

**Die Rolle von EBF2 in der
haematopoietischen Stammzellnische**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Silvia Hiechinger

München

September 2009

angefertigt am

Helmholtz Zentrum für Gesundheit und Umwelt

München

Gutachter: Prof. Harry MacWilliams
PD Dr. Berit Jungnickel

Rigorosum: 11.01.2010

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
1 Einleitung	7
1.1 Das Immunsystem	7
1.2 Haematopoietische Stammzellen – Die Grundlage des Immunsystems	7
1.3 Mesenchymale Stammzellen – ein weiterer Bestandteil des Knochenmarks	8
1.4 Osteoblasten – Abkömmlinge mesenchymaler Stammzellen	9
1.5 Die Stammzellnische	10
1.5.1 Die endosteale Nische	11
1.5.2 Die vaskuläre haematopoietische Stammzellnische	12
1.5.3 Molekulare Mechanismen der endostealen Nische	13
1.6 Die Expression von <i>Ebf2</i> in unreifen Osteoblasten	14
1.7 Early B-cell Faktoren	14
1.7.1 EBF1	15
1.7.2 EBF2	16
1.7.3 EBF3 und EBF4	18
1.8 Die Redundanz der EBF-Familie	18
1.9 Weitere Analyse des EBF2-defizienten Phänotyps	19
1.10 Funktionen von Angiogenin	20
1.10.1 Die biologische Rolle von Angiogenin1	20
1.10.2 Biochemische Aktivitäten von Angiogenin	21
1.10.2.1 Die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin	21
1.10.2.2 Die Rolle von Angiogenin in der Signaltransduktion	21
1.10.2.3 Nukleäre Translokation und Stimulation der rRNA-Transkription durch ANG	22
1.11 Fragestellung der Arbeit	24
2 Ergebnisse	25
2.1 Analyse der haematopoietischen Stammzellen in <i>Ebf2</i> -defizienten Mäusen	25
2.2 Gen-Expressionsanalyse von <i>Ebf2</i> ^{+/-} und <i>Ebf2</i> ^{-/-} exprimierenden Zellen	26
2.3 Angiogenin1-Promotorstudien	34
2.4 Charakterisierung der <i>Ang1</i> -Exonstartstellen	35
2.5 Differentielles Splicing und <i>exon-sharing</i> zwischen <i>RNase4</i> und <i>Ang1</i> in <i>Ebf2</i> - exprimierenden Osteoblasten.	35
2.6 Expressionsanalyse anderer <i>RNase5</i> -Familienmitglieder in <i>Ebf2</i> -exprimierenden Zellen	37
2.7 Charakterisierung der potentiellen EBF-Bindestellen im <i>Ang1</i> -Promotor 1 und 2	37
2.8 Analyse der <i>Ang1</i> -Promotoraktivität in Luziferase-Reporter-Assays	41
2.9 <i>Ebf2</i> -Überexpression und deren Einfluss auf die Angiogenin1 Expression in verschiedenen Zelllinien.	45
2.10 Deregulation von <i>Ang1</i> mittels RNAi in verschiedenen Zelllinien	45
2.11 Analyse der redundanten Wirkungsweise von EBF-Proteinen durch gleichzeitige Verminderung der Expression von <i>Ebf1</i> , 2 und 3.	49
2.12 Deregulation der endogenen <i>Ebf</i> -Expression und deren Wirkung auf den Erhalt haematopoietischer Stammzellen <i>in vitro</i>	51
2.13 Der dreifache <i>Ebf</i> -Knock-down – Ein <i>in vivo</i> Modell	52
3 Diskussion	57
3.1 <i>Ebf2</i> ist notwendig für die Unterstützung haematopoietischer Stammzellen.	57
3.2 Analyse der Ursache des Stammzelldefekts EBF2-defizienter Mäuse	58
3.3 Stromale EBF2-defiziente Zellen produzieren weniger Angiogenin 1	60

3.4	Angiogenin1 ist das einzige deregulierte Mitglied der <i>RNase5</i> -Familie in <i>Ebf2</i> - exprimierenden Osteoblasten.	63
3.5	Angiogenin1 ist ein direktes EBF2-Zielgen, seine Expression wird von Promotor1 aus reguliert	63
3.6	Die Transaktivierung des <i>Ang1/RNase4</i> Promotors durch EBF.	64
3.7	Wird neben EBF2 noch ein Kofaktor zur Induktion von Angiogenin1 benötigt?	66
3.8	Die biologische Rolle von <i>Ang1</i> in der haematopoietischen Stammzellnische	67
3.9	Geringe Expressionsunterschiede zwischen <i>Ebf2</i> ^{+/-} und <i>Ebf2</i> ^{-/-} Zellen durch redundante Wirkungsweise der Mitglieder der EBF-Familie?	68
3.10	Effekte einer gleichzeitigen Defizienz von EBF1, 2 und 3	68
3.11	Eine dreifache EBF-Defizienz – die Herstellung eines Mausmodells	70
3.12	Ausblick	72
4	Material und Methoden	74
4.1	Material	74
4.1.1	Ausstattung	74
4.1.2	Enzyme	75
4.1.3	Western-Blot-Antikörper	75
4.1.4	Längenstandards	75
4.1.5	Kits	76
4.1.6	DNA Micro-Array	76
4.1.7	Plasmide	76
4.1.8	Sonden für Southern-Blot-Analysen	77
4.1.9	Oligonukleotide	78
4.1.9.1	Real-Time PCR Oligonukleotide	78
4.1.9.2	Oligonukleotide zur Maus-Genotypisierung	80
4.1.9.3	Oligonukleotide für Klonierungen	80
4.1.9.4	Oligonukleotide zur Gelretardierung	81
4.1.9.5	miRNA-Oligonukleotide	82
4.1.10	Bakterien	83
4.1.11	Zelllinien	83
4.1.12	Mausstämme	84
4.2	Methoden	85
4.2.1	Molekularbiologische Methoden	85
4.2.1.1	Arbeiten mit RNA	85
4.2.1.1.1	RNA-Isolierung aus Säugerzellen	85
4.2.1.1.2	Herstellung von cDNA mittels RT-PCR	85
4.2.1.1.3	Quantitative RT-PCR	86
4.2.1.2	Arbeiten mit DNA	87
4.2.1.2.1	DNA Isolation	87
4.2.1.2.2	DNA Fällung und Reinigung	88
4.2.1.2.3	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	89
4.2.1.2.4	Southern-Blot nach Southern, E.M.	89
4.2.1.2.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	91
4.2.1.2.6	Punktgerichtete Mutagenese	92
4.2.1.3	Arbeiten mit Proteinen	92
4.2.1.3.1	Proteinextraktion aus Säugerzellen für Western-Blot	92
4.2.1.3.2	Extraktion von Kernproteinen aus Säugerzellen für Gelretardierung	92
4.2.1.3.3	<i>In vitro</i> Translation von Proteinen	93
4.2.1.3.4	Proteinextraktion von Säugerzellen für Luziferase-Reporter-Assays	93
4.2.1.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	93
4.2.1.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen nach Lämmli	94

4.2.1.3.7	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose (Western-Blot nach Towbin <i>et al.</i> , 1979).....	94
4.2.1.3.8	Immundetektion von Proteinen	95
4.2.1.4	Illumina Oligonukleotid-Micro-Arrays	95
4.2.1.5	Zellkultur	96
4.2.1.5.1	Allgemeine Zellkultur Techniken	96
4.2.1.5.2	Bestimmung der Zelldichte	97
4.2.1.5.3	Ablösen von adhärenen Zellen.....	97
4.2.1.5.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	98
4.2.1.5.5	Kultivierung von embryonalen Fibroblastenzellen	98
4.2.1.5.6	Mitotische Inaktivierung von EF-Zellen	98
4.2.1.5.7	Kultivierung von embryonalen Stammzellen.....	99
4.2.1.5.8	Generierung stabiler ES-Zell-Klone.....	99
4.2.1.5.9	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	100
4.2.1.5.10	Isolation und Kultur primärer <i>Ebf2</i> -exprimierender Osteoblasten aus E18,5 Mausembryonen.....	101
4.2.1.5.11	Isolation von Knochenmarkszellen und haematopoietischen Stammzellen aus der Maus.....	102
4.2.1.5.12	Durchflusszytometrie	103
4.2.1.5.13	Herstellung von Retroviren und retrovirale Infektion muriner Zelllinien und primärer Zellen aus der Maus.....	103
4.2.1.5.14	Kokultur von primären Osteoblasten und haematopoietischen Stammzellen aus der Maus.....	104
4.2.1.6	Deregulation von Proteinen mittels miRNA	104
4.2.1.7	Gelretardierung.....	105
4.2.1.7.1	Anlagerung des Oligonukleotids.....	105
4.2.1.7.2	Radioaktive Markierung eines Oligonukleotids für EMSA-Analysen	105
4.2.1.7.3	Bindereaktion von Proteinen an eine radioaktiv markierte Probe.....	105
4.2.1.7.4	Gellauf	106
4.2.1.8	Luziferase- und β -Galaktosidase-Test.....	106
4.2.1.8.1	Luziferase-Messung	106
4.2.1.8.2	β -Galaktosidase-Messung	106
	Abkürzungen	107
	Abbildungsverzeichnis	109
	Literaturverzeichnis.....	111
	Danksagung	121
	Ehrenwörtliche Erklärung	122
	Curriculum Vitae.....	123

Zusammenfassung

Haematopoiese, die Bildung der Blutzellen aus haematopoietischen Stammzellen, ist ein Prozess, der im Knochenmark von Vertebraten stattfindet. Zur Steuerung von Erhalt, Differenzierung und Selbst-Erneuerung haematopoietischer Stammzellen ist das Einwirken diverser Faktoren aus verschiedenen zellulären Milieus von essentieller Bedeutung.

Die Proteinfamilie der EBF (*early B-cell factor*) Transkriptionsfaktoren besteht aus 4 Mitgliedern, welche sowohl untereinander als auch evolutionär stark konserviert sind. Eine essentielle Rolle von EBF1 in der Haematopoiese, genauer in der Entstehung früher B-Zellen konnte bereits nachgewiesen werden. Die Expression von EBF2, einem weiteren Mitglied dieser Familie, konnte in haematopoietischen Organen wie dem Knochenmark, genauer in Osteoblasten, gezeigt werden. *Ebf2*-exprimierende osteoblastäre Zellen sind dem Endosteum angelagert und stellen eine molekulare Nische dar, die zum Erhalt haematopoietischer Zellen beiträgt. Wie gezeigt werden konnte ist die Anzahl von Osteoblasten proportional zur Anzahl haematopoietischer Stammzellen.

Die gezielte Zerstörung von *Ebf2* in mutanten Mauslinien führt dazu, dass es zu einer verminderten Anzahl haematopoietischer Stammzellen im Knochenmark kommt. Dieser Phänotyp beruht auf einer direkten Störung der stammzellunterstützenden Funktion von unreifen Osteoblasten in EBF2-defizienten Mäusen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Analyse EBF2-defizienter Zellen einen Beitrag zur besseren Charakterisierung der Stammzellnische leisten kann. Durch den Vergleich der Expressionsmuster von *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} osteoblastären Zellen der Maus konnte *Ang1*, ein Mitglied der RNase5-Familie in EBF2-defizienten Zellen als vermindert exprimiert gefunden werden. Dieses sezernierte Protein spielt eine Hauptrolle bei der Bildung von Blutgefäßen. Auch ist bekannt, dass *Ang1* an Zellen bindet, in diese eingebracht wird und dort durch die Stimulation der rRNA-Transkription die Ribosomenbiogenese und somit die Zellproliferation beeinflussen kann. Das verringerte *Ang1*-Level in der haematopoietischen Stammzellnische könnte so einen Einfluss auf die Proliferation der Stammzellen haben. Analysen dieser Arbeit identifizieren *Ang1* als direktes Zielgen von EBF2.

In vitro konnte durch eine gleichzeitige Verminderung der Expression von *Ebf1*, 2 und 3 in osteoblastären Zellen mittels RNAi eine weitere Verringerung der stammzellunterstützenden Funktion der Osteoblasten gezeigt werden. Um diesen Effekt *in vivo* untersuchen zu können, wurde ein Mausmodell zur gleichzeitigen Expressionsverminderung von *Ebf1*, 2 und 3 generiert.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Unser Organismus ist den verschiedensten Arten von Pathogenen ausgesetzt. Zu seinem Schutz haben sich eine Reihe hoch spezialisierter Zelltypen entwickelt, die das Immunsystem des Körpers bilden. Wie alle zellulären Bestandteile des Blutes entwickeln sich Zellen des Immunsystems aus haematopoietischen Stammzellen, die sich bei Säugern im Knochenmark befinden. Pluripotente Stammzellen haben die Fähigkeit, sich entweder selbst zu erneuern, oder Vorläuferzellen zu bilden, welche sich in begrenztem Maße wieder vermehren und zu myeloiden und lymphatischen Zellen differenzieren (Abb. 1). Myeloide Vorläuferzellen können sich zu Granulozyten und Makrophagen weiter entwickeln und als Hauptbestandteil des angeborenen Immunsystems agieren. Lymphatische Vorläufer entwickeln sich zu Lymphozyten, die sich in B-Lymphozyten und T-Lymphozyten untergliedern. Lymphozyten sind Teil der adaptiven Immunantwort, bei der man die zelluläre von der humoralen Immunantwort unterscheidet.

1.2 Haematopoietische Stammzellen – Die Grundlage des Immunsystems

Wie bereits erwähnt, bilden haematopoietische Stammzellen die Grundlage des Immunsystems. Im sich entwickelnden Mausembryo findet die Bildung haematopoietischer Stammzellen im Dottersack, der Plazenta und der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region ca. 10 Tage nach der Befruchtung statt (Godin et al., 1995; Medvinsky and Dzierzak, 1996). Ab E12,5 können haematopoietische Stammzellen hauptsächlich in der fötalen Leber gefunden werden (Mikkola and Orkin, 2006), zum Zeitpunkt der Geburt wandern sie über das Blut zum Knochenmark.

Eine ihrer wichtigsten Fähigkeiten ist es, einen lebenslangen Erhalt aller Blutzelltypen zu gewährleisten. Auch über die Lebensdauer eines Organismus behalten haematopoietische Stammzellen diese Fähigkeit. Das zeigt die Tatsache, dass das stammzellenthaltende Knochenmark in zweite und dritte Empfänger transplantiert werden kann ohne die Kapazität

zur Selbst-Erneuerung und Differenzierung in alle Zelltypen des Immunsystems zu verlieren (Domen and Weissman, 1999). Zu identifizieren sind haematopoietische Stammzellen einerseits durch das Nichtvorhandensein Linien-spezifischer Oberflächenmarker (LIN⁻) wie CD4, CD8, B220, TER119, MAC1 und GR1, die hauptsächlich von differenzierten Zellen exprimiert werden und andererseits durch die starke Expression von *Scal* und *cKit* (lin⁻, *scal*⁺, *ckit*⁺, so genannte LSK-Zellen). Allerdings haben nur ca. 8% dieser LSK-Zellen, die Langzeithaematopoietischen Stammzellen, eine nicht limitierende Selbsterneuerungskapazität (Osawa et al., 1996). Im Gegensatz zu Kurzzeithaematopoietischen Stammzellen befinden sich diese Zellen in einem ruhenden Status, das heißt sie teilen sich nur sehr selten. Die sich häufiger teilenden Kurzzeithaematopoietischen Stammzellen entwickeln sich aus Langzeithaematopoietischen Stammzellen, differenzieren weiter zu gemeinsamen Vorläuferzellen (Abb. 1) und unterscheiden sich zum Beispiel durch die Expression von CD34, die auf Langzeithaematopoietischen Stammzellen nicht zu detektieren ist (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000; Christensen and Weissman, 2001; Adolfsson et al., 2005; Kiel et al., 2005; Yang et al., 2005).

1.3 Mesenchymale Stammzellen – ein weiterer Bestandteil des Knochenmarks

Neben haematopoietischen Stammzellen sind mesenchymale Stammzellen ein weiterer Bestandteil des Knochenmarks (Short et al., 2003; Muguruma et al., 2006; Wang et al., 2006). Aus diesen undifferenzierten, multipotenten Zellen entsteht die Mehrheit der stromalen Zellen, wie zum Beispiel die zur Knorpelbildung benötigten Chondrozyten, knochenbildende Osteoblasten, Fibroblasten, Adipozyten des Fettgewebes, Endothelzellen und muskelbildende Myozyten (Abb. 1). Ein Kriterium zur Identifikation mesenchymaler Stammzellen ist das Fehlen von haematopoietischen Markern wie CD45, CD14, CD34 sowie des Endothelmarkers CD31 (Valtieri and Sorrentino, 2008). Durch die Transplantation einer Zellpopulation von CD146 positiven koloniebildenden Fibroblasten (CFU-F) konnte die multipotente Kapazität dieser Zellen gezeigt werden. CD146 positive Zellen konnten so als selbsterneuernde skelettbildende Vorläuferzellen identifiziert werden (Sacchetti et al., 2007).

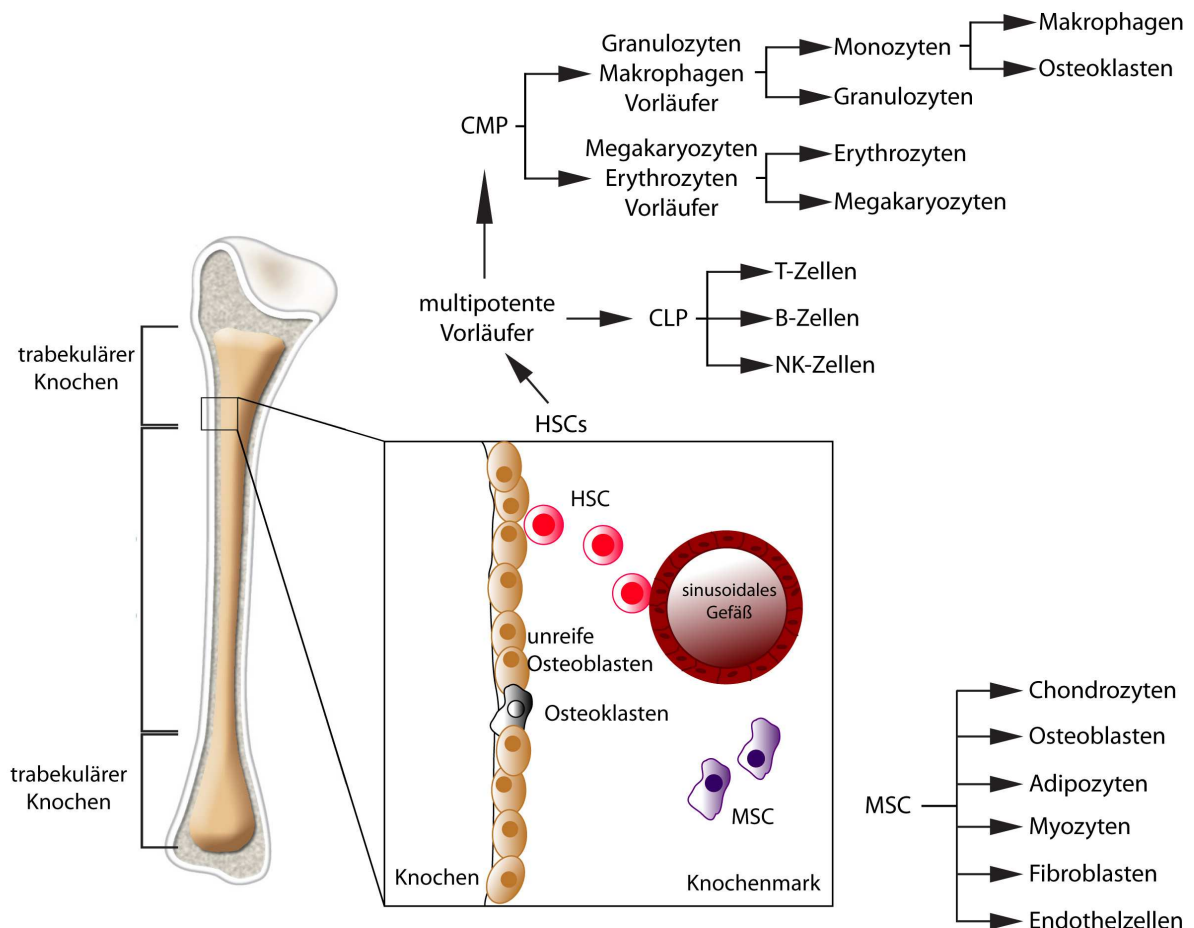


Abbildung 1: Haematopoiese im Knochenmark. Haematopoietische Stammzellen (HSC) befinden sich im Knochenmark in der Nähe der dem Endosteum angelagerten Osteoblasten, oder in der Nachbarschaft von Endothelzellen der sinusoidalen Gefäße. Nach jeder Teilung verlässt eine Tochterzelle die Stammzellnische um zu proliferieren und zu differenzieren. Aus haematopoietischen Stammzellen entwickeln sich zwei Vorläuferlinien: CMPs (*common myeloid progenitor*, gemeinsame myeloide Vorläufer) und CLPs (*common lymphoid progenitor*, gemeinsame lymphoide Vorläufer). Mesenchymale Stammzellen (MSC) befinden sich ebenfalls in der Knochenhöhle. Sie differenzieren zu Chondrozyten, Osteoblasten, Adipozyten, Myozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Geändert nach: (Yin and Li, 2006).

1.4 Osteoblasten – Abkömmlinge mesenchymaler Stammzellen

Die sich aus mesenchymalen Stammzellen entwickelnden Osteoblasten weisen je nach Differenzierungsstadium eine unterschiedliche Morphologie auf und sind dem Endosteum angelagert. Eine der Hauptaufgaben von Osteoblasten ist die Regulation des Knochenaufbaus (Wagner and Karsenty, 2002). Die Grundlage der Knochenbildung beruht auf einem Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -resorption. Für dieses Gleichgewicht ist eine Balance von Osteoblasten und Osteoklasten, welche aus haematopoietischen Vorläufern

entstehen und für die Resorption des Knochens verantwortlich sind, essentiell (Takahashi et al., 1988). Osteoklasten sind wie Osteoblasten dem Endosteum angelagert. Eine Kommunikation dieser beiden Zelltypen findet einerseits durch das von Osteoblasten sezernierte M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) statt, welches ein Überlebenssignal für Osteoklasten liefert (Yoshida et al., 1990; Lagasse and Weissman, 1997; Tsurukai et al., 2000). Andererseits spielt der von Osteoblasten exprimierte Rezeptor-Aktivator des NF- κ B Liganden RANKL (Taichman et al., 1996; Simonet et al., 1997; Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998; Dougall et al., 1999; Kong et al., 1999; Taichman et al., 2001) eine essentielle Rolle in der Induktion der Osteoklastendifferenzierung (Udagawa et al., 1999).

Während der Differenzierung von Osteoblasten findet eine Expression verschiedener zelltypspezifischer Gene wie zum Beispiel alkalischer Phosphatase (AP), *Bsp (bone sialoprotein)* und *Osteocalcin* statt. Reguliert wird deren Expression unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Osterix*. *Runx2* wird zu Beginn der Osteoblastendifferenzierung exprimiert (Ducy et al., 1997), während Osterix erst zu einem späteren Zeitpunkt wichtig wird.

Neben der Regulation der Osteoklastendifferenzierung geben erste Daten von Taichman et al. einen Hinweis darauf, dass Osteoblasten einen Einfluss auf haematopoietische Stammzellfunktionen haben (Taichman et al., 1996). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass einige der spindelförmigen Osteoblasten das Oberflächenmolekül N-Cadherin exprimieren und verantwortlich für die Interaktion mit haematopoietischen Stammzellen sind (Zhang et al., 2003).

1.5 Die Stammzellnische

Der von Taichman et al. (1996) dargestellte Einfluss von Osteoblasten auf haematopoietische Stammzellen beschreibt die Ausbildung einer so genannten Nische. Eine besondere Rolle bei der Bildung einer Nische spielen benachbarte unterstützende Zellen, die bestimmte Oberflächenmoleküle präsentieren oder Signalmoleküle in die Umgebung abgeben. Im Bezug auf haematopoietische Stammzellen regulieren Signale aus der Nische die Selbsterneuerung, das Überleben und somit den Erhalt der Zellen. Auch auf die Differenzierung der Zellen haben Signale aus der Umgebung Einfluss. Ein weiteres Charakteristikum einer Nische ist die räumliche Anordnung und Beziehung der Stammzellen mit den unterstützenden Zellen.

Der Begriff der Nische wurde zuerst 1978 von Schofield geprägt, welcher durch die Arbeit an koloniebildenden Zellen aus der Milz (CFU-S, *colony-forming unit spleen*) postulierte, dass „Stammzellen in direktem Verbund mit anderen Zellen stehen, die ihr Verhalten beeinflussen“ (Schofield, 1978). Diese Hypothese wird durch eine Vielfalt von Kokultur-Experimenten unterstützt (Dexter et al., 1977; Rios and Williams, 1990; Roecklein and Torok-Storb, 1995; Sitnicka et al., 1996; Moore et al., 1997; Li et al., 2004).

Momentan ist noch unklar, ob alle postulierten Funktionen der Stammzellnische von einem einzigen Milieu bewerkstelligt werden können, oder ob die Zellen in mehreren Umgebungen verschiedenen Schicksalen unterliegen.

1.5.1 Die endosteale Nische

Haematopoietische Stammzellen lassen sich am Endosteum in trabekulären Strukturen der Röhrenknochen detektieren (Abb. 1). Somit wurde ein morphologischer Beweis für eine Lokalisierung der Stammzellen nahe der am Endosteum angelagerten Osteoblasten erbracht. Differenzierte haematopoietische Vorläufer dagegen werden mehr in Zentrum des Knochenmarks detektiert (Lord et al., 1975; Gong, 1978; Nilsson et al., 2001; Askenasy and Farkas, 2003; Zhang et al., 2003; Wilson et al., 2004; Sipkins et al., 2005).

Durch unabhängige Studien konnte osteoblastären Zellen eine direkte Rolle bei der Regulation und dem Erhalt von haematopoietischen Stammzellen zugeteilt werden. In zwei dieser Arbeiten wurde in verschiedenen Mausmodellen die Zahl der Osteoblasten erhöht. Erreicht wurde das einerseits durch die Osteoblasten-spezifische Expression einer konstitutiv aktiven Form des Parathyroid-Hormon-verwandten Proteinrezeptors (PPR), eines wichtigen Regulators der Calcium-Homeostase und der Knochenbildung (Calvi et al., 2003). In einem weiteren Experiment wurde die Zahl der Osteoblasten durch die fehlende Expression des BMP1-Rezeptors (Chen et al., 2004) erhöht (Zhang et al., 2003). Beide Studien zeigen, dass eine Erhöhung der Zahl der Osteoblasten direkt in Zusammenhang mit einer Erhöhung der haematopoietischen Stammzellen steht. Osteoblasten scheinen somit einen wichtigen Teil der haematopoietischen Stammzellnische zu bilden und einen limitierenden Faktor für Größe und Aktivität der Nische darzustellen.

1.5.2 Die vaskuläre haematopoietische Stammzellnische

Neben den Osteoblasten am Endosteum identifizierten andere Studien die Endothelzellen der sinusoidalen Blutgefäße im Knochenmark als Zellen mit stammzellunterstützender Nischenfunktion (Kiel et al., 2005).

Ursprünglich wurde vermutet, dass eine vaskuläre Nische erst während einer Mobilisierung der Stammzellen durch Stress oder Verletzung stärker besetzt wird. Ein Modell beschreibt, dass sich ruhende Stammzellen vom Endosteum lösen und zur vaskulären Zone wandern um dort die Haematopoese wieder herzustellen (Heissig et al., 2002; Avecilla et al., 2004; Kopp et al., 2005). Kürzlich konnten haematopoietische Stammzellen auch durch eine neue Kombination von Oberflächenmarkern der *signaling lymphocyte activation molecule* (SLAM) Familie ($CD150^+$, $CD48^-$, $CD41^-$) identifiziert werden. In diesen Studien wurde ein großer Teil von $CD150^+$ haematopoietischen Stammzellen auch ohne das Auslösen von Stress in direktem Kontakt zum Endothel der Gefäße im Inneren des Knochenmarks nachgewiesen (Kiel et al., 2005). Diese Entdeckung könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine vaskuläre Nische als Alternative zum Endosteum auch während der normalen Homeostase existiert. Die Tatsache, dass ein Teil der $CD150^+$ Stammzellen proliferiert, könnte darauf hinweisen, dass die vaskuläre Nische mehr selbsterneuernde Stammzellen beherbergt, während das Endosteum eine Nische für ruhende Stammzellen bildet (Kopp et al., 2005).

Analog zu den Osteoblasten konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen haematopoietische Stammzellen in Zellkultur unterstützen können und die Funktion der Endothelzellen zur Unterstützung der Haematopoese *in vivo* benötigt wird (Ohneda et al., 1998; Li et al., 2004; Yao et al., 2005).

Vermutlich fördert das Endothel der sinusoidalen Gefäße die Proliferation und Differenzierung von Stammzellen durch das zur Verfügung stellen einer nährstoffreicheren Umgebung, mit einer höheren Konzentration an Sauerstoff und Wachstumsfaktoren (Abkowitz et al., 2003; Kopp et al., 2005). Stammzellen scheinen also unter unterschiedlichen Umständen verschiedene Nischen zu nutzen (Wagers, 2005).

1.5.3 Molekulare Mechanismen der endostealen Nische

Die Signaltransduktion zwischen haematopoietischen Stammzellen und osteoblastären Zellen am Endosteum ist bisher nur unvollständig beschrieben. Einigen Proteinen konnte eine Funktion in der Regulation der Stammzellnische jedoch nachgewiesen werden.

Die Expression des Liganden CXCL12 (SDF1) durch stromale Zellen des Knochenmarks, also auch durch Osteoblasten und vaskuläre Endothelzellen, (Ponomaryov et al., 2000; Ara et al., 2003) kann Motilität, Chemotaxis und Adhäsion von CXCR4 (SDF1-Rezeptor) exprimierenden haematopoietischen Stammzellen (Peled et al., 1999; Kortessidis et al., 2005) beeinflussen. Einerseits induziert SDF1 eine transendotheliale Migration von haematopoietischen Stammzellen, andererseits dient eine hohe Expression von SDF1 auf der osteoblastären Oberfläche als „Lockmittel“ um zirkulierende haematopoietische Stammzellen zurück in ihre Nische zu führen (Katayama et al., 2003).

Ein weiteres Molekül, das einen Einfluss auf haematopoietische Stammzellen hat, ist Osteopontin. Durch die Wirkung des von Osteoblasten produzierten Osteopontin wird in haematopoietischen Stammzellen der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet. OPN-defiziente Mäuse zeigen daher eine erhöhte Anzahl an haematopoietischen Stammzellen (Nilsson et al., 2005; Stier et al., 2005).

Das von Osteoblasten exprimierte SCF bindet und aktiviert KIT auf haematopoietischen Stammzellen (Lyman and Jacobsen, 1998) und gewährleistet dadurch deren Überleben und Proliferation (Bernstein et al., 1991; Heissig et al., 2002).

Umstritten ist der Einfluss von N-Cadherin auf die haematopoietische Stammzellnische. Einerseits wurde gezeigt, dass N-Cadherin von spindelförmigen N-Cadherin-exprimierenden Osteoblasten (SNOs) und von einem Teil von LSK haematopoietischen Stammzellen exprimiert wird und eine Anlagerung der Stammzellen an die Osteoblasten vermittelt (Zhang et al., 2003; Arai et al., 2004; Wilson et al., 2004; Murphy et al., 2005; Suda et al., 2005). Andere Studien bezweifeln jedoch die Expression von N-Cadherin auf haematopoietischen Stammzellen und somit die Funktion von N-Cadherin in der haematopoietischen Stammzellnische (Kiel and Morrison, 2008).

Eine Sekretion von Angiopoietin1 durch Osteoblasten aktiviert TIE2 auf haematopoietischen Stammzellen. Dadurch wird die Expression von N-Cadherin in Stammzellen erhöht und die Adhäsion von haematopoietischen Stammzellen am Endosteum verstärkt (Arai et al., 2004). Außerdem wird durch die Signaltransduktion von Angiopoietin1 und TIE2 der Erhalt

ruhender Stammzellen gefördert und eine Proliferation der Zellen verhindert (Spangrude and Johnson, 1990; Fleming et al., 1993; Cheng et al., 2000; Arai et al., 2004).

1.6 Die Expression von *Ebf2* in unreifen Osteoblasten.

Neben den gerade erwähnten an der Signaltransduktion zwischen Osteoblasten und haematopoietischen Stammzellen beteiligten Oberflächenmolekülen und sezernierten Proteinen und den vorher erwähnten Osteoblasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Osterix*, wird *Ebf2* (*early B-cell factor*), ein weiterer Transkriptionsfaktor, von osteoblastären Vorläufern im Knochen exprimiert. Gezeigt wurde dies unter anderem durch β -Galaktosidasefärbung von Kryoschnitten von E16,5 Embryonen des *Ebf2-LacZ* Mausmodells. Tiere dieses Modells tragen eine *LacZ* Insertion direkt 3' hinter der Translationsinitiationsstelle des *Ebf2*-Gens (Corradi et al., 2003). *Ebf2* kann in diesen Tieren an Strukturen der Knochenbildung und im Fettgewebe detektiert werden (Abb. 2). Durch weitere Analysen LacZ-positiver und LacZ-negativer Zellen dieses Mausmodells konnte die Expression von *Ebf2* in unreifen osteoblastären Zellen gezeigt werden (Kieslinger et al., 2005).

1.7 Early B-cell Faktoren

Proteine der *early B-cell factor* (EBF) Familie bilden eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die als Homo- und Heterodimere über eine Zink-Finger-Domäne an DNA binden. Die DNA-Bindestelle, eine Variation der palindromischen Sequenz 5'-ATTCCCNNGGGAAT-3', wird von allen vier (EBF1, 2, 3 und 4) Mitgliedern der Familie erkannt und gebunden (Hagman et al., 1993; Wang and Reed, 1993; Hagman et al., 1995; Wang et al., 2002). Die Dimerisierung findet über eine *helix-loop-helix* Domäne (HLH-Domäne) statt. Die beiden 15 Aminosäuren langen Helizes, die durch einen 7 Aminosäure langen *loop* getrennt sind, weisen große Ähnlichkeit auf. Dieses Merkmal unterscheidet die EBF-Familie von anderen bekannten *helix-loop-helix* Proteinen, deren HLH-Domäne aus zwei unterschiedlichen Helizes aufgebaut ist (Dubois and Vincent, 2001; Maier and Hagman, 2002). Die Analyse von EBF1 zeigte das Vorhandensein einer putativen Transkriptionsfaktor-Ig-ähnlichen Domäne zwischen der DNA-Bindedomäne und dem *helix-loop-helix* Motiv, die

auch in allen anderen Mitgliedern zu finden ist und deren Funktion noch nicht bekannt ist (Aravind and Koonin, 1999; Bork et al., 1999).

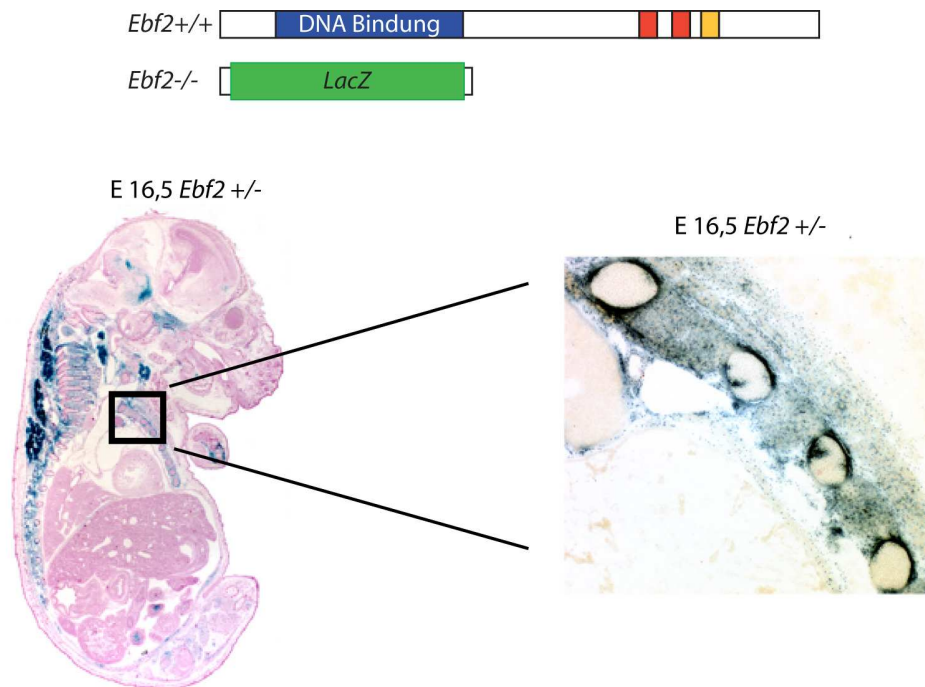


Abbildung 2: Expression von *Ebf2* an Stellen der Osteogenese. Die β -Galaktosidasefärbung von Kryoschnitten von E16,5 *Ebf2-LacZ*^{+/-} Embryonen zeigt die Expression von *Ebf2* unter anderem im Fettgewebe und an Strukturen der Knochenbildung (Kieslinger et al., 2005).

1.7.1 EBF1

EBF1, das zuerst entdeckte Protein dieser Familie, ist unter anderem in B-Lymphozyten, neuronalen Zellen und Adipozyten exprimiert. Wie gezeigt werden konnte spielt EBF1 eine zentrale Rolle in der frühen B-Zell-Entwicklung. Essentielle B-Zell-Gene, die zum Beispiel an der V(D)J-Rekombination und an der Zusammensetzung des B-Zell-Rezeptors beteiligt sind, werden von EBF1 aktiviert. Eine gezielte Deletion von EBF1 erlaubt zwar die Expression der B-Zell spezifischen *lineage Marker* *B220* und *CD43* und die Expression von *IL-7Ralpha*, andere Gene, die eine Rolle in der B-Zell-Signaltransduktion spielen, wie *lamda5*, *VpreB*, *CD19*, *mb1* und *B29*, werden allerdings nicht exprimiert. Auch die Expression des Transkriptionsfaktors *Pax5* und die für die Ig-Gen-Rearrangierung verantwortliche Expression der Gene *Rag1* und *Rag2* fehlen in EBF1-defizienten Mäusen.

Dadurch kommt es zu einer Hemmung der frühen B-Zellentwicklung (Hagman et al., 1993; Lin and Grosschedl, 1995).

1.7.2 EBF2

Um das Expressionsmuster von *Ebf2* genauer zu untersuchen, wurden Mäuse des bereits beschriebenen *Ebf2-LacZ* Mausmodells analysiert (Corradi et al., 2003). Während der embryonalen Entwicklung konnte die *Ebf2*-Expression ab dem 9. Tag nach der Befruchtung (E9) im ersten und zweiten Kiemenbogen, in den Somiten, speziell in den sich bildenden Sklerotomen (E10 und E10,5) und im dorsalen Wurzelganglion (E12,5) gezeigt werden (Kieslinger et al., 2005). 16,5 Tage nach der Befruchtung wurde die Expression von *Ebf2* auch in knochenbildenden Bereichen und in neuralen Geweben detektiert (Abb. 2) (Corradi et al., 2003; Kieslinger et al., 2005).

Durch die gezielte Deletion von EBF2 konnte eine wichtige Funktion dieses Proteins in der Morphogenese von peripheren Nerven, der Migration von Gonadotropinhormon-freisetzenden Neuronen und der Anlage von olfaktorischen Neuronen entdeckt werden (Corradi et al., 2003; Wang et al., 2004).

Die Analyse der *Ebf2-LacZ* positiven Zellen aus Knochen der Tiere zeigte die *Ebf2*-Expression in unreifen Osteoblasten und Vorläuferzellen von Osteo- und Chondrozyten (Kieslinger et al., 2005). Ein weiterer Phänotyp von EBF2-defizienten Mäusen ist die Reduktion von Größe und Gewicht, gemessen an drei Wochen alten Tieren im Vergleich zum Wildtyp. EBF2-defiziente Mäuse zeigen eine normale Knochenbildung, haben aber eine um 40% verringerte Knochendichte und eine um 50% erhöhte Knochenresorption. Die Zahl der Osteoblasten bleibt im Vergleich zum Wildtyp unverändert, es konnte aber eine erhöhte Anzahl von Osteoklasten detektiert werden. Weiterhin konnte eine verringerte Expression von *Osteoprotegerin* (*Opg*) und eine erhöhte Expression von *Rankl* in EBF2-defizienten Zellen festgestellt werden. OPG, ein RANK-Homolog, ist auch bekannt als Osteoklastogenese-inhibierender Faktor, der durch die Bindung an RANKL die RANK-RANKL Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten blockiert und somit die Differenzierung von Osteoklastenvorläufern zu reifen Osteoklasten hemmt. Durch Kokulturversuche konnte der Einfluss der verminderten *Opg*-Expression mit der verstärkten Differenzierung der Osteoklasten in Verbindung gebracht werden. Wie sich außerdem zeigte ist *Osteoprotegerin* ein direktes *Ebf2*-Zielgen (Kieslinger et al., 2005).

Durch die EBF2-Defizienz ist außerdem eine zwei- bis vierfache Reduktion von haematopoietischen Stammzellen im Knochenmark zu beobachten (Abb. 3). Adoptiver Transfer von *Ebf2*^{-/-} haematopoietischen Stammzellen in Wildtyp-Mäuse zeigte, dass dieser Phänotyp nicht stammzell-autonom sondern durch Veränderungen des stromalen Umfelds begründet ist. Wie bereits erwähnt und wie in von Dr. Kieslinger durchgeführten Untersuchungen gezeigt wurde, ist *Ebf2* neben der Milz und dem Thymus vor allem in stromalen Zellen des Knochenmarks, genauer in unreifen Osteoblasten exprimiert. Vorher wurde dargestellt, dass diese (*Ebf2*-exprimierenden) Osteoblasten dem Endosteum angelagert sind, welches wiederum eine Nische für haematopoietische Stammzellen darstellt und für normale Haematopoiese benötigt wird. Durch das Fehlen von EBF2 könnte eine Deregulation wichtiger stammzellunterstützender Faktoren stattfinden, und so zu einer Verringerung der haematopoietischen Stammzellpopulation führen (Abb. 3).

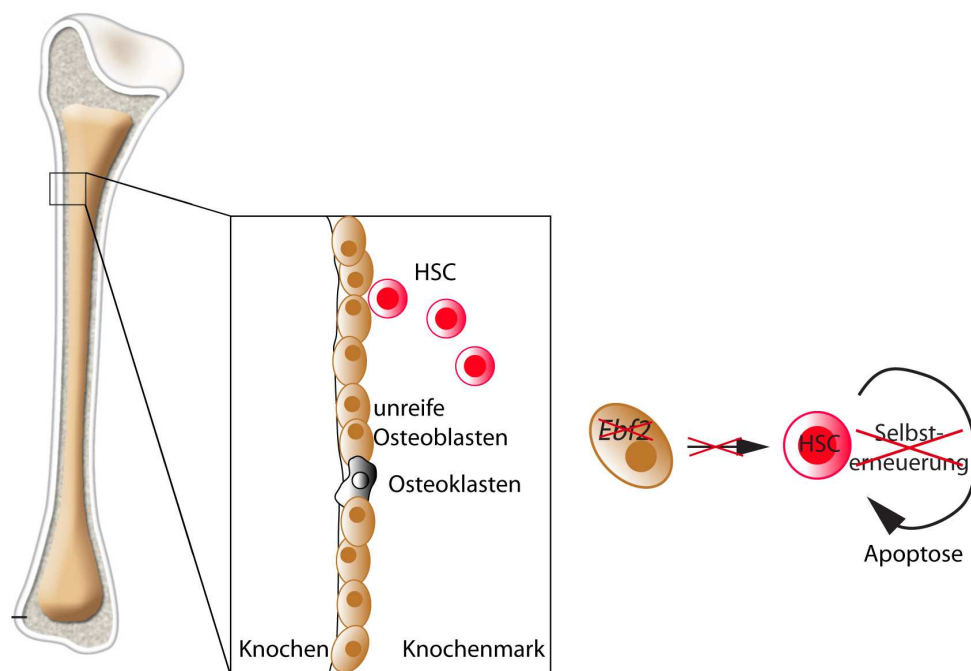


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Phänotyps EBF2-defizienter Mäuse. Das Fehlen von EBF2 in unreifen osteoblastären Zellen führt zu einer verringerten Anzahl haematopoietischer Stammzellen. Mögliche Gründe hierfür könnten eine durch die EBF2-Defizienz veränderte Expression von sezernierten oder transmembranären Proteinen sein.

1.7.3 EBF3 und EBF4

Die Expression von *Ebf3* ist der *Ebf2*-Expression sehr ähnlich und kann, wie *Ebf1*, in Adipozyten und in Neuronen im Gehirn detektiert werden (Garel et al., 1997; Malgaretti et al., 1997; Mella et al., 2004; Wang et al., 2004). In Gehirn-Tumorzellen, aber auch in Tumoren vieler anderer Gewebe wurde eine verminderte *Ebf3*-Expression festgestellt, was auf eine tumorsuppressive Funktion von EBF3 deutet. Eine Expression von *Ebf3* in diesen Tumorzellen führt zur Unterdrückung des Zellwachstums und zu Apoptose. Außerdem wurden Gene, die in der Suppression des Zellwachstums beteiligt sind, aktiviert (Zardo et al., 2002; Zhao et al., 2006). Genaueres über die zelluläre Funktion von *Ebf3* ist noch nicht bekannt.

EBF4 ist das am wenigsten charakterisierte Mitglied der EBF-Familie. Über die genaue Wirkungsweise und das Expressionsmuster dieses Proteins ist bisher noch sehr wenig bekannt, allerdings weisen erste Ergebnisse auf eine den anderen Familienmitgliedern eher entgegenwirkende Funktion hin. In *Reporter-assays* konnte durch die Bindung von EBF1, 2 und 3 an 10 konkatemerierte EBF-Bindestellen eines Luziferase-Reporterplasmids eine transkriptionsaktivierende Funktion nachgewiesen werden, während EBF4 eine hemmende Wirkung auf die Transkription auszuüben scheint. EBF4 könnte über seine *helix-loop-helix* Domäne mit anderen Mitgliedern der EBF-Familie interagieren, und so die Expression von Genen steuern und regulieren (Wang et al., 2002).

1.8 Die Redundanz der EBF-Familie

Wie sich zeigt, sind die 4 exprimierten EBF Proteine zu einem sehr hohen Grad zueinander homolog. Hinzukommt die Tatsache, dass auch in Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* (Collier) oder *C. elegans* (*Unc3*) verwandte Proteine gefunden wurden. Die Proteinfamilie der *early B-cell factors* ist also sowohl untereinander als auch evolutionär hoch konserviert (Abb. 4). Studien der Beinentwicklung bei Maus und Huhn (Mella et al., 2004) zeigen, dass *Ebf1*, 2 und 3 teilweise gleichzeitig und überlappend in den untersuchten Geweben exprimiert werden. In *in vitro* Differenzierungsversuchen konnte die simultane Expression von *Ebf1*, 2 und 3 in osteoblastären Zellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden Zellen aus der Schädeldecke von E18,5 Wildtyp-Mäusen in Zellkultur in reife Osteoblasten differenziert. Mittels quantitativer Real-Time PCR konnte die Expression von *Ebf1*, 2 und 3 während der

Differenzierung gezeigt werden (Kieslinger et al., 2005). Ebenfalls von Dr. Kieslinger und Dr. Saihong Jin durchgeführte Untersuchungen von *Ebf2-LacZ* bzw. *Ebf3-LacZ* Embryonen verschiedener Stadien zeigen ein großteils überlappendes Expressionsmuster von *Ebf2* und *Ebf3* (Daten nicht gezeigt). Zusammen mit der hohen Homologie von *Ebf1*, 2 und 3 und der Tatsache, dass alle Mitglieder der EBF-Familie die Fähigkeit besitzen an die gleiche DNA Sequenz zu binden, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass sich die einzelnen Familienmitglieder funktionell ersetzen können und damit bei Koexpression Redundanz vorliegt. Einige Funktionen werden von den einzelnen Mitgliedern allerdings spezifisch ausgeführt (Corradi et al., 2003; Wang et al., 2004).

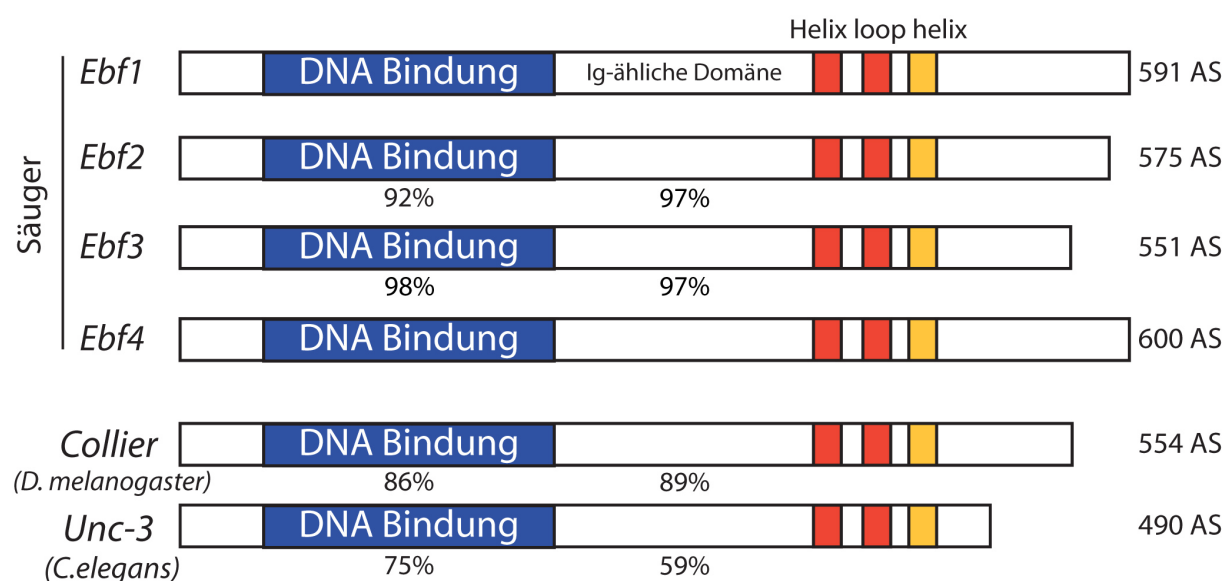


Abbildung 4: Schematische Darstellung und Vergleich der Familie der EBF-Transkriptionsfaktoren. Gezeigt sind murines *Ebf1*, 2, 3 und 4, *Drosophila Collier* und *C. elegans Unc3*. Die angegebenen Prozentzahlen stellen das Maß der Homologie der einzelnen Domänen dar. Die Größe der Proteine wird rechts gezeigt.

1.9 Weitere Analyse des EBF2-defizienten Phänotyps

Wie beschrieben, regulieren Osteoblasten den Erhalt haematopoietischer Stammzellen durch die Expression von Oberflächenmolekülen oder löslichen Wachstumsfaktoren. Daten von Dr. Kieslinger zeigen, dass die verringerte Anzahl an haematopoietischen Stammzellen in EBF2-defizienten Mäusen nicht auf einen Zell-autonomen Defekt, sondern auf die Mutation dieses Gens in osteoblastären Zellen zurückzuführen ist. Diese Mutation könnte im Fehlen solcher Faktoren resultieren und den beobachteten Phänotyp der Stammzelldefizienz

auslösen. In dieser Arbeit sollte durch die Analyse *Ebf2*-exprimierender Zellen aus dem Knochen von *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Tieren ein besseres Verständnis der Kommunikation zwischen haematopoietischen Stammzellen und ihrer Nische erlangt werden. Hierfür wurde das Expressionsmuster dieser beiden Zellen mittels DNA Micro-Array genauer analysiert. Angiogenin1, weiterer potentieller Faktor, der eine Rolle im Erhalt der Stammzellnische spielen könnte, wurde darüber identifiziert.

1.10 Funktionen von Angiogenin

1.10.1 Die biologische Rolle von Angiogenin1

Die Bildung neuer Blutgefäße spielt eine große Rolle in physiologischen Prozessen wie der embryonalen Entwicklung, der Entwicklung von Organen oder der Reparatur von Geweben nach Verletzung. Endothelzellen, die an diesem Prozess beteiligt sind, migrieren, proliferieren und differenzieren letztlich zu einem funktionalen Netzwerk aus Gefäßen (Gao and Xu, 2008). Unter normalen Umständen ist dieser Prozess starken Regulationsmechanismen unterworfen. Der Verlust dieser Kontrollmechanismen kann zu anormalem Wachstum von Blutgefäßen führen, und so genannte Angiogenese-abhängige Krankheiten hervorrufen. Hierzu zählt man unter anderem die Entstehung von Tumoren, Metastasen und chronischen Entzündungskrankheiten. Angiogenin (ANG), ein sezerniertes basisches Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 14 kDa, wurde zuerst aus Tumor-Zellkulturüberstand isoliert (Fett et al., 1985). Es induziert Angiogenese durch die Aktivierung von Blutgefäßendothel und glatten Muskelzellen. Weiter hilft Angiogenin eine Reihe von Prozessen, wie die Migration, Proliferation und Invasion von Zellen, auszulösen (Gao and Xu, 2008). Die Expression von Angiogenin kann in einigen Tumoren gefunden werden, in denen es für Zellproliferation und Tumorwachstum verantwortlich ist. Durch die Neutralisierung von ANG zum Beispiel durch monoklonale Antikörper kann die Etablierung eines Tumors erfolgreich verhindert werden (Kao et al., 2002).

1.10.2 Biochemische Aktivitäten von Angiogenin

1.10.2.1 Die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin

ANG ist ein Mitglied der Ribonuklease-Superfamilie und seine Ribonuklease-Aktivität ist von Bedeutung für die Induktion der Angiogenese. Allerdings zeigt ANG auf Grund seines Ribonuklease-atypischen aktiven Zentrums eine im Vergleich zur RNaseA sehr schwache enzymatische Aktivität (Acharya et al., 1994; Russo et al., 1994).

Neben seiner RNase-Aktivität ist die Bindung von ANG an die Oberfläche endothelialer Zellen maßgeblich für seine biologische Funktion. Über die Bindung von ANG an Zelloberflächen-Aktin (glattes Muskel Typ alpha-Aktin) wird die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin, einem wichtigen Enzym aus der Gruppe der Peptidasen, durch den Plasminogen-Aktivator (*tissue-type plasminogen activator* tPA) beschleunigt (Hu et al., 1991; Hu et al., 1993; Hu et al., 1994). Durch die Bildung eines Komplexes mit Aktin fördert ANG den Abbau von Basalmembran und extrazellulärer Matrix (Abb. 5). Somit können Endothelzellen während der Angiogenese in perivaskuläres Gewebe einwandern (Soncin, 1992).

1.10.2.2 Die Rolle von Angiogenin in der Signaltransduktion

Auf Endothelzellen konnte ein weiterer Bindepartner von ANG identifiziert werden. Bei diesem ANG-Rezeptor handelt sich um ein 170 kDa Molekül, das noch uncharakterisiert ist (Hu et al., 1994).

Trotz des fehlenden Wissens über ANG Rezeptoren konnte der Einfluss von ANG auf verschiedene Signaltransduktionswege gezeigt werden. Endothelzellen reagieren auf eine ANG-Behandlung mit der Aktivierung von ERK1/2 (*extracellular signal-related kinase*) und der Protein-Kinase B/Akt (Liu et al., 2001; Kim et al., 2007). Weiter konnte eine ANG-induzierte Phosphorylierung der Stress-assoziierten Protein-Kinase/c-jun N-terminalen Kinase (SAPK/JNK) beobachtet werden. Die Aktivierung dieser Moleküle ist wichtig für die Zellteilung in der Angiogenese (Xu et al., 2001).

Es scheint, dass die beiden ANG-Rezeptoren Aktin und der 170 kDa putative Rezeptor unter verschiedenen Bedingungen exprimiert werden. Wachsen Zellen unter konfluenten Bedingungen, wird Aktin exprimiert, bindet an ANG und aktiviert so ein zellassoziertes

Protease System, das den Abbau von extrazellulärer Matrix fördert (Hu et al., 1993; Hu et al., 1994). Durch verminderte Zelldichte wird die Expression des 170 kDa putativen ANG-Rezeptors ausgelöst. Dadurch kommt es zu vermehrten Proliferation der Zellen und somit könnte die Bildung neuer Blutgefäße induziert werden (Gao and Xu, 2008).

1.10.2.3 Nukleäre Translokation und Stimulation der rRNA-Transkription durch ANG

In Endothelzellen und glatten Muskelzellen konnte eine Translokation von ANG in den Zellkern beobachtet werden. Wie die Expression der ANG-Rezeptoren scheint auch die nukleäre Translokation abhängig von der Zelldichte zu sein. (Hu et al., 2000; Xu et al., 2001) Somit wird mit zunehmender Zelldichte die Translokation von ANG in den Kern verringert. ANG akkumuliert im Nukleolus und stimuliert durch die Bindung an ribosomale DNA die Transkription ribosomaler RNA (Xu et al., 2002; Xu et al., 2003; Tsuji et al., 2005). Somit beeinflusst ANG sekundär die Ribosomenbiosynthese und weiter die Translation von essentiellen Proteinen (Abb. 5). Wie gezeigt werden konnte ist ANG ein essentieller Faktor für die Proliferation von Zellen durch einen angiogenen Stimulus (z.B. durch *fibroblast growth factor* FGF oder *vascular endothelial growth factor* VEGF). Bei einer Verminderung der Angiogenin-Expression kann eine reduzierte rRNA-Transkription und verminderte Ribosomenbiogenese und Zellteilung beobachtet werden (Kishimoto et al., 2005; Tsuji et al., 2005).

Der Mechanismus der nukleären Translokation ist noch weitgehend unbekannt. Trotz der vorhandenen nukleären Lokalisierungssequenz (NLS) ist der Transport unabhängig vom Einfluss von *Importin* oder *Ran*, als auch von Mikrotubuli oder Lysosomen. Auf Grund des geringen Molekulargewichts könnte ANG passiv durch die Kernpore diffundieren (Lixin et al., 2001).

Ein Einfluss von ANG auf haematopoietische Zellen konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Es ist allerdings bekannt, dass ANG in vielen unterschiedlichen Tumorzellen, darunter auch in Leukämien und Lymphomen überexprimiert ist, und somit die rRNA-Transkription, Ribosomenbiogenese, Proliferation und Tumorigenese fördert (Yoshioka et al., 2006).

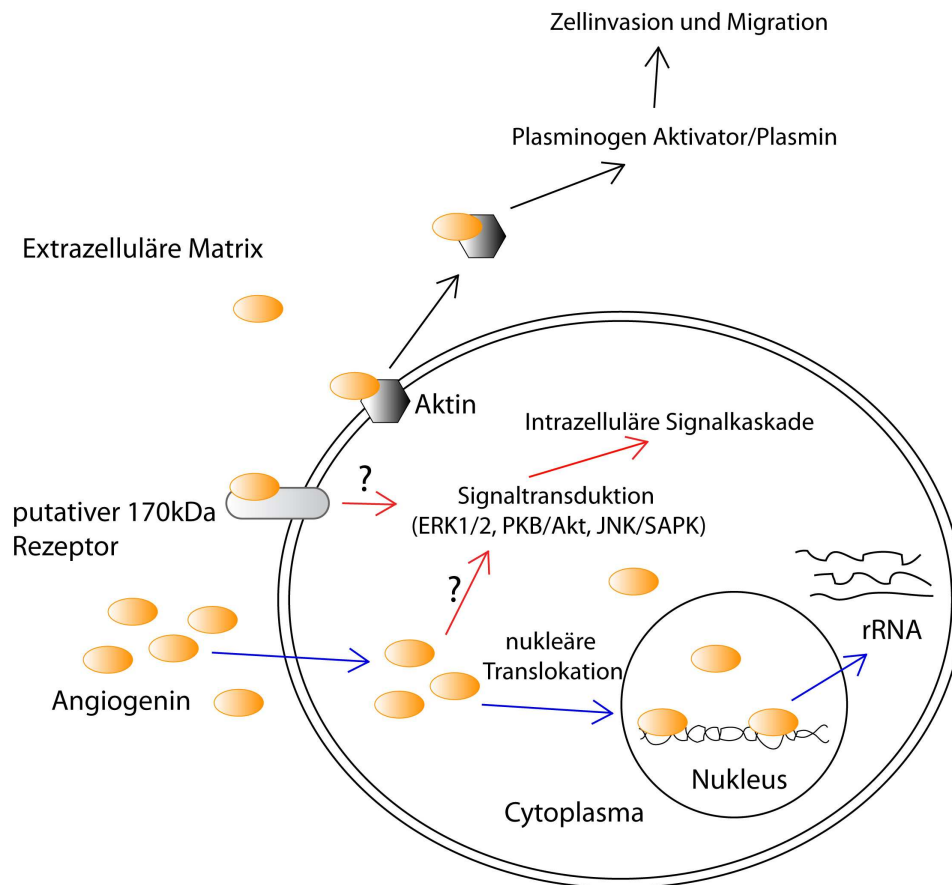


Abbildung 5: Übersicht über die Funktionen und Mechanismen von Angiogenin. Durch die Bindung an Zelloberflächen-Aktin wird die Spaltung von Plasminogen zu Plasmin durch den Plasminogen-Aktivator tPA beschleunigt. Unter Einfluss von ANG kommt es zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege, die möglicherweise durch die Bindung an einen Rezeptor oder als Zwischenschritt in der nukleären Translokation ausgelöst wird. Weiter kann ANG in den Kern transportiert werden und dort die Transkription von rRNA stimulieren.

1.11 Fragestellung der Arbeit

Die Proteinfamilie der EBF (*early B-cell factor*) Transkriptionsfaktoren besteht aus 4 Mitgliedern, welche sowohl untereinander als auch evolutionär stark konserviert sind. EBF1, das am frühesten entdeckte Familienmitglied, hat eine direkte und essentielle Rolle in der Haematopoese, genauer in der Entstehung früher B-Zellen. In Arbeiten von Dr. Kieslinger konnte die Expression von *Ebf2*, eines weiteren Mitglieds dieser Familie, in haematopoietischen Organen wie dem Knochenmark gezeigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass *Ebf2* nicht von haematopoietischen Zellen selbst, sondern von unreifen Osteoblasten im Knochenmark gebildet wird.

In *Ebf2*-mutanten Mauslinien kommt es unter anderem zu einer verminderten Anzahl haematopoietischer Stammzellen. Dieser Phänotyp beruht zumindest teilweise auf einer direkten Störung der stammzellunterstützenden Funktion unreifer Osteoblasten in EBF2-defizienten Mäusen. Wie unabhängig gezeigt werden konnte, spielen Osteoblasten eine wichtige Rolle zum Erhalt der haematopoietischen Stammzellnische (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003). Da die Deletion von EBF2 durch die Insertion einer GFP-Kassette erfolgte (Wang et al., 2004), können diese *Ebf2*-exprimierenden unreifen Osteoblasten direkt aus dem Knochen von *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Mäusen isoliert und zur Charakterisierung der haematopoietischen Stammzellnische analysiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen ob *Ebf2*-exprimierende Osteoblasten dazu dienen können, die haematopoietische Stammzellnische *in vivo* besser zu charakterisieren. Hierfür sollte der Vergleich von *Ebf2-Gfp*-exprimierenden Osteoblasten aus *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Mäusen zu einem besseren Verständnis der Faktoren, welche für den Erhalt von haematopoietischen Stammzellen wichtig sind, führen. Mögliche Mediatoren hierbei sind sezernierte oder Transmembranproteine, die von Osteoblasten exprimiert werden und eine regulatorische Funktion auf haematopoietische Stammzellen ausüben.

Die gleichzeitige Expression von *Ebf2* mit anderen *Ebf*-Familienmitgliedern, sowie deren hohe Homologie lassen auf eine redundante Wirkungsweise dieser Proteine schließen. Im Fall der EBF2-Deletion könnten Funktionen von EBF2 auch von anderen Familienmitgliedern übernommen werden. Ist dies der Fall, lässt ein gleichzeitiger *Knock-down* von *Ebf1*, 2 und 3 einen stärkeren Phänotyp vermuten. Dies sollte in dieser Arbeit durch die simultane Herunterregulation aller drei *Ebfs* mittels RNAi *in vitro*, sowie durch die Herstellung eines *in vivo* Mausmodells untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Analyse der haematopoietischen Stammzellen in *Ebf2*-defizienten Mäusen.

Ebf2 wird unter anderem von unreifen osteoblastären Zellen im Knochenmark exprimiert, denen eine Rolle im Erhalt haematopoietischer Stammzellen zugesagt wird. Mittels immunhistochemischer Färbung von Knochenschnitten konnten in der trabekulären Region des Femurs *Scal*-exprimierende haematopoietische Zellen in der Umgebung von *Ebf2*-exprimierenden osteoblastären Zellen gezeigt werden. Eine Analyse der B- und T-Zellen drei Wochen alter *Ebf2*^{-/-} Mäuse ergab eine reduzierte Zellzahl im Vergleich zum Wildtyp. Des Weiteren wurde die Anzahl der haematopoietischen Stammzellen in drei Wochen alten *Ebf2*-defizienten und Wildtyp Mäusen bestimmt. Es konnte eine zweifache Abnahme der haematopoietischen Zellen im Knochenmark von *Ebf2*-defizienten Mäusen festgestellt werden. Diese unpublizierten Erkenntnisse wurden von Dr. Matthias Kieslinger bei der Untersuchung von *Ebf2-LacZ* Mäusen erlangt. Die Deletion des *Ebf2*-Gens wurde in diesem Mausmodell durch das Ersetzen der ersten 5 Exons mit einer *LacZ*-Kassette generiert (Corradi et al., 2003). In dieser Arbeit wurde neben dem *Ebf2-LacZ* Mausmodell hauptsächlich mit dem *Ebf2-Gfp* Mausmodell gearbeitet. Wie sich in eigenen Vorarbeiten zeigte, bietet dieses Modell methodische Vorteile. Analog zum *Ebf2-LacZ* Modell wurden hier die ersten 5 Exons des *Ebf2*-Gens durch eine *Gfp*-Kassette ersetzt. Anstelle der *Ebf2*-Expression kommt es im heterozygoten (+/-) Zustand, bzw. in der EBF2-Deletion (-/-) zur Expression von *Gfp* (Wang et al., 2004). *Ebf2*-defiziente bzw. heterozygote Zellen können so durch ihre *Gfp*-Expression sichtbar gemacht werden (Abb. 6A).

Um zu untersuchen, ob der Stammzell-Phänotyp des *Ebf2-LacZ* Mausmodells auch in *Ebf2-Gfp* Mäusen auftritt, wurden aus dem Knochenmark von drei Wochen alten *Ebf2*^{+/+}, *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Mäusen haematopoietische Stammzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Mit der verwendeten Markerkombination sind haematopoietische Stammzellen durch das Nichtvorhandensein von zelltypspezifischen Oberflächenmarker (LIN⁻: CD4, CD8, B220, TER119, MAC1, GR1) und durch die Expression von *Scal* und *cKit* (LSK) zu identifizieren. In *Ebf2*^{-/-} Mäusen zeigte sich eine drei bis vierfache Reduktion der haematopoietischen Stammzellen im Vergleich zum Wildtyp. Der Verlust von nur einem *Ebf2*-Allel hatte keinen Effekt auf die Stammzellpopulation (Abb. 6B und C).

Um auch in diesem Mausmodell zu untersuchen ob *Ebf2* in haematopoietischen Zellen exprimiert wird, wurden Knochenzellen aus E18,5 *Ebf2*^{+/-} Embryonen mittels Collagenase/Dispase Behandlung von Tibia und Femur gewonnen und mit dem haematopoietischen Marker CD45 gefärbt. Es konnten keine CD45-positiven Zellen unter den *Ebf2-Gfp*-exprimierenden Zellen detektiert werden (Abb. 6D). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus dem *Ebf2-LacZ* Mausmodell, wonach *Ebf2* nicht in haematopoietischen Zellen selbst, sondern im Stroma, dem nichthaematopoietischen Anteil des Knochenmarks exprimiert ist.

2.2 Gen-Expressionsanalyse von *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} exprimierenden Zellen

Um Gene zu identifizieren, die in *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Osteoblasten differentiell exprimiert werden und deren unterschiedliche Expression zum Stammzellphänotyp von EBF2-defizienten Mäusen beitragen könnte, wurden mittels Collagenase/Dispase-Behandlung adhärente Zellen aus Tibia und Femur von E18,5 alten Embryonen gewonnen. Diese Zellen wurden auf Basis Ihrer *Gfp*-Expression durchflusszytometrisch sortiert, mit der später gewonnen RNA wurde eine DNA Micro-Array Analyse von je 6 *Ebf2*^{-/-} und je 5 *Ebf2*^{+/-} Proben durchgeführt (Abb. 7). Durchschnittlich konnten pro Tier 15.000 *Ebf2-Gfp*-exprimierende Zellen isoliert werden. Aus diesem Material konnten zwischen 30 und 70 ng Gesamt-RNA gewonnen werden.

Um die Reinheit der sortierten Population zu zeigen, wurden vor der Durchführung des DNA Micro-Arrays Zellen aus der GFP-positiven und GFP-negativen Fraktion von *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Mäusen sortiert (Abb. 8A). Nach Gewinnung der RNA und cDNA-Synthese wurde mittels quantitativer PCR das Vorhandensein von *Gfp*, *Ebf2* und *Coll1a1*, einem osteoblasten-spezifischen Marker, in diesen beiden Fraktionen getestet. In der GFP-positiven Fraktion ist die Expression von *Gfp* um 8 Zyklen, also ein 256-faches erhöht (Abb. 8B). Die Expression von *Ebf2* ist ebenfalls um einen vergleichbaren Wert erhöht. Der osteoblasten-spezifische Marker *Coll1a1* wurde in der GFP-positiven Fraktion um 3,5 Zyklen, also ein ca. 11-faches mehr detektiert (Abb. 8B). Diese Übereinstimmung zwischen der *Ebf2*-Expression und der Expression der Marker bestätigt die Identität und Reinheit der sortierten GFP-positiven Zellen. Zur weiteren Kontrolle der durchflusszytometrischen Sortierung wurde die

Prozentzahl der lebenden Zellen (97%) und der GFP-positiven Zellen (4 bis 5%) ermittelt (Abb. 8C).

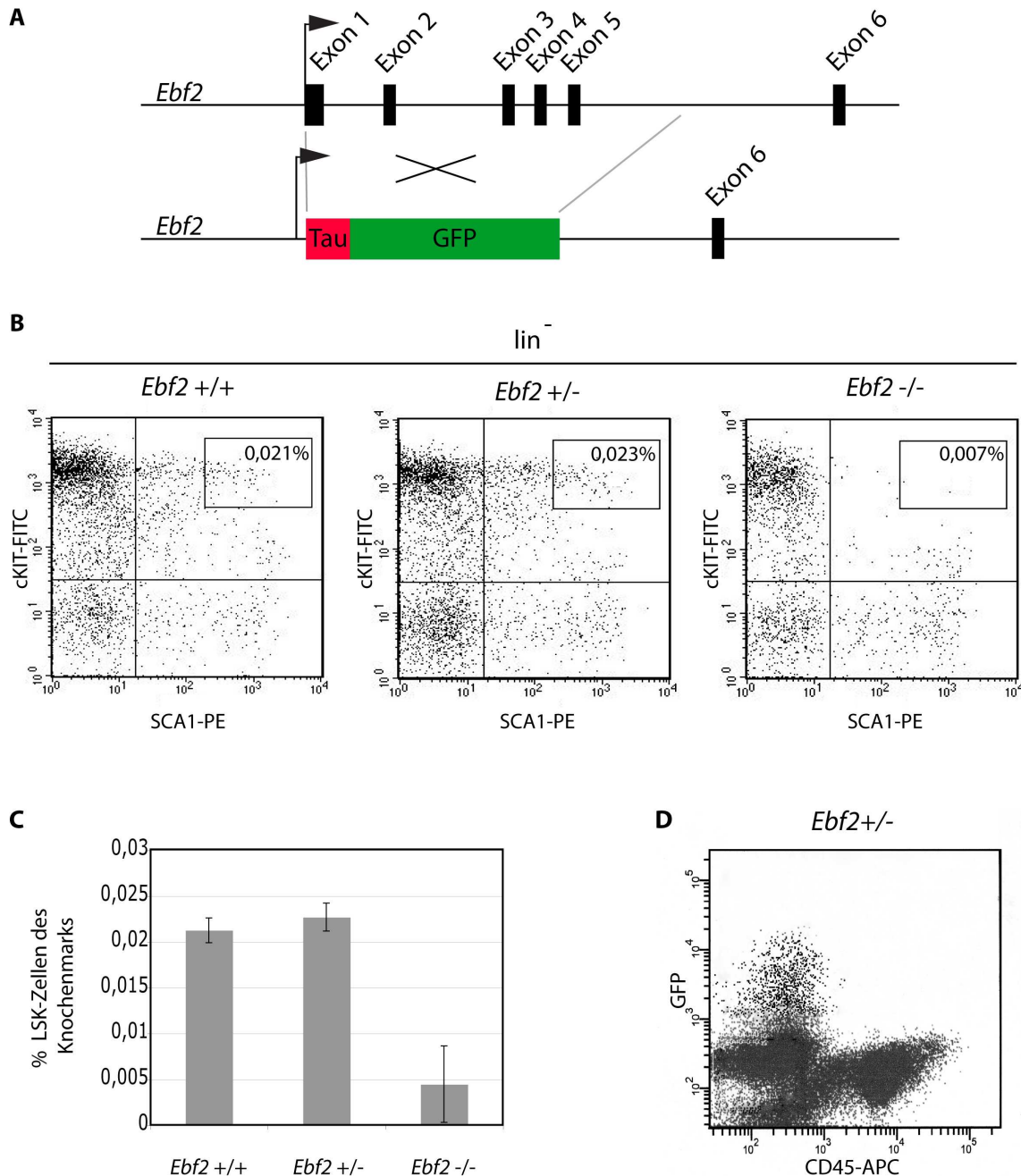


Abbildung 6: Phänotyp EBF2-defizienter Mäuse. **A:** Schematische Darstellung der Generierung der *Ebf2-Gfp* Maus. Zur Herstellung dieser Mäuse wurden die ersten 5 Exons des *Ebf2* Gens durch eine *Gfp*-Kassette ersetzt. **B:** Durchflusszytometrische Analyse der haematopoietischen Stammzellen (LIN^{-} $SCA1^{+}$ $cKIT^{+}$: LSK) des Knochenmarks drei Wochen alter *Ebf2*+/+, *Ebf2*+/- und *Ebf2*-/- Mäuse. **C:** Darstellung des Anteils der in B gezeigten LSK Zellen. Gezeigt wird der Mittelwert und die Standardabweichung von 3 (*Ebf2*+/+ und *Ebf2*+/-) bzw. 4 (*Ebf2*-/-) Tieren. **D:** Durchflusszytometrische Analyse *Ebf2*+/- osteoblastärer Zellen isoliert aus Tibia und Femur von E18,5 Embryonen auf ihre Expression von CD45.

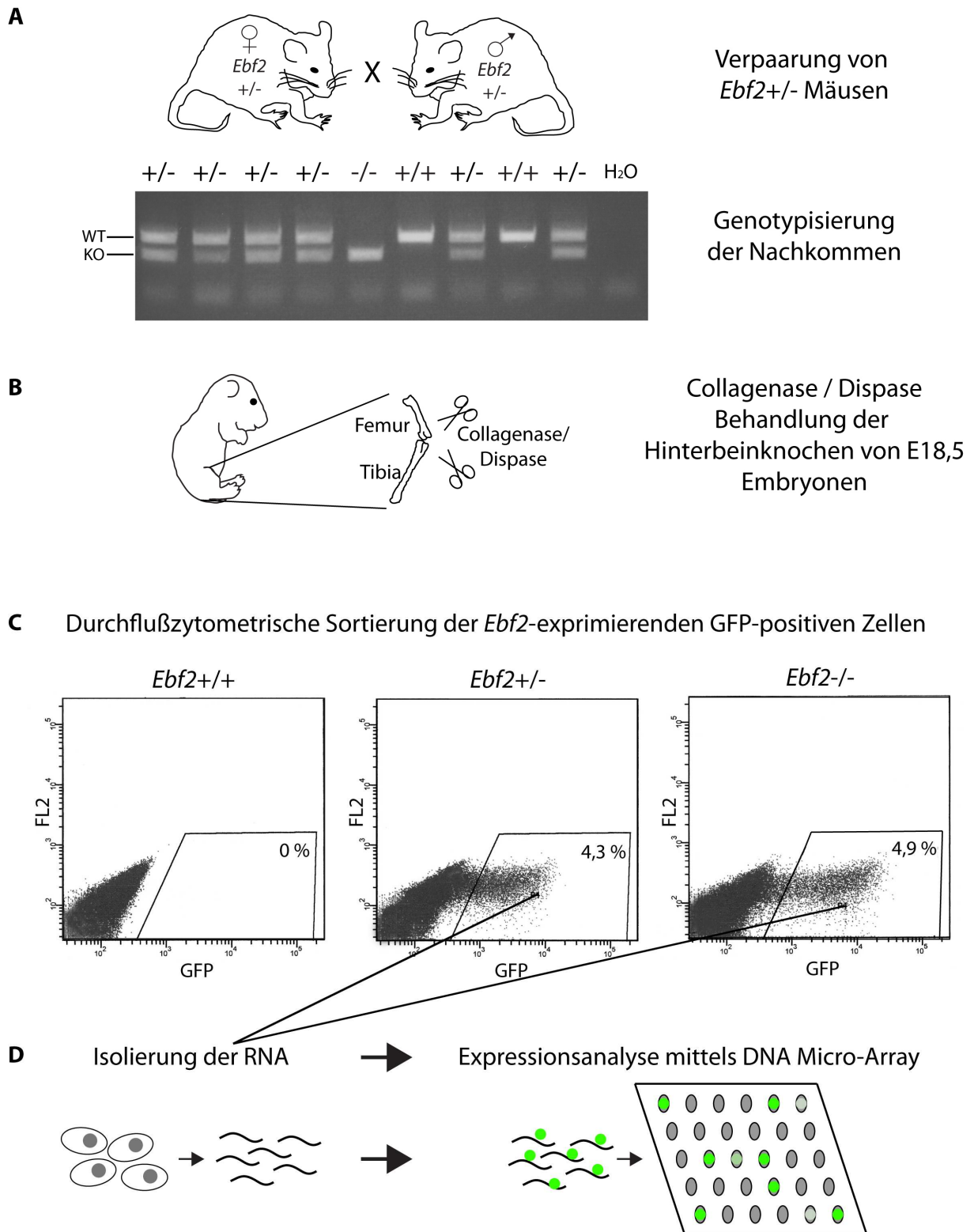


Abbildung 7: Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Gewinnung *Ebf2*-Gfp positiver Zellen. **A:** Verpaarung von *Ebf2*^{+/-} Mäusen zur Generierung von E18,5 *Ebf2*^{+/+}, *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Embryonen. **B:** *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Zellen werden aus Tibia und Femur der Embryonen mittels Collagenase/Dispase-Behandlung gewonnen. **C:** Durchflußzytometrische Sortierung *Ebf2*-Gfp-exprimierender Zellen. **D:** Isolierung der RNA und Vergleich der *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Zellen durch DNA Micro-Array Analyse.

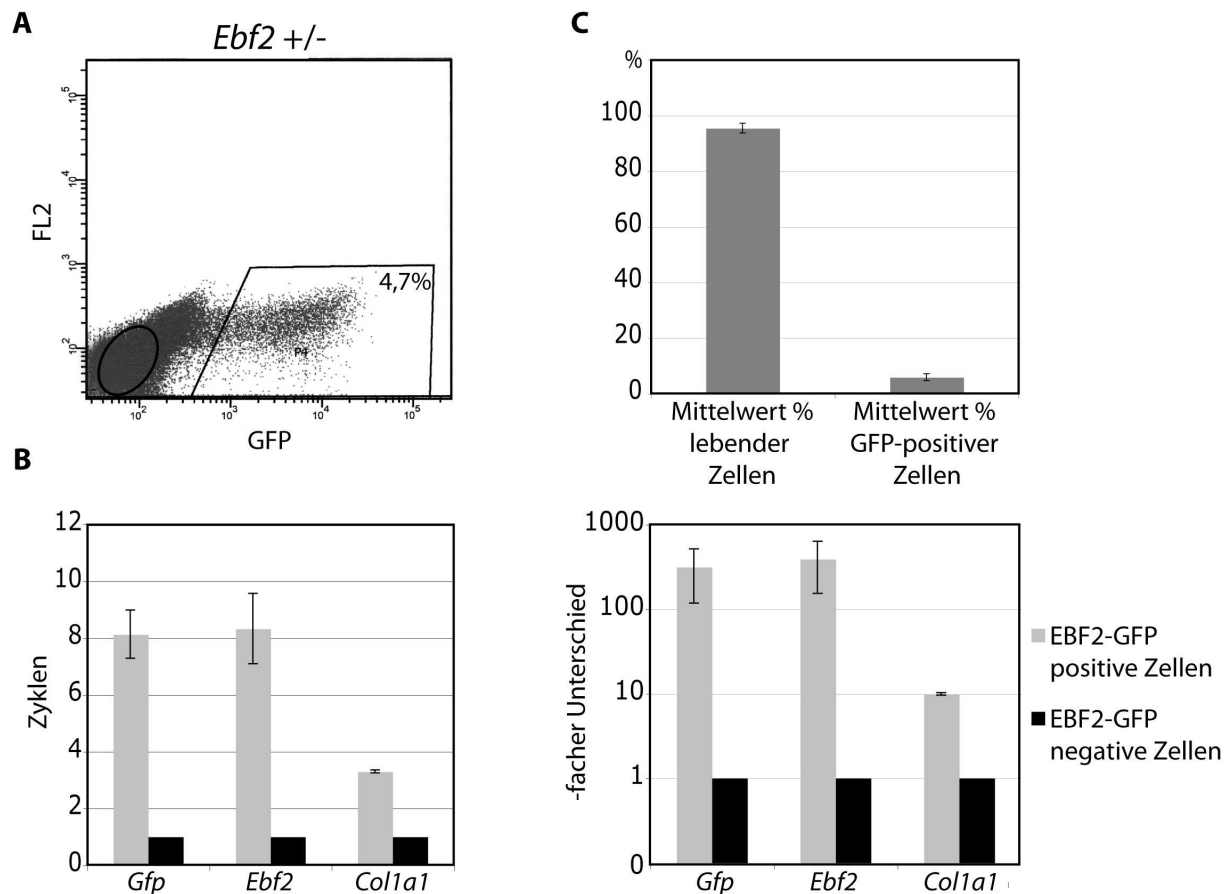


Abbildung 8: Vergleich der GFP-positiven und GFP-negativen Zellen aus *Ebf2*^{+/-} bzw. *Ebf2*^{-/-} Mäusen. **A:** Neben GFP-positiven Zellen wurden auch Zellen aus der negativen Fraktion sortiert, um die Reinheit der sortierten Fraktion zu zeigen. **B:** Vergleich der Expression von *Gfp*, *Ebf2* und *Col1a1* in der GFP-positiven und GFP-negativen Fraktion mittels quantitativer Real-Time PCR. Darstellung in Zyklen (links) und als -facher Unterschied der Expression (rechts). Normalisiert wurde auf den Aktinwert der Proben. Der Wert der GFP-negativen Fraktion wurde gleich 1 gesetzt. **C:** Mittelwert der lebenden und der GFP-positiven Zellen nach der durchflusszytometrischen Sortierung.

Das DNA Micro-Array Experiment und die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe von Dr. Holger Prokisch (Institut für Humangenetik, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Um den Versuchsaufbau zu testen, wurde vorerst eine geringe Anzahl an Proben analysiert, wie bereits erwähnt wurden in diesem Experiment 6 *Ebf2*^{-/-} und 5 *Ebf2*^{+/-} Proben miteinander verglichen. Da bei einem Versuchsaufbau mit einer geringen Anzahl von Datensätzen keine Auswertung bezüglich der Signifikanz möglich ist, wurde die veränderte Expression mit der Ermittlung des so genannten *KO.DiffScore* (Illumina, Bead-Studio) analysiert und in einer Tabelle nach dem Maß der Deregulation in *Ebf2*^{-/-} Zellen absteigend aufgelistet (Abb. 10). Bei der Berechnung des *KO.DiffScore* wird die Anzahl der zu vergleichenden Proben künstlich erhöht. Jedes zu analysierende Gen ist von durchschnittlich

30 verschiedenen Oligonukleotiden auf dem DNA Micro-Array repräsentiert. Die cRNA einer Probe bindet an 30 verschiedene Oligonukleotide pro Gen, somit wird eine 30-malige Messung der Intensität der Bindung ermöglicht. Des Weiteren kann so eine Varianz der verschiedenen Bindungsintensitäten an die Oligonukleotide eines Gens ermittelt werden, die neben der erhöhten Probenanzahl mit in die Berechnung des *KO.DiffScore* einght. Somit ist eine Auswertung nach Signifikanz auch bei geringen Datensätzen möglich.

Eine solche Deregulation der Expression konnte bei den ersten 1000 Kandidaten der Tabelle (Abb. 10) gezeigt werden. Diese 1000 signifikant deregulierten Kandidaten wurden in einer *Pathway*-Analyse untersucht. Hierbei wurden die Gene bezüglich ihrer Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen analysiert (Abb. 9). Je mehr der 1000 deregulierten Kandidaten an einem biologischen Prozess beteiligt sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Veränderung dieses *Pathways* in *Ebf2*-defizienten Zellen. Der in Abbildung 9 dargestellte Graph zeigt die biologischen Prozesse denen eine signifikante Anzahl deregulierter Kandidaten zugeordnet werden kann. Die Signifikanz richtet sich hier nach der Anzahl aller beteiligten Moleküle eines Prozesses und nach dem Verhältnis dieser Anzahl zu den untersuchten deregulierten Kandidaten. Die zellulären Prozesse sind in der Darstellung (Abb. 9) gemäß der signifikanten Beteiligung der Kandidaten eines Prozesses angeordnet. Allen aufgeführten *Pathways* unter einem Schwellenwert von 1,3 ($-\log(0,05)=1,3$) können nicht genügend Kandidaten zugeordnet werden, um eine signifikante Beteiligung an diesem *Pathway* auszumachen (Daten nicht aufgeführt). Alle biologischen Prozesse die über diesem Schwellenwert liegen, weisen somit eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% auf. Da sich unter den 1000 am stärksten deregulierten Kandidaten viele nicht annotierte Gene und Gene mit unbekannter Funktion befinden, konnten nur 600 der 1000 analysierten Gene biologischen Prozessen zugeordnet werden. Deregulierte Kandidaten konnten unter anderem in Prozessen wie der Calcium Signaltransduktion, der ES-Zell-Pluripotenz, der Leitung und Zielfindung von Axonen, der p53-Signaltransduktion, der IL10-Signaltransduktion und der FGF- und VEGF Signaltransduktion gefunden werden.

Ziel dieses Projektes ist, die Frage zu klären, ob es durch eine EBF2-Defizienz zur deregulierten Expression von Genen kommt, welche das Verhalten der haematopoietischen Stammzellen beeinflussen. In diesem Zusammenhang sind unabhängig der biologischen Prozesse vor allem sezernierte und membranständige Proteine interessante, sowie für die Stammzellnische relevante Kandidaten. Deshalb wurden unter den 70 am stärksten veränderten Kandidaten der Liste deregulierte Gene mit diesen beiden Merkmalen ausgewählt

(Abb. 10, alle grau unterlegten Kandidaten der Liste) und mittels quantitativer Real-Time PCR aus drei unterschiedlichen Osteoblastenpräparationen untersucht (Abb. 11).

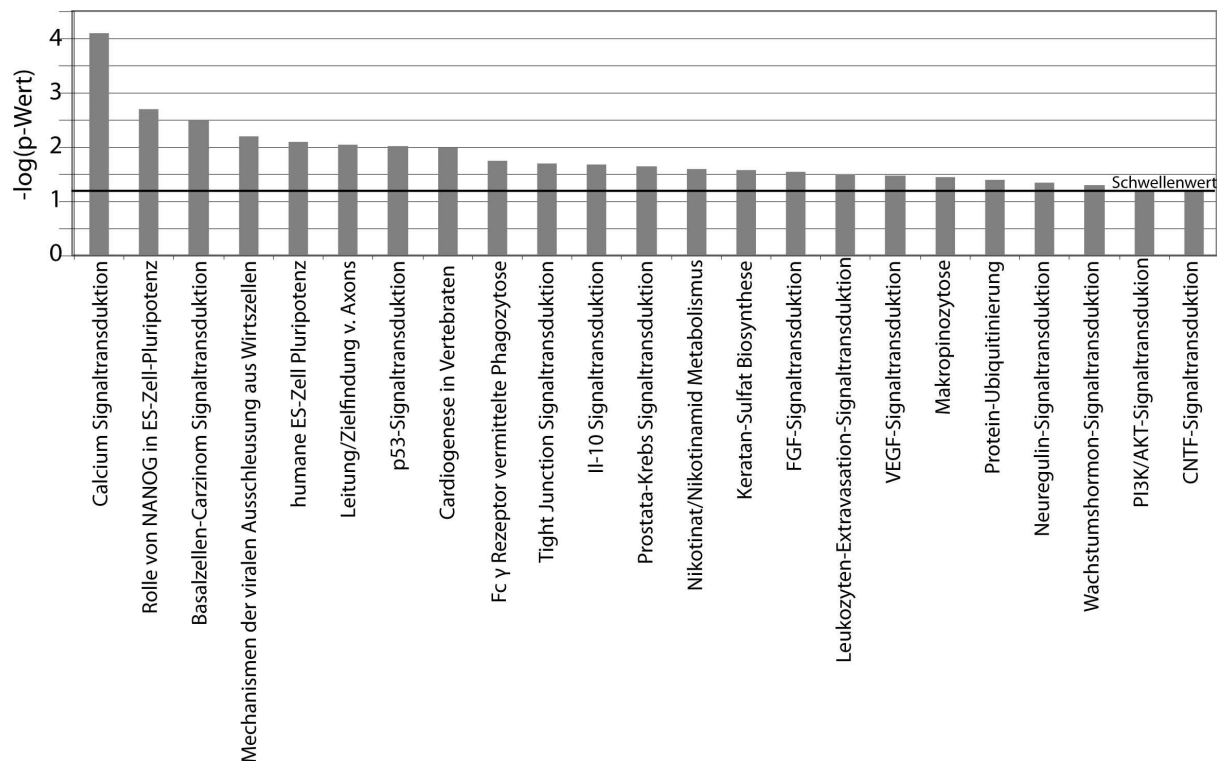


Abbildung 9: Analyse der 1000 am stärksten deregulierten Kandidaten des DNA Micro-Arrays bezüglich ihrer Beteiligung an zellulären Prozessen. Von den 1000 am stärksten deregulierten Genen konnten 600 Kandidaten bestimmten zellulären Prozessen zugeordnet werden. Die Tabelle zeigt alle signifikant angereicherten *Pathways* in denen diese 600 Kandidaten eine Rolle spielen. Die zellulären Prozesse sind gemäß ihrer Signifikanz angeordnet. Kandidaten, die unter einer Wahrscheinlichkeit von $-\log(p\text{-Wert})$ 1,3 (=Schwellenwert) biologischen Prozessen zu geordnet werden können, sind nicht mehr signifikant angereichert.

Neben der Deregulation von *Ebf2* in *Ebf2*^{-/-} Zellen, die als Kontrolle des Experiments diente, konnte eine 8-fach verminderte Expression von Angiogenin1 (*Ang1*) in EBF2-defizienten Zellen nachgewiesen und mehrfach bestätigt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde Angiogenin1 in folgenden Experimenten weiter untersucht.

Generell konnten die Unterschiede im Expressionsmuster von *Ebf2*^{-/-} und *Ebf2*^{+/-} Mäusen des Arrays und somit auch die Unterschiede in der in Abbildung 9 dargestellten biologischen Prozessen in der quantitativen PCR nur beschränkt bestätigt werden. Die Tendenz der Deregulation der einzelnen Gene kann auch in der Real-Time PCR gezeigt werden, allerdings fallen die Unterschiede in der Deregulation beim Vergleich mittels quantitativer PCR geringer

aus als durch die Analyse im DNA Micro-Array (Abb. 11). Um eine bessere statistische Auswertung bezüglich der Signifikanz der Deregulation zu gewährleisten wird im Moment eine zweite DNA Micro-Array Analyse durchgeführt. Hierfür werden je 25 *Ebf2*^{-/-} und 25 *Ebf2*^{+/-} Proben analysiert (Daten nicht aufgeführt).

	PROBE_ID	SYMBOL	KO.AVG_Signal	Het.AVG_Signal	KO.DiffScore	Transmembran	sezerniert
1	ILMN_2459214	Dgkh	334,7018	779,5718	-19,2661		
:	:	:	:	:	:		
4	ILMN_1225825	LOC100039175	1435,688	2843,276	-14,425		X
5	ILMN_1217982	LOC100039829	161,9222	409,155	-13,4766		
:	:	:	:	:	:		
14	ILMN_1219686	Esd	814,9083	1827,216	-11,24724		
15	ILMN_2650557	Ccbp2	826,5737	1950,995	-11,22035	X	
16	ILMN_1224210	Jarid1d	135,7509	287,3447	-11,06335		
20	ILMN_2773844	Ang1	236,5459	493,1463	-10,61812		X
21	ILMN_2693858	D14Ert449e	997,0895	1993,517	-10,37151	X	
22	ILMN_1238564	LOC100041512	141,2172	218,3411	-10,21859		
23	ILMN_2707504	Psmc1	195,9802	298,1384	-9,837686		
24	ILMN_1224014	Tmem100	958,4234	1640,064	-9,559095	X	
:	:	:	:	:	:		
29	ILMN_1251248	Ebf2	326,5374	1020,441	-9,21001		
30	ILMN_1243360	C130040D06Rik	182,3854	402,0736	-9,200632		
:	:	:	:	:	:		
36	ILMN_2715280	Tceal7	154,2751	219,5263	-8,413894		
37	ILMN_2602257	Tmem68	2006,391	3842,91	-8,357416	X	
:	:	:	:	:	:		
44	ILMN_2725099	Pcdh20	534,9315	896,2678	-7,182016	X	
45	ILMN_2482209	Tpm2	642,9481	997,0341	-7,147737		
46	ILMN_2643495	Fez1	678,2686	1060,636	-7,136564		
47	ILMN_2734097	Btc	393,3227	702,3633	-7,08386	X	X
48	ILMN_1223735	Myh8	1686,308	3259,466	-6,8576		
49	ILMN_2680584	Mid1ip1	503,1703	745,7715	-6,840538		
50	ILMN_2604029	Klf2	1837,101	3278,748	-6,781261		
51	ILMN_1255416	Ly6a	2966,39	4893,256	-6,6735	X	
52	ILMN_1249644	Gpr1	166,6536	267,8318	-6,553075	X	
53	ILMN_2502542	Uap1	1196,413	2661,025	-6,494991		
54	ILMN_1260507	Spin	380,1921	585,7101	-6,073775		
55	ILMN_2769877	Reck	1727,601	2545,233	-6,061243	X	
:	:	:	:	:	:		
65	ILMN_2652867	Trat1	188,5669	244,6449	-5,473334		
66	ILMN_1260036	AW120700	2205,067	3254,488	-5,453885	X	
:	:	:	:	:	:		
:	:	:	:	:	:		
20460	ILMN_3060603	Notch3	1265,544	898,0123	6,901062	X	
20551	ILMN_6400113	Icam2	149,5586	62,21432	9,632611	X	
20591	ILMN_6380452	Gja4	1366,946	724,3284	15,76716	X	

Abbildung 10: Expressionsanalyse von *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} osteoblastären Zellen aus der Maus. Auswertung des Vergleichs *Ebf2*-exprimierender osteoblastärer Zellen aus *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Tieren durch DNA Micro-Array. Dargestellt in einer Tabelle, nach dem Maß der Deregulation (*KO.DiffScore*) in *Ebf2*^{-/-} Zellen. Alle Gene in den grau unterlegten Feldern (= transmembran oder sezerniert) wurden mit quantitativer PCR weiter untersucht.

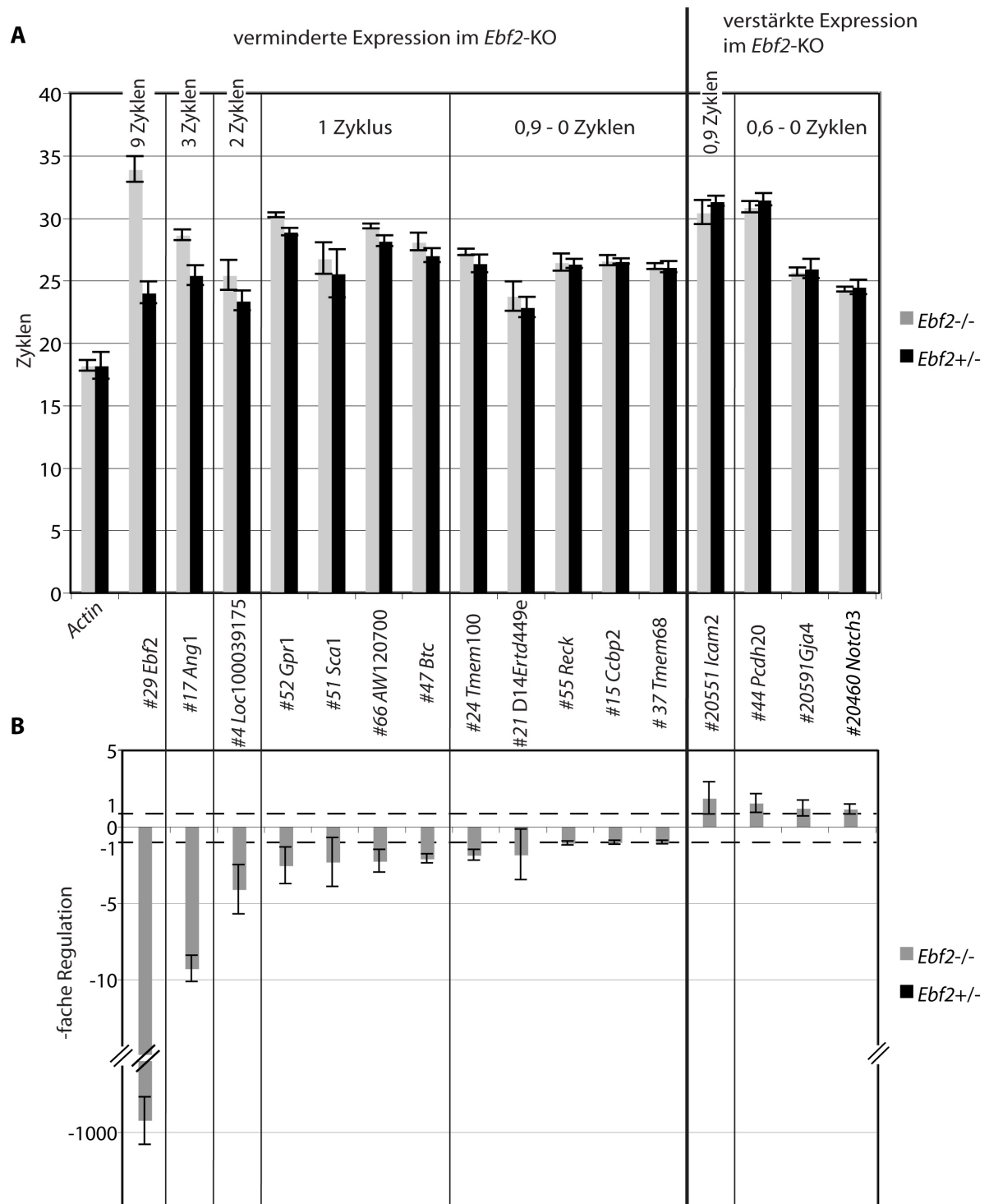


Abbildung 11: Analyse der DNA Micro-Array Daten. **A:** Darstellung der Analyse einiger der sezernierten und Transmembranproteine aus Abb. 10 durch quantitative PCR. Ausgewählt wurden Kandidaten unter den 70 am stärksten deregulierten Genen. Es wurden drei unterschiedliche *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Osteoblastenpräparationen untersucht. Die Stärke der Expression ist dargestellt in Zyklen und normalisiert auf die Aktinwerte der jeweiligen cDNA. **B:** Darstellung der Werte als -fache Regulation. Die Expression in *Ebf2*^{+/-} Zellen wurde gleich 1 gesetzt (gestrichelte Linie). Die Nummer vor den Genen stellt die Position auf der Liste in Abbildung 10 dar.

2.3 Angiogenin1-Promotorstudien

Der *RNase4 - RNase5/Ang1* Locus ist hoch konserviert zwischen Mensch und Maus und enthält zwei nicht-kodierende Exons gefolgt von zwei Exons, die für *RNase4* beziehungsweise für *RNase5/Ang1* kodieren. Die Kontrolle der Transkription dieses Locus erfolgt über differentielles Splicing und gewebespezifische Expression von zwei verschiedenen Promotoren, die 5` der nicht-kodierenden Exons lokalisiert sind (Dyer and Rosenberg, 2005) (Abb. 12A). Die beiden nicht kodierenden Exons1 und 2 können somit in Kombination mit Exon 3 (*Ang1*) als auch mit Exon 4 (*RNase4*) exprimiert werden.

Bei der Computeranalyse der beiden Promotorelemente mit der Datenbank TESS *Transcription Element Search Software* (www.cbil.upenn.edu/tess) konnten in Promotor1 zwei potentielle EBF-Bindestellen und in Promotor2 eine potentielle EBF-Bindestelle identifiziert werden. Zusätzlich wurden in den beiden Promotorregionen auch E2A-Bindestellen vorhergesagt (Abb. 12B). Da in B-Zellen in Bezug auf den *lamda5*-Promotor eine synergistische Wirkung von EBF und E2A gezeigt werden konnte (Sigvardsson et al., 1997), erscheint ein synergistischer Einfluss dieser beiden Proteine auch im Zusammenhang der *Ang1*-Promotoren möglich.

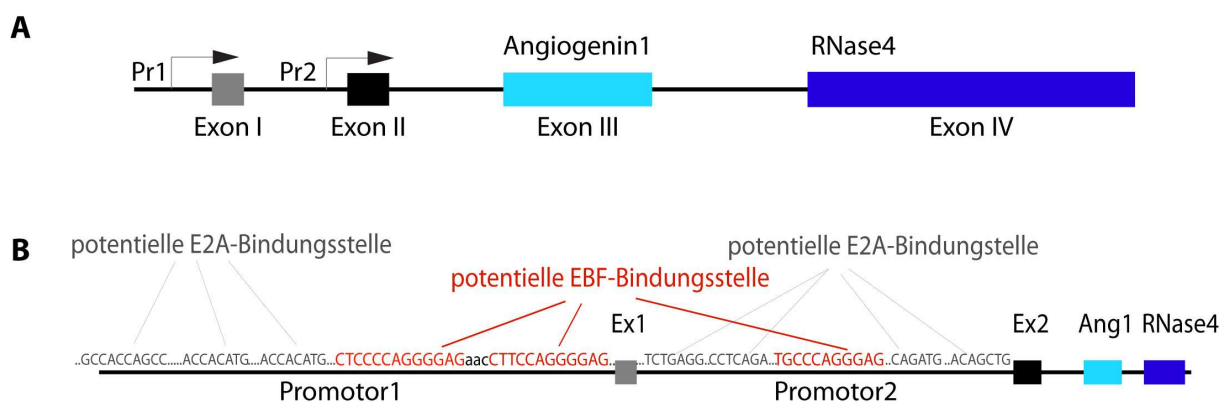


Abbildung 12: Schematische Darstellung des *RNase4 - RNase5/Ang1* Locus. A: Der Locus besteht aus zwei nicht-kodierenden Exons, gefolgt von zwei Exons, die für *RNase4* beziehungsweise für *RNase5/Ang1* kodieren. B: In beiden Promotorregionen (Pr1, Pr2) werden potentielle EBF und E2A Bindestellen vorhergesagt.

2.4 Charakterisierung der *Ang1*-Exonstartstellen

Um die beiden Startstellen der nicht-kodierenden Exons in *Ebf2*-exprimierenden osteoblastären Zellen zu charakterisieren, wurde mittels quantitativer PCR aus cDNA von *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Zellen und versetzt angeordneter Primer der Start dieser Exons ermittelt (Abb. 13A). Das Ergebnis fiel für *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Zellen gleich aus. Wie zu sehen ist, ist bei beiden Promoterregionen ab einer Zyklenzahl von 30 keine Amplifikation eines PCR-Produktes mehr zu detektieren (Abb. 13B und D). Das Signal wird bei Promotor1/Exon1 nach Primer 3 schwächer und ist nach Primer 4 nicht mehr nachzuweisen. Primer 3 und 4 reichen 5' von Exon1 bereits in die Promotor1-Region hinein. Der Start von Exon1 könnte somit in murinen *Ebf2*-exprimierenden osteoblastären Zellen 20 bis 30 Nukleotide weiter stromaufwärts liegen, als in Datenbanken beschrieben. Bei Promotor2/Exon2 ist nach Primer 3, der noch im Exon2 liegt kein Signal mehr zu detektieren. Der Start des nicht-kodierenden Exons1 ist in *Ebf2*-exprimierenden Zellen leicht unterschiedlich zu den in verschiedenen Datenbanken veröffentlichten Sequenzen. Exon2 stimmt mit den Datenbank-Sequenzen überein (Abb. 13B und D).

2.5 Differentielles Splicing und *exon-sharing* zwischen *RNase4* und *Ang1* in *Ebf2*-exprimierenden Osteoblasten.

Mit cDNA aus GFP-positiven osteoblastären Zellen aus *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Tieren wurde quantitative PCR durchgeführt, um den Gebrauch der nicht-kodierenden Exons1 und 2 in Kombination mit den kodierenden Exons3 (*RNase5/Ang1*) und 4 (*RNase4*) zu untersuchen. Betrachtet man *Ebf2*^{+/-} Zellen (Abb. 14B, schwarze Balken), so ist in der quantitativen PCR mit einer Primerkombination von *Exon1* mit *Ang1* bzw. *Rnase4* ein Signal nach 25 bis 26 Zyklen zu detektieren. Mit der Primerkombination von *Exon2* mit *Ang1* bzw. *Rnase4* ist ein Signal erst nach 30 bis 31 Zyklen zu detektieren (Abb. 14B, schwarze Balken). Obwohl die Daten durch die Verwendung verschiedener Primerkombinationen nicht direkt miteinander verglichen werden können, legt der Unterschied von 4 Zyklen nahe, dass Promotor2/Exon2 in *Ebf2*-exprimierenden +/- Zellen in Kombination mit *Ang1* als auch mit *RNase4* schwächer exprimiert wird als Promotor1/Exon1. Promotor 1 ist somit prominent und bevorzugt benutzt in *Ebf2*-exprimierenden Osteoblasten.

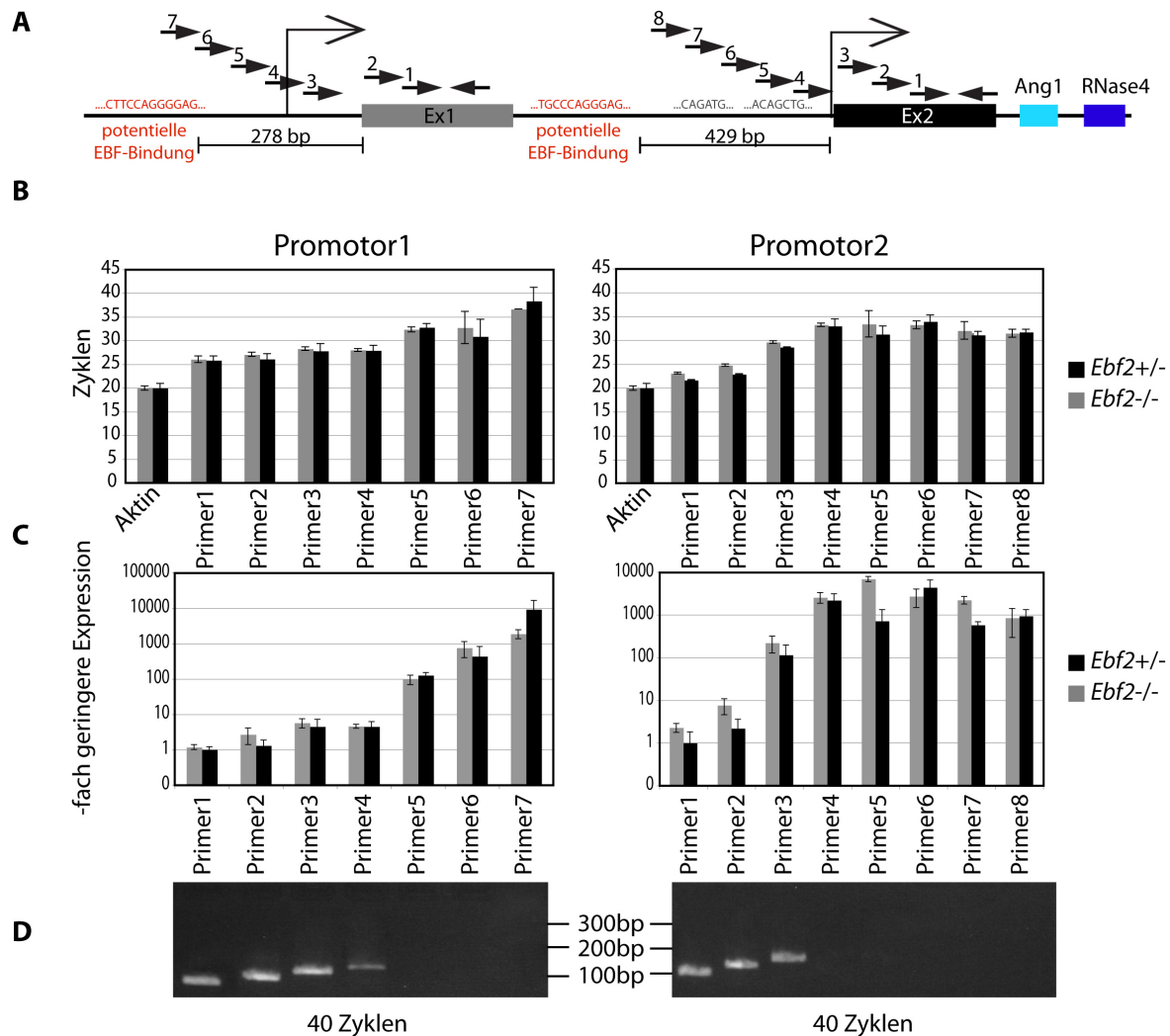


Abbildung 13: Charakterisierung der Startstellen der nicht-kodierenden ersten Exons.
A: Schematische Darstellung der verwendeten Primer und deren Bindestellen in den Promoterregionen bzw. Exons. **B:** Quantitative PCR von cDNA aus *Ebf2-Gfp* exprimierenden osteoblastären Zellen aus *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Tieren mit den in A dargestellten Primern. Die Expression ist in Zyklen dargestellt. **C:** Die Werte in 13B, dargestellt in –fach geringerer Expression. Der mit Primer1 in *Ebf2*^{+/-} Zellen erzielte Wert wurde gleich 1 gesetzt. **D:** Agarosegel der amplifizierten PCR-Produkte. Die Position der verwendeten Primer und EBF-Bindestellen ist wie folgt:

Beginn Exon1:	Nukleotid 1	Beginn Exon2:	Nukleotid 1
Reverser Primer:	Nukleotid 62 bis 82	Reverser Primer:	Nukleotid 163 bis 183
Primer1:	Nukleotid 29 bis 49	Primer1:	Nukleotid 78 bis 100
Primer2:	Nukleotid 8 bis 28	Primer2:	Nukleotid 35 bis 55
Primer3:	Nukleotid -4 bis -24	Primer3:	Nukleotid 2 bis 21
Primer4:	Nukleotid -44 bis -62	Primer4:	Nukleotid -9 bis -30
Primer5:	Nukleotid -72 bis -92	Primer5:	Nukleotid -58 bis -77
Primer6:	Nukleotid -123 bis -143	Primer6:	Nukleotid -94 bis -115
Primer7:	Nukleotid -190 bis -210	Primer7:	Nukleotid -125 bis -141
EBF-BindestelleA:	Nukleotid -278 bis -290	Primer8:	Nukleotid -182 bis -205
EBF-BindestelleB:	Nukleotid -293 bis 306	EBF-Bindestelle:	Nukleotid -429 bis -439

In *Ebf2*^{-/-} Zellen sind beide Kombinationen aus den beiden kodierenden und nicht kodierenden Exons erst nach einer Zykluszahl zwischen 30 und 35 detektierbar und somit kaum exprimiert (Abb. 14B, graue Balken).

Die Kombination *Exon1* mit *Ang1* bzw. *RNase4* wird in *Ebf2*^{+/-} Zellen am häufigsten exprimiert. Tendenziell wird im Vergleich dazu in diesen Zellen die Kombination *Exon2* mit *Ang1* bzw. *RNase4* ca. 4 bis 5-fach weniger benutzt. In *Ebf2*^{-/-} Zellen ist die Kombination aus *Exon1* als auch *Exon2* mit *Ang1* oder *RNase4* im Vergleich zu *Ebf2*^{+/-} Zellen 10 bis 40-fach schwächer (Abb. 14C).

2.6 Expressionsanalyse anderer *RNase5*-Familienmitglieder in *Ebf2*-exprimierenden Zellen

Die *RNase5*-Familie besteht neben *RNase4* und *Ang1* noch aus den *Ang1*-Homologen *Ang2*, *3*, *4* und *5*. Ähnlich wie *Ang1* und *RNase4* liegen diese Mitglieder der Proteinfamilie auch auf Chromosom 14 relativ nahe beieinander. Daten über eine redundante Wirkungsweise auf Grund ihrer Homologie zu *Ang1* und der ähnlichen Funktion sind bisher nicht bekannt. Um zu analysieren, ob die Expression weiterer *RNase5*-Familienmitglieder durch eine EBF2-Defizienz verändert wird, wurde mittels quantitativer PCR die Expression von *Ang2*, *3*, *4* und *5* und *RNase4* mit spezifischen Primern (Abb. 14D) in *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} osteoblastären Zellen verglichen. Für die meisten *RNase5*-Familienmitglieder konnte keine differentielle Expression gezeigt werden. Die Ausnahme stellte, wie schon gezeigt, *Ang1* dar, das in *Ebf2*^{-/-} Zellen im Durchschnitt 11-fach geringer exprimiert ist (Abbildung 14E und F).

2.7 Charakterisierung der potentiellen EBF-Bindestellen im *Ang1*-Promotor 1 und 2

Um die mit der Datenbank TESS *Transcription Element Search Software* identifizierten potentiellen EBF Bindestellen in den beiden Promotoren genauer zu charakterisieren wurden Gelretardierungsexperimente (EMSA – *electrophoretic mobility shift assay*) durchgeführt. Dazu wurden Oligonukleotide der beiden in Promotor1 vorhergesagten Bindestellen (Promotor1-Bindestelle A und B) unmutiert verwendet. Um die Bindungsspezifität zu analysieren wurden Mutanten mit je Bindestelle A oder B mutiert oder mit Bindestelle A und

B mutiert verwendet. Analog wurde Promotor2 mutiert und unmutiert eingesetzt. Zur Mutation der Sequenzen wurde je ein Triplet (GGG oder CCC) auf einer Seite des Palindroms der Bindestelle durch ein ATA ersetzt (Abb. 15A).

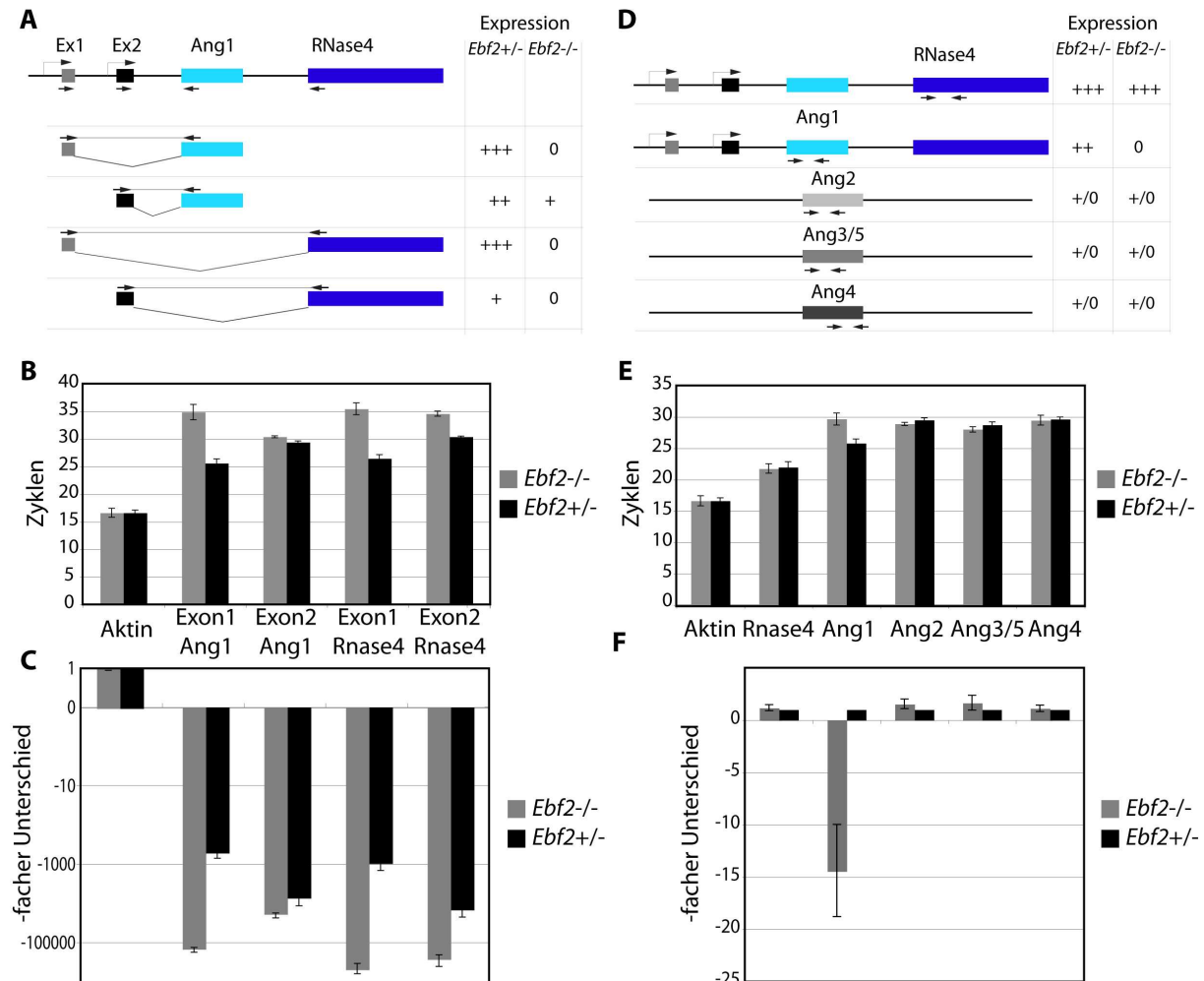


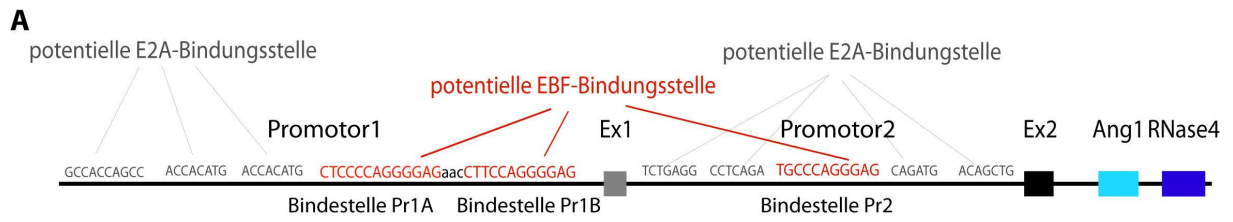
Abbildung 14: Differenzielles Splicing, exon-sharing und Expression anderer RNase5 Mitglieder in *Ebf2*-exprimierenden Osteoblasten. **A:** Schematische Darstellung der Primerkombination zur Analyse des Exongebrauchs im *RNase4/Ang1*-Locus in GFP-positiv sortierten *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Osteoblasten. **B:** Real-Time PCR mit den unter A gezeigten Primern dargestellt in Zyklen. **C:** Real-Time PCR mit den unter A gezeigten Primern dargestellt in –facher Unterschied relativ zur Aktin-Expression. **D:** Schematische Darstellung der zur Analyse der Expression anderer *RNase5* Mitglieder verwendeten Primer. **E:** Quantitative PCR mit den unter E gezeigten Primern dargestellt in Zyklen. **F:** Quantitative PCR mit den unter E gezeigten Primern dargestellt in –facher Unterschied. Die Werte der *Ebf2*^{+/-} Proben wurden gleich eins gesetzt.

In der Bindereaktion wurden zunächst *in vitro* translatierte EBF1-FLAG und EBF2-FLAG Proteine aus Reticulocytenslysaten verwendet. Als Negativkontrolle wurde der leere Flag-Expressionsvektor (mock) in die *in vitro* Translation eingesetzt. Die erfolgreiche Expression

der Proteine wurde im Western-Blot mit einem anti-FLAG-Antikörper überprüft (Abb. 15B). Versuche mit *in vitro* translatierten Proteinen zeigen eine Bindung von EBF1-FLAG (Abb. 15C) und EBF2-FLAG (Abb. 15D) an ein Oligonukleotid, welches sowohl Bindestelle A als auch Bindestelle B des Promotor1 einhält. Diese Bindung lässt sich durch Zugabe von nicht-markiertem Oligonukleotid kompetitieren und zeigt so die Spezifität der Reaktion. In der Leer-Vektor-Kontrolle (mock) ist keine Bindung zu erkennen. Verwendet man Oligonukleotide mit mutierter Bindestelle B bleibt die Bindung erhalten. Mutiert man jedoch die Bindestelle A beziehungsweise beide Bindestellen im Promotor1, geht die EBF Bindung verloren. Eine Bindung an ein Oligonukleotid, das die Bindestelle des Promotor2 enthält kann nicht beobachtet werden. Bindestelle A in Promotor1 ist somit die bevorzugte EBF-Bindestelle. EBF1 und EBF2 agieren hier in redundanter Art und Weise.

Um die Spezifität der Bindung zu bestätigen, wurde entweder ein anti-FLAG-Antikörper oder ein anti-pan-EBF-Antikörper zur Bindereaktion zugegeben. Durch die spezifische Bindung des Antikörpers an den DNA-Protein-Komplex wird das Laufverhalten des Komplexes im nativen Gel weiter verlangsamt. Es entsteht ein so genannter *supershift*. Dieser *supershift* lässt sich bei der Zugabe des anti-FLAG-Antikörpers beobachten. Verschiedene Konzentrationen des anti-pan-EBF-Antikörpers zeigen keinen Einfluss auf das Laufverhalten des Komplexes (Abb. 15C und D).

Um diese Ergebnisse auf Zellen auszuweiten, die EBF in relativ hohem Maße exprimieren, wurden weitere Gelretardierungsversuche mit nukleären Extrakten von 70Z/3-Zellen und primären *Ebf2-Gfp*^{+/-} Zellen durchgeführt. Die Anreicherung von EBF in der nukleären Fraktion wurde im Western-Blot mit einem anti-pan-EBF-Antikörper getestet (Abb. 16A). Analog zu den Gelretardierungsexperimenten mit *in vitro* translatierten Proteinen ist keine Bindung von EBF an den *Ang1/RNase4* Promotor2 zu erkennen. Unter Verwendung des unmutierten Oligonukleotids, das beide EBF-Bindestellen des Promotor1 abdeckt, ist eine Bindung von EBF zu erkennen. Dies kann durch Zugabe von nicht-markiertem Oligonukleotid kompetitiert werden und zeigt so das spezifische Binden von EBF an den Promotor. Verwendet man Oligonukleotide mit mutierter Bindestelle B, bleibt die Bindung erhalten. Mutiert man jedoch die Bindestelle A beziehungsweise beide Bindestellen im Promotor1 geht die EBF Bindung verloren. Diese Daten weisen darauf hin, dass Promotor1A die primäre Bindestelle für EBF ist. Die potentielle Bindestelle in Promotor2 lässt sich im EMSA nicht bestätigen (Abb. 16B).

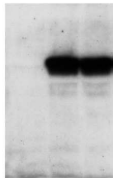


Verwendete Oligonukleotide:

Bindestelle Pr1AB	gct ccc cag ggg aga acc ttc cag ggg aga
Bindestelle Pr1A mut	gct ata cag ggg aga acc ttc cag ggg aga
Bindestelle Pr1B mut	gct ccc cag ggg aga acc ttc cag ata aga
Bindestelle Pr1AB mut	gct ata cag ggg aga acc ttc cag ata aga
Bindestelle Pr 2	aat gcc cag gga gac
Bindestelle Pr2 mut	aat gat aag gga gac

B

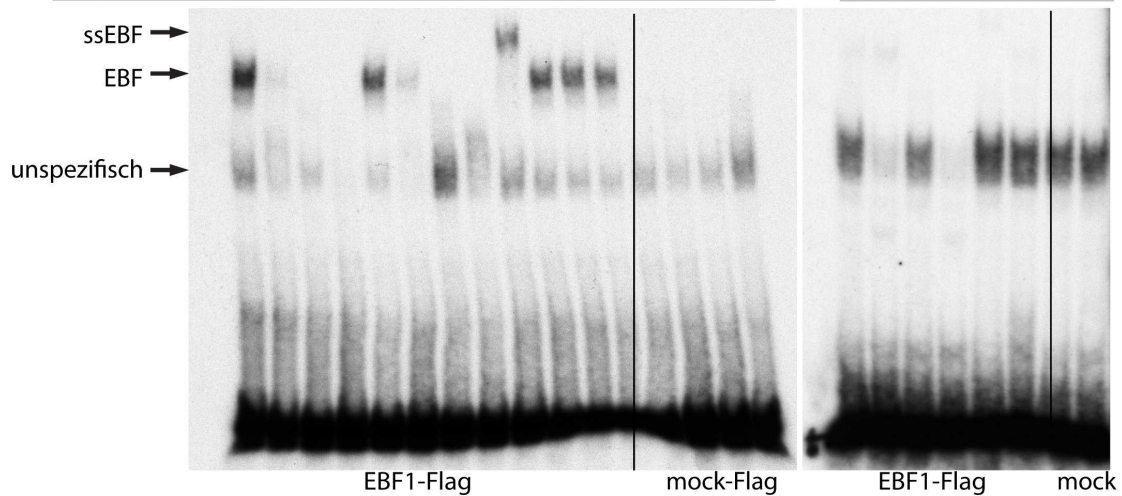
mock-Flag
 EBF1-Flag
 EBF2-Flag



Sequenzen in rot: potentielle EBF-Bindestelle
 Fett gedruckte Sequenzen: mutierte Basentriplets in der EBF-Bindestelle

C

	Promotor1										Promotor2					
EBF1-Flag	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mock-Flag																
Bindest. Pr1AB	+	+							+	+	+	+				
Bindest. Pr1A mut			+	+									+			
Bindest. Pr1B mut					+	+									+	
Bindest. Pr1AB mut							+	+								+
Bindest. Pr2															+	
Bindest. Pr2 mut																+
kaltes Oligo		+		+		+		+								
anti-FLAG-AK									2µl							
anti-panEBF-AK										2µl	5µl	8µl				



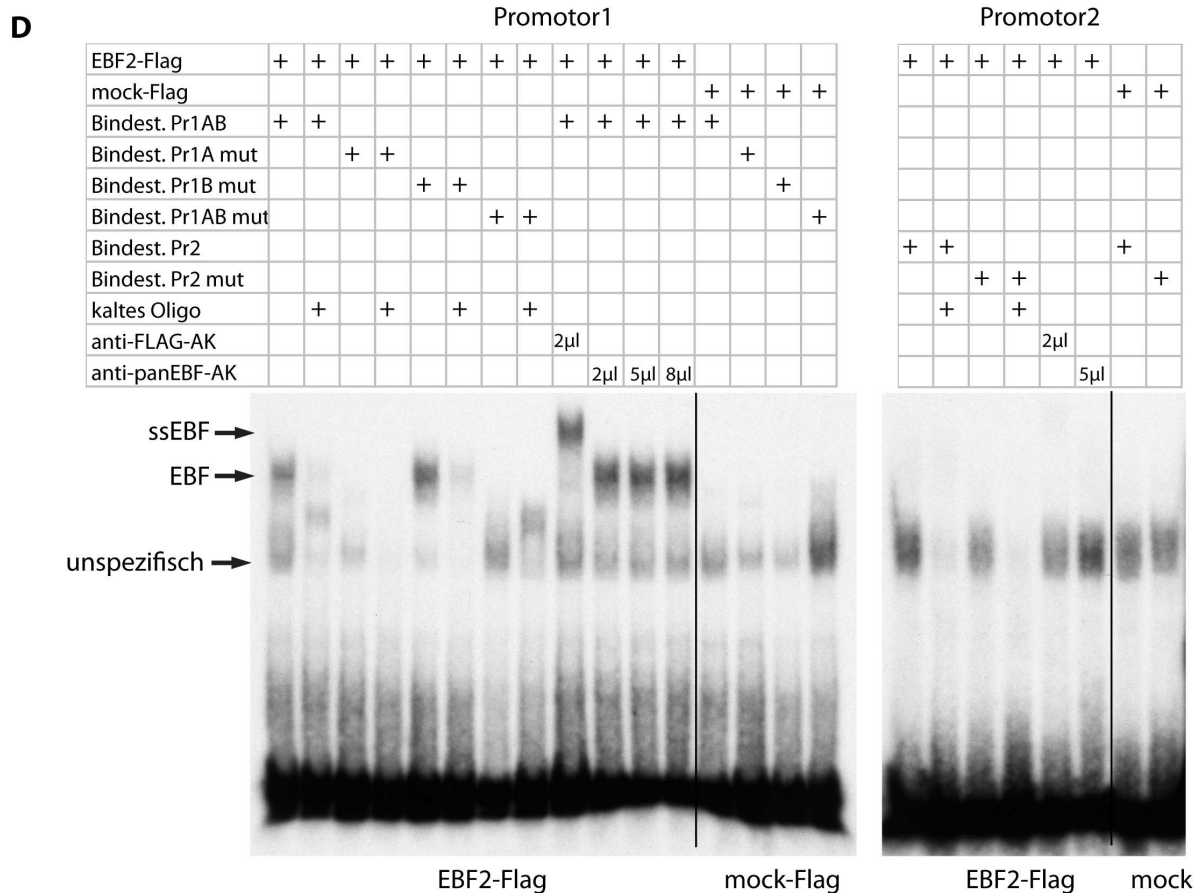


Abbildung 15: Gelretardierung zur Identifizierung der EBF-Bindestellen im *Ang1* Promotor. A: Schematische Darstellung der verwendeten Oligonukleotide. (z. B. Bindest. Pr1A mut: Bindestelle Promotor1 A mutiert) B: Western-Blot Analyse *in vitro* translaterter EBF-Proteine aus Reticulozytenlysaten. C: Gelretardierung bzw. *supershift in vitro* translaterter EBF1-FLAG Proteins durch anti-FLAG und anti-pan-EBF-Antikörper. D: Gelretardierung bzw. *supershift in vitro* translaterter EBF2-FLAG Proteins durch anti-FLAG und anti-pan-EBF-Antikörper. (ssEBF: supershifted EBF)

2.8 Analyse der *Ang1*-Promotoraktivität in Luziferase-Reporter-Assays

Um die EBF-induzierte Aktivität der beiden *Ang1/RNase4* Promotoren zu untersuchen, wurden Ba/F3 beziehungsweise HEK293T Zellen transient mit Promotor1-, bzw. Promotor2-Luziferase-Reporter-Genkonstrukten zusammen mit *Ebf1* oder *Ebf2* kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert. Zur Generierung der Reporter-Konstrukte wurde die genomische DNA 5' der nicht-kodierenden Exons1 bzw. 2, welche die *Ang1*-Promotor Regionen darstellen, vor ein Luziferase-Gen kloniert. Als Positivkontrolle wurde ein *Lamda5*-Luziferase-Reporter-Konstrukt mitgeführt (Abb. 17A). Wie gezeigt werden konnte führt die

Kotransfektion des *Lamda5*-Promotor-Luziferase-Reporter-Konstrukts mit dem *Ebf*-Expressionsplasmid zur Induktion der Luziferase in Ba/F3 Zellen (Sigvardsson et al., 1997). Durch zusätzliche Transfektion von E47, einer Spleissvariante von E2A, wird die Induktion der Luziferase in dieser Zelllinie um ein 6-faches erhöht, was auf Synergie zwischen EBF und E2A hindeutet (Sigvardsson et al., 1997). Als Negativkontrolle fungierte ein leerer Luziferase-Reporter-Vektor (mock). Um die Bindungsspezifität zu bestätigen, wurden mehrere *Ang1*-Promotor1-Mutanten analog zu den Gelretardierungsversuchen analysiert (Abb.15A, 17A).

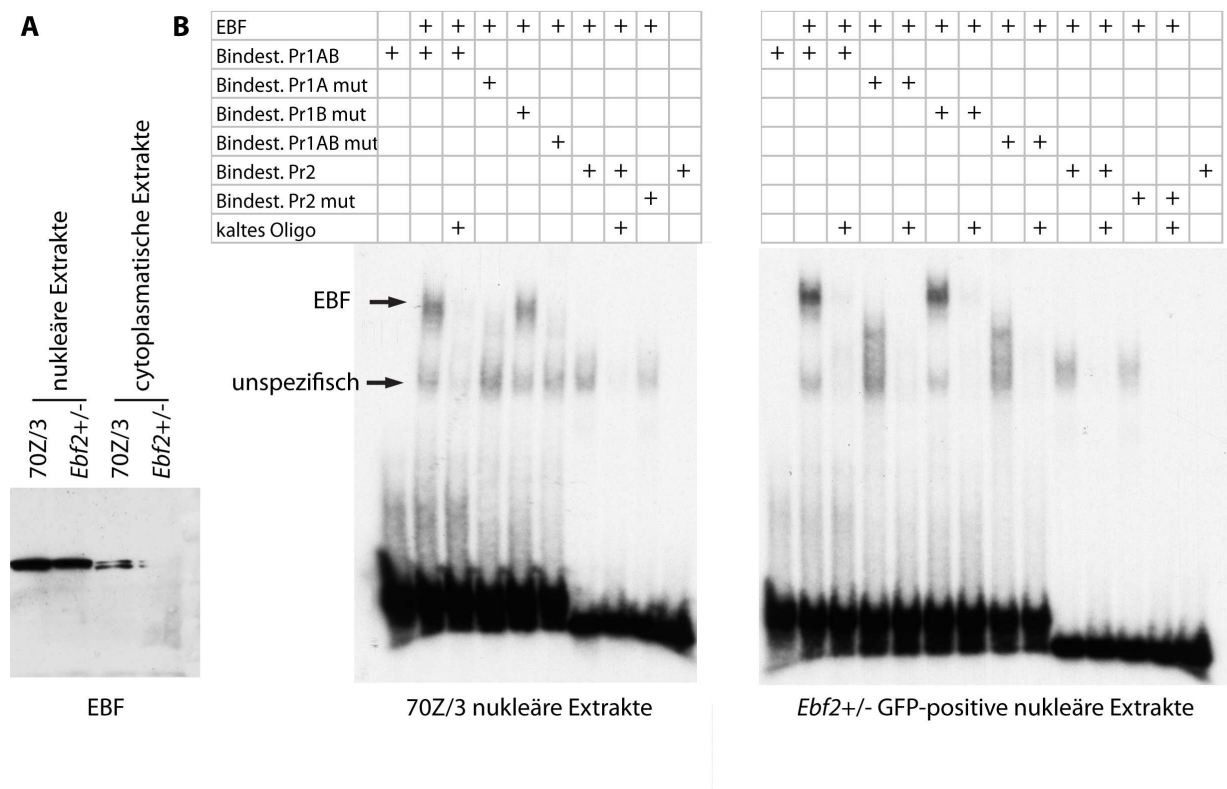


Abbildung 16: Analyse der Bindungsspezifität von endogenem EBF an die *Ang1* Promotorsequenzen. **A:** Western-Blot zur Überprüfung der Anreicherung von EBF in den nukleären Fraktionen. **B:** Gelretardierung nukleärer Extrakte aus 70Z/3 Zellen und primären GFP-positiven osteoblastären Zellen aus *Ebf2*^{+/-} Tieren.

In der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T konnte durch die Kotransfektion von EBF1 oder EBF2 mit dem Promotor1-Luziferase-Reporter-Konstrukt bzw. mit dem Promotor1-Konstrukt mit mutierter Bindestelle B eine ca. 16-fache Aktivierung beobachtet werden. Mit den Promotor1-Konstrukten mit mutierter Bindestelle A bzw. A und B und mit dem Promotor2-Luziferase-Reporter wird hingegen nur eine Aktivierung vergleichbar zur Leerkontrolle erzielt. Das in Ba/F3 Zellen als Positivkontrolle verwendete *Lamda5*-Reporter-

Konstrukt (Sigvardsson et al., 1997) zeigt in HEK293T Zellen nur eine geringe Aktivität (Abb. 17B).

Mittels Western-Blot wurde die Expression von EBF1 und EBF2 in den verwendeten Luziferase Extrakten mit einem Anti-pan-EBF-Antikörper überprüft (Abb. 17C).

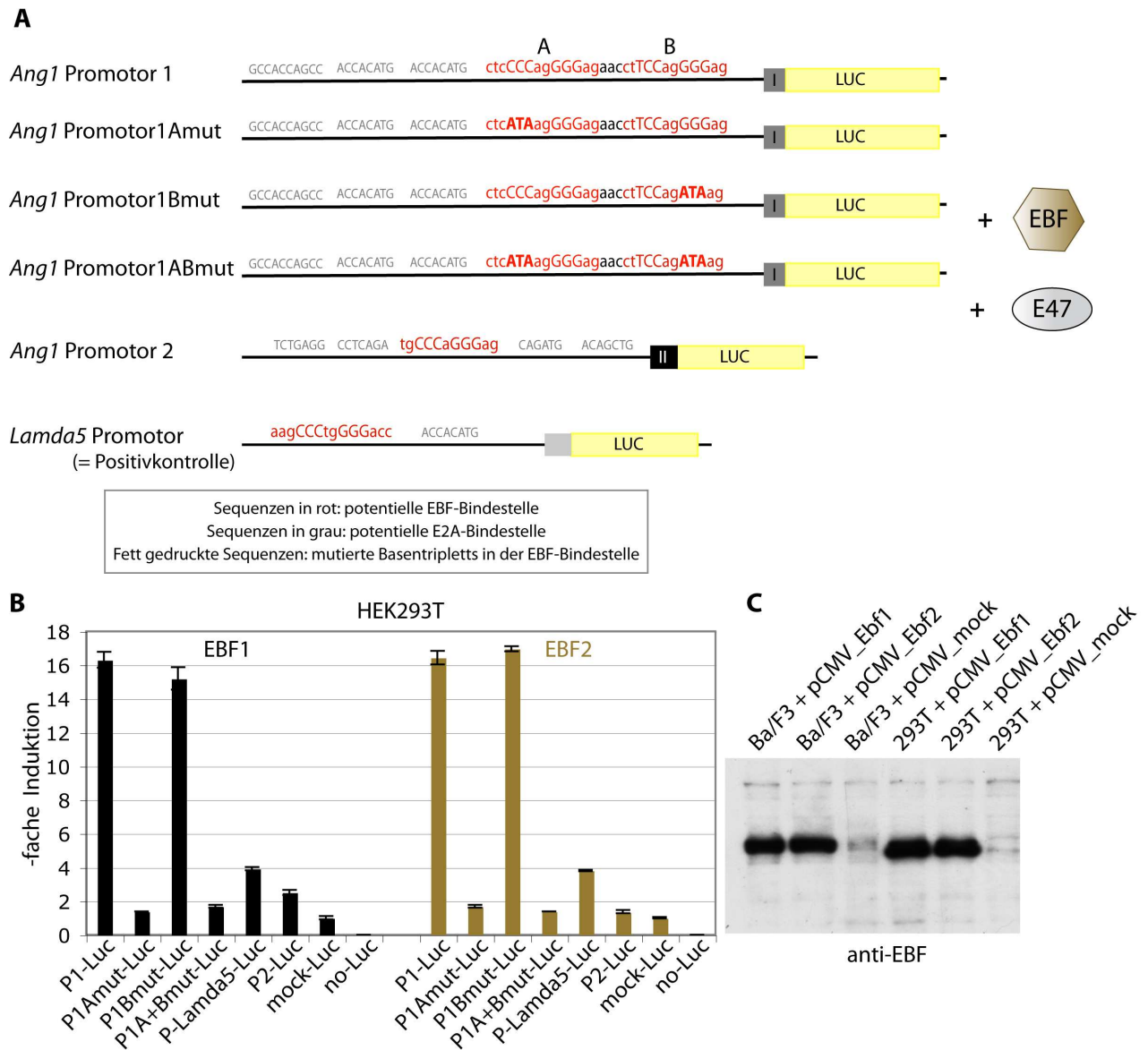


Abbildung 17: Analyse der EBF-abhängigen *Ang1*-Promotoraktivität in humanen Zellen. **A:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des durchgeführten Luziferase-Reporter-Assays und Darstellung der verwendeten Konstrukte. **B:** Luziferase-Reporter-Assay in HEK293T Zellen. Gezeigt ist die EBF-abhängige Induktion der Luziferase durch die *Ang1* Promotoren bzw. ihre mutierten Formen. **C:** Western-Blot zur Kontrolle der *Ebf*-Expression in den verwendeten Extrakten.

In Ba/F3 Zellen konnte durch die Kotransfektion des Promotor1-Luziferase-Reporters bzw. der *Lamda5*-Promotor-Luziferase-Positivkontrolle mit EBF1 oder EBF2 eine 5-fache Aktivierung im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (mock) gemessen werden. Wurden Mutationen des Promotor1 (Bindestelle A mutiert, Bindestelle A und B mutiert) kotransfiziert, konnte ein Rückgang der Aktivität um die Hälfte gemessen werden. Verwendet man ein Reporterkonstrukt mit mutierter Bindestelle B, konnte eine Aktivität vergleichbar mit dem unmutierten Promotor1 detektiert werden. Der Promotor2-Luziferase-Reporter zeigte eine zweifache Induktion in Vergleich zur Leervektor-Kontrolle. Durch die Synergie von EBF und E47 wurde die Aktivität des *Lamda5*-Reporters im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle 25 – 30-fach erhöht. Allerdings zeigte die Kotransfektion von E47 einen negativen Effekt auf die Aktivität von Promotor1, hier konnte ein Rückgang der Aktivität auf ca. die Hälfte beobachtet werden. Die Transfektion der Reporterkonstrukte mit E47 alleine hatte im Vergleich zur Leerkontrolle keinen Effekt (Abb. 18).

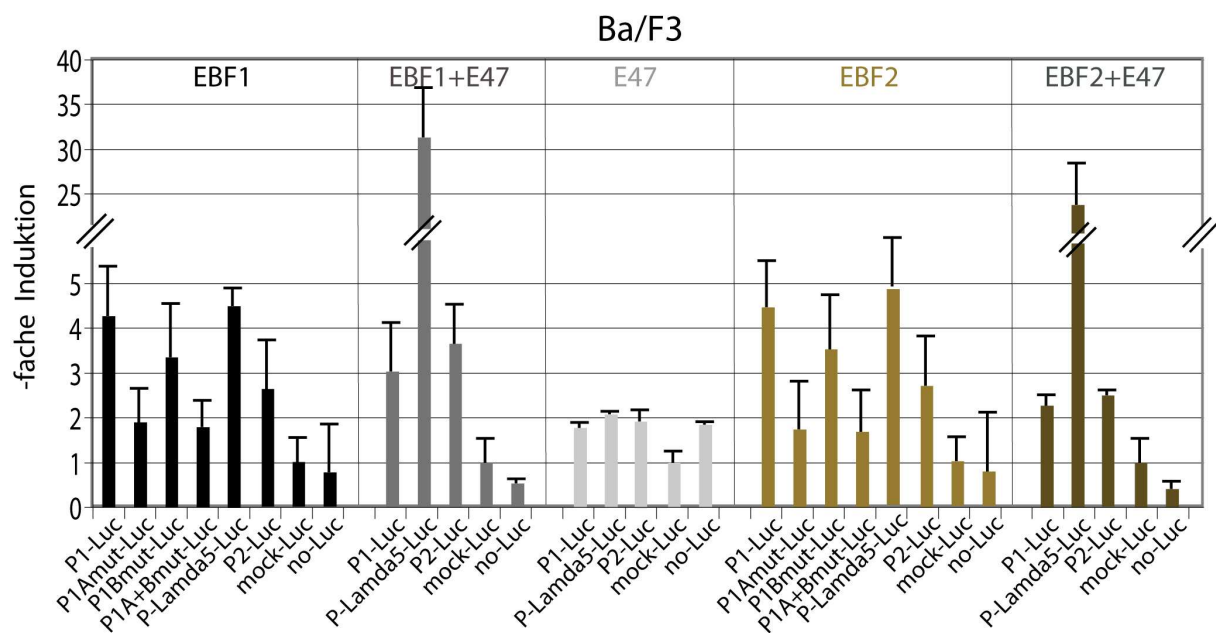


Abbildung 18: Analyse der EBF-abhängigen *Ang1* Promotoraktivität in murinen prä B-Zellen. Luziferase-Reporter-Assay in Ba/F3 Zellen. Gezeigt ist die EBF-abhängige Induktion der Luziferase durch die beiden *Ang1* Promotoren bzw. ihre mutierten Formen. Als Positivkontrolle diente die EBF-abhängige Induktion des *Lamda5*-Promotors. Als weitere Kontrolle wird die synergistische Wirkung von EBF und E2A auf den *Lamda5*-Promotor gezeigt.

2.9 *Ebf2*-Überexpression und deren Einfluss auf die Angiogenin1 Expression in verschiedenen Zelllinien.

Um den Einfluss von *Ebf2* auf die Angiogenin1-Expression in verschiedenen Zelllinien zu testen, wurden stromale Zelllinien (2018, AFT024), osteoblastäre Zelllinien (CH3T10½, MC3T3), primäre osteoblastäre GFP-positive Zellen aus *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Tieren, die prä-B-Zelllinie Ba/F3 und HEK293T Zellen transient mit einem *Ebf2*-Expressionsplasmid transfiziert und anschließend die *Ang1*-Expression im Vergleich zur Leervektorkontrolle mittels quantitativer PCR analysiert. 48 Stunden nach der Transfektion mit dem *Ebf2*-Expressionsplasmid konnte in allen verwendeten Zellen eine 1000 bis 1000000-fach erhöhte *Ebf2*-Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei Zellen mit geringer *Ang1*-Expression (*Ebf2*^{-/-} Zellen, CH3T10 ½, HEK293T, Ba/F3) (Abb. 19B) konnte eine 2 bis 6-fache Erhöhung von *Ang1* nach *Ebf2*-Überexpression gemessen werden (Abb. 19A). Im Gegensatz dazu konnte in Zellen, die bereits ein hohes *Ang1*-Expressionslevel zeigen (*Ebf2*^{+/-} Zellen, 2018, AFT024, MC3T3) (Abb. 19B) keine veränderte *Ang1*-Expression nach *Ebf2*-Überexpression nachgewiesen werden (Abb. 19A).

2.10 Deregulation von *Ang1* mittels RNAi in verschiedenen Zelllinien

Um den Beitrag von *Ang1* in *Ebf2*-exprimierenden Zellen auf den Erhalt haematopoietischer Stammzellen *in vitro* zu untersuchen, wurde die Expression von Angiogenin1 in verschiedenen stammzellunterstützenden und nichtunterstützenden stromalen Zelllinien und primären *Ebf2*-exprimierenden osteoblastären Zellen einerseits mit Hilfe von miRNA verringert, andererseits durch ektopische Expression erhöht. Um die *Ang1*-Expression in den verwendeten Zellen dauerhaft zu verändern, wurden die entsprechenden Konstrukte durch retrovirale Infektion in das Genom der Zellen integriert.

Zuerst wurden die passenden miRNAs gegen *Ang1* auf Ihre Funktionalität getestet. HEK293T Zellen wurden mit je 4 verschiedenen miR-RNAi-Expressionsvektoren (Invitrogen) und einem *Ang1-Flag* Überexpressionsvektor kotransfiziert. Im Western-Blot konnte die Überexpression von *Ang1-Flag* mit einem anti-FLAG-Antikörper ohne die Zugabe der miRNA bzw. des Leervektors detektiert werden. In Zellen die gleichzeitig mit den miRNA Konstrukten behandelt wurden, konnte eine verminderte *Ang1*-Expression gezeigt werden.

Alle der 4 miRNA Konstrukte konnten somit zur Deregulation von *Ang1* eingesetzt werden (Abb. 20A).

Zwei dieser getesteten miRNAs wurden für die Herstellung retroviraler Konstrukte eingesetzt. Hierfür wurde ein MSCV-Vektor verwendet, der spezielle *long terminal repeats* (LTR) des murinen Stammzellvirus (MSCV) enthält, und dessen Integration in das Genom der Zellen durch das Vorhandensein einer *Ires-Gfp*-Sequenz sichtbar gemacht werden kann. Um dieses Konstrukt auch in GFP-positiven *Ebf2*-exprimierenden Zellen verwenden zu können, wurde alternativ GFP durch dsTomato, einem roten Fluoreszenzfarbstoff ersetzt. Zusätzlich wurde die *Ang1*-cDNA in diesen retroviralen Expressionsvektor integriert. Eine erfolgreiche Integration der Konstrukte wurde durchflusszytometrisch durch die Expression von *Gfp* oder *dsTomato* überprüft. Mit Hilfe dieser Konstrukte wurde versucht die Expression von *Ang1* in der Zelllinie AFT024, welche die Fähigkeit besitzt haematopoietische Stammzellen zu unterstützen, zu deregulieren. Außerdem wurden auch *Ebf2*-exprimierende osteoblastäre Zellen aus den Hinterbeinknochen der Maus und die nicht-stammzellunterstützende Zelllinie 2018 mit den genannten Konstrukten retroviral infiziert (Abb. 20B).

Die *Ang1*-Expression wurde auf RNA-Ebene getestet. In allen Zelllinien konnte eine deutliche *Ang1*-Überexpression gemessen werden. Eine verminderte *Ang1*-Expression durch die zuvor getesteten miRNAs konnte auf RNA-Ebene nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auf Grund fehlender Antikörper konnte die veränderte *Ang1*-Expression auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden.

Um den Einfluss der *Ang1*-Expression in stammzellunterstützenden und nichtunterstützenden Zellen auf den Erhalt von haematopoietischen Stammzellen *in vitro* zu testen, wurden Kokultur-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden die in ihrer *Ang1*-Expression veränderten Zelllinien (unterstützend: AFT024, *Ebf2*-exprimierende Osteoblasten; nichtunterstützend: 2018) (Abb. 20C) konfluent, als ein so genanntes *feeder layer* ausgesät. Auf diesen Rasen von Zellen wurden aus dem Knochenmark der Maus gewonnene *lin⁻ cKit⁺ Sca1⁺* haematopoietische Stammzellen plattiert. Werden die Stammzellen auf den unterstützenden Zellen ausgebracht, bilden diese nach einigen Tagen so genannte *Cobblestone-forming-areas*. Hierbei wandern die Stammzellen unter die konfluente Zellschicht der unterstützenden Zellen, proliferieren und bilden eine Kolonie mit Kopfsteinpflaster-ähnlicher Morphologie. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die Kokulturen analysiert und die haematopoietischen Stammzellen auf ihre Fähigkeit so genannte *cobblestone area forming cells* (CAFC) zu bilden, untersucht. Wie sich zeigte konnte ein deutlicher Unterschied in der Fähigkeit Stammzellen zu unterstützen, auf den verschiedene

Zelllinien beobachtet werden. Die Frequenz der CFU (*cobblestone forming units*) war auf den stammzellunterstützenden Zelllinien bedeutend höher als auf den nichtunterstützenden Zellen. Die veränderte *Ang1*-Expression in der jeweiligen Zelllinie zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Fähigkeit der haematopoietischen Stammzellen *cobblestone forming units* zu bilden (Abb. 20D). Da das Maß der *Ang1*-Deregulation auf Proteinebene wegen erst in der Herstellung befindlicher Antikörper nicht überprüft werden konnte, lässt sich bezüglich dieser ersten Ergebnisse keine Aussage über den Einfluss von *Ang1* auf den Erhalt haematopoietischer Stammzellen machen.

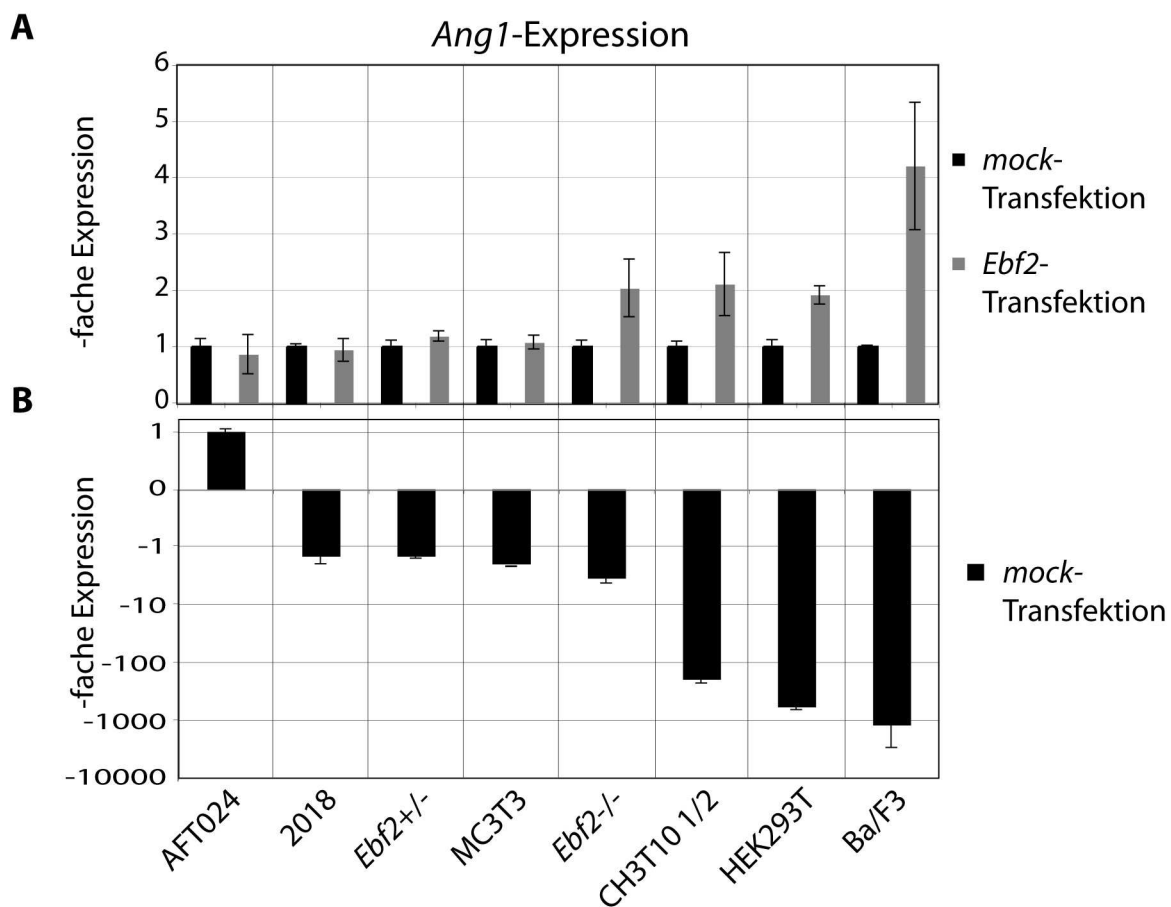


Abbildung 19: Effekt der *Ebf2*-Überexpression auf die Expression von *Ang1* *in vitro*. **A:** Transiente Transfektion verschiedener Zelllinien mit *Ebf2* bzw. dem Leervektor (mock) und anschließender Vergleich der Zellen bezüglich der *Ang1*-Expression mittels quantitativer PCR. Die Werte der mit dem Leervektor transfizierten Zellen wurden gleich eins gesetzt. **B:** Expressionslevel von *Ang1* in den verwendeten mock-transfizierten Zellen relativ zur höchsten *Ang1*-Expression in AFT024 Zellen. Dieser Wert wurde gleich 1 gesetzt.

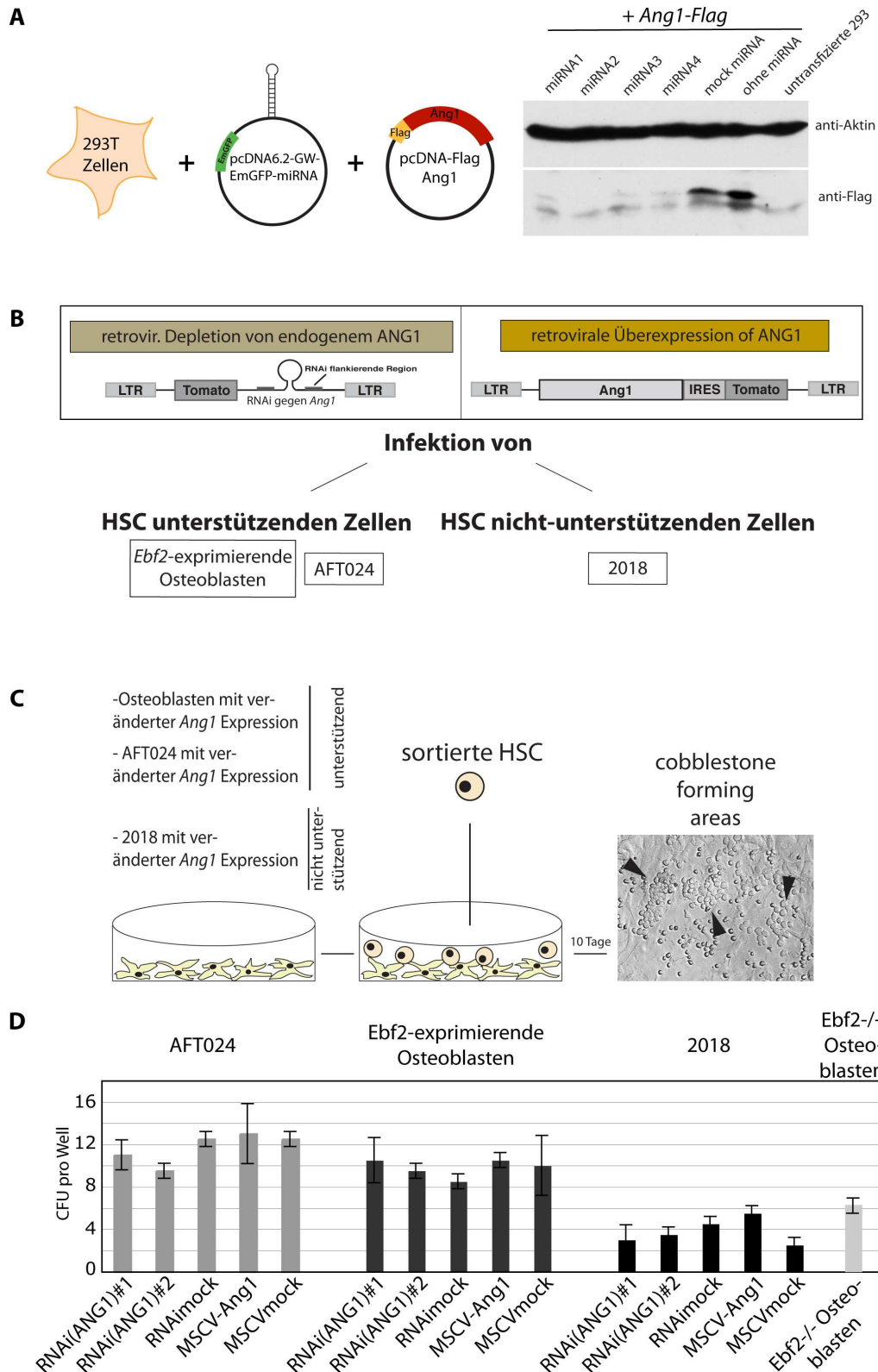


Abbildung 20: Deregulation der *Ang1*-Expression in stromalen Zellen. **A:** Test verschiedener miRNA Konstrukte gegen *Ang1* durch Kotransfektion von HEK293T Zellen mit *Ang1-Flag* und anschließender Western-Blot-Analyse **B:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Deregulation von endogenem *Ang1* in stammzellunterstützenden und nichtunterstützenden Zellen. **C:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Analyse der *Ang1*-Deregulation auf den Erhalt haematopoietischer Stammzellen. **D:** Auswertung der Kokultur.

2.11 Analyse der redundanten Wirkungsweise von EBF-Proteinen durch gleichzeitige Verminderung der Expression von *Ebf1*, 2 und 3.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, weisen die Mitglieder EBF-Familie hohe Homologie und evolutionäre Konserviertheit auf. Bedenkt man, dass alle EBF-Mitglieder die Fähigkeit haben an die gleiche DNA-Sequenz zu binden und zusätzlich eine Expression mehrerer *Ebfs* in gleichen Geweben zum selben Zeitpunkt beobachtet werden kann, liegt die Vermutung einer redundanten Wirkungsweise der Proteine nahe.

Bei einer Redundanz zwischen *Ebf1*, 2 und 3, besteht die Möglichkeit, dass im Falle der Deletion von *Ebf2* zumindest ein Teil der Funktionen von anderen, gleichzeitig exprimierten EBF-Familienmitgliedern übernommen werden kann. Ist dies der Fall, würde ein gleichzeitiger Verlust der Funktion von *Ebf1*, 2 und 3 einen viel stärkeren Phänotyp ergeben. Um den Effekt einer dreifachen Deregulation von *Ebf1*, 2 und 3 zu untersuchen, wurden miRNAs gegen *Ebf1*, 2 und 3 generiert. Unter Verwendung eines RNA Polymerase II gesteuerten RNAi-Expressionsvektorsystems (Invitrogen) ist es möglich miRNAs gegen *Ebf1*, 2 und 3 hintereinander zu hängen und so eine Deregulation der drei Proteine mit einem einzigen Molekül zu gewährleisten. Das Aneinanderhängen der einzelnen pre-miRNAs wurde durch Restriktionsspaltung der Moleküle und anschließender Ligation bewerkstelligt (Abb. 21A). Durch die nukleäre RNase3 Drosha werden die von murinen *miR155* Sequenzen flankierten miRNA-Schleifen in Vorläufer-miRNAs gespalten. Exportin5 bringt diese Moleküle vom Kern in das Zytoplasma, hier findet die Prozessierung der pre-miRNA in ca. 22 Nukleotide lange miRNAs durch das RNase3 Familienmitglied Dicer statt. Durch die Bindung der homologen RNA wird die Degradation der komplementären mRNA induziert.

Um die Funktionalität der miRNAs zu testen, wurden HEK293T Zellen mit *Ebf1-Flag*, *Ebf2-Flag* oder *Ebf3-Flag* und verschiedenen miRNAs kotransfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die *Ebf*-Expression im Western-Blot mit einem anti-FLAG-Antikörper untersucht. Es wurden miRNAs gegen *Ebf1*, 2 und 3 einzeln und im aneinander gehängten Zustand getestet. Wie zu sehen ist, kann die *Ebf1*-Expression durch die Kotransfektion einer einzelnen miRNA gegen *Ebf1* (1.1 und 1.2) als auch der aneinander gehängten Version, die miRNAs gegen alle drei *Ebfs* enthält (3.2+2.1+1.2, 3.5+2.2+1.1) vermindert werden. Die Kotransfektion von miRNAs gegen *Ebf2* und *Ebf3* hatte keinen Effekt auf die *Ebf1*-Expression im Vergleich zur Expression ohne miRNA.

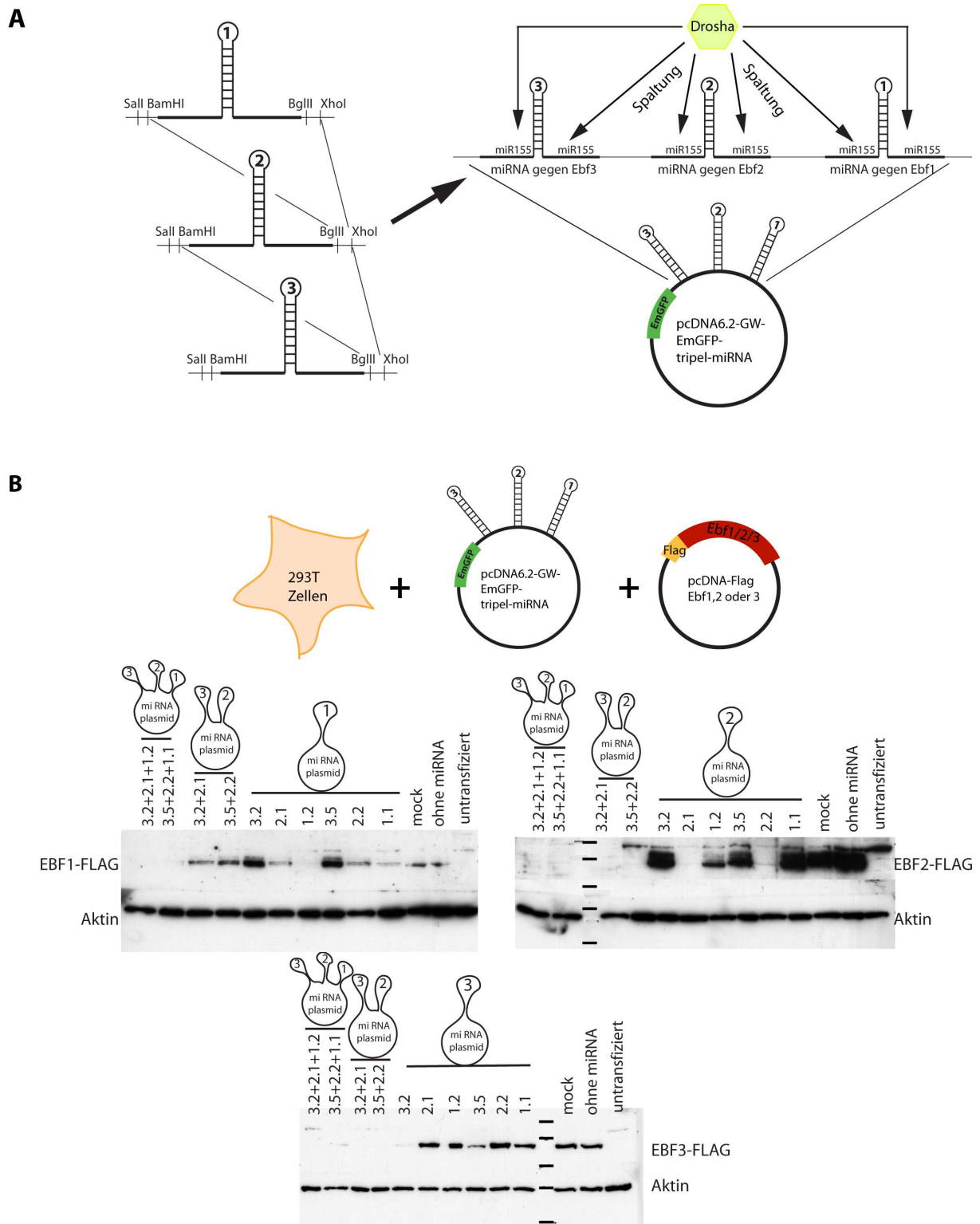


Abbildung 21: Gleichzeitige Verminderung der Expression von *Ebf1*, *2* und *3* mit Hilfe von RNAi. **A:** Um die Expression von *Ebf1*, *2* und *3* zu verringern wurden miRNAs individuell gegen *Ebf1*, *2* und *3* generiert und später mittels der *miRNA155* flankierenden Sequenz aneinander gehängt. **B:** Zur Bestätigung der Effizienz der Konstrukte wurden HEK293T Zellen mit den miRNA Konstrukten und einem *Flag-Ebf*-Überexpressionskonstrukt kotransfiziert. Nach 48h wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Die Expression von *Ebf2* kann ebenfalls durch einzelne miRNAs gegen *Ebf2* (2.1 und 2.2) als auch durch aneinander gehängte Versionen, die miRNAs gegen alle zwei (3.2+2.1, 3.5+2.2) bzw. drei *Ebfs* enthalten (3.2+2.1+1.2, 3.5+2.2+1.1) verringert werden. Die Kotretransfektion von miRNAs gegen *Ebf1* und *Ebf3* hatte ebenfalls keinen Effekt auf die *Ebf2*-Expression im Vergleich zur Expression ohne miRNA.

Sehr deutlich kann auch die verminderte Expression von *Ebf3* durch einzelne (3.2, 3.5) als auch durch aneinander gehängte (3.2+2.1, 3.5+2.2, 3.2+2.1+1.2, 3.5+2.2+1.1) miRNAs im Vergleich zur Kontrolle ohne miRNA gezeigt werden (Abb. 21B).

2.12 Deregulation der endogenen *Ebf*-Expression und deren Wirkung auf den Erhalt haematopoietischer Stammzellen *in vitro*

Um den Effekt einer Veränderung der endogenen *Ebf1*, 2 und 3-Expression *in vitro* zu untersuchen, wurde *Ebf1*, 2 und 3 in stammzellunterstützenden Zellen (AFT024 und *Ebf2*-exprimierenden osteoblastären Zellen) und nichtunterstützenden Zellen (2018) mittels retroviraler Infektion überexprimiert (Abb. 22A).

Parallel dazu wurde die Expression von *Ebf1*, 2 und 3 mit Hilfe der in HEK293T Zellen getesteten dreifach-miRNA-Konstrukte (RNAi_A: 3.5+2.2+1.1, RNAi_B: 3.2+2.1+1.2) retroviral vermindert (Abb. 22C). Die Deregulation der EBF-Proteine wurde mittels Western-Blot mit Hilfe eines anti-pan-EBF-Antikörpers bestätigt. Eine Überexpression von *Ebf1*, 2 und 3 konnte in allen drei Zelllinien gezeigt werden. In *Ebf2*-exprimierenden osteoblastären Zellen konnte mit beiden RNAi Konstrukten eine verringerte *Ebf*-Expression gezeigt werden. In den Zelllinien AFT024 und 2018 war die Verringerung der *Ebf*-Expression im Vergleich zur Leervektorkontrolle (mock) und dem RNAi_A Konstrukt mit dem RNAi_B Konstrukt effektiver. In vorausgehenden Versuchen wurde von Dr. Matthias Kieslinger untersucht, ob *Ebf2*-defiziente Osteoblasten einen funktionalen Defekt in der Unterstützung von haematopoietischen Stammzellen *in vitro* zeigen. Hierfür wurden Kokulturversuche mit LacZ-positiven osteoblastären Zellen aus *Ebf2*^{+/-} bzw. *Ebf2*^{-/-} Tieren und LSK haematopoietischen Stammzellen durchgeführt. Danach erfolgte eine Analyse der haematopoietischen Stammzellen auf ihre Fähigkeit *cobblestone area forming cells* (CAFC) zu bilden. Zu beobachten war eine Reduktion der *Cobblestone forming areas* auf *Ebf2*-defizienten osteoblastären Zellen um 45%. Zur weiteren Charakterisierung der *cobblestone*-bildenden Zellen wurden die haematopoietischen Stammzellen aus der Kokultur in

Methylzellulose-Medium überführt und so deren Fähigkeit Kolonien zu bilden analysiert. Die Fähigkeit der Koloniebildung bei Zellen aus Kokultur mit *Ebf2*^{+/-} Zellen konnte bei einer in 180 Zellen beobachtet werden. Bei Zellen aus Kokultur mit *Ebf2*^{-/-} Zellen war die Frequenz zur Koloniebildung auf eine in 320 Zellen reduziert (Daten nicht gezeigt).

Der Effekt der *Ebf*-Überexpression bzw. der *Ebf*-Deregulation durch die Tripel-miRNA-Konstrukte auf den Erhalt von haematopoietischen Stammzellen *in vitro* wurde ebenfalls mit Hilfe des Kokultur-Systems analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass haematopoietische Stammzellen, die in Kokultur mit *Ebf*-überexprimierenden Zellen kultiviert wurden, kein signifikant verändertes Verhalten zeigten. Durch die *Ebf*-Überexpression in nichtunterstützenden Zellen konnte ein leichter Anstieg der *cobblestone*-bildenden Zellen in der Kokultur beobachtet werden. Vergleicht man die Daten mit der Kokultur unterstützender Zellen, zeigt dieser Anstieg allerdings keine signifikante Änderung der stammzellunterstützenden Funktion dieser Zellen (Abb. 22B). Die *Ebf*-Überexpression in stammzellunterstützenden Zellen zeigte keine signifikante Veränderung der *cobblestone*-bildenden Zellen im Vergleich zur Leervektorkontrolle.

Wurden Stammzellen in Kultur mit Zellen gehalten, in denen *Ebf1*, 2 und 3 mit Hilfe von RNAi herunterreguliert wurde, ist die stammzellunterstützende Funktion dieser Osteoblasten im Vergleich zu unbehandelten Zellen eingeschränkt. In stammzellunterstützenden AFT024 Zellen und *Ebf2*-exprimierenden Osteoblasten konnte mit dem effektiveren der beiden miRNA-Konstrukte (RNAi_B) ein Rückgang der *Cobblestone forming areas* auf 26% bzw. 22% beobachtet werden. Die verminderte Expression der *Ebfs* in der nichtunterstützenden Zelllinie 2018 zeigte keinen Einfluss auf das *cobblestone*-bildende Verhalten der haematopoietischen Stammzellen (Abb. 22D). Diese Daten zeigen, dass die Familie der EBF-Proteine sehr kritisch für die Unterstützung von haematopoietischen Stammzellen ist, aber alleine nicht ausreicht um eine stammzellunterstützende Funktion zu induzieren.

2.13 Der dreifache *Ebf*-Knock-down – Ein *in vivo* Modell

Um den Effekt der gleichzeitigen Defizienz von *Ebf1*, 2 und 3 auch *in vivo* untersuchen zu können, wird ein Mausmodell generiert, indem durch Induktion der oben genannten miRNA Konstrukte die Expression der Mitglieder der EBF-Familie gewebespezifisch verringert werden kann. Hierfür wurde hinter eine *loxP*-flankierte STOP-Kassette eines *Rosa26* Targeting-Vektors eine GFP-Kassette, gefolgt von den miRNA-Sequenzen gegen *Ebf1*, 2 und

3, kloniert. Durch Einbringen des linearisierten Plasmids in embryonale Mausstammzellen wurde dieses Konstrukt durch homologe Rekombination in den *Rosa26* Locus von IDG3.2 ES Zellen integriert. Das Vorhandensein einer Neomycin-Resistenz im verwendeten Konstrukt ermöglichte die Selektion der erfolgreich integrierten ES-Zellklone (Abb. 23A).

Zur Überprüfung der korrekten Integration des Konstrukts wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Genomische DNA der Neomycin-resistenten Klone wurde hierfür mit Hilfe zweier Sonden analysiert. Mit der außerhalb des integrierten Locus liegenden *Rosa26*-Sonde kann bei Spaltung mit *EcoRI* in der Wildtyp-Situation eine Bande in Höhe von 15 kb detektiert werden. Bei einer Integration des Targeting-Konstrukts kann eine Bande bei 6 kb detektiert werden. Wird die Restriktionsspaltung mit *ScaI* durchgeführt, kann die Wildtyp-Bande bei 6 kb nachgewiesen werden. Im Falle einer Integration kann die Bande bei 12 kb detektiert werden (Abb. 23B). Um sicher zu gehen, dass das vollständige Konstrukt in den *Rosa26*-Locus integriert wurde, wurden weitere Southern-Blot-Analysen mit einer weiter 3'-liegenden Sonde, in diesem Fall einer *Gfp*-Sonde, durchgeführt. Das Vorhandensein von *Gfp* konnte in allen Neomycin-resistenten Klonen nachgewiesen werden. (Spaltung mit *EcoRI*: 3 kb, Spaltung mit *ScaI*: 12 kb) (Abb. 23C) Alle im Southern-Blot positiv getesteten Klone wurden des Weiteren durch Sequenzierung des integrierten Konstrukts überprüft. Unter den insgesamt 600 gepickten Klonen konnte eine Rekombinationsfrequenz des Konstrukts in den *Rosa26* Locus von 7,5 % erreicht werden.

Durch Kreuzung dieser Mäuse mit Tieren welche die *cre*-Rekombinase unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors (z.B. dem *Ebf2*-Promotor) exprimieren, kann die *loxP*-flankierte STOP-Kassette vor den miRNA Sequenzen durch Rekombination entfernt und die Expression der miRNAs gewebespezifisch induziert werden.

Um die Funktionalität der integrierten DNA zu testen, wurden einige der positiven ES-Zellklone mit einem *cre*-Rekombinase exprimierenden Plasmid transfiziert, welches zu einer Entfernung der *loxP*-flankierten STOP-Kassette führt, die sich vor dem *Gfp-miRNA*-Konstrukt befindet und somit die Expression von *Gfp* erlaubt. 48 Stunden nach der Transfektion mit der *cre*-Rekombinase konnten ca. 30% GFP-positive Zellen im FACS nachgewiesen werden (Abb. 24A).

In Kooperation mit Herrn Dr. Ralf Kühn am Helmholtz Zentrum Neuherberg wurden diese auf Funktionalität getesteten, genetisch veränderten ES-Zellen in Blastozysten eingebracht und in scheinchwangere Mäuse injiziert. Momentan erfolgt die weitere Verpaarung der so generierten chimären Mäuse um zu testen ob eine Übertragung des integrierten Konstrukts in die Keimbahn der Mäuse stattgefunden hat (Abb. 24B).

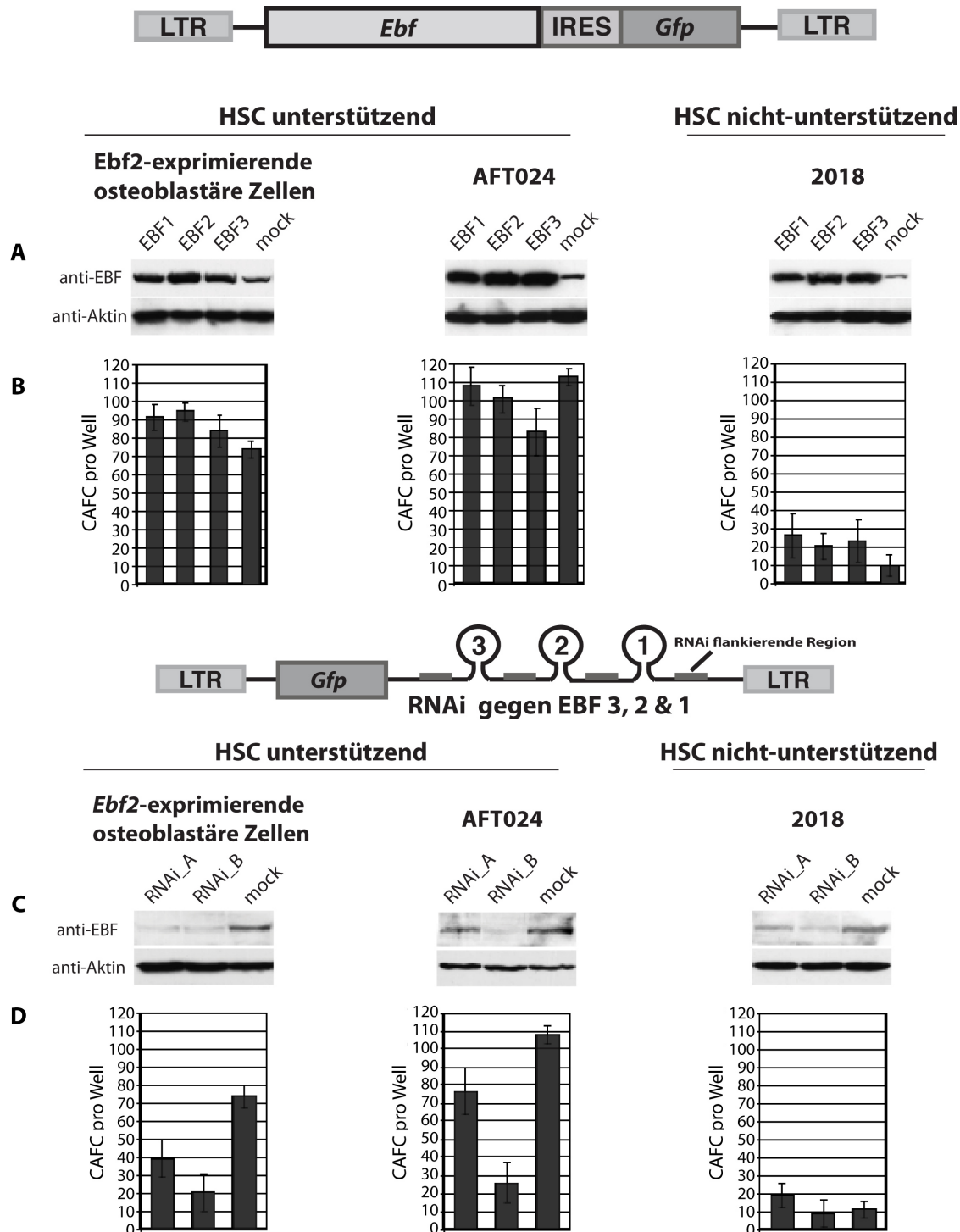


Abbildung 22: Deregulation von EBF1, 2 und 3 beeinträchtigt die stammzellunterstützende Kapazität stromaler Zellen. **A:** Darstellung des retroviralen Konstrukts, das zur Überexpression von *Ebf1*, 2 und 3 verwendet wurde. Die Western-Blot-Analyse zeigt die Überexpression der EBF-Proteine in den retroviral infizierten Zellen. **B:** Kokultur von Wildtyp-haematopoietischen Stammzellen mit den in A aufgeführten Zellen. **C:** Darstellung des retroviralen Konstrukts, das zur gleichzeitigen Expressionsverminderung von *Ebf1*, 2 und 3 verwendet wurde. Es wurden zwei verschiedene Versionen des Konstrukts verwendet, die sich in ihrer Sequenz zur Inhibierung von EBF1, 2 und 3 unterscheiden. Die Western-Blot-Analyse zeigt die Deregulation der EBF-Proteine in den retroviral infizierten Zellen. **D:** Kokultur von Wildtyp-haematopoietischen Stammzellen mit den in (C) aufgeführten Zellen.

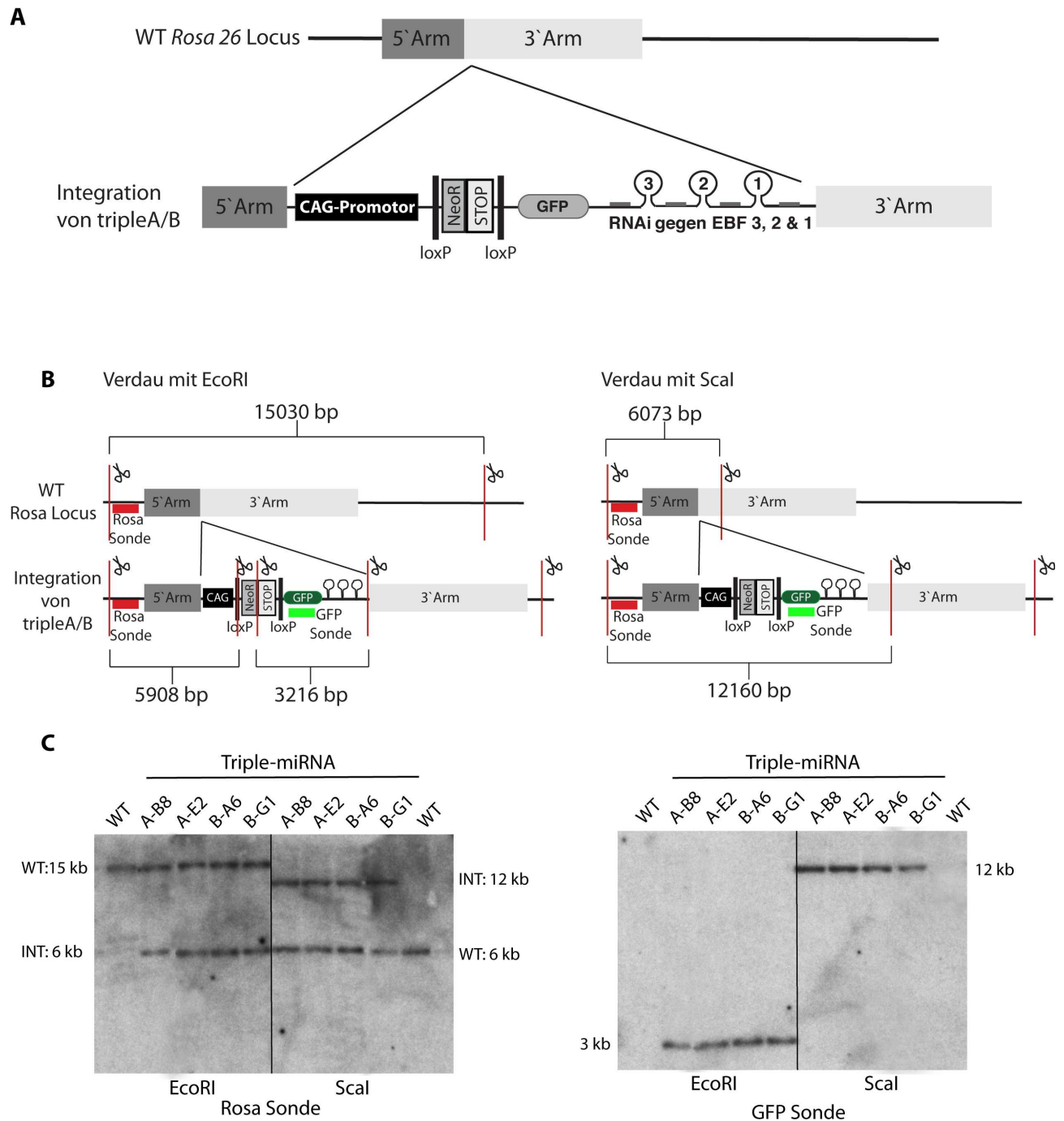


Abbildung 23: *in vivo* Modell des dreifachen EBF *Knock-downs*: **A:** Schematische Darstellung des genetisch veränderten *Rosa26* Locus zur induzierbaren Expression der miRNA Konstrukte gegen *Ebfl*, 2 und 3. In einen die homologen Arme des *Rosa26* Locus, den *Chicken- β -Actin* Promotor gefolgt von einer *LoxP*-flankierten *Neor* und *STOP* Kasette enthaltenden Targetingvektor wurde das *Gfp*-tripel-miRNA-Konstrukt kloniert. Durch homologe Rekombination wurde dieses Konstrukt in Maus IDG 3.2 ES-Zellen in den *Rosa26* Locus integriert. **B:** Darstellung der Southern-Blot-Strategie zum Testen der Neomycin-resistenten ES-Zellklone auf die korrekte Integration des Konstrukts. **C:** Southern-Blot-Analysen der ES-Zellklone mit den in B gezeigten Sonden.

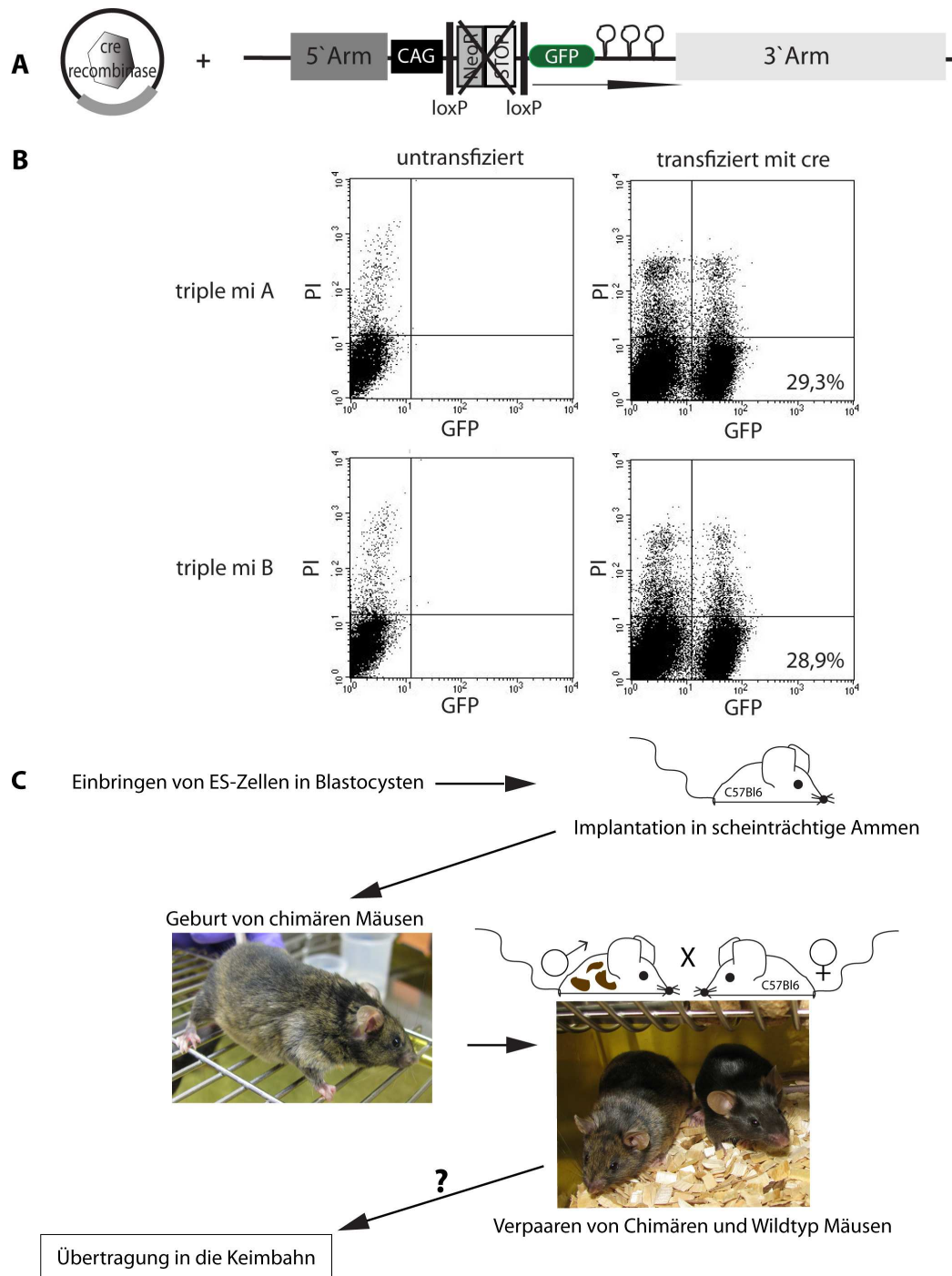


Abbildung 24: Funktionalität des Konstrukts und Generierung chimärer Mäuse. A: Zum Testen der Funktionalität des Konstrukts wurden die ES-Zellklone mit einem *cre*-Rekombinase exprimierenden Vektor transfiziert. GFP-Expression wurden nach 48h mittels Durchflusszytometrie gemessen. **B:** Durch das Einbringen der genetisch Veränderten ES-Zellen in Blastozysten konnten Chimären generiert werden.

3 Diskussion

3.1 *Ebf2* ist notwendig für die Unterstützung haematopoietischer Stammzellen.

Während des ganzen Lebens wird die Bildung von Blutzellen durch haematopoietische Stammzellen im Knochenmark gewährleistet. Essentiell hierbei ist das Einwirken verschiedener Milieus, welche durch die Produktion diverser Faktoren das Schicksal der Zellen beeinflussen und so die Differenzierung und Selbsterneuerung der Zellen steuern. Im Knochenmark wurden mittlerweile verschiedene haematopoietische Stammzellnischen beschrieben. Hierzu zählen unter anderem die osteoblastäre Nische am Endosteum und die vaskuläre Nische, die durch die Endothelzellen der sinusoidalen Gefäße im Knochenmark gebildet wird (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003; Arai et al., 2004; Kiel et al., 2005; Adams and Scadden, 2006; Wilson and Trumpp, 2006).

Ebf2 wird von mindestens zwei Zelltypen im Knochenmark, den Osteoblasten und Adipozyten, exprimiert (Kieslinger et al., 2005; Jimenez et al., 2007). Auf Grund der Expression des osteoblasten-spezifischen Transkriptionsfaktors *Runx2*, der Chondrozyten-Determinante *Sox9* und der Abwesenheit reifer Osteoblastenmarker können *Ebf2*-exprimierende Zellen als unreife osteoblastäre Zellen identifiziert werden (Kieslinger et al., 2005).

Dieser Arbeit vorausgehende unpublizierte Studien EBF2-defizienter Mäuse zeigen, dass *Ebf2* für die stromale Unterstützung haematopoietischer Stammzellen *in vivo* und *in vitro* essentiell ist. Unter Verwendung des EBF2-LacZ-Mausmodells (Corradi et al., 2003) konnte in durchflusszytometrischen Analysen eine zwei bis vierfach verringerte Anzahl haematopoietischer Stammzellen in *Ebf2*^{-/-} Mäusen beobachtet werden. Der adoptive Transfer von EBF2-defizientem Knochenmark in letal bestrahlte Wildtyp-Mäuse zeigt, dass die Defekte in *Ebf2*^{-/-} Mäusen auf Grund von Veränderungen des stromalen Umfeldes und nicht durch Defekte der haematopoietischen Zellen statt finden. Drei bis 4 Monate nach der Transplantation konnten ähnliche B-Zell-Populationen in Mäusen die mit EBF2-defizientem bzw. Wildtyp-Knochenmark rekonstituiert wurden, nachgewiesen werden. Haematopoietische Defekte EBF2-defizienter Mäuse werden somit durch das stromale Umfeld erzeugt. Hier könnten Mechanismen wie Zelladhäsion zwischen Stroma und haematopoietischen

Stammzellen, Differenzierung der Zellen oder die Balance zwischen Zellteilung und ruhendem Status gestört sein.

Der Einfluss osteoblastärer Zellen auf die haematopoietische Stammzellnische wurde in Studien dargestellt, in denen eine Erhöhung der Osteoblasten auch zu einer erhöhten Anzahl haematopoietischer Stammzellen führt (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003). Trotz der verringerten Knochendichte von EBF2-defizienten Mäusen, die durch eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten bedingt ist, ist in EBF2-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Anzahl an Osteoblasten zu detektieren (Kieslinger et al., 2005). EBF2-defiziente Zellen zeigen also mindestens zwei funktionale Defekte, erstens in der Osteoblasten-abhängigen Differenzierung von Osteoklasten und zweitens in der Unterstützung haematopoietischer Stammzellen.

Auch in dem hier verwendeten EBF2-GFP Mausmodell (Abb. 6A) (Wang et al., 2004) kann eine drei bis 4-fache Reduktion haematopoietischer Stammzellen in EBF2-defizienten Mäusen gezeigt werden (Abb. 6B und C). Die Färbung *Ebf2*-exprimierender Zellen mit dem haematopoietischen Marker CD45 zeigte außerdem, dass *Ebf2* nur vom Stroma haematopoietischer Gewebe und nicht von haematopoietischen Zellen selbst exprimiert ist (Abb. 6D).

3.2 Analyse der Ursache des Stammzelldefekts EBF2-defizienter Mäuse

Um die haematopoietische Stammzellnische besser zu charakterisieren und die Ursache des Defekts EBF2-defizienter Mäuse in der Unterstützung haematopoietischer Stammzellen zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen von GFP-positiven *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} osteoblastären Zellen mittels DNA Micro-Array (Abb. 9 und 10) durchgeführt. Zum Test des Versuchsaufbaus, wurden 6 unabhängige *Ebf2*^{-/-} und 5 unabhängige *Ebf2*^{+/-} Osteoblastenpräparationen miteinander verglichen. Nach einer Auswertung der Daten, konnte eine Vielzahl deregulierter Gene festgestellt werden, allerdings waren die Unterschiede in der Expression dieser Kandidaten zwischen *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Zellen sehr gering.

Die zur Hybridisierung des DNA Micro-Arrays verwendete RNA wurde direkt aus Zellen aus der Maus isoliert. Durch die Gewinnung der RNA ohne zusätzliche Kulturschritte der Zellen, sollte es möglich sein, die *in vivo* Situation der Expression der Gene widerzuspiegeln. Die lange Prozedur der Präparation der Zellen aus dem Knochen (Abb. 7, von der Isolation der

Embryonen bis zu Zellsortierung ca. 10 Stunden) bringt diese allerdings in eine Stresssituation, die eine Veränderung des Expressionsprofils während der langen Präparationszeit zur Folge haben könnte. Hinzu kommt der geringe Anteil GFP-positiver *Ebf2*-exprimierender Zellen (drei bis vier Prozent) im Knochen. Pro Embryo konnten durchschnittlich 15.000 Zellen sortiert werden. Auf Grund dieser niedrigen Zellzahlen konnten nur geringe RNA Mengen isoliert werden, die eine zweifache Amplifikation der RNA vor der Hybridisierung mit dem DNA Micro-Array notwendig machten. Diese Vervielfältigung des Materials könnte eine weitere Fehlerquelle darstellen, da keine 100% gleiche Amplifikation aller RNAs gewährleistet werden kann. Die aufgeführten Gründe könnten eine Veränderung des Expressionsprofils nach der Isolation der Zellen bedingen und für die geringen Expressionsunterschiede in *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Zellen verantwortlich sein.

Weiter ist zu bedenken, dass die Proteine der EBF-Familie die Fähigkeit besitzen an die gleiche DNA Sequenz binden (Hagman et al., 1993), eine hohe Homologie aufweisen und gleichzeitig in Osteoblasten exprimiert werden (Kieslinger et al., 2005). Es wäre deshalb möglich, dass andere EBF-Mitglieder (EBF1 oder EBF3) Funktionen von EBF2 übernehmen und deshalb nur geringe Expressionsunterschiede in EBF2-defizienten Zellen zu vermerken sind.

Eine weitere Fehlerquelle könnte die biologische Varianz der einzelnen Osteoblastenpräparationen darstellen. Um diese Effekte gering zu halten und eine bessere statistische Auswertung zu gewährleisten, wurde die Anzahl der zu vergleichenden Proben bei einem momentan durchgeführten DNA Micro-Array auf je 25 erhöht. Daten aus diesen Experimenten sind noch nicht bekannt.

In einer Analyse der 1000 am stärksten deregulierten Kandidaten bezüglich ihrer Beteiligung an zellulären Prozessen, konnten 600 der Kandidaten bestimmten Signalwegen zugeordnet werden. Bei den 400 Genen die keinem biologischen Prozess zugeordnet werden konnten, handelt es sich um nicht annotierte Gene mit unbekannter Funktion. Analog zu diesen Ergebnissen konnte in Expressionsanalysen von stammzellunterstützenden (AFT024) und nichtunterstützenden Zelllinien (2018) ebenfalls eine Vielzahl nicht annotierter Genen als differentiell exprimiert identifiziert werden (Charbord and Moore, 2005). Die potentielle Beteiligung vieler Gene uns noch unbekannter Funktion könnte ein Grund für die bisher wenig beschriebene Kommunikation haematopoietischer Stammzellen mit ihrer Umgebung sein.

Eine signifikante Beteiligung der deregulierten Kandidaten konnte unter anderem bei der Signaltransduktion durch Calcium gefunden werden (Abb. 9). Die Beteiligung des Calcium-Signalings kann unter anderen in biochemischen Prozessen wie der Regulation von Enzymen, der Aktivierung von Ionenkanälen oder als *second messenger* zum Beispiel in der Signalübertragung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren gefunden werden. Die Deregulation von Komponenten dieses eher allgemein verwendeten Signalwegs könnte einen Einfluss auf den Erhalt oder das Verhalten haematopoietischer Stammzellen haben. Weiter wurde die Beteiligung deregulierter Kandidaten am Erhalt der Stammzellpluripotenz identifiziert. Auch Signaltransduktionswege durch Zytokine wie IL10, FGF oder VEGF wurden als signifikant angereichert gefunden. Im Bezug auf VEGF konnte eine Expression in Osteoblasten gezeigt, aber keine differentielle Regulation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), allerdings könnten andere Mitglieder dieser Signalwege dereguliert sein und so einen Effekt auf die Stammzellnische ausüben. Einige der deregulierten Kandidaten sind laut *Pathway*-Analyse auch an der Leitung und Zielfindung von Axonen beteiligt. EBF2 konnte bereits eine Rolle in der Morphogenese und Migration von peripheren Nerven zugeteilt werden (Corradi et al., 2003; Wang et al., 2004).

3.3 Stromale EBF2-defiziente Zellen produzieren weniger Angiogenin 1

Da bekannt ist, dass Osteoblasten haematopoietische Stammzellen durch die Produktion von sezernierten und membrangebundenen Wachstumsfaktoren unterstützen (Taichman and Emerson, 1998; Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003; Suda et al., 2005; Taichman, 2005), wurde bei der Auswertung des DNA Micro-Arrays ein Hauptaugenmerk auf die differentielle Expression von sezernierten und Transmembranproteinen zwischen *Ebf2*^{-/-} und *Ebf2*^{+/-} osteoblastären Zellen gelegt. Dereguliert gefundene Kandidaten des Arrays mit diesen Merkmalen wurden mittels Real-Time PCR verifiziert (Abb. 11).

Die geringen Expressionsunterschiede der deregulierten Kandidaten fielen bei der Bestätigung durch quantitative PCR noch geringer aus. Die für die Real-Time PCR verwendete RNA wurde direkt aus primären Zellen der Maus isoliert und in die cDNA Synthese eingesetzt. Wie schon erwähnt, könnte durch die zweifache Amplifikation des für den DNA Micro-Array verwendeten Materials eine Verfälschung des Expressionsmusters

statt gefunden haben. Unterschiede, die im Array detektierbar waren, könnten in der PCR durch die Verwendung von nur einmal amplifizierter RNA geringer erscheinen.

Die im DNA Micro-Array detektierte Deregulation des sezernierten Angiogenin1 (*Ang1*) konnte auch mittels Real-Time PCR bestätigt werden. In EBF2-defizienten osteoblastären Zellen konnte Angiogenin1 8 bis 11-fach weniger exprimiert vorgefunden werden (Abb. 11). Das Mitglied der RNase-Familie 5 wurde zuerst durch seine Rolle in der Bildung von Blutgefäßen identifiziert. Durch den Einfluss von ANG auf verschiedene Signaltransduktionswege (Liu et al., 2001; Xu et al., 2001; Kim et al., 2007) und durch seine Fähigkeit in den Kern von Zellen eingebracht zu werden und die Transkription ribosomaler RNA zu stimulieren (Xu et al., 2002; Xu et al., 2003; Tsuji et al., 2005), wird sekundär die Ribosomenbiogenese und damit die Translation von Proteinen beeinflusst (siehe auch 1.10). Verminderte Expression von ANG kann in reduzierter rRNA-Transkription und verminderter Ribosomenbiogenese und Zellproliferation resultieren (Kishimoto et al., 2005; Tsuji et al., 2005).

Eine mögliche Begründung für die verringerte Anzahl an haematopoietischen Stammzellen in EBF2-defizienten Mäusen könnte die verminderte Expression und damit auch Sekretion von Angiogenin durch *Ebf2*-exprimierende osteoblastäre Zellen sein. Das verringerte Angiogenin1-Level in der haematopoietischen Stammzellnische könnte in einer verminderten Bindung und/oder Translokation des Proteins in haematopoietische Stammzellen resultieren. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass durch eine reduzierte rRNA-Transkription und Ribosomenbiogenese, die Proliferation und der Erhalt der haematopoietischen Stammzellen gestört ist (Abb. 25A). Bisher konnte noch kein Einfluss von Angiogenin1 auf haematopoietische Zellen gezeigt werden, obwohl eine Überexpression von Angiogenin1 und somit eine verstärkte Proliferation und Tumorigenese in einigen Leukämien und Lymphomen beobachtet werden konnte (Yoshioka et al., 2006). Die verminderte Angiogenin-Expression könnte aber auch indirekt auf die haematopoietischen Stammzellen wirken und so den Stammzelldefekt in EBF2-defizienten Mäusen auslösen. Wie bereits erwähnt, scheinen die Endothelzellen der sinusoidalen Gefäße im Knochenmark eine weitere Nische für haematopoietische Stammzellen zu bilden (Kiel et al., 2005; Kiel and Morrison, 2008). Da die Wirkung von Angiogenin bisher hauptsächlich in Endothelzellen gezeigt wurde (Hu et al., 1991; Hu et al., 1994; Hu et al., 1997; Hu et al., 2000; Liu et al., 2001; Kishimoto et al., 2005; Kim et al., 2007), wäre es möglich, dass Angiogenin einen Einfluss auf die Endothelzellen der vaskulären Stammzellnische oder auf die Angiogenese der sinusoidalen Gefäße ausübt,

welche wiederum den Erhalt und die Proliferation von haematopoietischen Stammzellen unterstützen (Abb. 25B).

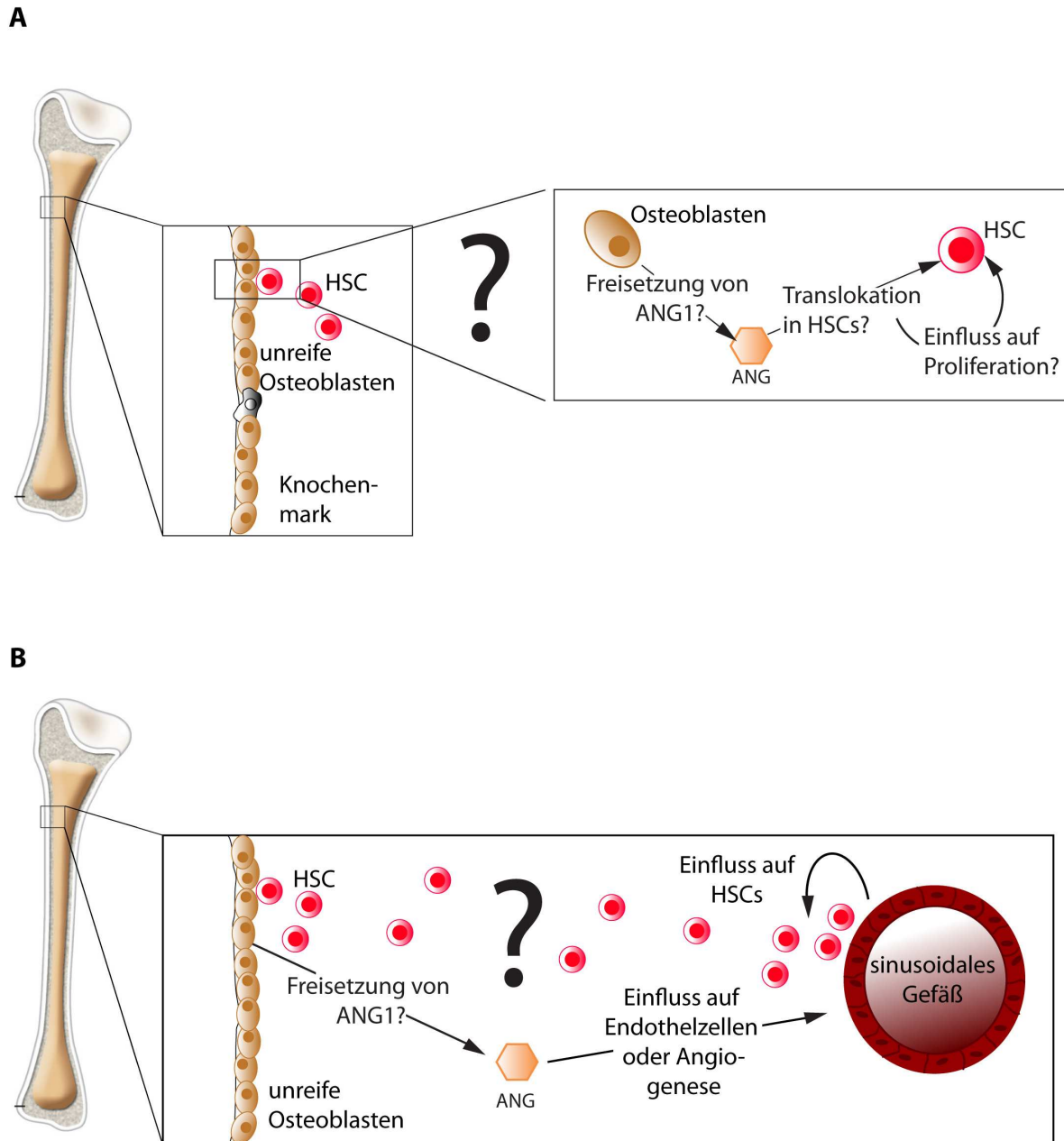


Abbildung 25: Zwei Modelle zur möglichen Wirkungsweise von ANG1 in der haematopoietischen Stammzellnische. A: Von *Ebf2*-positiven Osteoblasten exprimiertes ANG1 könnte an die Oberfläche haematopoietischer Stammzellen (HSC) binden oder in diese eingebracht werden und so einen Einfluss auf die Proliferation und den Erhalt der Stammzell-Population haben. **B:** Die Sekretion von ANG1 könnte aber auch einen Einfluss auf die Endothelzellen der sinusoidalen Gefäße haben, die eine Nische für haematopoietische Stammzellen bilden und so deren Erhalt und Proliferation verändern.

3.4 Angiogenin1 ist das einzige deregulierte Mitglied der *RNase5*-Familie in *Ebf2*-exprimierenden Osteoblasten.

Die *RNase*-Superfamilie umfasst noch weitere homologe Mitglieder, unter anderem *Angiogenin2* bis *5* und *RNase4*. Eine unterschiedliche Expression der Proteine *Angiogenin2* bis *5* konnte in *Ebf2*-exprimierenden Zellen nicht festgestellt werden (Abb. 14E und F). Wie *Ang1* kann auch *RNase4* von zwei unterschiedlichen Promotoren gewebespezifisch in Kombination mit den nicht-kodierenden Exons1 bzw. 2 exprimiert werden (Abb. 12A). Untersucht man die Verwendung der beiden Promotoren in *Ebf2*-exprimierenden Zellen, kann man Promotor1 gesteuerte *RNase4*-Expression in *Ebf2*^{-/-} Zellen ca. ein 1000-faches weniger detektieren als in *Ebf2*^{+/-} Zellen, ähnliches ist auch bei der *RNase4* Expression von Promotor2 aus zu beobachten. Hier wird in *Ebf2*^{-/-} Zellen eine ca. 30-fach geringere Expression als in *Ebf2*^{+/-} Zellen beobachtet (Abb. 14B und C). Diese Daten weisen auf eine unterschiedliche Expression von *RNase4* in *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Zellen, analog der *Ang1*-Expression hin. Betrachtet man die *RNase4*-Expression in *Ebf2*-exprimierenden Zellen allerdings unabhängig von Promotor1 und 2, kann keine differentielle Expression von *RNase4* in *Ebf2*^{-/-} und *Ebf2*^{+/-} Zellen auf RNA-Ebene verzeichnet werden (Abb. 14E und F). Die Expression von *RNase4* in *Ebf2*-exprimierenden Zellen scheint also nicht alleine von den Promotorregionen1 und 2 im *Ang1/RNase4* Locus gesteuert zu werden. Daten über die Expression von *RNase4* von einer weiteren Promotorregion aus oder über den Einfluss weiterer Faktoren, die für die *RNase4*-Expression benötigt werden, sind bisher noch nicht bekannt. Somit ist *Ang1* das einzige deregulierte Mitglied der *RNase5*-Familie in *EBF2*-defizienten Zellen (Abb. 14E und F).

3.5 Angiogenin1 ist ein direktes *EBF2*-Zielgen, seine Expression wird von Promotor1 aus reguliert

Mitglieder der *EBF*-Familie binden alle eine Variation der palindromischen Sequenz 5'-ATTCCnGGGAAT-3'. Sobald die Zahl der beiden *Spacer-Nukleotide* (nn) in der Mitte der palindromischen Sequenz auf eins reduziert wird (5'-ATTCCnGGGAAT-3'), findet keine Bindung von *EBF* an die Sequenz mehr statt. Die Bindung geht ebenfalls verloren wenn die Anzahl der *Spacer-Nukleotide* auf 4 und mehr Nukleotide erhöht wird (5'-

ATCCCnnnnGGGAAT-3`)). Mutiert man eine Hälfte des Palindroms ist auch ein Rückgang der Bindungsspezifität zu beobachten (Travis et al., 1993).

Durch Computeranalysen konnten in den beiden *Ang1/RNase4* Promoterregionen potentielle EBF-Bindestellen identifiziert werden. Bindestelle A in Promotor1 entspricht mit ihrer Sequenz (5`-GCTCCCcaGGGAG-3`), einem Palindrom mit zwei *Spacer-Nukleotiden*, einer typischen EBF-Bindestelle. In Bindestelle B des Promotor1 ist durch das Fehlen eines Nukleotids im linken Triplet des Palindroms (5`-CTTCCagGGGAG-3`) eher untypisch für eine EBF-Bindung. Durch das Vorhandensein von nur einem *Spacer-Nukleotid* in *Ang1/RNase4* Promotor2 (5`-TGCCCaGGGAG-3`) ist eine EBF-Bindung hier eher unwahrscheinlich (Abb. 12 und 15A).

Gelretardierungsexperimente mit endogenem als auch mit *in vitro* translatiertem EBF1 oder EBF2 zeigen, dass EBF nur an die Bindestelle A des Promotor1 binden kann. An die als Bindestellen identifizierten DNA Sequenzen des Promotor1B und des Promotor2 konnte keine spezifische Bindung von EBF festgestellt werden (Abb. 15 und 16).

Die Spezifität der Bindung von EBF an den Promotor1A wurde mit so genannten *Supershift* Experimenten weiter bestätigt. Verwendet man *in vitro* translatierte mit einem FLAG-Tag versehene EBF Proteine und setzt einen Anti-FLAG-Antikörper in die Bindereaktion ein, wird das Laufverhalten des EBF-Promotor1A-Komplexes durch die zusätzliche Bindung des Antikörpers verlangsamt (Abb. 15). Die Zugabe des EBF1, 2 und 3 erkennenden Anti-pan-EBF-Antikörpers hatte keinen Einfluss auf das Laufverhalten des Komplexes. Dieser Antikörper bindet an die Aminosäuren 52 bis 66 in der DNA-Bindedomäne der EBF-Proteine 1 bis 3. Im nativen Protein dürfte sich dieser Bereich an Aminosäuren, der einen Teil der DNA-Bindedomäne ausmacht, im Inneren des Proteins befinden, somit ist eine Erkennung der nativen EBF-Proteine durch den Anti-pan-EBF-Antikörper nicht gewährleistet. Durch den Einsatz des Anti-pan-EBF-Antikörpers in Gelretardierungsversuchen ist deshalb auch kein *Supershift* zu erkennen (Abb. 15).

3.6 Die Transaktivierung des *Ang1/RNase4* Promotors durch EBF.

Der Einfluss von EBF auf diverse Promotoren ist aus der Literatur bekannt. Beispielsweise wurde die Wirkung von EBF auf den *Lamda5*-Promotor in Luziferase-Reporter-Experimenten gezeigt und eine Synergie zwischen EBF und E47, einer Spleissvariante von E2A dargelegt. In diesen Reporter Experimenten wurde in der murinen B-Zelllinie Ba/F3, die unter der

Kontrolle des *lamda5*-Promotors liegende Luziferase unter der Einwirkung von EBF aktiviert. Im Zusammenspiel von EBF und E47 wurde die Aktivierung der *lamda5*-gesteuerten Luziferase um ein vielfaches erhöht. Aus diesem Grund wurde der *lamda5*-Promotor als Positivkontrolle in die Versuche mit eingebaut (Sigvardsson et al., 1997).

Durch eine Überexpression von *Ebf* in humanen HEK293T Zellen konnte die *Ang1/RNase4*-Promotor1 gesteuerte Luziferase, in Vergleich zur Leervektorkontrolle, um ein 16-faches induziert werden. Verwendet man eine mutierte Form des Promotor1, in der eine Hälfte des Palindroms der Bindestelle A bzw. der Bindestelle A und B vergleichbar zum EMSA verändert wurde, war ein Rückgang der Induktion vergleichbar zur Leervektorkontrolle zu verzeichnen. Unter Verwendung des *Ang1/RNase4*-Promotor2 gesteuerten Luziferase-Reporters konnte nur eine zwei bis dreifache Induktion durch EBF beobachtet werden (Abb. 17).

Diese Daten zeigen die Bindung von EBF an die Bindestelle A im Promotor1 und die daraus resultierende Aktivierung eines Reporters und bestätigen die Ergebnisse vorhergehender Experimente. Mittels Real-Time PCR konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Ang1* bzw. *RNase4* weitaus häufiger von Promotor1 als von Promotor 2 induziert wird (Abb. 17). In Gelretardierungsexperimenten konnte die Bindestelle A im *Ang1/RNase4*-Promotor1 als EBF-Bindestelle identifiziert werden (Abb. 15 und 16).

Die bereits gezeigte Aktivierung der Luziferase durch die Bindung von EBF an den *lamda5*-Promotor wurde in HEK293Zellen nicht beobachtet. In der murinen B-Zelllinie Ba/F3 konnte eine vergleichbare Aktivierung der Luziferase durch die Bindung von EBF an die Bindestelle A des *Ang1/RNase4*-Promotor1 und durch die Bindung an den *lamda5*-Promotor erzielt werden. Im Vergleich zu den humanen HEK293T Zellen fiel die Induktion in den Ba/F3 Zellen um ein dreifaches geringer aus. Da es sich bei HEK293T um eine humane embryonale Nierenzelllinie handelt, sind dort im Vergleich zur murinen B-Zelllinie keine basalen Level an endogenem murinen EBF vorhanden. Das Hintergrundsignal das durch endogenes EBF und zusätzliche murine B-Zellfaktoren in Ba/F3 Zellen entsteht, ist in HEK293T Zellen geringer. Somit kann in der humanen Zelllinie eine stärkere Aktivierung durch den *Ang1/RNase4*-Promotor1 beobachtet werden. Die geringe Aktivierung durch den *lamda5*-Promotor in HEK293T Zellen könnte ebenfalls durch das Fehlen von murinen B-Zellfaktoren begründet werden.

Weiterhin konnte in Ba/F3 Zellen eine Erhöhung der Aktivität durch die Zugabe von E47 bezüglich des *lamda5*-Promotors gezeigt werden. Die Expression von Genen durch EBF erreicht also in Synergie mit Faktoren wie E47 eine höhere Effizienz. Die Aktivierung der

Luziferase durch die Bindung von EBF an den *Ang1/RNase4*-Promotor1 ist in Ba/F3 Zellen vergleichbar zum *lamda5*-Promotor, in Zusammenspiel mit E47 ist jedoch eine Reduktion der Aktivität zu verzeichnen. Alleine hat E47 weder Einfluss auf die Aktivität des *Ang1/RNase4*-Promotors noch auf die des *lamda5*-Promotors (Abb. 18).

3.7 Wird neben EBF2 noch ein Kofaktor zur Induktion von Angiogenin1 benötigt?

Um zu untersuchen, ob eine Überexpression von *Ebf2 in vitro* Einfluss auf die Expression von *Ang1* hat, wurde *Ebf2* in verschiedenen Zelllinien exprimiert und anschließend die *Ang1* Expression mittels quantitativer PCR gemessen (Abb. 19). Die untersuchten Zelllinien ließen sich in zwei Gruppen aufteilen. Zelllinien mit einem generell hohen *Ang1*-Expressionslevel, reagierten nicht auf eine Überexpression von EBF2. Vor und nach der Expression konnten hier die gleichen *Ang1*-Expressionslevel gemessen werden. In Zelllinien mit geringer *Ang1*-Expression (bis zu 1000 –fach weniger als in Gruppe 1) konnte nach der Überexpression von *Ebf2* eine zwei bis 4-fache Erhöhung der *Ang1*-Levels gezeigt werden (Abb. 19). Das basale Expressionslevel von *Ang1* scheint also bei der Wirkung von EBF auf die *Ang1*-Expression eine Rolle zu spielen.

Vergleichbar zu den Luziferase-Reporter Experimenten in Ba/F3 Zellen konnte nach einer Überexpression von *Ebf2* in verschiedenen Zelllinien nur eine schwache Induktion von *Ang1* beobachtet werden. Wie bereits erwähnt, kann die Wirkungsweise von EBF durch ein synergetisches Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren wie E47, einer Spleissvariante von E2A verstärkt werden (Sigvardsson et al., 1997). Da die Wirkung von E47 in Kombination mit EBF im Bezug auf den *Ang1/RNase4*-Promotor1 einen negativen Effekt ausübt (Abb. 18), wäre es denkbar, dass andere Faktoren benötigt werden um eine starke Induktion, ähnlich der *lamda5*-Expression nach EBF und E2A Einwirkung, zu erreichen. Die in den *Ang1/RNase4*-Promotorregionen1 als auch 2 befindlichen E-Box Motive (5'-CANNTG-3) könnten von anderen *helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktoren gebunden werden und so die *Ang1*-Expression verstärken. In differenzierenden Muskelzellen zum Beispiel, wird die Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor1 (IGF1), der ähnlich der *Ang1/RNase4* ebenfalls von zwei Promotoren lokalisiert vor Exon1 oder Exon2 gesteuert wird, durch die Bindung von myogenen regulatorischen Faktoren wie MyoD1, an E-Box Elemente in der Promotorregion1

reguliert (McLellan et al., 2006). Erkenntnisse über Faktoren, welche die *Ang1*-Expression steuern, sind in diesem Zusammenhang noch nicht bekannt.

3.8 Die biologische Rolle von *Ang1* in der haematopoietischen Stammzellnische

Um die biologische Rolle von *Ang1* im Erhalt von haematopoietischen Stammzellen zu untersuchen, wurde die *Ang1*-Expression in *Ebf2*-exprimierenden Zellen retroviral verändert. Die zur *Ang1*-Expressionsverminderung verwendeten miRNA Konstrukte wurden auf ihre Funktionalität getestet, indem die Deregulation von überexprimiertem *Ang1-Flag* in HEK293T Zellen mittels Western-Blot-Analyse untersucht und gezeigt werden konnte (Abb. 20). Um zu beobachten, ob die Fähigkeit haematopoietische Stammzellen zu unterstützen in *Ebf2*-exprimierenden Zellen mit deregulierten *Ang1*-Leveln verändert ist, wurden Kokultur-Experimente mit haematopoietischen Stammzellen aus der Maus durchgeführt. Erste Auswertungen der Kokulturen ergaben keine signifikante Veränderung in der Unterstützung haematopoietischer Stammzellen, nach Deregulation der *Ang1*-Expression. Zu erwähnen ist, dass eine Deregulation von *Ang1* in den in der Kokultur eingesetzten Zellen auf Proteinebene wegen fehlender funktionierender Antikörper nicht nachzuweisen ist. Deshalb lässt sich auf Grund dieser ersten Kokultur-Ergebnisse keine Aussage über den Einfluss *Ang1*-deregulierter Zellen auf den Erhalt haematopoietischer Stammzellen *in vitro* machen. In Kollaboration mit Frau Dr. Kremmer (Institut für molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München) werden momentan ANG1-spezifische Antikörper produziert und von mir auf Funktionalität getestet. Mit Hilfe dieser Antikörper soll die *Ang1*-Expression untersucht werden.

Ein weiterer Grund für die unveränderte Unterstützung haematopoietischer Stammzellen in der Kokultur mit in ihrer *Ang1*-Expression veränderten Zellen, könnte eine indirekte Wirkungsweise von *Ang1* auf die Stammzellen sein. Wie schon beschrieben ist die Wirkungsweise von *Ang1* hauptsächlich aus Endothelzellen bekannt. Beeinflusst die veränderte *Ang1*-Expression der Osteoblasten nicht die Stammzellen selbst, sondern die Endothelzellen der vaskulären Stammzellnische, die wiederum das Verhalten der Stammzellen regulieren (Abb. 25B), könnte dieser indirekte Effekt in den eben beschriebenen Kokultur-Experimenten nicht untersucht werden.

3.9 Geringe Expressionsunterschiede zwischen *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Zellen durch redundante Wirkungsweise der Mitglieder der EBF-Familie?

Der Begriff der Redundanz beschreibt das zusätzliche Vorhandensein funktional gleicher Ressourcen. Die hohe Homologie und evolutionäre Konserviertheit sowie die Tatsache, dass EBF1, 2 und 3 die Fähigkeit besitzen an gleiche DNA-Sequenzen zu binden (Hagman et al., 1993; Wang and Reed, 1993; Hagman et al., 1995) und als transkriptionelle Aktivatoren zu fungieren, weist auf eine ähnliche Funktionalität hin. Hinzu kommt, dass in *Ebf2*-exprimierenden osteoblastären und adipozytischen Zellen auch andere Mitglieder der EBF-Familie (*Ebf1* und *Ebf3*) exprimiert sind. Diese Faktoren könnten auf eine redundante Wirkungsweise der Proteine hinweisen (Kieslinger et al., 2005). Die von *Ebf2* ausgeübten Funktionen könnten im Falle einer EBF2-Defizienz somit von den anderen Mitgliedern der Proteinfamilie übernommen werden.

Wie bereits mehrfach erwähnt, konnten in Expressionsanalysen von *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} osteoblastären Zellen durch DNA Micro-Array und quantitative Real-Time PCR viele Gene als dereguliert exprimiert identifiziert werden. Allerdings wurden nur geringe Unterschiede im Expressionsmuster beider Zelltypen gefunden. Gründe für die geringen Expressionsunterschiede in *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Zellen könnten in der beschriebenen redundanten Wirkung der Proteine der Familie der EBF-Transkriptionsfaktoren liegen.

3.10 Effekte einer gleichzeitigen Defizienz von EBF1, 2 und 3

Geht man von einer Redundanz der EBF-Proteine aus, wäre es interessant den Effekt einer gleichzeitigen Deregulation von EBF1, 2 und 3 beobachten zu können. Eine alleinige Defizienz von EBF1 resultiert in einer Blockade der B-Zellentwicklung (Hagman et al., 1993; Lin and Grosschedl, 1995). EBF2-defiziente Mausstämmen zeigen neben einem neuronalen Phänotyp (Corradi et al., 2003; Wang et al., 2004) eine verringerte Knochendichte auf Grund erhöhter Osteoklastenzahlen (Kieslinger et al., 2005) und weisen den hier untersuchten Stammzellphänotyp auf. EBF3-defiziente Mäuse wirken zyanotisch und sterben innerhalb eines Tages nach der Geburt. Würden alle 3 EBFs gleichzeitig deletiert, sollten sich diese Phänotypen mindestens summieren. In Falle einer Redundanz wäre sogar eine Verstärkung

der Phänotypen zu erwarten. Es kann spekuliert werden, ob nicht noch weitere Defekte, die bisher bei den einzelnen Deletionen der *Ebf*-Gene nicht beobachtet wurden, auftreten könnten. Die früheste Expression von EBF kann ab dem 9. Tag nach der Befruchtung in Zellen der Neuralleiste festgestellt werden. Auch in diesem Fall kann eine gleichzeitige Expression von *Ebf1*, 2 und 3 gezeigt werden. Da die Deletion von nur einem Mitglied der EBF Familie bereits starke Defekte auftreten lässt, könnten hier eventuell schon frühe embryonale Stadien von einem Defekt betroffen sein. Möglicherweise wäre eine dreifache Deletion in einem embryonalen Stadium letal.

Um den Effekt einer gleichzeitigen Defizienz von EBF1, 2 und 3 untersuchen zu können, wurde die Expression dieser Gene mittels RNAi dereguliert. Unter Verwendung einer eleganten Methode, bei der miRNA-Schleifen gegen verschiedene Gene in einem Expressionsvektor hintereinander gehängt werden können, ist es möglich die Expression von *Ebf1*, 2 und 3 gleichzeitig mit einem Plasmid zu verringern. Die Funktionalität dieser Konstrukte konnte sowohl anhand ektopisch exprimierter EBF-FLAG Proteine in HEK293T Zellen, als auch bei endogenem EBF auf Proteinebene mittels Western-Blot gezeigt werden (Abb. 21B und 22C).

Der funktionelle Defekt EBF2-defizienter Osteoblasten in der Unterstützung haematopoietischer Stammzellen wurde *in vitro* in vorausgehenden Experimenten von Dr. Kieslinger untersucht. In Kokulturversuchen mit *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} osteoblastären Zellen und *lin*⁻ *cKit*⁺ *Scal*⁺ haematopoietischen Stammzellen wurde die Fähigkeit der Stammzellen so genannte *Cobblestone area forming cells* zu bilden untersucht. Hier konnte eine Reduktion der *Cobblestone area forming cells* auf EBF2-defizienten Zellen um 45% gezeigt werden. Auch die Fähigkeit der Koloniebildung war bei haematopoietischen Stammzellen aus der Kokultur mit EBF2-defizienten Zellen ca. die Hälfte reduziert (Daten nicht gezeigt). Führt man diese Kokulturversuche mit den dreifach EBF-deregulierten osteoblastären Zellen durch, kann man einen Rückgang der *Cobblestone forming areas* auf 22 – 26 % beobachten (Abb. 22D). Der Effekt durch die verminderte Expression aller drei EBF-Proteine *in vitro* ist also deutlich stärker als durch die EBF2-Defizienz alleine. Die Theorie, dass eine dreifache EBF-Defizienz einen stärkeren Phänotyp aufweisen würde, könnte sich also durchaus bewahrheiten. In einer Expressionsanalyse von dreifach defizienten Mäusen könnten die Unterschiede im Expressionsmuster im Vergleich zum Wildtyp vielleicht deutlicher sein.

3.11 Eine dreifache EBF-Defizienz – die Herstellung eines Mausmodells

Führt eine dreifache EBF-Defizienz zu einem verstärkten Phänotyp, wäre solch ein Mausmodell vermutlich in einem frühen Stadium letal ist. Würde man die Defizienz von *Ebf1*, 2 und 3 in einer konventionellen Art und Weise erzeugen, zum Beispiel in dem man Gene oder Teile davon deletiert, wäre es möglich, dass solch ein Mausmodell auf Grund der Letalität nur bis zu einem bestimmten embryonalen Stadium analysiert werden könnte. Die Beantwortung der Fragen bezüglich des Erhalts haematopoietischer Stammzellen im Knochenmark adulter Tiere könnte so nicht erfolgen.

In dem von uns geplanten Mausmodell befinden sich die miRNA-Schleifen, die für eine verminderte Expression von *Ebf1*, 2 und 3 verantwortlich sind, hinter einer loxP-flankierten STOP-Kassette. Dieses Konstrukt wurde unter der Kontrolle des *Chicken- β -Aktin*-Promotors in den ubiquitär exprimierten und für Gen-Targeting leicht zugänglichen *Rosa26*-Locus integriert. Die Expression der miRNAs wird also unter normalen Umständen durch das Vorhandensein der STOP-Kassette verhindert und die Expression von *Ebf1*, 2 und 3 ist unverändert zum Wildtyp. Kreuzt man diese Maus mit einem Mausmodell das die *cre*-Rekombinase unter einem bestimmten Promotor, zum Beispiel dem *Ebf2*-Promotor, exprimiert, so wird in allen *Ebf2*-exprimierenden Zellen die STOP-Kassette durch homologe Rekombination entfernt. Die *cre*-Rekombinase katalysiert die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA zwischen verschiedenen spezifischen Basensequenzen, den *loxP*-Stellen. Der Vorteil dieses Systems ist, dass eine Deregulierung von *Ebf1*, 2 und 3 nicht im ganzen Tier stattfindet, sondern gewebespezifisch untersucht werden kann. Verwendet man ein Mausmodell in dem die *cre*-Rekombinase an den Östrogen-Rezeptor fusioniert ist (*creER*), kann die Expression der *cre*-Rekombinase durch das Füttern oder Injizieren von Östrogen induziert werden. Unter Verwendung eines solchen Mausmodells wäre eine gewebespezifische Deregulierung von *Ebf1*, 2 und 3 zu jedem Zeitpunkt und Alter der Maus induzierbar. Die Expression der miRNA-Schleifen kann durch die Expression von *Gfp* sichtbar gemacht werden. Diese *Gfp*-Expression ermöglicht somit auch das durchflusszytometrische Sortieren der *Ebf1*, 2 und 3-deregulierten Zellen. Zur Realisierung dieses Mausmodells wurde in dieser Arbeit das EBF-Tripel-miRNA Konstrukt in den *Rosa26* Locus muriner embryonaler Stammzellen integriert und diese zur Herstellung chimärer Mäuse verwendet. Momentan erfolgt die Verpaarung der Chimären um zu testen, ob eine Übertragung des integrierten Konstrukts in die Keimbahn stattgefunden hat.

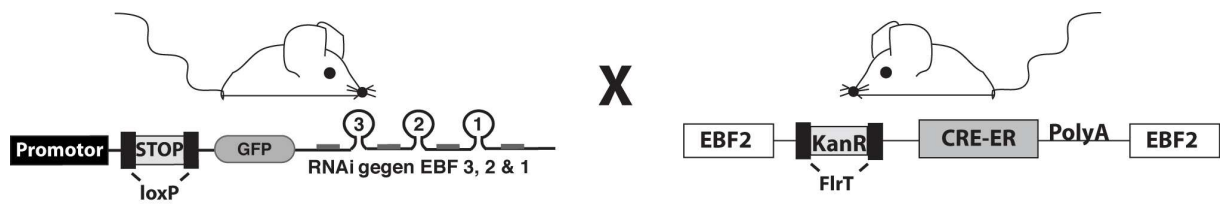


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Verwendung des EBF-Tripel-miRNA Mausmodells. Durch Kreuzung der EBF-Tripel-miRNA Maus mit einem Mausmodell, das die *cre*-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors (z.B. der *Ebf2*-Promotor) exprimiert, wird die loxP-flankierte STOP-Kassette durch homologe Rekombination entfernt. Die Expression der miRNAs und somit die Deregulierung von *Ebf1*, 2 und 3 findet dadurch gewebespezifisch statt.

3.12 Ausblick

Auf biochemischer Ebene konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Ang1* ein direktes Zielgen von EBF2 ist. Um die hier gezeigten Ergebnisse weiter zu bestätigen, soll auch durch Chromatin-Immunopräzipitation in lebenden Zellen gezeigt werden, ob EBF an den endogenen Angiogenin-Promotor bindet.

Zur weiteren Bestätigung und zur *in vivo* Lokalisierung der veränderten *Ang1*-Expression in EBF2-defizienten Mäusen sollen Methylmetacrylat-eingebettete Knochenschnitte der Maus durchgeführt werden. Durch Immunhistochemie und deren Analyse durch konfokale Mikroskopie soll der Phänotyp weiter charakterisiert werden. Durch die Tatsache, dass die Wirkung von *Ang1* hauptsächlich in Endothelzellen gezeigt wurde, könnte gleichzeitig eine Analyse der Knochenschnitte bezüglich einer veränderten Anzahl oder Morphologie an sinusoidaler Gefäße im Knochenmark durchgeführt werden (Abb. 25B).

Erste Untersuchungen der biologischen Funktion von *Ang1 in vitro*, in Kokulturversuchen mit in ihrer *Ang1*-Expression veränderten osteoblastären Zellen und primären haematopoietischen Stammzellen, zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Fähigkeit der Osteoblasten, haematopoietische Stammzellen zu unterstützen. Da es bisher auf Grund fehlender Antikörper nicht möglich war, die *Ang1*-Deregulation in osteoblastären Zellen auf Proteinebene zu untersuchen, wurden hierfür von Dr. E. Kremmer (Helmholtz Zentrum München, Institut für molekulare Immunologie) Antikörper generiert, die momentan auf ihre Funktionalität getestet werden. Optimal zur Analyse der biologischen Funktion wäre die Verwendung eines konditionalen *Ang1 knock out*-Mausmodells. Durch Kreuzung eines solchen Modells mit Mäusen, welche die *cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des *Ebf2*-Promotors exprimieren, wäre es möglich *Ang1* in *Ebf2*-exprimierenden Zellen zu deletieren und so biologische Effekte direkt *in vivo* zu untersuchen. So könnte auch eine indirekte Wirkungsweise von *Ang1* auf die haematopoietische Stammzellenanalyse analysiert werden.

Zusätzlich wäre es interessant die Expression von *Ang1* in dreifach EBF-deregulierten Zellen zu untersuchen. Ist die *Ang1*-Expression im Gegensatz zu EBF2-defizienten Zellen weiter verringert, wäre dies ebenfalls ein Hinweis auf eine redundante Wirkung der Proteine der EBF-Familie.

Des Weiteren könnte die Expression synergistischer Partner die im Zusammenspiel mit EBF die *Ang1*-Expression erhöhen, analysiert werden. Ein Augenmerk sollte hierbei zum Beispiel E-Box bindenden *helix-loop-helix* Transkriptionsfaktoren gelten, da in den Promotorregionen von *Ang1* E-Boxbindestellen identifiziert werden konnten.

Momentan wird in Kooperation mit Dr. H. Prokisch ein weiterer Illumina DNA Micro-Array durchgeführt. Die hohe Anzahl der analysierten Proben (25 unabhängige *Ebf2*^{+/-} und 25 unabhängige *Ebf2*^{-/-} Osteoblasten Präparationen aus den Hinterbeinknochen von E18,5 Embryonen) soll eine bessere statistische Auswertmöglichkeit bieten. Ziel dieser zweiten Expressionsanalyse von *Ebf2*^{+/-} und *Ebf2*^{-/-} Zellen im großen Maßstab ist es, weitere Faktoren die wichtig für den Erhalt der Stammzellnische sind, zu identifizieren.

Weiterhin findet die Verpaarung der generierten EBF-Triple-miRNA Chimären statt, um die Integration des Konstrukts in die Keimbahn zu testen. Nach einer erfolgreichen Keimbahnübertragung werden erste Analysen der dreifachen EBF-Deregulation *in vivo* durchgeführt. Durch eine Kreuzung dieses Mausmodells mit einem so genannten *cre/loxP-deleter*-Mausstamm, wäre eine generelle Depletion aller drei *Ebfs* in allen Geweben zu verschiedenen Stadien der Entwicklung oder im adulten Tier möglich. Wäre in diesen Tieren eine Verstärkung der Phänotypen bezüglich der Stammzellnische, der Knochen- und neuronalen Entwicklung zu beobachten, ist eine redundante Wirkungsweise der EBF-Proteine wahrscheinlich. Da es sich bei der hier generierten Maus um ein konditionales Modell handelt, soll in weiteren Arbeiten der Effekt der zell- bzw. gewebespezifischen Depletion von *Ebf1*, 2 und 3 untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Ausstattung

Agarosegelelektrophorese-Apparatur	Peqlab Biotechnologie GmbH
Blotting-Apparatur	Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell, BioRad
Blotting-Papier	Whatman 3mm, Schleicher & Schuell GmbH
CO ₂ -Inkubator	CB150, Binder
Kryoröhrchen	Nunc GmbH & Co KG Greiner Labortechnik Bio-One GmbH
Durchflusszytometer	FACSCalibur, BD Biosciences FACSAria, BD Biosciences
Elektroporationssystem	Gene Pulser, BioRad
Feinwaage	Sartorius
Glaswaren	Schott, Braun
Geltrockner	BioRad
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf
Inkubationsschrank	B6120 Heraeus
Kühl- und Gefriergeräte	Liebherr GmbH Privileg, Quelle
Küvetten	Uvette 220-1600nm, Eppendorf
Luminometer	Microplate Luminometer OrionII, Berthold Detection Systems
Magnetrührer	MR3000 Heidolph
Mikroskop	Axiovert25, Zeiss
Mikrowelle	Panasonic
Nitrozellulose Membranen	Protran, Whatman
PAGE-Apparatur	Mini-Protean, BioRad
PCR-Geräte	DNA Engine, BioRad
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf
Pipetten	Gilson
pH-Meter	763 Multi Calimolic, Knick
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml Eppendorf 15 ml, 50 ml Falcon PCR-Gefäße, Biozym Diagnostik GmbH
Röntgenfilme	Biomax MS Film, Kodak Medical X-Ray screen film blue sensitive, CEA
Röntgenfilmentwicklermaschine	Cawomat 2000IR, Cawo
Schüttler	Polymax1040 Heidolph Reax2 Heidolph
Spannungsquelle	Power Pack, BioRad
Sterilbank	HeraSafe KS12, Heraeus
UV-Transilluminator	San Gabriel

Vakuumpumpe	BVC 21, Vacuubrand
Wasserbäder	Sub6, Grant
Zellkulturschalen und Zellkulturflaschen	diverse, Nunc GmbH & Co KG diverse, Falcon
Zellzahl-Messgerät	CASY TTC, Innovatis
Zentrifugen	Rotina 38R Hettich Micro 200R, Hettich Eppendorf centrifuge 5424, Eppendorf

4.1.2 Enzyme

FirePol	Solis BioDyne
T4-DNA-Ligase	Invitrogen
Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer	Roche Molecular Diagnostics MBI Fermentas New England Biolabs
SuperScript Reverse Transcriptase	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Invitrogen
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	Finnzymes
DispaseII (neutral protease grade) aus <i>Bacillus polymyxa</i>	Roche
Collagenase aus <i>Clostridium histolyticum</i> Typ IA	Sigma-Aldrich
ProteinaseK	Roth

4.1.3 Western-Blot-Antikörper

Monoklonaler Anti- β -Aktin Antikörper	Klon AC-74, Sigma
Anti-FLAG M2 monoklonaler Antikörper	Sigma
Anti-EBF Klon 6G6	E. Kremmer, HMGU, R. Grosschedl
Anti-Pan-EBF, Klon 5E6-111 IgG2A	E. Kremmer, HMGU
Goat-anti-Mouse IgG (Fc-spec.) Peroxidase conjugated	Sigma
Goat-anti-Rat Peroxidase conjugated	Jackson Immuno Research

4.1.4 Längenstandards

1 kb Ladder (DNA)	Fermentas
Prestained SDS-PAGE Standard	Fermentas

4.1.5 Kits

Quick Change, Site directed mutagenesis	Stratagene
QIAprep Midiprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Tnt coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega
Random Prime Labeling Kit	Amersham Bioscience
BLOCK-iT PolII miR RNAi Expression Vector Kits	K4936-00 Invitrogen
MessageAmp TM II aRNA Amplification Kit	Illumina
Illumina® TotalPrep TM RNA Amplification Kit	Illumina
T7-Oligo(dT)24V Promoter Primer, Anchored (100 ng/μl)	Illumina

4.1.6 DNA Micro-Array

MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChip	Illumina
------------------------------------	----------

4.1.7 Plasmide

pBS II-KS (pBluescript; Fermentas)

Dieser Vektor wurde zur Klonierung von *Ebf1* und *Ebf2* verwendet und zur *in vitro* Translation mit Reticulozyten Extrakten eingesetzt.

pCMVcyto (Dr. Josef Mautner, HMGU München)

pCMVcyto wurde zur Überexpression von *Ebf1*, 2 und *E2A (E47)* in Luziferase-Reporter-Assays eingesetzt.

pBLluc5 (Dr. Ursula Zimmer-Strobl, HMGU München)

Dieses Plasmid trägt das Luziferase Gen, vor das die verschiedenen Versionen der Angiogenin1-Promotoren bzw. des Lambda5 Promotors für den Luziferase-Reporter-Assay kloniert wurden.

pCMV- β -Gal (Dr. Ursula Zimmer-Strobl, HMGU München)

Dieses Plasmid wurde zur Überexpression von β -Galaktosidase und somit zur Normalisierung der Messwerte im Luziferase-Reporter-Assay verwendet.

pcDNA3.1-Flag (Dr. Hermann Silje MPI, München)

Dieser Vektor wurde zur Überexpression von *Ebf1*, 2 und 3 und *Ang1* verwendet und zum Testen von diversen miRNA Konstrukten kotransfiziert bzw. zur *in vitro* Translation mit Reticulozyten Extrakten eingesetzt.

pcDNA6.2-GWEmGFPmiR (Invitrogen)

Dieser Vektor aus dem BLOCK-iT System wurde zur Expression von miRNAs benutzt.

MSCV-IRES-GFP (Dr. R. Moriggl)

Dieses Mouse-Stem-Cell-Virus-Plasmid wurde zur Herstellung „retroviraler Packaging“ Zelllinien verwendet.

pGAG-STOP-EGFP-Rosa –TV (Dr. M. Schmid-Supprian, MPI München)

Dieser Vektor wurde zum Targeting des *Rosa26* Locus von murinen embryonalen Stammzellen verwendet.

pGK-cre-bpA (Kurt Fellenberg, Institut für Genetik, Köln)

Dieses Plasmid trägt das Gen für die Rekombinase *Cre*, welches unter der Kontrolle des Promotors des Haushaltsgens „Phosphoglyceratkinase“ (PGK) steht. Hinter dem *Cre*-Rekombinase-Gen befindet sich eine Polyadenylierungssignalsequenz (bpA), die für die richtige Expression des Gens notwendig ist.

4.1.8 Sonden für Southern-Blot-Analysen

Rosa26-Sonde

Die 550 bp Sonde wurde aus dem Plasmid p*Rosa26*-5-pBS KS mit den Enzymen *EcoRI* und *PacI* isoliert. Waschbedingungen: Membran nach Hybridisierung 3x 10 Min. bei 58 °C in 0,2 x SSC 0,5 % SDS waschen.

GFP-Sonde

Die 723 bp Sonde wurde mit dem Enzym *DraI* aus dem Originalplasmid aus dem BLOCK-iT PolII miR RNAi Expressionsvektor Kit von Invitrogen isoliert. Waschbedingungen nach Hybridisierung: 3x 10 Min. bei 58 °C in 0,2 x SSC 0,5 % SDS waschen.

4.1.9 Oligonukleotide

4.1.9.1 Real-Time PCR Oligonukleotide

Actin F	tgt ggt ggt gaa gct gta gc	Actin R	gac gac atg gag aag atc tgg
Ang1-F-A	aac ctc acc ctg caa aga tg	Ang1-R-A	agt gga cag gca aac cat tc
Ang1-F-B	agc gaa tgg aag ccc tta ca	Ang1-R-B	gaa gtg gac agg caa acc at
Ang1P2FWD	gga gcc tct agc ttc aca cc	AngP2REV	gga gtc atc ctg agc cag ag
Ang2 F	ttt ctg caa aga tgt caa ca	Ang2 R	ggg aga cct tcc ttt gtg t
Ang3/5F	gtc ttt ttg ctg agt ctg gat gt	Ang3/5 R	cac aga tgg cct tga tgt tg
Ang4 F	atg aca atg agc cca tgt cc	Ang4 R	cag atg gcc ctg atg ttt tt
AW120700-Cdh4-F	cca tca tca cgg tga cag ac	AW120700-Cdh4-R	gag ggg tcc cca ctt atg at
Btc F	gca cag gta cca ccc cta ga	Btc R	tga aca cca cca tga cca ct
Ccbp2 F	tct tca tca cct gca tga gc	Ccbp2 R	aag atc atg gcc aag agt gg
CD34 F	acc aca gac ttc ccc aac tg	CD34 R	cgg att cca gag cat ttg at
Coll1a1 F	cac cct caa gag cct gag tc	Coll1a1 R	gtt cgg gct gat gta cca gt
D14Ert449e F	ctg ggt ccc ttc acg aag ta	D14Ert449e R	aat tgt gtt ttt ggc gct tt
EBF2 G F	tgg aga atg aca aag agc aag	EBF2 G R	ggg ttt ccc gct gtt ttc aaa
GFP F	acc tac ggc gtg cag tgc ttc agc	GFP R	gtc ctc gat gtt gtg gcg gat ctt g
Gja4 F	ggt cag cgt gct gtg taa ga	Gja4 R	gag cac cag gga gat gac tc
Gpr1 F	aca ttt cct acg tgg cct tg	Gpr1 R	aag cca aca gcc aga caa gt
Icam2 F	atc aac tgc agc acc aac tg	Icam2 R	act tga gct gga ggc tgg ta

Notch3 F	tga gtg tcc agc tgg cta tg	Notch3 R	cac agg tgc cat tgt ata gg
P1staggered1F	gga gtg aga aac aaa gct gc	P1staggeredR	ctg gac ccg gaa ctg gag gcg
P1staggered2F	tca ttc ttc tat tgc caa tcc		
P1staggered3F	cat atc ggg gac gag att cc		
P1staggered4F	caa tct gtt tgc gtg gcc		
P1staggered5F	cca ccc tcc act cct ctg c		
P1staggered6F	ggg cat cct tgg aag aat g		
P1staggered7F	aaa ccc acc ttg tct gct tg		
P2staggered1F	gga tct atg gca tat gca cag t	P2staggeredR	cta agc acg gcc ttt tgt tc
P2staggered2F	caa agt agt tcc tga agt tgg		
P2staggered3F	cag ttg cct cac tcc ttc c		
P2staggered4F	gta ttt ctg ggg gtt gga gag		
P2staggered5F	ctc cag agg atg gac aga gg		
P2staggered6F	cag gaa gct gag tag cca taa		
P2staggered7F	cag ctg gtt ttg caa ctg tg		
P2staggered8F	gca gag cag aca tgc ata att t		
Pcdh20 F	cct gga tat ggg gca tct ac	Pcdh20 R	cag cag cct cag gtc ctc
Reck F	ccc aga tta ttg ccc tga aa	Reck R	gaa ttc tcg gca gtt ggt gt
RNase4F	acc agc act agg cga gtt gt	RNase4R	ata agg cac gag caa agg aa
RNase4F	cta tgg cca gga tcg aat gt	RNase4R	ttc gtg gat gaa ggt ggt ga
RNase4P1FWD	cca aca gga agg aag gag tg	RNase4P1REV	aca ttc gat cct ggc cat ag
Sca1 F	cca tca att acc tgc ccc ta	Sca1 R	ttc ctg gca aca gga agt ct
Tmem100 F	cca cac ctg tga caa tgg ag	Tmem100 R	atg gaa cca tgg gaa ttg aa
Tmem68 F	ttg tgc tct tca tgg acc aa	Tmem 68 R	taa tgg gca ctt ttg cat ca

4.1.9.2 Oligonukleotide zur Maus-Genotypisierung

EBF2-GFP-Fwd	ggc ctg ggt tgt agt aac cat
EBF2-GFP-KO	ctg agc atg atc ttc cat cac
EBF2-GFP-REV	ttc aga gct ggt cct ctt cc
5 [^] -RosaFWD	gag ttc tct gct gcc tcc tg
CAG-Rev	tga act aat gac ccc gta att g
3 [^] -RosaRev	agg aaa ggg aaa atg cca at

EBF2-GFP PCR-Programm

Schritt 1	94°C	4 min
Schritt 2	94°C	30 sec
Schritt 3	62°C	30 sec
Schritt 4	72°C	1 min
Schritt 2-4		32 Zyklen
Schritt 5	72°C	5 min

RosaTripleMiRNA PCR-Programm

Schritt 1	95°C	5 min
Schritt 2	94°C	45 sec
Schritt 3	60°C	45 sec
Schritt 4	72°C	1 min
Schritt 2-4		33 Zyklen
Schritt 5	72°C	10 min

4.1.9.3 Oligonukleotide für Klonierungen

XhoI+2-Ebf1-fwd	ccc ctcgag ca atg ttt ggg atc cag gaa agc	<i>Ebf1</i> Klonierung mit N-terminalem Flag Tag
XhoIEbf1-rev	ccc ctcgag tca cat ggg agg gac aat cat g	<i>Ebf1</i> Klonierung mit N-terminalem Flag Tag
XhoI+2-Ebf2-fwd	ccc ctcgag ca atg ttt ggg att caa gat acg c	<i>Ebf2</i> Klonierung mit N-terminalem Flag Tag
XhoI-Ebf2-rev	ccc ctcgag tta cat cgg ggg aac aac aag	<i>Ebf2</i> Klonierung mit N-terminalem Flag Tag
BamHI+2-Ebf3-fwd	ccc ggatcc ca atg ttt ggg att cag gag aat att c	<i>Ebf3</i> Klonierung mit N-terminalem Flag Tag
XhoI-Ebf3-rev	ccc ctcgag tca cat ggg cgg gac tac cag	<i>Ebf3</i> Klonierung mit N-terminalem Flag Tag
DraI-Tomatoe-F	ccc tttaaa atg tcc gtg agc aag ggc gag ga	dsTomatoe Klonierung in MSCVmiRNA
DraI-Tomatoe-R	ccc tttaaa tta ctt gta cag ctc gtc cat g	dsTomatoe Klonierung in MSCVmiRNA
XhoI-Tomatoe-F	ccc ctcgag agc aat tcc tgc agc ccg at	dsTomatoe Klonierung in MSCV- IRES
SaII-Tomatoe-R	gat t gtcgac gc ggc cgc	dsTomatoe Klonierung in MSCV- IRES

HindIII-Ang1Promotor1F-I	ccc aagctt tcc ttc ttg cct gcc tac at	<i>Ang1</i> -Promotor1 Klonierung in pBLLuc5
BamHI-Ang1Promotor1-R-I	ccc ggatcc cac tcc ttc ctt cct gtt gg	<i>Ang1</i> -Promotor1 Klonierung in pBLLuc5
HindIII-Ang1Promotor1F-II	ccc aagctt tgc ttg gtc tag ggg tat gat tct cgc ttt	<i>Ang1</i> -Promotor1 Klonierung in pBLLuc5
BamHI-Ang1Promotor1-R-II	Ccc ggatcc tgg gtg agg tgc gcg ttg cct ggc cac gca	<i>Ang1</i> -Promotor1 Klonierung in pBLLuc5
HindIII-Ang1Promotor2-F-I	ccc aagctt gtg cag tct tcc cca agt gt	<i>Ang1</i> -Promotor2 Klonierung in pBLLuc5
HindIII-Ang1Promotor2-F-II	Ccc aagctt Cat gta tgt ctg tgt acc aca c	<i>Ang1</i> -Promotor2 Klonierung in pBLLuc5
XhoI-Ang1Promotor2R	ccc ctcgag tcc tcc gac tgg gaa tgt g	<i>Ang1</i> -Promotor2 Klonierung in pBLLuc5
HindIII-Lamda5-Fwd	ccc aagctt cag aga ctc ttg ttc cat gg	Lamda5 Klonierung in pBLLuc5
XhoI-Lamda5-Fwd	ccc ctcgag tct agc ctc act tgc agt gta	Lamda5 Klonierung in pBLLuc5
Sal-Ebf2-F	ccc gtcgac atg ttt ggg att caa gat acg c	<i>Ebf2</i> Klonierung in pCMVcyto
Not-Ebf2-R	ccc gcggccgc t tac atg ccg gga aca aca ag	<i>Ebf2</i> Klonierung in pCMVcyto
SalI-E2A-F	ccc gtcgac atg atg aaccag tct cag aga	<i>E2A</i> Klonierung in pCMVcyto
NotI-E2A-R	ccc gcggccgc t cacagg tgc ccg gct gg	<i>E2A</i> Klonierung in pCMVcyto
EcoRI+2-Ang1-Fwd	ccc gaattc ca atg gcg ata agc cca ggc cc	<i>Ang1</i> Klonierung mit N-terminalem Flag Tag
XhoI-Ang1-Rev	ccc ctcgag cta tag act gaa aaa cga ctc atc	<i>Ang1</i> Klonierung mit N-terminalem Flag Tag
AscI-Linker-Kozak-ATG-TriplemiRNA-GFP-F	ggc ggcgcgcc g ttt aaa ctt ggc tca ttc tga tct agc cgc cac cat ggt gag caa ggg cga gg	EmGFPtriplemiR Klonierung in ROSA26-TV
SacIXmaI-TriplemiRNA-Rev	cg gagctc cccggg c tag ata tct cga gtg cgg cca g	EmGFPtriplemiR Klonierung in ROSA26-TV

4.1.9.4 Oligonukleotide zur Gelretardierung

MB1 F	ccc cga ccc cac gca cta gag aga gac tca agg gaa ttg tgg
MB1 R	ccc tgc acc tgg gct ggc cac aat tcc ctt gag tct ctc tc
Ang1Prom1F	ttc tag att cct gaa gct ccc cag ggg aga acc ttc cag ggg ag
Ang1Prom1R	aag acc ctg gaa ggt tct ccc ctg gaa ggt tct ccc ctg ggg ga
Ang1Prom1AmutF	ttc tag att cct gaa gct ATA cag ggg aga acc ttc cag ggg ag

Ang1Prom1AmutR	aag acc ctg gaa ggt tct ccc ctg gaa ggt tct ccc ctg TAT ga
Ang1Prom1BmutF	ttc tag att cct gaa gct ccc cag ggg aga acc ttc cag ATA ag
Ang1Prom1BmutR	aag acc ctg gaa ggt tct TAT ctg gaa ggt tct ccc ctg ggg ga
Ang1Prom1ABmutF	ttc tag att cct gaa gct ATA cag ggg aga acc ttc cag ATA ag
Ang1Prom1ABmutR	Aag acc ctg gaa ggt tct TAT ctg gaa ggt tct ccc ctg TAT ga
Ang1Prom2F	cca cac ata tgc aat gcc cag gga g
Ang1Prom2R	tgc ctt cat ctg gtc tcc ctg ggc at
Ang1Prom2mutF	cca cac ata tgc aat gAT Aag gga g
Ang1Prom2mutR	tgc ctt cat ctg gtc tcc ctT ATc at

4.1.9.5 miRNA-Oligonukleotide

Ang1-mi1-F	tgctgttcacagtatctgtcgtcccggtttggccactgactgaccgggacgagatactgtgaa
Ang1-mi1-R	cctgttcacagtatctcgtcccggtcagtcagtgccaaaaccgggacgacagatactgtgaac
Ang1-mi2-F	tgctgatacgttcacagtatctgtcggtttggccactgactgaccgacagattgtgaacgtat
Ang1-mi2-R	cctgatacgttcacaatctgtcggtcagtcagtgccaaaaccgacagatactgtgaacgtatc
EBF1-mi1.1-F	tgctgaaaggcagtcctctcaatctcgttttggccactgactgacgagattgaggactgccttt
EBF1-mi1.1-R	cctgaaaggcagtcctcaatctcgtcagtcagtgccaaaaccgagattgagaggactgcctttc
EBF1-mi1.2-F	tgctgatctgagggagtctcatttcggttggccactgactgaccgaaatgactccctcagat
EBF1-mi1.2-R	cctgatctgagggagtctcatttcggtcagtcagtgccaaaaccgaaatgagactccctcagatc
EBF2-mi2.1-F	tgctgattcctcaagttgaaggaggttggccactgactgacctcctcactgaggaaat
EBF2-mi2.1-R	cctgattcctcaagtgaggaggtcagtcagtgccaaaacctcctcaactgaggaaatc
EBF2-mi2.2-F	tgctgttggtgacagagtcgatgaggttggccactgactgacctcatcgactgtcacaaa
EBF2-mi2.2-R	cctgttggtgacagtcgatgaggtcagtcagtgccaaaacctcatcgactctgcacaaaac
EBF3-mi3.2-F	tgctgattaagggcagtgtagacaaagtttggccactgactgactttgtctactgccctaat
EBF3-mi3.2-R	cctgattaagggcagtagacaaagtcagtcagtgccaaaactttgtctactgccctaatc
EBF3-mi3.5-F	tgctgtctggaagccgtaactctatgggttggccactgactgacctatagatcggcttcaga
EBF3-mi3.5-R	cctgtctggaagccgatctatgggtcagtcagtgccaaaacctatagattacggcttcagac

4.1.10 Bakterien

XL-1blue

Escherichia coli-Stamm

Genotyp: F⁺:Tu10 proA+B⁺ lacI^q D (lacZ) M15/recA1 end A1 gyr A96 (Nal^r) thi hsd R17 (rk-mk⁺) glu V44 rel A1 lac. Der Originalbakterienstamm wurde von der Firma Stratagene bezogen.

DH5 α

Escherichia coli-Stamm;

Genotyp: F⁻, ϕ dlacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁻), supE44, thi-1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF)U169, λ ⁻

4.1.11 Zelllinien

HEK293T-Zellen

Transformierte fibroblasten ähnliche Zelllinie die aus humanen embryonalen Nierenzellen gewonnen wurde.

GP+E86

Murine retrovirus-verpackende Zelllinie

Ba/F3

Il-3 abhängige murine pro B-Zelllinie, die in dieser Arbeit für Luziferase-Reporter-Assays verwendet wurde.

WEHI-3B

Il-3 produzierende makrophagen-ähnliche myelomonocytische Zelllinie. Der Überstand dieser Zelllinie wird für die Kultur von Ba/F3 Zellen benötigt.

70Z/3

Murine pre-B-Zelllinie

AFT024

Immortalisierte murine Stroma-Zelllinie; wurde durch ihre stammzellunterstützende Fähigkeit als Positivkontrolle in Kokulturversuchen eingesetzt. Zur Verfügung gestellt von Kateri Moore, Princeton University.

2018

Immortalisierte murine Stroma-Zelllinie; wurde durch ihre nicht stammzellunterstützende Fähigkeit als Negativkontrolle in Kokulturversuchen eingesetzt. Zur Verfügung gestellt von Kateri Moore, Princeton University.

CH3T101/2

Murine mesenchymale Osteoblasten-ähnliche Zelllinie.

MC3T3

Murine Osteoblasten-ähnliche Zelllinie.

IDG3.2 embryonale Stammzellen

F1 ES Zellen (C57BL/6 x 129). Zur Verfügung gestellt von Dr. Ralf Kühn, Helmholtz Zentrum Neuherberg.

Embryonale Fibroblasten (EF-Zellen)

EF-Zellen wurden aus Mäusen des Neomycin-resistenten Stammes pSV2neo,PEP-II4 präpariert und von Dr. Ralf Kühn, Helmholtz Zentrum Neuherberg für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

4.1.12 Mausstämme

C 57BL/6 (Charles River, WIGA)

Dieser Mausstamm wurde zur Verpaarung der EBF2-GFP transgenen Mäuse verwendet, um ein Wildtyp Allel zu erhalten.

EBF2-GFP

Durch das Ersetzen von 5 Exons, die für die ersten 162 Aminosäuren kodieren, mit einer tauGFPpA-Reporterkassette wurde der *Ebf2* Locus deletiert. Der Mausstamm wurde von Dr. Randall R. Reed zu Verfügung gestellt

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle Standardmethoden molekularbiologischer Laboratorien, die hier nicht weiter erläutert werden, wurden wie bei (Sambrook *et al.*, 2001) beschrieben durchgeführt. Bei kommerziellen Produkten wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen.

4.2.1.1 Arbeiten mit RNA

4.2.1.1.1 RNA-Isolierung aus Säugerzellen

Zur Gesamt-RNA Isolierung aus humanen und murinen Zellen wurden diese bei 200g, 4°C ca. 6 min abzentrifugiert und nach vorherigem Waschen mit PBS in 1ml Trizol (Peqlab) pro 1×10^6 Zellen resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,2 ml Chloroform und anschließendem Mischen der Reagenzien folgte ein Inkubationsschritt für 5 min bei 15-30 °C. Die durch das Reagenz aufgeschlossenen Zellen wurden für 15 Minuten bei 4 °C und 12000 x g abzentrifugiert. Die in der wässrigen Phase befindliche RNA wurde in ein neues Gefäß überführt und durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol und 10 min Inkubation auf Eis gefällt und danach bei 12000 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und nochmals bei 7500 x g für 5 min zentrifugiert, getrocknet und in 10µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die so gewonnene RNA wurde zur Synthese von cDNA eingesetzt.

4.2.1.1.2 Herstellung von cDNA mittels RT-PCR

Zur Einzelstrang-cDNA-Synthese wurde SuperScript II RT (Reverse Transkriptase) von Invitrogen benutzt. Hierfür wurden 1µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (500 µg/ml), 1 ng bis 5µg Gesamt-RNA und 1 µl dNTP Mix (jeweils 10 mM) mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt, 5 min bei 65 °C erhitzt und auf Eis rasch abgekühlt. Danach folgte die Zugabe von 4 µl 5x First-Strand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNaseOUT (40 Units/µl). Der Ansatz wurde für 2 min bei 42 °C inkubiert, anschließend wurde 1µl (200 units) SuperScript II RT zupipettiert. Die reverse Transkription erfolgte bei 42 °C für 50 min. Darauf folgend wurde

die Reaktion bei 70 °C für 15 min inaktiviert. Die gewonnene cDNA wurde in die quantitative PCR eingesetzt.

4.2.1.1.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) mit der LightCycler-Methode nach Roche ist eine PCR-Reaktion, die mit einer „Faststart“ Taq DNA-Polymerase und dem dsDNA-spezifischem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green1 arbeitet. Die Taq-Polymerase ist mit hitzelabilen Blockgruppen modifiziert und so bei Raumtemperatur inaktiv. Erst durch Erhitzen auf 95°C wird die Reaktion gestartet. SYBR Green 1 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch in die kleine Furche der dsDNA interkaliert und dessen Fluoreszenz durch diese Bindung um das 100-fache gesteigert wird. So können die bei der Amplifikation entstehenden Produkte mittels ihrer Fluoreszenz detektiert werden. Die Fluoreszenz wird am Ende jeder Elongationsphase gemessen, was die Kontrolle der Zunahme der DNA-Mengen in „Echt-Zeit“ erlaubt. Die Menge an amplifizierter DNA gibt einen Hinweis darauf, wie viel cDNA zu Beginn in der untersuchten Probe war, die mit den gewählten Primern erkannt werden konnte. Zur Überprüfung der Spezifität wird das amplifizierte Produkt aufgeschmolzen und es ergibt sich eine spezifische Schmelztemperatur. Zusätzlich kann das Produkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden und seine Spezifität anhand der Größe ermittelt werden.

Für die LightCycler Reaktion wurde abweichend vom Protokoll (FastStart DNA Master SYBR Green, Roche) nur 1µl cDNA in einem Reaktionsvolumen von 10µl eingesetzt. Die Primer für diese Methode waren - soweit möglich - exonübergreifend, um zu vermeiden, dass eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA Amplifikationsprodukte bilden. Die benutzten Primer-Oligonukleotide wurden bei Metabion (München) bezogen. Die PCR-Reaktionen wurden in Glaskapillaren (Roche) in einem LightCycler (Roche) mit folgender Temperaturabfolge in 40 Zyklen durchgeführt

Denaturierung der DNA

und Aktivierung der Polymerase	95 °C	für 10 min
Zyklische Denaturierung	95 °C	für 1 s
Zyklische Anlagerung	60-65 °C	für 10 s
Zyklische Verlängerung	72 °C	für 4 s pro 100 bp
Aufschmelzen	65 °C	in 10 s
Abkühlen	40 °C	für 30 s

Die entstandenen PCR-Produkte wurden zur Erstellung einer Eichgerade seriell verdünnt, um später die Effizienz dieser PCR-Reaktion errechnen zu können. Folgende Verdünnungsserie wurde erstellt: 10^{-3} ; 10^{-5} ; 10^{-7} ; 10^{-9} und Wasser als Negativkontrolle. Während der Amplifikation nimmt die Fluoreszenz des Reaktionsansatzes mit steigender Zykluszahl zu. Diese Fluoreszenzzunahme wird von dem LightCycler gemessen und eine Kurve erstellt. Das LightCycler-Programm ermittelt aus dieser Amplifikationskurve den crossing point (Cp). Dieser gibt die Anzahl der Zyklen an, die nötig sind um eine definierte Menge an PCR-Produkt zu erzeugen.

Um die Menge an Zieltranskript quantifizieren zu können, wurde die relative Quantifizierungsmethode angewendet, die auf der relativen mRNA-Expression eines Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen basiert. Die Expression der Gene wurde auf Aktin standardisiert.

4.2.1.2 Arbeiten mit DNA

4.2.1.2.1 DNA Isolation

4.2.1.2.1.1 Isolation von Plasmiden aus Bakterien

Plasmid DNA wurde für Klonierung und Transfektion mit Hilfe des „Quiagen Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

4.2.1.2.1.2 Isolation von genomischer DNA aus Mausschwanzzellen

Den Mäusen wurde ein etwa 0,3 cm langes Stück des Schwanzes abgeschnitten und über Nacht in 100 µl Lysepuffer (1x FirePol Puffer B von Solis BioDyne; 1,25 mM MgCl₂, 50 µg/ml ProteinaseK) bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 95°C inkubiert, um die ProteinaseK zu inaktivieren. Zur Genotypisierung wurde von der so gewonnenen cDNA 0,7 µl in die PCR-Reaktion eingesetzt.

4.2.1.2.1.3 Isolation von genomischer ES-Zell-DNA im 96-Loch-Format

Für die Präparation der ES-Zell-Klone aus 96-Loch-Platten wurden diese bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und je Loch 50 µl Lysepuffer (10 mM Tris pH7,4 , 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % SDS, 1 mg/ml ProteinaseK) zugegeben. Die Platten wurden dann in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 56 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag bei Raumtemperatur für 30 Minuten abgekühlt. Anschließend wurden 100 µl 100 %-Ethanol je Loch zugesetzt, um die DNA zu präzipitieren. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Die DNA wurde dann noch zweimal mit 100 µl 75 %-Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und direkt in (35 µl/Loch) der vorbereiteten Lösung für den darauf folgenden Restriktionsverdau resuspendiert.

4.2.1.2.1.4 Isolation von genomischer DNA von ES-Zellen aus 10 cm Platten

Zur Präparation der genomischen DNA von ES-Zell-Klonen in größeren Mengen wurden die Klone auf 10-cm-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in Lysepuffer (10 mM Tris pH7,4 , 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % SDS, 1 mg/ml ProteinaseK) aufgenommen. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden dann die sich von der Unterlage lösenden Zellen mit einer Pipette in Falcon-Röhrchen überführt und bei 56 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die DNA über eine Ethanol-Präzipitation isoliert.

4.2.1.2.2 DNA Fällung und Reinigung

4.2.1.2.2.1 Phenol Extraktion

Mit dieser Methode können Proteinkontaminationen in der DNA-Lösung beseitigt werden. Die DNA-Lösung wurde auf ein Minimalvolumen von 200 µl gebracht und anschließend mit einem Volumen TE-gesättigtem Phenol (pH 8,0) versetzt. Nach dem Vermischen der Lösungen durch starkes Schütteln wurde die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 9000 x g für 5 Minuten erzielt. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform versetzt. Durch zweiminütiges starkes Schütteln wurden die Lösungen

vermischt und wiederum wie oben zentrifugiert. Die DNA in der oberen wässrigen Phase wurde anschließend durch Ethanol-Präzipitation gefällt.

4.2.1.2.2 Ethanol Präzipitation

Der gelösten DNA wurde zunächst 1/10-Volumen 3 M NaAc und 2 ½ Volumen 100 % EtOH zugesetzt. Danach wurde die Probe für 20 Minuten bei -20 °C inkubiert und anschließend mit 9000 x g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgossen, die DNA mit 3 Volumen 70% EtOH gewaschen und wiederum bei 9000 x g zentrifugiert, getrocknet und anschließend in H₂O oder in 10 mM Tris-Puffer (HCl) pH 7 aufgenommen.

Techniken der DNA-Analyse

4.2.1.2.3 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurde unter den vom Hersteller vorgeschlagenen Bedingungen und Puffern durchgeführt.

4.2.1.2.3.1 Enzymatische Spaltung genomischer DNA aus ES-Zellen

Bei der Spaltung von genomischer DNA aus Zellen, die direkt in 96-Loch-Platten präpariert wurden, wurde die DNA direkt nach der Fällung in 35 µl Restriktionslösung (Spermidin 1 mM, DTT 1 mM, BSA 100 µg/ml, RNase 50 µg/ml, Puffer (10X) 1/10 Volumen, Enzym 50 U/Loch) aufgenommen und die Platten, nach der Versiegelung mit Parafilm, in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für die Spaltung genomischer DNA, die bereits gelöst war, wurden 5-10 µg DNA mit 50-60 µl Restriktionslösung bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.2.1.2.4 Southern-Blot nach Southern, E.M.

Durch die von Southern entwickelte Methode ist es möglich, die in einem Agarosegel durch elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennte DNA auf eine Membran zu transferieren. Durch das anschließende Hybridisieren der fixierten DNA auf der Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde ist es möglich, spezifische DNA-Fragmente als Banden auf der Membran zu detektieren. Dabei ist die Spezifität des Nachweises von der Spezifität der Sonde abhängig, die einem Teil der nachzuweisenden Region komplementär ist.

Die mit Restriktionsenzymen gespaltene DNA wurde nach Zugabe von 1/10 Ladepuffer auf ein 0,8-1 % Agarosegel (Ethidiumbromid 5µg/ml) aufgetragen. Um später die Größe der

detektierten Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen (7,5 ng 1 kb DNA-Leiter). Nach der Auftrennung der DNA im Gel durch Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 2001) wurde dieses zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Anschließend wurde das Gel für 20 Minuten in 0,25 N HCl auf dem Schüttler geschwenkt. Danach wurde es kurz mit Wasser gewaschen und 40 Minuten in dem alkalischen Transferpuffer (0,4 M NaOH; 0,6 M NaCl) inkubiert. Anschließend wurde der Blot aufgebaut. Auf einen Stapel mit Papiertüchern wurden drei trockene Whatman-Papiere gelegt, danach ein weiteres in Transferpuffer getränktes und anschließend die ebenfalls in Puffer angefeuchtete Nylon-Membran Hybond-N (Millipore). Anschließend wurde das Gel auf die Membran gelegt und mit drei weiteren angefeuchteten Whatman-Papieren zugedeckt. Zum Schluss wurde die Verbindung zum Transferpuffer-Reservoir über zwei lange angefeuchtete Whatman-Papiere hergestellt und der ganze Aufbau mit einer Glasscheibe abgedeckt. Nach 4-16 Stunden wurde der Blot abgebaut, die Position der Geldaschen markiert und die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt. Danach wurde die DNA 1 h bei 80 °C gebacken auf dieser fixiert. Danach konnte der Blot für die Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde vorbereitet werden.

4.2.1.2.4.1 Hybridisierung der Southern-Blot-Membran

Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurden die Membranen prähybridisiert. Der Blot wurde dazu in 2x SSC (0,3 M NaCl; 0,03 M NaCitrat) angefeuchtet und in einem Glaszylinder in vorgewärmtem Church-Puffer (0,4 M Na₂HPO₄; 0,1 M NaH₂PO₄; 7 % SDS; 1 mM EDTA) für mindestens 1 Std. bei 65 °C im Hybridisierungsofen, inkubiert.

4.2.1.2.4.2 Markierung der Sonde

Es wurden jeweils 50-100 ng Sonden-DNA mit 50 µCi ³²P-α32-dCTP mit Hilfe des „Random Prime Labeling Kit“ (Amersham Bioscience; Freiburg) nach Firmenprotokoll markiert. Anschließend wurde die markierte Sonde mit Hilfe einer G50 Sephadex Säule (Amersham Bioscience; Freiburg) nach Firmenprotokoll gereinigt. Danach wurde die Probe durch fünfminütige Inkubation bei 100 °C denaturiert und der Hybridisierungslösung beigemischt. Die Membran wurde anschließend 16 Std. bei 65 °C im Hybridisierungsofen inkubiert und anschließend mit vorgewärmtem Waschpuffer (0,2 x SSC, 0,5 % SDS) bei 58 °C gewaschen. Die markierten Banden auf der Membran ließen sich im Anschluss mit einem fotosensitiven Film (Biomax MS PE Applied Biosystems 35x43 cm, KODAK Film) nachweisen. Die

radioaktive Sonde konnte bis zu zwei Wochen aufgehoben und nach zehnmütigem Aufkochen wieder verwendet werden.

4.2.1.2.4.3 Entfernen der Sonde

Es ist möglich, eine Membran mit verschiedenen Sonden zu hybridisieren. Zur Vermeidung von überlappenden Signalen wurde die alte noch an die Membran gebundene Sonde abgewaschen. Dazu wurde der Blot für ca. 20 Min. in 95 °C heiße, 0,1 % SDS Lösung gegeben und langsam auf 51 °C abgekühlt. Mit Hilfe des Phosphoimagers (Fuji Bas 1000, Japan) wurde untersucht, wie gut die alte Sonde entfernt wurde. Anschließend konnte die Membran wie üblich für die Hybridisierung verwendet werden.

4.2.1.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion wird ein spezifisches DNA-Molekül amplifiziert, wobei die entstehenden Produkte durch die verwendeten Primer definierte Enden besitzen. Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Nukleotidsequenzen, an die je ein Desoxyoligonukleotidprimer binden kann.

Die Polymerase Kettenreaktion setzt sich prinzipiell aus drei Schritten zusammen:

1. Denaturierung der Doppelstrangmatrize zu zwei Einzelsträngen bei 95 °C
2. Anlagerung der Oligonukleotide an die komplementäre Matrizensequenz. Dieser Schritt wird mit der für die Oligonukleotide berechneten Anlagerungstemperatur (T_A) durchgeführt, die wiederum von der Nukleotidsequenz abhängt.
3. Extension der angelagerten Primer bei 72 °C. Die benötigte Zeit richtet sich nach der Amplifikatlänge. Dabei werden für 500 bp/30 sec gerechnet.

Die Anlagerung der Oligonukleotide ist sowohl von der spezifischen Sequenz und damit von der Anlagerungstemperatur, als auch von der vorhandenen Mg^{2+} -Konzentration abhängig. Aus diesem Grund wurde darauf geachtet, dass gemeinsam verwendete Oligonukleotide eine ähnliche Anlagerungstemperatur besitzen. Außerdem wurde eine vom Hersteller empfohlene Standard- Mg^{2+} -Konzentration gewählt, bei der alle Primer mit der Matrize hybridisieren.

4.2.1.2.6 Punktgerichtete Mutagenese

Punktmutagenese wurde mit der „Quickchange“ Methode von Stratagene nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

4.2.1.3 Arbeiten mit Proteinen

4.2.1.3.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen für Western-Blot

Für die Isolation von Proteinen wurden mindestens 1×10^6 Zellen für 4 min bei 1200 rpm sedimentiert und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 20 μ l 2 x Laemmli-Puffer (4% SDS; 20% Glycerin; 250 mM Tris pH 6,8; 5% β -Mercaptoethanol; 0,01% Bromphenolblau) pro 10^6 Zellen lysiert und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Falls erforderlich wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

4.2.1.3.2 Extraktion von Kernproteinen aus Säugerzellen für Gelretardierung

Für die Extraktion der Kernproteine aus 70Z/3-Zellen oder primären und im Anschluss kultivierten *Ebf2*-exprimierenden Zellen wurden 2×10^7 Zellen geerntet, gewaschen, sedimentiert und in 0,2 ml in Puffer A (10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF (eine Tablette Roche Complete/10 ml)) für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 12,5 μ l NP40 zugesetzt, welches spezifisch die Zellmembranen aufbricht, jedoch die Kernmembran nicht beeinflusst. Die Proben wurden dann bei 4°C für 5 Minuten bei höchster Geschwindigkeit geschüttelt (Vortexer) und anschließend die Zellkerne durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 15000 rpm und 4°C sedimentiert und nochmals mit 1,5 ml Puffer A gewaschen. Die Zellkerne wurden dann in 40 μ l Puffer C (20 mM HEPES pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT (frisch zugesetzt); 1 mM Proteinaseinhibitoren (frisch zugesetzt)) aufgenommen. Anschließend wurden sie wieder bei 4 °C für 30 Minuten geschüttelt (Vortexer) und abermals bei 15000 rpm und 4 °C für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand, der die Kernproteine enthielt, wurde dann aliquotiert, und nachdem die Proteinkonzentration bestimmt worden war, in flüssigem Stickstoff eingefroren oder für die Bindereaktionen eingesetzt.

4.2.1.3.3 *In vitro* Translation von Proteinen

In vitro translatierte Proteine für Gelretardierungsanalysen wurden mit Hilfe von Reticulocytensystemen hergestellt. Hierfür wurde nach dem Protokoll von „TnT-gekoppelten Reticulocytensystemen“ von Promega vorgegangen.

4.2.1.3.4 Proteinextraktion von Säugerzellen für Luziferase-Reporter-Assays

24 bis 48 h nach Kotransfektion der Zellen mit einem Luziferase-Reporter Konstrukt vor das der zu untersuchende Promotor kloniert wurde, einem Überexpressionsvektor für das zu untersuchende Protein und einem β -Galaktosidase Reporter, der zur Standardisierung des Tests dient, wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und sedimentiert. Entsprechend der Sedimentgröße wurden die Zellen in 50 – 100 μ l 1 x Luziferase-Extraktionspuffer (10% Glycerin; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl pH 7,8; 2mM DTT) aufgenommen und 10 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde 15 min bei 4 °C und 15300 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.1.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Erstellen der Eichkurve:

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde zuerst eine Eichkurve erstellt. Dazu wurde BSA in den Konzentrationen 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 μ g Protein/ml verwendet. Die Proteinlösung wurde mit dem zur Lyse der Zellen verwendeten Puffer auf 100 μ l gebracht, dies mit 1 ml Bradfordreagenz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) welches 1:4 mit Wasser verdünnt war, versetzt und 5-30 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die OD bei 595 nm photometrisch bestimmt. Auf Grund dieser Daten wurde eine Eichkurve erstellt und darauf beruhend bei der Probenmessung die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

Probenbehandlung:

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration eines Zellextraktes wurden 5 μ l der Probe verwendet. Diese wurden mit dem verwendeten Lysispuffer 1:10 verdünnt und davon 10 bzw. 2 μ l zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Die beiden Aliquots wurden mit Lysispuffer auf ein Volumen von 100 μ l gebracht und mit 1000 μ l 1:4 verdünntem Bradfordreagenz

versetzt, die gleiche Zeit als die Proben der Eichkurve inkubiert und anschließend die OD bei 595 nm gemessen. Die vom Photometer ermittelte Konzentration wurde mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

4.2.1.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen nach Lämmli

Zur Auftrennung von Proteinen aus Zellextrakten wurde die diskontinuierliche SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (Lämmli, 1970) verwendet. Durch das Aufkochen der Proben in Laemmli-Puffer wurden die enthaltenen Proteine denaturiert und die erneute Faltung durch das Detergenz SDS verhindert, welches die Eigenladung der Proteine überlagert, so dass alle Proteine negativ geladen sind. Die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten wurden durch β -Mercaptoethanol reduziert.

Das Acrylamidgel bestand aus einem Sammelgel (250 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 5% Acrylamid/Bisacrylamid), das der Fokussierung der geladenen Proteine dient und einem Trenngel (375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 10 - 15% Acrylamid/Bisacrylamid), das die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse ermöglicht. Die vorbereiteten Proben wurden auf das mit 1x Laufpuffer (25 mM Tris; 1% SDS; 192 mM Glycin) überschichtete Gel aufgetragen. Für den Größenvergleich wurde ein Proteinstandard mitgeführt. Die Elektrophorese wurde in einer Bio-Rad Vorrichtung bei 100 V durchgeführt.

4.2.1.3.7 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellululose (Western-Blot nach Towbin *et al.*, 1979)

Der Transfer der im SDS-PAA-Gel aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Nitrozellulosemembran erfolgte nach der „semi-dry“ Methode in einer Trans-Blot SD Transferkammer von BioRad bei 10V, 300 mA für 1h. Vor dem Blotvorgang wurde die Nitrozellulosemembran (Hybond-P, Amersham) mit Blotting-Puffer (20% Ethanol; 80% 1 x SDS-Laufpuffer) angefeuchtet. Nach dem Blotten wurde die Membran mit Ponceau S (2 % Ponceau S, 30 % Trichloressigsäure, 30 % Sulfosalicylsäure) gefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen. Vor der Inkubation des ersten Antikörpers wurden die Membranen mit transferierten Proteinen 1 h in PBS mit 5% Magermilch blockiert.

4.2.1.3.8 Immundetektion von Proteinen

Proteine können mit spezifischen Antikörpern auf der Western-Blot-Membran nachgewiesen werden. Der Proteinnachweis erfolgt über zwei Antikörper. Der Erstantikörper bindet spezifisch das gesuchte Protein und mit Hilfe des Zweitantikörpers, der den Erstantikörper spezifisch bindet, wird das Protein mittels einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Der Zweitantikörper ist an die Meerrettich (horseradish)-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazides Luminol katalysiert. Das oxidierte Luminol emittiert Licht, welches durch die Exposition eines lichtsensitiven Filmes (Hyperfilm ECL, Amersham) nachgewiesen werden kann. Die Chemolumineszenz wird verstärkt, indem die Oxidation von Luminol durch HRP in Anwesenheit eines chemischen Verstärkers wie Phenol durchgeführt wird.

Die Membran wurde mit dem Erstantikörper, der in einer 5%-Milchpulver-Lösung verdünnt wurde, über Nacht inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper, der in einer 5 % Milchpulver-PBS-Lösung verdünnt wurde, für 1 bis 3 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran wieder dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde mit dem ECL-Detektionsreagenz (Amersham) die Chemolumineszenz-Reaktion angeregt. Die Membran wurde auf einen Film aufgelegt und der Film anschließend in einer Entwicklungsmaschine entwickelt. Die für die Immundetektion verwendeten Antikörper sind weiter oben aufgelistet.

4.2.1.4 Illumina Oligonukleotid-Micro-Arrays

Die Verwendung von „Oligonukleotid Micro-Arrays“ (MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChip, Illumina) ermöglicht die gleichzeitige Analyse der Expression tausender Transkripte. Hierzu werden Biotin-markierte cRNAs mit einem Genchip hybridisiert, der aus einem Glassubstrat besteht und auf dem jedes einzelne Gen durch ein oder mehrere Proben-Sets repräsentiert wird. Jedes Proben-Set besteht aus durchschnittlich 30 Probenpaaren. Die Intensitäten jedes einzelnen Probenpaares werden dazu verwendet, eine qualitative und quantitative Expressionsmessung durchzuführen. Werden die Expressionsdaten mit denen eines Kontrollchips verglichen, so kann eine Aussage über die relative Abundanz eines Transkripts gemacht werden. Die Oligonukleotid-Proben werden auf der Basis von Standard-Hybridisierungskriterien ausgewählt, wobei jedoch 3'-Bereiche eines Gens bevorzugt werden, da diese während der cDNA-Synthese zuverlässiger synthetisiert werden. Die Probenpaare eines Proben-Sets sind aus statistischen Gründen über den gesamten Chip verteilt.

4.2.1.5 Zellkultur

4.2.1.5.1 Allgemeine Zellkultur Techniken

Die beschriebenen Methoden halten sich an leicht abgewandelte Protokolle von Torres und Kühn (1997) sowie Pasparakis und Kollias (1995). Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Umluft-Sterilbank (Heraeus, Düsseldorf) und unter Verwendung steriler Pipetten sowie Lösungen durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei Zentrifugationsschritten bei 1200 rpm für 6 Minuten zentrifugiert. Für die Waschschriffe wurde steriles PBS (Gibco) verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank (Binder) bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verschiedenen Zelltypen wurden in an diese Zellen angepassten Medien kultiviert. Das Medium wurde bei embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) jeden Tag gewechselt, bei embryonalen Fibroblastenzellen (EF-Zellen) jeden zweiten Tag. Um bei adhärenenten Zellen eine gute Festsetzung zu gewährleisten, wurden die Zellkulturplatten teilweise mit Gelatine beschichtet. Dazu wurden die Platten 15 Minuten mit einer Gelatinelösung inkubiert (2 % Gelatine in PBS).

ES-Zell-Medium

500 ml	DMEM (Dulbeccos Mod Eagle Medium Gibco BRL Paisley)
75 ml (12 %)	FCS (PAA, ES-Zell getestet)
12 ml (2 %)	HEPES (1M) (Invitrogen)
6 ml (1 %)	Sodium Pyruvat (100x), (Gibco BRL Paisley)
9 ml (1,5 %)	Glutamin (100x), (Gibco BRL Paisley, Schottland)
6 ml (1 %)	Nicht essentielle Aminosäuren (100x), (Gibco BRL Paisley, Schottland)
1,2 ml	2-β-Mercaptoethanol (50 mM)
90 µl	LIF (Leukämie inhibierender Faktor)

EF-Zell-Medium

10 %	FCS (Fötales Kälberserum) (PAA)
1 %	Glutamin (100x), (Gibco BRL Paisley, Schottland)
89 %	DMEM (Dulbecos Modified Eigel Medium mit Glutamax, Gibco)

Ba/F3- Medium

10 %	FCS (Fötales Kälberserum) (PAA)
10 %	WEHI-Überstand (II-3)
1 %	Glutamin (100x), (Gibco BRL Paisley)
1 %	Penicillin/Streptavidin (10000 Units/ml / 10000µg/ml, Gibco)
78 %	RPMI 1640 (Gibco)

WEHI-3B-Medium

10 %	FCS (PAA)
90 %	RPMI 1640 (Gibco)

Medium für adhärenente Zellen (293T, GP+E86, AFT024, 2018, etc.)

10 %	FCS (PAA)
1 %	Glutamin (100x), (Gibco BRL Paisley, Schottland)
1 %	Penicillin/Streptavidin (10000 Units/ml / 10000µg/ml, Gibco)
88 %	DMEM (Dulbecos Modified Eagel Medium mit Glutamax, Gibco)

Medium für Zellen in Suspension (70Z/3)

10 %	FCS (PAA)
1 %	Glutamin (100x), (Gibco BRL Paisley, Schottland)
1 %	Penicillin/Streptavidin (10000 Units/ml / 10000µg/ml, Gibco)
88 %	RPMI 1640 (Gibco)

Medium für osteoblastäre Zellen (MC3T3, CH3T10 1/2) und primäre Osteoblasten

10 %	FCS (PAA)
1 %	Glutamin (100x), (Gibco BRL Paisley, Schottland)
1 %	Penicillin/Streptavidin (10000 Units/ml / 10000µg/ml, Gibco)
88 %	MEMalpha (Gibco)

4.2.1.5.2 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden adherente Zellen trypsiniert und in Suspension gebracht, 50 µl der Zellsuspension wurden in 10 ml CASYTON verdünnt und im CASY TTC (Innovatis) gemessen. Das Gerät errechnet anhand der editierten Parameter nach der Zählung die Zellzahl pro ml der Ausgangssuspension. Es wurden je 3 Zählungen durchgeführt und der Mittelwert der Einzelergebnisse als Zellzahl pro ml verwendet.

4.2.1.5.3 Ablösen von adhärenenten Zellen

Adhärenente Zellen wurden zum Passagieren, Ernten oder Transfizieren durch kurzzeitige Behandlung mit dem proteolytischen Enzym Trypsin (Gibco) in Suspension gebracht. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 37 °C warmem 1x Trypsin 4 - 8 Minuten inkubiert. Bei der Trypsinbehandlung von ES-Zellen wurde dem Trypsin noch 2 %

Hühnerserum zugesetzt, um die Reaktion weniger aggressiv zu machen. Die Enzymreaktion wurde danach mit dem zweifachen Volumen Zellkulturmedium gestoppt, die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und je nach Verwendungszweck in Medium aufgenommen.

4.2.1.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Adhärente Zellen wurden zwei bis vier Stunden, Suspensionszellen einen Tag vor dem Einfrieren mit frischem Medium gefüttert. Zum Einfrieren wurden sie in Einzelzellsuspension gebracht, zentrifugiert und in kaltem Einfriermedium (90 % FCS; 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in Einfrier-Röhrchen (Nunc) zunächst bei -80 °C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Um ein zu schnelles Einfrieren zu verhindern, wurden die Röhrchen in mit Isopropanol gefüllte Behälter gestellt. Zum Einfrieren der Zellen in 96-Loch-Platten wurden diese ebenfalls trypsinisiert, durch mehrfaches Pipettieren in Einzelzellsuspension gebracht und die Reaktion durch 2fach konzentriertes Einfriermedium (80 % FCS; 20 % DMSO) abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Mineralöl überschichtet und die Platten mit Parafilm versiegelt. Danach wurden die Platten mit Zellstoff umwickelt und bei -80 °C eingefroren. So eingefrorene Zellen wurden spätestens nach zwei Monaten erneut kultiviert, da die Lebensdauer der Zellen bei -80 °C begrenzt ist.

Beim Auftauen wurden die Zellen durch Zugabe von Medium schnell auf 37 °C erwärmt und im 10fachen Volumen Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen, um das DMSO zu entfernen, zentrifugiert und in neuem Medium aufgenommen.

4.2.1.5.5 Kultivierung von embryonalen Fibroblastenzellen

Um zu verhindern, dass die ES-Zellen während der Kultivierung ihre Pluripotenz durch Differenzierung verlieren, wurden sie unter Zugabe von LIF (Leukämie inhibierender Faktor) auf einer Zellschicht von mitotisch inaktivierten EF-Zellen gehalten. Diese „feeder“-Zellen wurden etwa alle 3 - 4 Tage expandiert. Nur EF-Zellen, die maximal dreimal expandiert worden waren, wurden für die Kultivierung von ES Zellen verwendet.

4.2.1.5.6 Mitotische Inaktivierung von EF-Zellen

EF-Zellen müssen, bevor man sie zur Kultivierung von ES-Zellen verwenden kann, mitotisch inaktiviert werden. Diese Inaktivierung erfolgt mit Hilfe des aus dem Pilz *Streptomyces caespitosus* stammenden Zellgiftes Mitomycin C (Sigma-Aldrich). Da es die beiden DNA-

Stränge durch alkylierende Reaktionen kovalent quervernetzt, verhindert es weitere Zellteilungen. Die Zellen wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Mitomycin C-haltigem (10 µg/ml) EF-Medium 2 - 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen in geeigneter Dichte ausplattieren zu können, wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und ihre Anzahl mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer) bestimmt.

4.2.1.5.7 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Da die ES-Zellen für die Generierung transgener Mäuse genutzt wurden, musste bei der Kultivierung in besonderem Maße darauf geachtet werden, dass sie nicht differenzierten. Daher wurden die Zellen auf EF-Zellen gezüchtet und zusätzlich dem Medium LIF zugegeben, was einer Differenzierung entgegenwirkt (Smith 1988, Williams 1988).

4.2.1.5.8 Generierung stabiler ES-Zell-Klone

4.2.1.5.8.1 Transfektion

Je Transfektion wurden ca. $0,7 \times 10^7$ ES-Zellen eingesetzt, die vorher einmal mit PBS gewaschen wurden und anschließend in 700 µl Transfektionspuffer (RPMI 1640 w/o Phenolred, PAA) aufgenommen wurden. Anschließend wurden 20 µg des linearisierten und über eine Phenol Chlorophorm Extraktion gereinigten Targeting-Vektors, der in 100 µl Transfektionspuffer aufgenommen war, zugesetzt. Danach wurde die DNA-Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette (Biorad, Gene Pulser Küvette, 0,4 cm Elektrode; Biorad, Hercules, USA) überführt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einem Elektroporator (Biorad, Hercules, USA) bei 230 mV und 500 µF. Nach der Elektroporation wurden die Zellen nochmals für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf einer EF-Zell-beschichteten 10 cm Platte ausplattiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden 1×10^3 Zellen vor und nach der Transfektion dem Ansatz entnommen und auf zwei 5 cm Platten kultiviert. Diese Zellen wurden in normalem ES-Zellmedium kultiviert, bis die auf ihnen wachsenden Kolonien gut zu erkennen waren. Sechs Tage nach der Transfektion wurden die Kolonien gezählt und so der Anteil der bei der Transfektion gestorbenen Zellen bestimmt.

4.2.1.5.8.2 Selektion

Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden über die Zugabe von G418-Sulfat selektioniert, da der Vektor ein Neomycinresistenzgen enthielt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde mit der Selektion begonnen.

Selektionsmedium: ES-Medium mit 0,170 mg/ml aktivem Geneticin (Gibco)

4.2.1.5.8.3 Vereinzeln und Expandieren von ES-Zell-Kolonien

Sieben bis zehn Tage nach der Transfektion waren auf den mit G418 behandelten Platten fast ausschließlich Kolonien mit G418-resistenten Zellen zu sehen. Zum Vereinzeln der Klone wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml PBS überschichtet. Mit Hilfe einer Pipette (p-200) wurde dann unter einem Stereomikroskop (Nikon, Tokio, Japan) in einer Gegenstrom-Sterilbank einzelne Kolonien in 25 µl PBS aufgenommen. Die Kolonien wurden jeweils in ein Loch einer 96-Loch-Platte (Rundboden) transferiert, danach wurden 50 µl Trypsin hinzugegeben. Nach einer kurzen Inkubation bei 37 °C wurden sie durch Pipettieren in Einzelzellsuspension gebracht und die Trypsinreaktion mit 100 µl Medium gestoppt. Anschließend wurden die Klone auf eine mit EF-Zellen beschichtete 96-Loch-Platte ausplattiert. Nach etwa drei Tagen wurden die Zellen trypsinisiert und auf 3 EF-Zell-beschichteten Platten verteilt. Nach weiteren drei Tagen, als in 50 % der Löcher die Zellen eine optimale Dichte erreicht hatten, wurde eine der drei Platten eingefroren. Vor dem Einfrieren wurde der Zustand der einzelnen Klone protokolliert. Die zweite Platte wurde am darauf folgenden Tag eingefroren. Die dritte Platte wurde auf zwei mit Gelatine behandelte 96-Loch-Platten aufgeteilt. Diese Zellen wurden später verwendet um DNA für eine erste Analyse der Klone zu gewinnen.

4.2.1.5.9 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

4.2.1.5.9.1 Transfektion von 293T-Zellen mittels Polyethylenimin

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen definiert ausplattiert (3×10^5 pro 6-well, 7×10^5 pro 10 cm Schale). Unmittelbar vor der Transfektion wurde das alte Medium abgesaugt. Pro 10 cm Schale wurden 3 ml OptiMEM (Gibco) oder DMEM mit 1 % FCS zugegeben und die Zellen wieder bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden 6 µg der zu transfizierenden DNA in 300 µl OptiMEM und 12 µl PEI (Polyethylenimin; Sigma-Aldrich) (1 mg/ml) in ebenfalls 300 µl OptiMEM gelöst. Diese Mixe wurden gut gemischt und 20 min bei RT

inkubiert. Danach wurde die Mischung tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium durch normales Medium ersetzt. Die Ernte der transfizierten Zellen erfolgte nach 24 – 48 h.

4.2.1.5.9.2 Transfektion von adhärennten Zellen mit Lipofectamin

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen definiert ausplattiert (3×10^5 pro 6-well). Unmittelbar vor der Transfektion wurde das alte Medium abgesaugt. Pro 6-well wurden 2 ml OptiMEM (Gibco) zugegeben. Es wurden 4 µg der zu transfizierenden DNA in 250 µl OptiMEM und 10 µl „Lipofectamine 2000“ (Invitrogen) in weiteren 250 µl OptiMEM gelöst. Diese Mixe wurden gut gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Mischung tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag wurde das Transfektionsmedium durch normales Medium ersetzt. Die Ernte der transfizierten Zellen erfolgte nach 24 – 48 h.

4.2.1.5.9.3 Transfektion von Ba/F3- Zellen

Ba/F3-Zellen wurden gemäß des Herstellerprotokolls mit den „cell line V Nucleofector Kit“-Reagenzien von Amaxa transfiziert.

4.2.1.5.9.4 Transiente Transfektion von ES-Zellen mit dem Plasmid pGK-cre

Die transiente Transfektion wurde genutzt, um in den ES-Zellen *in vitro* eine *cre*-vermittelte Deletion durchzuführen. Je Transfektion wurden 1×10^7 Zellen mit 25 µg Plasmids pGK-cre-bpA in 800 µl Transfektionsmedium (RPMI 1640 w/o Phenolred, Gibco, Paisley, Schottland) gelöst und bei 230 mV und 500 µF elektroporiert. Von den transfizierten Zellen wurden je 1×10^6 Zellen auf zwei 10 cm Platten ausplattiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und mittels Durchflußzytometrie auf die Expression von GFP (grün fluoreszierendes Protein) untersucht.

4.2.1.5.10 Isolation und Kultur primärer *Ebf2*-exprimierender Osteoblasten aus E18,5 Mausembryonen

Zur Gewinnung primärer *Ebf2*-exprimierender Osteoblasten wurden Mausembryonen am Tag E 18,5 aus dem Muttertier präpariert. Die Hinterbeine der Embryonen wurden isoliert und die Haut entfernt. Nachfolgend wurde jedes Beinpaar in 5 ml DMEM mit 0,1 % Collagenase, 0,2 % Dispase inkubiert, um das knochenumgebende Gewebe zu verdauen. Nach 20 min wurde der Überstand verworfen und die Reaktion mit 2,5 ml DMEM mit 0,1 % Collagenase, 0,2 %

Dispase wiederholt. Alle Inkubationsschritte fanden bei 37 °C, überkopf-rotierend statt. Die so freigelegten Hinterbeinknochen wurden nun mit PBS gewaschen, sodass kein umliegendes Gewebe am Knochen bleibt, halbiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die halbierten Knochen wurden nun in je 2,5 ml DMEM mit 0,1 % Collagenase, 0,2 % Dispase in drei nacheinander folgenden Schritten von je 30 min bei 37 °C rotierend inkubiert. Die Überstände der 3 Fraktionen wurden auf Eis gesammelt, die Zellen sedimentiert, in 500 µl PBS aufgenommen und die *Ebf2-Gfp* exprimierenden Zellen mittels Durchflußzytometrie sortiert.

4.2.1.5.11 Isolation von Knochenmarkszellen und haematopoietischen Stammzellen aus der Maus

Von 3 – 6 Wochen alten C57Bl6 Wildtyp Mäusen wurden die Hinterbeine präpariert. Durch das Brechen des Knie- bzw. Fußgelenks in die entgegengesetzte Richtung konnten Femur und Tibia freigelegt werden. Zum Spülen der Knochen mit 10 ml PBS wurde eine Spritze mit einer 26G5/8 Kanüle (BD Microlance) verwendet. Das aus dem Knochen gespülte Knochenmark wurde ebenfalls mit Hilfe einer Kanüle resuspendiert und zur Herstellung einer Einzelzellsuspension durch ein 100µm Zellsieb (BD Falcon) in ein frisches Gefäß überführt. Zur Sortierung von haematopoietischen Stammzellen aus der Knochenmark-Zellsuspension, wurde im Casy Counter die Zellzahl ermittelt. $1,5 \times 10^7$ Zellen wurden in 250 µl PBS aufgenommen, 20 min bei RT mit 1µl Ratte anti-Maus CD16/CD32 (Fc Block, BD Biosciences) inkubiert, um unspezifische Bindungsreaktionen zu verhindern und mit folgenden Antikörpern gefärbt:

CD4-GFP (FITC Rat Anti-Mouse CD4)	BD Biosciences	1:1500
CD8-GFP (FITC Rat Anti-Mouse CD8a)	BD Biosciences	1:1500
B220-GFP (FITC Rat Anti-Mouse CD45R/B220)	BD Biosciences	1:1500
Gr1-GFP (FITC Rat Anti-Mouse Ly-6G and LY-6C)	BD Biosciences	1:1500
Mac1-GFP (FITC Rat Anti-Mouse CD11b)	BD Biosciences	1:1500
Ter119-GFP (FITC Rat Anti-	BD Biosciences	1:1500

Mouse TER-119/Erythroid Cells)		
Sca1-PE (R-Phycperythrin Rat Anti-Mouse Ly-6A/E)	BD Biosciences	1:1500
cKit-APC (Allophycocyanin Anti-Mouse CD117)	eBioscience, NatuTec	1:1500

4.2.1.5.12 Durchflusszytometrie

Für die Analyse über Durchflusszytometrie müssen die Zellen als Einzelzellen vorliegen. Die Zellen wurden zuerst 20 min in PBS mit einem Fc-Block Antikörper (Ratte Anti-Maus CD16/CD32, BD Biosciences) inkubiert um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden sie mit einer Kombination von FITC-, PE- und APC-konjugierten monoklonalen Antikörpern gefärbt, die in PBS verdünnt waren. Es wurden jeweils 1×10^6 Zellen für 20 Minuten gefärbt und dann nochmals in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in PBS für die Analyse aufgenommen. Um tote Zellen zu färben, wurde Propidium-Iodid (Appllichem) zugegeben.

Alle Analysen wurden mit einem FACSCaliburTM (BD-Biosciences) durchgeführt und die Resultate mit der CELLQuestProTM Software ausgewertet. Es wurden je Färbung 3×10^4 lebendige Zellen aufgenommen. Zusätzlich wurden auch noch die Propidium-Iodid positiven und somit toten Zellen aus dieser Population ausgeschlossen.

4.2.1.5.13 Herstellung von Retroviren und retrovirale Infektion muriner Zelllinien und primärer Zellen aus der Maus

Zur Generation von Zellen, die die Fähigkeit besitzen retrovirale Viren herzustellen (GP+E86), wurden HEK293T Zellen mit der oben beschriebenen Methode mit PEI transfiziert. In die Zellen wurde ein MSCV-Vektor (*murine stem cell virus*) mit dem Gen von Interesse, gefolgt von einer IRES-GFP Kasette (Internal Ribosomal Entry Site - Green Fluorescent Protein), und ein Helfer-Plasmid, das die für die Viruspartikelbildung und – replikation erforderlichen Gene (gag, pol, env) enthält, eingebracht. 48 Stunden nach der Transfektion wurde der Viruspartikel-enhaltende Zellkulturüberstand der HEK293T Zellen durch einen Spritzenfilter steril filtriert (0,22 μ m Millex GP Filter, Millipore) und auf die zu 20 % konfluent wachsende Virus-verpackende Zelllinie GP+E86 pipettiert. Dieser Schritt

wurde 4 – 6 mal alle 8 – 12 Stunden wiederholt. Um die Infektionseffizienz zu erhöhen wurde Polybren (finale Konzentration 6 µg/ml; Hexadimethin Bromid, 95 %; Sigma-Aldrich) zugegeben.

Zur Erhöhung des Virustiters wurden die GFP-positiven Zellen der retrovirus-verpackende Zelllinie GP+E86 nach der 3tägigen Infektion mittels Durchflusszytometrie zweimal sortiert. Die so produzierte Zelllinie hat nun das Gen von Interesse genomisch integriert. Durch das Vorhandensein der viralen Gene gag, pol und env in Genom der Packaging-Zelllinie, wird nun stabil Virus im Kulturüberstand produziert. Dieser Virus-enthaltende Zellkulturüberstand kann zur Infektion von murinen Zelllinien (in dieser Arbeit: AFT024 und 2018) und primären murinen Zellen (*Ebf2-Gfp* exprimierende Zellen) verwendet werden. Hierfür wurde wieder, wie oben beschrieben, der Zellkulturüberstand 4 – 6 mal alle 8 – 12 Stunden auf die zu infizierenden Zellen gegeben. Nach der Infektion wurden die Zellen ebenfalls mittels Durchflusszytometrie sortiert.

4.2.1.5.14 Kokultur von primären Osteoblasten und haematopoietischen Stammzellen aus der Maus

Retroviral infizierte murine Zellen (AFT024, 2018, primäre *Ebf2*-exprimierende Osteoblasten) wurden in 24-Loch-Platten in einer Zahl von 2×10^4 pro Loch ausplattiert. Am darauf folgenden Tag wurden nach der oben beschriebenen Methode aus der Maus präparierte und mittels Durchflusszytometrie sortierte haematopoietische Stammzellen auf die ausplattierten Zellen pipettiert. Pro Loch wurden 250 – 500 Stammzellen eingesetzt. Dem verwendeten Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Pen/Strep) wurde Il-3, Il-6 und SCF (R & D Systems) in einer 1:2000 Verdünnung zugesetzt. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Medienwechsel. Nach 10 – 14 Tagen konnten die Kokulturen ausgewertet werden. Hierbei wurden die „cobblestone forming areas“ pro Loch unter dem Mikroskop ausgezählt.

4.2.1.6 Deregulation von Proteinen mittels miRNA

Um Proteine einzeln als auch gleichzeitig herunter zu regulieren, wurden mit Hilfe der Internet Seite: <https://rnaidesigner.classic.invitrogen.com/rnaiexpress/index.jsp> (Invitrogen) miRNAs gegen die RNA-Sequenzen von Interesse gesucht. Unter Verwendung des „BLOCK-iT PolII miR RNAi Expression Vector Kits“ (Invitrogen) wurden mehrere spezifische miRNAs pro Gen kloniert. Um die Funktionalität der Konstrukte zu testen, wurde das herunter zu regulierende Protein in HEK293T Zellen mit einem FLAG-Tag überexprimiert.

Gleichzeitig wurden die entsprechenden miRNA Konstrukte gegen ein oder mehrere Proteine exprimiert. Die Deregulation der Proteine wurde im Western-Blot mittels eines anti-FLAG Antikörpers nachgewiesen. Um Proteine auch in primären Zellen deregulieren zu können, wurden die auf Funktionalität getesteten miRNA Sequenzen in den retroviralen MSCV-Expressionsvektor subkloniert. Später wurden diese Sequenzen ebenfalls für ein Gentargeting in murinen embryonalen Stammzellen verwendet.

4.2.1.7 Gelretardierung

4.2.1.7.1 Anlagerung des Oligonukleotids

Equimolare Menge der beiden Einzelstränge wurden in Annealing Puffer (10mM Tris/HCl pH 7,4; 10mM MgCl₂; 50mM NaCl) gemischt und bei 95 °C für 10 min gekocht. Zur Anlagerung der Oligonukleotide wurde der Heizblock ausgeschaltet und mit den Proben auf RT abkühlen gelassen.

4.2.1.7.2 Radioaktive Markierung eines Oligonukleotids für EMSA-Analysen

Das doppelsträngige Oligonukleotid wurde zunächst in einer Reaktion mit Hilfe von „Klenow Fragment“ (Roche) mit ³²P-alpha-dCTP radioaktiv markiert. Der Ansatz der Markierungsreaktion war wie folgt: 2 µl Oligo (25 ng/µl), 2 µl Klenow Fragment (2U/µl), 2 µl 10 x NEB2 Puffer, 5 µl alpha-CTP, 2 µl dATP, dGTP, dTTP (500 µM), 7µl H₂O. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das spezifische Oligonukleotid mit Hilfe einer Sephadex G50 Säule (Pharmacia) gereinigt und der Grad der Markierung im Szintillationszähler (Bioscan) gemessen. Die Markierung des „ kalten Oligonukleotids“ wurde folgendermaßen durchgeführt: 1 µl Oligo (250 ng/µl), 2 µl Klenow Fragment (2U/µl), 2 µl 10 x NEB2 Puffer, 2 µl dNTPs, 13 µl H₂O.

4.2.1.7.3 Bindereaktion von Proteinen an eine radioaktiv markierte Probe

Die Proteinkonzentration der Kernextrakte wurde bestimmt. Von den mit Reticulocytenlysaten *in vitro* translatierten Proteinen wurden 5 µl eingesetzt. Der Ansatz der Bindereaktion war wie folgt: 5 µl (3-4 µg) Protein; 5 µl 4x Bindepuffer (10 mM Hepes pH 7,9; 70 mM KCl; 1 mM DTT; 4 % Glycerin; 1 mM EDTA; 2,5 mM MgCl₂); 2 µl poly dIdC (1mg/ml); 2 µl BSA (1mg/ml); Diese Komponenten wurden 5 min bei RT inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 4 µl H₂O und 2 µl radioaktivem Oligonukleotid. Die Ansätze wurden

für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf ein nicht-denaturierendes Gel geladen.

4.2.1.7.4 Gellauf

Die Proben wurden auf einem Polyacrylamidgel (4 % Acrylamid (Rotiphorese Gel 40, Roth), 0,5 x TBE; 0,1 % APS (Amoniumperoxydisulfat), 0,002 % TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin)) im elektrischen Feld bei 130V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf einem Whatmanpapier mit Hilfe eines Geltrockners (BioRad) unter Vakuum und Wärmeeinwirkung getrocknet (80 °C, 1 Std.)

4.2.1.8 Luziferase- und β -Galaktosidase-Test

4.2.1.8.1 Luziferase-Messung

Von den, wie oben beschrieben, hergestellten Extrakten wurde je 2 x 10 μ l in eine Luziferase-Mikrotiter-Platte pipettiert und nach Zugabe von 50 μ l Luziferase-Assaypuffer (20 mM Tricin; 1,07 mM Magnesiumcarbonat Pentahydrat; 2,67 mM $MgSO_4$; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DTT; 270 μ M Coenzym A (Roche); 470 μ M Luciferin (Roche) 530 μ M ATP (Roche)) in einem Luminometer Plattenlesegerät ausgewertet.

4.2.1.8.2 β -Galaktosidase-Messung

Wieder wurden von den Extrakten je 2 x 10 μ l in eine weiße Luziferase-Mikrotiter-Platte pipettiert. Nach Zugabe von je 100 μ l β -Gal Assaypuffer (100 mM Na-P pH 8; 1 % GalactonPlus/Serva (Topix); 1mM $MgCl_2$) wurde der Ansatz 15 - 20 min bei RT inkubiert. Unter Zugabe von 50 μ l β -Gal Verstärkungspuffer (0,2 M NaOH; 10 % Emerald Enhancer (Topix)) erfolgte die Messung entsprechend dem Luziferase Test.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar (e)
BSA	Rinder-Serum Albumin („bovine serum albumine“)
cDNA	copy-DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CIP	Kälberdarm-Phosphatase („calf intestine phosphatase“)
Cre-Protein	Protein Rekombinase des <i>PI</i> Phagen („Causes Recombination“)
DMEM	Dulbeccos Modifikation des „Eagle“ Mediums
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EBF	early B-cell factor
EDTA	Ethylen-Diamin-tetra-Acetat
EF-Zellen	embryonale Fibroblastenzellen
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	und andere („et alii“)
FACS	Fluoreszenz-assoziierte Durchfluss Zytometrie
FCS	fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
FRT	Erkennungssequenz der Rekombinase Flip
g	Gramm
xg	x fache Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
HRP	Meerrettich Peroxidase
HSC	hematopoietic stem cell
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LA	langer Arm der Homologie („long arm of homology“)
<i>Lac Z</i>	Gen der β -Galactosidase
LB	Luria Bertani
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
loxP	Orte der überschneigung im Phagen P1 („locus of crossover (x) of phage P1“)
λ	Wellenlänge
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MSC	mesenchymal stem cell
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
μ Ci	Mikrocurie
μ F	Mikrofaraday
Min.	Minute
ml	Milliliter

µl	Mikroliter
mM	Millimol
MMC	Mitomycin C
mRNA	Boten RNA („messengerRNA“)
msec	Millisekunden
mV	Millivolt
Neo	Neomycin
<i>neo^r</i> -Gen	Neomycinresistenz-Gen
NFκB	Kernfaktor-κB („nuclear factor-κB“)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	offenen Leserahmen („open reading frame“)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline („posphate buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
SA	kurzer Arm der Homologie („short arm of homology“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulphate“)
Sec.	Sekunde
Tab.	Tabelle
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TE	Tris-EDTA
TV	Targeting Vektor
U	„Units“ Enzym Einheit
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Haematopoiese im Knochenmark.
Abbildung 2	Expression von <i>Ebf2</i> an Stellen der Osteogenese.
Abbildung 3	Schematische Darstellung eines Phänotyps EBF2 defizienter Mäuse.
Abbildung 4	Schematische Darstellung und Vergleich der Familie der EBF-Transkriptionsfaktoren.
Abbildung 5	Übersicht über die Funktionen und Mechanismen von Angiogenin.
Abbildung 6	Phänotyp EBF2-defizienter Mäuse.
Abbildung 7	Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Gewinnung <i>Ebf2-Gfp</i> positiver Zellen.
Abbildung 8	Vergleich der GFP-positiven und GFP-negativen Zellen aus <i>Ebf2</i> ^{+/-} und <i>Ebf2</i> ^{-/-} Mäusen.
Abbildung 9	Analyse der 1000 am stärksten deregulierten Kandidaten des DNA Micro-Arrays bezüglich ihrer Beteiligung an zellulären Prozessen.
Abbildung 10	Expressionsanalyse von <i>Ebf2</i> ^{+/-} und <i>Ebf2</i> ^{-/-} osteoblastären Zellen aus der Maus.
Abbildung 11	Analyse der DNA Micro-Array Daten.
Abbildung 12	Schematische Darstellung des <i>RNase4 – RNase5/Ang1</i> Locus.
Abbildung 13	Charakterisierung der Startstellen der nicht-kodierenden ersten Exons.
Abbildung 14	Differentielles Splicing, „Exon-sharing“ und Expression anderer RNase5 Mitglieder in <i>Ebf2</i> -exprimierenden Osteoblasten.
Abbildung 15	Gelretardierung zur Identifizierung der EBF-Bindestellen im <i>Ang1</i> -Promotor.
Abbildung 16	Analyse der Bindungsspezifität von endogenem EBF an die <i>Ang1</i> Promotorsequenzen.
Abbildung 17	Analyse der EBF-abhängigen <i>Ang1</i> Promotoraktivität in humanen Zellen.
Abbildung 18	Analyse der EBF-abhängigen <i>Ang1</i> Promotoraktivität in murinen pre B-Zellen.
Abbildung 19	Effekt der <i>Ebf2</i> -Überexpression auf die Expression von <i>Ang1 in vitro</i> .
Abbildung 20	Deregulation der <i>Ang1</i> -Expression in stromalen Zellen.
Abbildung 21	Gleichzeitige Verminderung der Expression von <i>Ebf1</i> , 2 und 3 mit Hilfe von RNAi.

Abbildung 22	Deregulation von EBF1, 2 und 3 beeinträchtigt die stammzellunterstützende Kapazität stromaler Zellen.
Abbildung 23	<i>In vivo</i> Modell des dreifachen EBF „Knock downs“.
Abbildung 24	Funktionalität des Konstrukts und Generierung chimärer Mäuse.
Abbildung 25	Zwei Modelle zur möglichen Wirkungsweise von ANG1 in der haematopoietischen Stammzellnische.
Abbildung 26	Schematische Darstellung der Verwendung des EBF-Tripel-miRNA Mausmodells.

Literaturverzeichnis

- Abkowitz, J.L., A.E. Robinson, S. Kale, M.W. Long, and J. Chen. 2003. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood*. 102:1249-53.
- Acharya, K.R., R. Shapiro, S.C. Allen, J.F. Riordan, and B.L. Vallee. 1994. Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:2915-9.
- Adams, G.B., and D.T. Scadden. 2006. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol*. 7:333-7.
- Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C.T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O.J. Borge, L.A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson, and S.E. Jacobsen. 2005. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*. 121:295-306.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I.L. Weissman. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 404:193-7.
- Ara, T., K. Tokoyoda, T. Sugiyama, T. Egawa, K. Kawabata, and T. Nagasawa. 2003. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity*. 19:257-67.
- Arai, F., A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G.Y. Koh, and T. Suda. 2004. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 118:149-61.
- Aravind, L., and E.V. Koonin. 1999. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *J Mol Biol*. 287:1023-40.
- Askenasy, N., and D.L. Farkas. 2003. In vivo imaging studies of the effect of recipient conditioning, donor cell phenotype and antigen disparity on homing of haematopoietic cells to the bone marrow. *Br J Haematol*. 120:505-15.
- Avecilla, S.T., K. Hattori, B. Heissig, R. Tejada, F. Liao, K. Shido, D.K. Jin, S. Dias, F. Zhang, T.E. Hartman, N.R. Hackett, R.G. Crystal, L. Witte, D.J. Hicklin, P. Bohlen, D. Eaton, D. Lyden, F. de Sauvage, and S. Rafii. 2004. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*. 10:64-71.
- Bernstein, A., L. Forrester, A.D. Reith, P. Dubreuil, and R. Rottapel. 1991. The murine W/c-kit and Steel loci and the control of hematopoiesis. *Semin Hematol*. 28:138-42.
- Bork, P., T. Doerks, T.A. Springer, and B. Snel. 1999. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci*. 24:261-3.

- Calvi, L.M., G.B. Adams, K.W. Weibrecht, J.M. Weber, D.P. Olson, M.C. Knight, R.P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F.R. Bringhurst, L.A. Milner, H.M. Kronenberg, and D.T. Scadden. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 425:841-6.
- Charbord, P., and K. Moore. 2005. Gene expression in stem cell-supporting stromal cell lines. *Ann N Y Acad Sci*. 1044:159-167.
- Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy. 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 22:233-41.
- Cheng, T., N. Rodrigues, H. Shen, Y. Yang, D. Dombkowski, M. Sykes, and D.T. Scadden. 2000. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*. 287:1804-8.
- Christensen, J.L., and I.L. Weissman. 2001. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14541-6.
- Corradi, A., L. Croci, V. Broccoli, S. Zecchini, S. Previtali, W. Wurst, S. Amadio, R. Maggi, A. Quattrini, and G.G. Consalez. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development*. 130:401-10.
- Dexter, T.M., M.A. Moore, and A.P. Sheridan. 1977. Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras in vitro. *J Exp Med*. 145:1612-6.
- Domen, J., and I.L. Weissman. 1999. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today*. 5:201-8.
- Dougall, W.C., M. Glaccum, K. Charrier, K. Rohrbach, K. Brasel, T. De Smedt, E. Daro, J. Smith, M.E. Tometsko, C.R. Maliszewski, A. Armstrong, V. Shen, S. Bain, D. Cosman, D. Anderson, P.J. Morrissey, J.J. Peschon, and J. Schuh. 1999. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 13:2412-24.
- Dubois, L., and A. Vincent. 2001. The COE--Collier/Olf1/EBF--transcription factors: structural conservation and diversity of developmental functions. *Mech Dev*. 108:3-12.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A.L. Ridall, and G. Karsenty. 1997. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 89:747-54.
- Dyer, K.D., and H.F. Rosenberg. 2005. The mouse RNase 4 and RNase 5/ang 1 locus utilizes dual promoters for tissue-specific expression. *Nucleic Acids Res*. 33:1077-86.
- Fett, J.W., D.J. Strydom, R.R. Lobb, E.M. Alderman, J.L. Bethune, J.F. Riordan, and B.L. Vallee. 1985. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*. 24:5480-6.
- Fleming, W.H., E.J. Alpern, N. Uchida, K. Ikuta, G.J. Spangrude, and I.L. Weissman. 1993. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J Cell Biol*. 122:897-

- Gao, X., and Z. Xu. 2008. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 40:619-24.
- Garel, S., F. Marin, M.G. Mattei, C. Vesque, A. Vincent, and P. Charnay. 1997. Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Dev Dyn*. 210:191-205.
- Godin, I., F. Dieterlen-Lievre, and A. Cumano. 1995. Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:773-7.
- Gong, J.K. 1978. Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science*. 199:1443-5.
- Hagman, J., C. Belanger, A. Travis, C.W. Turck, and R. Grosschedl. 1993. Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev*. 7:760-73.
- Hagman, J., M.J. Gutch, H. Lin, and R. Grosschedl. 1995. EBF contains a novel zinc coordination motif and multiple dimerization and transcriptional activation domains. *EMBO J*. 14:2907-16.
- Heissig, B., K. Hattori, S. Dias, M. Friedrich, B. Ferris, N.R. Hackett, R.G. Crystal, P. Besmer, D. Lyden, M.A. Moore, Z. Werb, and S. Rafii. 2002. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 109:625-37.
- Hu, G., J.F. Riordan, and B.L. Vallee. 1994. Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:12096-100.
- Hu, G., C. Xu, and J.F. Riordan. 2000. Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA. *J Cell Biochem*. 76:452-62.
- Hu, G.F., S.I. Chang, J.F. Riordan, and B.L. Vallee. 1991. An angiogenin-binding protein from endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:2227-31.
- Hu, G.F., J.F. Riordan, and B.L. Vallee. 1997. A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:2204-9.
- Hu, G.F., D.J. Strydom, J.W. Fett, J.F. Riordan, and B.L. Vallee. 1993. Actin is a binding protein for angiogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:1217-21.
- Jimenez, M.A., P. Akerblad, M. Sigvardsson, and E.D. Rosen. 2007. Critical role for Ebf1 and Ebf2 in the adipogenic transcriptional cascade. *Mol Cell Biol*. 27:743-57.
- Kao, R.Y., J.L. Jenkins, K.A. Olson, M.E. Key, J.W. Fett, and R. Shapiro. 2002. A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:10066-71.

- Katayama, Y., A. Hidalgo, B.C. Furie, D. Vestweber, B. Furie, and P.S. Frenette. 2003. PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin. *Blood*. 102:2060-7.
- Kiel, M.J., and S.J. Morrison. 2008. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 8:290-301.
- Kiel, M.J., O.H. Yilmaz, T. Iwashita, C. Terhorst, and S.J. Morrison. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 121:1109-21.
- Kieslinger, M., S. Folberth, G. Dobrova, T. Dorn, L. Croci, R. Erben, G.G. Consalez, and R. Grosschedl. 2005. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 9:757-67.
- Kim, H.M., D.K. Kang, H.Y. Kim, S.S. Kang, and S.I. Chang. 2007. Angiogenin-induced protein kinase B/Akt activation is necessary for angiogenesis but is independent of nuclear translocation of angiogenin in HUVE cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 352:509-13.
- Kishimoto, K., S. Liu, T. Tsuji, K.A. Olson, and G.F. Hu. 2005. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene*. 24:445-56.
- Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 91:661-72.
- Kong, Y.Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H.L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A.J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, T.W. Mak, W.J. Boyle, and J.M. Penninger. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 397:315-23.
- Kopp, H.G., S.T. Avezilla, A.T. Hooper, and S. Rafii. 2005. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*. 20:349-56.
- Kortesidis, A., A. Zannettino, S. Isenmann, S. Shi, T. Lapidot, and S. Gronthos. 2005. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood*. 105:3793-801.
- Lacey, D.L., E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, and W.J. Boyle. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 93:165-76.
- Lagasse, E., and I.L. Weissman. 1997. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell*. 89:1021-31.
- Li, W., S.A. Johnson, W.C. Shelley, and M.C. Yoder. 2004. Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Exp Hematol*. 32:1226-37.

- Lin, H., and R. Grosschedl. 1995. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature*. 376:263-7.
- Liu, S., D. Yu, Z.P. Xu, J.F. Riordan, and G.F. Hu. 2001. Angiogenin activates Erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 287:305-10.
- Lixin, R., A. Efthymiadis, B. Henderson, and D.A. Jans. 2001. Novel properties of the nucleolar targeting signal of human angiogenin. *Biochem Biophys Res Commun*. 284:185-93.
- Lord, B.I., N.G. Testa, and J.H. Hendry. 1975. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood*. 46:65-72.
- Lyman, S.D., and S.E. Jacobsen. 1998. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*. 91:1101-34.
- Maier, H., and J. Hagman. 2002. Roles of EBF and Pax-5 in B lineage commitment and development. *Semin Immunol*. 14:415-22.
- Malgaretti, N., O. Pozzoli, A. Bosetti, A. Corradi, S. Ciarmatori, M. Panigada, M.E. Bianchi, S. Martinez, and G.G. Consalez. 1997. Mmot1, a new helix-loop-helix transcription factor gene displaying a sharp expression boundary in the embryonic mouse brain. *J Biol Chem*. 272:17632-9.
- McLellan, A.S., T. Kealey, and K. Langlands. 2006. An E box in the exon 1 promoter regulates insulin-like growth factor-I expression in differentiating muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 291:C300-7.
- Medvinsky, A., and E. Dzierzak. 1996. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*. 86:897-906.
- Mella, S., C. Soula, D. Morello, M. Crozatier, and A. Vincent. 2004. Expression patterns of the *coe/ebf* transcription factor genes during chicken and mouse limb development. *Gene Expr Patterns*. 4:537-42.
- Mikkola, H.K., and S.H. Orkin. 2006. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*. 133:3733-44.
- Moore, K.A., H. Ema, and I.R. Lemischka. 1997. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood*. 89:4337-47.
- Muguruma, Y., T. Yahata, H. Miyatake, T. Sato, T. Uno, J. Itoh, S. Kato, M. Ito, T. Hotta, and K. Ando. 2006. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 107:1878-87.
- Murphy, M.J., A. Wilson, and A. Trumpp. 2005. More than just proliferation: Myc function in stem cells. *Trends Cell Biol*. 15:128-37.
- Nilsson, S.K., H.M. Johnston, and J.A. Coverdale. 2001. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 97:2293-9.

- Nilsson, S.K., H.M. Johnston, G.A. Whitty, B. Williams, R.J. Webb, D.T. Denhardt, I. Bertoncello, L.J. Bendall, P.J. Simmons, and D.N. Haylock. 2005. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 106:1232-9.
- Ohneda, O., C. Fennie, Z. Zheng, C. Donahue, H. La, R. Villacorta, B. Cairns, and L.A. Lasky. 1998. Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad-mesonephros region-derived endothelium. *Blood*. 92:908-19.
- Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada, and H. Nakauchi. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 273:242-5.
- Peled, A., V. Grabovsky, L. Habler, J. Sandbank, F. Arenzana-Seisdedos, I. Petit, H. Ben-Hur, T. Lapidot, and R. Alon. 1999. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest*. 104:1199-211.
- Ponomaryov, T., A. Peled, I. Petit, R.S. Taichman, L. Habler, J. Sandbank, F. Arenzana-Seisdedos, A. Magerus, A. Caruz, N. Fujii, A. Nagler, M. Lahav, M. Szyper-Kravitz, D. Zipori, and T. Lapidot. 2000. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest*. 106:1331-9.
- Rios, M., and D.A. Williams. 1990. Systematic analysis of the ability of stromal cell lines derived from different murine adult tissues to support maintenance of hematopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*. 145:434-43.
- Roecklein, B.A., and B. Torok-Storb. 1995. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood*. 85:997-1005.
- Russo, N., R. Shapiro, K.R. Acharya, J.F. Riordan, and B.L. Vallee. 1994. Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:2920-4.
- Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanit, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P. Gehorn Robey, M. Riminucci, and P. Bianco. 2007. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids can organize a hematopoietic Microenvironment. *Cell*. 131:324-336.
- Schofield, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 4:7-25.
- Short, B., N. Brouard, T. Occhiodoro-Scott, A. Ramakrishnan, and P.J. Simmons. 2003. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res*. 34:565-71.
- Sigvardsson, M., M. O'Riordan, and R. Grosschedl. 1997. EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity*. 7:25-36.

- Simonet, W.S., D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, and W.J. Boyle. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 89:309-19.
- Sipkins, D.A., X. Wei, J.W. Wu, J.M. Runnels, D. Cote, T.K. Means, A.D. Luster, D.T. Scadden, and C.P. Lin. 2005. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*. 435:969-73.
- Sitnicka, E., F.W. Ruscetti, G.V. Priestley, N.S. Wolf, and S.H. Bartelmez. 1996. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood*. 88:82-8.
- Soncin, F. 1992. Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:2232-6.
- Spangrude, G.J., and G.R. Johnson. 1990. Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:7433-7.
- Stier, S., Y. Ko, R. Forkert, C. Lutz, T. Neuhaus, E. Grunewald, T. Cheng, D. Dombkowski, L.M. Calvi, S.R. Rittling, and D.T. Scadden. 2005. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*. 201:1781-91.
- Suda, T., F. Arai, and A. Hirao. 2005. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol*. 26:426-33.
- Taichman, R., M. Reilly, R. Verma, K. Ehrenman, and S. Emerson. 2001. Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors. *Br J Haematol*. 112:438-48.
- Taichman, R.S. 2005. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 105:2631-9.
- Taichman, R.S., and S.G. Emerson. 1998. The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells*. 16:7-15.
- Taichman, R.S., M.J. Reilly, and S.G. Emerson. 1996. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood*. 87:518-24.
- Takahashi, N., T. Akatsu, N. Udagawa, T. Sasaki, A. Yamaguchi, J.M. Moseley, T.J. Martin, and T. Suda. 1988. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*. 123:2600-2.
- Travis, A., J. Hagman, L. Hwang, and R. Grosschedl. 1993. Purification of early-B-cell factor and characterization of its DNA-binding specificity. *Mol Cell Biol*. 13:3392-400.
- Tsuji, T., Y. Sun, K. Kishimoto, K.A. Olson, S. Liu, S. Hirukawa, and G.F. Hu. 2005. Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in ribosomal RNA transcription and cell proliferation. *Cancer Res*. 65:1352-60.

- Tsurukai, T., N. Udagawa, K. Matsuzaki, N. Takahashi, and T. Suda. 2000. Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab.* 18:177-84.
- Udagawa, N., N. Takahashi, E. Jimi, K. Matsuzaki, T. Tsurukai, K. Itoh, N. Nakagawa, H. Yasuda, M. Goto, E. Tsuda, K. Higashio, M.T. Gillespie, T.J. Martin, and T. Suda. 1999. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone.* 25:517-23.
- Valtieri, M., and A. Sorrentino. 2008. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol.* 217:296-300.
- Wagers, A.J. 2005. Stem cell grand SLAM. *Cell.* 121:967-70.
- Wagner, E., and G. Karsenty. 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 4:389-406.
- Wang, M.M., and R.R. Reed. 1993. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature.* 364:121-6.
- Wang, S.S., A.G. Betz, and R.R. Reed. 2002. Cloning of a novel Olf-1/EBF-like gene, O/E-4, by degenerate oligo-based direct selection. *Mol Cell Neurosci.* 20:404-14.
- Wang, S.S., J.W. Lewcock, P. Feinstein, P. Mombaerts, and R.R. Reed. 2004. Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. *Development.* 131:1377-88.
- Wang, X., H. Hisha, S. Taketani, Y. Adachi, Q. Li, W. Cui, Y. Cui, J. Wang, C. Song, T. Mizokami, S. Okazaki, T. Fan, H. Fan, Z. Lian, M.E. Gershwin, and S. Ikehara. 2006. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells.* 24:482-93.
- Wilson, A., M.J. Murphy, T. Oskarsson, K. Kaloulis, M.D. Bettess, G.M. Oser, A.C. Pasche, C. Knabenhans, H.R. Macdonald, and A. Trumpp. 2004. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 18:2747-63.
- Wilson, A., and A. Trumpp. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 6:93-106.
- Xu, Z., D.M. Monti, and G. Hu. 2001. Angiogenin activates human umbilical artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 285:909-14.
- Xu, Z.P., T. Tsuji, J.F. Riordan, and G.F. Hu. 2002. The nuclear function of angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production. *Biochem Biophys Res Commun.* 294:287-92.
- Xu, Z.P., T. Tsuji, J.F. Riordan, and G.F. Hu. 2003. Identification and characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression. *Biochemistry.* 42:121-8.

- Yang, L., D. Bryder, J. Adolfsson, J. Nygren, R. Mansson, M. Sigvardsson, and S.E. Jacobsen. 2005. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*. 105:2717-23.
- Yao, L., T. Yokota, L. Xia, P.W. Kincade, and R.P. McEver. 2005. Bone marrow dysfunction in mice lacking the cytokine receptor gp130 in endothelial cells. *Blood*. 106:4093-101.
- Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi, and T. Suda. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:3597-602.
- Yin, T., and L. Li. 2006. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 116:1195-201.
- Yoshida, H., S. Hayashi, T. Kunisada, M. Ogawa, S. Nishikawa, H. Okamura, T. Sudo, and L.D. Shultz. 1990. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*. 345:442-4.
- Yoshioka, N., L. Wang, K. Kishimoto, T. Tsuji, and G.F. Hu. 2006. A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:14519-24.
- Zardo, G., M.I. Tiirikainen, C. Hong, A. Misra, B.G. Feuerstein, S. Volik, C.C. Collins, K.R. Lamborn, A. Bollen, D. Pinkel, D.G. Albertson, and J.F. Costello. 2002. Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nat Genet*. 32:453-8.
- Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J.Q. Feng, S. Harris, L.M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. Li. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 425:836-41.
- Zhao, L.Y., Y. Niu, A. Santiago, J. Liu, S.H. Albert, K.D. Robertson, and D. Liao. 2006. An EBF3-mediated transcriptional program that induces cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res*. 66:9445-52.

Teile dieser Arbeit wurden auf dem Mouse Genetics and Genomics Meeting von 29. Oktober bis 2. November 2008 in Cold Spring Harbor, USA präsentiert.

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Matthias Kieslinger möchte ich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Labor anzufertigen danken. Des Weiteren möchte ich mich für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und der Herstellung der Kontakte mit meinen Kooperationspartnern bedanken.

Mein besonderer Dank gebührt Prof. Harry MacWilliams für die Betreuung meiner Dissertation als Erstgutachter und für die konstruktiven Gespräche während der Durchführung der Arbeit. Ich möchte mich auch bei den weiteren Mitgliedern meiner Prüfungskommission recht herzlich bedanken.

Vielen, vielen Dank an Dr. Berit Jungnickel für das Erstellen des Zweitgutachtens und für jegliche, nicht nur fachliche Unterstützung während der letzten drei Jahre.

Danke auch an Dr. Ulla Strobl für die fachliche und mentale Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Danke an Dr. Elisabeth Kremmer für schön funktionierende Antikörper, Dr. Holger Prokisch für die Durchführung und Analyse der DNA Micro-Arrays, Bianka Ksienzyk für zahlreiche Sorts, und den Tierpflegern, besonders Martina Münichsdorfer für Ihr großes Engagement.

Vielen Dank an meine Kollegen, vor allem Kathi Zettl und Inga Ludenberg für die Unterstützung, die schöne Zeit, die gute Stimmung und das gemeinsame „Zähnezusammenbeißen“. Auch an Euch, Mädls: Judith, Kerstin, Olivia und Petra! Danke für alles. Besonders die Unterstützung „in guten wie in schlechten Zeiten“! Nicht zu vergessen sind Maria, Emix und Tung: jetzt hab ich's endlich auch mal geschafft, glaub das müssen wir feiern!

Meinen Eltern kann ich gar nicht genug danken, für Ihr Verständnis und Ihre Unterstützung in allen Lebenslagen. Ich bin unglaublich froh, dass es euch gibt.

Alex...Danke für alles! Ohne Dich ist alles nichts...

Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde von April 2006 bis September 2009 am Helmholtz Zentrum München im Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik angefertigt.

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorgelegte Dissertation weder ganz noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde. Ich habe mich anderweitig keiner Doktorprüfung unterzogen.

München, den 09. September 2009

Silvia Hiechinger

Curriculum Vitae

Silvia Hiechinger

geboren am 27. April 1977

in München

Staatsangehörigkeit

deutsch

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit April 2006

Promotion am Helmholtz Zentrum
München, Institut für klinische
Molekularbiologie und Tumorgenetik
„Die Rolle von EBF2 in der haemato-
poietischen Stammzellnische“

November 2004 – März 2006

wissenschaftliche Angestellte am Gen-
zentrum der LMU München

November 2003 – August 2004

Diplomarbeit am Helmholtz Zentrum
München, Institut für molekulare
Strahlenbiologie

November 1998 – November 2003

Studium der Biologie an der LMU
München

Schulischer Bildungsweg, Praktika

Oktober 1997 – Oktober 1998

Praktikum bei 3W GmbH

1997

Abitur

1988 – 1997

Sophie-Scholl-Gymnasium, München