), mit freundlicher Genehmigung der Herausgeber

Leukämien mit komplexem Karyotyp oder die Monosomie 7 (-7/del7q) (26;40;44;52;131). Ein komplexer Karyotyp ist definiert durch das Vorliegen einer AML mit mehr als drei genetischen Aberrationen, darunter keine balancierte Translokation (26).
Über diese zytogenetische Risikoklassifikation hinaus sind molekulargenetische Mutationen von prognostischer Bedeutung. Patienten mit zytogenetisch normalem Karyotyp weisen häufig FLT3-Veränderungen oder CEBPA-, MLL- und NPM1-Mutationen auf. Diese Mutationen haben unterschiedliche klinische Relevanz und lassen eine weitere prognostische Einordnung der bisher als intermediär eingestuften Risikogruppe zu. Während für Patienten mit Veränderungen in den Genen CEBPA oder NPM1 gute Überlebensdaten gezeigt werden konnten, sind FLT3- oder MLL-Mutation bei Patienten mit normalem Karyotyp mit schlechter Prognose assoziiert (40;131).

1.1.5. Therapie

Trotz umfassender Kenntnisse zur biologischen Varietät der akuten myeloischen Leukämie ist die Therapie der AML wenig variabel. Es wird zwischen der Phase der Induktionstherapie und der Phase der Konsolidierungs- bzw. Post-Remissionstherapie unterschieden. Das Ziel der Induktionstherapie ist das Erreichen einer kompletten hämatologischen Remission durch Reduktion der blastenbedingten Tumorlast (40;128). Eine komplette Remission (complete remission = CR, Vollremission) ist definiert durch das Vorliegen von <5% Blasten im Knochenmark, dem Nachweis von >1000 neutrophilen Granulozyten/µl und >100000 Thrombozyten/µl im peripheren Blutbild, sowie dem Nicht-Vorkommen unreifer Blasten in peripherem Blut oder extramedullären Leukämiemanifestationen (29). Ziel der anschließenden Konsolidierungstherapie ist es den Zustand der Vollremission dauerhaft zu erhalten und ein Rezidiv der AML zu vermeiden (40;128).
Die Standard-Induktionstherapie der AML ist seit Jahrzehnten eine Kombinationschemotherapie aus ARA-C (Cytosin-Arabinosid) und einem Anthrazyklin (Daunorubicin oder Idarubicin), unabhängig von Ätiologie und genetischer Disposition (40;128). Eine Ausnahme ist die Therapie der Promyelozytenleukämie mit der t(15;17)-Translokation, die in Kombination zur Chemotherapie mit einer Differenzierungsinduktion durch All-trans-Retinolsäure (ATRA) erfolgt (siehe unten).
Für die Konsoliderungstherapie besteht neben der Möglichkeit der Chemotherapie mit Hochdosis-ARA-C die Möglichkeit der allogenen und autologen Stammzelltransplantation (21;40). Der Stellenwert der verschiedenen Stammzelltransplantationen im Vergleich zur Chemotherapie in der remissionserhaltenden Therapie ist derzeit noch nicht ausreichend bekannt und Gegenstand klinischer Studien (152). Therapieempfehlungen für eine allogene Stammzelltransplantation gibt es für Patienten mit Hoch-Risiko-Leukämien (40;139).
Das Fehlen einheitlicher Empfehlungen zur Therapie der AML verdeutlicht die Notwendigkeit klinischer Studien, sowie der Entwicklung neuer Therapieoptionen.

Ziel klinischer AML-Forschungen ist es, neue Pathomechanismen aufzudecken und auf Grund pathophysiologischer und genetischer Kenntnisse Medikamente für eine zielgerichtete Therapie („targeted therapy“) zu entwickeln. Eine erste spezifische Therapie ist bei der

Promyelozytenleukämie (APL) mit t(15;17)-Translokation möglich. Standard in der Therapie der APL ist die Kombination einer Chemotherapie mit All-trans-Retinolsäure (ATRA). Bei t(15;17)-Translokation entsteht ein Fusionsprotein, das die normale hämatopoetische Differenzierung blockiert. ATRA führt zur Spaltung des Fusionsproteins und zur Wiederherstellung von Signalwegen, die die myeloische Differenzierung steuern (85;87). Vor Einführung der ATRA-Therapie hatte die Promyelozytenleukämie eine intermediäre Prognose, in der Kombination mit ATRA weist die APL im Vergleich zu anderen AML-Subgruppen die höchsten Heilungschancen auf. Bei über 70% der Patienten kann durch die Kombinationstherapie eine Langzeitremission erreicht werden (42;44;85;125).

Diese Aussichten unterstreichen die Notwendigkeit einer zielgerichteten, individuellen Therapie auch für andere AML-Typen. Eine Option für eine indiviuelle Therapie ist bei AML-Patienten mit Ras-Mutation gegeben. Patienten mit Ras-Mutation, die in der Konsolidierungstherapie mit Hochdosis ARA-C behandelt wurden, erreichten ein besseres Gesamt- und rezidivfreies Überleben als Patienten mit Ras-Mutation, die eine Niedrigdosis-ARA-C-Therapie erhielten. Für Patienten ohne Ras-Mutation dagegen konnte dieser Überlebensvorteil für eine Hochdosis-Therapie nicht gezeigt werden (102). Mögliche therapeutische Angriffspunkte sind die Hemmung von Rezeptortyrosinkinasen (FLT3, c-kit), Hemmung der Ras-Signaltransduktion oder die epigenetische Modulation der Genexpression über Histon-Deacetylasen (20;76). Da klinische Wirksamkeit verschiedener FLT3-Inibitoren bereits gezeigt werden konnte, sind Ergebnisse aus groß angelegten Studien zu erwarten (142). Nachdem präklinisch ein therapeutischer Effekt für die epigenetische Modulation mit Histon-Deacetylasen (HDAC) gezeigt werden konnte, folgen auch hier klinische Studien (20;76)

1.1.6. Vorarbeiten der AG Neubauer

Einer der Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe Neubauer ist die Biologie der prognostisch ungünstigen AML mit -7/del7q. Obwohl viele Gene gefunden wurden, die im Bereich der bei Monosomie 7/del7q betroffenen Regionen liegen, ist bisher kein Gen identifiziert worden, dessen Verlust oder Mutation das Entstehen der Leukämie ausreichend kausal begründet (24;35;83).
Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das Onkogen Ski bei der AML mit Monosomie 7 hoch exprimiert ist. Ski wirkt dabei als Transkriptions-Repressor der Vitamin-A-vermittelten Zelldifferenzierung durch Proteininteraktion mit dem Vitamin-A-Säure-Rezeptor RARα (120). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in einem funktionellen shRNA-Screening (shRNA = short hairpin RNA) nach weiteren Proteinen gesucht, die ebenfalls mit dem RARα-Rezeptor interagieren. Mit Hilfe so genannter shRNA-Libraries können in einer Zellpopulation verschiedene Gene durch RNA-Interferenzen ausgeschaltet, beziehungsweise in ihrer Expression vermindert werden. Die Folgen der reduzierten Genexpression können anschließend untersucht werden (18). In diesem Fall wurde nach Genen gesucht, deren Funktionsausfall zu Verlust der Vitamin-A-vermittelten Differenzierbarkeit (Vitamin-A-Resistenz) führt. In diesem Screening sind einige Gene aufgefallen, die an der Vitamin-A-vermittelten

Differenzierung beteiligt sein könnten, darunter der HMG-Box-Transkriptionsfaktor-1 (HBP1). Demnach scheint HBP1-Knockdown Vitamin-A-Resistenz zu vermitteln.
Ein weiterer Anhaltspunkt ist der umgekehrte Zusammenhang. In Leukämiezellen zeigte sich durch Vitamin-A-Behandlung eine 3,5 fache HBP1-Induktion (1;101). In weiteren Validierungsstudien der Arbeitsgruppe soll HBP1 und seine Funktion in der Leukämogenese geklärt werden.

1.2. HBP1 - Der Repressor HMG-Box-Transkriptions-Faktor-1

1.2.1. Charakterisierung als HMG-Box-Protein

HBP1 (HMG-Box containing protein 1) gehört in die Gruppe der HMG-Box tragenden Proteine (82). Gemeinsames Element dieser Proteingruppe ist die HMG-Box (HMG = High-Mobility-Group), die DNA erkennen und binden kann. Bestehend aus ca. 80 Aminosäuren bildet die HMG-Box eine gefaltete Struktur, die drei alpha-helikale Domänen aufweist (siehe Abb.2) (79;145).

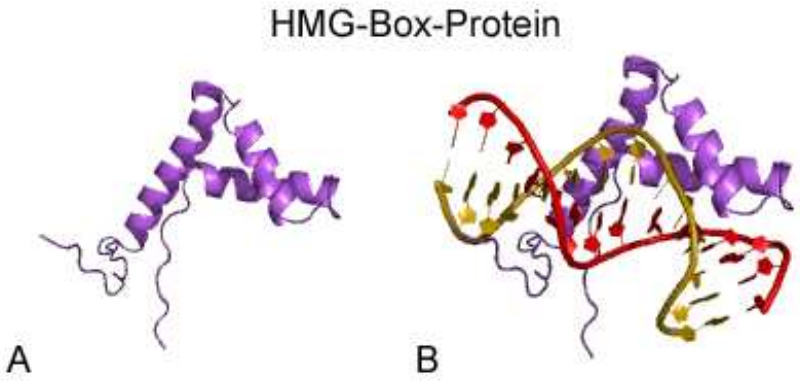


Abbildung 2: Struktur des HMG-Box-Proteins.
Teil A zeigt die gefaltete Proteinstruktur der HMG-Box mit drei alpha-helikalen Domänen. In Teil B ist die Protein-DNA-Interaktion dargestellt.
Modifiziert nach (32)

1.2.2. HBP1 im menschlichen Genom

HBP1 liegt im humanen Genom auf Chromosom 7 (7q22-q31) (84;100;138). Diese HBP1-kodierende Sequenz auf Chromosom 7 liegt in einer Region, die in vielen Tumorerkrankungen mutiert ist (Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Kolonkarzinom), jedoch besonders bei myeloischen Leukämien (17;84;124;134;156;158).

1.2.3. HBP1-assoziierte Signalwege

HBP1 ist in verschiedene Signalwege und regulative Netzwerke involviert. Abbildung 3 zeigt die verschiedenen funktionellen Regionen des HBP1-Proteins (Abb. 3).

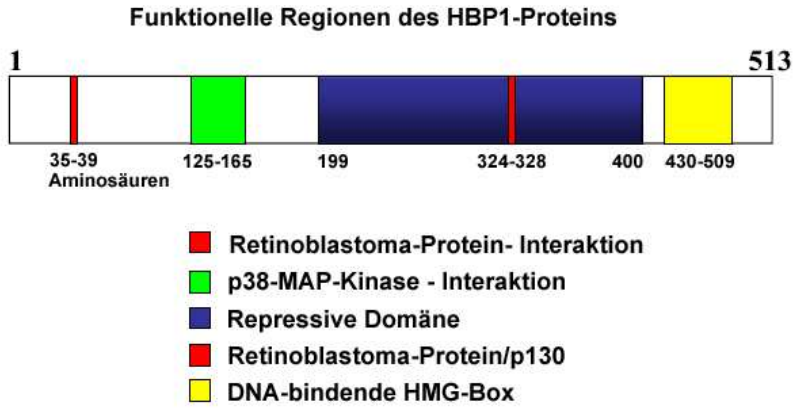


Abbildung 3: Schematische Darstellung der funktionellen Regionen des HMG-Box-Transkriptions-Faktor-1 (HBP1). Insgesamt besteht das HBP1-Protein aus 513 Aminosäuren. Es werden einzelne funktionelle Abschnitte unterschieden. Nach (159)

1.2.3.1 Zellzyklus-regulierende Gene

HBP1 ist als Negativ-Regulator des Zellzyklus in die Steuerung von Wachstum und Proliferation integriert. HBP1 wirkt als Repressor Zellzyklus-regulierender Gene (N-Myc, Cyclin D1, cMyc) und verzögert die Zellzyklus-Progression – vor allem während der G1-Phase. In HBP1-überexprimierenden Leberzellen führt HBP1 zu verzögertem S-Phase-Eintritt[2], längerem Verbleiben in der G1-Phase[2] und Zellzyklus-Arrest (134;144;158;159).

1.2.3.2 Retinoblastoma-Protein und Differenzierung

Zelluläre Differenzierung kann in zwei Phasen gegliedert werden. In einer ersten Phase bedarf es der Initiation und Aufrechterhaltung eines Zellzyklusarrests (Verlassen des Zellzyklus). In der zweiten Phase folgt die Ausprägung gewebsspezifischer Gene (133;160;160). Verschiedene Versuche mit Muskelzellen und Adipozyten zeigten, dass HBP1 in diese zellulären Differenzierungsprozesse integriert ist (82;133;144;160). Eine zentrale Rolle kommt dabei dem Retinoblastoma-Protein zu. RB fördert die Zelldifferenzierung durch negative Effekte auf die Zellzyklus-Progression sowie Aktivierung von gewebsspezifischen Transkriptionsfaktoren (69;74).

HBP1 ist Zielgen des Retinoblastoma-Proteins (RB) und des Proteins p130 aus der Familie der Retinoblastoma-Proteine (80;133;144). Es wird davon ausgegangen, dass für die Regulation

[2] Zur genaueren Beschreibung der Zellzyklus-Phasen siehe *2.8.3. Zellzyklus-Analyse*

zellulärer Differenzierungsprozesse das Verhältnis zwischen HBP1- und RB-Expression entscheidend ist (RB/HBP1). Während C2C12-Muskelzellen bei niedrigen RB/HBP1-Quotienten (überwiegend HBP1) zwar aus dem Zellzyklus austraten, jedoch keine gewebsspezifischen Gene exprimierten, konnten Zellen mit einem hohen RB/HBP1-Quotienten (überwiegend RB) gewebsspezifisch ausdifferenzieren (133).

In Assoziation mit dem Retinoblastoma-Protein kommt HBP1 eine weitere entwicklungsspezifische Funktion zu. Während der Embryonalentwicklung sowie zellulärer Differenzierungsvorgänge verändert sich die Genexpression der Zellen ständig. Diese Expressionsänderungen sind verbunden mit Veränderungen in der Chromatin-Struktur. Für die Organisation der Chromatin-Struktur werden so genannte „Linker-Histone“ als essentiell angesehen. Unter den verschiedenen Linker-Histonen ist der Subtyp $H1^0$ für differenzierende Gewebe charakteristisch (70;81). Eine kooperative Wirkung zwischen RB und HBP1 kontrolliert die $H1^0$-Genexpression (81).

1.2.3.3. p38-MAP-Kinase-Signalweg und Seneszenz

HBP1 und die p38-MAP-Kinase werden als Partner der Zellzyklus-Kontrolle bezeichnet (159). Die p38-MAP-Kinase ist eine Protein-Kinase, die durch zellulären Stress aktiviert wird. Zelluläre Differenzierungsvorgänge, umweltbedingter Stress oder inflammatorische Zytokine können als Stressoren wirken. Die biologische Funktion des MAP-Kinase-Weges ist die Regulation einer adäquaten Stressantwort (34;77). Im Zusammenhang mit HBP1 ist die Zellzyklus-regulierende Wirkung der p38-MAP-Kinase von Bedeutung. Unter anderem reguliert die p38-Kinase den Übergang der G1-Phase in die Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus durch Phosphorylierung regulativer Proteine (5;146). Effektorproteine der p38-MAP-Kinase sind Cyclin D1 und $p21^{CIP/waf1}$. Cyclin D1 fördert die Zellzyklus-Progression. Eine Phosphorylierung des Proteins Cyclin D1 bewirkt eine Destabilisierung der Cyclin D1-Struktur und reduziert dadurch die Cyclin D1-Wirkung. Die Phosphorylierung des Zellzyklus-Inhibitors $p21^{CIP/waf1}$ dagegen bewirkt eine Stabilisierung der Proteinstruktur und hemmt dadurch die Zellzyklus-Progression. Resultierend hemmt eine Stimulation der p38-MAP-Kinase die G1-Progression und kann zu G1-Arrest führen (156;159). HBP1 ist ebenfalls in den p38-MAP-Kinase-Signalweg integriert und wird durch die p38-Kinase phosphoryliert. Die Phosphorylierung führt – ähnlich wie bei $p21^{CIP/waf1}$ – zu einer verlängerten Halbwertszeit und Stabilisierung der Struktur des HBP1-Proteins. Wie für $p21^{CIP/waf1}$ bedingt die Proteinstabilisierung erhöhte HBP1-Spiegel mit inhibitorischer Wirkung auf die G1-Progression (156), siehe Abbildung 4.

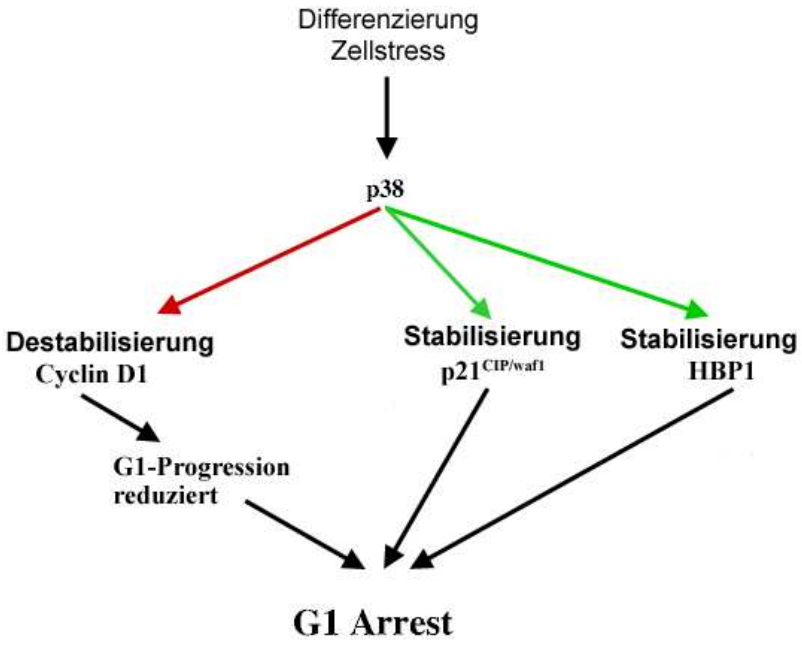


Abbildung 4:
Aktivierung der p38-MAP-Kinase führt zu G1-Arrest.

Der G1-Arrest wird über die Zellzyklus-Inhibitoren $p21^{CIP/waf1}$ und HBP1 erreicht, bedingt durch eine Stabilisierung der jeweiligen Proteinstruktur (grün). Die Destabilisierung der Cyclin D1-Struktur (rot) bewirkt eine reduzierte Zellzyklus-Progression und führt ebenfalls zu G1-Arrest. Modifiziert nach (156).

G1-Arrest kann in den so genannten Seneszenz-Status der Zelle übergehen. Seneszenz beschreibt die Unfähigkeit zur normalen Zellzyklus-Progression. Zellen im Seneszenz-Status verharren irreversibel in der G1-Phase, haben die Fähigkeit zur DNA-Replikation und Proliferation verloren und können nicht mehr auf stimulierende Wachstumsignale reagieren. Dieser irreversible Zellzyklus-Arrest kann durch unterschiedliche Faktoren induziert werden. Zum einen wird Seneszenz physiologisch als eine Art „Alterserscheinung“ bei kultivierten Zellen beobachtet (replicative senescense) und äußert sich durch Verlust der Teilungsfähigkeit. Zum anderen kann Seneszenz induziert werden. Als Reaktion auf Stress können Zellen in einen frühzeitigen Sensenzenz-Status gehen (premature senescence). Als entscheidende Mediatoren für das Erreichen einer frühzeitigen Senszenz gelten unter anderem das Onkogen Ras oder oxidativer Stress. Der p38-MAP-Kinase-Kaskade wird in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle zugeschrieben (27;63). Dieses antiproliferative Programm bietet Schutz vor maligner Entartung und wird von einigen Tumor-Suppressorgenen als Reaktion auf onkogene Stimuli initiiert (37). HBP1 kann über die DNA-bindende HMG-Box-Domäne vorzeitige Seneszenz auslösen und wird als Effektorprotein der Ras-induzierten Seneszenz angesehen. Ras-Stimulation führt zur Aktivierung der p38-MAP-Kinase und induziert HBP1-vermittelt den irreversiblen Zellzyklus-Arrest (162). Für die Seneszenz induzierende HBP1-Wirkung ist die Interaktion mit dem Retinoblastoma Protein RB nötig. Bei fehlender RB-Bindung kann HBP1 den Seneszenz-Status nicht auslösen (162). Im Hinblick auf den Entstehungsprozess maligner Erkrankungen könnte die HBP1-Ras-Interaktion interessant sein. In Melanomzellen mit Ras-Mutation konnte ein Zusammenhang mit HBP1 gezeigt werden (39).

1.2.3.4. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Zellzyklus-Regulation

Durch so genannte reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS) wird oxidativer Stress ausgelöst. Während hohe ROS-Konzentrationen zu Seneszenz oder Apoptose führen können, wirken geringe ROS-Konzentrationen als spezifische Signalmoleküle für Zellwachstum, Proliferation und Zellzyklus-Progression. Cytokine, Wachstumsfaktoren oder das Onkogen Ras können die ROS-Produktion stimulieren. ROS-Moleküle werden durch die aus verschiedenen katalytischen Untereinheiten bestehende NADPH-Oxidase aus Sauerstoffmolekülen generiert (126;149). Die HMG-Box des HBP1-Proteins besitzt inhibitorische Wirkung auf die Promotorregion einer dieser Domänen (p47phox-Untereinheit). Durch diese repressive Funktion auf die NADPH-Oxidase trägt HBP1 zur Regulation des intrazellulären ROS-Status bei. HBP1 vermindert die zelluläre ROS-Produktion und bedingt dadurch eine reduzierte Antwort auf Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, PDGF) oder Ras-Stimulation. Die ROS-vermittelte Zellzyklus-Progression wird verlangsamt (17). In Versuchen mit mikrovaskulären Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion zwischen HBP1 und p47phox in der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt (41;135).

1.2.3.5. Wnt-ß-Catenin-Signalkaskasade

HBP1 ist in die Wnt-ß-Catenin-Signaltransduktion involviert (71;104;124). Die Wnt-ß-Catenin-Signalkaskade ist in Prozesse der Embryonalentwicklung integriert und regulierend an der Proliferation selbsterneuernder Gewebe beteiligt. Über den Transkriptionsfaktor ß-Catenin wird die Expression der Zielgene aktiviert (31;60). Eine Dysregulation des Wnt-ß-Catenin-Signalweges mit erhöhten ß-Catenin-Spiegeln und konsekutiv übermäßige Aktivierung der Zielgene (Cyclin D1, c-Myc) ist mit verschiedenen Tumorentitäten (Leukämien, Kolonkarzinom, Hepatozelluläres Karzinom, Melanom) assoziiert (31;107). In Bezug auf die maligne Hämatopoese ist die Wnt-ß-Catenin-Regulation noch nicht ausreichend geklärt. Jedoch wird ein Zusammenhang zwischen Wnt-ß-Catenin-Fehlregulationen und Pathogenese der AML sowie bei AML-Patienten eine Korrelation zwischen vermehrter Wnt-ß-Catenin-Aktivität und schlechter Prognose gesehen (136;140;157;161).

Auf verschiedenen Ebenen hemmt HBP1 den Wnt-ß-Catenin-Signalweg. HBP1 unterdrückt die Aktivierung der Reaktionskaskade durch inhibitorische Wirkung auf den Wnt-Promotor, hemmt Proteine der nachgeschalteten Signalkaskade und blockiert die Aktivierung von ß-Catenin und den Zielgenen (Cyclin D1, c-Myc) (124).

1.2.4. HBP1 in Hämatopoese und Leukämogenese

1.2.4.1 Physiologische Hämatopoese

Zu HBP1 und seiner Funktion in der physiologischen Hämatopoese ist nicht viel bekannt. HBP1 bindet und aktiviert den Promotor der Myeloperoxidase (MPO). Die Myeloperoxidase katalysiert in reifen Granulozyten die Oxidation von phagozytiertem Material. Während in der normalen Hämatopoese die Aktivität der Myeloperoxidase physiologischerweise erst mit dem Promyelozytenstatus (unreife Vorläuferzellen der Granulozyten) und Beginn der terminalen Differenzierung beginnt, exprimieren leukämische Zellen die MPO bereits im Blastenstatus (9;55;73). Daher besteht die Vermutung, dass HBP1 in die Regulierung der gewebespezifischen Genexpression während der myeloischen Differenzierung einbezogen sein könnte (84). Zum aktuellen Zeitpunkt ist jedoch nicht bekannt wie der Transkriptionsfaktor HBP1 in die normale Hämatopoese integriert ist (158).

1.2.4.2. Maligne Hämatopoese (Leukämogenese)

In verschiedenen Zelllinien[3] (KG-1a, HL60, K-562, akute T-Zell-Leukämie, akute B-Zell-Leukämie) wurde eine unterschiedliche HBP1-Expression festgestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der lymphatischen oder myeloischen Reihe nachgewiesen werden, jedoch variierte die HBP1-Expression v.a. zwischen den verschiedenen Zelllinien myeloischer Herkunft. Diese Beobachtungen bestätigen den Verdacht, HBP1 könnte eine entscheidende Rolle in der Regulation der myeloischen Differenzierung spielen und lässt eine Variation der HBP1-Expression in verschiedenen myeloischen Entwicklungsstadien vermuten (84).

Weitere Erkenntnisse zu HBP1 in myeloischen Zellen wurden durch Zellkulturversuche mit HBP1-überexprimierenden K562-Zellen gewonnen. K562-Zellen sind humane Zellen einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) mit erythroleukämischem Phänotyp (38;158). HBP1-Überexpression hemmte die Proliferationsfähigkeit der K562-Zellen und führte durch Inhibition der G1-Phase-Progression zu Zellzyklus-Arrest. Interessanterweise führte die vermehrte HBP1-Expression zur Ausdifferenzierung der leukämischen K562-Zellen in Richtung der erythroiden und megakaryozytären Linie. Demnach ist HBP1 an der Kontrolle der myeloischen Differenzierung sowie Ausdifferenzierung leukämischer Zellen beteiligt. Genaueres zur Bedeutung von HBP1 in der Leukämogenese ist derzeit nicht bekannt (158).

[3] Zur Charakterisierung der einzelnen Zelllinien siehe *2.1.1. Ausgangsmaterial*

1.2.5. Zusammenfassende Übersicht bekannter HBP1-Interaktionen

HBP1-Interaktion		Effekt	Referenz
N-Myc	Inhibition des N-Myc-Promotors	Regulation zellulärer Differenzierung und Proliferation	(144)
Retinoblastoma-Proteine	HBP1 als Zielgen der Retinoblastoma-Proteine RB und p130	Regulation zellulärer Differenzierung, Zellzyklus-Inhibition	(82;133;134;144)
Histone $H1^0$	Aktivierender Transkriptionsfaktor für die Histone $H1^0$-Expression	Regulation zellulärer Differenzierung	(81)
p38-MAP-Kinase	HBP1 als Zielgen der p38-MAP-Kinase (Phosphorylierung)	Zellzyklus-Arrest	(156)
Ras	HBP1 als Ras-Effektor	Effektor Ras-induzierter Seneszenz	(162)
p47phox	Inhibition der p47phox-Untereinheit der NADPH-Oxidase	Reduktion der ROS-Produktion	(17)
Wnt-ß-Catenin-Kaskade	1. Inhibition des Wnt-Promotors 2. Inhibition von ß-Catenin 3. Inhibition von cMyc, Cyclin D1	Regulation zellulärer Differenzierung und Proliferation	(124)
Myeloperoxidase (MPO)	Aktivierung des Promotors der MPO	Aktivierung der MPO-Expression	(84)
LCR	Interaktion mit LCRs (Locus Control Regions)	Verhinderung umlagerungsbedingter Geninaktivierung	(132;163)
Sin3	Interaktion mit Sin3	Co-Regulation DNA-bindender Transkriptionsfaktoren	(141)

Tabelle 1: Zusammenfassung bekannter HBP1-Interaktionen

1.3. Hämatopoetische Progenitorzellen

1.3.1. Stamm- und Vorläuferzellen der Hämatopoese

Periphere Blutzellen entwickeln sich aus im Knochenmark vorkommenden hämatopoetischen Stammzellen. Diese HSCs (hematopoietic stem cells) bilden ein Reservoir aus pluripotenten Stammzellen. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können in alle bekannten Blutzelllinien differenzieren (myeloisch, erythrozytär, megakaryozytär, monozytär und lymphozytär). Mit zunehmender Differenzierung verlieren die Zellen ihre Pluripotenz sowie die Fähigkeit der Selbsterneuerung. Aus den Stammzellen entwickeln sich Zellen, die in ihrer Differenzierung zunehmend auf bestimmte hämatopoetische Zelllinien determiniert sind (2;67;121).

Es entstehen linienspezifische Vorläuferzellen (Vorläuferzellen = Progenitorzellen), die durch spezifische Oberflächenantigene, spezielle Membranbestandteile oder linientypische Zelleigenschaften unterschieden werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit war im Hinblick auf die akute myeloische Leukämie die granulozytäre Entwicklung der myeloischen Reihe interessant.

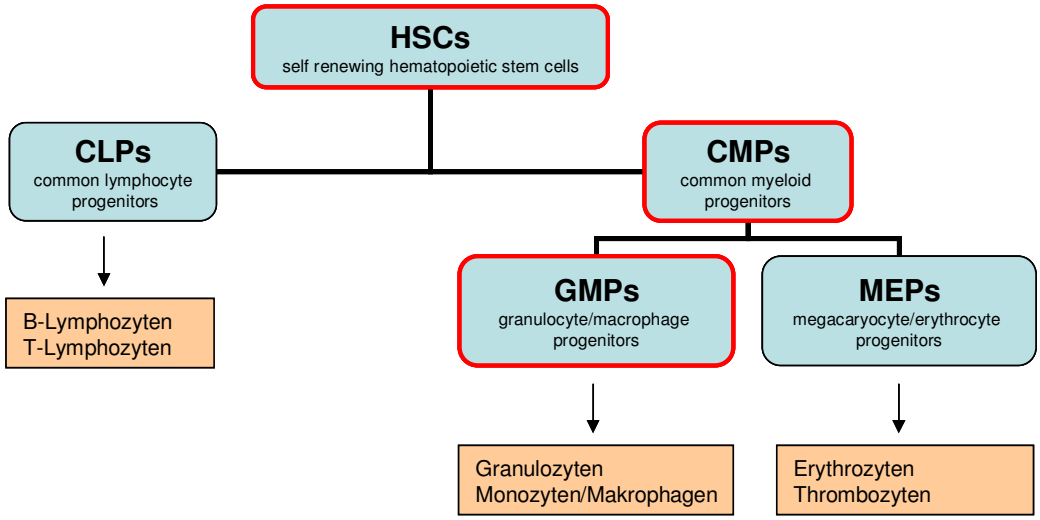


Abbildung 5: Stammbaum der Hämatopoese
Aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) entstehen differenzierte Vorläuferzellen der lymphatischen (CLPs) und myeloischen (CMPs) Reihe. CMPs können zu GMPs und MEPs differenzieren. Aus den GMPs entstehen Granulozyten und Makrophagen, aus den MEPs Thrombozyten und Erythrozyten. Aus den CLPs werden Lymphozyten. Für diese Arbeit waren HSCs, CMPs und GMPs interessant.Grafik erstellt nach (2;67;121).

Abbildung 5 zeigt ein vereinfachtes Schema der hämatopoetischen Differenzierung. Aus den HSCs entstehen die CMPs (common myeloid progenitors) und CLPs (common lymphocyte progenitors). Die CMPs bilden eine Population myeloischer Vorläuferzellen, aus denen sowohl die GMPs (granulocyte/macrophage progenitors) als auch MEPs (megakaryocyte/erythrocyte progenitors) entstehen können. Die CLPs differenzieren entsprechend der lymphatischen Reihe. Die Progenitorzellen der Granulozyten und Monozyten/Makrophagen (GMPs) als auch Vorläuferzellen der Erythrozyten und Megakaryozyten (MEPs) werden als determinierte Stammzellen bezeichnet. Die spezialisierten GMPs können in Granulozyten und Monozyten/Makrophagen ausdifferenzieren, die MEPs entsprechend in Erythrozyten und Megakaryozyten (2;67;121).

1.3.2. Antigenexpression hämatopoetischer Progenitorzellen

Die verschiedenen Subfraktionen hämatopoetischer Vorläuferzellen sind durch unterschiedliche Antigenexpression charakterisiert. Anhand dieser Antigenexpression können die hämatopoetischen Zellen unterschieden und - wie in *2.9. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung* beschrieben - sortiert werden. Hämatopoetische Progenitorzellen exprimieren den Oberflächenmarker CD34 (CD = cluster of differentiation). Anhand dieser CD34-Expression können Vorläuferzellen und reife Blutzellen voneinander unterschieden werden. Das Antigenprofil hämatopoetischer Zellen verändert sich mit zunehmender Differenzierung. Um die frühen Progenitorzellen von differenzierten, reifen Vorläuferzellen unterscheiden zu können, dienen „Lineage-Marker“ (Lin), eine Kombination aus zellspezifischen Differenzierungs-Antigenen. Diese Differenzierungsantigene werden von weiter differenzierten Vorläuferzellen als

GMPs, MEPs und CLPs sowie ausgereiften Blutzellen, nicht jedoch von frühen hämatopoetischen Progenitor- oder Stammzellen exprimiert. Durch eine Lineage-Negativ-Selektion können frühe hämatopoetische Progenitorzellen isoliert werden (58;64;90). Die Abbildung 6 zeigt die Veränderung der Antigenexpression hämatopoetischer Progenitorzellen im Laufe ihrer Differenzierung.

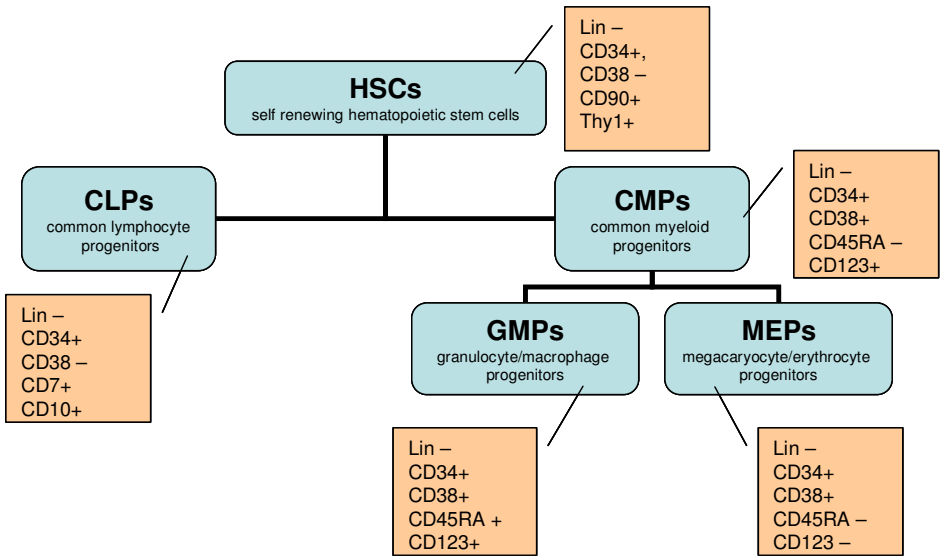


Abbildung 6: Hämatopoetische Progenitorzellen: Populationsspezifische Antigenexpression
Mit fortschreitender Differenzierung exprimieren hämatopoetische Zellen spezifische Antigene, CDs (=Cluster of Differentiation). Grafik erstellt nach (58;64;90).

Die frühen pluripotenten HSCs mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung sind charakterisiert als Lin- (Lineage negativ), CD34+ und CD38-. Mit zunehmender Differenzierung kommt es zur Ausprägung weiterer Oberflächenantigene. CD34 und CD38 doppelt positive Zellen haben das Potential zur Selbsterneuerung verloren und können sich nur noch in der myeloischen Reihe entwickeln, eine lymphatische Differenzierung ist für diese Zellen nicht mehr möglich. Myeloische Progenitorzellen (CMPs) sowie die entstehenden Vorläuferzellen der Granulozyten/Makrophagen (GMPs) und Megakaryozyten/Erythrozyten (MEPs) sind Lin-, CD34+ und CD38+. Zur weiteren Unterscheidung dienen die Expression von IL-3Rα (= CD123) und CD45RA. Die Zellpopulationen der CMPs, GMPs und MEPs lassen sich durch die unterschiedliche Expression von CD123 und CD45RA differenzieren. CMPs sind CD123+ und CD45RA-. Die GMPs exprimieren CD123 und CD45RA (CD123+, CD45RA+), die MEPs weder CD123 noch CD45RA (CD123-, CD45RA-), siehe Abbildung 6 (58;64;90).
Durch diese unterschiedliche Antigenexpression ergeben sich für die einzelnen Progenitorpopulationen charakteristische Expressionsmuster. Die Muster werden für die Zellsortierung genutzt, es wird eine an der Antigenexpression orientierte Sortierstrategie festgelegt, siehe *2.9.3. Sortierstrategie*.

1.4. Ziele und bearbeitete Fragestellung

Dieses Dissertationsprojekt untersucht die Rolle des Repressorproteins HBP1 in der myeloischen Differenzierung. Durch ein shRNA-Screening war HBP1 als geeigneter Kandidat aufgefallen, als bisher unbekanntes Protein an Vitamin-A-vermittelten Differenzierbarkeit beteiligt zu sein. Bekannte HBP1-Charakteristika sowie die Lokalisation im menschlichen Genom legen nahe, dass HBP1 ein geeigneter Regulator ist, dessen Funktionsausfall in der Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie eine Rolle spielen könnte. Die generelle Hypothese dieser Arbeit ist, dass HBP1 eine zentrale Rolle in der myeloischen Differenzierung sowie der Leukämogenese einnimmt. Es wird folgenden Postulaten nachgegangen:

1. In Zelllinien variiert die HBP1-Expression in Abhängigkeit von der leukämischen Entität.
2. Es besteht eine Korrelation zwischen HBP1-Expression und den verschiedenen Phasen des Zellzyklus
3. Eine Reduktion der HBP1-Expression hat funktionelle Auswirkungen auf die Wnt-ß-Catenin-Signalkaskade und spielt eine entscheidende Rolle in der Leukämogenese.
4. Die Expression des HMG-Box-Proteins HBP1 fällt in gesunden humanen Knochenmarkzellen in den hämatopoetischen Progenitorpopulationen der HSCs, CMPs und GMPs unterschiedlich aus.
5. Die HBP1-Expression korreliert bei AML-Patienten mit bestimmten Karyotypen und lässt einen Zusammenhang mit Gesamt- und rezidivfreiem Überleben erkennen.

2. Methoden

Anmerkung:
Auf Grund der umfassenden Methodik dieser Arbeit wurde an gegebener Stelle darauf verzichtet, einzelne Versuchsschritte in fortlaufendem Text zu verfassen, sondern stichpunktartig gehaltene Laborprotokolle aufgeführt und als solche gekennzeichnet.

2.1. Zellkultur

2.1.1. Ausgangsmaterial

Die Zellkulturversuche zu HBP1 (Zellzykluskorrelation, siehe *2.1.3. Versuchs-Etablierung zur Analyse der* Zellzykluskorrelation und siRNA-Transfektion, siehe *2.6. Transfektion mit HBP1-siRNA*) wurden in den humanen Zelllinien U937 (histiozytäres Lymphom) bzw. K562-Zellen (chronische myeloische Leukämie) durchgeführt. Die Zelllinien wurden in Kulturmedium bestehend aus 90% RPMI 1640, 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) gehalten. Verschiedene humane Zelllinien wurden auf HBP1-RNA-Expression untersucht (siehe Tabelle 2). Ausgangmaterial für das spätere PCR-Screening auf cDNA-Ebene waren RNA-Bestände der Arbeitsgruppe, sowie THP1 und U937-Zellen aus eigener Zellkultur (90% RPMI, 10%FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) (38).

Zelllinie	Eigenschaften	Genetische Aberrationen
HL60	Akute myeloische Leukämie: AML FAB M2	Komplexer Karyotyp, myc-Amplifikation
Jurkat	T-Zell-Leukämie (ALL): Akute Lymphoblastenleukämie	
K-562	Chronische myeloische Leukämie - Blastenkrise	BCR-ABL-Fusion
Karpas-422	B-Zell-Lymphom: B-NHL	
Kasumi-1	Akute myeloische Leukämie: AML FAB M2	t(8;21) AML1-ETO
KG-1a	Akute myeloische Leukämie	Komplexer Karyotyp, Monosomie 7
Lama84	Chronische myeloische Leukämie - Blastenkrise	BCR-ABL-Fusion
ME-1	Akute myeloische Leukämie: AML FAB M4eo	Inv(16) CBCB-MYH11
MV4-11	Akute monozytäre Leukämie: AML FAB M5	t(4;11) MLL-AF4 FLT3-Mutation
NB-4	Akute Promyelozytenleukämie (APL): AML FAB M3	t(15;17) PML-RARA
OCI-AML3	Akute myeloische Leukämie: AML FAB M4	NPM-Mutation
SSK41	Niedrig malignes B-Zell-Lymphom	
SU-DHL-4	B-Zell-Lymphom: B-NHL	
THP-1	Akute monozytäre Leukämie	t(9;11) MLL-AF9
U937	Histiozytäres Lymphom	

Tabelle 2: Zelllinien und deren Charakterisierung.
Informationen wurden der Online-Datenbank der DSMZ entnommen („Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“) (38).

2.1.2. Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Von einer Zellsuspension wurden 10µl 1:1 mit 10µl Tryptanblau-Lösung gemischt. Tryptanblau färbt abgestorbene Zellen an. 10µl dieser gemischten Zellsuspension wurden zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Es wurden die nicht-tryptophan-gefärbten Zellen (vitale Zellen) in den 16 Feldern aller vier Eckquadranten gezählt.

(Zellzahl / 2) x 10^4 = Zellen / ml Zellsuspension

2.1.3. Versuchs-Etablierung zur Analyse der Zellzykluskorrelation

Um der Frage nachzugehen, ob eine Korrelation zwischen HBP1-Expression und den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus besteht, wurde das folgende Versuchsmodell etabliert. Durch Serumentzug sind die optimalen Wachstumsbedingungen für U937-Zellen nicht mehr gegeben. Das resultierende Verhalten der Zellen sollte ein Wachstumsarrest sein. Die U937-Zellen wurden daher im ersten Versuch über 48 und im zweiten Versuch über 72 Stunden in FCS-freiem RPMI-Medium gehalten. Nach Ablauf des serumfreien Intervalls wurde FCS zugegeben, um optimale Wachstumsbedingungen wieder herzustellen. Nach der Zugabe des FCS-haltigen Mediums wurde zur Stunde 0, 4, 8, 12, 24 und 48 jeweils die HBP1-Expression durch quantitative PCR bestimmt. Zum selben Zeitpunkt wurde mit Durchflusszytometrie untersucht, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zellen befanden. Gleichzeitig wurde die Zellzahl jeweils in Dreifachbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Kammer ermittelt, um die Vermehrung der Zellen zu quantifizieren.

Laborprotokoll:

Ausgangsmaterial: U937-Zellen in Kultur (RPMI + 10% FCS + 1%P/S)

- Zellen kultivieren (auf ca. 3-5 x 10^5 Zellen/ml in 60ml Medium)
- Zellen zentrifugieren (5 Min., 300 rpm)
- Zellpellet in 60ml serumfreiem Medium (ohne FCS-Zusätze) resuspendieren
- Lagerung im Brutschrank (37°C, 5%CO_2) für 48 bzw. 72 Stunden

Nach 48 bzw. 72 Stunden:

1. Für 0-Stunden-Wert:
- 5ml der serumfreien Zellsuspension entnehmen und in 15ml Falcon geben, zentrifugieren (300 rpm, 5 Min.): Pellet für RNA-Extraktion
- 5ml der serumfreien Zellsuspension entnehmen und in 15ml Falcon geben, zentrifugieren (300 rpm, 5 Min.): Pellet für Zyklusanalyse
2. Vorbereiten der Aliquots für die weitere Probenentnahme
- Restliche 50ml Zellsuspension zentrifugieren (5 Min., 300 rpm)
- Pellet in 50ml serumhaltigem Medium (RPMI +10% FCS + 1% P/S) ausplatieren und à 10ml auf 5 mittlere Kulturflaschen aliquotieren. Lagerung im Brutschrank (37°C,5%CO_2)
- Zu definierten Zeitpunkten (nach 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden) eine Kulturflasche mit 10ml Zellsuspension aus dem Brutschrank entnehmen. 5ml für RNA-Extraktion und 5ml für Zellzyklusanalyse entnehmen, in 15ml-Falcons überführen und pelletieren (5 Min., 300 rpm)

Bearbeitung der Pellets:

- Pellet für RNA-Extraktion in 600µl Mercapto-RLT-Puffer resuspendieren und bei -80°C bis zur RNA-Extraktion lagern (auf 1ml RLT Puffer 10µl ß-Mercaptoethanol).
- Pellet für Zellzyklus-Analyse in 70% Ethanol fixieren:
    - Zellpellet aus 5ml Zellsuspension in 500µl PBS resuspendieren
    - 1ml eiskaltes Ethanol zugeben (70%)
    - Ethanol-Zell-Gemisch über Nacht bei -20°C inkubieren

2.2. RNA-Extraktion

RNA sind funktionelle Moleküle, die zwischen kodierenden Genabschnitten der DNA und Proteinsynthese vermitteln. Für funktionelle Genexpressionsanalysen wird die RNA-Menge bestimmt (110). Die RNA-Extraktion der Zellkulturversuche wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt (109).

Laborprotokoll:

- Mercaptoethanol-RLT-Puffer ansetzen: 10µl ß-Mercaptoethanol auf 1ml RLT-Puffer
- Zellpellets erstellen: Zellsuspension zentrifugieren (5 Min.,300 rpm):
  bis $1x10^6$ Zellen: Pellet in 350µl Mercaptoethanol-RLT-Puffer resuspendieren
  ab $5x10^6$ Zellen: Pellet in 600µl Mercaptoethanol-RLT-Puffer resuspendieren
- 350 bzw. 600µl lysierte Zellen auf den Qiagen-Shredder geben (lila)
  Zentrifugieren (max. Geschwindigkeit, 2 Min.); Shredder verwerfen
- 350 bzw. 600µl 70% Ethanol zur durch den Shredder gelaufenen Suspension im Auffangbehälter geben und resuspendieren
- resuspendiertes Lysat aus den Auffangbehältern auf Qiagen-Säule (rosa) pipettieren und zentrifugieren (≥ 10 000 rpm, 15 Sek.)
  Da maximal 700µl auf die Säule pipettiert werden können, durchgelaufenes Lysat nach erstem Zentrifugationsschritt verwerfen und Säule erneut laden, erneut zentrifugieren.
- Nach Zentrifugieren Auffangbehälter mit durchgelaufenem Lysat verwerfen,
  Säulen auf neuen Auffangbehälter setzen
- 350µl RW1-Puffer auf die Säule geben, zentrifugieren (≥ 10 000 rpm, 15 Sek.)
- Auffangbehälter verwerfen und neuen verwenden
- DNA-Verdau vorbereiten:
    - 105µl Buffer RDD und 15µl DNAse1-Stock mischen
    - 120µl Buffer-DNAse-Mix auf die Säule pipettieren
    - 15 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubieren
- 525µl RW1-Puffer zum Stoppen der Verdau-Reaktion auf die Säule pipettieren.
  Zentrifugieren (≥ 10 000 rpm, 15 Sek.), Auffangbehälter ausleeren
- 500µl RPE-Puffer auf die Säule geben,
  zentrifugieren (max. Geschwindigkeit, 3 Min.)
- Säulen in beschriftetes 1,5ml Reaktionsgefäß stellen

- RNA eluieren: 30 bis 50µl RNAse-freies-H_2O auf die Säule geben,
  kurz anzentrifugieren (≥ 10 000 rpm, 15 Sek.). Durchgelaufenes RNA-$H_2$0-Gemisch aus dem Reaktionsgefäß pipettieren und erneut auf Säule geben.
  Zentrifugieren (≥ 10 000 rpm, 1 Min.)
  RNA sofort auf Eis geben, Lagerung bei -80°C

Die RNA-Konzentration wurde am Gene Quant II RNA/DNA Calculator von Pharmica Biotech photometrisch ermittelt. Die RNA Konzentration in µg/µl wurde in 1:20 verdünnten Proben (4µl der RNA zu 76µl RNAse-freies H_2O) durch Messung der Absorption bei 260 nm Wellenlänge bestimmt.

2.3. cDNA-Synthese

cDNA (complementary DNA) ist eine synthetische DNA, die mit Desoxyribonucleosid-Triphosphaten (dNTPs) enzymatisch aus RNA hergestellt wird. Das Umschreiben der RNA in cDNA wird durch eine reverse Transkriptase (RT) katalysiert. Die synthetisierte cDNA kann für PCR-Untersuchungen eingesetzt werden (111).

2.3.1. Zellkulturversuche

In den Zellkulturversuchen (siehe *2.1. Zellkultur*) wurde für die cDNA-Synthese das Omniscript RT-Kit von Qiagen verwendet (111).

Laborprotokoll:

- Reaktionsgemisch (Mastermix) ansetzen, siehe Tabelle 3
- RNA-Menge je Probe für eine Konzentration von 1µg ausrechnen, errechnete Menge in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettieren und mit RNase-freiem Wasser zu 12µl auffüllen
- 8µl des Mastermixes zugeben
- Reaktionsgefäße für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubieren (RT-Reaktion).
- Reaktionsgefäße für 5 Minuten bei 93°C in Heizblock stellen (hitzeinaktivieren der reversen Transkriptase)
- Das Kondensat runterzentrifugieren
- cDNA bei -20°C lagern

Zusammensetzung Mastermix Omniscipt RT-Reaktion Angaben für eine einzelne Probe	
2 µl	10x RT-Puffer
2 µl	dNTP-Mix (5µM)
2 µl	Hexamer-Primer (100 µM)
0,75 µl	RNAse-freies H_2O
0,25 µl	RNAsin - Inhibitor (40 U/µl)
1 µl	Omniscript RT

Tabelle 3: Berechnung des Reaktionsgemisches für die cDNA-Synthese mit Omniscript.

2.3.2. Sortierte Progenitorzellen

Die durchflusszytometrisch sortierten und gesammelten Populationen der humanen HSCs, GMPs und CMPs umfassten sehr geringe Zellzahlen, je nach Population meist in einer Größenordnung zwischen 4000 und 10000 Zellen. Die cDNA-Synthese mittels magnetischer Beads über µMACS-Säulen hat sich als die beste Methode erwiesen, um cDNA aus sortierten Populationen von geringer Zellzahl zu gewinnen (89).

Die cDNA-Synthese über die µMACS-Säulen wurde direkt an die Zellsortierung angeschlossen. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Original-Protokoll des µMACS One-Step cDNA-Kit (92).

Laborprotokoll

1. Vorbereitung:

- Thermo-MACS-Separator von Miltenyi Biotec bereitstellen und MACS-Säulen für cDNA-Synthese einspannen, jeweils 15ml-Falcons unterstellen
- Lysis/Binding-Puffer und Wash-Buffer aus dem RNA-Kit auf Raumtemperatur aufwärmen

2. Präparation der sortierten Zellen:

- 0,5ml-Reaktionsgefäße mit sortierten Zellen vortexen (3-5 Min.), in 1,5ml Reaktionsgefäße überführen und zentrifugieren (1000 rpm, 5 Min.)
- Überstand abkippen und abpipettieren. Meist ist das Pellet nicht sichtbar, sodass die Flüssigkeit vorsichtig am gegenüberliegenden Rand des erwarteten Pellets abgenommen werden muss.
- 1ml Lysis/Bindig-Puffer pro 10^7 Zellen zugeben und für 3-5 Minuten vortexen
- Die gevortexten Zellen in Lysispuffer auf LysatClear Column (in Auffangbehälter) geben: Zentrifugieren (≥ 13.000 g, 3 Min.)
- Nach dem Zentrifugieren die Säule verwerfen. Das Lysat im Auffangbehälter enthält die Zellen und wird für die weitere Synthese verwendet.
- Pro ml Lysat Zugabe von 50µl Oligo (dT) MicroBeads. Für die Markierung mit diesen magnetischen Beads ist keine weitere Inkubationszeit notwendig.

3. cDNA-Synthese über MACS-Säulen:

- Säulen vorbereiten: 100µl Lysis/Binding-Puffer durchlaufen lassen
- Wenn der Puffer zum Spülen der Säulen durchgelaufen ist, kann die mit Beads versehene Zellsuspension auf die Säulen gegeben werden.
- Puffer-Zugabe: Jeweils vor erneutem Befüllen der Säule warten, bis der Puffer des vorherigen Schrittes komplett durch die Säule gelaufen ist:
  2 x 200µl Lysis/Binding-Buffer durchlaufen lassen und anschließend 4 x 100µl Wash-Buffer auf die Säule geben
- Waschschritte mit Equilibration/Wash-Buffer: 2 x 100µl auf die Säule geben
- Den Enzym-Mix in 20µl Resuspension-Buffer auflösen und als resuspendierten Mix auf die Säule geben und 1µl Sealing-Solution dazu geben.
- Den Thermo-MACS auf 42°C einstellen und für 1 Stunde inkubieren
- 2 x mit 100µl Equilibration/Wash-Buffer waschen
- 20µl cDNA-Release-Solution zugeben, erneut für 10 Minuten bei 42°C inkubieren
- Die untergestellten Falcons verwerfen und 1,5ml Reaktionsgefäße unterstellen: cDNA mit 50µl cDNA-Elution-Buffer auswaschen. Um die cDNA-Ausbeute zu erhöhen erneut 50µl cDNA-Elution Buffer auf die Säule geben.
- Die cDNA-Proben der sortierten Progenitorzellen bei -20°C lagern.

2.3.3. Erstellen der Kalibrator-cDNA

Für die Versuche mit Patientenproben, sowie alle funktionellen Zellkulturversuche wurde die gleiche NB4-cDNA-Probe (NB4-Pool) als Kalibrator verwendet. Für diesen NB4-Pool wurde zur cDNA-Synthese das Quantitec Reverse Transcription Kit verwendet. Die eingesetzte Quantiscript-Transcriptase erleichtert durch verkürzte Reaktionszeiten das Erstellen großer cDNA-Mengen, gleichzeitig wird eventuell in den Proben enthaltene genomische DNA verdaut (113). Für die Kalibrator-Herstellung wurden 25 Ansätze à 12µl cDNA erstellt und nach abgeschlossener Synthese zu einer Pool-cDNA-Probe zusammengegeben.

2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.4.1. Prinzip der konventionellen PCR

Die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beschreibt eine Serie hintereinander geschalteter Zyklen, in denen ein spezifisches DNA-Fragment in enzymatischer Reaktion exponentiell vermehrt wird. Es werden drei unterschiedliche Phasen unterschieden, die sich zyklisch wiederholen.

Jeder Zyklus beginnt mit einem Denaturierungsschritt. Im PCR-Cycler wird die Probe auf 95°C hochgeheizt, dabei wird die doppelsträngige cDNA in ihre Einzelstränge (Sense- und Antisense-Strang) zerlegt. Die verwendete DNA-Taq-Polymerase ist thermostabil und unterliegt daher nicht der Denaturierung.

Der zweite Schritt dient der Anlagerung der zugegebenen Oligonukleotid-Primer. Sie bestehen aus einer Sequenz von Desoxyribonucleosid-Triphosphaten (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Es wird jeweils ein Primer-Paar verwendet. Ein Primer ist jeweils zu einem Abschnitt des Sense-Strangs komplementär, der andere zu einer Sequenz des Antisense-Strangs (Forward- und Backward-Primer). Die Temperatur für die Anlagerung (Annealing-Temperatur) ist spezifisch für die jeweiligen Primer. Für die durchgeführte ß-Actin-PCR wurden nach etablierter Standardmethode 55°C verwendet.

Im letzten Schritt werden die angelagerten Primer durch die zugegebene Taq-Polymerase entlang der DNA-Sequenz bei 72°C durch weitere Desoxynukleosid-Triphosphate verlängert. Das in jedem Zyklus entstehende Produkt dient als Matrize für einen erneuten Anlagerungsschritt. Es resultiert eine exponentielle Vermehrung des PCR-Produkts. Wichtig bei der Verlängerung ist, dass die entstehende Sequenz neben der Zielgensequenz die Sequenz des jeweils gegenläufigen Primers einschließt. Die drei PCR-Phasen werden in definierter Zyklenzahl wiederholt. Dadurch wird von einem Genabschnitt eine große Anzahl identischer Kopien produziert, das PCR-Produkt umfasst schließlich die beiden Primer-Sequenzen und die eingeschlossene Zielgen-DNA in definierter Länge (6;8).

2.4.2. Laborprotokoll ß-Actin-PCR

Als Kontrolle der cDNA-Synthese wurde eine ß-Actin-PCR durchgeführt. ß-Actin ist ein Gen, das unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konstant exprimiert ist. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches (Mastermix) für die PCR wurde nach folgendem Schema berechnet, siehe Tabelle 4. Neben den zu untersuchenden Proben, wurden eine

Positiv-Kontroll-cDNA und als Negativkontrolle eine sterile Wasserprobe (H_2O) mitgeführt. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt (6).

Laborprotokoll - nach (6):

- Erstellen des Reaktionsgemisches (Mastermixes)
- Verteilen von je 24µl des Mastermixes auf die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße
- Zugeben von 1µl cDNA der zu amplifizierenden Probe
- Verschlossene Reaktionsgefäße in den Cycler stellen
- Annealing: 55°C, 21 Zyklen

Mastermix der ß-Actin-PCR Angaben für eine einzelne Probe	
16,875 µl	H_2O
1,25 µl	ß-Actin Primer forw. (10µM) 5′CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3′
1,25 µl	ß-Actin Primer backw.(10µM) 5′AATCTCATCTTGTTTTCTGCG-3′
2,0 µl	dNTPs (10µM)
2,5 µl	10x PCR-Puffer
0,1 µl	AmpliTaq-Polymerase

Tabelle 4: Berechnung des Reaktionsgemisches einer ß-Actin-PCR. Die Angaben werden mit der Anzahl der Proben multipliziert.

2.4.3. Auswertung durch Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde 1,5%-Agarose-Gel verwendet. 100ml 1xTAE-Puffer wurden mit der abgewogenen Menge Agarose (1,5 g) vermengt und aufgekocht. In der Gelkammer wurden 10µl Ethidium-Bromide-Solution verteilt, das flüssige Agarose-Gel darüber gegossen und beides vermischt. Nach Einstecken der Elektrophorese-Kämme in das flüssige Ethidiumbromid-Gel musste abgewartet werden bis das Gel erkaltet und fest geworden war. Anschließend wurde die Gelkammer in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kämme herausgezogen. Zu 4µl des PCR-Produkts wurden 10µl Gelladepuffer zugegeben und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde nach Laborstandardbedingungen bei 100-150mV und ~150mA in einer horizontalen Elektrophoresekammer durchgeführt. Die anschließende Fotodokumentation erfolgte unter UV-Licht, siehe Abbildung 7 (153).

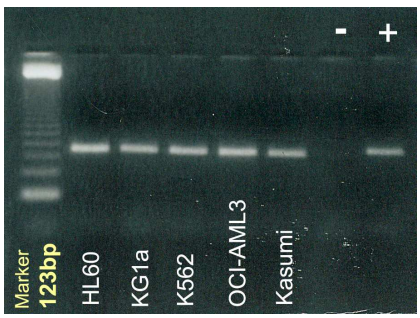


Abbildung 7. Gel-Fotodokumentation nach Elektrophorese.
Nach der Marker-cDNA (123 Basenpaare) wurde das PCR-Produkt der einzelnen Proben aufgetragen. Danach Negativ- und Positivkontrolle.

2.5. Quantitative PCR (qPCR)

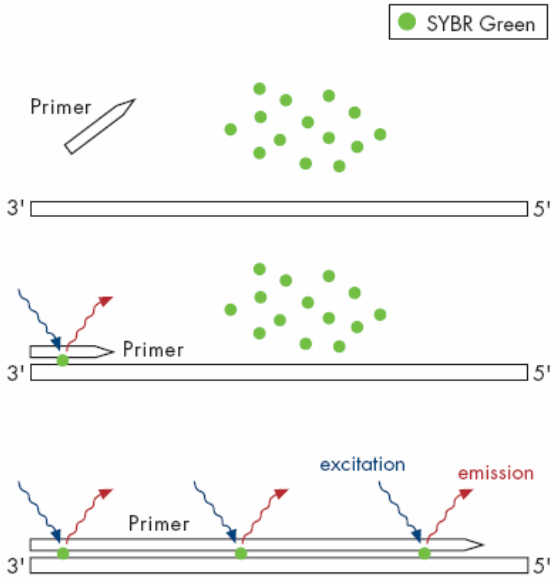
2.5.1. Prinzip der Detektion

Die quantitative PCR ist eine Methode, bei der ein spezifisches Zielgen mit Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und gleichzeitig eine quantitative Aussage über die Menge des entstehenden PCR-Produkts generiert wird. Während der Phase der exponentiellen Vermehrung des Genprodukts werden die durchlaufenen PCR-Zyklen gemessen. Für den quantitativen Vergleich ist der PCR-Zyklus entscheidend, nach dem das entstehende PCR-Produkt zum ersten Mal detektiert werden kann.

Um das PCR-Produkt registieren und detektieren zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen I verwendet. SybrGreen I bindet unspezifisch an Doppelstrang-DNA, in diesem gebundenen Zustand zeigt der Farbstoff stark fluoreszierende Eigenschaften in definiertem Wellenlängenbereich (Anregungswellenlänge 494nm, emittierte Fluoreszenzwellenlänge von 521 nm), siehe Abbildung 8.

Die Signalintensität steigt mit zunehmender Zyklenzahl bedingt durch die Zunahme an amplifizierter DNA. Die gebundene Menge SybrGreen und somit die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge des PCR-Produkts (114).

Abbildung 8:
Funktionsprinzip SYBR-Green I.
Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I interkaliert mit doppelsträngiger DNA. Nach Anregung (Exzitation) im Wellenlängenbereich von 494nm liefert SYBR-Green I im gebundenen Zustand ein Fluoreszenzsignal im Bereich von 521nm (Emission), nach (114).



Die unspezifische Bindung des SYBR-Green I an doppelsträngige DNA führt dazu, dass auch Primer-Dimere einen Fluoreszenzanstieg verursachen. Mittels Schmelzkurvenanalyse kann nach Ablauf der PCR zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren oder anderen unspezifischen Nebenprodukten unterschieden werden. In der Schmelzkurvenanalyse wird das PCR-Produkt langsam auf sehr hohe Temperaturen aufgeheizt (95°C). Im Bereich niedriger Temperaturen liegt das PCR-Produkt doppelsträngig vor, die Fluoreszenz ist dementsprechend hoch. Ab einer für das PCR-Produkt spezifischen Temperatur denaturiert die doppelsträngige Struktur, es resultiert eine plötzliche Fluoreszenzabnahme. Diese Fluoreszenzabnahme ist in der graphischen Darstellung (Fluorescence –dF/dT gegen die Temperatur in °C) als Peak zu

erkennen. An diesem Schmelzpunkt liegen 50% der cDNA denaturiert vor. Primer-Dimere haben ihren Schmelzpunkt bei deutlich niedrigeren Temperaturen als spezifische PCR-Produkte, multiple Peaks in der Schmelzkurve sprechen für unspezifische Nebenprodukte (112).

2.5.2. Analyse der PCR-Daten

Für die Analyse der PCR-Daten werden C_T-Werte verwendet. Der Threshold-Cycle (C_T) beschreibt den PCR-Zyklus, bei dem das sich vervielfältigende Genprodukt einen signifikanten Fluoreszenzanstieg erkennen lässt. Dadurch wird der Beginn der exponentiellen Amplifikationsphase der PCR unter optimalen Reaktionsbedingungen markiert, siehe Abbildung 9. Je höher die Menge des zu amplifizierenden PCR-Produkts ist, desto früher wird der Threshold-Cycle (C_T) erreicht. Ein niedriger C_T-Wert bedeutet demnach eine große Menge an vorliegendem PCR-Produkt und entspricht einer hohen Genexpression in der zu untersuchenden Probe. Das Ende der Reaktion ist durch das Erreichen der Plateauphase bedingt. Während dieser Phase ist kein Fluoreszenzanstieg (= Vermehrung des PCR-Produkts) mehr zu verzeichnen, die Reaktionsbedingungen sind nicht mehr optimal, um eine weitere Amplifikation zu ermöglichen (114).

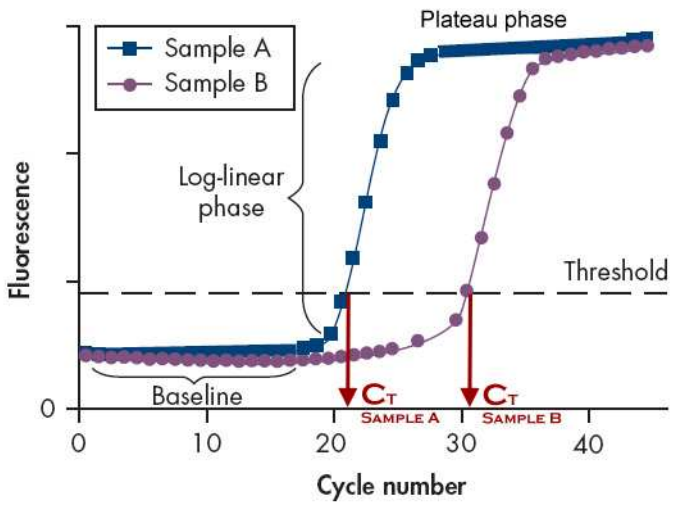


Abbildung 9:
Typischer Plot einer quantitativen PCR (qPCR).
Die Baseline beschreibt die Fluoreszenz zu Beginn der PCR, die noch keinen signifikanten Fluoreszenzanstieg erkennen lässt. Mit Threshold Cycle (C_T) beginnt die Phase der exponentiellen Amplifikation des PCR-Produkts (Linear Log Phase), erkennbar an signifikantem Fluoreszenzanstieg. Die Plateauphase beschreibt das Ende der Reaktion.
(114)

2.5.3. Relative Quantifizierung

Um vergleichbare quantitative Aussagen treffen zu können, werden C_T-Wert-Differenzen berechnet. ΔC_T beschreibt dabei die Differenz zwischen dem C_T-Wert des interessierenden Zielgens und dem C_T-Werts eines gleichzeitig gemessenen Referenzgens. Als Referenzgen werden sogenannte Housekeeping-Gene wie ß-Actin oder GAPDH verwendet, deren konstante Gen-Expression in den zu untersuchenden Zellen bekannt ist.

$$\Delta C_T = C_T\text{-Wert (Zielgen)} - C_T\text{-Wert (Referenzgen)}$$

Für den quantitativen Vergleich wird die Differenz errechnet zwischen dem ermittelten ΔC_T-Wert der Probe und dem ΔC_T-Wert des jeweiligen Kalibrators, der $\Delta\Delta C_T$-Wert. Als Kalibrator dient eine festgelegte Probe, für die die qPCR durch Ermitteln einer Standardkurve etabliert wurde. Auf diesen Kalibrator werden alle gemessenen Werte einer PCR berechnet, vergleichende

Aussagen über unterschiedliche Genexpression können getroffen werden. Die quantitative PCR auf HBP1 wurde in der Arbeitsgruppe auf die Zelllinie NB4 etabliert, entsprechend wurde NB4-cDNA als Kalibrator verwendet.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ der Probe} - \Delta C_T \text{ des Kalibrators}$$

In der Auswertung wird die Genexpression des Kalibrators = 1 gesetzt. Die relative Expression des interessierenden Zielgens wird nach folgender Formel berechnet: Das Expressionslevel des Zielgens ist im Vergleich zum Kalibrator mit rel.HBP1 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ beschrieben. In den folgenden Versuchen wird die relative Genexpression ebenfalls mit rel.HBP1 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ dargestellt (114).

2.5.4. Verwendete qPCR-Primer

Für die qPCR wurden spezifische Primer für quantitative PCR verwendet, siehe Tabelle 5. Wichtige Voraussetzung ist, dass Referenzgen und zu untersuchendes Zielgen die gleichen PCR-Bedingungen benötigen. Die Anlagerungstemperatur (Annealing) der verwendeten Primer muss übereinstimmen. In den einzelnen Versuchen wurden die jeweiligen Primer in einer Konzentration von 10µM eingesetzt.

Primer		**Oligonucleotid-Sequenz**	**Annealing**
Zielgen **HBP1**	5'-HBP1-41	5'AAG AAT GTA CAC ATT AGA AGC AAA GG 3'	58°
	3' HBP1-41	5'CCT GGT TTA ATG TTG TTG TGA GC 3'	58°
Referenz-gen **ß-Actin**	ß-Actin for	5'CAT TGC CGA CAG GAT GCA G 3'	58°
	ß-Actin rev	5'CCG ATC CAC ACG GAG TAC 3'	58°

Tabelle 5: Verwendete Primer für die quantitative PCR auf HBP1

Zur Qualitätskontrolle wurde das Produkt nach quantitativer HBP1-PCR zur Sequenzierung bei der Firma Eurofins MWG Biotech-AG (Ebersberg, München) eingeschickt. Die uns gelieferte Sequenz konnte in der Datenbank PubMed-Blast als HBP1 identifiziert werden (99).
Für die in der Arbeitsgruppe etablierten PCRs auf cMyc und Cyclin D1 wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Primer eingesetzt, als Referenzgen für cMyc wurde GAPDH und für CylinD1 wie für HBP1 ß-Actin verwendet. Für cMyc wurde als Referenz die Zelllinie Raji (humanes Burkitt Lymphom) und für Cyclin D1 die Zelllinie HL60 (AML FAB M2) eingesetzt (38).

Primer		**Oligonucleotid-Sequenz**	**Annealing**
Zielgen **cMyc**	cMyc forw	5' TTT CGG GTA GTG GAA AAC CA 3'	60°
	cMyc backw	5' TTC CTG TTG GTG AAG CTA ACG 3'	60°
Zielgen **Cyclin D1**	Cyclin D1 forw	5' CCG TCC ATG CGG AAG ATC 3'	60°
	Cyclin D1 backw	5' ATG GCC AGC GGG AAG AC 3'	60°
Referenz-gen: **GAPDH**	GAPDH forw	5' CTC CTC CAC CTT TGA CGC TG 3'	60°
	GAPDH backw	5' ACC ACC CTG TTG CTG TAG 3'	60°

Tabelle 6: Verwendete Primer für die quantitative PCR auf cMyc und Cyclin D1

2.5.5. Versuchsschritte der quantitativen PCR

Für die quantitative PCR wurden 96-Well-Platten verwendet. Zu Versuchsbeginn wurde ein Mastermix aus SybrGreen Universal PCR MasterMix, Primern und RNAse-freiem H_2O erstellt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches (Mastermix) wurde nach Tabelle 7 berechnet. Für jede Probe wurden Daten in Dreifachbestimmung erhoben, in der Auswertung Mittelwerte berechnet, nach (108).

Mastermix der quantitativen PCR (qPCR)		
Zusammensetzung	Berechnung für eine Probe	Anzahl der Proben = Benötigte Ansätze
		42 Ansätze
SYBRGreen MM	**12,5** µl	**525** µl
Primer *forward*	**0,75** µl	**31,5** µl
Primer *backward*	**0,75** µl	**31,5** µl
H_2O (RNAse-frei)	**10** µl	**420** µl
	24 µl	**1008** µl

Tabelle 7: Berechnung des Mastermixes für die quantitative PCR. Für eine PCR muss der Enzymmix mit den Primern des Zielgens und im zweiten Ansatz mit den Primern des Referenzgens erstellt werden.

Weitere Versuchsschritte – *Laborprotokoll (108)*:

- Je 24µl des Mastermixes auf die einzelnen Wells der PCR-Platte verteilen
- Nach Verteilung des Mastermixes 1µl cDNA der zu untersuchenden Probe in die vorgesehenen Wells geben, Pipettierschema siehe Abbildung 10
- Negativkontrolle (Non-Template-Controle, NTC): In die entsprechenden Wells ohne weitere Zugaben nur den Mastermix pipettieren
- Wells mit vorgesehenen optischen Kappen verschließen
- Verschlossene 96-Well-Platte 1 Minute bei 300 rpm zentrifugieren und in den Cycler stellen

-

CL qPCR **hBP1** - Zellzyklus-Proben 01 09 07

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NB4 Pool	NB4 Pool	NB4 Pool	U937#1 Std0	U937#1 Std0	U937#1 Std0	U937#1 Std4	U937#1 Std4	U937#1 Std4	U937#1 Std8	U937#1 Std8	U937#1 Std8
	ß-Actin	ß-Actin	ßActin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin
B	U937#1 Std12	U937#1 Std12	U937#1 Std12	U937#1 Std24	U937#1 Std24	U937#1 Std24	U937#1 Std48	U937#1 Std48	U937#1 Std48			
	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin			
C	U937#2 Std0	U937#2 Std0	U937#2 Std0	U937#2 Std4	U937#2 Std4	U937#2 Std4	U937#2 Std8	U937#2 Std8	U937#2 Std8	U937#2 Std12	U937#2 Std12	U937#2 Std12
	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin
D	U937#1 Std24	U937#1 Std24	U937#1 Std24	U937#1 Std48	U937#1 Std48	U937#1 Std48				leer	leer	leer
	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin	ß-Actin				ßActin	ßActin	ßActin
E	NB4 Pool	NB4 Pool	NB4 Pool	U937#1 Std0	U937#1 Std0	U937#1 Std0	U937#1 Std4	U937#1 Std4	U937#1 Std4	U937#1 Std8	U937#1 Std8	U937#1 Std8
	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box
F	U937#1 Std12	U937#1 Std12	U937#1 Std12	U937#1 Std24	U937#1 Std24	U937#1 Std24	U937#1 Std48	U937#1 Std48	U937#1 Std48			
	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box			
G	U937#2 Std0	U937#2 Std0	U937#2 Std0	U937#2 Std4	U937#2 Std4	U937#2 Std4	U937#2 Std8	U937#2 Std8	U937#2 Std8	U937#2 Std12	U937#2 Std12	U937#2 Std12
	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box
H	U937#1 Std24	U937#1 Std24	U937#1 Std24	U937#1 Std48	U937#1 Std48	U937#1 Std48				leer	leer	leer
	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box				hMG-Box	hMG-Box	hMG-Box

Abbildung 10: Beispiel-Pipettierschma für 96-Well-Platte einer quantitativen PCR.
In die Wells der oberen Hälfte der PCR-Platte (blau) wurde jeweils der Mastermix mit den Primern des Referenzgens (ß-Actin) und die zu untersuchenden Proben (NB4-Pool, U937#1 Std0, …) pipettiert. In der unteren Hälfte der Platte (gelb) wurden der Mastermix mit den Primern des Zielgens (HBP1) und die cDNA-Proben in die Wells gegeben. Jede Probe wurde für die Mehrfachbestimmung dreifach aufgetragen. Mit „Leer“ bezeichnete Felder dienen der Leerwertkontrolle (Non-Template-Control, NTC).

2.5.6. Einstellungen am Cycler

Die PCR-Bedingungen wurden nach Tabelle 8 festgelegt und am Cycler für quantitative PCR eingestellt. Stage II beschreibt einen PCR-Zyklus, Stage III dient der Erstellung der Schmelzkurve. Das Gesamtvolumen in den einzelnen Wells beträgt 25µl, nach (108;112).

PCR-Bedingungen der quantitativen PCR				
Stage I	15 Min.	95°C	Aktivierung der TaqPolymerase	
Stage II	15 Sek.	95°C	Denaturierung der cDNA	45 x (=Zyklen)
	30 Sek.	Annealing-Temperatur	Primer-Anlagerung	
	30 Sek.	72°C	Primerverlängerung, Nukleotidanlagerung	
Stage III	15 Sek.	95°C	Erstellen der Schmelzkurve	
	30 Sek.	Annealing-Temperatur		
Ramptime von Annealing-Temperatur 95°C: 19:59 Min.				
	15 Sek.	95°C		

Tabelle 8: Stadien der quantitativen PCR.

2.6. Transfektion mit HBP1-siRNA

2.6.1. Genregulation durch siRNAs

Mit Hilfe von siRNAs (small interfering RNAs) können Gene auf mRNA-Ebene ausgeschaltet werden. siRNAs sind kleine doppelsträngige RNA-Sequenzen, die in katalytischem Komplex an spezifische mRNA-Sequenzen binden können. Die mRNA wird dabei gespalten und eine anschließende Translation verhindert, siehe Abbildung 11. Durch diese sequenzspezifische Interaktion wird die Expression des von der mRNA codierten Gens posttranskriptional gehemmt (30;117).

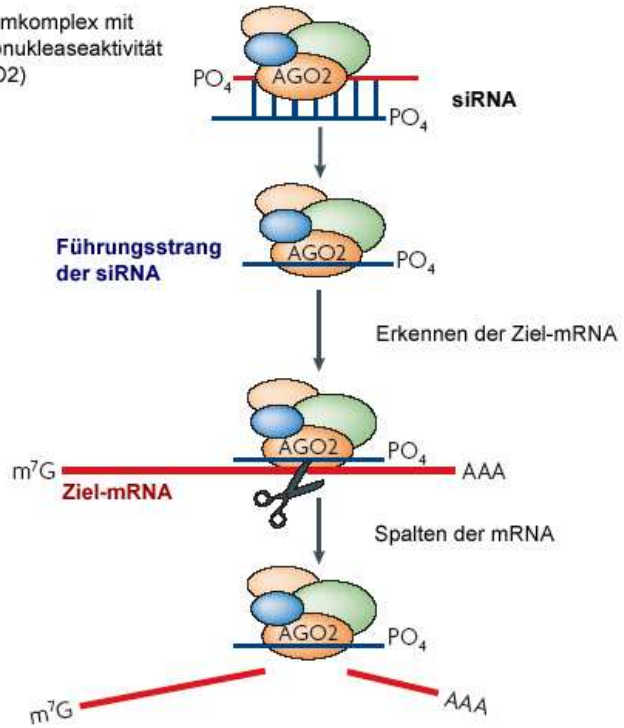


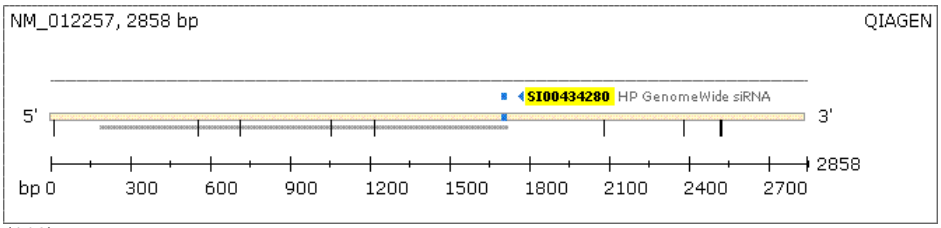
Abbildung 11: Funktionsprinzip siRNAs
Die doppelsträngige siRNA wird in einen katalytischen Enzymkomplex eingeschleust. Mit ihrem Führungsstrang bindet die siRNA an eine spezifische mRNA-Ziel-Sequenz. Dabei wird die mRNA durch die Endonuklease AGO2 des Enzymkomplexes gespalten. Vereinfacht nach (117).

2.6.2. Ausgangsmaterial und Prinzip der Transfektion

Die siRNA-Versuche wurden in K562-Zellen aus eigener Zellkultur durchgeführt. Es wurde vorgefertigte siRNA der Firma Qiagen verwendet (siehe Tabelle 9) sowie das Cell Line Nucleofector Kit V von Amaxa. Die Transfektion wurde am Nucleofector™ II (Amaxa) mit dem Nucleofector-Programm T-003 durchgeführt (3). Als Transfektionskontrolle wurde pmaxGFP (GFP: engl. Green Fluorescent Protein) eingesetzt.

Der Nucleofector™ II funktioniert nach dem Prinzip der Elektroporation. Durch elektrische Impulse in die Zellsuspension wird die Zellmembran der zu transfizierenden Zellen permeabel, siRNA und GFP gelangen bis in den Zellkern (3).

<table>
<tr><th>siRNA</th><th>Eigenschaften und Zielgen</th></tr>
<tr><td>HBP1:
Hs_HBP1_1
HP siRNA

SI00434280</td><td>HMG-box transcription factor 1 (HBP1), mRNA NM_012257
 

(116)</td></tr>
<tr><td>ns-siRNA
(nonsense):
Negative
Control
siRNA</td><td><table>
<tr><td>Sense sequence</td><td>UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT</td></tr>
<tr><td>Antisense sequence</td><td>ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT</td></tr>
<tr><td>Target DNA Sequence</td><td>AATTCTCCGAACGTGTCACGT</td></tr>
</table>
(115)</td></tr>
</table>

Tabelle 9: Verwendete siRNA für die funktionellen Versuchsreihen

2.6.3. siRNA-Transfektion

Die Transfektion wurde nach Amaxa-Originalprotokoll durchgeführt (4).

Amaxa-Transfektion - *Laborprotokoll*:

Ausgangsmaterial: K562-Zellen in Kultur (RPMI + 10% FCS + 1% P/S)

- 48 Stunden vor Versuchsbeginn K562-Zellen in serumfreiem Medium ausplatieren.

Vorbereiten der Transfektion:

- 12-Well-Platte: Je Probe ein Well mit 1ml Medium (RPMI + 10% FCS + 1% P/S) füllen und in den Brutschrank (37°C, 5% CO_2) stellen. Je Ansatz werden 4 Wells/Proben benötigt
- In 50ml-Falcon abgemessene Menge Kulturmedium im Brutschrank vorwärmen (je Probe 500µl), siRNA auftauen
- Nucleofector-Solution auf Raumtemperatur aufwärmen lassen
- Zu 2,25ml Nucleofector Solution 0,5ml Supplement zugeben

Versuchsbeginn:

1. Zellen in der Neubauer-Kammer zählen
2. In 5ml-Falcons Aliquots gleicher Zellzahl für jede Probe anfertigen
   Ideal für Transfektion: $1x10^6$-$5x10^6$ Zellen je Probe.
3. Zentrifugieren (300 rpm, 5 Minuten), Überstand abpipettieren

Folgende Schritte 4-9 für jede Probe einzeln nacheinander durchführen:

4. Pellet in 100µl Nucleofector-Solution resuspendieren und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführen

5. Zu 100µl Zellsuspension (Zellen in Nucleofector-Solution):
   - Probe 1: 4µl HBP1-siRNA [1µg/µl] HBP1-Transfektion
   - Probe 2: 4µl ns-siRNA [1µg/µl] Kontrolle Transfektionseffekte
   - Probe 3: 4µl pmaxGFP [0,5µg/µl] Transfektionskontrolle (pos)
   - Probe 4: keine weitere Zugabe Negativkontrolle
6. Nach Zugabe von siRNA/GFP die Suspension in Amaxa-Küvette überführen, Küvette mit blauem Deckel verschließen und in Nucleofector™ II stellen
7. Nucleofection Programm T003 auswählen und Reaktion starten
8. Nach erfolgter Elektroporation 500µl des vorgewärmten Mediums zugeben
9. Suspension mit Amaxa-Plastik-Pipette aus der Transfektions-Küvette in die vorbereiteten Wells der 12-Well-Platte überführen, Pipettierschema nach Abbildung 12.
10. Nach erfolgter Transfektion 12-Well-Platte in den Brutschrank (37°C, 5% CO_2) stellen.

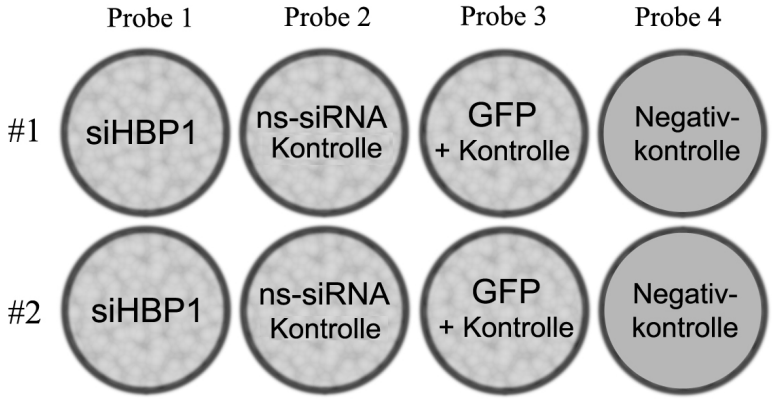


Abbildung 12: Pipettierschema der siRNA-Versuche
Dargestellt sind zwei Versuchsansätze (#1 und #2). Die ns-siRNA-Probe (Probe 2) bildet eine negative Kontrolle für Transfektionseffekte im Vergleich zur HBP1-Transfektion (Probe 1), die GFP-Probe (Probe 3) wird als positive Versuchskontrolle mitgeführt. Probe 4 bildet die negative Versuchskontrolle.

2.6.4. Fluoreszenzmikroskopische GFP-Transfektionskontrolle

Nach 24 Stunden wurde die GFP-Anreicherung der GFP-transfizierten Kontrollprobe unter dem Fluoreszenzmikroskop sowie durchflusszytometrisch am LSRII-Durchflusszytometer bestimmt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann die GFP-Fluoreszenz erkannt werden. Erfolgreich GFP-transfizierte K562-Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz. Im Vergleich mit der zugehörigen lichtmikroskopischen Aufnahme kann die Transfektionseffizienz abgeschätzt werden, siehe Abbildung 13. Quantitative Aussagen über die Transfektionseffizienz liefert die Durchflusszytometrie

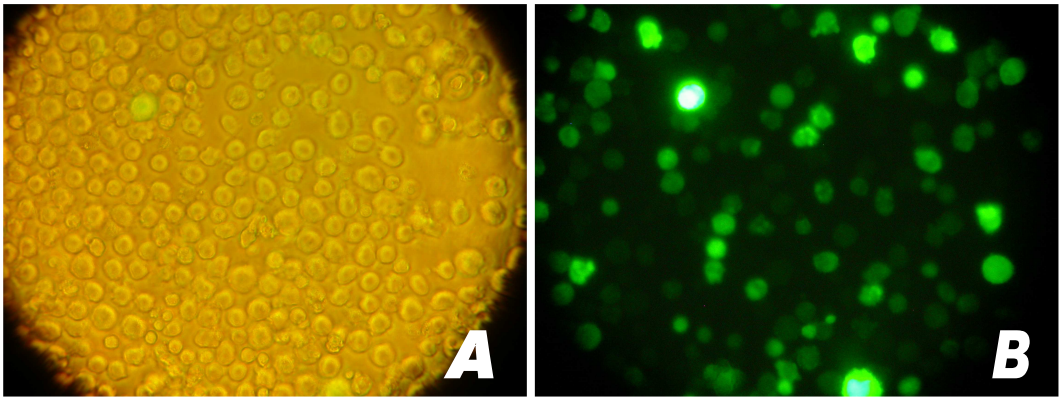


Abbildung 13: GFP-Transfektionskontrolle.
24 Stunden nach der Transfektion wurde in der GFP-transfizierten Probe die GFP-Fluoreszenz beurteilt. Aufnahme A (Lichtmikroskop) zeigt das zugehörige Zellbild zur Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme B. Grün-fluoreszierende Zellen bedeuten eine erfolgreiche GFP-Transfektion.

2.7. Isolation hämatopoetischer Progenitorzellen aus humanem Knochenmark

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hämatopoetische Progenitorzellen (Vorläuferzellen) untersucht, die aus humaner Substantia spongiosa gewonnen wurden. Die Substantia spongiosa (Spongiosa) bildet die innere Knochenschicht und weist eine schwammartige Bälkchenstruktur auf. In den Hohlräumen zwischen den Knochenbälkchen befindet sich Knochenmark mit hämatopoetischen Vorläuferzellen (57).

2.7.1. Patientenauswahl

Voraussetzung für die Auswahl der Patienten war, dass die Patienten weder an einer hämatologischen Systemerkrankung noch einer onkologischen Erkrankung leiden und keine Chemo- oder Strahlentherapie erhalten hatten. Ansonsten gab es für die Patienten keine besonderen Auswahlkriterien. Eine Einverständniserklärung der Patienten wurde jeweils eingeholt (siehe Vordrucke im Anhang), das zugehörige Votum der Ethikkommission der Universität Marburg zu „Untersuchungen zur Biologie humaner hämatopoetischer Stammzellen“ stammt vom 25.02.2005, Aktenzeichen 19/05.

2.7.2. Spongiosapräparation und Ficoll-Zellseparation

Durch Kooperation mit der orthopädischen Abteilung des Universitätsklinikums Marburg konnte die Substantia spongiosa des Femurknochens verwendet werden, welche bei Hüft-Prothese-Operationen entnommen wurde. Um die Progenitorzellen aus der Spongiosa-Probe zu gewinnen, wurden die Zellen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) aus der Probe gelöst und nach der Ficoll-Standard-Methode aufgearbeitet (46;47).

Zunächst wurde das Spongiosa-Stück im Probengefäß aus dem Operationssaal belassen, mit PBS überschichtet und mit Hilfe einer Klemme zerstampft und zerkleinert. Dabei werden die Knochenmarkzellen aus dem Markraum herausgelöst, die umgebende PBS-Lösung färbt sich rot. Das rot gefärbte PBS wurde mit einer Pipette aus dem Probengefäß abgenommen und über ein 40µm Zellsieb in ein 50ml Falcon überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis der

zerkleinerte Rest der Spongiosa-Probe weiß erschien. Das gefilterte Zell-PBS-Gemisch wurde in einem neuen 50ml Falcon vorsichtig über 15ml Ficoll-Lösung geschichtet und bei 800g 15 Minuten zentrifugiert. Die Zentrifuge durfte bei diesem Schritt nicht abgebremst werden (46;47).

Durch das Zentrifugieren werden die Knochenmark-Zellen auf Grund unterschiedlicher Zelldichte aufgeteilt. Es bildet sich eine untere Ficoll- und obere Serum-PBS-Phase, dazwischen ein trüb erscheinender Zellring aus mononukleären Zellen (Progenitorzellen und Lymphozyten). Erythrozyten und die meisten reifen Granulozyten sammeln sich als Pellet am Boden des Falcons, Thrombozyten liegen auf dem Ring mononukleärer Zellen, siehe Abbildung 14. Mit Hilfe einer Transferpipette wurde der Zellring zwischen Ficoll und PBS abgenommen und in ein 50ml Falcon überführt und 5 Minuten bei 300g zentrifugiert.

Abbildung 14: Ficoll-Zellseparation.
Der Zellring aus mononukleären Zellen enthält Lymphozyten und Progenitorzellen.
Modifiziert nach (47)

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgekippt und das entstandene Zellpellet zur Auflösung restlicher Erythrozyten in 5ml Lysispuffer resuspendiert. Nach fünfminütiger Wartezeit erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 300g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 15ml PBS resuspendiert und erneut 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Durch diese Waschschritte werden auch restliche Thrombozyten herausgewaschen und man erhält ein sauberes Zellpellet aus mononukleären Zellen mit enthaltenen hämatopoetischen Vorläuferzellen (46;47).
Dieses Pellet wurde nach Abkippen des Überstandes in 10ml PBS resuspendiert und eine Bestimmung der Zellzahl angeschlossen. Ab einer Zellmenge von 4-5 x 10^7 Zellen in den 10ml Zellsuspension konnte das Material weiter verwendet werden.

2.7.3. Separation der CD34+ Progenitorzellen

Die Separation in CD34-postitive Progenitorzellen erfolgte mit Hilfe magnetischer Microbeads über MACS-Seperator-Säulen nach Originalprotokoll (94;95). Die magnetischen Beads sind gekoppelt an Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CD34-Oberflächenantigen auf hämatopoetischen Progenitorzellen. MACS-Microbeads sind sehr kleine magnetische Partikel im Durchmesser von 50 nm. Die Zellen werden durch diese Antikörper-gekoppelten Beads magnetisch markiert. Durch die Microbeads wird die Stuktur, Funktion oder Aktivität der Zelle nicht beeinflusst, sie bestehen aus einer biologisch abbaubaren Matrix und müssen daher nach Beendigung der magnetischen Separation nicht abgewaschen werden (93). Da die Separatorsäule in eine magnetische Halterung eingespannt ist, reichern sich die magnetisch markierten CD34-positiven Zellen innerhalb dieser Säule an und können anschließend gesammelt werden (94;95). Für die spätere Durchflusszytometrie wird ebenfalls ein CD34-spezifischer Antikörper verwendet, dieser bindet jedoch an ein anderes Epitop des CD34-

Antigens. Für die magnetische Separation wurde der Antikörper des CD34-Klons QBEND/10 verwendet und in der Durchflusszytometrie des Klons 8G12 (12;94).

Laborprotokoll (94;95):

1. Materialvorbereitung: Ausgangsmaterial sind Spongiosa-Zellen in PBS
   - PBS-Zellsuspension zentrifugieren (300 rpm, 5 Min.)
   - Überstand abkippen und Zellpellet in ~3ml MACS-Puffer resuspendieren Zentrifugieren (300 rpm, 5 Min.), Überstand abkippen
   - Zellpellet in 300µl MACS-Puffer resuspendieren
2. Markieren der CD34-positiven Progenitor-Zellen durch magnetische Beads:
   - Zu den 300µl der resuspendierten Zellen (steril unter Bench arbeiten):
     + 100µl FcR Blocking Reagent (bis 10^8 Zellen) um unspezifische Bindungen zwischen CD34-Microbeads und Fc-Rezeptoren zu vermeiden
     + 100µl CD34 Microbeads
   - 30 Minuten auf Eis inkubieren
3. Vorbereitung der Säulen:
   - MiniMACS Seperator-Säule in magnetische Halterung einspannen, 15ml Falcon unterstellen und 500µl MACS-Puffer auf Säule geben
4. Magnetische Separation CD34-positiver Zellen:
   - Zu mit Beads markierten Zellen (500µl) ~3ml MACS-Puffer zugeben Zentrifugieren (300 rpm, 5 Min.), Überstand abpipettieren
   - Zellpellet in 500µl MACS-Puffer resuspendieren
   - Zellsuspension (500µl) auf die Säule geben und durchlaufen lassen
   - 3 x 500µl MACS-Puffer auf die Säule geben (vor erneuter Füllung jeweils warten bis vorherigen 500µl komplett durchgelaufen sind). Die durchgelaufene Zellsuspension bildet die CD34-negative Zellfraktion.
5. Sammeln der CD34-positiven Zellfraktion
   - Säule vom Seperator nehmen und auf ein neues 15ml-Falcon setzen
   - 1ml MACS-Puffer auf die Säule geben, sofort mit dem Kolben durch die Säule drücken
   - Kolben wieder herausziehen, erneut 1ml MACS-Puffer zugeben und durchdrücken (Vorgang 4-5 Mal wiederholen). Die durchgedrückte Zellsuspension bildet die CD34-positive Zellenfraktion und repräsentiert hämatopoetische Progenitorzellen.

Anschließend wurde die Zellzahl der CD34-positiven Progenitorzellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ab einer Zellzahl von 5 x 10^5 Zellen konnten die Zellen für die anschließende Progenitor-Sortierung vorbereitet werden.

2.8. Durchflusszytometrie (Flowzytometrie)

2.8.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Hinter dem Prinzip der Durchflusszytometrie (Flowzytometrie) verbirgt sich das Messen von Fluoreszenz verschiedener zellulärer Bestandteile. Während eine Zellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl vorbei geleitet wird, werden durch den Laser Fluoreszenzsignale ausgelöst. Diese Fluoreszenzsignale können durch verschiedene Zellbestandteile erzeugt werden oder von zugegebenen fluoreszierenden Markern ausgehen und werden von spezifischen Fotodetektoren erkannt. Auf diese Weise werden zelluläre Parameter in Fluoreszenz ausgedrückt. Die Fotodetektoren wandeln das emittierte Fluoreszenzlicht in elektrische Signale um.

Einer der Detektoren registriert das Laserlicht, das durch die Zelloberfläche seitlich abgelenkt wird, das Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC). Je rauer, stärker granuliert oder irregulärer geformt eine Zelle ist, desto stärker wird das einfallende Licht ablenkt. Der SSC macht eine Aussage über die Granularität der Zellen. Granulozyten generieren durch ihre unterschiedlich geformten Zellkerne ein stärkeres SSC-Signal als Lymphozyten, Erythrozyten oder Progenitorzellen (siehe Abb.15). Fast in Linie des ursprünglichen Laserstrahls liegt ein Detektor für das Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC). Die Stärke des FSC-Signals ist hauptsächlich vom Volumen der Zellen abhängig und gibt daher eine Auskunft über die Zellgröße (51;143).

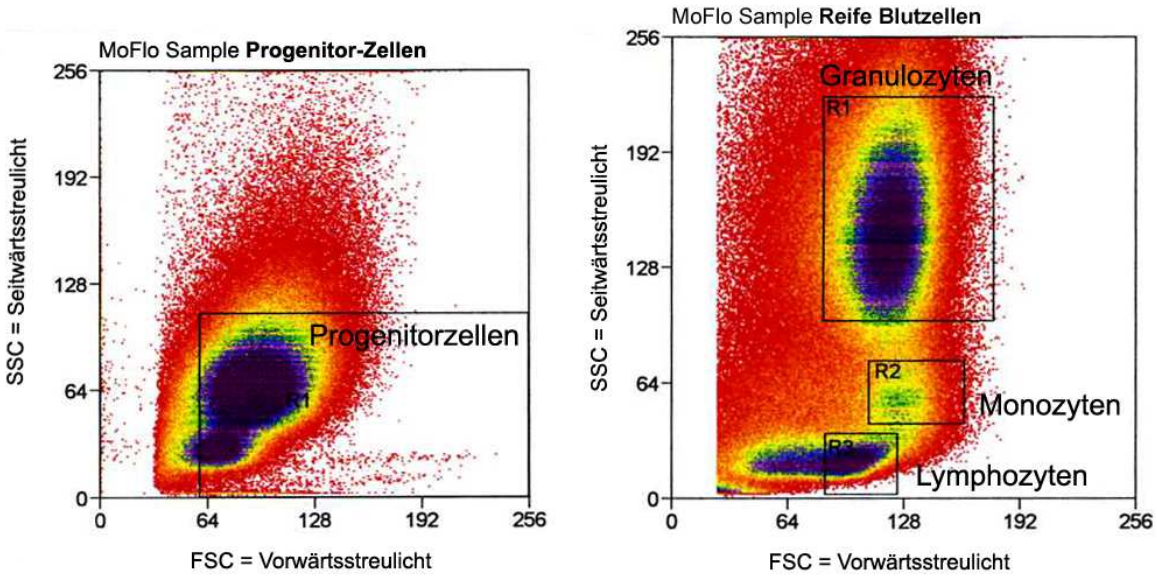


Abbildung 15: Messung SSC gegen FSC. Hämatopoetische Progenitor- und reife Blutzellen.
Die Daten wurden aus CD34-vorsortierten Knochenmarkzellen akquiriert. Der linke Dotplot (Sample Progenitorzellen) zeigt eine CD34+ Zellfraktion, der rechte Dotplot (Sample Reife Blutzellen) eine CD34- Population. Die Granulozyten liefern auf Grund höherer Kerngranularität ein stärkeres SSC-Signal als Progenitorzellen, Lymphozyten oder Monozyten. Eigene Abbildungen, Prinzip nach (143).

Während SSC und FSC das vom Laser ausgehende Licht registrieren, können auch Detektoren eingesetzt werden, die von fluoreszierenden Farbstoffen emittierte Fluoreszenz registrieren. Mit Hilfe fluoreszierender spezifischer Antikörper können Antigene auf der Zelloberfläche markiert und in Fluoreszenzintensität ausgedrückt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff leuchtet auf, wenn

dieser vom Laserstrahl des Durchflusszytometers getroffen wird, das Aufleuchten wird von den Fotodetektoren erkannt.
Diese Fotodetektoren erfassen jeweils das Fluoreszenzlicht eines definierten Emissionsspektrums (Wellenlängenbereich). Den einzelnen Spektren sind Fluoreszenz-Detektionskanäle zugeordnet. Auf Grund der Spezifität der einzelnen Fotodetektoren für einen bestimmten Wellenlängenbereich können in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen verschiedene Parameter gleichzeitig gemessen werden. Beispielsweise ist Fluorescein isothiocyanate (FITC) ein Fluoreszenzfarbstoff mit maximaler Emission bei 519nm. Das Emissionsmaximum von Phycoerythrin (PE) liegt mit 578nm über dem von FITC, so dass diese beiden Fluorochrome von unterschiedlichen Photodetektoren erkannt und in den zugehörigen Kanälen FL-1 für FITC und FL-2 für PE gleichzeitig gemessen werden können (50)

2.8.2. Gating-Prinzip

Ein Gate beschreibt einen Bereich, in den Zellen nach definierten Fluoreszenzkriterien eingeschlossen werden. Dadurch ist die Analyse in bestimmten Subpopulationen möglich. Die verwendeten Fluorochrome können in einzelnen Dotplots gegeneinander gemessen werden und Zellen nach ihren Antigeneigenschaften in Gates gefasst werden. Die aquirierten Daten der durch Gating selektierten Zellen können nach weiteren Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden. Durch Kombination verschiedener Gates kann eine Zellsuspension multifaktoriell untersucht werden (48).

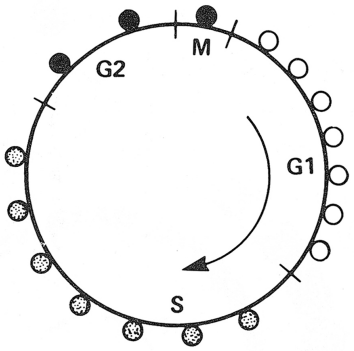
2.8.3. Zellzyklus-Analyse

2.8.3.1. Zellzyklus und DNA-Gehalt

Für die Zellzyklus-Analyse wird der DNA-Gehalt der Zelle durchflusszytometrisch bestimmt. Anhand des DNA-Gehalts kann darauf geschlossen werden, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle befindet. Zellen in der G1-Phase sind in der Vorbereitung für die Synthese-Phase (S). In der S-Phase findet die DNA-Replikation statt, der DNA-Gehalt der Zellen nimmt im Laufe der fortschreitenden Synthese zu. In der G2-Phase ist diese DNA-Replikation abgeschlossen. Die G2-Phase-Zellen weisen einen doppelten DNA-Gehalt auf und stehen kurz vor Eintritt in die Mitose (M-Phase). In der M-Phase findet die Chromosomenkondensation und Vorbereitung der mitotischen Teilung in zwei Tochterzellen statt (49;154) (siehe Abb.16, Teil 1).

Für die durchflusszytometrische DNA-Analyse wurde das Fluorochrom Propidiumiodid (PI) verwendet. Propidiumiodid wirkt als Nucleinsäureinterkalator in Ethanol-fixierten Zellen und liefert Fluoreszenzsignale im Wellenlängenbereich von 600nm. Da PI sowohl mit DNA als auch RNA interagiert wurde zum Ausschluss von RNA bedingten Signalen ein RNAse Enzym für den RNA-Verdau zugegeben. Die im Durchflusszytometer registrierte PI-Fluoreszenzintensität ist proportional zum DNA-Gehalt der Zelle, die histographische Auswertung liefert eine Zellzyklus-Moment-Aufnahme der vorliegenden Zellsuspension (49) (siehe Abb.16, Teil 2).

Teil 1:
Zellzyklus und DNA-Gehalt:
Zellen in G1-Phase (weiße Kreise) besitzen einen einfachen, Zellen in G2/M-Phase (schwarze Kreise) doppelten Chromosomensatz. Während der S-Phase (graue Kreise) nimmt der DNA-Gehalt mit fortlaufender Synthese kontinuierlich zu.



Teil 2:
Schema der flowzytometrischen Messung.
Der DNA-Gehalt wird mit Hilfe eines interkalierenden Farbstoffs (Propidiumiodid, PI) in Fluoreszenz-intensität gemessen und als Histogramm dargestellt. Weiße Kreise = Zellen mit einfachem DNA-Gehalt der G1-Phase; Schwarze Kreise = Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt der G2/M-Phase. Dazwischen (grau) Zellen der S-Phase.

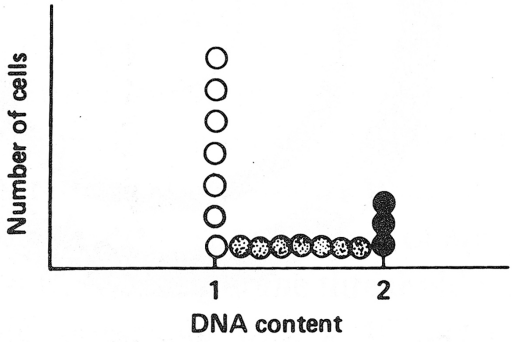


Abbildung 16: Schematisch Darstellung der flowcytometrischen Zellzyklusanalyse, nach Gray aus (49).

2.8.3.2. Zellzyklus-Messung mit PI am LSR-II

Laborprotokoll: Zellzyklusanalyse, nach (23;36)

1. Ethanol-Fixierung der Zellen (70% Ethanol):
   - Zellesuspension (ideal 10^6 Zellen) zentrifugieren (300 rpm, 5 Min.)
   - Zellpellet in 500µl PBS resuspendieren
   - 1ml eiskaltes Ethanol zugeben (70%)
   - Ethanol-Zell-Gemisch über Nacht bei -20°C inkubieren

2. Färbung mit Propidiumiodid (PI):
   - Waschvorgang: zu in Ethanol fixierten Zellen 2ml PBS zugeben und zentrifugieren (300 rpm, 10 Min.)
   - Überstand abkippen, Zellpellet in 500µl PBS resuspendieren
   - Zugeben von 10µl Propidiumjodid (Konzentration 200µg/ml)
   - Zugeben von 20µl RNAse (Konzentration 10mg/ml)
   - für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
   - Zellen bis zur Messung bei 4°C lagern

Für die Messung am LSR-II wurden die Daten in drei Stufen akquiriert. In einem ersten Dotplot wurde im FSC-SSC ein Live-Gate gesetzt um apoptotische Zellen aus der Messung möglichst auszuschließen. Bei der Fixierung können Dubletten entstehen. Um diese Dubletten aus der Analyse ausschließen zu können, wird in einem zweiten Schritt die im PE-Kanal gemessene Propidiumiodid-Fluoreszenz PE-A (A=Area, Oberfläche) gegen PE-W (W=Width, Breite) dargestellt. In der eigentlichen histographischen Zellzyklus-Analyse wird die PI-Fluoreszenz (PE-A) gegen die Zellzahl aufgetragen, siehe Abbildung 17.

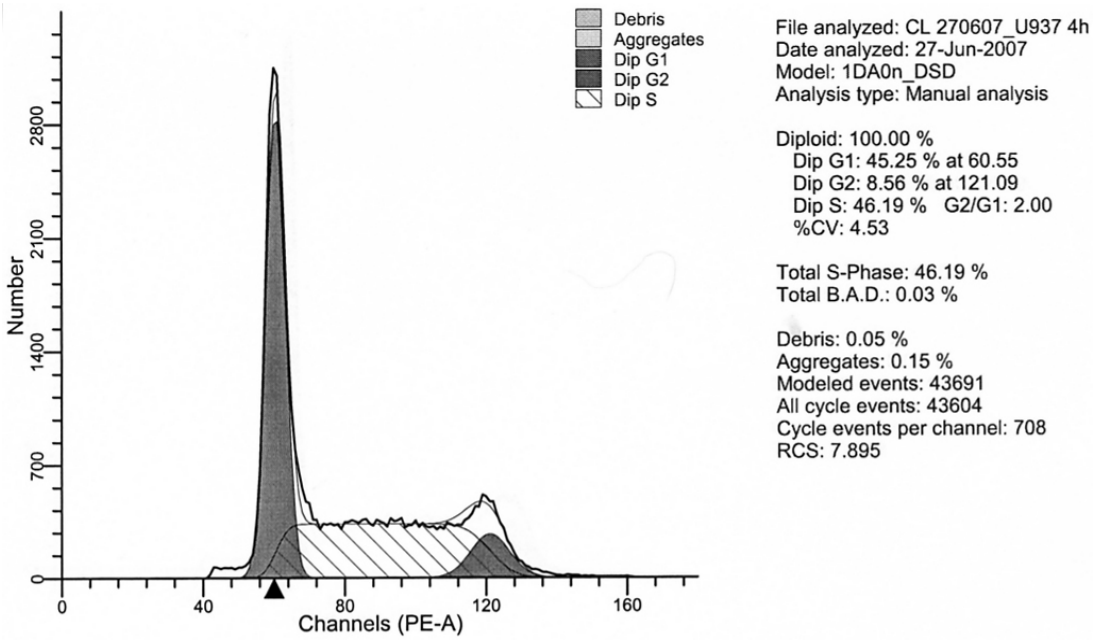


Abbildung 17: Histogramm der Zellzyklusanalyse zur Darstellung der Zellzyklusphasen Die Statistik zeigt prozentual die Verteilung der Zellen über die einzelnen Phasen des Zellzyklus (ModFit LT™). Der erste Peak beschreibt den Anteil der Zellen in der G1-Phase, der zweite Peak die G2-Phase-Zellen. Die dazwischen liegende schraffierte Fläche markiert den S-Phase-Anteil.

2.8.4. Durchflusszytometrische GFP-Messung

Die durchfusszytometrische GFP-Messung diente der quantitativen Effizienzkontrolle der siRNA-Versuche (24 Stunden nach der Transfektion). Für die Auswertung am Durchflusszytometer wurde die GFP-transfizierte Probe einmal mit PBS gewaschen und vor der Messung in 2ml PBS aufgenommen. Die GFP-Fluoreszenz wird im FITC-Kanal gemessen. Die statistische Auswertung liefert den prozentualen Anteil der transfizierten Zellen, siehe Abbildung 18. Als Negativ-Kontrolle wurden untransfizierte K562-Zellen gemessen (4;13).

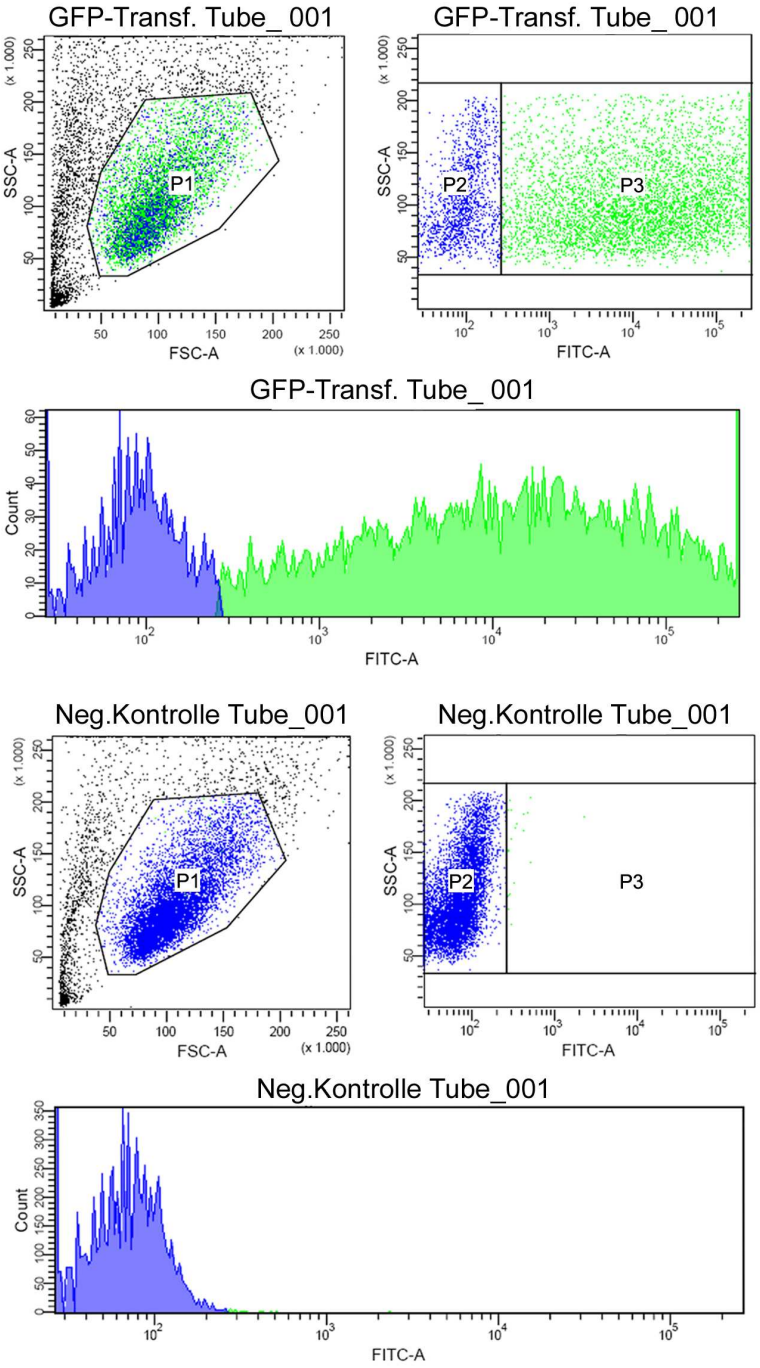


Abbildung 18: Transfektionskontrolle 24 Stunden nach siRNA-Transfektion: Durchflusszytometrische GFP-Messung am LSRII-Durchflusszytometer. Die GFP-Fluoreszenz wird im FITC-Kanal registriert.

GFP-Transf. Tube_001: Im ersten Dotplot (FSC-SSC) werden die lebenden Zellen im Gate P1 zusammengefasst. Im zweiten Doplot wird die FITC (GFP)-Fluoreszenz gemessen. Der Bereich P2 (grün) beschreibt die Zellen, bei denen eine GFP-Fluoreszenz registriert wird. Das Gate P3 (blau) fasst die GFP-negativen Zellen. Das Histogramm zeigt den Anteil der GFP-positiv gemessenen Zellen (grün).

Neg-Kontrolle Tube_001: Eine untransfizierte Probe zeigt im Bereich P2 sowie im Histogramm keine GFP-Fluoreszenz.

Die statistische Auswertung (s.u.) liefert eine Aussage über die Transfektions-effizienz. In diesem Beispiel wurden 77,5% der als lebend detektierten Zellen GFP-positiv registriert.

GFP-Transf. Tube_ 001

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10.000		100,0
P1	6.808	68,1	68,1
P2	5.278	77,5	52,8
P3	1.543	22,7	15,4

Experiment Name:	Transfection K562
Specimen Name:	GFP Transf
Tube Name:	Tube_001
Record Date:	21.11.2007 11:18:58
$OP:	Link
GUID:	d29d8d1b-9e80-426a-b130-348b1058e002

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	10.000	####	34.904
P1	6.808	68,1	41.626
P2	5.278	77,5	53.664
P3	1.543	22,7	102

Neg.Kontrolle Tube_001

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10.000		100,0
P1	8.040	80,4	80,4
P2	23	0,3	0,2
P3	8.021	99,8	80,2

Experiment Name:	Transfection K562
Specimen Name:	neg Kontrolle
Tube Name:	Tube_001
Record Date:	21.11.2007 11:20:52
$OP:	Link
GUID:	46e41e8e-5e21-452f-bddf-3e5c2a0b4115

Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean
All Events	0	####	94
P1	0	####	72
P2	0	####	419
P3	0	####	71

2.9. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

2.9.1. Zellsortierung anhand Antigenexpression

Die Zellsortierung für diese Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem Flow Cytometry Team der Arbeitsgruppe (C.Brendel, M.Dohse, T.Volkmann) durchgeführt.

Die Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung („Sorting“) ermöglicht es, Zellen anhand akquirierter Fluoreszenzsignale nach festgelegten Fluoreszenz-Parametern sortieren und sammeln zu können (51). Eine CD34-positive Zellfraktion umfasst sämtliche Progenitorzellen der myeloischen und lymphatischen Reihe. Anhand ihrer Antigenexpression können die CD34-positiven Progenitorzellen weiter in die Subpopulationen der HSCs, CMPs und GMPs sortiert werden, zur Hämatopoese siehe *1.3. Hämatopoetische Progenitorzellen*. Für die Sortierung wurde ein CD34-Antikörper verwendet, der ein anderes Epitop des CD34-Antigens erkennt als in der vorangegangenen magnetischen Separation, s.o. (12;94).

Für die Lineage-Kombination wurden folgende acht Antigene gewählt, nach (11;22;90):

CD2: T-Zellen; CD3: T-Zellen; CD4: T-Zellen, Monozyten/Makrophagen; CD14: Monozyten/Makrophagen, Granulozyten; CD15: Granulozyten; CD19: Reife B-Zellen; Glyophorin A: Erythrozyten; CD56: NK-Zellen (59;88). Für die Populationen der HSCs, CMPs und GMPs wurde entsprechend der Antigenexpression folgende Sortierstrategie festgelegt, siehe Tabelle 10 (22;90).

Population	Oberflächenantigene
HSCs	CD34+, lin-, CD38-
CMPs	CD34+, lin-, CD38+, CD123+ CD45-
GMPs	CD34+, lin-, CD38+, CD123+ CD45+

Tabelle 10: Sortierstrategie nach Expressionsmuster der Oberflächenantigene hämatopoetischer Vorläuferzellen
(22;90)d}d}d}d}2)

Im Rahmen der Progenitor-Sortierung dieser Arbeit wurden antikörpergebunden fünf verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: FITC, PE, APC, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, siehe Tabelle 11. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind an Maus-IgG-Antikörper gekoppelt, die gegen humane Oberflächenantigene gerichtet sind. Durch diese fluoreszierenden Maus-Antikörper, die spezifisch an die verschiedenen Oberflächenantigene der Progenitorzellen binden, können diese flowzytometrisch detektiert und anschließend sortiert werden (51).

Ziel-Antigene	Konjugierte Fluoreszenzfarbstoffe mit Emissionsmaxima	
CD34	**PE-Cy7** Phycoerythrin und Cyanine dye	785nm
CD38	**PerCP-Cy5.5** Peridinin chlorophyll Protein mit Cyanine dye	695nm
CD45RA	**APC** Allophycocyanin	660nm
CD123	**PE** Phycoerythrin	578nm
Lin: CD2,CD3,CD4,CD14, CD15,CD19,CD56, Glyophorin A	**FITC** Fluorescein isothiocyanate	519nm

Tabelle 11: Fluoreszenzgekoppelte Maus-IgG-Antikörper gegen humane Oberflächenantigene (10)d}d}d}d}5).

2.9.2. Antigen-Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern

Für die Zellsortierung wurde die CD34-positive Zellpopulation mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert, nach (14).

Laborprotokoll:

Ausgangsmaterial: Zellsuspension CD34-positiver Zellen

- CD34-positive Zellfraktion (in PBS) zentrifugieren (300 rpm, 5 Min.)
- Überstand abkippen und Zellpellet in 5ml PBS resuspendieren, in FACS-Röhrchen überführen und erneut zentrifugieren (300 rpm, 5 Min.)
- Überstand abkippen, jedoch nicht abpipettieren: zurückbleibenden Überstand (~100µl PBS) im FACS-Röhrchen belassen. Antikörper zugeben und das Zellpellet mit den Antikörpern in belassenem PBS-Überstand resuspendieren
- Antikörper: 2µl CD34 PE-Cy7
  2µl CD38 PerCP-Cy5.5
  2µl lin-FITC
  2µl CD45RA-APC
  2µl CD123-PE
- Nach der Antikörper-Zugabe die Zellsuspension gut vortexen, auf Eis stellen und für 15-30 Minuten im Dunklen inkubieren
- Nach der Inkubationszeit zu der markierten Zellsuspension 2ml PBS zugeben und zentrifugieren (300 rpm, 5 Min.). Nicht-gebundene Antikörper werden bei diesem Vorgang weggewaschen.
- Überstand abkippen und sauber abpipettieren, Pellet in 300µl PBS resuspendieren
- Die antikörpergebundenen Zellen (300µl) für den Sortiervorgang durch einen Zellfilter in 1,5ml Reaktionsgefäße überführen. Aus diesen 1,5ml Reaktionsgefäßen werden die Zellen durch das MoFlo-Zellsortiergerät heraussortiert.

2.9.3. Sortierstrategie

Sortiert wird anhand der gesetzten Gates. Alle Zellen, die innerhalb eines Gates liegen werden gesammelt, alle Zellen außerhalb des Gates werden nicht weiter beachtet. Werden verschiedene Gates hintereinander geschaltet, können Subpopulationen unterschiedlicher Charakteristika sortiert werden (51). Nach Manz (90) wurde für die Progenitorsortierung ein mehrstufiges Gating-Schema festgelegt, nach dem die als CD34-positiv vorselektierten Zellen sortiert wurden.

Die myeloischen Subpopulationen der HSCs, CMPs und GMPs liegen im Dotplot FSC (forward scatter) gegen SSC (side scatter) alle im Bereich der Progenitorzellen. Für diesen Bereich wurde das Gate R1 definiert (siehe Abb. 19).

Entsprechend ihres Antigenprofils wurden für die Sortierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen mehrere Gates hintereinander geschaltet (siehe Tabelle 12, Abb.19) (90). Die einzelnen Zellpopulationen wurden in 200µl MACS-Puffer in 0,5ml Rektionsgefäßen sortiert. –

Zellpopulation	Antigen-eigenschaften	Definierte Gates
HSC	Progenitorgate	R1
	lin–	R2
	CD38– CD34+	R3
CMP	Progenitorgate	R1
	lin–	R2
	CD38+ CD34+	R4
	CD45– CD123+	R6
GMP	Progenitorgate	R1
	lin–	R2
	CD38+ CD34+	R4
	CD45+ CD123+	R5

Tabelle 12: Zellpopulationen hämatopoetischer Vorläuferzellen. Die charakteristischen Antigeneigenschaften sind durch definierte Gates repräsentiert

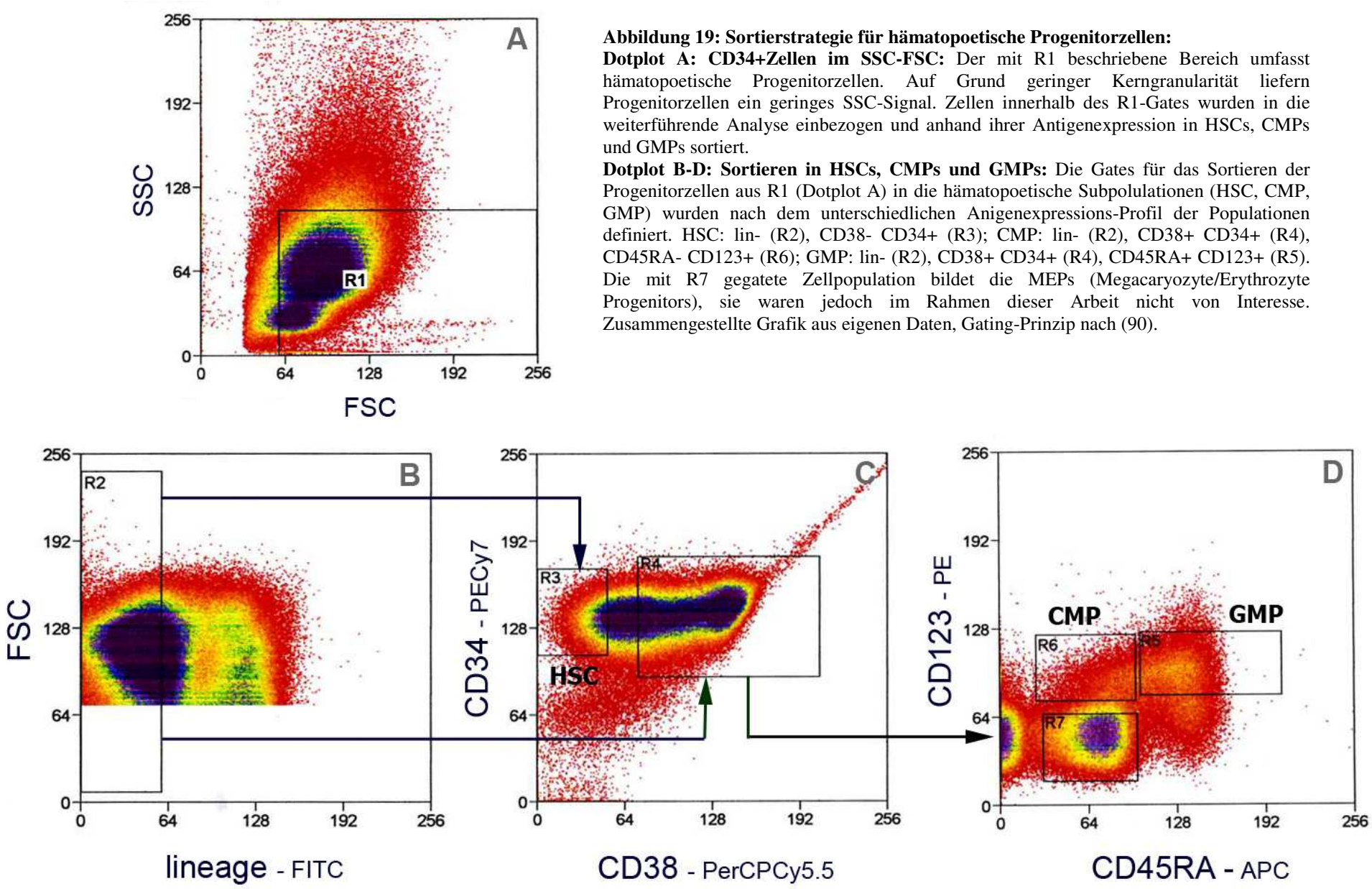


Abbildung 19: Sortierstrategie für hämatopoetische Progenitorzellen:
Dotplot A: CD34+Zellen im SSC-FSC: Der mit R1 beschriebene Bereich umfasst hämatopoetische Progenitorzellen. Auf Grund geringer Kerngranularität liefern Progenitorzellen ein geringes SSC-Signal. Zellen innerhalb des R1-Gates wurden in die weiterführende Analyse einbezogen und anhand ihrer Antigenexpression in HSCs, CMPs und GMPs sortiert.
Dotplot B-D: Sortieren in HSCs, CMPs und GMPs: Die Gates für das Sortieren der Progenitorzellen aus R1 (Dotplot A) in die hämatopoetische Subpolulationen (HSC, CMP, GMP) wurden nach dem unterschiedlichen Anigenexpressions-Profil der Populationen definiert. HSC: lin- (R2), CD38- CD34+ (R3); CMP: lin- (R2), CD38+ CD34+ (R4), CD45RA- CD123+ (R6); GMP: lin- (R2), CD38+ CD34+ (R4), CD45RA+ CD123+ (R5). Die mit R7 gegatete Zellpopulation bildet die MEPs (Megacaryozyte/Erythrozyte Progenitors), sie waren jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht von Interesse. Zusammengestellte Grafik aus eigenen Daten, Gating-Prinzip nach (90).

3. Ergebnisse

3.1. HBP1-Screening in verschiedenen Zelllinien

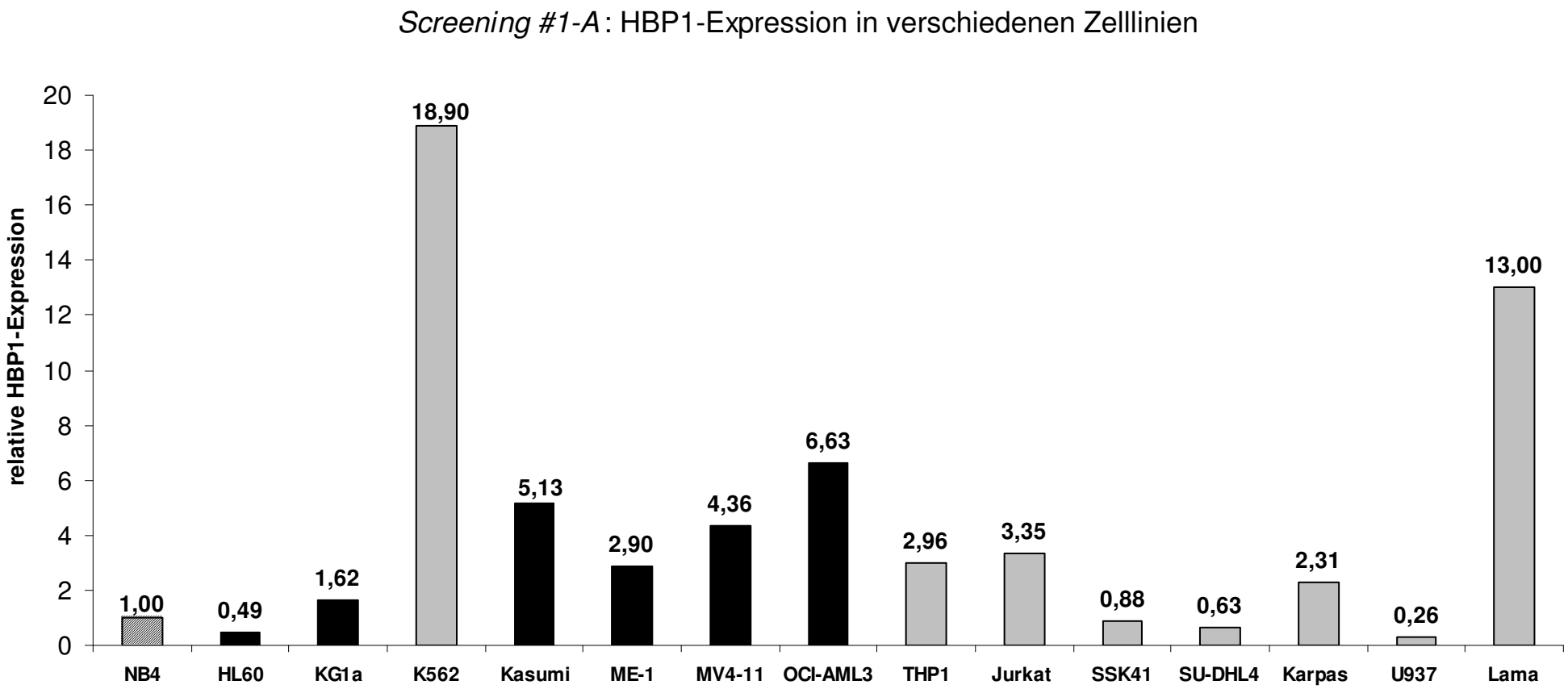


Abbildung 20: Grafische Darstellung der relativen HBP1-Expression in verschiedenen Zelllinien (Screening #1-A).
Die relative HBP1-Expression wurde aus den ermittelten PCR-Werten berechnet (jeweils Dreifach-Bestimmungen), siehe auch Rohdaten *Anhang 1*. Für die Kalibrator-Probe (NB4, AML) wurde rel.HBP1 = 1 gesetzt (schraffierte Säule). Neben NB4 sind die weiteren AML-Zelllinien als schwarze Säulen dargestellt. HBP1 ist in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich exprimiert, jedoch wurde auf eine Subgruppen-Analyse oder zytogenetische Korrelation verzichtet, da sich die quantitative PCR für eine Analyse der HBP1-Expression in den verschiedenen Zelllinien als nicht geeignete Methode erwiesen hat (*4.1. HBP1 in verschiedenen Zelllinien*).

In unterschiedlichen AML-, CML- und Lymphom-Zelllinien wurde die HBP1-Expression durch quantitative PCR bestimmt (Abb. 20, Rohdaten siehe *Anhang 1*). Ziel der Versuche war es, eine unterschiedliche HBP1-Expression mit molekularen oder zytogenetischen Aberrationen korrelieren zu können. Für die Berechnung der relativen HBP1-Expression wurden C_T-Werte ausgeschlossen, die in der Dreifachbestimmung >1 C_T-Wert von den beiden anderen Messwerten abwichen (zur Berechnung siehe *2.5.3. Relative Quantifizierung*). Die CML-Linien (K562 und Lama) zeigten im Vergleich zu AML- oder Lymphomlinien eine sehr hohe HBP1-Expression. Die Lymphomlinien (Jurkat, SSK41, SU-DHL4, Karpas, U937) zeigten tendentiell eine geringere HBP1-Expression als die Zelllinien myeloischer Herkunft. Die HBP1-Level der AML-Proben (NB4, HL60, KG1a, ME-1, MV4-11, Kasumi, Oci-AML3) variierten (kritische Diskussion der Ergebnisse siehe *4.1. HBP1 in verschiedenen Zelllinien*).

Da Werte und Verhältnisse der relativen HBP1-Expression nicht bestätigt werden konnte, wurde auf eine weitere Analyse sowie Korrelation der HBP1-Werte mit bestimmten Karyotypen verzichtet. Die Aussagekraft der PCR-Daten wurde vor allem dadurch in Frage gestellt, dass selbst innerhalb einer Zelllinie starke Schwankungen auffielen (vergleiche NB4#1 und NB4#2, U937#1 und U937#2 im Screening #1-B in Abbildung 21.). Für das Screening #1-B wurde jeweils eine andere cDNA verwendet als im Screening #1-A, für die Ansätze #1 und #2 der Zelllinien NB4 bzw. U937 wurden Proben aus jeweils zwei verschiedenen Kulturansätzen verwendet (*4.1. HBP1 in verschiedenen Zelllinien*).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, die HBP1-Expression könnte mit bestimmten Zellzyklus-Phasen korrelieren und die relative HBP1-Expression in Zellkulturexperimenten je nach dem Entnahmezeitpunkt der RNA variieren.

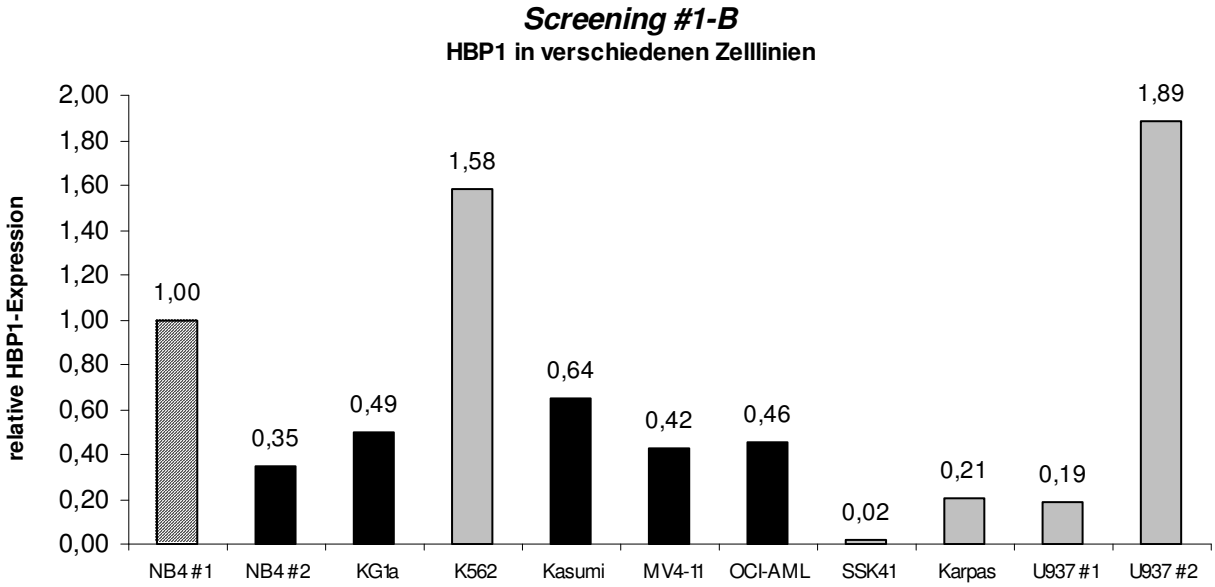
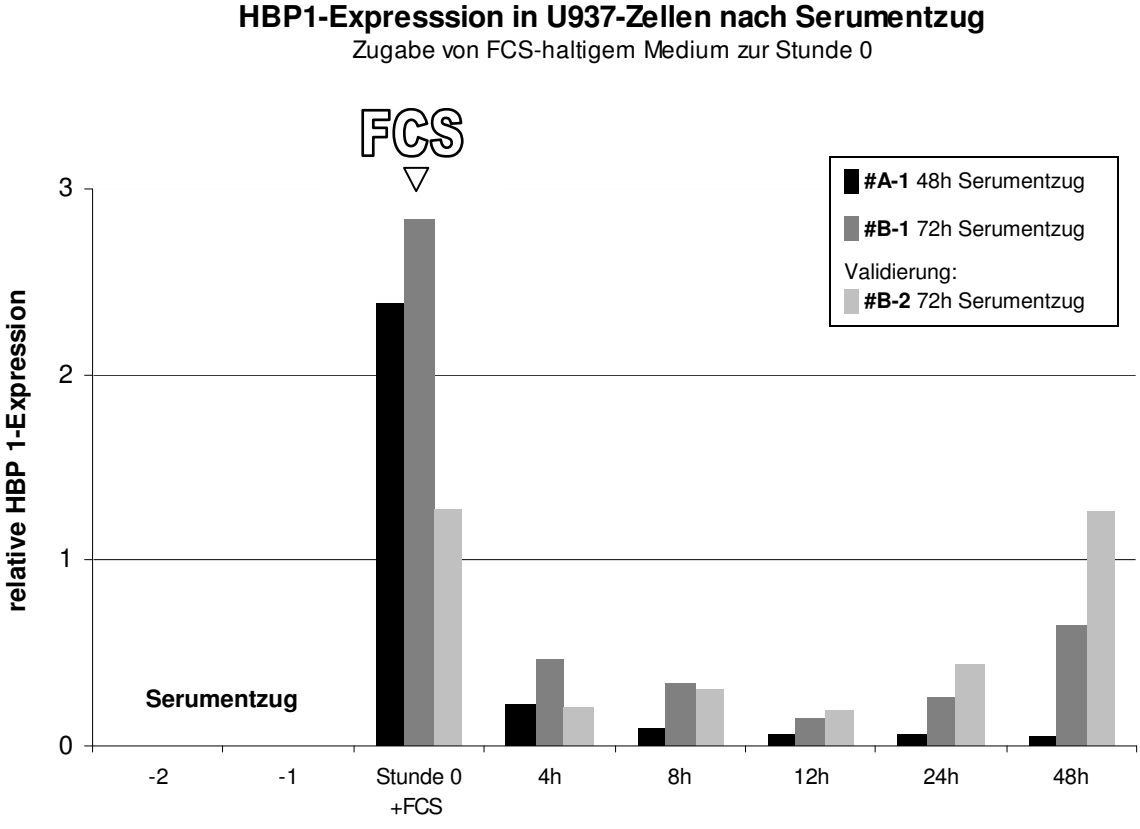


Abbildung 21: Screening #1-B: HBP1 in verschiedenen Zelllinien.
Grafische Darstellung der relativen HBP1-Expresssion. Die HBP1-Expression wurde aus den ermittelten PCR-Daten berechnet (jeweils Dreifach-Bestimmungen). Für die Kalibrator-Probe (NB4, AML) wurde rel.HBP1 = 1 gesetzt (schraffierte Säule). Die neben der NB4-Kalibrator-Probe analysierten AML-Zelllinien wurden als schwarze Säulen dargestellt. Für die einzelnen Zelllinien ergaben sich jeweils andere Werte und Verhältnisse der HBP1-Expression als im Screening #1-A. Auffallend sind v.a. die Schwankungen innerhalb einer Zellinie (NB4, U937)

3.2. HBP1 und Zellzyklus

3.2.1. HBP1-Expression in U937-Zellen nach Serumentzug

Das Zellzyklus-Experiment wurde von uns vor dem Hintergrund der Ergebnisse aus dem Zelllinien-Screening etabliert. Es sollte in diesem Versuchsmodell die Hypothese geprüft werden ob die HBP1-Expression mit bestimmten Zellzyklus-Phasen korreliert (siehe auch *2.1.3. Versuchs-Etablierung zur Analyse der Zellzykluskorrelation, 4.2. HBP1 und Zellzyklus*). Nachdem die U937-Zellen über einen definierten Zeitraum in FCS-freiem Medium gehalten wurden (serumfreies Intervall = Serumentzug), wurde den Zellen zur Stunde 0 FCS zugegeben und die HBP1-Expression in bestimmten Intervallabständen bestimmt. Das Experiment lieferte eindrückliche Ergebnisse, die sich in den verschiedenen Versuchsansätzen bestätigen ließen.



	-2	-1	Stunde 0 +FCS	4h	8h	12h	24h	48h
#A-1 Serumentzug 48h			2,38	0,22	0,10	0,07	0,06	0,05
#B-1 Serumentzug 72h			2,83	0,47	0,33	0,16	0,26	0,65
#B-2 Serumentzug 72h			1,28	0,21	0,30	0,19	0,45	1,26

Abbildung 22: HBP1-Expression in U937-Zellen nach Serumentzug drei verschiedener Ansäzte. Die Zellen wurden über einen definierten Zeiraum in FCS-freiem Medium gehalten (serumfreies Intervall = Serumentzug). Nach Ablauf des serumfreien Intervalls wurde zur Stunde 0 FCS zugegeben und gleichzeitig die HBP1-Expression mit quantitativer PCR ermittelt (qPCR-Rohdaten siehe *Anhang 2*) Zu den nachfolgend aufgeführten Zeitpunkten (4h, 8h, 12h, 24h, 48h nach Serumzugabe) wurde jeweils die HBP1-Expression bestimmt. Alle drei Ansätze zeigten einen deutlichen Expressionsabfall nach Serumzugabe.

Alle drei Versuchansätze zeigten im Vergleich zur Kalibrator-Probe eine HBP1-Überexpression nach Ablauf des serumfreien Intervalls (48 bzw. 72 Stunden). Die Probe für den Wert zur Stunde 0 wurde entnommen kurz bevor FCS zugegeben wurde. Mit FCS-Zugabe wurde in allen drei Ansätzen eine starke Abnahme der HBP1-Expression festgestellt. Nach vier Stunden war die relative HBP1-Expression auf 9,24% des 0-Stunden-Wertes im Ansatz #A-1, 16,61% im Ansatz #B-1 und 16,41% im Ansatz #B-2 abgefallen (siehe Abbildung 22, Rohdaten *Anhang 2*).
In den Messreihen der beiden Ansätze #B-1 und B#-2 ist zu erkennen, dass die HBP1-Expression nach Erreichen der minimalen Werte wieder anstieg und im Ansatz #B-2 fast wieder die Höhe des 0-Stunden-Wertes erreichte.

3.2.2. Zellzyklus-Korrelation

Durchflusszytometrisch wurde der Anteil der Zellen bestimmt (Verteilungsraten in Prozent), der sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme in der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus befand. Es wurde untersucht ob sich die Änderung der HBP1-Expression mit einem bestimmten Zellzyklus-Verhalten assoziieren lässt. Die Prozentwerte wurden mit ModFit LT™ aus den am LSRII-Durchflusszytometer aquirierten Daten ermittelt. Abbildung 23 zeigt die Histogramme der Zellzyklus-Analyse des Versuchsansatzes #A-1.
Um die Proliferationsphasen mit den Zellzyklus-inaktiven Phasen vergleichen zu können, wurde ein G2-S-Phase-Index aus den ermittelten Daten errechnet und mit dem G1-Phase-Anteil verglichen. Da in der Messung nicht zwischen G0 und G1 Phase differenziert wurde, umfasst der G1-Anteil sowohl die in G0- als auch in G1-Phase befindlichen Zellen (siehe Tabelle 13, Abbildung 24.

Im Gegensatz zur eindeutigen Entwicklung der HBP1-Expression, sind die ermittelten Zellzyklus-Daten weniger eindrücklich. Die Phasenverteilung der U937-Zellen zeigte für die gemessenen Zellphasen einen biphasischen Verlauf, wobei sich der G0/G1-Anteil jeweils gegenläufig zum G2/S-Anteil verhielt. Nach Serumzugabe stieg der G2/S-Anteil zunächst an, fiel danach jedoch wieder ab um nach Erreichen eines minimalen G2/S-Anteils von 41,01% zur Stunde 24 wieder in Richtung des Ausgangswertes anzusteigen. Der G0/G1-Anteil verhielt sich reziprok. Nach Serumzugabe fiel der Prozentsatz zunächst ab und stieg bis zum Erreichen des Maximalwertes von 58,99% zur Stunde 24 an und fiel danach erneut ab. Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass das Serumentzugsintervall zu kurz und damit der Anteil der sich in G0/G1-Phase befindlichen Zellen zu gering war um ein eindeutiges Zellzyklus-Verhalten analysieren zu können.
Mit dem Ziel den Anteil der nach Serumentzug in G1-Phase befindlichen Zellen zu erhöhen und aussagekräftigere Zellzyklus-Daten zu erhalten, wurde das Serumentzugsintervall für die Ansätze #B-1 und #B-2 von 48 auf 72 Stunden erhöht. Der Prozentsatz der G1-Phase-Zellen war nach 72-Stunden Serumentzug deutlich erhöht (72,18% zur Stunde 0 im Ansatz #B-1, siehe *Anhang 3* und *Anhang 4*), jedoch konnte auch in diesen Versuchreihen das Zellzyklus-Verhalten der U937-Zellen nicht mit der Entwicklung der HBP1-Expression korreliert werden.

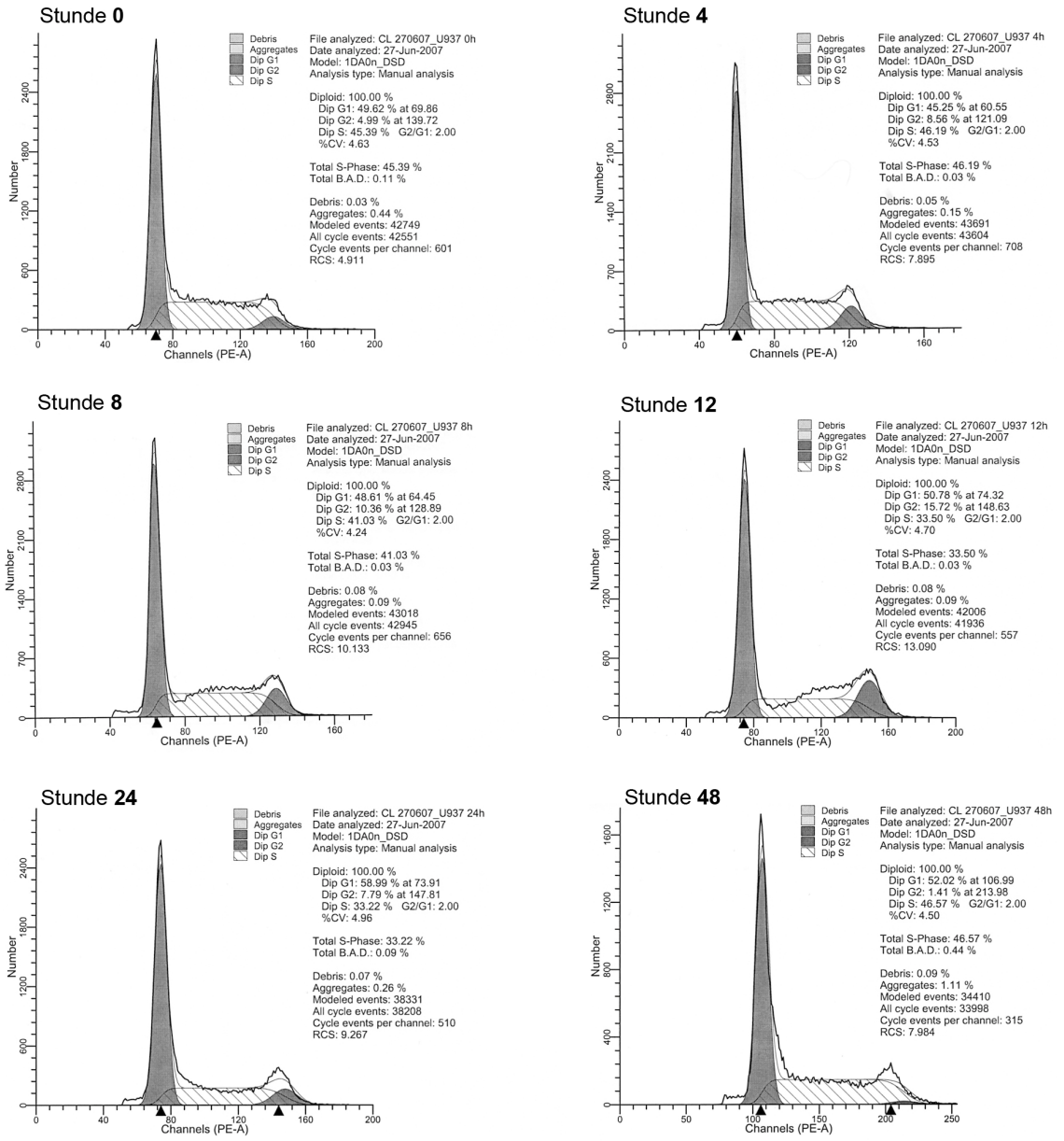


Abbildung 23: Zellzyklus-Analyse (ModFit LT™-Auswertung). Die Zellzyklusphasen wurde zur Stunde 0, sowie 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden nach Serumzugabe gemessen. Zuvor wurden die U937-Zellen über 48 Stunden in serumfreiem Medium gehalten (Ansatz A#-1).

In jedem Histogramm beschreibt der erste Peak den Anteil der in der G1-Phase befindlichen Zellen (registriert zw. 60 und 110 PE-A-Aktivität). Der zweite Peak (registriert zw. 120 und 215 PE-A-Aktivität) beschreibt den Anteil der in G2-Phase befindlichen Zellen. Die dazwischen liegende schraffierte Fläche zeigt den S-Phase-Anteil. Für die spätere Auswerung wurden die Proliferationsphasen S und G2 als „G2-S-Index“ zusammengefasst und dem Anteil der Zellzyklus-inaktiven G1-Phase gegenübergestellt.

Korrelation Zellzyklus & HBP1-Expression
Ansatz #A-1: 48h Serumentzug

Stunde 0 + FCS		Stunde 4		Stunde 8		Stunde 12		Stunde 24		Stunde 48	
	%		%		%		%		%		%
G0/G1	49,62	G0/G1	45,25	G0/G1	48,61	G0/G1	50,78	G0/G1	58,99	G0/G1	52,02
G2/S	50,38	G2/S	54,75	G2/S	51,39	G2/S	49,22	G2/S	41,01	G2/S	47,98
HBP1: 2,38		**HBP1: 0,22**		**HBP1: 0,1**		**HBP1: 0,07**		**HBP1: 0,06**		**HBP1: 0,05**	

Tabelle 13: Zellzyklus und HBP1-Expression, Ansatz #A-1. Für jeden Messzeitpunkt sind die Zahlen aufgelistet, die in der ModFit LT™-Analyse für die prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellphasen ermittelt wurden. Die G2- und S-Phase wurden als G2-S-Index zusammengefasst (Proliferationsphasen). Da in der Messung nicht zwischen G0 und G1-Phase differenziert wurde, umfasst der gemessene G1-Anteil sowohl G0 als auch G1. In der letzten Zeile sind die Werte der relativen HBP1-Expression aufgeführt, die durch qPCR bestimmt wurden.

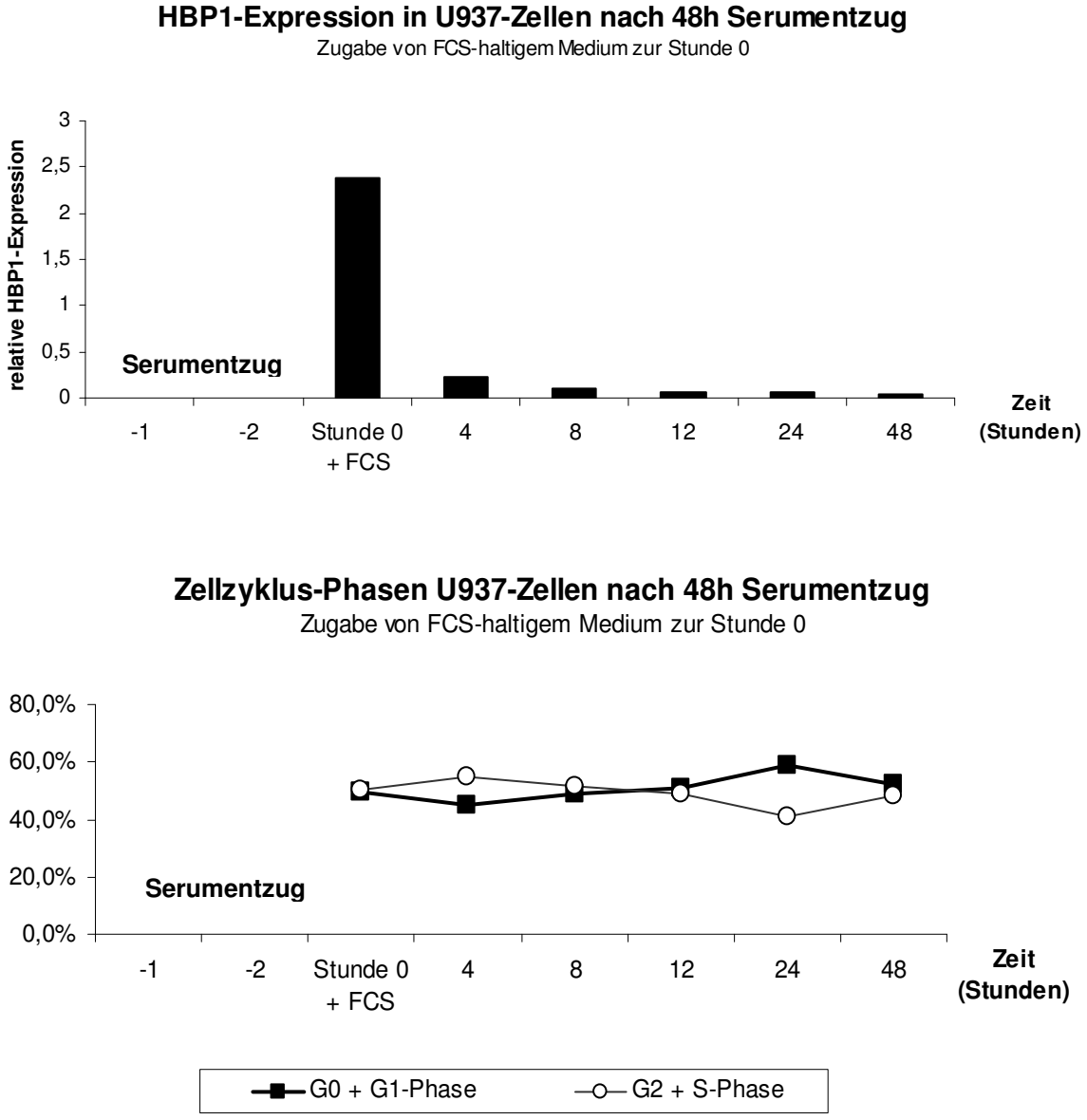


Abbildung 24: HBP1-Expression (oberer Teil der Abbildung) und zugehörige Zellzyklusphasen (unterer Teil der Abbildung) zur Stunde 0, sowie nach 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden nach Serumzugabe. Die U937-Zellen wurden 48 Stunden in FCS-freiem Medium gehalten (Ansatz #A-1), zur Stunde 0 wurde FCS-haltiges Medium zugegeben. Die sehr eindeutige Entwicklung der HBP1-Expression konnte nicht mit den gemessenen Zellzyklusphasen assoziiert werden.

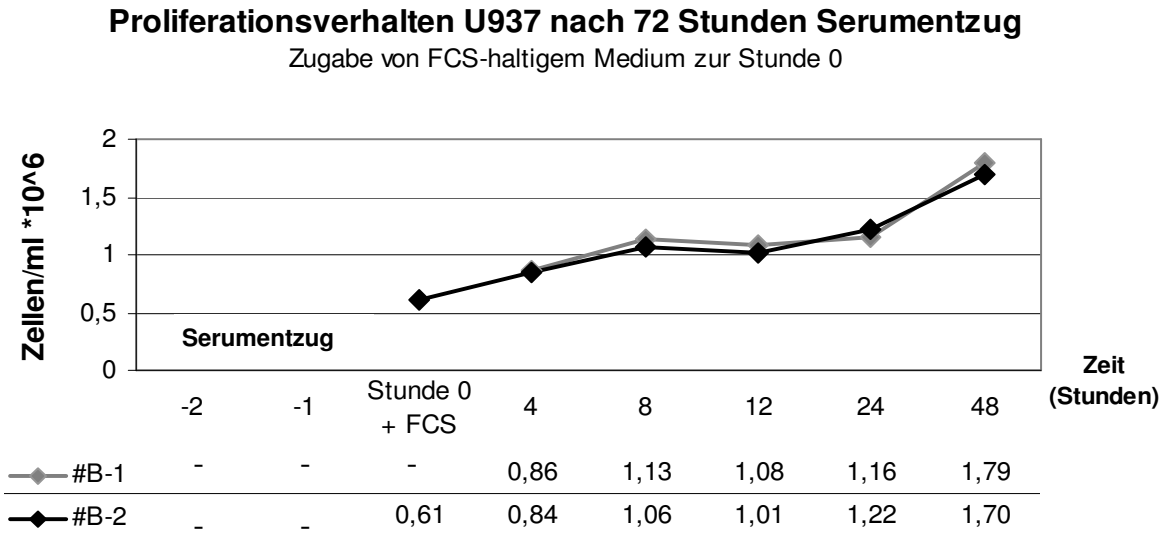


Abbildung 25: Proliferationsverhalten nach Serumentzug. Die dargestellten Zahlen sind jeweils Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Nach 72 Stunden Serumentzug wurde zur Stunde 0, sowie 4, 8, 12, 24, 48 nach FCS-Zugabe die Zellzahl bestimmt. Beide Ansätze zeigen einen Proliferationsanstieg.

In den Ansätzen #B-1 und #B-2 wurde die Zellzahl jeweils in Dreifachbestimmung ermittelt. Für die grafische Darstellung (Abb.25) wurden jeweils Mittelwerte berechnet. In der Analyse des Proliferationsverhaltens zeigte sich ein Wachstumsanstieg über den Beobachtungszeitraum von 48 Stunden nach Ablauf des Serumentzugsintervalls, doch auch das Proliferationsverhalten kann nicht mit der Entwicklung der HBP1-Expression korreliert werden.

3.3. Funktionelle Effekte durch reduzierte HBP1-Expression

In drei Ansätzen wurde HBP1 in K562-Zellen durch siRNAs ausgeschaltet und die Effekte auf die Expression der Zielgene des der Wnt-ß-Catenin-Signalweges cMyc und Cyclin D1 beobachtet. In quantitativer PCR wurde zunächst die relative HBP1-Expression ermittelt und dadurch die HBP1-Transfektions-Effizienz beurteilt. Im zweiten Schritt wurde die relative Expression der beiden Gene (cMyc, Cyclin D1) ebenfalls mit quantitativer PCR bestimmt. In allen drei Ansätzen zeigte sich ein vergleichbarer und effizienter Rückgang der HBP1-Expression in der transfizierten Probe. Jedoch konnten in der Zielgenanalyse keine Ergebnisse erzielt werden, die auf die HBP1-siRNA-Transfektion zurückzuführen wären. Weder für die cMyc-Expression noch für Cyclin D1 konnte ein Expressionsverhalten gezeigt werden, das mit der HBP1-Herunterregulation assoziiert werden könnte (siehe Daten *Anhang 5*).

Auf die Darstellung der Ergebnisse wurde verzichtet, da sie keine eindeutige Interpretation zulassen. In der Diksussion folgt eine methodische Fehlerdiskussion.

3.4. HBP1 in hämatopoetischen Progenitorzellen

Im Zentrum dieser Arbeit stehen die Ergebnisse der Versuche mit humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die Zellsortierung wurde in Zusammenarbeit mit dem Flow Cytometry Team der Arbeitsgruppe (C.Brendel, M.Dohse, T.Volkmann) durchgeführt. Abbildung 26 zeigt die mit Durchflusszytometrie ermittelten Daten während eines Sortiervorgangs (zur Sortierstrategie siehe auch *2.9.3. Sortierstrategie*). Je nach Population wurden in einem Versuch zwischen 4000 und 30000 Zellen gewonnen. In den durchflusszytometrisch sortierten Progenitorpopulationen der HSCs (hematopoietic stem cells), CMPs (common myeloid progenitors) und GMPs (granulocyte/macrophage progenitors) wurde die relative HBP1-Expression durch quantitative PCR bestimmt (zur Berechnung siehe *2.5.3. Relative Quantifizierung*).
Da mit einer sehr geringen cDNA-Menge gearbeitet werden musste, war in der quantitativen PCR erst nach hoher Zyklenzahl mit einem exponentiellen Fluoreszenzanstieg zu rechnen. Proben, die keine adäquate Dreifachbestimmung aufzeigten, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. In acht von zehn Fällen konnte ausreichend Zellmaterial sortiert werden. Insgesamt wurde die HBP1-Expression in den Populationen der HSCs, CMPs und GMPs von acht Patienten mit gesundem Knochenmark durch quantitative PCR untersucht..

In Abbildung 27 ist die ermittelte relative HBP1-Expression in den HSCs, CMPs und GMPs graphisch dargestellt (Rohdaten siehe *Anhang 6*). Eine genaue Auswertung mit Statistik liefert Abbildung 28. Die HSCs repräsentieren undifferenzierte Stammzellen, die sich in alle bekannten Blutzelllinien entwickeln können. Die aus den HSCs entstehenden CMPs markieren den Beginn der myeloischen Hämatopoese (Myelopoese). Im Verlauf der Myelopoese sind die CMPs und die sich aus ihnen entwickelnden GMPs zunehmend granulozytär differenzierte Zellen (siehe auch *1.3.1. Stamm- und Vorläuferzellen der Hämatopoese*).
Die Stammzellpopulation der HSCs zeigte im Vergleich zu den weiter differenzierten Progenitorpopulationen eine sehr hohe HBP1-Expression. Ausgehend von dieser hohen HBP1-Expression in den HSCs fielen die Expressionslevel im Laufe der weiteren Differenzierung deutlich ab. Differenzierungsgrad der hämatopoetischen Progenitorzellen und HBP1-Expression ergaben eine reziproke Korrelation. In der Population der CMPs war die HBP1-Expression signifikant reduziert ($p=0.017$) und fiel in den GMPs weiter ab. Auf Grund dieser Daten ist von einer spezifischen Expression des HBP1-Proteins in hämatopoetischen Stammzellen auszugehen.
.

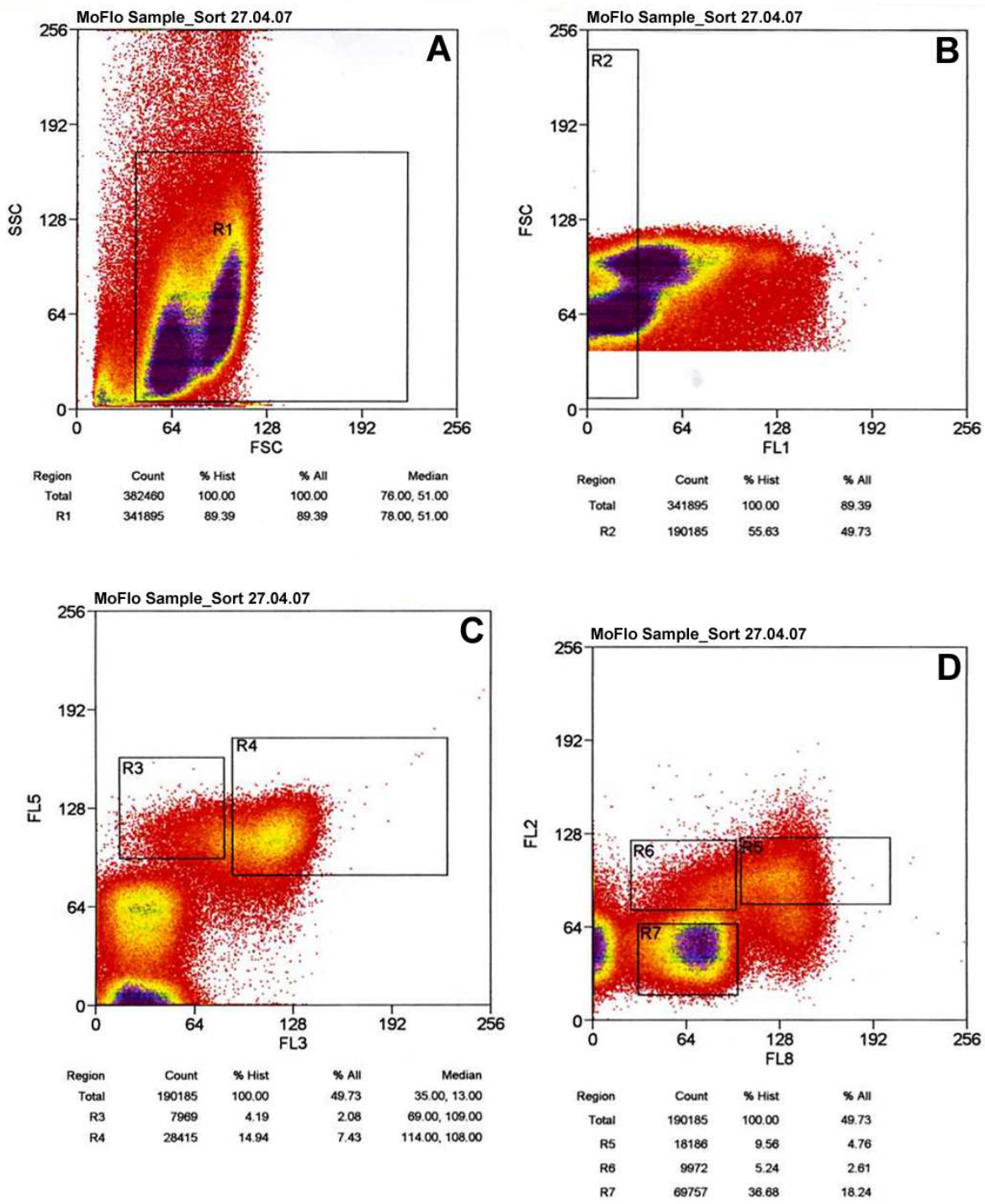


Abbildung 26: Akquirierte Daten der Durchflusszytometrie für die sequenzielle Sortierung in die hämatopoetischen Populationen der HSCs, CMPs und GMPs. Für den Sortiervorgang wurden die Gates (R1-R7) der einzelnen DotPlots (A-D) kombiniert.

Im Dotplot A wurde Forward-Scatter (FSC) gegen Side-Scatter (SSC) gemessen, R1 beschreibt den Bereich der Progenitorzellen. Dotplot B (FL1 = lin-FITC gegen FSC) beschreibt mit R2 die Lin-negative Zellen. Im dritten Fenster (Dotplot C) wurde FL3 = CD38-PerCP-Cy5.5 gegen FL5 = CD34-PE-Cy7 gemessen und vierten Fenster (Dotplot D) FL8 = CD45RA-APC gegen FL2 = CD123-PE messen. Für die Progenitorpopulationen wurden folgende Gate-Kombinationen festgelegt: HSCs (R1, R2, R3), CMPs (R1, R2, R4, R6) und GMPs (R1, R2, R4, R5). R7 wurde nicht berücksichtigt. Zur Sortierstrategie siehe auch *2.9.3. Sortierstrategie*.

Im vorliegenden Beispiel (Sort 27.04.07 – Patient 2) wurden für die HSCs ~13000 Zellen, für die CMPs ~4000 Zellen und für die GMP ~ 14000 sortiert. In den Legenden ist die prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Gates angegeben.

In Zusammenarbeit mit C.Brendel, M.Dohse, T.Volkmann

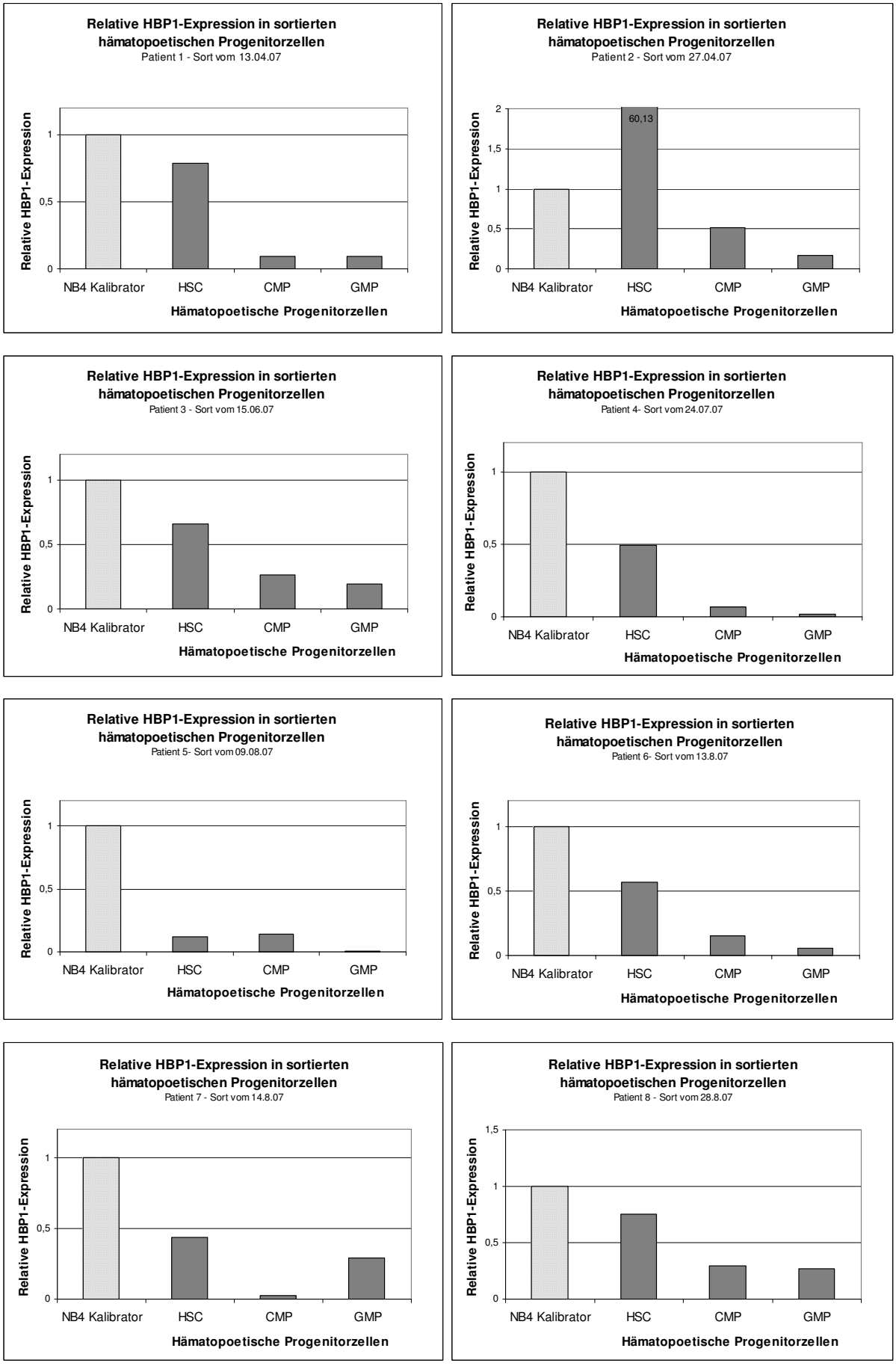
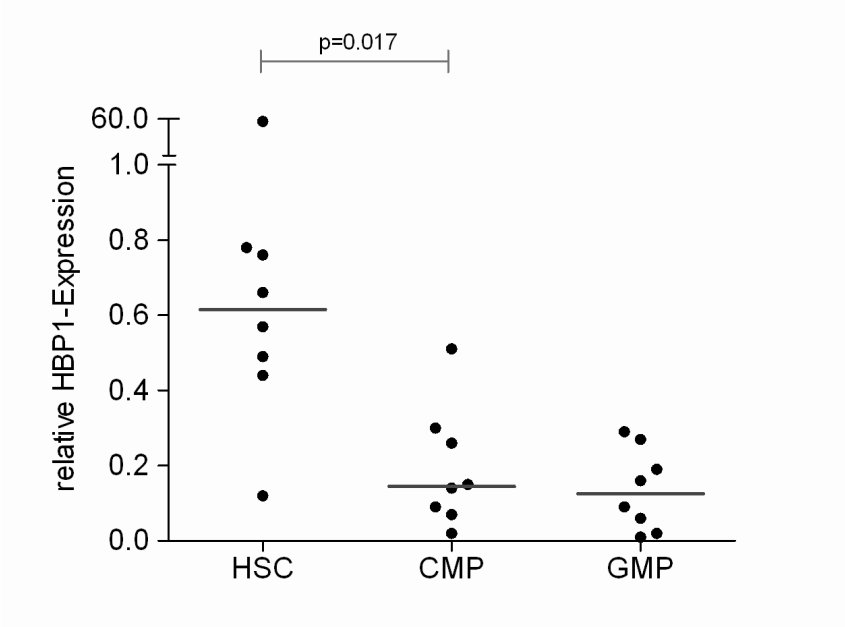


Abbildung 27: Relative HBP1-Expression in sortierten hämatopoetischen Progenitorzellen.
Die Daten stammen aus sortierten Progenitorzellen acht verschiedener Patienten. Dargestellt ist für jeden Patienten die HBP1-Expression in den HSCs, CMPs und GMPs. In sieben von acht Fällen wurde die höchste HBP1-Expression in der Population der HSCs (hematopoietic stem cells) gemessen. In den CMPs und GMPs wurde eine deutlich reduzierte HBP1-Expression registriert. Von den HSCs über die CMPs bis zu den GMPs zeigte sich in der HBP1-Expression eine fallende Tendenz. Als Kalibrator (rel.HBP1 = 1) diente die Zelllinie NB4 (schraffierte Säule). Rohdaten im *Anhang 6*.



	HSC	CMP	GMP
Median	0,615	0,145	0,125
Mittelwert	7,994	0,193	0,136
Standardfehler	7,448	0,056	0,038

Abbildung 28: Relative HBP1-Expression in hämatopoetischen Progenitorzellen (n=8). Es zeigte sich eine hohe HBP1-Expression in hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) sowie fallende Expressionslevel im Laufe der myeloischen Differenzierung. Der Expressionsabfall von den HSCs zu den CMPs ist statistisch signifikant (p=0.017). Von den CMPs zu den GMPs zeigte sich ebenfalls ein Expressionsabfall. NB4-cDNA wurde als Kalibrator verwendet (rel.HBP1 = 1). Auswertung und Statistik mit *GraphPad Prism Version 5, San Diego California USA.*

3.5. HBP1-Expression in AML-Erstdiagnosen

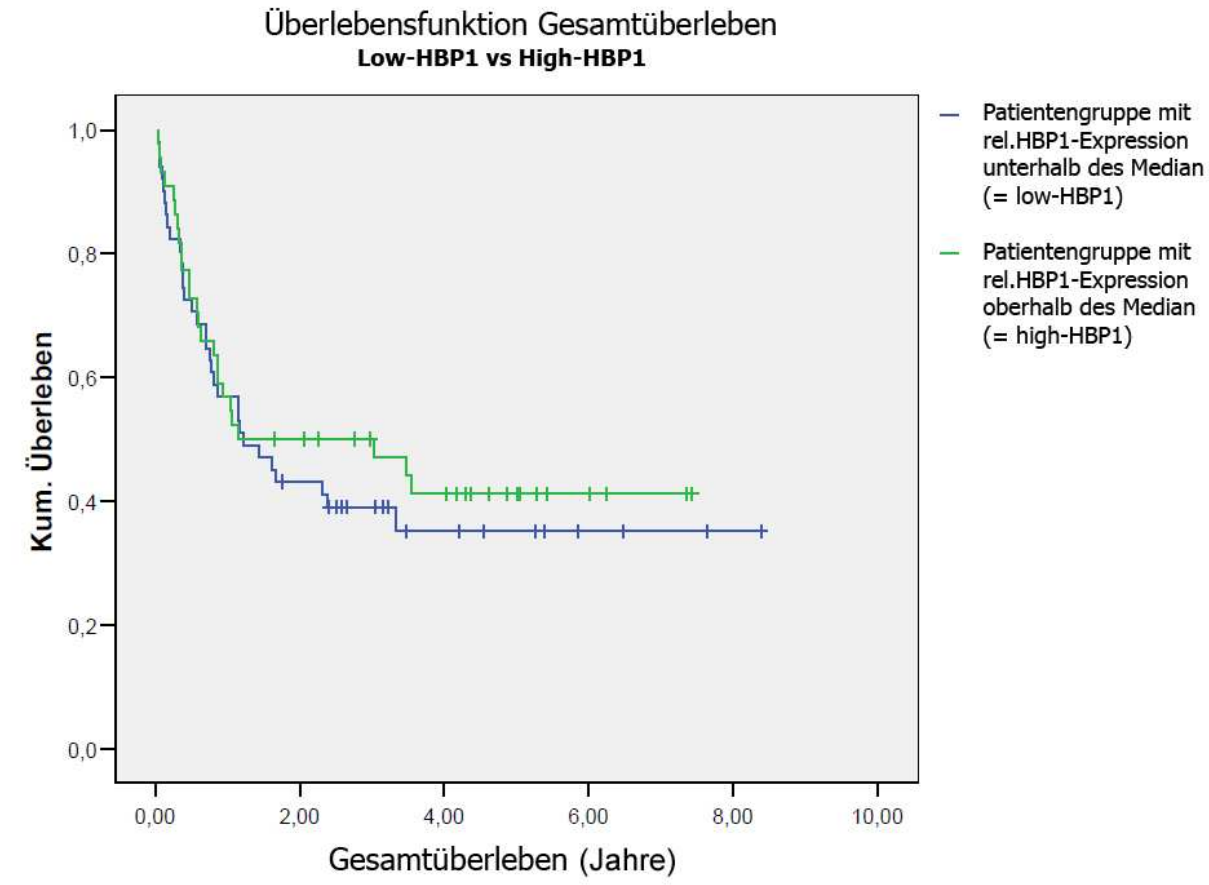
3.5.1. HBP1-Screening (qPCR)

Parallel zu den Zellkulturversuchen wurde die HBP1-Expression bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) untersucht. Es wurden Knochenmarkzellen von 114 Patienten mit AML-Erstdiagnose auf HBP1 mittels quantitativer PCR gescreent. AML-Subtyp und klinische Daten waren nicht bekannt und nicht zugänglich. Als Ausgangsmaterial dienten cDNA-Proben aus Knochenmark-Zellen von AML-Patienten der AG Illmer der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden. Von Herrn Dr. Illmer wurden AML-Proben à 5µl cDNA zur Verfügung gestellt. Für den Readout wurden die Proben 1:1 mit 5µl RNAse-freiem H_2O verdünnt. Die HBP1-Expression wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. In insgesamt sechs PCR-Läufen wurden alle AML-Proben untersucht, die HBP1-Expression wurde jeweils durch Zweifach-Bestimmung ermittelt (zur Berechnung siehe *2.5.3. Relative Quantifizierung*).

3.5.2. Korrelation mit klinischen Daten

Die Ergebnisse dieses Genscreenings wurden von der Studienzentrale der Deutschen Studieninitiative Leukämie (DSIL) des Dresdener Universitätsklinikums mit klinischen Daten korreliert. 95 Patienten mit vollständigem Datensatz wurden in die Analyse (Analysesoftware SPSS Statistics 17.0) eingeschlossen. Für die statistische Analyse wurde die mediane relative HBP1-Expression bestimmt. Patienten mit einer relativen HBP1-Expression oberhalb des Medians (high-HBP1, 44 Patienten, rel.HBP1>0,12) wurden mit Patienten verglichen, deren HBP1-Expression unterhalb des Medians (low-HBP1, 51 Patienten, rel.HBP1< 0,12) lagen.

Die Analyse ergab keine signifikanten Ergebnisse. Das Outcome war für die Patientengruppe mit einer HBP1-Expression unterhalb des Medians schlechter, jedoch nicht von statistischer Relevanz (siehe Abbildung 29, Kaplan-Meier-Statistik). Für 46 Patienten lag ein aberranter Karyotyp vor, jedoch auch die Korrelation mit Karyotypen ließ keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen HBP1-Expression und Karyotyp erkennen, siehe Tabelle 14 (Originaldaten der Studienzentrale Dresden).



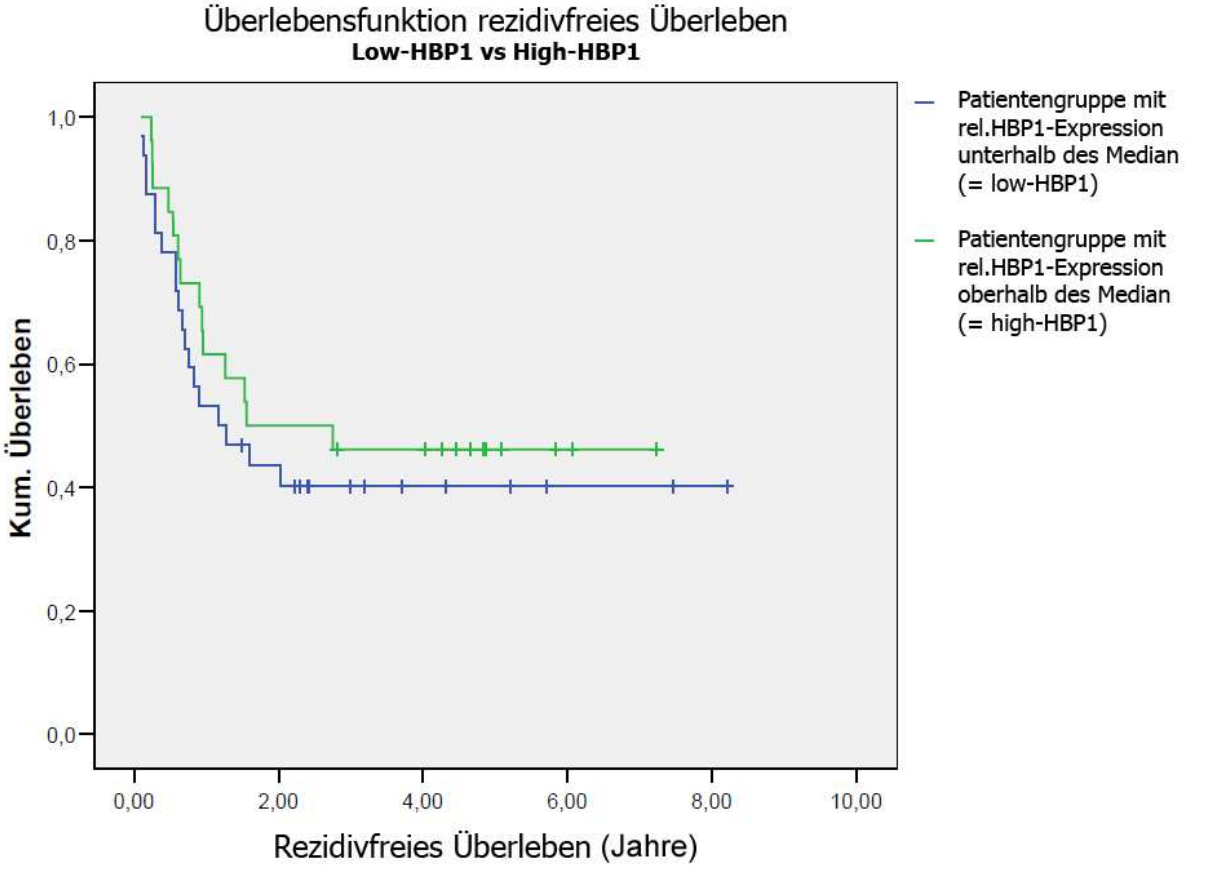


Abbildung 29: Überlebenskurven der auf HBP1 gescreenten AML-Patienten (Originaldaten der Studienzentrale Dresden, Kaplan-Meier-Statistik). Gesamtüberleben (oben) und rezidivfreies Überleben (unten). Es wurden Patienten mit niedriger HBP1-Expression (die rel.HBP1-Expression lag unterhalb der medianen HBP1-Expression = low-HBP1) verglichen mit Patienten mit einer hohen HBP1-Expression (die rel.HBP1-Expression lag oberhalb der medianen HBP1-Expression = high-HBP1). Es konnte ein leichter Überlebensvorteil für Patienten der high-HBP1-Gruppe (grüne Kurve) gegenüber der Patientengruppe low-HBP1 (blaue Kurve), jedoch nicht von statistischer Relevanz.

Korrelation AML-Karyotyp und HBP1-Expression
- Originaldaten der Studienzentrale Dresden -

Karyotyp			HBP1-Expression		Gesamt
			low-HBP1	high-HBP1	
Aberrations-gruppe	t821	Anzahl	4	3	7
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	57,1%	42,9%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	14,8%	15,8%	
	inv16	Anzahl	12	7	19
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	63,2%	36,8%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	44,4%	36,8%	
	Del5	Anzahl	3	1	4
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	75,0%	25,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	11,1%	5,3%	
	Mo7	Anzahl	4	3	7
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	57,1%	42,9%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	14,8%	15,8%	
	Del7	Anzahl	2	2	4
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	50,0%	50,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	7,4%	10,5%	
	Moand	Anzahl	2	0	2
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	100,0%	,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	7,4%	,0%	
	Inv3q	Anzahl	0	1	1
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	,0%	100,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	,0%	5,3%	
	Tri8	Anzahl	3	1	4
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	75,0%	25,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	11,1%	5,3%	
	Tri11	Anzahl	0	1	1
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	,0%	100,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	,0%	5,3%	
	Tri13	Anzahl	2	0	2
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	100,0%	,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	7,4%	,0%	
	Tri21	Anzahl	1	1	2
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	50,0%	50,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	3,7%	5,3%	

Prozentsätze und Gesamtwerte beruhen auf den Befragten.

Fortsetzung: Korrelation AML-Karyotyp und HBP1-Expression

- Originaldaten der Studienzentrale Dresden -

Karyotyp			HBP1-Expression		Gesamt
			low-HBP1	high-HBP1	
Aberrations-gruppe	Tri22	Anzahl	5	3	8
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	62,5%	37,5%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	18,5%	15,8%	
	t911	Anzahl	0	1	1
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	,0%	100,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	,0%	5,3%	
	komplex	Anzahl	8	3	11
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	72,7%	27,3%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	29,6%	15,8%	
	MoY	Anzahl	0	1	1
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	,0%	100,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	,0%	5,3%	
	abnl11q	Anzahl	1	2	3
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	33,3%	66,7%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	3,7%	10,5%	
	abnl12p	Anzahl	3	0	3
		Verteilung innerhalb der Aberrationsgruppe	100,0%	,0%	
		Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp	11,1%	,0%	
Gesamt		Anzahl	27	19	46

Prozentsätze und Gesamtwerte beruhen auf den Befragten.

a. Dichotomie-Gruppe tabellarisch dargestellt bei Wert 1.

Tabelle 14: Karyotypen der auf HBP1 gescreenten AML Patienten. Es ist kein statistisch signifikanter Trend zu erkennen. Insgesamt war ein aberranter Karyotyp von 46 Patienten bekannt. In der Tabelle ist jeweils die genetische Aberration angegeben, sowie die Anzahl der Patienten, deren Karyotyp die jeweilige Mutation aufwies. Innerhalb einer Aberrations-Gruppe (z.B. t821) ist jeweils in Prozent angegeben wie sich die Patienten mit diesem Karyotypen auf die Gruppen low-HBP1 und high-HBP1 verteilten. Die Prozentangabe „Anteil von allen Patienten mit aberrantem Karyotyp“ beschreibt den Anteil der Patienten mit einem bestimmten Karyotyp von allen Patienten mit low-HBP1-Expression bzw. den Anteil der Patienten mit bestimmtem Karyotyp von allen Patienten mit high-HBP1-Expression.

Für die Differnezierung low-HBP1 und high-HBP1 wurde die mediane HBP1-Expression gewählt (low-HBP1 = rel.HBP1 < Median; high-HBP1 = rel.HBP1 > Median). Median: rel.HBP1 = 0,12

4. Diskussion

4.1. HBP1 in verschiedenen Zelllinien

Die Analyse der HBP1-Expression in Zelllinien stellte sich als schwierig heraus. Für die AML-Zelllinien ergaben sich unterschiedlich starke HBP1-Expressionen. Tendenziell zeigten die Zelllinien lymphatischer Herkunft (Jurkat, SU-DHL, SSK41, Karpas, U937) eine geringere HBP1-Expression als die myeloischen Zelllinien. Diese Tendenz bestätigt die Vermutung HBP1 könne in die Regulation der myeloischen Differenzierung einbezogen sein (84;158). Nach ihrer HBP1-Expression können die AML-Zelllinien in die folgende Reihenfolge gebracht werden (Screening #1-A). HL60 Zellen zeigten die geringste, Oci-AML3-Zellen die höchste HBP1-Expression:

HL60	NB4	KG1a	ME-1	MV4-11	Kasumi	OCI-AML3
1	2	3	4	5	6	7

Im Screening #1-B ergab sich anhand der HBP1-Expression für die AML-Linien eine andere Reihenfolge. NB4#2 zeigte die geringste, NB4#1 die höchste HBP1-Expression:

NB4#2	MV4-11	OCI-AML3	KG1a	Kasumi	NB4#1
1	2	3	4	5	6

Während für die CML-Proben (K562, Lama) in beiden PCR-Läufen eine sehr hohe relative HBP1-Expression auffiel, zeigte die Expressionsanalyse in den mitgeführten Lymphomzelllinien (Jurkat, SU-DHL, SSK41, Karpas, U937) ein ähnlich schwankendes Verhalten wie in den AML-Proben. Die Schwankungen können nicht dadurch begründet werden, dass die beiden PCR-Läufe untereinander nicht vergleichbar seien, da auch innerhalb der Zelllinien (siehe NB4) eines PCR-Laufes starke Schwankungen auffielen. Für die Versuchsreihen wurde jeweils eine andere cDNA verwendet, so dass die Ursache für die Schwankungen im Zusammenhang mit der cDNA-Synthese gesucht werden muss.

Am stärksten fielen Schwankungen der Zelllinie U937 (histiozytäres Lymphom) auf. Von allen analysierten Proben wurde für U937-Zellen im Screening #1-A die geringste HBP1-Expression nachgewiesen. Im Screening #1-B wurden zwei U937-Proben mitgeführt, die aus unterschiedlichen Kulturflaschen entnommen und deren cDNA im gleichen Versuchsansatz synthetisiert wurde. Die Probe U937#1 zeigte eine sehr geringe HBP1-Expression, die Probe U937#2 dagegen zeigte die höchste relative HBP1-Expression von allen im Screening #1-B analysierten Proben.

Diese Beobachtungen zeigen, dass das Screening von Zellkulturproben nicht die geeignete Methode ist um eine Aussage zwischen HBP1-Expression und AML-Entität treffen zu können. Daher wurde auf eine weitere Analyse verzichtet. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die

Hypothese aufgestellt, dass die HBP1-Expression mit bestimmten Zellzyklusphasen korreliert und im Zellkulturscreening vom Zeitpunkt der Probenentnahme abhängt.

4.2. HBP1 und Zellzyklus

Aus den Versuchen zur HBP1-Expression nach Serumentzug und Zellzykluskorrelation sind folgende Ergebnisse zu diskutieren:

1. Nach Ablauf des serumfreien Intervalls ist HBP1 stark exprimiert
2. Nach Serumzugabe ist ein rasanter Abfall mit anschließend moderatem Wiederanstieg der HBP1-Expression zu beobachten
3. Die HBP1-Expression kann nicht mit den gemessenen Zellzyklus-Phasen korreliert werden

In diesem Versuchsansatz sollte die Hyptothese überprüft werden, ob die HBP1-Expression mit bestimmten Zellzyklus-Phasen korreliert. U937-Zellen wurden gewählt, da in dieser Zelllinie die stärksten Schwankungen im Zell-Screening aufgefallen waren (siehe *3.1. HBP1-Screening in verschiedenen Zelllinien* und *4.1. HBP1 in verschiedenen Zelllinien*). Foetales Kälberserum (FCS = foetal calf serum) enthält Wachstumsfaktoren und wird Zellen als Nährlösung zugegeben um die Zellzyklus-Progression aufrecht zu halten (103). Durch Serumentzug sollte in den U397-Zellen durch Wegnahme der Wachstumsfaktoren ein Wachstumsarrest erreicht werden.
Die hohe HPB1-Expression könnte eine Antwort auf die zellären Stressbedingung unter Serumentzug sein. HBP1 ist in verschiedene Mechanismen der adäquaten Stressregulation (p38-MAP-Kinase, ROS-Regulation) beteiligt (17;156;159). Jedoch konnten wir ebenfalls zeigen, dass HBP1 in hämatopoetischen Stammzellen hoch exprimiert ist (siehe *3.4. HBP1 in hämatopoetischen Progenitorzellen)*. Also sind die Ergebnisse unseres Serumentzugsmodells auch im Hinblick auf Stammzell-assoziierte Eigenschaften zu interpretieren. Es ist bekannt, dass in Zellkulturexperimenten durch Serumentzug der zelluläre Ruhestatus der Quiescence induziert werden kann. Quiescence ist definiert als reversibler Wachstums- und Proliferationsarrest (27) und zählt zu den Stammzellcharakteristika. Dies ist im Hinblick auf die nachfolgende Diskussion zu HBP1 in hämatopoetischen Stammzellen interessant (*4.4. HPB1 in hämatopoetischen Progenitorzellen*). Es ist ein besonderes Merkmal der hämatopoetischen Stammzellen, dass sich die Zellen im Quiescence-Status befinden und auf Anreiz schnell von diesem Ruhestatus auf Proliferation und Differenzierung umschalten können (relative Quiescence) (7;151). Quiescence ist der Gegenspieler zur Proliferation und definiert als reversibler Wachstums- und Proliferationsarrest. Er entspricht der G0-Phase des Zellzyklus. Von der Senescence, definiert als dauerhafter Wachstumsarrest (27), unterscheidet sich der Quiescence-Status durch seine Reversibilität. Unter Serumentzugsbedingungen wurden verschiedene Genscreenings durchgeführt, um Quiescence-induzierende Mechanismen

aufzudecken (19;33;86). Die durchgeführte Versuchsreihe mit Serumentzug stellt somit ein Quiescence-induzierendes Modell dar.

Unter diesen Voraussetzungen ist die von uns beobachtete hohe HBP1-Expression nach Ablauf des serumfreien Intervalls interpretierbar. Die hohe HBP1-Expression könnte auf die induzierte Quiescence zurück zu führen sein. Serumzugabe wirkt als Proliferationsanreiz, serumentzogene Zellen verlassen den Quiescence-Status mit dem Moment der Serumzugabe (19). Nach Zugabe von FCS konnten wir in den serumentzogenen Zellen eine starke Herunterregulation der HBP1-Expression beobachten – das Abfallen der HBP1-Expression könnte mit FCS-induzierter Aufhebung der Quiescence assoziiert sein.
Der langsame Wiederanstieg ist nicht eindeutig zu interpretieren. Es ist jedoch durchaus denkbar, dass die HBP1-Konzentration bis auf minimale Expression sinkt bis die Zellen die Quiescence verlassen haben und sich schließlich eine Verteilung unter Normal-Bedingungen einstellt.

Die Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse lassen keine eindeutige Interpretation zu. Es ist durchaus denkbar, dass der Beobachtungzeitraum zu kurz war oder die Versuchsbedingungen mit Serumentzug durch 0%-FCS-Zusatz nicht optimal waren, um ein eindeutiges Zellzyklus-Verhalten beobachten zu können. Festzuhalten bleibt, dass den sehr eindeutigen Ergebnissen der HBP1-Expression keine der gemessenen Zellzyklus-Phasen zuzuordnen ist und auch eine Assoziation mit der G1-Phase nicht zu erkennen ist. Eine denkbare Interpretation ist, dass eine Korrelation mit der nicht gemessenen G0-Phase der Quiescence besteht. Diese Interpretation würde einen weiteren Baustein zur HBP1-Quiescence Hypothese liefern.

In unserer Serumentzugsreihe wurde die Hypothese bestätigt, dass die HBP1-Expression vom Zeitpunkt der Probenentnahme abhängig ist. Die Ergebnisse bekräftigen die in *4.4. HPB1 in hämatopoetischen Progenitorzellen* vorgestellte Hypothese, dass HBP1 in molekulare Mechanismen hämatopoetischer Stammzellen integriert ist – und rückt die Quiescence-Regulation hämatopoetischer Stammzellen in den Fokus.

4.3. Funktionelle Effekte durch reduzierte HBP1-Expression

HBP1 besitzt suppressive Wirkung auf die Wnt-ß-Catenin-Signalkaskade (71;104;124). In unseren Versuchen sollte die Interaktion zwischen HBP1 und der Wnt-ß-Catenin-Signalkaskade in leukämischen Zellen analysiert werden. Durch siRNA-Transfektion wurde die HBP1-Expression reduziert und die Auswirkungen der reduzierten HBP1-Expression auf die Wnt-ß-Catenin-Signalkaskade beobachtet. Für die Versuchsreihe wurden K562-Zellen gewählt, da sie im HBP1-Screening durch konstant hohe HBP1-Expression aufgefallen waren. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurden K562-Zellen für HBP1-Versuche verwendet (158).
Das erwartete Ergebnis mit Anstieg der beiden Wnt-ß-Catenin-Zielgene Cyclin D1 und cMyc in der mit HBP1-siRNA transfizierten Probe konnte jedoch nicht gezeigt werden. Die Expressionsanalyse der Zielgene zeigte in allen drei Ansätzen ein unterschiedliches Verhalten.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass unser Versuchsmodell nicht effizient genug war, um eine Wnt-suppressive HBP1-Wirkung zu analysieren. Ein möglicher Hinweis dafür ist die in unseren Versuchen fehlende Wnt-Aktivierung. In anderen Arbeitsgruppen wurden mit HBP1-siRNA transfizierte Zellen gleichzeitig mit einem sogenannten TOPFLASH-Reporter transfiziert. Diese TOPFLASH-Transfektion aktiviert die Wnt-ß-Catenin-Signalkaskade (71;124). Es ist denkbar, dass die HBP1 Wirkung bei fehlender Wnt-Aktivierung zu gering ist, um im Gegensatz zu transfizierten Zellen mit HBP1-Überexpression (158) einen suppressiven HBP1-Effekt auf Cyclin D1 und cMyc sehen zu können.
Auffallend war die Beobachtung, dass HBP1 in der mit Nonsense-siRNA transfizierten Probe deutlich höher war als in der untransfizierten Kontroll-Probe. Für dieses Phämonen ist keine eindeutige Erklärung zu finden, es lässt jedoch darauf schließen, dass eventuelle Transfektionseffekte oder die siRNA selbst die HBP1-Expression beeinflussen und somit eine eindeutige Transfektionsanalyse nicht möglich war.
Diese Ausführungen zeigen, dass die von uns erzielten Ergebnisse keine Interpretation zur HBP1-Wnt-Interaktion in leukämischen Zellen zulassen und eine Modifikation des Versuchsmodells erforderlich ist.

4.4. HPB1 in hämatopoetischen Progenitorzellen

In den Versuchen mit sortierten hämatopoetischen Progenitorpopulationen wurden verschiedene Beobachtungen gemacht:

1. Das HMG-Box-Protein HBP1 ist in der Population der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) stark exprimiert.
2. In der aus den HSCs hervorgehenden Population der myeloischen Vorläuferzellen (CMPs) ist ein deutlicher Abfall der HBP1-Expression zu erkennen.
3. In den Progenitorpopulationen zeigt sich eine fallende Tendenz der HBP1-Expression von den HSCs über die CMPs zu den GMPs.

4.4.1. These: HBP1 ist an der Regulation zentraler Stammzelleigenschaften beteiligt

Da wir in der durchflusszytometrisch sortierten humanen HSC-Population eine hohe HBP1-Expression zeigen konnten, ist davon auszugehen, dass HBP1 in hämatopoetischen Zellen stammzellspezifisch exprimiert wird. Wir postulieren, dass das HMG-Box-Protein HBP1 in die Regulation zentraler Stammzelleigenschaften integriert ist. Für verschiedene Eigenschaften des HBP1-Proteins und HBP1-assoziierte Signalwege ist eine Stammzellspezifität belegt.

4.4.1.1. HSC-Spezifität der p38-MAP-Kinase

Eine Schlüsselrolle kommt dabei dem p38-MAP-Kinase-Signalweg zu. Unsere Ergebnisse mit hoher HBP1-Expression in den hämatopoetischen Stammzellen können durch Kenntnisse zum p38-MAP-Kinase-Signalweg ergänzt werden. Es wurde gezeigt, dass die p38-MAP-Kinase in hämatopoetischen Zellen stammzellspezifisch aktiviert wird (62). Da HBP1 als Zielgen der p38-MAP-Kinase in diesen Signalweg integriert ist (146;156;159), kann auch für HBP1 eine stammzellspezifische Aktivität gefordert werden.

Vor allem unter Stressbedingungen durch Sauerstoffradikale (reactive oxygen species = ROS) zeigen HSCs eine hohe p38-MAP-Kinase-Aktivität (62;65). Jedoch auch im ROS-armen Milieu der sogenannten Stammzellnische zeigen HSCs p38-MAP-Kinase-Aktivität (65). Als Nische werden Zellen bezeichnet, die die Stammzellen umgeben und die Stammzelleigenschaften der Selbsterneuerung, Pluripotenz und relativen Quiescence regulieren (127). Hämatopoetische Stammzellen sind im Knochenmark von einer Nische aus Osteoblasten umgeben (7;91). Diese Nische aus Osteoblasten stellt die sauerstoffärmste Region des Knochenmarks dar (7;65). Es wird davon ausgegangen, dass die p38-MAP-Kinase in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen (ROS-Status) eine unterschiedliche Rolle spielt und im ROS-armen Milieu für die Repopulationsfähigkeit der Stammzellen essentiell ist (65). HBP1 könnte in diese Mechanismen integriert sein.

4.4.1.2. Reaktive Sauerstoffradikale in hämatopoetischen Stammzellen

Stammzellnische und ROS-Bedingungen bieten einen weiteren Anhaltpunkt für die Interpretation der hohen HBP1-Expression in den HSCs. Nach aktuellem Wissensstand werden Stammzelleigenschaften durch die Stammzell-Nische aufrecht erhalten (7;91). Das sauerstoffarme Milieu der Nische schützt die Zellen vor oxidativem Stress durch Sauerstoffradikale (ROS) (7;65). Es ist bekannt, dass eine adäquate Steuerung der ROS-Konzentration für die Stammzelleigenschaften der HSCs sowie den Erhalt einer effektiven Hämatopoese von Bedeutung ist. Derzeit gibt es jedoch wenige Kenntnisse über zugrunde liegende molekulare Mechanismen (96;147;148).

Fehlregulationen der Stressantwort mit konsekutiv erhöhtem ROS-Spiegel führen dazu, dass hämatopoetische Stammzellen nicht mehr in der Lage sind, den Quiescence-Status aufrecht zu erhalten und die Fähigkeit der Selbsterneuerung verlieren. In Transplantationsversuchen mit Mäusen wurden Knochenmarkversagen und schlechtere Überlebensraten für Mäuse gezeigt, in deren Stammzelltransplantat eine ROS-Dysregulation vorlag (61;62;96;148).

HBP1 ist an der Regulation der intrazellulären ROS-Konzentration beteiligt (17). Reaktive Sauerstoffradikale werden von der NADPH-Oxidase (NOX) aus Sauerstoffmolekülen generiert. Es gibt verschiedene Oxidase-Isoformen (NOX1-5) (78). In hämatopoetischen Stammzellen kommen multiple Isoformen der NADPH-Oxidase vor und zeigen eine geringe jedoch konstitutive Aktivität (105;106). Mit Fluoreszenz-Mikroskopie konnte die Co-Expression von CD34-Oberflächenantigenen und der NOX2 nachgewiesen werden (43). Interessanterweise interagiert HBP1 genau mit dieser NOX2 (17). Die DNA-bindende Domäne (HMG-Box) des HBP1-Proteins bindet an den Promotor der p47phox-Untereinheit und unterdrückt die

Transkription des p47phox Genes. Es resultiert eine verminderte ROS-Produktion. Vor diesem Hintergrund kann die Regulation des ROS-Status zum Schutz stammzellspezifischer Eigenschaften eine weitere Begründung liefern für die von uns gezeigte hohe HBP1-Expression in den HSCs

4.4.2. These: HBP1 ist an myeloischer Differenzierung beteiligt

CMPs (common myeloid progenitors) und GMPs (granulocyte/macrophage progenitors) markieren den Beginn der terminalen Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen. In der Annahme, dass HBP1 an der Regulation zentraler Stammzelleigenschaften beteiligt ist, wird die in unseren Versuchen gezeigte HBP1-Herunterregulation in den Progenitorpopulationen der CMPs und GMPs erklärbar. Jedoch ist davon auszugehen, dass HBP1 auch in den Progenitorpopulationen eine Rolle spielt. In der vorgestellten Versuchsreihe dieser Arbeit wurde in den Progenitorpopulationen ebenfalls eine HBP1-Expression festgestellt, wobei von den CMPs zu den GMPs eine fallende Tendenz der Genexpression zu erkennen war.

4.4.2.1. Der Wnt-ß-Catenin-Signalweg in physiologischer Hämatopoese

Einen Ansatzpunkt liefert die HBP1-Interaktion mit dem Wnt-ß-Catenin-Signalweg. In der aktuellen Literatur wird der Wnt-ß-Catenin-Kaskade eine entscheidende Rolle in der Regulation von Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen zugeschrieben (66;72;130;155). Experimente mit sortierten Maus-Knochenmark-Zellen zeigten, dass eine erhöhte Wnt-ß-Catenin Aktivität zu völligem Versagen der granulozytären Differenzierung führt. Im Knochenmark mit ß-Catenin-überexprimierenden Zellen konnten weder Granulozyten noch GMPs nachgewiesen werden, dagegen jedoch eine erhöhte Anzahl erythrozytärer Vorläuferzellen (72). Demnach lenkt eine erhöhte Wnt-ß-Catenin-Aktivität die hämatopoetische Entwicklung in Richtung der erythrozytären Reihe und weg von der granulozytären Differenzierung. Eine ähnliche Interpretation liefern Ergebnisse aus ß-Catenin-Knockout-Experimenten. Mäuse, in denen ß-Catenin ausgeschaltet wurde, zeigten in den untersuchten Populationen eine vollkommen normale Hämatopoese. Es wurde eine normale Anzahl von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten nachgewiesen (66).
Für die granulozyäre Differenzierung scheint eine geringe Wnt-ß-Catenin-Aktivität von entscheidender Bedeutung – vor allem auf Höhe der CMPs, da hier zwischen granulozytärer und erythrozytärer Differenzierung entschieden wird. HBP1 könnte mit negativer Wirkung auf den Wnt-ß-Catenin-Signalweg (71;104;124) an dieser Regulation der Granulopoese beteiligt sein. Die Wnt-suppresive Wirkung des HBP1 Preoteins könnte demnach eine Erklärung sein für die von uns beobachtete tendenziell höhere HBP1-Expression in CMPs gegenüber den GMPs, siehe Abbildung 30.

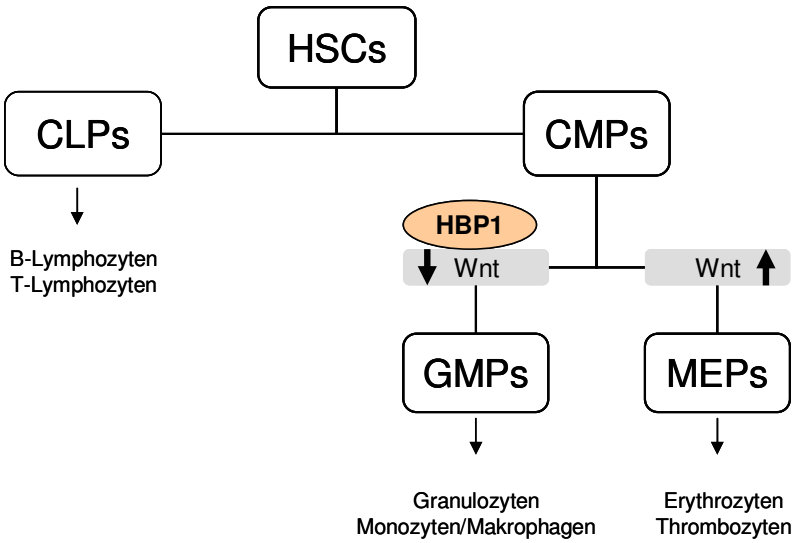


Abbildung 30: Modell zur Wechselwirkung zwischen HBP1 und der Wnt-ß-Catenin-Kaskade in Hämatopoese.
Für die granulozyäre Differenzierung scheint eine niedrige Wnt-Aktivität essentiell.
HBP1 könnte durch Wnt-suppressive Wirkung an der Regulation der Granulopoese beteiligt sein. Erstellt nach (66;72;124;155)
physiologischer

4.4.2.2. Reaktive Sauerstoffradikale in der Hämatopoese

Ein weiterer Zusammenhang zwischen hämatopoetischer Differenzierung und der von uns beobachteten HBP1-Herunterregulation im Laufe der Granulopoese besteht erneut in der Steuerung der Konzentration reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) in hämatopoetischen Zellen. Auf dem Weg aus der sauerstoffarmen Knochenmarknische in die periphere Blutbahn gelangen hämatopoetische Zellen in zunehmend sauerstoffreichere Regionen (106).
In den ruhenden hämatopoetischen Stammzellen der Knochenmarknische wird die intrazelluläre ROS-Konzentration gering gehalten. Dagegen weisen Stammzellen ansteigende intrazelluläre ROS-Konzentrationen auf, wenn der Beginn der Differenzierung bevor steht. In hämatopoetischen Progenitorzellen mit einer hohen ROS-Konzentration wird eine Entwicklung zu Gunsten der myeloischen Differenzierung beschrieben (65). Für verschiedene Krankheiten myeloischer Entität (Myelodysplastisches Syndrom, CML, AML) wurde ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsprogression und erhöhtem ROS-Spiegel gesehen (118;123). Es wurde die These aufgestellt, dass bei AML-Patienten mit FLT3-ITD-Mutation die Aggressivität und die schlechte Prognose der Erkrankgung auf erhöhte intrazelluläre ROS-Konzentrationen zurück zu führen ist (122).
Diese Fakten verdeutlichen, dass reaktive Sauerstoffradikale an myeloischer Differenzierung beteiligt sind. Logische Konsequenz ist, dass Regulationsmechanismen, die die ROS-Konzentration senken, in hämatopoetischen Zellen der myeloischen Linie weniger aktiv sind als in den Stammzellen. HBP1 - als Negativ-Regulator des intrazellulären ROS-Spiegels (17) - sollte demnach in CMPs und GMPs weniger aktiv sein als in hämatopoetischen Stammzellen. Die von uns beobachtete fallende Tenzdenz mit der höchsten HBP1-Expression in den HSC und der niedrigsten HBP1-Konzentration in den GMPs bestätigt diese Forderung.

4.5. HBP1-Expression in Patienten mit AML–Erstdiagnose (Dresdener Studienzentrale)

Das vorgestellte HBP1-Screening in cDNA-Proben aus Knochenmarkzellen von Patienten mit AML-Erstdiagnose (Deutsche Studieninitiative Leukämie (DSIL), Dresden) lieferte keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Zwar wurden geringe Unterschiede mit schlechterem Outcome (Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben) im Patientenkollektiv mit niedriger HBP1-Expression gezeigt, jedoch nicht von statistischer Relevanz.

Dies muss nicht bedeuten, dass kein Zusammenhang zwischen HBP1-Expression und dem Verlauf einer akuten myeloischen Leukämie besteht. Insgesamt war das Patientenkollektiv mit 95 Fällen nicht sehr groß für eine statistische Analyse. In Studien mit derartiger Fallzahl fallen nur Ergebnisse von sehr hoher Signifikanz ins Gewicht. Es könnte sein, dass eine größere Fallzahl nötig ist, um eindeutige Überlebensunterschiede nachweisen zu können. Jedoch muss die Komplexität in der Pathogenese der AML berücksichtigt werden. Für das Entstehen einer akuten myeloischen Leukämie eine Vielzahl genetischer Aberrationen und Mutationen bekannt (45;68;119;131;131). Eine Assoziation mit bestimmten AML-Subtypen ist denkbar. In der von uns durchgeführten Korrelation mit AML-Karyotypen wurden keine eindeutigen Ergebnisse erzielt. Jedoch war das Patientenkollektiv der einzelnen Subgruppen zu klein, um genauere Aussagen über einen pathogenetischen HBP1-assoziierten Effekt in einzelnen Gruppen treffen zu können. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe mit einer größeren Fallzahl (n=40) konnte eine hohe HBP1-Expression für AML-Patienten mit -7/del7q im Vergleich zu AML-Patienten mit normalem Karyotyp gezeigt werden (nicht veröffentlicht).

Interessant wäre eine HBP1-Mutationsanalyse. Bei einem HBP1-Screening in Proben von Patientinnen mit invasiv duktalem Mamma-Karzinom (IDC) wurde gezeigt, dass HBP1-Mutationen ausschließlich mit dem IDC und nicht mit den weniger aggressiven Formen DCIS (duktales Carcinoma in situ), ADH (atypische duktale Hyperplasie) und LCIS (lobuläres Carcinoma in situ) korrelieren – die reine Expressions-Analysen dagegen ließ nur vermuten, dass HBP1 in der Pathogenese des IDC eine Rolle spielt (104). Vielleicht gilt das auch im Falle der AML?

In den von uns vorgestellten Daten zur HBP1-Expression in normalen hämatopoetischen Progenitorzellen (siehe *3.4. HBP1 in hämatopoetischen Progenitorzellen* und *4.4. HPB1 in hämatopoetischen Progenitorzellen*) zeigte sich, dass die HBP1-Expression je nach Progenitorpopulation variiert. Vor diesem Hintergrund erscheint eine rein quantitative Expressionanalyse in AML-Proben unterschiedlicher Entität als nicht ausreichend. Vielleicht macht sich ein HBP1-assoziierter Effekt auch eher in klinischen Daten wie Therapieverträglichkeit oder hämatopoetischer Repopulationsfähigkeit nach Stammzelltransplantation oder Chemotherapie bemerkbar. Derart qualitative Analysen könnten interessante Ergebnisse liefern und Anreiz für weitere Experimente zu HBP1 und seiner Rolle in der Leukämogenese geben.

Fazit – Schlussfolgerung

Die vorgestellten Versuche zeigen, dass HBP1 an der Aufrechterhaltung einer physiologischen Hämatopoese und Regulation myeloischer Differenzierung beteiligt ist. Die eingangs formulierten Fragestellungen können folgendermaßen beantwortet werden:

1. Die Analyse der HBP1-Expression in verschiedenen leukämischen Zelllinien hat sich nicht als die richtige Methode erwiesen um eine Korrelation zwischen HBP1-Expression und AML-Entitäten herzustellen, da die HBP1-Expression vom Zeitpunkt der Probenentnahme abhängt.

2. Es konnte gezeigt werden, dass die HBP1-Expression nach Serumentzug überexprimiert ist und nach Zugabe von Wachstumsfaktoren rasant abfällt. Die HBP1-Expression konnte keiner der gemessen Zellzyklusphasen G1-, S- oder G2-Phase zugeordnet werden. Jedoch wird angenommen, dass die HBP1-Expression mit dem Quiescence-Status (G0) der Zellen korreliert. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass HBP1 an der Regulation des Quiescence-Status hämatopoetischer Zellen beteiligt ist.

3. Die funktionellen Versuche zu HBP1 und Interaktionen mit dem Wnt-ß-Catenin-Signalweg zeigten nicht die erwarteten Ergebnisse. Jedoch sind diese Daten auf Grund der verwendeten Methodik nicht aussagekräftig.

4. Es wurde bestätigt, dass die HBP1-Expression in den verschiedenen Progenitorpopulationen (HSCs, CMPs, GMPs) unterschiedlich ausfällt. Im Vergleich zu den Progenitorpopulationen konnten wir eine signifikant höhere HBP1-Expression in den undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen nachweisen ($p= 0,017$). Ausgehend von den HSCs fiel die HBP1-Expression im Laufe der myeloischen Differenzierung ab. In den GMPs wurde HBP1 am wenigsten exprimiert. Wir postulieren, dass HBP1 an der Regulation stammzellspezifischer Eigenschaften beteiligt ist. In den Progenitorpopulationen (CMPs und GMPs) wird HBP1 eine andere Funktion zugeschrieben. Bekannte HBP1-Charakteristika lassen die These zu, dass HBP1 in myeloische Differenzierungsprozesse einbezogen ist. Schon in früheren Arbeiten wurde vermutet, HBP1 könnte eine entscheidende Rolle in der Expression gewebsspezifischer Gene während myeloischer Differenzierungsprozesse spielen und die Notwendigkeit unterstrichen, die HBP1-Expression in hämatopoetischen Progenitorzellen zu untersuchen (84). Demnach sind die Ergebnisse dieser Arbeit ein zentraler Baustein in der Diskussion zum Stellenwert des HMG-Box-Proteins HBP1 in der physiologischen Hämatopoese.

5. Im Screening von AML-Erstdiagnosen konnte auf Grund zu kleiner Fallzahl keine Relation mit bestimmten Karyotypen bei AML-Patienten von statistischer Relevanz gezeigt werden. Zwar konnte ein Überlebensvorteil für Patienten mit hoher HBP1-Expression in Gesamt- und rezidivfreiem Überleben gezeigt werden, jedoch waren die Analysen nicht statistisch signifikant.

HBP1 ist in den verschiedenen Entwicklungsstadien der physiologischen Myelopoese unterschiedlich aktiv und lässt auf unterschiedliche Funktion in Abhängigkeit von äußerem Milieu (z.B. Stammzellnische) und Gewebetyp (Stammzellen, Progenitorzellen) schließen. Funktionelle Interaktionen des HMG-Box-Proteins HBP1 sind sehr komplex. Neben der von uns geforderten Beteiligung an der Regulation zentraler Stammzelleigenschaften wie der Quiescence ist HBP1 in Seneszenz-Mechanismen (156;162) und verschiedene Differenzierungsvorgänge (71;80-82;84;104;124;132-134;137;144;159;163) integriert. In Abhängigkeit von den Stimuli des umgebenden Zellmilieus scheint HBP1 in unterschiedlichen Signalwegen aktiv zu sein und in dualer Funktion sowohl an der Regulation einer adäquaten Antwort auf zelluläre Stressoren mit Aufrechterhaltung der Quiescence als auch an der Regulation zellulärer Differenzierung beteiligt zu sein.

Es sollten funktionelle HBP1-Versuche zu Wnt-ß-Catenin-Interaktionen durchgeführt werden. Interessant wären Versuche mit HBP1-Knockoutmäusen und Beobachtung der Repopulationsfähigkeit der HSCs nach Knochenmarktransplantation – ähnlich früheren $p21^{CIP/waf1}$-Versuchen (28) oder eine Co-Expressionsanalyse von $p21^{CIP/waf1}$ und HBP1.
HBP1 ist ein interessantes Protein, diese Arbeit unterstreicht seine vielseitigen Interaktionen. Die Beteiligung an der Regulation zentraler Stammzelleigenschaften wie der Quiescence und die Integration in myeloische Differenzierungsprozesse erklären HBP1 zu einem geeigneten Kandidaten für ein Tumorsuppressorgen, dessen Funktionsausfall oder Mutation am Entstehungsprozess der AML beteiligt sein könnte.

Literatur

(1) Adhikary S. Der Weg zu HBP1. 16-7-0008. Personal Communication

(2) Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature 2000;404:193-7.

(3) Amaxa GmbH - Scientific Support. Leading Transfection Technology - Catalog 2007/2008. 2007;

(4) Amaxa GmbH - Scientific Support. Cell Line NucleofectorTM Kit V for K562 Cells [ATCC]. 2003;

(5) Ambrosino C, Nebreda AR. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. Biol Cell 2001;93:47-51.

(6) Applied Biosystems (Roche Molecular Systems). AmpliTaq® DNA Polymerase with GeneAmp® 10X PCR Buffer or GeneAmp® 10X PCR Buffer II & MgCl2 Solution. 2000;

(7) Arai F, Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. Ann N Y Acad Sci 2007;1106:41-53.

(8) Arnheim N, Erlich H. Polymerase chain reaction strategy. Annu Rev Biochem 1992;61:131-56.

(9) Austin GE, Chan WC, Zhao W, Racine M. Myeloperoxidase gene expression in normal granulopoiesis and acute leukemias. Leuk Lymphoma 1994;15:209-26.

(10) BD Biosciences. Fluorochrome Reference Chart. 2005;

(11) BD Biosciences. Lineage Cocktail 1 (lin1). 1998;

(12) BD Biosciences. Detailed view of product - CD34 (348811). 2006;

(13) BD Biosciences. BD LSR II - Users Guide. 2007;

(14) BD Biosciences. Cell Surface Staining of Human PBMCs and Suspension Cell Lines. BD Biosciences 2007 [cited 2007 Jun 1]; Available from: URL: http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols/hPBMC_surface.shtml

(15) Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 1995;9:1783-6.

(16) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med 1985;103:620-5.

(17) Berasi SP, Xiu M, Yee AS, Paulson KE. HBP1 repression of the p47phox gene: cell cycle regulation via the NADPH oxidase. Mol Cell Biol 2004;24:3011-24.

(18) Bernards R, Brummelkamp TR, Beijersbergen RL. shRNA libraries and their use in cancer genetics. Nat Methods 2006;3:701-6.

(19) Blomen VA, Boonstra J. Cell fate determination during G1 phase progression. Cell Mol Life Sci 2007;64:3084-104.

(20) Blum W, Marcucci G. New approaches in acute myeloid leukemia. Best Pract Res Clin Haematol 2008;21:29-41.

(21) Bornhäuser M, Kienast J. Stammzelltransplantation. In: Ehninger G, Link H, Berdel WE, editors. Akute myeloische Leukämie.Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2008. p. 121-30.

(22) Brendel C. Clusters of Differentiation and Lineage-Specific Markers. 2007. AG Neubauer Zentrum Innere Medizin, Philipps-Universität Marburg, Personal Communication

(23) Brendel C. Zellzyklus-Analyse am LSRII - Protokoll. 2001. AG Neubauer Zentrum Innere Medizin, Philipps-Universität Marburg, Personal Communication

(24) Brezinova J, Zemanova Z, Ransdorfova S, Pavlistova L, Babicka L, Houskova L, et al. Structural aberrations of chromosome 7 revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques in myeloid malignancies. Cancer Genet Cytogenet 2007;173:10-6.

(25) Büchner T, Ehninger G, Lechner K, Schwarzinger I. Akute myeloische Leukämie (AML). In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K, editors. Kompendium Internistische Onkologie - Standards in Diagnostik und Therapie Band II. 4 ed. Heidelberg: Springer Verlag; 2006. p. 2605-41.

(26) Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood 2002;100:4325-36.

(27) Campisi J, dda di FF. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:729-40.

(28) Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. Science 2000;287:1804-8.

(29) Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, et al. 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 2003;21:4642-9.

(30) Chu CY, Rana TM. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. J Cell Physiol 2007;213:412-9.

(31) Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell 2006;127:469-80.

(32) Clore GM, Murphy EC. 3d solution nmr structure of the wild type hmg-box domain of the human male sex determining factor sry complexed to DNA. 17 07 2008 2001 Available from: URL: http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=1j46

(33) Coller HA, Sang L, Roberts JM. A new description of cellular quiescence. PLoS Biol 2006;4:e83.

(34) Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochim Biophys Acta 2007;1773:1358-75.

(35) Curtiss NP, Bonifas JM, Lauchle JO, Balkman JD, Kratz CP, Emerling BM, et al. Isolation and analysis of candidate myeloid tumor suppressor genes from a commonly deleted segment of 7q22. Genomics 2005;85:600-7.

(36) Darzynkiewicz Z, Huang X. Unit 5.7: Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. Basic Protocol 1: Analysis of Fixed Cells Stained with Propidium Iodide. Current Protocols in Immunology 2004

(37) Dimri GP. What has senescence got to do with cancer? Cancer Cell 2005;7:505-12.

(38) DSMZ. Human and Animal Cell Lines - Cell Culture Collection: Online Catalogue. 2007;

(39) Eskandarpour M, Huang F, Reeves KA, Clark E, Hansson J. Oncogenic NRAS has multiple effects on the malignant phenotype of human melanoma cells cultured in vitro. Int J Cancer 2009;124:16-26.

(40) Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. Lancet 2006;368:1894-907.

(41) Fan LM, Teng L, Li JM. Knockout of p47 phox uncovers a critical role of p40 phox in reactive oxygen species production in microvascular endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29:1651-6.

(42) Fenaux P, Chevret S, Guerci A, Fegueux N, Dombret H, Thomas X, et al. Long-term follow-up confirms the benefit of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. European APL group. Leukemia 2000;14:1371-7.

(43) Frassanito MC, Piccoli C, Capozzi V, Boffoli D, Tabilio A, Capitanio N. Topological organization of NADPH-oxidase in haematopoietic stem cell membrane: preliminary study by fluorescence near-field optical microscopy. J Microsc 2008;229:517-24.

(44) Frohling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Dohner K, et al. Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. Blood 2006;108:3280-8.

(45) Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. J Clin Oncol 2005;23:6285-95.

(46) GE Healthcare Bio-Sciences AB. Isolation of mononuclear cells - Methodology and applications. 2007;

(47) GE Healthcare Bio-Sciences AB. Ficoll-Paque PLUS - product instruction/protocoll sheet. 2006;

(48) Givan AL. Cells From Without: Lymphocytes and the Strategy of Gating. In: Givan AL, editor. Flow Cytometrie - First Principles.New York: Wiley-Liss; 1992. p. 75-102.

(49) Givan AL. Cells from within: DNA and Molecular Biology. In: Givan AL, editor. Flow Cytometrie - First Principles.New York: Wiley Liss; 1992. p. 103-34.

(50) Givan AL. Seeing the Light: Lasers, Fluorochromes and Filters. In: Givan AL, editor. Flow Cytometrie - First Principles.New York: Wiley-Liss; 1992. p. 55-73.

(51) Givan AL. Instrumentation: Beyond the Black Box. In: Givan AL, editor. Flow Cytometrie - First Principles.New York: Wiley-Liss; 1992. p. 15-40.

(52) Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. Blood 2001;98:1312-20.

(53) Haferlach C. Zytogenetik. In: Ehninger G, Link H, Berdel WE, editors. Akute myeloische Leukämie.Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2008. p. 54-61.

(54) Hagmann FG, Kroschinsky F. Morphologie (Methoden, Durchführung, Qualitätsstandards). Onkodin 2008 [cited 2008 Nov 1];(6.2) Available from: URL: http://www.onkodin.de/zms/content/e2/e51675/e52337/index_ger.html

(55) Hagmann FG, Kroschinsky F. Morphologie (Methoden, Durchführung, Qualitätsstandards). In: Ehninger G, Link H, Berdel WE, editors. Akute myeloische Leukämie.Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2008. p. 27-49.

(56) Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. Oncologist 2007;12:20-37.

(57) Herken R, von der Mark K. Aufbau des adulten Knochens. In: Unsicker K, Schmidt RF, Birbaumer N, Kurtz A, Schartl M, editors. Lehrbuch Vorklinik - Teil B: Anatomie, Biochemie und Physiologie des Nervensystems und des Bewegungsapparates.Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2003. p. 365-6.

(58) Hoebeke I, De SM, Stolz F, Pike-Overzet K, Staal FJ, Plum J, et al. T-, B- and NK-lymphoid, but not myeloid cells arise from human CD34(+)CD38(-)CD7(+) common lymphoid progenitors expressing lymphoid-specific genes. Leukemia 2007;21:311-9.

(59) Hoy T. Red Cells and Reticulozytes. In: Macey MG, editor. Flow Cytometry - Clinical Applications.Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994. p. 192-214.

(60) Huang H, He X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. Curr Opin Cell Biol 2008;20:119-25.

(61) Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature 2004;431:997-1002.

(62) Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nat Med 2006;12:446-51.

(63) Iwasa H, Han J, Ishikawa F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. Genes Cells 2003;8:131-44.

(64) Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. N Engl J Med 2004;351:657-67.

(65) Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. Blood 2007;110:3056-63.

(66) Jeannet G, Scheller M, Scarpellino L, Duboux S, Gardiol N, Back J, et al. Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of beta-catenin and gamma-catenin. Blood 2008;111:142-9.

(67) Kaushansky K. Hematopoietic stem cells, progenitors and cytokines. In: Lichtman MA, Kipps TJ, Kaushansky K, Beutler E, Seligsohn U, Prchal JT, editors. Williams Hematology.New York: McGraw-Hill Medical; 2006. p. 201-20.

(68) Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. Annu Rev Genomics Hum Genet 2002;3:179-98.

(69) Khidr L, Chen PL. RB, the conductor that orchestrates life, death and differentiation. Oncogene 2006;25:5210-9.

(70) Khochbin S. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. Gene 2001;271:1-12.

(71) Kim J, Zhang X, Rieger-Christ KM, Summerhayes IC, Wazer DE, Paulson KE, et al. Suppression of Wnt signaling by the green tea compound (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCG) in invasive breast cancer cells. Requirement of the transcriptional repressor HBP1. J Biol Chem 2006;281:10865-75.

(72) Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. Nat Immunol 2006;7:1048-56.

(73) Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol 2005;77:598-625.

(74) Knudsen ES, Knudsen KE. Retinoblastoma tumor suppressor: where cancer meets the cell cycle. Exp Biol Med (Maywood) 2006;231:1271-81.

(75) Kroschinsky F, Wandt H. Klassifikation. In: Ehninger G, Link H, Berdel WE, editors. Akute myeloische Leukämie.Köln: Deutscher Ärtze-Verlag; 2008. p. 3-10.

(76) Krug U, Serve H, Müller-Tidow C, Berdel W.E. Therapie mit neuen Substanzen. In: Ehninger G, Link H, Berdel WE, editors. Akute Myeloische Leukämie.Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2008. p. 104-21.

(77) Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev 2001;81:807-69.

(78) Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Rev Immunol 2004;4:181-9.

(79) Landsman D, Bustin M. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. Bioessays 1993;15:539-46.

(80) Lavender P, Vandel L, Bannister AJ, Kouzarides T. The HMG-box transcription factor HBP1 is targeted by the pocket proteins and E1A. Oncogene 1997;14:2721-8.

(81) Lemercier C, Duncliffe K, Boibessot I, Zhang H, Verdel A, Angelov D, et al. Involvement of retinoblastoma protein and HBP1 in histone H1(0) gene expression. Mol Cell Biol 2000;20:6627-37.

(82) Lesage F, Hugnot JP, Amri EZ, Grimaldi P, Barhanin J, Lazdunski M. Expression cloning in K+ transport defective yeast and distribution of HBP1, a new putative HMG transcriptional regulator. Nucleic Acids Res 1994;22:3685-8.

(83) Liang H, Castro PD, Ma J, Nagarajan L. Finer delineation and transcript map of the 7q31 locus deleted in myeloid neoplasms. Cancer Genet Cytogenet 2005;162:151-9.

(84) Lin KM, Zhao WG, Bhatnagar J, Zhao WD, Lu JP, Simko S, et al. Cloning and expression of human HBP1, a high mobility group protein that enhances myeloperoxidase (MPO) promoter activity. Leukemia 2001;15:601-12.

(85) Link H. Akute Promyelozytenleukämie (APL; M3-Leukämie). In: Ehninger G, Link H, Berdel WE, editors. Akute myeloische Leukämie.Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2008. p. 193-213.

(86) Liu H, Adler AS, Segal E, Chang HY. A transcriptional program mediating entry into cellular quiescence. PLoS Genet 2007;3:e91.

(87) Lowenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2003;82-101.

(88) Macey MG. Introductions - Monoclonal Antibodies and clusters of differentiation. In: Macey MG, editor. Flow Cytometrie - Clinical Applications.Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994. p. 23-34.

(89) Mack E, Neubauer A, Brendel C. Comparison of RNA yield from small cell populations sorted by flow cytometry applying different isolation procedures. Cytometry A 2007;71:404-9.

(90) Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:11872-7.

(91) Martinez-Agosto JA, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. Genes Dev 2007;21:3044-60.

(92) Miltenyi Biotec. µMACS One-step cDNA Kit. 2007;

(93) Miltenyi Biotec. MACS® Technology - Gold standard in cell separation. 2006;

(94) Miltenyi Biotec. MACS Cell Isolation Kits - Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit. 2006;

(95) Miltenyi Biotec. MS Columns - Data sheet. 2007;

(96) Naka K, Muraguchi T, Hoshii T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. Antioxid Redox Signal 2008;10:1883-94.

(97) National Cancer Institute (NCI). The Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program - Estimated New Cancer Cases and Deaths for 2009, Table I - 1. http://seer.cancer.gov . 2009. Internet Communication http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/results_single/sect_01_table.01.pdf

(98) National Cancer Institute (NCI). The Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program - Number of Incidence Cases 2002-2006, Table A - 1. http://seer.cancer.gov . 2009. Internet Communication http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/results_merged/topic_apxcount.pdf

(99) National Center for Biotechnology Information. PubMed BLAST - Nucleotide database: Basic Local Alignment Search Tool. 2007. 28-3-2007. Internet Communication http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi

(100) National Center for Biotechnology Information - Nucleotide Database. HBP1 HMG-box transcription factor 1 [Homo sapiens] GeneID: 26959. 18 07 08 2008 Available from: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=26959

(101) Neubauer A, Illmer T. Der Repressor HMG-Box-Transkription-Faktor-1 (HBP1) in der Leukämogenese. Antrag bei der José Carreras Leukämiestiftung 2007.

(102) Neubauer A, Maharry K, Mrozek K, Thiede C, Marcucci G, Paschka P, et al. Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol 2008;26:4603-9.

(103) PAA - The Cell Culture Company. Seren für die Zellkultur. 2006;

(104) Paulson KE, Rieger-Christ K, McDevitt MA, Kuperwasser C, Kim J, Unanue VE, et al. Alterations of the HBP1 transcriptional repressor are associated with invasive breast cancer. Cancer Res 2007;67:6136-45.

(105) Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, Scrima R, Lecce L, Boffoli D, et al. Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. Biochem Biophys Res Commun 2007;353:965-72.

(106) Piccoli C, Ria R, Scrima R, Cela O, D'Aprile A, Boffoli D, et al. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. J Biol Chem 2005;280:26467-76.

(107) Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. Curr Opin Genet Dev 2007;17:45-51.

(108) Qiagen. QuantiTect® SYBR® Green PCR - Handbook. 2008;

(109) Qiagen. RNeasy® Mini Handbook. 2006;

(110) Qiagen. What is RNA? Bench Guide - General Protocol. 2003. p. 45-6.

(111) Qiagen. Omniscript® Reverse Transcription Handbook. 2004;

(112) Qiagen. Data Analysis (for Users of QuantiFast SYBR Green Kits and QuantiTect SYBR Green Kits). Qiagen 2008 Available from: URL: http://www1.qiagen.com/resources/info/guidelines_rtpcr/dataanalysis_sybr.aspx#

(113) Qiagen. Quantitec Reverse Transcription Handbook. 2005;

(114) Qiagen. Integrated Solutions - Real-Time PCR Applications, Critical Factors for Successful Real-Time PCR. 2006;

(115) Qiagen GeneGlobe Search Center. Product Details: Negative Control siRNA (5 nmol) (1022076). 30-12-2003. Internet Communication https://www1.qiagen.com/GeneGlobe/SiRnaControlView.aspx?ID=1022076&ProductMatNr=1022076

(116) Qiagen GeneGlobe Search Center. Product Details: Hs_HBP1_1 HP siRNA (SI00434280). 17-1-2008. Internet Communication https://www1.qiagen.com/GeneGlobe/SiRnaGenomeWideView.aspx?ID=SI00434280&ProductMatNr=SI00434280&DispProdType=0

(117) Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:23-36.

(118) Rassool FV, Gaymes TJ, Omidvar N, Brady N, Beurlet S, Pla M, et al. Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with progression in myeloid leukemia? Cancer Res 2007;67:8762-71.

(119) Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. Leukemia 2008;22:915-31.

(120) Ritter M, Kattmann D, Teichler S, Hartmann O, Samuelsson MK, Burchert A, et al. Inhibition of retinoic acid receptor signaling by Ski in acute myeloid leukemia. Leukemia 2006;20:437-43.

(121) Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. Nat Rev Immunol 2007;7:105-17.

(122) Sallmyr A, Fan J, Datta K, Kim KT, Grosu D, Shapiro P, et al. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. Blood 2008;111:3173-82.

(123) Sallmyr A, Fan J, Rassool FV. Genomic instability in myeloid malignancies: Increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. Cancer Lett 2008;270:1-9.

(124) Sampson EM, Haque ZK, Ku MC, Tevosian SG, Albanese C, Pestell RG, et al. Negative regulation of the Wnt-beta-catenin pathway by the transcriptional repressor HBP1. EMBO J 2001;20:4500-11.

(125) Sanz MA. Treatment of acute promyelocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006;147-55.

(126) Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. Cell Physiol Biochem 2001;11:173-86.

(127) Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. Nature 2006;441:1075-9.

(128) Schaich M, Ehninger G. Chemotherapie. In: Ehninger G, Link H, Berdel WE, editors. Akute myeloische Leukämie.Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2008. p. 95-104.

(129) Schaich M, Neubauer A. Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese. In: Ehninger G, Link H, Berdel WE, editors. Akute myeloische Leukämie.Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2008. p. 7-17.

(130) Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG, et al. Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. Nat Immunol 2006;7:1037-47.

(131) Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2008;358:1909-18.

(132) Sekkali B, Szabat E, Ktistaki E, Tolaini M, Roderick K, Harker N, et al. Human high mobility group box transcription factor 1 affects thymocyte development and transgene variegation. J Immunol 2005;175:5203-12.

(133) Shih HH, Tevosian SG, Yee AS. Regulation of differentiation by HBP1, a target of the retinoblastoma protein. Mol Cell Biol 1998;18:4732-43.

(134) Shih HH, Xiu M, Berasi SP, Sampson EM, Leiter A, Paulson KE, et al. HMG box transcriptional repressor HBP1 maintains a proliferation barrier in differentiated liver tissue. Mol Cell Biol 2001;21:5723-32.

(135) Shilo S, Roy S, Khanna S, Sen CK. Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:471-7.

(136) Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. Oncogene 2005;24:2410-20.

(137) Smith JM, Bowles J, Wilson M, Koopman P. HMG box transcription factor gene Hbp1 is expressed in germ cells of the developing mouse testis. Dev Dyn 2004;230:366-70.

(138) Stros M, Launholt D, Grasser KD. The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. Cell Mol Life Sci 2007;64:2590-606.

(139) Suciu S, Mandelli F, de WT, Zittoun R, Gallo E, Labar B, et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. Blood 2003;102:1232-40.

(140) Suzuki R, Onizuka M, Kojima M, Shimada M, Fukagawa S, Tsuboi K, et al. Preferential hypermethylation of the Dickkopf-1 promoter in core-binding factor leukaemia. Br J Haematol 2007;138:624-31.

(141) Swanson KA, Knoepfler PS, Huang K, Kang RS, Cowley SM, Laherty CD, et al. HBP1 and Mad1 repressors bind the Sin3 corepressor PAH2 domain with opposite helical orientations. Nat Struct Mol Biol 2004;11:738-46.

(142) Tam WF, Gary GD. Can FLT3 inhibitors overcome resistance in AML? Best Pract Res Clin Haematol 2008;21:13-20.

(143) Terstappen LWMM. Cell Differentiation and Maturation in Normal Bone Marrow and Akute Leukemia. In: Macey MG, editor. Flow Cytometrie - Clinical Applications.Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994.

(144) Tevosian SG, Shih HH, Mendelson KG, Sheppard KA, Paulson KE, Yee AS. HBP1: a HMG box transcriptional repressor that is targeted by the retinoblastoma family. Genes Dev 1997;11:383-96.

(145) Thomas JO. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. Biochem Soc Trans 2001;29:395-401.

(146) Thornton TM, Rincon M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. Int J Biol Sci 2009;5:44-51.

(147) Tothova Z, Gilliland DG. FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. Cell Stem Cell 2007;1:140-52.

(148) Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell 2007;128:325-39.

(149) Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. Sci STKE 2006;2006:re8.

(150) Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 2002;100:2292-302.

(151) Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. PLoS Biol 2004;2:e301.

(152) Visani G, Olivieri A, Malagola M, Brunori M, Piccaluga PP, Capelli D, et al. Consolidation therapy for adult acute myeloid leukemia: a systematic analysis according to evidence based medicine. Leuk Lymphoma 2006;47:1091-102.

(153) Voytas A. Section II, 2.5A: Agarose Gel Electrophoresis. In: Smith JA, Struhl K, editors. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons; 2003.

(154) Weinberg RA. External signals influence the cell's decision to enter into the active cell cycle. The Biology of Cancer.New York: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2007. p. 256-61.

(155) Wilusz M, Majka M. Role of the Wnt/beta-catenin network in regulating hematopoiesis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2008;56:257-66.

(156) Xiu M, Kim J, Sampson E, Huang CY, Davis RJ, Paulson KE, et al. The transcriptional repressor HBP1 is a target of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cell cycle regulation. Mol Cell Biol 2003;23:8890-901.

(157) Xu J, Suzuki M, Niwa Y, Hiraga J, Nagasaka T, Ito M, et al. Clinical significance of nuclear non-phosphorylated beta-catenin in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. Br J Haematol 2008;140:394-401.

(158) Yao CJ, Works K, Romagnoli PA, Austin GE. Effects of overexpression of HBP1 upon growth and differentiation of leukemic myeloid cells. Leukemia 2005;19:1958-68.

(159) Yee AS, Paulson EK, McDevitt MA, Rieger-Christ K, Summerhayes I, Berasi SP, et al. The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. Gene 2004;336:1-13.

(160) Yee AS, Shih HH, Tevosian SG. New perspectives on retinoblastoma family functions in differentiation. Front Biosci 1998;3:D532-D547.

(161) Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, De TF, Prade-Houdellier N, Ruidavets JB, et al. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. Leukemia 2006;20:1211-6.

(162) Zhang X, Kim J, Ruthazer R, McDevitt MA, Wazer DE, Paulson KE, et al. The HBP1 transcriptional repressor participates in RAS-induced premature senescence. Mol Cell Biol 2006;26:8252-66.

(163) Zhuma T, Tyrrell R, Sekkali B, Skavdis G, Saveliev A, Tolaini M, et al. Human HMG box transcription factor HBP1: a role in hCD2 LCR function. EMBO J 1999;18:6396-406.

Anhang

1. Daten-Anhang **81**

2. Abkürzungsverzeichnis **88**

3. Abbildungsverzeichnis **89**

4. Tabellenverzeichnis **99**

5. Geräteliste **90**

6. Verwendete Reagenzien **90**

7. Einwilligungserklärung zur „Untersuchungen zur Biologie humaner hämatopoetischer Stammzellen“ **93**

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer **94**

9. Danksagung **94**

Anhang

1. Daten-Anhang

qPCR: **HBP1** in verschiedenen Zelllinien (Screening #1-A) 290307

Probe	C_T ß-Actin	Mittelwert C_T ß-Actin	C_T HBP1	Mittelwert C_T HBP1	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	rel. HBP1-Expression
NB4	15,69	**15,91**	25,82	**25,64**	**9,73**	**0,00**	**1,00**
	16,14		25,46				
	15,91		~~24,01~~				
HL60	14,71	**14,58**	25,37	**25,35**	**10,77**	**1,04**	**0,49**
	14,58		25,33				
	14,45		~~32,24~~				
KG1a	16,25	**16,66**	25,81	**25,69**	**9,03**	**-0,70**	**1,62**
	16,63		25,43				
	17,09		25,82				
K562	16,46	**16,43**	21,94	**21,91**	**5,49**	**-4,24**	**18,90**
	16,46		21,75				
	16,36		22,05				
Kasumi	17,18	**16,67**	~~23,25~~	**24,04**	**7,37**	**-2,36**	**5,13**
	16,51		23,83				
	16,33		24,25				
ME-1	15,10	**15,22**	23,61	**23,41**	**8,19**	**-1,54**	**2,90**
	15,36		23,36				
	15,21		23,27				
MV4-11	17,88	**17,96**	25,65	**25,57**	**7,60**	**-2,13**	**4,36**
	18,09		~~27,03~~				
	17,92		25,48				
OCI-AML3	15,11	**15,13**	22,20	**22,13**	**7,00**	**-2,73**	**6,63**
	14,95		~~20,63~~				
	15,34		22,06				
THP1	16,63	**16,75**	24,62	**24,91**	**8,16**	**-1,57**	**2,96**
	16,54		25,26				
	17,08		24,85				
Jurkat	17,04	**16,86**	24,72	**24,85**	**7,98**	**-1,74**	**3,35**
	16,77		25,12				
	16,78		24,70				
SSK41	17,00	**16,98**	26,43	**26,89**	**9,92**	**0,19**	**0,88**
	16,96		27,10				
	16,97		27,15				
SU-DHL4	15,00	**14,88**	25,65	**25,27**	**10,39**	**0,67**	**0,63**
	14,87		25,13				
	14,76		25,03				
Karpas	15,73	**15,73**	24,29	**24,24**	**8,52**	**-1,21**	**2,31**
	15,69		23,82				
	15,76		24,62				
U937	16,84	**16,74**	27,99	**28,39**	**11,65**	**1,92**	**0,26**
	16,72		28,30				
	16,67		28,88				
Lama	17,86	**18,02**	23,88	**24,04**	**6,03**	**-3,70**	**13,00**
	17,87		24,46				
	18,32		23,79				
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00	0,00	0,00	0,00
	45,00		45,00				
	45,00		45,00				

Anhang 1: Rohdaten der quantitativen PCR auf HBP1 in verschiedenen Zelllinien (Screening #1-A).
Die relative HBP1-Expression (letzte Spalte) wurde aus den ermittelten C_T-Werten berechnet (Berechnung siehe *Methoden Kapitel 5.3. Relative Quantifizierung*. Wegen zu starker Schwankungen (>1C_T-Wert) aus der Berechnung ausgeschlossene Werte sind als durchgestrichene Zahlenwerte aufgeführt.

HBP1-Expression in U937-Zellen: 48h Serumentzug, Ansatz#A-1 05 07 07

Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT HBP1	Mittelwert CT HBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. HBP1 Expression
NB4-Kalibrator	~~17,78~~	**18,75**	24,69	**24,29**	**5,55**	**0,00**	**1,00**
	19,01		23,96				
	18,48		24,22				
Stunde 0 +FCS	17,29	**17,39**	21,97	**21,68**	**4,29**	**-1,25**	**2,38**
	17,17		21,47				
	17,70		21,60				
4h	16,16	**15,64**	23,52	**23,36**	**7,72**	**2,18**	**0,22**
	15,48		23,14				
	15,28		23,42				
8h	14,81	**15,04**	23,67	**23,97**	**8,93**	**3,38**	**0,10**
	15,08		~~27,08~~				
	15,22		24,26				
12h	16,97	**17,11**	26,30	**26,56**	**9,44**	**3,90**	**0,07**
	16,89		26,81				
	17,48		~~28,86~~				
24h	15,89	**15,78**	~~26,35~~	**25,34**	**9,56**	**4,01**	**0,06**
	15,90		25,46				
	15,54		25,21				
48h	15,13	**15,15**	25,24	**24,89**	**9,75**	**4,20**	**0,05**
	15,16		~~27,08~~				
			24,54				
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00	0,00	0,00	0,00
	45,00		45,00				
	45,00		45,00				

HBP1-Expression in U937-Zellen: 72h Serumentzug, Ansatz #B-1 01 09 07

Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT HBP1	Mittelwert CT HBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. HBP1 Expression
NB4-Kalibrator	17,30	**17,46**	24,03	**23,62**	**6,16**	**0,00**	**1,00**
	17,61		23,20				
Stunde 0 +FCS	19,66	**19,97**	24,16	**24,62**	**4,66**	**-1,50**	**2,83**
	20,00		24,82				
	20,24		24,89				
4h	17,28	**17,24**	24,71	**24,50**	**7,26**	**1,10**	**0,47**
	17,10		24,80				
	17,33		23,98				
8h	15,40	**15,88**	23,45	**23,63**	**7,75**	**1,59**	**0,33**
	16,09		23,62				
	16,15		23,83				
12h	~~16,56~~	**15,24**	23,98	**24,07**	**8,84**	**2,68**	**0,16**
	15,46		24,05				
	15,01		24,19				
24h	15,24	**15,24**	23,73	**23,35**	**8,12**	**1,96**	**0,26**
	15,19		23,30				
	15,28		23,03				
48h	15,16	**14,91**	21,39	**21,69**	**6,78**	**0,62**	**0,65**
	14,71		22,10				
	14,86		21,59				
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00	0,00	0,00	0,00
	45,00		45,00				
	45,00		45,00				

HBP1-Expression in U937-Zellen: 72h Serumentzug, Ansatz#B-2 02 09 07

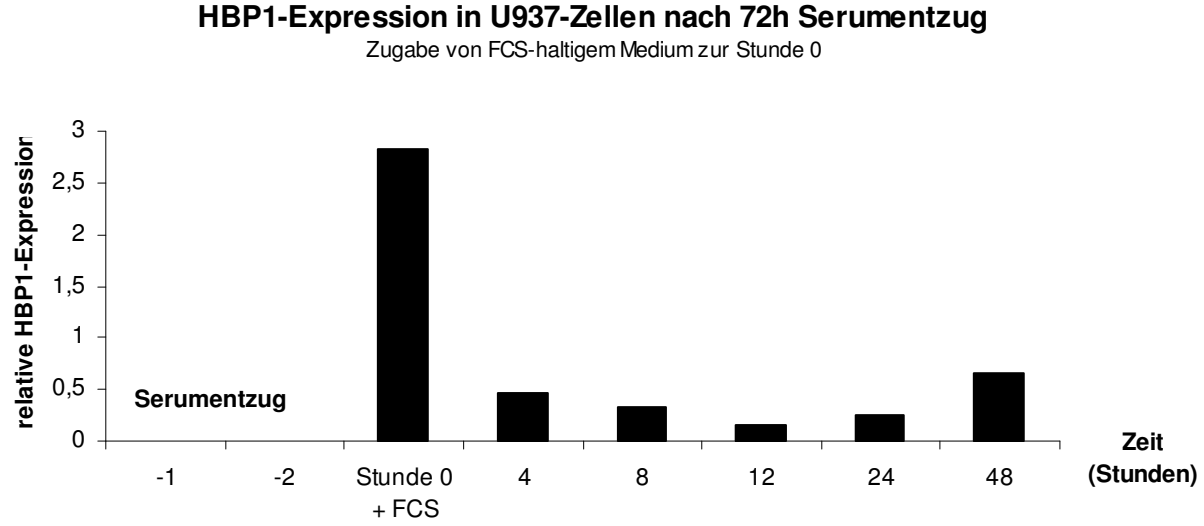
Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT HBP1	Mittelwert CT HBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. HBP1 Expression
NB4-Kalibrator	18,03	**17,73**	24,35	**24,52**	**6,79**	**0,00**	**1,00**
	17,33		24,70				
	17,84		24,51				
Stunde 0 +FCS	17,03	**16,81**	23,51	**23,25**	**6,43**	**-0,35**	**1,28**
	16,69		23,13				
	16,72		23,10				
4h	16,40	**16,55**	26,06	**25,60**	**9,05**	**2,27**	**0,21**
	16,86		25,52				
	16,39		25,23				
8h	15,55	**15,61**	~~24,94~~	**24,11**	**8,50**	**1,72**	**0,30**
	15,51		24,31				
	15,76		23,91				
12h	17,34	**17,52**	26,45	**26,70**	**9,18**	**2,39**	**0,19**
	17,88		27,25				
	17,34		26,40				
24h	15,76	**15,73**	~~24,84~~	**23,69**	**7,95**	**1,17**	**0,45**
	15,53		23,88				
	15,91		23,49				
48h	16,47	**16,72**	23,32	**23,18**	**6,46**	**-0,33**	**1,26**
	16,58		~~24,09~~				
	17,11		23,03				
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00	0,00	0,00	0,00
	45,00		45,00				
	45,00						

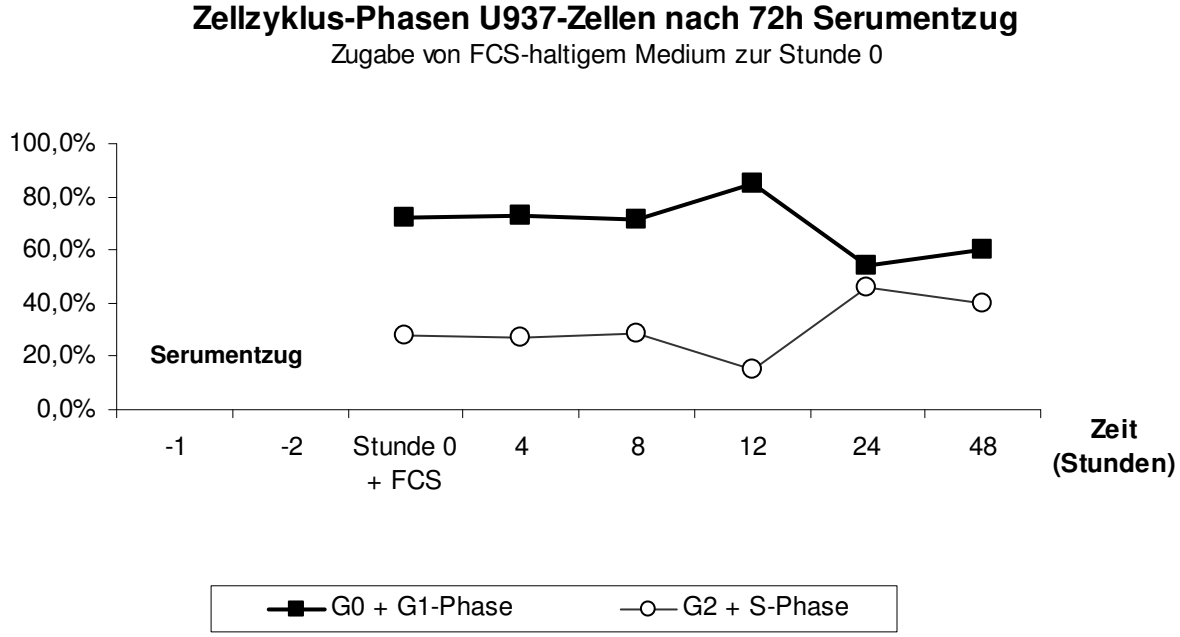
Anhang 2: Relative HBP1-Expression in U937-Zellen nach Serumentzug (Rohdaten der qPCR)
Die Relative HBP1-Expression (letzte Spalte) wird aus den ermittelten C_T-Werten errechnet. Schwankende Werte (>1C_T-Wert) wurden aus der Berechnung ausgeschlossen (gestrichene Werte), zur Berechnung siehe *Methoden Kapitel 5.3. Relative Quantifizierung*.

Korrelation Zellzyklus & HBP1-Expression (qPCR 01-09-07)
Ansatz #B-1: 72h Serumentzug

Stunde 0 + FCS		Stunde 4		Stunde 8		Stunde 12		Stunde 24		Stunde 48	
	%		%		%		%		%		%
G0/G1	72,18	G0/G1	72,99	G0/G1	71,75	G0/G1	85,13	G0/G1	54,22	G0/G1	60,19
G2/S	27,82	G2/S	27,01	G2/S	28,25	G2/S	14,87	G2/S	45,78	G2/S	39,81
HBP1: 2,83		**HBP1: 0,47**		**HBP1: 0,33**		**HBP1: 0,16**		**HBP1: 0,26**		**HBP1: 0,65**	

Anhang 3: Zellzyklus und HBP1-Expression, Ansatz #B-1. Für jeden Messzeitpunkt sind die Zahlen aufgelistet, die in der ModFit LT™-Analyse für die prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellphasen ermittelt wurden. Die G2- und S-Phase wurden als G2-S-Index zusammengefasst (Proliferationsphasen). Da in der Messung nicht zwischen G0 und G1-Phase differenziert wurde, umfasst der gemessene G1-Anteil sowohl G0 als auch G1. In der letzten Zeile sind die Werte der relativen HBP1-Expression aufgeführt, die durch qPCR bestimmt wurden

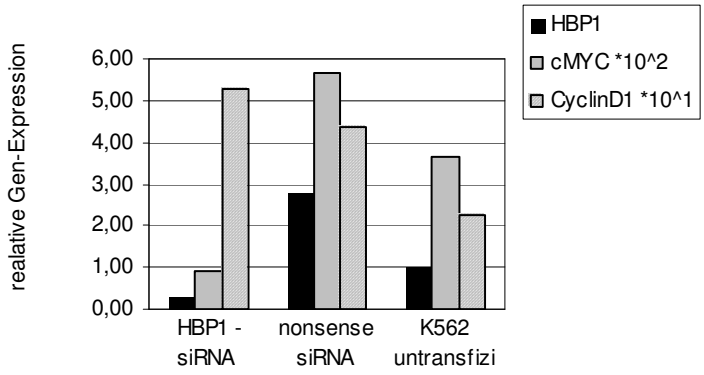




Anhang 4: Korrelation HBP1 und Zellzyklus: HBP1-Expression (oberer Teil der Abbildung) und zugehörige Zellzyklusphasen (unterer Teil der Abbildung) zur Stunde 0, sowie nach 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden nach Serumzugabe. Die U937-Zellen wurden 72 Stunden in FCS-freiem Medium gehalten (Ansatz #B-1), zur Stunde 0 wurde FCS-haltiges Medium zugegeben. Die sehr eindeutige Entwicklung der HBP1-Expression konnte nicht mit den gemessenen Zellzyklusphasen assoziiert werden.

siRNA-Transfektion in K562-Zellen

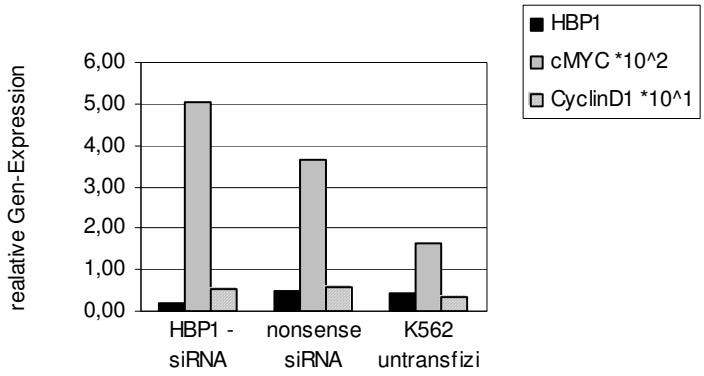
Korrelation Gen-Expression Ansatz #A



	HBP1 - siRNA	nonsense siRNA	K562 untransfizi
HBP1	0,29	2,77	1,00
cMYC *10^2	0,92	5,69	3,65
CyclinD1 *10^1	5,30	4,35	2,25

siRNA-Transfektion in K562-Zellen

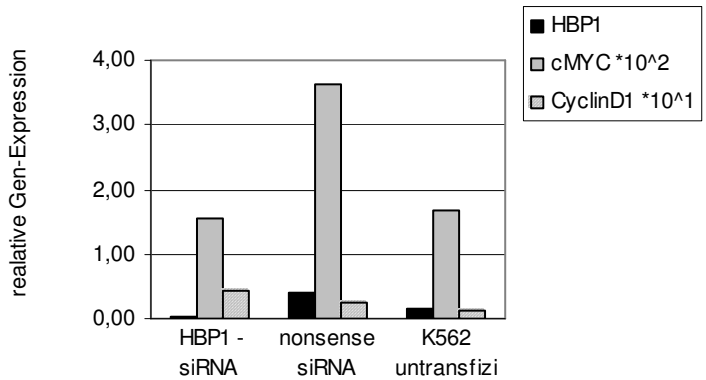
Korrelation Gen-Expression Ansatz #B



	HBP1 - siRNA	nonsense siRNA	K562 untransfizi
HBP1	0,20	0,48	0,42
cMYC *10^2	5,02	3,66	1,62
CyclinD1 *10^1	0,51	0,56	0,32

siRNA-Transfektion in K562-Zellen

Korrelation Gen-Expression Ansatz #C



	HBP1 - siRNA	nonsense siRNA	K562 untransfizi
HBP1	0,04	0,40	0,14
cMYC *10^2	1,55	3,64	1,69
CyclinD1 *10^1	0,43	0,25	0,13

Anhang 5: HBP1-siRNA-Transfektion: Gemeinsame Darstellung der HBP1-, cMyc- und Cyclin D1-Expression. Ergebnisse der siRNA-Versuche, geordnet nach Versuchsansätzen (#A, #B, #C). In keinem Versuchsansatz konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen HBP1-Herunterregulation und der Genexpression von cMyc oder Cyclin D1 gezeigt werden.

Anhang 6: Relative HBP1-Expression in sortierten hämatopoetischen Progenitorzellen (PCR-Daten). Die relative HBP1-Expression (letzte Spalte) wurde aus den gemessenen C_T-Werten errechnet (Zur Berechnung siehe *Methoden Kapitel 5.3. Relative Quantifizierung*). Stark schwankenden Werte mit Abweichung >1C_T-Wert wurden aus der Berechung ausgeschlossen (gestrichene Zahlenwerte). In Proben mit C_T = 45,00 konnte HBP1 nicht nachgewiesen werden, die entsprechenden Werte sind mit „!!“ gekennzeichent. Als Kalibrator (rel.HBP1 = 1) diente die Zelllinie NB4.

qPCR **hBP1** Sortiere hämatopoetische Progenitorzellen (Sort 13.04.07 - Patient 1) 20 06 07

Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT hBP1	Mittelwert CT hBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. hBP1-Expression
NB4 Kalibrator	16,91	**16,89**	25,60	**26,00**	**9,11**	**0,00**	**1,00**
	16,70		26,29				
	17,05		26,10				
HSC	24,43	**24,27**	33,50	**33,73**	**9,46**	**0,35**	**0,78**
	23,95		33,62				
	24,42		34,06				
CMP	22,55	**22,87**	35,56	**35,44**	**12,57**	**3,46**	**0,09**
	23,09		~~34,29~~				
	22,97		35,32				
GMP	24,21	**24,42**	37,45	**36,99**	**12,57**	**3,46**	**0,09**
	24,43		37,02				
	24,62		36,51				

qPCR **hBP1** Sortiere hämatopoetische Progenitorzellen (Sort 27.04.07 - Patient 2) 20 06 07

Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT hBP1	Mittelwert CT hBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. hBP1-Expression
NB4 Kalibrator	16,91	**16,89**	25,60	**26,00**	**9,11**	**0,00**	**1,00**
	16,70		26,29				
	17,05		26,10				
HSC	27,82	**27,46**	~~28,59~~	**30,66**	**3,20**	**-5,91**	**60,13**
	27,23		30,42				
	27,33		30,90				
CMP	27,07	**27,20**	37,43	**37,28**	**10,08**	**0,97**	**0,51**
	27,28		37,41				
	27,26		37,00				
GMP	22,47	**22,67**	34,48	**34,40**	**11,73**	**2,62**	**0,16**
	23,02		34,52				
	22,53		34,20				

qPCR **hBP1** Sortiere hämatopoetische Progenitorzellen (Sort 15.06.07 - Patient 3) 20 06 07

Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT hBP1	Mittelwert CT hBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. hBP1-Expression
NB4 Kalibrator	16,91	**16,89**	25,60	**26,00**	**9,11**	**0,00**	**1,00**
	16,70		26,29				
	17,05		26,10				
HSC	25,22	**25,18**	34,66	**34,90**	**9,72**	**0,61**	**0,66**
	25,09		~~34,06~~				
	25,24		35,14				
CMP	24,98	**24,62**	35,48	**35,66**	**11,04**	**1,93**	**0,26**
	24,50		35,84				
	24,39		~~36,51~~				
GMP	23,62	**23,51**	35,19	**34,99**	**11,48**	**2,36**	**0,19**
	23,12		~~34,09~~				
	23,79		34,78				
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00	0,00	0,00	0,00
	45,00		45,00				

qPCR **hBP1** Sortiere hämatopoetische Progenitorzellen (Sort 24.07.08 - Patient 4) 21 08 07

Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT hBP1	Mittelwert CT hBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. hBP1-Expression
	16,92	**17,04**	24,08	**24,00**	**6,96**	**0,00**	**1,00**
NB4 Kalibrator	17,05		23,92				
	17,16		~~27,34~~				
HSC	22,17	**21,92**	29,38	**29,90**	**7,98**	**1,03**	**0,49**
	21,73		30,16				
	21,86		30,17				
CMP	31,01	**31,13**	45,00 **!!**	**41,93**	**10,80**	**3,85**	**0,07**
	31,01		45,00 **!!**				
	31,37		35,80 **!!**				
GMP	32,64	**32,30**	45,00 **!!**	**45,00**	**12,70**	**5,75**	**0,02**
	31,73		45,00 **!!**				
	32,52		45,00 **!!**				
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00	0,00	0,00	0,00
	45,00		45,00				

qPCR **hBP1** Sortiere hämatopoetische Progenitorzellen (Sort 09.08.07 - Patient 5) 27 08 07

Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT hBP1	Mittelwert CT hBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. hBP1-Expression
	17,24	**17,77**	23,83	**24,08**	**6,32**	**0,00**	**1,00**
NB4 Kalibrator	~~19,18~~		24,19				
	18,29		24,23				
HSC	~~24,73~~	**23,24**	32,80	**32,57**	**9,34**	**3,02**	**0,12**
	23,04		32,78				
	23,43		32,13				
CMP	24,74	**24,87**	34,16	**34,01**	**9,14**	**2,82**	**0,14**
	24,99		34,06				
	24,89		33,81				
GMP	30,94	**31,06**	45,00 **!!**	**45,00**	**13,94**	**7,62**	**0,01**
	30,91		45,00 **!!**				
	31,34		45,00 **!!**				
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00	0,00	0,00	0,00
	45,00		45,00				

qPCR **hBP1** Sortiere hämatopoetische Progenitorzellen (Sort 13.08.07 - Patient 6) 22 08 07

Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT hBP1	Mittelwert CT hBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. hBP1-Expression
	16,65	**16,48**	24,48	**24,69**	**8,21**	**0,00**	**1,00**
NB4 Kalibrator	16,32		24,54				
	16,47		25,06				
HSC	24,62	**24,82**	~~35,32~~	**33,84**	**9,02**	**0,81**	**0,57**
	24,66		34,15				
	25,17		33,53				
CMP	23,57	**23,78**	35,08	**34,71**	**10,93**	**2,72**	**0,15**
	23,84		34,34				
	23,93		~~35,87~~				
GMP	21,68	**21,93**	~~33,15~~	**34,32**	**12,39**	**4,17**	**0,06**
	21,80		34,32				
	22,31		34,31				
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00	0,00	0,00	0,00
	45,00		45,00				

qPCR **hBP1** Sortiere hämatopoetische Progenitorzellen (Sort 14.08.07 - Patient 7) 24 08 07

Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT hBP1	Mittelwert CT hBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. hBP1-Expression
NB4 Kalibrator	16,93	**16,83**	23,13	**23,76**	**6,93**	**0,00**	**1,00**
	16,74		24,01				
	16,82		24,14				
GMP	22,36	**22,07**	30,93	**30,78**	**8,71**	**1,78**	**0,29**
	21,61		30,57				
	22,23		30,84				
HSC	32,41	**32,81**	40,18 **!!**	**40,94**	**8,13**	**1,20**	**0,44**
	~~34,64~~		45,00 **!!**				
	33,21		37,63 **!!**				
CMP	24,64	**24,45**	~~34,82~~	**36,75**	**12,29**	**5,36**	**0,02**
	24,24		37,18				
	24,48		36,31				
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00	0,00	0,00	0,00
	45,00		45,00				

qPCR **hBP1** Sortiere hämatopoetische Progenitorzellen (Sort: 28.08.07 - Patient 8) 01 09 07

Probe	CT ß-Actin	Mittelwert CT ß-Actin	CT hBP1	Mittelwert CT hBP1	ΔCT	ΔΔCT	rel. hBP1-Expression
NB4 Kalibrator	17,30	**17,46**	24,03	**23,62**	**6,16**	**0,00**	**1,00**
	17,61		23,20				
HSC	23,39	**23,79**	30,26	**30,35**	**6,56**	**0,40**	**0,76**
	24,18		30,11				
	~~25,77~~		30,67				
CMP	25,50	**25,93**	33,66	**33,85**	**7,92**	**1,76**	**0,30**
	26,05		~~33,01~~				
	26,25		34,04				
GMP	21,67	**21,34**	29,28	**29,39**	**8,05**	**1,89**	**0,27**
	21,15		29,16				
	21,20		29,74				
NTC	45,00	45,00	45,00	45,00	0,00	0,00	0,00
	45,00		45,00				

2. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
ADH	Atypische duktale Hyperplasie (Mamma)
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APL	Akute Promyelozytenleukämie
ARA-C	Cytosin-Arabinosid
ATRA	All-trans-Retinolsäure
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
CIP	CDK-Interacting protein 1
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMP	Common myeloid progenitor
CR	Complete remission
C_T-Wert	Threshold-Cycle
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
Dmp1	Cyclin D binding myb-like protein 1
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
EGCG	Epigallocatechin-Gallate
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetal Calf Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
GFP	Green Fluorescent Protein
GMP	Granulocyte/macrophage progenitor
HBP1	HMG-Box containing Protein 1
HBP1	HMG-Box containing Protein 1
HMG-Box	High-Mobililty-Group
HSC	Hematopoietic stem cell
IDC	Invasives duktales Karzinom (Mamma)
LCIS	Lobuläres carcinoma in situ (Mamma)
LCR	Locus control regions
Lin	Lineage
MEP	Megakaryocyte/erythrocyte progenitor
MPO	Myeloperoxidase
NTC	Non-Template-Controle
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PE-A	PE-Area
PE-Cy7	Phycoerythrin - Cyanine dye
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophyll Protein - Cyanine dye
PEV	Position effect variegation
PE-W	PE-Width
PI	Propidiumiodid
qPCR	Quantitative PCR
RB	Retinoblastoma Protein
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive oxygen species
RT	Reverse Transkriptase
shRNA	Short hairpin RNAs
siRNA	Small interfering RNA
SSC	Side Scatter
TAE-Puffer	TRIS Acetate-EDTA-Puffer
Waf	Wildtype p53-activated fragment 1
WHO	World Health Organization

3. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Zytologische Bilder AML (Onkodin)

Abb.2: Struktur des HMG-Box-Proteins

Abb.3: Schematische Darstellung der funktionellen Regionen des HBP1-Proteins

Abb.4: Modell zur Regulation des G1-Arrests über den p38 MAP-Kinase-Weg

Abb.5: Stammbaum der Hämatopoese

Abb.6: Hämatopoetische Progenitorzellen: Populationsspezifische Antigenexpression

Abb.7: Gel-Fotodokumentation nach Elektrophorese

Abb.8: Funktionsprinzip SYBR-Green I

Abb.9: Typischer Plot einer quantitativen PCR (qPCR)

Abb.10: Beispiel-Pipettierschma für 96-Well-Platte einer quantitativen PCR

Abb.11: Funktionsprinzip siRNAs

Abb.12: Pipettierschema der siRNA-Versuche

Abb.13: GFP-Transfektionskontrolle

Abb.14: Ficoll-Zellseparation

Abb.15: Messung SSC gegen FSC. Hämatopoetische Progenitor- und reife Blutzellen

Abb.16: Schematisch Darstellung der flowcytometrischen Zellzyklusanalyse

Abb.17: Histogramm der Zellzyklusanalyse zur Darstellung der Zellzyklusphasen

Abb.18: Transfektionskontrolle nach 24h: Durchflusszytometrische GFP-Messung am BD™ LSRII Durchflusszytometer

Abb.19: Sortier-Strategie für hämatopoetische Progenitorzellen.

Abb.20: Relativen HBP1-Expression in verschiedenen Zelllinien (Screening #1-A)

Abb.21: HBP1 in verschiedenen Zelllinien (Screening #1-B)

Abb.22: HBP1-Expression in U937-Zellen nach Serumentzug drei verschiedener Ansätze

Abb.23: Zellzyklus-Analyse (ModFit LT™-Auswertung

Abb.24: HBP1-Expression und ermittelte Zellzyklusphasen (Ansatz #A-1)

Abb.25: Proliferationsverhalten nach Serumentzug

Abb.26: Akquirierte Daten der Durchflusszytometrie für die sequenzielle Sortierung

Abb.27: Relative HBP1-Expression in sortierten hämatopoetischen Progenitorzellen

Abb.28: Kumulative Übersicht der relativen HBP1-Expression in sortierten hämatopoetischen Progenitorzellen

Abb.29: Überlebenskurven der auf HBP1 gescreenten AML-Patienten (Dresden, Kaplan-Meier-Statistik)

Abb.30: Modell zur Wechselwirkung zwischen HBP1 und der Wnt-ß-Catenin-Kaskade in physiologischer Hämatopoese

4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung bekannten HBP1-Interaktionen

Tabelle 2: Zelllinien und deren Charakterisierung.

Tabelle 3: Berechnung des Reaktionsgemisches für die cDNA-Synthese mit Omniscript.

Tabelle 4: Berechnung des Reaktionsgemisches einer ß-Actin-PCR

Tabelle 5: Verwendete Primer für die quantitative PCR auf HBP1

Tabelle 6: Verwendete Primer für die quantitative PCR auf cMyc und Cyclin D1

Tabelle 7: Berechnung des Mastermixes für die quantitative PCR (qPCR)

Tabelle 8: Stadien der quantitativen PCR

Tabelle 9: Verwendete siRNA für funktionelle Versuchsreihen

Tabelle 10: Sortierstrategie nach Expressionsmuster der Oberflächenantigene hämatopoetischer Vorläuferzellen

Tabelle 11: Fluoreszenzgekoppelte Maus-IgG-Antikörper gegen humane Oberflächenantigene

Tabelle 12: Zellpopulationen hämatopoetischer Vorläuferzellen (Antigeneigenschaften, Gatedefinition)

Tabelle 13: Auswertung Zellzyklus und HBP1-Expression, Ansatz #A-1

Tabelle 14: Karyotypen der auf HBP1 gescreenten AML Patienten (Dresden)

5. Geräteliste

Durchflusszytometer	BD LSR II (BD Biosiences)
Elektrophoresekammer	Horizontal Gel Electrophoresis System Horizon® 11.14 (Biometra)
Heizblock	Eppendorf ThermoStat plus (Eppendorf)
Microzentrifuge	Eppendorf Microcentrifuge 5417R (Eppendorf)
Nucleofector	Nucleofector™ II (Amaxa)
PCR-Cycler	GeneAmp PCR-System 9600 (Applied Biosystems)
Photometer	Pharmacia GeneQuant II RNA / DNA Calculator (Pharmacia)
qPCR-Cylcer	ABI-Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystem)
ThermoMACS	ThermoMACS 130-091-136 (Miltenyi Biotec)
Wasserbad	Haake E15 (Thermo-Haake)
Zellsortierung	Cytomation MoFlo™ XDP Cell Sorter (Beckman Coulter)
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5810R (Eppendorf)

6. Verwendete Reagenzien

	Bezeichnung	**Firma und Katalog-Nr.**
6-Well-Platten	6-Well-Platten für Zellkultur	Greiner Bio-one 657160
96-Well-Platten qPCR	PP-PCR-Platte, 96 WELL für Abi	Greiner Bio-one 652260
Agarose	UltraPure Agarose	Invitrogen 15510027
Antikörper Flowzytometrie	**CD34 PE-Cy7** (Mouse IgG)	BD Biosciences 348811
	PerCp-Cy5.5 anti-human **CD38** (MouseIgG)	BD Pharmingen™ 551400
	APC anti-human **CD45RA** (Mouse IgG)	BD Pharmingen™ 550855
	PE anti-human **CDw123 IL-3Rα** (Mouse IgG)	BD Pharmingen™ 555644
	CD2 FITC (Mouse IgG)	BD Biosiences 347404
	CD3 FITC (Mouse IgG)	BD Biosciences 345763
	CD4 FITC (Mouse IgG)	BD Biosciences 345768
	CD14 FITC (Mouse IgG)	BD Biosciences 345784
	CD15 FITC (Mouse IgG)	BD Biosciences 332778
	CD19 FITC (Mouse IgG)	BD Biosciences 345776
	CD56 FITC (Mous IgG)	BD Biosciences 345811
	Glyophorin A FITC (Mouse IgG)	DAKO JC159
BSA	Albumin from bovine serum	Sigma-Aldrich A4503
CD34-Beads	CD34 MicroBead Kit - CD34 MicroBeads - FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec 130-046-702
cDNA-Kit Miltenyi	µMACS One-step cDNA Kit: - Oligo (dT) MicroBeads - Lysis/Binding Buffer - Wash Buffer - Lyophilized Enzyme Mix - Resuspension Buffer - Equilibration/Wash Buffer	Miltenyi Biotec 130-091-902

	- cDNA Release Solution - cDNA Elution Buffer - µMACS Sealing Solution - Columns - LysateClear Columns	
cDNA-Synthese	Omniscript RT Kit	Qiagen 205113
cDNA-Synthese	QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen 205311
DNA-Polymersase	AmpliTaq® DNA Polymerase, with Buffer I	Applied Biosystems N808-0166
Ethidium Bromide	Ethidium Bromide Solution, Molecular Grade	Promega H5041
FACS-Röhrchen	5 ml polystyrene round bottom tube	BD Falcon™ 352052
Falcons	Polypropylen Röhrchen - 10ml - 50ml	Greiner Bio-one - 188271 - 210261
FCS	Foetal Bovine Serum Category "EU"	PAA Laboratories GmbH A15-043 (2007)
Ficoll	Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare 17-1440-03
Gelladepuffer	auf 10ml H_2O: 4g Sucrose 500µl Bromophenol blue-Xylenecyanol	 Fluka 84100 Fluka 18047
Kulturflaschen	CELLSTAR® Standard Zellkultur Flasche - klein (50ml) - mittlere (250 ml) - groß (550 ml)	Greiner Bio-one: - 690160 - 660160 - 658170
Kulturmedium	RPMI 1640 Medium (1X), liquid	Invitrogen 21875-034
Lysispuffer	auf 100ml H_2O: 8,02g Ammoniumchlorid 1g Kaliumhydrogencarbonat 0,037g EDTA	 Carl Roth K298.1 Merck 104852 Sigma-Aldrich E9884
MACS-Puffer	PBS 0,5% BSA 2mM EDTA	BIOCHROM AG - L1825 Sigma-Aldrich A4503 Sigma-Aldrich ED2SS
Nonsense siRNA	Negative Control siRNA (5 nmol)	Qiagen 1022076
P/S	Penicillin/Streptomycin (100x Concentrate)	PAA Laboratories GmbH P11-010
PBS	PBS Phosphate Buffered Saline Dulbecco (1x), ohne Ca2+/Mg2+	BIOCHROM AG - L1825
PCR-Reaktionsgefäße	PCR-SoftTubes, einzeln (0,2 ml)	Biozym 711008
Pipetten	Pipette, mit Spitze - 5 ml - 10ml - 25ml	Greiner Bio-one: - 606180 - 607180 - 760180
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen (ohne Filter) - 10 µl - 200 µl - 1000 µl Micro-Filterspitzen - 10 µl - 20 µl - 200 µl - 1000µ	 - Greiner Bio-one 771291 - Gilson, F161930 - Gilson, F161670 Greiner Bio-one - 771288 - 774288 - 739288 - 740288
Propidiumjodid	Propidium Iodide	Sigma-Aldrich P-4170
Reaktionsgefäße	Reagiergefäß für Mikrolitersysteme - 0,5 ml - 1,5 ml - 2,0 ml	 - Eppendorf 0030121023 - Sarstedt 72.690 - Sarstedt 72.695
RNAse-Inhibitor	Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega N2511
RNA-Extraktions-Kit	RNeasy Mini Kit (250) - RNeasy-mini Spin Colums (Säulen) - Auffangbehälter (2ml) - Buffer RLT - Buffer RW1 - Buffer RPE	Qiagen 74106

	- RNAse-freies Wasser	
Säulen und Kolben (Magnetic Separation)	MS-Colums - Colums and Plungers	Miltenyii Biotec 130-041-201
Shredder (RNA)	QIAshredder	Qiagen 79656
siRNA HBP1	Hs_HBP1_1 HP siRNA	Qiagen SI00434280
ß-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol ≥99.0%	Sigma-Aldrich M6250
SybrGreen I	QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen 204145
TAE-Puffer	TRIS Acetate-EDTA buffer	Sigma-Aldrich T 9650
Transfections-Kit	Cell Line Nucleofector Kit V: - Plastic pipettes - Certified cuvettes - pmaxGFP - Supplement - Cell Line Nucleofector Solution V	Amaxa Biosystems VCA-1003
Transferpipette	Transferpipetten - 3,5ml	Sarstedt 86.1171.001
Tryptanblau	Tryptanblau 50ml	Fluka 2007867
Zellfilter (MoFlo)	Filcons 30µm, Syringe fitting	Guenter Keul GmbH 030-33
Zellsieb (Spongiosapräparation)	Zellsieb - 4µm	BD Falcon 352340

7. Einwilligungserklärung zur „Untersuchungen zur Biologie humaner hämatopoetischer Stammzellen“

KLINIKUM
der Philipps-Universität Marburg
Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg

Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. A. Neubauer

Hausanschrift: Baldingerstraße, 35043 Marburg
Postanschrift: 35033 Marburg
Telefon: (06421) 28-66272 / 28- 66273
Telefax: (06421) 28-66358
Email: neubauer@mailer.uni-marburg.de
Internet: www.med.uni-marburg.de
Bearbeiter: Dr. med. Brendel

Patienteninformation

Untersuchung der Eigenschaften humaner hämatopoietischer Stammzellen

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie um die Teilnahme an der o.g. Untersuchung bitten.

Wie sie vielleicht wissen ist Leukämie (Blutkrebs) eine häufige Erkrankung. Um diese besser zu verstehen, ist es nötig, auch gesunde Blut- und Knochemarksstammzellen vergleichend zu betrachten. Wir untersuchen daher die Eigenschaften gesunder Blutstammzellen bei gesunden Erwachsenen. Insbesondere sehr frühe Vorläuferzellen der Blutbildung sollen von uns genauer hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens untersucht werden.

Die Blutstammzellen leben als „Knochenmark“ in den Hohlräumen zwischen Knochenbälckchen aller großen Knochen des Menschen. Bei einer Hüftoperation mit prothetischem Hüftersatz wird ein wenig Knochensubstanz aus dem Oberschenkelknochen entfernt, um dem Zement Halt zu verschaffen. Dies wird im Allgemeinen, genau wie der entfernte Hüftkopf selbst, verworfen.

Wir möchten Sie bitten, uns ein wenige Millimeter großes Fragment von dem bei der Hüftoperation entfernten Knochen aus den Oberschenkelknochen oder Hüftkopf zur Verfügung zu stellen, um damit Untersuchungen an gesunden Blutstammzellen durchführen zu können.

Das Knochenmarksfragment erhält beim Eintreffen im Labor eine Probenummer, der Ihr Name, ihr Alter und das Eingangsdatum zugeordnet ist. Alle weiteren Untersuchungen werden anhand der anonymisierten Probenummer durchgeführt.

Durch Ihre Teilnahme an dem Studienprojekt wird ein besseres Verständnis biologischer Vorgänge bei Blutstammzellen erzielt .Sie können über Ihre Teilnahme an der Untersuchung selbstverständlich frei entscheiden und Ihre Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen bzw. zurückziehen. Im Falle einer Ablehnung werden Ihnen bezüglich Ihrer weiteren Behandlung natürlich keine Nachteile entstehen.

KLINIKUM
der Philipps-Universität Marburg
Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg

Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. A. Neubauer

Hausanschrift: Baldingerstraße, 35043 Marburg
Postanschrift: 35033 Marburg
Telefon: (06421) 28-66272 / 28- 66273
Telefax: (06421) 28-66358
Email: neubauer@mailer.uni-marburg.de
Internet: www.med.uni-marburg.de
Bearbeiter: Dr. med. Brendel

Einwilligungserklärung

Untersuchung der Eigenschaften humaner hämatopoietischer Stammzellen

Ich, ... bin über Wesen, Bedeutung und Tragweite der o.g. Studie aufgeklärt worden und habe die Patienteninformation gelesen und verstanden. Alle Fragen zu dieser vorgesehenen Studie wurden von Herrn/Frau Dr. med. ..... zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich hatte genügend Zeit für meine Entscheidung und bin bereit, ein bei der Operation anfallende Knochenfragment für die Untersuchung von Blutstammzellen zur Verfügung zu stellen. Ich bin mit der im Rahmen der Studie erforderlichen Aufzeichnung von Krankheitsdaten entsprechend der Patienteninformation einverstanden.

Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile erwachsen. Eine Ausfertigung des Aufklärungs-/Informationsblatts und der Einwilligungserklärung habe ich erhalten.

Marburg, den

.....
(Unterschrift des Patienten)

.....
(Unterschrift des Arztes)

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Universität Marburg:
Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gerdes, Grundmann, Grzeschik, Hertl, Hilt, Höffken, Jungclas, Klose, Koolmann, Krieg, Kroll, Lang, Lenz, Lill, Lohoff, Maier, Mandrek, Martin, Moll, Mueller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Oertel, Plant, Renz, Richter, Röper, Schade, Schäfer, Schmidt, Schrader, Steiniger, Tibesku, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Werner, Westermann, Wulf und Rieße (Universität Gießen)

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all dejenigen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützten und dieses Dissertationsprojekt ermöglicht haben:

- Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Neubauer für die Idee zu diesem Projekt, die Betreuung meiner Arbeit und kritische Durchsicht des Manuskripts
- Frau Dr. Cornelia Brendel, Herrn Marius Dohse und Herrn Thorsten Volkmann des Flow Cytometry Teams der Klinik für Hämatologie, Onkolologie, Immunologie der Universität Marburg für die Zusammenarbeit, Sortieren der Progenitorzellen am MoFlo-Zellsortiergerät sowie die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie
- Dem kompletten Labor-Team der Arbeitsgemeinschaft Neubauer, sowie Mitarbeitern der Forschungslabore der Ebene -2 und des hämatologischen Routinelabors für Ihre Zeit und Hilfsbereitschaft
- Den Mitarbeitern im Labor Frau Kathleen Stabla und Frau Petra Roth und Frau Dagmar Daniels für die Geduld und das Einarbeiten in die Laborarbeit, sowie Herrn Thorsten Volkmann für die Einarbeitung und Unterstützung bei der Arbeit mit Knochenmarkzellen
- Der Abteilung für Orthopädie für die Zusammenarbeit, welche die Arbeit mit hämatopoetischen Stammzellen ermöglichte.
- Frau Dr. Sabine Teichler, Frau Ludmilla Sytik, Frau Dr. Sovana Adhikary und Dr. Minh Huynh, die mir als erfahrene Forscher immer mit Rat und Tat zur Seite standen, sowie Frau Dr. Nicole Hagner
- Herrn Dr. Illmer der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden Und dem beteiligten Team der Studienzentrale der Deutschen Studieninitiative Leukämie (DSIL) des Dresdener Universitätsklinikums für die Überlassung der DNA-Proben von Leukämiepatienten sowie die Korrelation der Laborergebnisse mit klinischen Daten.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen Freunden, die mich während meiner gesamten Ausbildung und auf dem langen Weg zur Promotion unterstützt haben. Sie standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite, haben mir geholfen in schwierigen Zeiten die Zuversicht nicht zu verlieren und gaben mir die notwendige Ruhe und Sicherheit für die Erstellung dieser Arbeit.