

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

***Bedeutung des Homeoboxgens HOXB4  
für die Regulation muriner hämatopoetischer Vorläuferzellen***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Anne Wagner

aus

Freiburg

2007

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

***Bedeutung des Homeoboxgens HOXB4  
für die Regulation muriner hämatopoetischer Vorläuferzellen***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Anne Wagner

aus

Freiburg

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. C. Buske \_\_\_\_\_

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. A. Eberharter \_\_\_\_\_

Prof. Dr. M. Schleicher \_\_\_\_\_

Prof. Dr. W.-M. Franz \_\_\_\_\_

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: \_\_\_\_\_

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt \_\_\_\_\_

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2007 \_\_\_\_\_

*Meinen Eltern*

<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b> .....	1
<u>Abbildungen und Tabellen</u> .....	6
<b><u>1.0 Einleitung</u></b> .....	8
<b><u>1.1 Hämatopoese und Hämatopoetische Stammzellen</u></b> .....	8
<b><u>1.1.2 Selbsterneuerung - ein wichtiges Merkmal der Stammzelle</u></b> .....	10
<b><u>1.1.3 Extrinsische Regulation der Proliferation und Selbsterneuerung</u></b> <b><u>hämatopoetischer Stammzellen</u></b> .....	11
1.1.3.1 Zytokine- „die klassischen hämatopoetischen “Wachstumsfaktoren“ .....	12
1.1.3.2 Chemokine .....	12
1.1.3.3 Notch Proteine .....	13
1.1.3.4 Wnt / $\beta$ -Catenin .....	13
1.1.3.5 Weitere wichtige Regulatoren der Hämatopoese .....	14
<b><u>1.1.4 Intrinsische Regulationsvorgänge der Hämatopoese</u></b> .....	14
<b><u>1.2 Homeoboxgene</u></b> .....	16
<b><u>1.2.1 Übersicht und Nomenklatur</u></b> .....	16
<b><u>1.2.2 Die Homeobox und ihre Bedeutung für Homeoboxgene</u></b> .....	16
<b><u>1.2.3 HOX Gen Expression in normalen und leukämischen</u></b> <b><u>hämatopoetischen Zellen</u></b> .....	18
<b><u>1.3 Das Homeoboxgen HOXB4</u></b> .....	20
<b><u>1.3.1 Bedeutung des Homeoboxgens HOXB4 für die Regulation muriner</u></b> <b><u>hämatopoetischer Vorläuferzellen</u></b> .....	20
<b><u>1.3.2 HOXB4 und sein Kofaktor PBX</u></b> .....	21
<b><u>1.4 Ablauf und Ziel der durchgeführten Experimente</u></b> .....	22

<b><u>2. Material und Methoden</u></b> .....	24
<b><u>2.1 Materialien</u></b> .....	24
<u>2.1.1 Geräte</u> .....	24
<u>2.1.2 Reagenzien</u> .....	25
<u>2.1.3 Reaktionskits</u> .....	27
<u>2.1.4 Puffer und Lösungen</u> .....	28
<u>2.1.5 Enzyme und Marker</u> .....	30
<u>2.1.6 Expressionsplasmide</u> .....	30
<u>2.1.7 Oligonukleotidprimer</u> .....	31
<u>2.1.8 Antikörper</u> .....	31
<u>2.1.9 Bakterien</u> .....	32
<u>2.1.10 Zelllinien</u> .....	32
<u>2.1.11 Kulturmedien</u> .....	32
<u>2.1.12 Tiere und Tierhaltung</u> .....	33
<u>2.1.13 Weitere Materialien</u> .....	33
<u>2.1.14 Programme</u> .....	34
<b><u>2.2 Methoden</u></b> .....	35
<u>2.2.1 Zellkultur</u> .....	35
<u>2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen</u> .....	35
<u>2.2.1.2 Auftauen von Zellen</u> .....	35
<u>2.2.1.3 Einfrieren von Zellen</u> .....	35
<u>2.2.2 Molekularbiologische Methoden</u> .....	36
<u>2.2.2.1 Reaktionsansätze</u> .....	36
<u>2.2.2.1.1 Zielgerichtete Mutagenese</u> .....	36
<u>2.2.2.1.2 Polymerasenkettenreaktion</u> .....	36
<u>2.2.2.1.3 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen</u> .....	37

2.2.2.1.4	<u>Ligation</u>	37
2.2.2.1.5	<u>Transformation kompetenter Escherichia coli</u>	38
2.2.2.1.6	<u>Konzentrationsbestimmung von DNA</u>	38
2.2.2.1.7	<u>DNA-Sequenzanalyse</u>	38
2.2.2.2	<u>Zielgerichtete Mutagenese</u>	39
2.2.2.3	<u>Mutagenese mit Polymerasekettenreaktion</u>	40
2.2.2.4	<u>Das HOXB4-Wildtyp Konstrukt</u>	41
<b>2.2.3</b>	<b><u>Funktionelle Analysen</u></b>	<b>42</b>
2.2.3.1	<u>Transiente Transfektion von 293-T Zellen</u>	42
2.2.3.2	<u>Titration von retroviralen Virusüberständen</u>	42
2.2.3.3	<u>Durchflusszytometrie</u>	43
2.2.3.4	<u>Transduktion primär muriner Stammzellen</u>	43
2.2.3.5	<u>Proliferationsexperiment muriner Progenitorzellen <i>in vitro</i></u>	45
2.2.3.6	<u>Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung</u>	45
2.2.3.7	<u>Kolonie bildender Milzversuch <math>\Delta</math> CFU-S <i>in vivo</i></u>	46
<b>2.2.4</b>	<b><u>Proteinchemische Methoden</u></b>	<b>46</b>
2.2.4.1	<u>Ganzellextrakte aus eukaryoten Kulturzellen</u>	46
2.2.4.2	<u>Bestimmungen der Proteinkonzentration mit dem BioRad-Assay</u>	47
2.2.4.3	<u>Immunpräzipitation</u>	47
2.2.4.4	<u>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</u>	47
2.2.4.5	<u>Western Blot</u>	48
<b>3.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b><u>Herstellung der verschiedenen Mutanten des Homeoboxgens HOXB4</u></b>	<b>49</b>
<b>3.1.1</b>	<b><u>Herstellung der bindungsinaktiven <math>\Delta</math>P-HOXB4-N 211 S</u></b>	
<b>Doppelmutante</b>		49
<b>3.1.2</b>	<b><u>Herstellung der <math>\Delta</math>P-HOXB4-W144A (PBX) Doppelmutante</u></b>	50
<b>3.1.3</b>	<b><u>Herstellung der C-terminal deletierten Doppelmutante</u></b>	
<b><u><math>\Delta</math>P-HOXB4-C-DEL</u></b>		51

<u>3.1.4 Herstellung der N-terminal deletierten Doppelmutante</u> <u><math>\Delta P</math>-HOXB4-NtD30</u> .....	52
<u>3.2 Eine Übersicht über das HOXB4 Gen und seine Mutanten</u> .....	52
<u>3.2.1 Anordnung des HOXB4 Gens in seinem retroviralen Vektor</u> .....	52
<u>3.2.2 Anordnung der Mutationen innerhalb des HOXB4 Gens</u> .....	53
<u>3.3 Darstellung der Proteinexpression des HOXB4-Wildtyps,</u> <u>der <math>\Delta P</math>-HOXB4 Einfach-/ und Doppelmutanten</u> .....	54
<u>3.4 Funktionelle Analysen</u> .....	55
<u>3.4.1 Virusüberstandanalyse</u> .....	55
<u>3.4.2 Ergebnisse der Transduktionseffizienz primär muriner Progenitorzellen</u> <u>mit Virusüberstand</u> .....	64
<u>3.5 Proliferationsexperiment HOXB4-/Mutanten transduzierter muriner</u> <u>Progenitorzellen in vitro</u> .....	68
<u>3.5.1 Der Effekt des HOXB4-Wildtyps und der generierten HOXB4 Mutanten</u> <u>auf unreife hämatopoetische Progenitorzellen in vitro</u> .....	69
<u>3.5.2 Testung eines Effektes der HOXB4 Mutanten auf die myeloische</u> <u>Differenzierung muriner unreifer Progenitorzellen in vitro mittels</u> <u>durchflusszytometrischer Immunphänotypisierung</u> .....	70
<u>3.5.3 Vergleich der mittels Antikörper gefärbten, murinen hämatopoetischen</u> <u>Progenitorzellen</u> .....	74
<u>3.6 Kolonie bildender Milzversuch in vivo (<math>\Delta CFU-S</math>)</u> .....	76
<u>3.6.1 Die Wirkung von HOXB4 und der Mutanten auf Kurz-zeit</u> <u>repopulierende hämatopoetische Stammzellen in vivo</u> .....	77
<u>3.6.2 Repräsentative Darstellung der makroskopisch sichtbaren Milzkolonie</u> .....	78

<b><u>4. Diskussion</u></b> .....	79
<b><u>5. Zusammenfassung und klinischer Aspekt</u></b> .....	85
<b><u>6. Literaturverzeichnis</u></b> .....	87
<b><u>7. Anhang</u></b> .....	95
<b><u>7.1 Danksagung</u></b> .....	95
<b><u>7.2 Curriculum vitae</u></b> .....	96

## Abbildungen und Tabellen

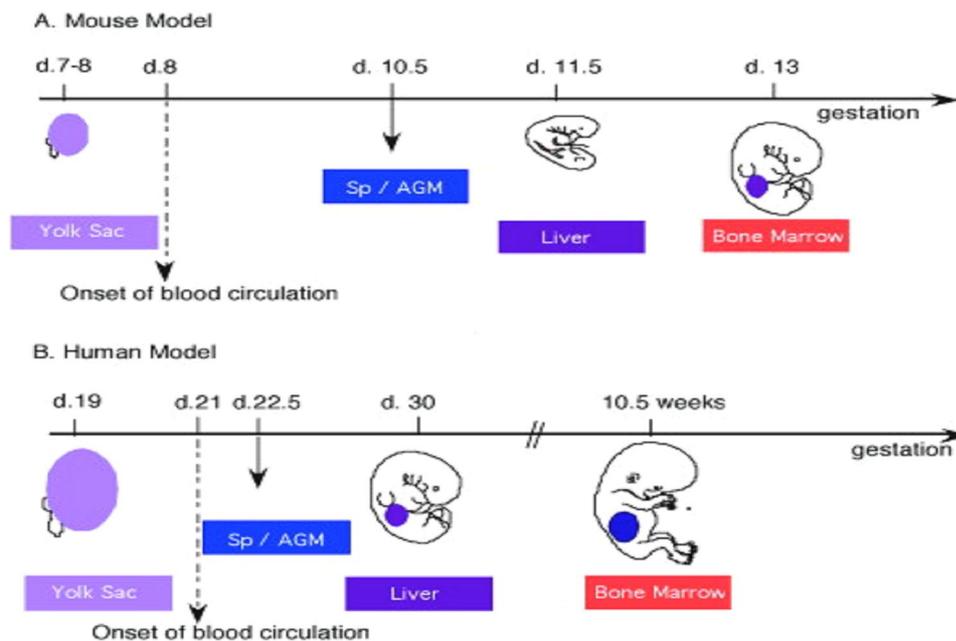
<b>Abbildung 1:</b> Ontogenetische Entstehung des hämatopoetischen Systems .....	8
<b>Abbildung 2:</b> Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen .....	10
<b>Abbildung 3:</b> Darstellung der Struktur der Homeodomäne .....	17
<b>Abbildung 4:</b> Sequenzunterschiede der Homeoproteine .....	18
<b>Abbildung 5:</b> Expression von Hoxgenen in humanen Knochenmarkzellen .....	19
<b>Abbildung 6:</b> Bildliche Darstellung der Transduktion .....	45
<b>Abbildung 7:</b> Das PBX interagierende Pentapeptidmotiv .....	51
<b>Abbildung 8:</b> Retrovirale Vektorstruktur von HOXB4 .....	52
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung der Mutationen innerhalb des HOXB4 Gens .....	53
<b>Abbildung 10:</b> Expressionsniveau des $\Delta$ P-HOXB4 Proteins .....	54
Expressionsniveau des $\Delta$ P-HOXB4-W144-A Proteins	
<b>Abbildung 11:</b> Expressionsniveau des $\Delta$ P-HOXB4-N_211_S Proteins .....	54
Expressionsniveau des $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL Proteins	
<b>Abbildung 12:</b> Expressionsniveau des HOXB4 –Wildtyp Proteins .....	55
<b>Abbildung 13:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit der Negativkontrolle .....	56
<b>Abbildung 14:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4 (unverdünnt) .....	56
<b>Abbildung 15:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4 (1:3 verdünnt) .....	57
<b>Abbildung 16:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4 (1:10 verdünnt) .....	57
<b>Abbildung 17:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4-N_211_S (unverdünnt) .....	58
<b>Abbildung 18:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4-N_211_S (1:3 verdünnt) .....	58
<b>Abbildung 19:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4-N_211_S (1:10 verdünnt) .....	59
<b>Abbildung 20:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4-W144-A (unverdünnt) .....	60
<b>Abbildung 21:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4-W144-A (1:3 verdünnt) .....	60
<b>Abbildung 22:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4-W144-A (1:10 verdünnt) .....	61
<b>Abbildung 23:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL (unverdünnt) .....	62
<b>Abbildung 24:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL (1:3 verdünnt) .....	62
<b>Abbildung 25:</b> Transfektionseffizienz von 293-T Zellen mit $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL (1:10 verdünnt) .....	63
<b>Abbildung 26:</b> Transduktionseffizienz muriner Knochenmarkzellen mit einer Negativkontrolle .....	64
<b>Abbildung 27:</b> Transduktionseffizienz muriner Knochenmarkzellen mit dem GFP Kontrollvektor .....	64
<b>Abbildung 28:</b> Transduktionseffizienz muriner Knochenmarkzellen mit $\Delta$ P-HOXB4 .....	65
<b>Abbildung 29:</b> Transduktionseffizienz muriner Knochenmarkzellen mit $\Delta$ P-HOXB4-N_211_S .....	65
<b>Abbildung 30:</b> Transduktionseffizienz muriner Knochenmarkzellen mit HOXB4-Wildtyp .....	66
<b>Abbildung 31:</b> Transduktionseffizienz muriner Knochenmarkzellen mit $\Delta$ P-HOXB4-W144-A .....	67
<b>Abbildung 32:</b> Transduktionseffizienz muriner Knochenmarkzellen mit $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL .....	67
<b>Abbildung 33:</b> <i>In vitro</i> Proliferationsversuch .....	68

<b>Abbildung 34:</b> Sca-1, c-kit, Sca-1/c-kit doppelpositive Antikörperfärbung .....	70
<b>Abbildung 35:</b> Mac-1, Gr-1, Mac-1/Gr-1 doppelpositive Antikörperfärbung.....	71
<b>Abbildung 36:</b> Ter119, B220, Ter119/B220 doppelpositive Antikörperfärbung.....	73
<b>Abbildung 37:</b> Schematische Präsentation des Kolonie bildenden Milzversuches ( $\Delta$ CFU-S) .....	76
<b>Abbildung 38:</b> $\Delta$ CFU-S Experiment <i>in vivo</i> .....	76
<b>Tabelle 1:</b> Darstellung der Probenmittelwerte aus vier unabhängigen <i>in vitro</i> Experimenten (N=4).....	68
<b>Tabelle 2:</b> Probenmittelwerte in Prozent aus N=3 unabhängigen Antikörperfärbungen mit Sca-1, c-kit und Sca-1/c-kit .....	70
<b>Tabelle 3:</b> absolute Zahl Sca-1 positiver, c-kit positiver und Sca-1/c-kit doppelpositiver Zellen .....	71
<b>Tabelle 4:</b> Probenmittelwerte in Prozent aus N=3 unabhängigen Antikörperfärbungen mit Mac-1, Gr-1 und Mac-1/Gr-1 .....	72
<b>Tabelle 5:</b> absolute Zahl Mac-1 positiver, Gr-1 positiver und Mac-1/Gr-1 doppelpositiver Zellen .....	72
<b>Tabelle 6:</b> Probenmittelwerte in Prozent aus N=3 unabhängigen Antikörperfärbungen mit Ter119, B220 und Ter119/B220.....	73
<b>Tabelle 7:</b> absolute Zahl Ter119 positiver, B220 positiver und Ter119/B220 doppelpositiver Zellen.....	74
<b>Tabelle 8:</b> Darstellung der Mittelwerte und deren Standardabweichung der Milzkolonien aus N Versuchsreihen .....	77

# 1.0 Einleitung

## 1.1 Hämatopoese und Hämatopoetische Stammzellen

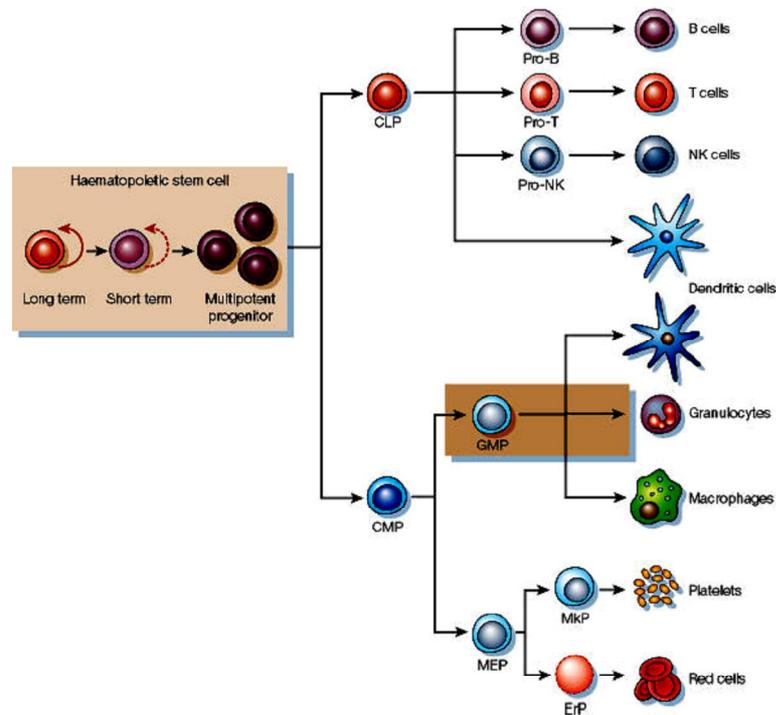
Die Bezeichnung Hämatopoese bezieht sich auf die Formung und Entwicklung der Blutzellen. Bei menschlichen Lebewesen beginnt dieser Prozess in dem Dottersack während der ersten Wochen in der embryonalen Entwicklung. Im dritten Monat der Schwangerschaft wandern Stammzellen in die fötale Leber und weiter in die Milz. Zwischen dem dritten und siebten Monat der Schwangerschaft spielen diese zwei Organe eine Hauptrolle in der Hämatopoese. Im weiteren Verlauf übernimmt das Knochenmark diese Funktion und die Hämatopoese in Leber und Milz endet.



**Abbildung 1:** Ontogenetische Entstehung des hämatopoetischen Systems (Bonnet 2003)

Während der Embryo sich entwickelt wird diese primitive Hämatopoese von einem endgültigen, aus mehreren Zelllinien bestehenden Blutsystem abgelöst. Der menschliche Körper produziert täglich Billionen neuer Blutzellen. Jede einzelne dieser Zellen stammt von seltenen, sich im Knochenmark befindenden hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) ab. Adulte Stammzellen sind definiert als Zellen, die in der Lage sind, sich mittels Selbsterneuerung zu verewigen und reife Zellen eines bestimmten Gewebes, mittels Differenzierung, zu erzeugen (Reya, Morrison, Clarke & Weissman 2001). Der erste Beweis

für das Bestehen eines solchen Zelltyps stammte aus Experimenten von Ray Owen und seinen Mitarbeitern im Jahr 1945. Diese zeigten, dass zweieiige Rinderzwillinge, die eine gemeinsame Plazenta und Blutzirkulation teilten, lebenslang Blutzellen herstellten, die genetisch von beiden Zwillingen bestimmt waren. Die Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen wurde 1963 von Till und McCulloch definiert (Siminovitch, Till & McCulloch 1964). In einem Mausmodell lieferte diese Gruppe den Beweis für die Existenz hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark. Diese waren in der Lage das hämatopoetische System wieder herzustellen und somit letal bestrahlten Empfängertieren das Leben zu retten. Mit Hilfe von einer Reihe an Transplantationen zeigten sie, dass hämatopoetische Stammzellen die Fähigkeit für eine Selbsterneuerung besitzen. Auf diesen Experimenten basierend wurden sie als Zellen definiert, die sowohl in der Lage sind, sich zu differenzieren, als auch sich uneingeschränkt selbst zu erneuern. Diese Entdeckung war die Geburtsstunde der heutigen, modernen Stammzellforschung (Bonnet 2003). Erste Versuche hämatopoetische Stammzellen zu reinigen wurden mittels Experimenten von Till und McCulloch in Holland durchgeführt. Diese Arbeit ermöglichte es, hochgereinigte hämatopoetische Stammzellen aus Maus bzw. menschlichem Knochenmark routinemäßig zu identifizieren und isolieren. Deren charakteristische Zelloberflächenproteine präsentierten überwiegend Sca-1 und c-kit. Im hämatopoetischen System sind Stammzellen heterogen im Hinblick auf ihre Fähigkeit, sich selbst zu erneuern. Daher können sie in drei unterschiedliche Populationen eingeteilt werden: Lang-zeit selbsterneuernde hämatopoetische Stammzellen (Long-term HSC), Kurz-zeit selbsterneuernde HSZ (Short-Term HSC) und multipotente Vorläuferzellen, die kein Potential für eine Selbsterneuerung aufweisen (Morrison, Wandycz, Hemmati, Wright & Weissman 1997). Diese Populationen bilden eine Linie, in der aus Lang-zeit hämatopoetischen Stammzellen Kurz-zeit HSZ hervorgehen und diese sich zu multipotenten Vorläuferzellen weiter entwickeln (Akashi, Reya, Dalma-Weiszhausz & Weissman 2000). Sobald Lang-zeit selbsterneuernde hämatopoetische Stammzellen zu multipotenten Vorläuferzellen reifen, verlieren sie zunehmend ihr Potential für eine Selbsterneuerung und werden mitotisch aktiver. Während aus Lang-Zeit HSZ von Mäusen lebenslang hämatopoetische Zellen reifen, überleben Kurz-zeit repopulierende HSZ und multipotente Vorläuferzellen in letal bestrahlten Mäusen nur weniger als acht Wochen.



**Abbildung 2.** Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen. HSZ können unterteilt werden in HSZ mit Langzeit Selbsterneuerungspotential, in HSZ mit kurzzeitiger Selbsterneuerung und in multipotente Vorläuferzellen. (Die roten Pfeile in Abb. 2 weisen auf das Selbsterneuerungspotential hin). Aus ihnen entstehen determinierte lymphatische (CLP) und myeloische (CMP) Vorläuferzellen, aus denen sich alle bekannten hämatopoetischen Zellen einer Maus entwickeln können (Reya, Morrison, Clarke & Weissman 2001).

### 1.1.2 Selbsterneuerung - ein wichtiges Merkmal der Stammzelle

Selbsterneuerung ist die Eigenschaft einer Stammzelle, Abkömmlinge mit identischen Eigenschaften der ursprünglichen Zellen zu erzeugen. Eine Stammzelle teilt sich symmetrisch und lässt zwei Tochterzellen entstehen, wobei jede der Zellen Stammzeleigenschaften besitzt. Alternativ kann sich eine Stammzelle asymmetrisch teilen, wobei eine Tochterzelle als Stammzelle besteht und die andere Zelle sich als Vorläuferzelle rasch entlang der Differenzierungslinie bewegt. Letztere besitzt eine eingeschränkte Fähigkeit sich selbst zu erneuern (Warner, Wang, Hope, Jin & Dick 2004). Die sich differenzierende Vorläuferzelle vermag sich verstärkt zu vermehren, was die Voraussetzung für klonale Expansion und Herstellung einer größeren Anzahl an determinierten Vorläuferzellen und differenzierteren hämatopoetischen Stammzellen ist.

Hämatopoetische Stammzellen können funktionell voneinander getrennt werden. Lang-zeit repopulierende Stammzellen, die in der Lage sind sich unendlich selbst zu reproduzieren und Kurz-zeit rekultivierende Zellen. Diese erneuern sich für einen definierten Zeitraum in Mäusen (~ acht Wochen) (Passegue, Jamieson, Ailles & Weissman 2003). Aus den Kurz-zeit repopulierenden Stammzellen entstehen Vorläuferzellen, die sich nicht selbst erneuern können, jedoch die Fähigkeit haben sich in die unterschiedlichen myeloischen Zellreihen zu differenzieren. Im weiteren Verlauf entstehen aus diesen Vorläuferzellen Zellen, die in ihrem Differenzierungspotential beschränkter sind und sich schließlich zu funktionell reifen Zellen entwickeln.

### **1.1.3 Extrinsische Regulation der Proliferation und Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen**

Die Regulation des Selbsterneuerungsprozesses hämatopoetischer Stammzellen ist nur ungenau verstanden. Frühe Experimente zeigten, dass sich die Selbsterneuerung von Zellen *in vivo* in der Tat einer extrinsischen Regulation unterzieht. In normalen adulten Mäusen bleibt die Zahl hämatopoetischer Stammzellen (HSZ) im Knochenmark relativ konstant. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation bestrahlter Mäuse die anfangs injizierte Anzahl an HSZ um das 10 bis 20 fache anstieg. Nach den ersten Wochen erreichten die Stammzellen ein Plateau. Als hämatopoetische Stammzellen erneut von Mäusen, deren Hämatopoese wiederhergestellt war und sich in einem gleichmäßigen Zustand befand entnommen und bestrahlten Empfängertieren injiziert wurden, stieg die Anzahl der HSZ erneut um das 10 fache dessen, was sie gespritzt bekamen. Erst dann erreichten sie ein Plateau. Diese Beobachtung wurde in vier aufeinander folgenden Stammzellübertragungen gemacht. Am Ende konnte eine steigende Wachstumszahl hämatopoetischer Stammzellen um das 8400 fache der Zellzahl, die am Anfang der Versuchsreihe eingesetzt wurde, verzeichnet werden (Iscove & Nawa 1997). Diese Experimente zeigten, dass die durch Selbsterneuerung bedingte Ausdehnung von HSZ auf eine Modulation von Signalen aus der Umgebung hämatopoetischer Stammzellen zurückzuführen ist und dass normale HSZ ihre Zellzahl beträchtlich steigern können (Iscove & Nawa 1997; Pawliuk, Eaves & Humphries 1996; Sauvageau, Thorsteinsdottir, Eaves, Lawrence, Largman, Lansdorp & Humphries 1995). HSZ sind in der Lage, mit ihrer äußeren Umgebung durch Zell zu Zell Kontakt, Bindung an Bestandteile extrazellulärer Matrix und spezifischen Wechselwirkungen mit unzähligen, zellgebundenen oder löslichen

Wachstumsfaktoren auf vielfältige Art und Weise zu kommunizieren (Iscove & Nawa 1997; Sauvageau, Iscove & Humphries 2004). Es wurden zahlreiche Faktoren identifiziert, die mit ‚Stammzellwachstum‘ assoziiert sind. Als weitaus schwieriger hat sich herausgestellt, Prozesse zu erklären, die durch Wachstumsfaktoren stimuliert, eine Selbsterneuerung von HSZ fördern.

#### 1.1.3.1 Zytokine- „die klassischen hämatopoetischen“ Wachstumsfaktoren

Die wohl am besten charakterisierten Regulatoren der Hämatopoese sind Zytokine (Zhu & Emerson 2002). Zytokine gehören zu einer großen Proteinfamilie, die sowohl positiv als auch negativ Einfluss auf zelluläre Ruhephasen, Apoptose, Proliferation und Differenzierung nehmen. Üblicherweise wirken Zytokine auf spezifische Rezeptoren ein und aktivieren eine Reihe von Prozessen. Zytokine, die Interleukin 3 und GM-CSF einschließen, induzieren eine Proliferation von Zellen. Weitere Zytokine, wie zum Beispiel der flt-3 und kit Ligand schützen Zellen vor dem Zelltod und sensibilisieren diese für Zytokine, die einen fördernden Effekt auf das Wachstum der Zellen ausüben. Eine Vielzahl von *in vitro* Kulturbedingungen wurden beschrieben, die sowohl zu einer gewaltigen Vermehrung differenzierterer, klonogener Vorläuferzellen als auch zu einer beträchtlichen Expansion primitiverer Zellen führte. Diese stellten sich als Zellen heraus, aus denen sich Langzeitkulturen entwickelten (Petzer, Eaves, Barnett & Eaves 1997; Zandstra, Conneally, Petzer, Piret & Eaves 1997). Jedoch hat sich die *in vitro* Expansion streng definierter HSZ als eine größere Herausforderung erwiesen.

#### 1.1.3.2 Chemokine

Chemokine sind eine weitere Klasse, die zu dem Verbund wichtiger hämatopoetischer Regulatoren gehören. Sie setzen sich aus einer Gruppe von Proteinen zusammen, die neben Entzündungsprozessen, Leukozytenmigration, Angiogenese, Tumorzellwachstum und Metastasierung auch Einfluss auf die Hämatopoese nehmen. Chemokine inhibieren das Wachstum von Vorläuferzellen, regulieren deren Abwanderung und vermitteln die Entwicklung von T-Zellen im Thymus. Das Chemokin SDF-1 ist zum einen für den Transport hämatopoetischer Zellen in einem sich entwickelnden Embryo erforderlich; zum anderen weist es hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen nach Transplantationen den

Weg zurück in das Knochenmark auf und mobilisiert Stammzellen für die Ansammlung von peripheren Blutstammzellen für Transplantationszwecken (Christopherson & Hromas 2001).

#### 1.1.3.3 Notch Proteine

Notch wurde erstmals 1919 als ein Gen identifiziert, das aufgrund von „Haplo-Unzulänglichkeiten“ Kerben (Notches) in Flügelrändern von Fliegen verursacht (Kojika & Griffin 2001). Bisher wurden drei transmembrane Liganden im Menschen gefunden, die an die äußeren Domänen von Notchrezeptoren binden: Delta, Jagged 1 und Jagged 2. Im hämatopoetischen System wird Jagged 2 auf Thymozyten (Felli, Maroder, Mitsiadis, Campese, Bellavia, Vacca, Mann, Frati, Lendahl, Gulino & Screpanti 1999), Delta vornehmlich auf hämatopoetischen Zellen und Stromazellen exprimiert (Han, Ye & Moore 2000). Im Gegensatz dazu, scheint die Expression von Jagged 1 auf bestimmte Zelltypen wie Stromazellen, Mastzellen und Megakaryozyten (Singh, Phillips, Iscove & Egan 2000) sowie undifferenzierte Zellen beschränkt zu sein (Karanu, Murdoch, Gallacher, Wu, Koremoto, Sakano & Bhatia 2000). Der Notch Signalweg übernimmt die Funktion eines weitgehend beanspruchten, in der Evolution konservierten regulatorischen Systems. Dieses spielt eine zentrale Rolle bei Entscheidungen über das Entwicklungsschicksal multipotenter Vorläuferzellen und der Erhaltung der Hämatopoese. Die Wirkung von Notchproteinen besteht häufig in der Hemmung einer (unter Umständen fehlerhaften) Differenzierung entlang eines bestimmten Pfades. Eine Selbsterneuerung oder eine Differenzierung entlang eines alternativen Pfades werden durch Notchproteine zugelassen oder sogar gefördert. Eine Notch Signalwirkung betrifft das Überleben, die Proliferation, und das Entwicklungsschicksal von Vorläuferzellen in unterschiedlichen Phasen ihrer hämatopoetischen Entwicklung. Dies schließt sowohl die Selbsterneuerung versus Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen, die Differenzierung von undifferenzierten lymphatischen Vorläuferzellen in T- oder B-Zellen, als auch die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen oder dendritische Zellen ein (Ohishi, Katayama, Shiku, Varnum-Finney & Bernstein 2003).

#### 1.1.3.4 Wnt/ $\beta$ -Catenin

Komponenten einer Wnt vermittelten Signaltransduktion sind in der Lage eine Proliferation von hämatopoetischen Knochenmarkzellen zu induzieren, während sie signifikant deren Differenzierung inhibieren. Dies resultiert funktionell in einer Selbsterneuerung von HSZ.  $\beta$ -

Catenin, das den Wnt Pfad in Bezug auf die eben erwähnte Wirkung in hämatopoetischen Stammzellen aktiviert, führt bei seiner Transduktion in HSZ zu einer Aufrechterhaltung myeloischer und lymphatischer Zellreihen *in vivo*. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Wnt mittels  $\beta$ -Catenin Einfluss auf Notch 1 und HOXB4 zu nehmen scheint. Eine  $\beta$ -Catenin vermittelte Hochregulierung der Expression dieser beiden Gene, von denen bekannt ist, dass sie entscheidende Faktoren für den Selbsterneuerungsprozess hämatopoetischer Stammzellen sind, lässt die Vermutung zu, dass Wnt auf diesem Weg ebenfalls ein potenter Faktor für die Proliferation von Stammzellen ist (Reya, Duncan, Ailles, Domen, Scherer, Willert, Hintz, Nusse & Weissman 2003).

#### 1.1.3.5 Weitere wichtige Regulatoren der Hämatopoese

Weitere wichtige Regulatoren der Hämatopoese schließen Bestandteile der extrazellulären Matrix ein, sowie hämatopoetische und nicht hämatopoetische Zellen, Nährstoffe, Vitamine und physiologische Prozesse (Smith 2003). HSZ und Vorläuferzellen binden fest an Heparinsulfate, Chemokine, Kollagene, Laminin, Fibronectin und weitere Bestandteile extrazellulärer Matrix. Diese Moleküle bilden für Progenitoren und Stammzellen ein Gerüst mit einem breiten Spektrum an positiven und negativen Wachstumsregulatoren. Bestandteile der extrazellulären Matrix und der Stroma sind in der Lage, an HSZ gezielt Signale zu senden. Diese veranlassen Stammzellen zum Wachstum, schützen Zellen vor Apoptose oder verändern die Reaktion der Zellen auf positive oder negative Regulatoren. Integrine, Selektine und Muzine,-Adhäsionsmoleküle auf HSZ und Vorläuferzellen-, vermitteln die Bindung an Bestandteile extrazellulärer Matrix (Smith 2003). Hämatopoetische und Nicht-hämatopoetische Zellen, die an der Regulation der Hämatopoese beteiligt sein können, schließen NK-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, Osteoblasten, Fettzellen und eventuell auch Neuronen ein (Gimble, Robinson, Wu & Kelly 1996).

#### 1.1.4 Intrinsische Regulationsvorgänge der Hämatopoese

Zusätzlich zu dem breiten Feld an extrinsischen Faktoren, die bei der Regulation der Hämatopoese eine Rolle spielen, müssen intrinsische genetische Abläufe erwähnt werden, die ebenfalls entscheidend auf die Hämatopoese Einfluß nehmen. Die Genfamilien Rb, E2Fs, SCL sowie HOX und weitere, hier nicht erwähnte Familien, scheinen die Proliferation und Selbsterneuerung von frühen HSZ zu regulieren.

Dem Genprodukt von SCL wird als Transkriptionsfaktor eine Rolle bei der Bestimmung der Differenzierung von Erythrozyten und Megakaryozyten aus gewöhnlichen, menschlichen CD34+ hämatopoetischen Zellen zugesprochen (Elwood, Zogos, Pereira, Dick & Begley 1998).

Mäuse, deren E2F4 Aktivität fehlerhaft ist, ließen eine Abnormalität unter anderem in der Entwicklung hämatopoetischer Zelllinien erkennen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die E2F4 Genaktivität entscheidend Einfluss auf die Kontrolle des Reifungsprozess von Zellen unterschiedlichen Gewebes nimmt (Rempel, Saenz-Robles, Storms, Morham, Ishida, Engel, Jakoi, Melhem, Pipas, Smith & Nevins 2000).

Eine eingehende Beschreibung der oben genannten Genfamilien und ihre Bedeutung für die Hämatopoese würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Daher ist eine Gengruppe hervorzuheben, deren Aktivität eine bedeutende Rolle bei der intrinsischen Regulation der Hämatopoese spielt; die so genannten HOX Gene. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird zunächst ein Überblick über die Homeobox (HOX) Genfamilie gegeben und schließlich näher auf die Bedeutung des HOXB4 Gens eingegangen.

## **1.2 Homeobox Gene**

### **1.2.1 Übersicht und Nomenklatur**

Es wird geschätzt, dass das menschliche Genom wenigstens 200 Homeoboxgene beinhaltet (Tupler, Perini & Green 2001), von denen nur 39 der Familie der HOX Gene zugeschrieben werden. Homeoboxgene wurden zuerst in *Drosophila* charakterisiert, wo sie eine herausragende Rolle bei der embryonalen Entwicklung entlang der anterioren-posterioren Körperachse spielen (Krumlauf 1994).

Homeoboxgene werden in zwei Klassen unterteilt. Klasse I umfasst gebündelte („clustered“) HB (HOX) Gene, zu denen 39 gezählt werden. Zur Klasse II gehören divergente HB (non-HOX) Gene. Diese sind auf das gesamte Genom verteilt und beinhalten kleine Familien, wie die MSX, ParaHox (CDX), PAX, DLX Familien sowie die eingekerbten „engrailed“ (EN) Gruppen. Wenngleich individuelle Mitglieder innerhalb der Homeoboxfamilien neben der Homeobox kleine Sequenzähnlichkeiten aufweisen, besitzen einige Familien zusätzliche konservierte Sequenzmotive, die ihnen ausgeprägte funktionelle Eigenschaften verleihen (Abate-Shen 2002; Owens & Hawley 2002).

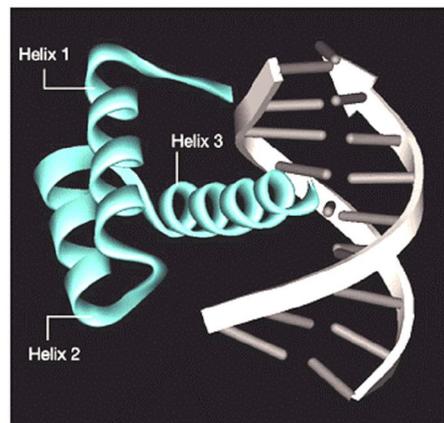
HOX Gene in der Maus und im Menschen sind in vier separaten chromosomalen Genclustern (HOX a- d bzw. HOX A-D) organisiert und umfassen wie oben erwähnt 39 Gene. Zusätzlich zu ihrer Rolle in der embryonalen Entwicklung ist die HOX Genfamilie von entscheidender Bedeutung in der Regulation der Hämatopoese. Wenigstens 16 unterschiedliche HOX Gene werden im hämatopoetischen Progenitor-kompartiment des Menschen exprimiert. Die Expression der Gene am 3'-Ende des A und B Genclusters konzentriert sich auf das Kompartiment der primitiven Stammzellen (CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>niedrig</sup>), die Expression der 5' Gene ist dagegen gleichermaßen im primitiven oder reiferen Progenitor-kompartiment (CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>hoch</sup>), zu finden. Das Homeoboxgen HOXB4 gehört zu der Gruppe der 3' lokalisierten HOX Gene (Buske & Humphries 2000).

### **1.2.2 Die Homeobox und ihre Bedeutung für Homeoboxgene**

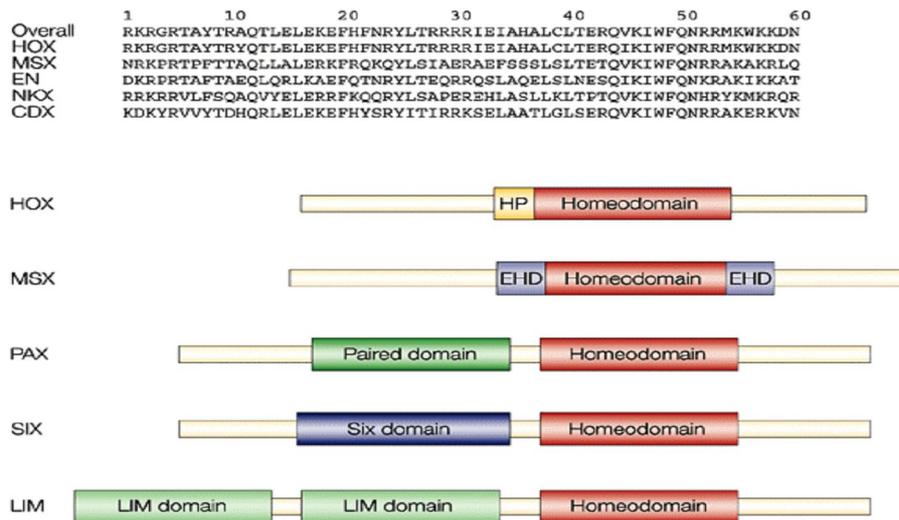
Die Homeobox ist ein hochkonserviertes Genfragment, welches für Peptide mit einer hohen Affinität für bestimmte DNA Sequenzen kodiert. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression und wird durch das Vorhandensein einer charakteristischen,

aus 183 Basenpaaren bestehende DNA Sequenz definiert. Diese Sequenz kodiert für einen relativ konservierten Bereich eines Proteins, der Homeodomäne (HD), die aus 61 Aminosäuren besteht und sequenzspezifisch an DNA bindet (Gehring, Affolter & Burglin 1994).

Diese Homeodomänen sind strukturell mit dem helix-turn-helix Motiv prokaryotischer DNA-bindender Proteine verwandt und besitzen sequenzspezifische DNA Bindungsaktivität (Buske & Humphries 2000). Sequenzen, die an die HD angrenzen, beeinflussen ferner deren Spezifität, indem sie Wechselwirkungen mit Proteinkofaktoren eingehen, welche die DNA-bindenden Eigenschaften beeinflussen.



**Abbildung 3: Darstellung der Struktur der Homeodomäne.** Trotz seiner beachtlichen Variation in der Primärsequenz, ist die dreidimensionale Struktur der Homeodomäne hochkonserviert. Sie entspricht 3  $\alpha$ -Spiralen, die einen relativ unstrukturierten amino-terminalen Arm aufweisen. Die Übereinstimmung in den Aminosäuren, die unter allen Homeodomänen keine Veränderungen aufzeigen, ist für die Aufrechterhaltung der strukturellen Intaktheit erforderlich und stellt essentielle Kontakte mit der DNA her. Aminosäuren, die von den verschiedenartigen Homeoproteinfamilien abweichen, führen zu Unterschieden in ihrer DNA - Spezifität und zu weiteren funktionellen Eigenschaften. Die Abbildung zeigt den DNA Komplex (Abate-Shen 2002).

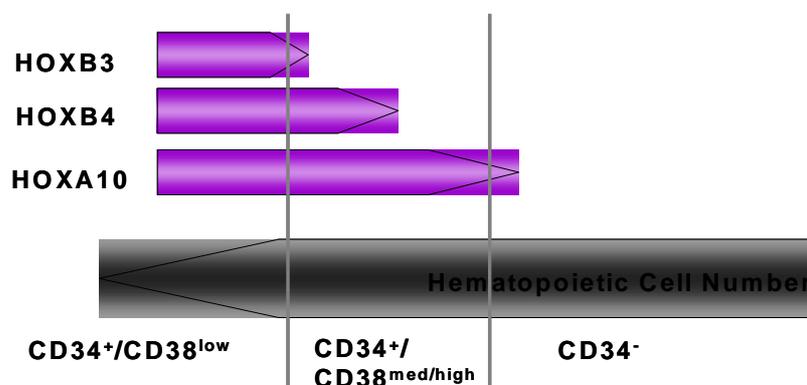


**Abbildung 4:** Die Abbildung stellt die unter Homeoproteinen auftretende Verschiedenheit dar. Die unterschiedlichen Klassen der Homeoproteine zeigen erhebliche Sequenzunterschiede innerhalb der Homeodomänen (Abb. 4 oben) und innerhalb der amino- und carboxy-terminalen Regionen, die dieser Domäne benachbart sind (Abb. 4 unten). Es wird angenommen, dass die Sequenzvielfältigkeit zu den funktionell unterschiedlichen Eigenschaften der Homeoproteine beiträgt. Dies erfolgt durch Bildung ausgeprägter DNA Bindungsspezifität, Begünstigung einzigartiger Protein-Protein Wechselwirkung und anderer Mechanismen. Funktionelle Vielfältigkeit kann unter anderem durch zusätzliche konservierte Domänen oder Motive entstehen, wie es insbesondere bei Homeoproteinfamilien vorkommt. HOX Proteine besitzen ein Hexapeptid (HP) Motiv - eine kleine Verlängerung von konservierten Restbeständen - das für Wechselwirkungen mit PBX Homeoproteinen verantwortlich ist und diese vermittelt. MSX Proteine besitzen ebenfalls eine kleine Erweiterung konservierter Aminosäuren, die der Homeodomäne anliegt und erweiterte Homeodomäne (EHD) genannt wird. Die Funktion dieser Proteine ist bislang unbekannt. PAX Proteine weisen eine zusätzliche DNA bindende Domäne auf, die unter ‚paired box‘ bekannt ist. Mitglieder der SIX Familie besitzen einen konservierten amino-terminalen Bereich, der als SIX Domäne bezeichnet wird. LIM Homeoproteine wurden nach dem Motiv benannt, welches mit Proteinen in Wechselwirkung tritt - die so genannte LIM Domäne (Abate-Shen 2002).

### 1.2.3 HOX Gen Expression in normalen und leukämischen hämatopoetischen Zellen

Zahlreiche Studien haben nun gezeigt, dass HOX Gene zusätzlich zu embryonalem Gewebe auch in reiferem Gewebe bei Wirbeltieren exprimiert werden; sowohl in normalem als auch neoplastischen Gewebe. Dies schliesst normales und neoplastisches Gewebe in Haut (Care, Silvani, Meccia, Mattia, Stoppacciaro, Parmiani, Peschle & Colombo 1996), Nieren (Barba, Magli, Tiberio & Cillo 1993), menschlicher Kolonschleimhaut (De Vita, Barba, Odartchenko, Givel, Freschi, Bucciarelli, Magli, Boncinelli & Cillo 1993; Wang, Hung, Koh, Cheong & Hooi 2001), Hoden (Watrin & Wolgemuth 1993) und hämatopoetischen Stammzellen

(Antonchuk, Sauvageau & Humphries 2002; Buske, Feuring-Buske, Antonchuk, Rosten, Hogge, Eaves & Humphries 2001; Giampaolo, Pelosi, Valtieri, Montesoro, Sterpetti, Samoggia, Camagna, Mastroberardino, Gabbianelli, Testa & . 1995; Schnabel, Jacobs & Cleary 2000) ein. Diese Studien brachten hervor, dass die Expression von HOX Genen in einer normalen Hämatopoese strikt reguliert wird. Sie unterscheidet sich in frühen Vorläuferzellen von der in reifen, differenzierten hämatopoetischen Stammzellen. HOX Gene der A, B und C Gruppe werden in unreifen CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert, während eine Transkription von HOX Genen der Gruppe D in diesem Progenitorpool nicht vorhanden ist (Buske & Humphries 2000). In dem reiferen CD34<sup>-</sup> Zellkompartiment fehlt eine Expression von HOX Genen (A, B und C) oder ist wesentlich herunterreguliert (Giampaolo, Pelosi, Valtieri, Montesoro, Sterpetti, Samoggia, Camagna, Mastroberardino, Gabbianelli, Testa & . 1995; Lawrence, Sauvageau, Humphries & Largman 1996). Daraus wird ersichtlich, dass HOX Gene eine grössere Rolle in primitiven hämatopoetischen Stammzellen zu spielen scheinen.



**Abbildung 5:** Expression von HOX Genen (HOX B3, B4 und A10) in menschlichen Knochenmarkszellen. HOX Gene werden in frühen Vorläuferzellen exprimiert. Ihre Expression nimmt im Laufe der Zelldifferenzierung ab.

Die Funktion von HOX Genen in der Hämatopoese wurde sowohl mit Hilfe von ‚knockout‘ Mausmodellen untersucht als auch mittels retroviraler Überexpression in HSZ aus muriner fetaler Leber und aus Knochenmark, sowie in menschlichen Vorläuferzellen der Nabelschnur analysiert. Eine verstärkte Expression von HOXB8/IL3 in Mäusen hatte eine aggressive transplantierbare Leukämie zur Folge. Im Gegensatz dazu trat bei rein IL-3 transplantierten Mäusen keine Leukämie auf (Perkins, Kongsuwan, Visvader, Adams & Cory 1990).

Leukämische Blasten vieler Patienten mit akuter Leukämie (AML) zeigen ein aberrantes HOX A Expressionsmuster. Dies stützt weiterhin die Auffassung, dass eine dysregulierte Expression von HOX Genen ein generelles Merkmal dieser Erkrankung sein könnte (Kawagoe, Humphries, Blair, Sutherland & Hogge 1999; Lawrence, Sauvageau, Ahmadi, Lopez, LeBeau, Link, Humphries & Largman 1995).

### **1.3 Das Homeoboxgen HOXB4**

#### **1.3.1 Bedeutung des Homeoboxgens HOXB4 für die Regulation muriner hämatopoetischer Stammzellen**

Als einer der entscheidenden molekularen Faktoren für die hämatopoetische Stammzellamplifikation wurde das Homeoboxgen HOXB4 identifiziert. HOXB4 gehört zu der hochkonservierten Familie der Homeoboxtranskriptionsfaktoren, die als entscheidende Regulatoren der normalen hämatopoetischen Entwicklung fungieren. Bei Störung ihres normalen Expressionsprofils sind sie an der Entstehung akuter Leukämien beteiligt. Wie oben schon kurz erwähnt, zählt HOXB4 zu den 3' - lokalisierten HOX Genen und wird selektiv nur im unreifen Stammzellkompartiment exprimiert (Buske & Humphries 2000). Die Expression von HOXB4 führt sowohl in der Maus als auch beim Menschen zu einer signifikanten Vermehrung Lang-zeit repopulierender Stammzellen, ohne die normale hämatopoetische Differenzierung der Zellen zu beeinträchtigen (Antonchuk, Sauvageau & Humphries 2001; Antonchuk, Sauvageau & Humphries 2002; Buske, Feuring-Buske, Abramovich, Spiekermann, Eaves, Coulombel, Sauvageau, Hogge & Humphries 2002; Sauvageau, Thorsteinsdottir, Eaves, Lawrence, Largman, Lansdorp & Humphries 1995; Thorsteinsdottir, Sauvageau & Humphries 1999). Experimentelle Strategien, wie der retrovirale Gentransfer oder das Ausschalten von Zielgenen mittels ‚Gene Targeting‘, erlaubte die funktionelle Analyse der regulativen Rolle der HOX Gene in der Hämatopoese. So bewirkte die retroviral induzierte Überexpression von HOXB4 in murinen Knochenmarkstromazellen einen selektiven Proliferationsvorteil für primitive Stammzellen, ohne myeloisch- oder lymphoid determinierte Progenitorzellpopulationen zu beeinflussen (Sauvageau, Thorsteinsdottir, Eaves, Lawrence, Largman, Lansdorp & Humphries 1995). Bemerkenswert ist weiterhin, dass die konstitutive Expression von HOXB4 den Stammzellgehalt in transplantierten Mäusen zu normalen Prätransplantationszahlen anheben kann, während letal bestrahlte Kontrollmäuse deutlich niedrigere Stammzellfrequenzen nach

Transplantation aufweisen. Auf der anderen Seite kommt es unter Expression von HOXB4 nach Erreichen der normalen Stammzellfrequenz nicht zu einer überschießenden Stammzellexpansion. Vielmehr erfolgt eine Stabilisierung der Stammzellfrequenz auf normalem Niveau, so dass selbst unter retroviral induzierter Expression die normalen Stammzellregulationsmechanismen erhalten bleiben (Antonchuk, Sauvageau & Humphries 2002; Thorsteinsdottir, Sauvageau & Humphries 1999).

### **1.3.2 HOXB4 und sein Kofaktor PBX**

Bei mehreren nicht gebündelten (non-clustered) HD Proteinen konnte gezeigt werden, dass sie für HOX Proteine als Kofaktoren wirken. Während der embryonalen Entwicklung werden sie zusammen mit den HOX Genen exprimiert und gehen mit diesen über eine konservierte Sequenz Wechselwirkungen ein. Einer dieser Kofaktoren ist das PBX Protein. PBX Gene werden weitgehend sowohl in fötalem als auch reifen Gewebe exprimiert. (Monica, Galili, Nourse, Saltman & Cleary 1991).

Trotz der wichtigen, funktionellen Rolle, die der Homeodomäne beigemessen wird, ist die Spezifität der einzelnen HOX Proteine nicht allein auf ihre spezifische DNA Bindung als monomäre Proteine *in vitro* zurückzuführen. HOX Proteine mit grundverschiedener Wirkung binden *in vitro* an sehr ähnliche DNA Motive, was nahe legt, dass Wechselwirkungen mit heterologen Kofaktoren für eine funktionelle Spezifität erforderlich sind. Das Non-HOX Homeoboxgen PBX scheint als Kofaktor insofern eine wichtige Rolle zu spielen, als dass es unter anderem die Bindungseigenschaften von HOX Proteinen der Klasse 1 an DNA modifiziert (Chang, Brocchieri, Shen, Largman & Cleary 1996). Acht der neun Hoxproteine der Homeoboxgene des Clusters B, folglich auch HOXB4, binden in Anwesenheit von Pbx1a kooperativ an Zielnukleotide und zwar unter Bedingungen, unter denen HOX und PBX Proteine alleine nicht oder nur minimal in der Lage sind eine Bindung einzugehen (Shen, Chang, Rozenfeld, Sauvageau, Humphries, Lu, Lawrence, Cleary & Largman 1996).

#### **1.4 Ablauf und Ziel der durchgeführten Experimente**

Die Expression von HOXB4 führt sowohl in der Maus als auch im Menschen zu einer signifikanten Vermehrung Lang-zeit repopulierender Stammzellen, ohne die normale hämatopoetische Differenzierung zu stören (Antonchuk, Sauvageau & Humphries 2001; Antonchuk, Sauvageau & Humphries 2002; Buske, Feuring-Buske, Abramovich, Spiekermann, Eaves, Coulombel, Sauvageau, Hogge & Humphries 2002; Sauvageau, Thorsteinsdottir, Eaves, Lawrence, Largman, Lansdorp & Humphries 1995; Thorsteinsdottir, Sauvageau & Humphries 1999). Der Mechanismus, der dieser Stammzellamplifikation zugrunde liegt, ist noch ungenau verstanden. Um Domänen des HOXB4 Gens charakterisieren zu können, welche die Aktivität in der Regulierung der Hämatopoese beeinflussen, wurden Mutationen in HOXB4 erzeugt, die Schlüsselemente des Gens modifizieren sollten. Als Basis für die Untersuchungen wurde eine HOXB4 cDNA aus dem Labor von Humphries RK in Kanada zur Verfügung gestellt, deren prolinreiche N-terminale Domäne ( $\Delta P$ ) deletiert war ( $\Delta P$ -HOXB4). Die Entdeckung spontaner Mutationen in humanen und murinen HOX Genen, z.Bsp. in HOXD13, die besondere dominante Phänotypen entstehen liessen (Goodman, Giovannucci-Uzielli, Hall, Reardon, Winter & Scambler 1998) führte unter anderem dazu, dass den Funktionen N-terminaler Domänen in HOX Genen mehr Beachtung beigemessen wurde. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Kofaktor Meis1 mit der N-terminalen Domäne von HOXA9 interagiert (Shen, Montgomery, Rozenfeld, Moskow, Lawrence, Buchberg & Largman 1997) und diese Wechselwirkung an der Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie (AML) beteiligt ist (Thorsteinsdottir, Kroon, Jerome, Blasi & Sauvageau 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass prolin-reiche Regionen in der N-terminalen Domäne bei der Klasse der ‚Paired – like‘ Homeoboxgenen konserviert ist und wahrscheinlich Funktionen in der transkriptionellen Aktivierung der Homeoproteine wahrnehmen (Sahr, Dias, Sanchez, Chen, Chen, Gudas & Baron 2002). Es erschien interessant, die Auswirkung einer einfachen N-terminalen  $\Delta P$  Deletion bzw. in Kombination mit jeweils einer weiteren Mutante in HOXB4 zu untersuchen. Daher wurden weitere Mutationen mittels molekularbiologischen Methoden in das Homeoboxgen eingeführt. Neben der  $\Delta P$  Deletion schliessen die Mutationen sowohl die C-terminale Domäne (C-DEL-Mutante), die DNA bindende Homeodomäne (N\_211\_S), die PBX bindende Domäne (W144A) als auch einen weiteren N-terminale Bereich (Nt-D30) des Gens ein. Die Herstellung der Mutanten sowie der Effekt auf die *in vitro* Proliferation von Knochenmarkzellen 5'FU vorbehandelter Mäuse sind eingehend im Methoden bzw.

Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben. Für die Expression der verschiedenen Mutanten wurde die Technik des retroviralen Gentransfers in primäre murine Knochenmarkzellen verwendet. Für eine anschließende Bestimmung der Transduktionseffizienz bzw. die Isolierung transduzierter Knochenmarkzellen wurde die Methode der Durchflusszytometrie angewandt.

Die Voraussetzung für den Transduktionsvorgang war die Herstellung eines retroviralen Virusüberstandes mittels Transfektion humaner Verpackungszelllinien (293-T Zellen). Bevor die virale Transduktion primärer muriner Stammzellen mit VCM (engl. Virus conditioned medium) des HOXB4-Wildtyps sowie der HOXB4 Mutanten durchgeführt wurde, ermittelten wir in einer Verdünnungsreihe den Virustiter, der von transfizierten 293-T Zellen produziert wurde. Ein *in vitro* Proliferationsversuch über eine Woche bzw. ein sich anschließendes  $\Delta$ CFU-S Experiment *in vivo* sollte dazu beitragen, einen Einblick in die Bedeutung der N-terminalen Domäne von HOXB4 zu gewinnen, in Hinblick auf dessen Eigenschaft, hämatopoetische Progenitorzellen *in vitro* zur Proliferation anzuregen bzw. Kurz-zeit repopulierende Stammzellen *in vivo* zu expandieren. Die Wirkung des HOXB4-Wildtyps, der  $\Delta$ P-HOXB4-Einfachmutante, sowie der  $\Delta$ P-HOXB4-Doppelmutanten auf das proliferative Verhalten unreifer Progenitorzellen *in vitro* und Kurz-zeit repopulierende Stammzellen *in vivo* sowie auf den zellulären Differenzierungsprozess *in vitro* wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht, beschrieben und diskutiert.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1. Materialien**

#### **2.1.1. Geräte**

Autoradiograph ABI-Prism 310	Applied Biosystems, Foster City, USA
Begasungsbrutschrank	Binder, Tuttlingen
Bestrahlungsanlage	Atomic Energy of Canada Limited, Canada
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Blockthermostat BT 1302	TLC, Crawly, UK
FACS Calibur	Becton Dickinson, San Jose USA
FACS Vantage	Becton Dickinson, San Jose USA
Elektrophoresekammer	PEQLAB GmbH, Erlangen
Inkubator	Binder, Tuttlingen
Inkubator-Schüttler Innova 4400	UniEquip, Martinsried
Laminar-Flow-Sterilbank	BDKLuft-und Reinraumtechnik, Deutschland
Leitz Diavert Inverses Mikroskop	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
PCR-Maschine GeneAMP PCR System 2400	PerkinElmer, Wellesley, MA, USA
Pipetus Accu	Hirschmann, Deutschland
Standzentrifuge Rotanta 46R	Helmer, Nobleville, IN, USA

Standzentrifuge Sigma 3K30	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Western Blot Gel Apparat	Bio-Rad, München
Zentrifugen, Rotanta 46 RC	Hettich, Tuttlingen

### **2.1.2 Reagenzien**

Acrylamid-Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Life Technologies, Paisley, UK
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Ammoniumpeoxidsulfat (APS)	Fluka, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, MO, USA
BSA	NEB, Beverly, MA, USA
dNTPs	Stratagene, La Jolla, CA
Ciprofloxacin	Bayer, Leverkusen
Dithiothreitol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	PAN Biotech, Aidenbach
ECL-/ECL+ Reagenz	Amersham
EDTA	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA

Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Life Technologies, Paisley, UK
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies, Paisley, UK
Fetal C Serum (FCS)	Life Technologies, Paisley, UK
5' Fluouracil	Medac, Wedel
Glycerin	Merck, Darmstadt
HBS	Sigma, St. Louis, MO, USA
HEPES	Sigma, St. Louis, MO, USA
Il 3	Tebu-bio Gmbh, Offenbach
Il 6	Tebu-bio Gmbh, Offenbach
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LB-Medium	GIBCOBRL, Grand Island,
Methanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
m-SCF	Tebu-bio Gmbh, Offenbach
Natriumacetat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumdeoxycholat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumfluorid	Sigma, St. Louis, MO, USA
(Natriumpyrophosphat)	Sigma, St. Louis, MO, USA
(Natriumvanadat)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Orthovanadat	Sigma, St. Louis, MO, USA

PBS	PAN Biotech, Aidenbach
PCR-Primer	Metabion, Martinsried
PCR Premix	Metabion, Martinsried
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Paisley, UK
PMSF	Sigma, St. Louis, MO, USA
Propidium-Iodin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Protaminsulfat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Protein G-Sepharose	Amersham Biotech, Schweden
SDS	Serva, Heidelberg
Sigma-H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
TEMED	Bio-Rad
Tris-HCL	Merck, Darmstadt
Triton X100	Merck, Hohenbrunn
Trypan-Blau	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trypsin /EDTA	PAN Biotech, Aidenbach
TWEEN	Merck, Hohenbrunn

### **2.3.1. Reaktionskits**

Mutagenese Kit, QuickChange XL	Stratagen, La Jolla, CA
QiaQuick® Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAfilter® Plasmid Maxiprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Biorad-Protein-Assay	Bio-Rad, München
Taq Cycle Sequencing Kit	Stratagen, La Jolla, CA

### 2.1.4. Puffer und Lösungen

Trenngel 12% :

4,0 ml Acrylamid  
2,5 ml 1,5 M Tris-HCL  
pH 8,8  
0,1 ml 10% SDS  
0,15 ml 10% APS  
0,035ml TEMED  
3,5ml dH<sub>2</sub>O

Sammelgel 4%:

1,8ml Acrylamid  
3,5 ml 1 M Tris pH 6,8  
0,1 ml 10% SDS  
0,15 ml 10% APS  
0,035ml TEMED  
dH<sub>2</sub>O ad 9,4 ml

Laemmli Puffer (2,5ml):

0,6 g Dithorthreitol  
0,15 g SDS  
0,06 g TRIS  
0,75 ml Glycerin

nach vollständiger Lösung:

0,75 ml Glycerin  
0,25µg Bromphenolblau  
dH<sub>2</sub>O ad 1,75 ml

Zell-Lyse Puffer (RIPA):

1 M HEPES pH 7,5  
5 M Natriumchlorid  
200mM EGT, 50% Glycerin  
Triton X-100  
Natriumfluorid  
Tetranatriumdiphosphat-  
dekahydrat als Puffer dH<sub>2</sub>O  
10 µg/ml Aprotinin

Elektrophoresepuffer (Tankpuffer):	0,1 M PMSF 0,1 M Orthovanadat 18 g TRIS , 86,4 g Glycin in 480 ml bidest lösen 6 g SDS, dH <sub>2</sub> O ad 120 ml
Transferpuffer (10x):	72,75 g TRIS 36,63 g Glycin 0,475 g SDS Methanol ad 200ml
TBS Puffer (10x):	121 g TRIS 176 g NaCl 1,6 l dH <sub>2</sub> O ad pH 8,0 durch Zugabe von HCl
TBS-T Puffer:	30 ml TBS Puffer (10x) 0,15 ml Tween dH <sub>2</sub> O ad 270 ml
Blotto 5 Prozent:	5 Prozent Magermilch- pulver in TBS-T-Puffer
TAE-Puffer (Endkonzentration):	0.04 M Tris-Acetate 0.001 M EDTA
Telleyesnickzky`s Lösung:	450ml EtOH, 25ml Eisessig 25 ml Formaldehyde
5-Fluoruracil:	50 mg/ml Lösung von Medac.
5-FU Injektionslösung:	Ausgangslösung in 4 ml PBS verdünnt

### 2.1.5 Enzyme und Marker

#### Restriktionsenzyme

Ecori I	NEB, Beverly, MA, USA
XHO I	NEB, Beverly, MA, USA
XBA	NEB, Beverly, MA, USA
PML I	NEB, Beverly, MA, USA
Dpn I	QuickChange XL, Stratagen®
T4-DNA Ligase	NEB, Beverly, MA, USA
PfuTurbo DNA Polymerase	QuickChange XL, Stratagen®

Die Enzyme wurden mit den entsprechenden Reaktionspuffern sowie mit BSA geliefert. Die PfuTurbo DNA Polymerase wurde zusammen mit Reaktionspuffer und dNTP Mix geliefert.

#### DNA-Standard

1 kb ladder	NEB, Beverly, MA, USA
SeeBlue® Plus 2:	gefärbter Proteinstandard Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 2.1.6 Expressionsplasmide

pMSCV 2.1  
pMSCV 2.1/ $\Delta$ P -Hb4  
pMSCV 2.1/ $\Delta$ P Hb4N\_211\_S  
pMSCV 2.1/ $\Delta$ P Hb4W144A  
pMSCV 2.1/ $\Delta$ P Hb4C-DEL  
pMSCV 2.1/ $\Delta$ P Hb4DEL-N30

pcDNA 6/V5-HisA

pcDNA6/V5-HisA/ ΔP Hb4DEL-Nt30

### 2.1.7. Oligonukleotidprimer

Die Sequenzen sind 5'-3'-Richtung angegeben. Alle als Sequenzen aufgeführten Oligonukleotide wurden von Metabion in Martinsried hergestellt.

ΔP- hb4\_n\_211\_s sense: -CAA GAT CTG GTT CCA **GAG** CCG GCG CAT GAA GTG-

ΔP- hb4\_n\_211\_s antisense: -CAC TTC ATG CGC **CGG** CTC TGG AAC CAG ATC TTG-

ΔP- hb4\_W 144 A\_ sense: -CGT CGT CTA CCC **CGC** GAT GCG CAA AGT TCA C-

ΔP- hb4\_W 144 A\_ antisense: -GTG AAC TTT GCG CAT **CGC** GGG GTA GAC GAC G-

ΔP- hb4\_C-DEL sense: -GTG GAA AAA AGA CCA **CTA** GTT GCC CAA CAC CAA G-

ΔP-hb4\_C-DEL antisense: -CTT GGT GTT GGG CAA **CTA** GTG GTC TTT TTT CCA C-

ΔP-hb4\_Nt\_D30 sense:-CGG AAT TCA TGA GCT ACC ACT CGC CCG G-

ΔP-hb4\_Nt\_D30 antisense:-CCG TCT AGA TCT CCA GGT TAA TTC GTA GAG C-

### Sequenzierprimer für das ΔP-HOXB4/Doppelmutanten Konstrukt:

MIG\_seq sense: -CCC TTG AAC CTC CTC GTT CGA CC-

MIG\_seq antisense: -CCT AGG AAT GCT CGT CAA G-

### 2.1.8. Antikörper

Anti-flag, muriner monoklonaler

Sigma, St. Louis, MO, USA

Erstantikörper

Sekundärantikörper anti-Maus, verknüpft mit

Santa Cruz, California, USA

Merettichperoxidase (HRP)

Anti-HOXB4, Goat, monoklonaler Antikörper

Santa Cruz, California, USA

Sca-1	BD PharMingen, Heidelberg
c-kit	BD PharMingen, Heidelberg
Gr-1	BD PharMingen, Heidelberg
Mac-1	BD PharMingen, Heidelberg
Ter119	BD PharMingen, Heidelberg
B220	BD PharMingen, Heidelberg

### **2.1.9. Bakterien**

Escherichia coli Epikurian XL 1 Blue

### **2.1.10. Zelllinien**

293-T	humane embryonale Nierenkarzinomzellen
3T3	Fibroblasten
Primäre, murine Knochenmarkzellen	C3HxC57BL Spendermäuse

### **2.1.11. Kulturmedien**

Escherichia Coli	LB-Medium
293-T Zellen	DMEM (1,0g/l Glucose) 10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin Ciprofloxacin

3T3	DMEM (1,0g/l Glucose) 10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin Ciprofloxacin
Primäre murine Knochenmarkzellen aus Spendermäusen: (C3H x C57BL)	DMEM (1,0g/l Glucose) 10% FBS Ciprofloxacin 10ng/ml mIL-6 6ng/ml mIL-3 100ng/ml SCF (muriner Stammzellfaktor)

### **2.1.12 Tiere und Tierhaltung**

Als Spender- und Empfängermause wurden gesunde acht bis zwölf Wochen alte weibliche und männliche (C3H x C57BL) Mäuse verwendet. Alle Tiere wurden im Tierstall der GSF Großhadern gezüchtet und unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur betrug  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% und einem hell-dunkel-Zyklus von zwölf Stunden.

### **2.1.13. Weitere Materialien**

ECL Western Blotting Analyse System	Amersham, Freiburg
FACS Röhren	BD Falcon, Heidelberg
Filter (0,45 $\mu\text{m}$ )	Millipore, Schwalbach
Kanülen 0.5 x 25 mm	BD Microlanc, Heidelberg
Kanülen 0.55x 25 mm	BD Microlanc, Heidelberg
Pipetten (5, 10, 25ml)	Corning, Schubert und Weiss, München
Reagiergefäße	Eppendorf, Wessling- Berzdorf

Zellkulturschalen 10, 15 cm

Corning, Schubert und  
Weiss, München

Zellkulturschalen ( 6 Vertiefungen)

Sarstedt, Nümbrecht

Zellkulturschalen, Susp.Zellen 10 cm

BD Falcon, Heidelberg

Zellschaber, 25 cm

Sarstedt, Nümbrecht

Gel-Blotting Membran

Schleicher und Schnell,  
Dassel

#### **2.1.14 Programme**

Durchflusszytometrie  
und FACS

CellQuest Version 3,1  
BD Biosciences, San Jose,  
USA

Tabellenkalkulation

Microsoft, Excel,  
Redmond, WA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Sowohl die verwendeten Zelllinien, als auch die primären Knochenmarkzellen wurden unter Standardbedingungen (5% CO<sub>2</sub>, 37° Celsius, 96 % relative Feuchte) inkubiert. Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Bestimmung der Zellzahl geschah mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und nach Ausschluss toter Zellen mittels Färbung durch Trypan-Blau.

#### 2.2.1.2 Auftauen von Zellen

Die Zellkonserven in den Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff heraus im Wasserbad bei 37° C schnell aufgetaut, bis der Inhalt geschmolzen war und anschließend auf Eis überführt. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in ein gekühltes 15 ml Falcon Röhrchen überführt und auf Eis mit gekühltem Auftaumedium schrittweise (in steigenden Volumina von 0,1 ml bis 1 ml) verdünnt. Die Zellen wurden für zehn Minuten bei RPM' 980 zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in einer Dichte  $1 \times 10^6$ /ml in Kultur genommen.

#### 2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden trypsiniert, in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und bei RPM' 980 abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in Aufnahme-medium resuspendiert und die Zellen gezählt. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde zu der Zellsuspension 1 ml Einfriermedium tropfenweise, aber zügig, hinzupipettiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen gefüllt und diese in einen Cryo-Freezing Container gegeben; in diesem werden die Zellen um 1°C/min heruntergekühlt. Dazu wurde der Container für mindestens vier Stunden bei -80°C inkubiert und die Konserven danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Reaktionsansätze

#### 2.2.2.1.1 Ziel gerichtete Mutagenese

10 x Reaktionspuffer	5µl
Quick solution	3µl
cDNA (3,84µg/µl)	1µl in 99µl dH <sub>2</sub> O (38,4 ng)
Oligonukleotid Primer (sense)	1,5µl, 30 pmol entsprechend
Oligonukleotid Primer (antisense)	1,5µl, 30 pmol entsprechend
dNTP Mix	1µl
dH <sub>2</sub> O	39µl (Endvolumen von 50µl)
PfuTurbo DNA Polymerase (2.5U/µl)	1µl

#### Programm der PCR Maschine (Ziel gerichtete Mutagenese):

Denaturierung	95° Celsius	60 Sekunden
Aktivierung der Polymerase	95° Celsius	50 Sekunde
Hybridisierung	60° Celsius	50 Sekunden
DNA-Synthese	68° Celsius	9 Minuten
Halten bei	4° Celsius	

Die Aktivierung der Polymerase, das Anheften der Primer an die Doppelstrang DNA Matrize und die Elongation wurden 18 Mal wiederholt.

#### 2.2.2.1.2 Polymerasenkettenreaktion

10 x Reaktionspuffer	5µl
50mM MgSO <sub>4</sub>	2µl
10mM dNTP	1,5µl
cDNA (3,84 µg/µl)	1,5µl
Primer (sense)	2µl
Primer (antisense)	2µl
Enhancer (2x)	10µl
dH <sub>2</sub> O	Endvolumen 50µl
Pfx-Polymerase	0,5µl

### Programm der PCR Maschine (Polymerasekettenreaktion):

Denaturierung	95° Celsius	60 Sekunden
Aktivierung der Polymerase	95° Celsius	50 Sekunden
Anheften der Primer	60° Celsius	50 Sekunden
Elongation	68° Celsius	10 Minuten
Halten bei	4° Celsius	

Die Aktivierung der Polymerase, das Anheften der Primer an die Doppelstrang DNA Matrize und die Elongation wurden 18 Mal wiederholt.

### 2.2.2.1.3 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

1 ) PCR Produkt	
2) pcDNA6/V5-His A	1µl
3) MSCV2.1.	1µl
4) pcDNA6/V5-His A-hb4_DEL_30N	4µl
Restriktionsenzym	jeweils 1µl
10x Reaktionspuffer	10µl
10x BSA	10µl
mH <sub>2</sub> O ad	100µl

Inkubation bei 37° Celsius für acht Stunden.

Der Verdau der DNA unter 1-4 erfolgte in vier voneinander unabhängigen Reaktionsansätzen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen und Stabilisierungspuffern. Das verdaute PCR Produkt und der pcDNA6/V5-His A-Vektor wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und nach Gelextraktion in einer ersten Ligationsreaktion ligiert. In einer zweiten Ligationsreaktion wurde das pcDNA6/V5-His A-ΔP- hb4 \_Del\_N30 Konstrukt mit dem MSCV2.1 Vektor ligiert.

### 2.2.2.1.4 Ligation

1) PCR Produkt (ΔP-hb4_Del_N30)	6µl
2) pcDNA6/V5-His A	2µl
3) pcDNA6/V5-His A- hb4ΔP _Del_N30	
4) MSCV2.1.	

Ligase	1 µl
Ligase Puffer	1 µl

Sowohl die Ligation der verdauten Ansätze 1 und 2, als auch die Ligation der verdauten Ansätze 3 und 4 erfolgten über Nacht bei einer Temperatur von 4° Celsius.

#### 2.2.2.1.5 Transformation kompetenter Escherichia coli (Epikurian XL 1 Blue)

25 µl kompetente Bakterien  
 5 µl verdaute DNA  
 5 µl KCM  
 15 µl H<sub>2</sub>O  
 200 µl LB Medium (ohne Ampicillin)  
 30 Minuten Inkubation bei 4° Celsius  
 1 Minute Inkubation bei 42° Celsius  
 2 Minuten Inkubation bei 4° Celsius  
 Zugabe von 200 µl LB Medium (ohne Ampicillin)  
 1 Stunde Inkubation bei 37° Celsius im Schüttler  
 Ausstrich auf Ampicillin enthaltende LB-Agar-Platte  
 Inkubation über Nacht bei 37° Celsius

#### 2.2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Photometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm

#### 2.2.2.1.7 DNA-Sequenzanalyse

##### Ansatz:

Plasmid DNA	5 µg
Primer (sense)	1 µl (10 pmol entsprechend)
Primer(antisense)	1 µl (10 pmol entsprechend)
PCR-Premix	4 µl
dH <sub>2</sub> O	Endvolumen 10 µl

### Aufreinigung:

PCR Produkt auf 100 µl Volumen verdünnen

Natrium-Acetat (steril filtriert)	10 µl
100% Ethanol	250 µl
70% Ethanol	500 µl
DNA in 20µl dH <sub>2</sub> O steril lösen	

### Bedingungen der Sequenzreaktion: (25 Zyklen)

Denaturierung	96° Celsius	10 Sekunden
Hybridisierung	58° Celsius	5 Sekunden
DNA-Synthese	60° Celsius	4 Minuten

Es wurden fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleotide in die DNA eingebaut. Nach der PCR wurde die DNA mit Ethanol gefällt, gereinigt und in H<sub>2</sub>O steril gelöst. Die Sequenz wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Analyse auf einem Autoradiographen erhalten.

### 2.2.2.2 Zielgerichtete Mutagenese

Als Vorlage der Mutationen, die mittels eines ‚zielgerichteten‘ Mutagenese Kits hergestellt worden sind, diente die 709 Bp grosse ΔP-HOXB4-Flag cDNA, die uns freundlicherweise aus dem Labor von Humphries RK in Kanada zur Verfügung gestellt wurde. Diese wurde in die Hpa I Stelle der ‚multiple cloning sites‘ des modifizierten Stammzell Virus (MSCV)-basierenden retroviralen Vektors MSCV 2.1 kloniert. Dabei ist die cDNA 5' von der ‚internal ribosomal entry site‘ (IRES) Sequenz des ECM Virus positioniert, die das Gen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP, Clontech, Palo Alto, CA) verbindet, das als Selektionsmarker fungiert. Ein entscheidender Vorteil der ‚zielgerichteten‘ Mutagenese besteht darin, dass diese an doppelsträngiger DNA in nahezu allen Plasmiden durchgeführt werden kann; folglich auch in dem oben genannten MSCV2.1 Vektor, ohne dass ΔP-HOXB4-flag in spezialisierte Vektoren kloniert werden muss. Zunächst wurden ‚sense‘ (forward) Primer synthetisiert, deren Nukleotidsequenzen die jeweils gewünschte Punktmutation aufwiesen und die dem Beginn der Polymerisation dienten. Um eine Mutation in einer als Doppelstrang vorliegenden DNA zu gewährleisten, wurden den ‚sense‘ Primern komplementäre antisense (reverse) Oligonukleotide erstellt, die den komplementären Strang von 5' nach 3' rückläufig replizieren sollten. Mit Hilfe der Pfu-Polymerase wurden die Oligonukleotide in das neu synthetisierte Plasmid inkorporiert, ohne von dem Enzym ersetzt zu werden. Die Synthese des veränderten

Plasmids erfolgte durch methylierte Nucleotide, so dass durch einen anschließenden Verdau mit dem methylysensitiven Enzym Dpn I, für 1 Stunde bei 37° C, selektiv das nicht mutierte Mutterplasmid eliminiert werden konnte. Zwecks Vermehrung der mutierten Plasmide wurden kompetente Escherichia coli (Epikurian XL 1Blue) transformiert. Um eine wirksame Expression des Resistenzgens gegen Ampicillin zu erreichen, das sich auf dem MSCV2.1 Vektor befindet, wurden die Bakterien nach dem Hitzeschock für eine Stunde bei 37° Celsius inkubiert, bevor sie schließlich auf einer Ampicillin enthaltenden Agarplatte ausplattiert wurden. Nach zwölf Stunden wurden Kolonien mit einer Impföse entnommen, jeweils in 1,5 ml LB-Medium inokuliert und für weitere zwölf Stunden bei 37° Celsius unter fortwährender Agitation inkubiert. Die Präparation der reinen Plasmid DNA aus der Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des DNA Miniprepkits nach Anleitung des Herstellers. Eine geringe Menge der gewonnenen DNA jedes untersuchten Klons wurde mit den Restriktionsenzymen Ecori I und XHO I vier Stunden lang verdaut und anschließend auf einem Gel mit 1% Agarosegehalt analysiert. Die DNA wurde mittels Sequenzierung auf die gewünschte Punktmutation hin untersucht. Die Kolonie des Klons, in dessen Sequenz die Mutation bestätigt werden konnte, wurde von einer vorher angelegten Masterplatte erneut mit einer Impföse entnommen, in 2 ml ampicillinhaltigem LB-Medium für zwei Stunden inokuliert. Um eine ausreichende Amplifikation der gewünschten Plasmid DNA zu erhalten, wurde die Bakterienkolonie über Nacht in 100 ml ampicillinhaltigem LB-Medium unter konstanter Agitation inokuliert und mit Hilfe des Maxiprepkits nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Nach erneuter Verdauung und Bestimmung der DNA Konzentration mit der Ultravioletabsorptionsspektrometrie wurde die mutierte DNA nochmals sequenziert.

### 2.2.2.3 Mutagenese mit Polymerasekettenreaktion

Als Matrize für die Polymerasekettenreaktion diente das Expressionsplasmid MSCV2.1/ $\Delta$ P-HOXB4 (flag). Es wurden zwei Primer synthetisiert, um ein Fragment zu amplifizieren, das die gewünschte Deletion der Nucleotide 1-90( $\Delta$ P-HOXB4\_Nt\_D30) aufweist und in dessen Sequenz das Stoppcodon (tag) von  $\Delta$ P-HOXB4 entfernt worden ist. Die Nucleotidsequenz des „sense (forward) Primers“ ist zu dem 3' 5' Strang ab Position 31 in der Aminosäurenabfolge komplementär und enthält eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuclease XHO I. Die Sequenz des „antisense“ (reverse) Primers weist neben einer Schnittstelle für die Endonuclease Ecori I die oben erwähnte Mutation des Stoppcodons auf. Die Deletion der N-terminalen Aminosäuren resultieren in einem Verlust der ebenfalls N-terminal gelegenen flag

Region. Diese ist entscheidend für die spezifische, antikörpervermittelte Markierung des Proteins  $\Delta$ P-HOXB4 (flag). Eine Klonierung des N-terminal mutierten Gens in den pCDNA6/V5-His A Vektor, der eine für Histidin kodierende Sequenz enthält, gewährleistete erneut eine spezifische Isolierung des Proteins mit einem monoklonalen Antikörper. Für ein präparatives Gel wurde der gesamte PCR Ansatz mit den Restriktionsenzymen Ecori I/XBA sowie der pCDNA6/V5-His A Vektor mit den Enzymen Ecori I/PML I verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Fragmente wurden mit Hilfe des QiaQuick®Gelextraktionskits aus dem Gel eluiert. Es folgte über Nacht die Ligation mit der DNA Ligase. Das Vektorrückgrat enthält eine für Ampicillin kodierende Sequenz. Nach Transformation kompetenter Escherichia coli (Epikurian XL 1 Blue) und Inokulierung der Kolonien wurde die DNA-Präparation durchgeführt. Kleine Mengen DNA wurden nach Verdau mit den Enzymen XHO und Ecori auf einem 1% Agarosegel aufgetragen und analysiert. Zur Bestätigung der Einführung der Mutation wurde die DNA des Klons mit der exakten Größe auf dem Agarosegel sequenziert. Der Klonierung folgte eine Subklonierung in die multiple, cloning site' des modifizierten, murinen Stammzellvirus (MSCV) 2.1 Vektor. Das Expressionsplasmid pCDNA6/V5-His A / $\Delta$ P-HOXB4\_Nt\_D30 wurde mit den Restriktionsenzymen XHO I und PML I, der (MSCV) 2.1.Vektor mit XHO I und Ecori I verdaut. Eine weitere Ligation für zwölf Stunden, eine sich anschließende Transformation, sowie die Plasmid-DNA Isolierung und Sequenzierung ergab die Klonierung von  $\Delta$ P-HOXB4\_Nt\_D30 in den MSCV 2.1 Vektor. Aufgrund dessen, dass die Doppelmutante  $\Delta$ P-HOXB4\_Nt\_D30 in einem späteren Verlauf hergestellt worden ist, konnte sie in die *in vitro* und *in vivo* Experimente dieser Arbeit nicht eingeschlossen werden.

#### 2.2.2.4 Das HOXB4 Wildtypkonstrukt

Die 0,8 kb ( 755 BP) grosse cDNA des HOXB4-Wildtyps wurde freundlicherweise aus dem Labor von Humphries RK in Kanada zur Verfügung gestellt. Die Klonierung in den MSCV 2.1 Vektor erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die cDNA von  $\Delta$ P-HOXB4 (s. 2.2.2.2).

### 2.2.3 Funktionelle Analyse

#### 2.2.3.1 Transiente Transfektion von 293 T-Zellen zur Produktion von retroviralen Virusüberständen

Die transiente, also vorübergehende Transfektion diente dazu, durch Einbringen von fremder DNA in 293-T Zellen, virusenthaltendes Medium (engl. Virus conditioned medium, VCM ) zu produzieren, womit später primäre Knochenmarkzellen transduziert wurden. 293-T Zellen wurden in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^7$  in 20 ml DMEM, 10% FBS auf einer 15 cm Corning Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium der Platte, die zu 60 bis 70% konfluent war, vier Stunden vor Transfektion erneuert. Zunächst wurde 10µg DNA (modifizierter, retroviraler, Vektor mit gewünschtem Konstrukt) in 333µl sterilem, endotoxinfreiem H<sub>2</sub>O Sigma Wasser verdünnt. Für die Bereitstellung retroviraler Proteine, die für eine Produktion infektiöser Viruspartikel unabdingbar sind, wurde der DNA 30µg Ecopac (packaging retroviral genes) in Sigma Wasser beigelegt. Nach tropfenweiser Zugabe von 33µl Calciumchlorid (2.5 M) wurde das Reaktionsgemisch langsam zu 333µl sterilem HBS (pH= 7,2) pipettiert. Nach drei bis vierminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die 293-T Zellen tropfenweise mit der Lösung bedeckt. Nach zwölf Stunden Inkubationszeit unter Standardbedingungen wurden 20 ml Medium erneuert. Nach weiteren vierundzwanzig Stunden Inkubationszeit wurde der virale Überstand mit einem Filter (0,45µm) von Resten der Zelllinie isoliert und in Aliquots (10ml, 8ml, 8ml) umgehend bei einer Temperatur von 80°C eingefroren. Die restlichen 2 ml des Überstandes wurden in unterschiedlichen Verdünnungen zur Messung des Virustiters in NIH 3T3 transduziert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Nach der Gewinnung des Virusüberstandes wurden die 293-T Zellen mit frischem, angewärmtem Medium vorsichtig bedeckt und der Vorgang der Virusfiltration nach weiteren zwölf, vierundzwanzig und achtundvierzig Stunden wiederholt. Die VCM Aliquots wurden in weiteren Experimenten für einen retroviralen Gentransfer in primäre, murine Stammzellen verwendet.

#### 2.2.3.2 Titration von retroviralen Virusüberständen

Durch diese Methode wurden die von den 293-T Verpackungszellen produzierten Virusüberständen auf ihren Titer kontrolliert. In eine Platte mit sechs Vertiefungen wurden pro Vertiefung  $1 \times 10^5$  NIH 3T3 Fibroblasten Zellen in je 2 ml DMEM eingesät. Vor dem Versetzen mit Überstand am zweiten Tag wurde das Medium entfernt. Jeweils eine Reihe mit

fünf Vertiefungen wurde einem Zellklon zugeordnet. Die Zellen des ersten wells wurden nicht transduziert und dienten als Negativkontrolle in der FACS-Analyse. Die Zellen der zweiten Vertiefung einer jeden Reihe wurden am Tag der Transduktion gezählt und für die Berechnung des Titers (s. Formel) verwendet. Die Zellen der dritten Vertiefung einer jeden Reihe wurden unverdünnt mit 500µl Virusüberstand, die Zellen der vierten Vertiefung mit einer 1/3 Verdünnung und die Zellen der fünften Vertiefung mit einer 1/10 Verdünnung transduziert. Nach dem Versetzen der Zellen mit Virusüberstand (VCM) wurde in Vertiefung drei bis fünf jeweils 5µg/ml Protaminsulfat hinzugefügt. Nach vier Stunden wurden in die Vertiefungen jeweils 2 ml erwärmtes DMEM Medium pipettiert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie vorbereitet und anschliessend der Anteil an GFP (grün fluoreszierendes Protein) positiven Zellen gemessen. Die Formel für die Berechnung des Titers: %GFP<sup>+</sup> Zellen x 3T3 Zellen /well(d0) x 2 = Titer/ml.

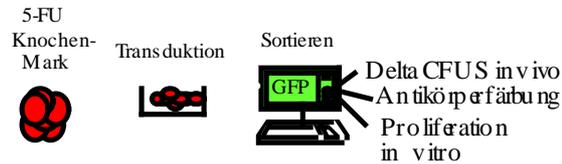
#### 2.2.3.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wird die Fluoreszenz einzelner Zellen in einem Flüssigkeitsstrom in Abhängigkeit von der Absorption und der Fluoreszenzintensität der eingesetzten Farbstoffe gemessen. Da einzelne Zellen detektiert werden, können Zellpopulationen quantifiziert werden und damit das Mass eines retroviralen Gentransfers. Die zu analysierenden Zellen wurden bei RPM' 980 zentrifugiert, in PBS 10% FBS resuspendiert und nach erneutem Zentrifugieren in 500µl FACS Puffer (PBS, FBS 2% Propidiumiodid stock 1000x) aufgenommen. Für eine Bestimmung der GFP Expression wurden die Zellen direkt nach der Aufnahme in Puffer gemessen und gegebenenfalls sortiert.

#### 2.2.3.4 Transduktion primär muriner Stammzellen

Die Zuchtmäuse wurden im Tierhaus der GSF gehalten und versorgt. Den Mäusen wurde autoklaviertes Stroh als Nahrungsmittel zur Verfügung gestellt. Das Trinkwasser enthielt Ciprofloxacin und Acetessigsäure. Die Tiere wurden in individuell gestalteten Tierkäfigen gehalten. C3H x C57BL Spendermäuse primärer Knochenmarkzellen waren > acht Wochen alt. 150 mg 5-Fluorouracil (5-FU) pro kg an Mausgewicht wurde diesen Spendermäusen injiziert. Das Ziel der Injektion bestand darin, sich teilende Zellen zu eliminieren und auf diese Weise hämatopoetische Progenitorzellen anzureichern.

Am fünften Tag nach der 5-FU Verabreichung wurden diese Mäuse geopfert. Mit einem Serum angereicherten Medium folgte daraufhin eine Spülung von Femur und Tibiaknochen der Donormäuse. Auf diese Weise konnten Knochenmarkzellen gewonnen werden. Das Knochenmark wurde zwei Tage in einem Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) das mit 15% FBS angereichert war, in Kultur gehalten. Diesem Medium wurde ein Cytokin Cocktail, bestehend aus 10 ng/ml mIL-6, 6 ng/ml mIL-3 und 100 ng/ml muriner Stammzellfaktor (SCF), beigefügt, das die Knochenmarkzellen zwei Tage prästimulieren sollte. Am dritten Tag der Prästimulierung wurde die erste Transduktion der primär murinen Knochenmarkzellen durchgeführt. In einem Wasserbad von 37 °C wurde der aus der transienten Transfektion gewonnene und bei -80 °C eingefrorenen retrovirale Virusüberstand (VCM) aufgetaut. Corning Kulturplatten wurden jeweils mit 3 ml VCM bedeckt und für 45 Minuten inkubiert. Dieser Vorgang wurde zweimalig durchgeführt. Während der zweiten Inkubation der Kulturplatten wurden die prästimulierten Knochenmarkzellen aus dem Medium gewonnen. Nach Zugabe von 4 ml DMEM 15% FBS Medium wurden diese bei RPM' 900 für zehn Minuten zentrifugiert und in 500 ml VCM resuspendiert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen mit VCM verdünnt, um eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Knochenmarkzellen pro ml VCM zu erzielen. Nach Replattierung der transduzierten Zellen in Corning Platten wurde neben einer Zytokinkombination (SCF, IL3 und IL6) zusätzlich Protaminsulfat in einer Konzentration von 5 µg/ml hinzugefügt, bevor die Platten über Nacht inkubiert wurden. An den folgenden zwei Tagen wurden die Knochenmarkzellen erneut nach dem gleichen, gerade beschriebenen Protokoll transduziert, um die Transduktionseffizienz zu steigern. Die Transduktionsperiode wurde am dritten Tag beendet. Die Knochenmarkzellen wurden aus den Platten unter zu Hilfenahme eines Zellschabers herausgelöst, ihre Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt und bei RPM' 900 für zehn Minuten zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in DMEM 15% FBS Medium. In einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml Medium erfolgte die Replattierung der transduzierten Zellen in Petriplatten. Unter Zugabe der Zytokinkombination SCF, IL3 und IL6 wurden die Zellen 48 Stunden in Kultur gehalten und bei 37° Celsius inkubiert. Schliesslich erfolgte eine Analyse und Sortierung der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.



**Abbildung 6** : Bildliche Darstellung der geschilderten Transduktion und Aufreinigung GFP positiver, transduzierter muriner Progenitorzellen .

### 2.2.3.5 Proliferationsexperiment muriner Progenitorzellen *in vitro*

Nach Transduktion muriner Progenitorzellen mit dem GFP positiven Kontrollvektor, der Einfachmutante  $\Delta P$ -HOXB4, sowie der drei Doppelmutanten wurden die Zellen in einer gleichen Konzentration von  $1 \times 10^6$  pro Arm plattiert. Über einen Zeitraum von einer Woche wurden sie unter Zugabe einer Zytokinkombination aus SCF, IL3, IL6 bestehend, in Kultur gehalten und bei  $37^\circ \text{C}$  inkubiert. Am Tag sieben des Proliferationsexperiments wurde die Zellzahl jeder einzelnen Probe bestimmt.

### 2.2.3.6 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung

Immunphänotypische Analysen von Einzelzellsuspensionen aus transduzierten Knochenmarkzellen wurden mittels Durchflusszytometrie angefertigt. Mit dieser Methode können Einzelzellen, die mit fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern gefärbt worden sind, identifiziert und die Expression von Antigenen auf der zellulären Oberfläche untersucht werden. Nach Kultivierung der transduzierten Progenitorzellen in einem zytokinhaltigen (SCF, IL 3, IL 6) Medium für eine Woche wurden die Zellen für die Analyse vorbereitet:  $5 \times 10^4$  Zellen eines Ansatzes wurden in ein spezielles FACS Röhrchen (BD, Falcon) überführt. Die vorher nach Anleitung des Herstellers (BD Pharmingen) mit PBS (+2% FBS) verdünnten Antikörper wurden hinzupipettiert und jeder Ansatz jeweils für zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit PBS+2% FBS gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper aus dem Ansatz zu isolieren. Schliesslich wurden die Zellen in 200  $\mu\text{l}$  FACS Puffer (PBS+FBS 2% + Propidiumiodid 0,1%) aufgenommen und gemessen. Das Propidiumiodid (PI) im FACS Puffer färbte tote Zellen an, so dass diese beim Messen ausgegrenzt werden konnten. Es wurden monoklonale Anti-Maus Antikörpern verwendet. Sca-1, Gr-1, Ter-119 Antikörper sind mit R-Phycoerythrin (PE)

konjugiert, c-kit, Mac-1, B220 Antikörper besitzen eine Allophycocyanin (APC) Markierung. PE liegt im Absorptionsbereich von 488nm und besitzt ein Emissionsmaximum bei 585, APC im Absorptionsbereich von 633nm bei einem Emissionsmaximum von 660.

#### 2.2.3.7 Kolonie bildender Milzversuch (CFU-S) bzw. $\Delta$ CFU-S

C3H x C57 Bl Spendermäusen wurden fünf Tage vor ihrer Knochenmarkentnahme mit einer intravenösen Injektion von 150 mg/kg 5-Fluorouracil (5 FU) versehen. Nach der in 2.2.3.4 beschriebenen retroviralen Transduktion der primär murinen Knochenmarkzellen konnten die Zellen aufgrund ihrer GFP Expression und mittels zu Hilfenahme einer FACS Analyse aufgereinigt werden. Die transduzierten, GFP positiven Zellen wurden direkt nach dem Sortierungsprozess letal bestrahlten C3H x C57 Bl Empfängermäusen in die Schwanzvene injiziert. Das Auftreten von CFU-Zellen wurde mittels Bestimmung der makroskopisch sichtbaren Kolonien, die sich am zwölften Tag post Injektionem in der Milz gebildet hatten, nach Immersion in Telleyesnickzky's Lösung quantifiziert.  $\Delta$ -CFU-S beschreibt die Durchführung des Milzversuches (CFU-S) nach einer einwöchigen *in vitro* Kultivierung der transduzierten, GFP positiven sortierten Zellen in einem zytokinhaltigen (SCF, IL3, IL6) Medium, bevor sie letal bestrahlte Empfängermäusen in die Schwanzvene injiziert werden.

### 2.2.4 Proteinchemische Methoden

#### 2.2.4.1 Ganzellextrakte aus eukaryoten Kulturzellen

Nach Transfektion von  $5 \times 10^5$  293 T Zellen pro Platte und jeweils 6 Vertiefungen mit der gewünschten cDNA wurden nach zwölf Stunden das Medium gewechselt und nach weiteren zwölf Stunden durch Zugabe von Lysepuffer (RIPA) Ganzellextrakte hergestellt. Der Puffer enthielt sowohl Protease- als auch Phosphataseinhibitoren. Der Ansatz wurde in einmal PBS resuspendiert, gewaschen und bei 4° Celsius für dreißig Minuten unter Drehbewegung lysiert. Nach jeweils zehn Minuten wurde der Ansatz mit dem Vortexgerät durchgemischt, bevor er dann erneut bei 4° Celsius und 14000 rpm für dreißig Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand enthielt Proteine, deren Konzentration mit dem BioRad-Assay gemessen und weiteren Analysen zugeführt wurden.

#### 2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BioRad-Assay

Der BioRad Versuch beruht auf der Bradfordmethode zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte nach Zugabe von 1µl des Proteinlysats, verdünnt in 199µl dH<sub>2</sub>O, zu 800µl BioRad-Reagenz durch photometrische Messung der Absorption bei 595nm und durch Errechnung an Hand von Eichgraden, die mit BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen erstellt wurden.

#### 2.2.4.3 Immunpräzipitation

Eine Immunpräzipitation wurde durchgeführt, um das HOXB4-Wildtyp Protein bzw. die Proteine der Einfach-(ΔP-HOXB4 flag) und Doppelmutanten aus den zuvor transfizierten 293-T Zellen spezifisch zu isolieren. In einem ersten Arbeitsschritt wurden Proteinlysate durch Lyse von Kernextrakten gewonnen. In einem zweiten Schritt wurde die Protein G-Sepharose (aus Streptokokken), die als Festphase den Fc-Teil des monoklonalen IgG Flag-Antikörpers bindet, mit 1xHNTG Puffer gewaschen und aufbereitet. Zunächst erfolgte die Antigenisolierung durch eine vierstündige Inkubation eines Reaktionsansatzes, der sich aus 200µl Proteinlysate, 22µl G-Sepharose und 0,5µl monoklonalen Anti-Flag- bzw. Anti-HOXB4 (für das Wildtypprotein) Antikörper zusammensetzte. Nach drei Waschschritten mit 500µl HNTG wurde jeweils nach Zentrifugieren bei RPM' 14000 der Überstand mit den ungebundenen Proteinen verworfen. Das Pellet mit dem Sepharose G-Antigen-Antikörperkomplex wurde in 20µl Laemmli-Puffer resuspendiert. Die Inkubation bei 100° Celsius im Heizblock für acht Minuten sollte zu einer Ablösung des Sepharose-G Antikörper Komplexes von dem spezifisch gebundenen Antigen führen. Der Ansatz wurde schließlich fünf Minuten bei RPM' 13000 zentrifugiert. 20µl des Überstandes, der das spezifische Protein enthalten sollte, wurden mit 5 µl Ladepuffer versehen, bevor sie mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert wurden.

#### 2.2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten die Proteine ihrer Molekülmasse nach in vertikalen Gelapparaturen aufgetrennt werden. Vor der Elektrophorese wurden abhängig von der Proteinkonzentration 20-30µg Proteinlysate (jeweils maximal 20µl der Lysate pro Spur) mit 5µl Ladepuffer versehen und nach fünf Minuten langer

Denaturierung bei 95° Celsius für zehn Sekunden in Eis abgekühlt. Es folgte die Auftrennung in einem elektrischen Feld mit einer Spannung von 100 Volt für 1,5-zwei Stunden. Die Abschätzung des Molekulargewichtes geschah anhand eines gefärbten Proteinstandards („SeeBlue® Plus 2’).

#### 2.2.4.5 Western Blot

Nach Vollendung der Auftrennung der Proteinlysate wurden diese von dem SDS Gel auf eine Gel-Blotting Membran transferiert, die kurz zuvor mit Transferpuffer benetzt wurde. Der Transfer wurde in Puffer bei 100 Volt und konstant bleibenden 250mA für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran in fünf Prozent Blottopuffer für eine Stunde bei 4° Celsius unter Agitation blockiert, um einer Bindung unspezifischer Proteine vorzubeugen. In dem gleichen Puffer erfolgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden Erstantikörper (Anti-flag bzw. Anti-HOXB4) in einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht bei 4° Celsius unter konstanter Bewegung. Nach drei Waschsritten in TBS-T Puffer wurde die Membran mit einem Merettichperoxidase konjugierten und 1:20000 (in fünf Prozent Blottopuffer) verdünnten anti-Maus Zweitantikörper inkubiert, der an den FC Teil des Anti-flag Primärantikörpers bindet. Nach einer Stunde Inkubation unter Raumtemperatur wurde die Membran erneut in TBS-T Puffer dreimal gewaschen. Nach Inkubation mit den Lösungen des ECL-Systems (ECL-/ECL+) von Amersham wurden die gebundenen Antikörper durch Exposition mit einem ECL-Röntgenfilm sichtbar gemacht.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Herstellung der verschiedenen Mutanten des Homeoboxgens HOXB4**

HOX Proteine besitzen eine so genannte Homeodomäne, die zu einer spezifischen, monomären Bindung von Proteinen an DNA führt. Sie ist eine aus 60 Aminosäuren bestehende, konservierte Sequenz, die aus einem flexiblen N-terminalen Arm besteht, gefolgt von drei alpha Helices (Gehring, Qian, Billeter, Furukubo-Tokunaga, Schier, Resendez-Perez, Affolter, Otting & Wuthrich 1994), wobei die dritte Helix als Erkennungshelix zahlreiche Kontakte mit der DNA entlang der ‚major groove‘ aufweist. Es überwiegen drei mögliche Varianten für HOX Proteine, monomär an DNA zu binden. Sowohl HOX Proteine der Paraloggruppen 2-8 (Antp-Klasse), die das HOXB4 Protein einschließen, als auch Paraloggruppen 9-13 (Abd-B-Klasse) erkennen und binden DNA im Kern über eine 5' TAAT 3' Nukleotidsequenz (Phelan, Rambaldi & Featherstone 1995). Während die Funktion der Homeodomäne in HOX Proteinen ausgiebig untersucht wurde, ist im Vergleich dazu die Rolle der nicht zur Homeodomäne gehörenden Bereiche in HOX Genen weniger Beachtung geschenkt worden (Mortlock, Sateesh & Innis 2000).

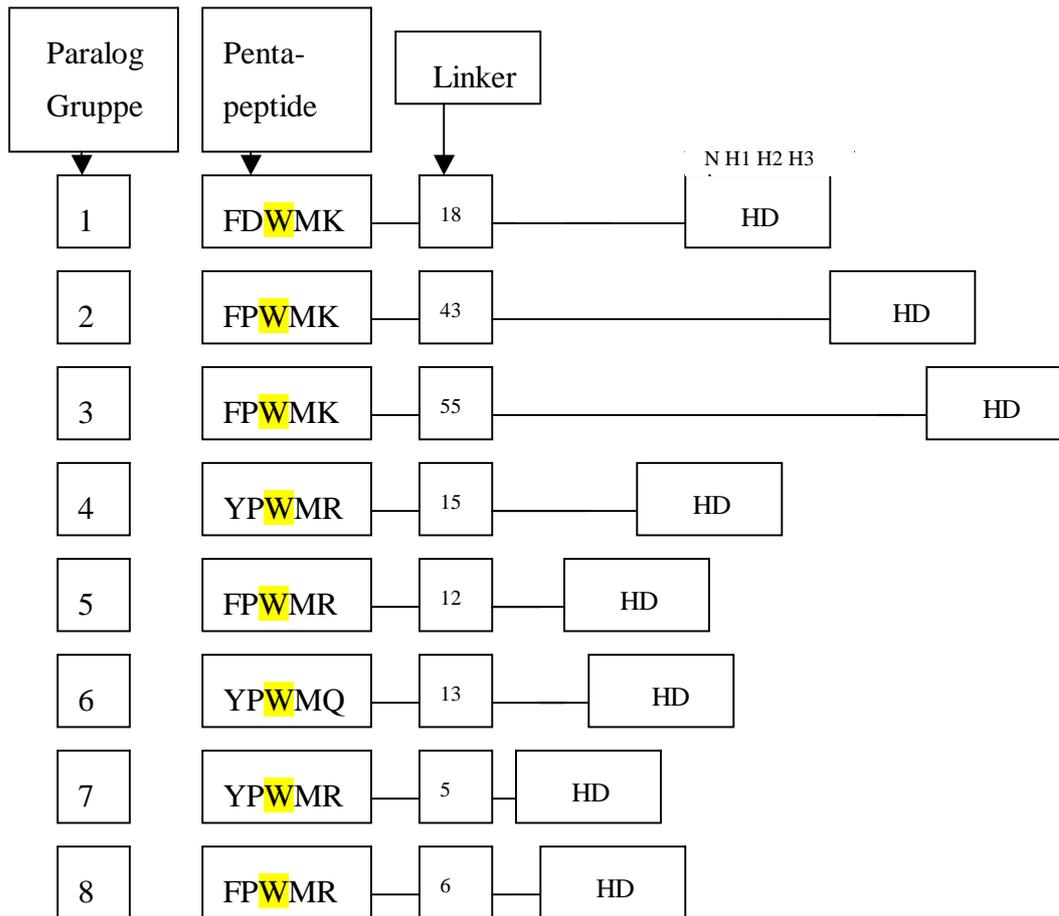
#### **3.1.1 Herstellung der DNA-bindungsinaktiven $\Delta P$ -HOXB4-N-211-S Doppelmutante**

Die Aminosäure Asparagin (N), die sich an Position 51 innerhalb der definierten Homeodomäne befindet, spielt in der Erkennungshelix bezüglich der spezifischen Erkennung von DNA Zielbindungsstellen eine Schlüsselrolle (Shanmugam, Featherstone & Saragovi 1997). Durch den Austausch der Base Adenin an Position 2 in dem für die Amid-Aminosäure Asparagin<sup>211</sup> (N) kodierenden Basentriplett AAC gegen die Base Guanin ergab sich über die Transkription des Triplets AGC ein Aminosäureaustausch zur Hydroxyl-Aminosäure Serin (S) in der Homeobox, die keine DNA Bindungsaktivität mehr aufweisen sollte. Diese DNA bindungsinaktive Mutante wurde ausgehend von der  $\Delta P$ -HOXB4 Einfachmutante durch gezielte Mutagenese generiert und durch Sequenzierung bestätigt ( $\Delta P$ -HOXB4 -N\_ 211\_S Mutante).

### **3.1.2 Herstellung der $\Delta P$ -HOXB4-W144A PBX Doppelmutante**

Ein entscheidender Faktor für die Wechselwirkung zwischen HOX und PBX Proteinen ist das konservierte Pentapeptidmotiv (siehe Abb. 7), das N-terminal der Homeodomäne, durch einen Linker von dieser getrennt, bei vielen HOX Proteinen gefunden wurde (Phelan, Rambaldi & Featherstone 1995). Zwei Aminosäuren (Tryptophan, Methionin), die innerhalb der Pentapeptid Domäne hochkonserviert sind, scheinen für die Formung des HOX-PBX Komplexes benötigt zu werden (Shen, Chang, Rozenfeld, Sauvageau, Humphries, Lu, Lawrence, Cleary & Largman 1996). Es erschien sinnvoll, eine der hochkonservierten Aminosäuren mittels Punktmutation auszutauschen, in der Absicht, eine Protein-Protein Bindung zwischen HOXB4 und PBX zu verhindern. Erneut wurde mittels ‚zielgerichteter Mutagenese‘ sowohl die Base Thymin an Position 1 als auch die Base Guanin an Position 2 des Triplets, das der Kodierung der aromatischen Aminosäure Tryptophan (W) zu Grunde liegt, durch die Basen Guanin an Position 1 und Cytosin an Position 2 ausgetauscht. Das sich daraus ableitende Kodon GCG resultierte nach Transkription in der Sequenz der aliphatischen Aminosäure Alanin (A). Eine Sequenzierung bestätigte die gewünschte Mutation  $\Delta P$ -HOXB4-W144A. (s. Material und Methoden).

**Das PBX1 interagierende  
Motiv**



**Abbildung 7:** Das PBX interagierende Pentapeptidmotiv mit seiner hochkonservierten Aminosäure Tryptophan (W) (Phelan, Rambaldi & Featherstone 1995).

**3.1.3 Herstellung der C-terminal deletierten Doppelmutante  $\Delta$ P-HOXB4 -C-DEL**

Durch den Austausch der Base Adenin an Position 1 in dem für die basische Aminosäure Lysin (K) kodierende Basentriplett AAG gegen die Base Thymin ergab sich das Triplett TAG, das als Stoppkodon bei der Proteinsynthese zu einem Abbruch der Translation führt. Das mittels ‚zielgerichteter Mutagenese‘ (s. Material und Methoden) veränderte Basentriplett ist an Position 222 in der Aminosäuresequenz des HOXB4 Gens lokalisiert, C-terminal nach der Homeodomäne gelegen. Durch das Einfügen eines Stoppkodons an der genannten Position kommt es in der Proteinsynthese des Gens zu einem Verlust der letzten 29 C-terminal gelegenen Aminosäuren. Eine Sequenzierung bestätigte die Insertion des Triplets TAG und somit die gewünschte C-terminal deletierte Doppelmutante  $\Delta$ P-HOXB4 -C-DEL.

### 3.1.4 Herstellung der $\Delta P$ -N-terminal deletierten Doppelmutante $\Delta P$ -NtD30

Die in dem Abschnitt Material und Methoden eingehend beschriebene Polymerasen-Kettenreaktion führten zu einem Verlust von 90 Nukleotiden des N-terminalen Armes von HOXB4, die für die ersten 30 Aminosäuren des Proteins kodieren. Die Flag Erkennungsstruktur des Proteins, deren Kodierung durch eine Sequenz erfolgt, die N-terminal lokalisiert ist, fällt somit weg. Um dem Protein des Konstruktes HOXB4/NtD30 eine neue Erkennungsstruktur zu verleihen, wurde mittels Subklonierung eine Sequenz gewonnen, die für Histidin kodiert. Aufgrund dessen, dass die Doppelmutante **E** in einem späteren Verlauf hergestellt worden ist, konnte sie in die *in vitro* und *in vivo* Experimente dieser Arbeit nicht eingeschlossen werden( s.Material/Methoden).

## 3.2 Übersicht über das HOXB4 Gen und seine Mutanten

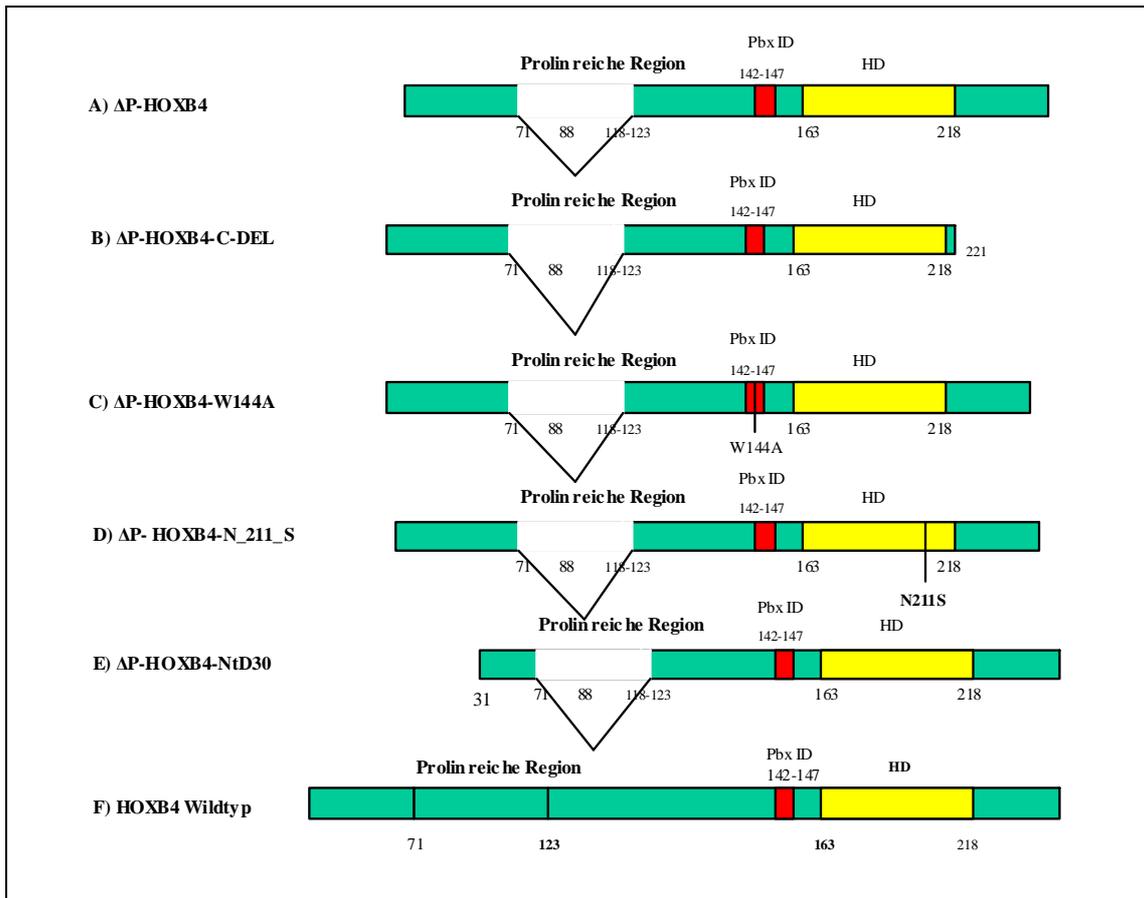
### 3.2.1 Anordnung des HOXB4 Gens in seinem retroviralen Vektor

Der retrovirale Vektor enthält die für die Integration und die Transkription notwendigen LTR Sequenzen und das für die Verpackung notwendige  $\Psi$ -Element. Bei zwei Transgenen, HOXB4 und GFP (grün fluoreszierende Protein), wird das zweite Gen über eine 'internal ribosome entry site' (IRES) transkribiert.



**Abbildung 8:** Retrovirale Vektorstruktur von HOXB4

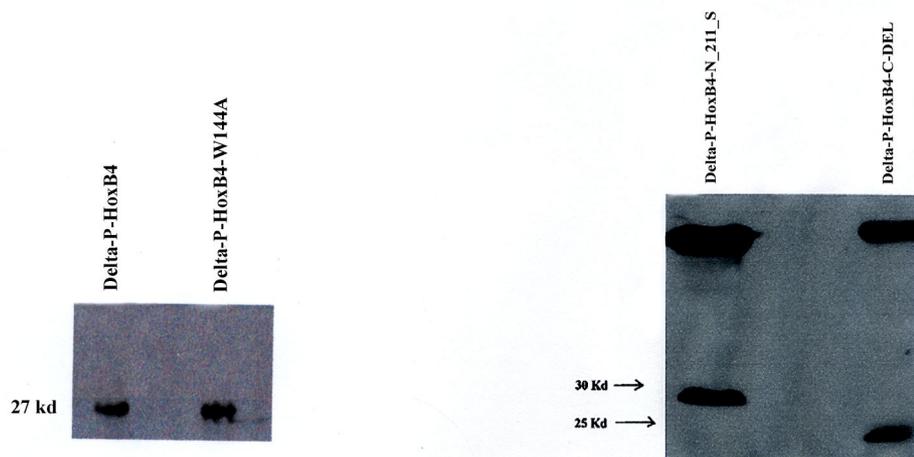
### 3.2.2 Anordnung der Mutationen innerhalb des HOXB4 Gens



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des HOXB4-Wildtyps, seiner  $\Delta P$ -Einfachmutante und der  $\Delta P$ -Doppelmutanten.

Die N-terminale  $\Delta P$  Deletion der Mutanten umfasst 47 Basenpaare. Die Wirkung des HOXB4-Wildtyp, der HOXB4 Einfachmutante **A** und der Doppelmutanten **B**, **C** und **D** auf primäre murine Progenitorzellen und Kurz-zeit repopulierende murine Stammzellen wurde anschliessend in weiteren Versuchen getestet.

### 3.3 Darstellung der Proteinexpression des HOXB4-Wildtyps, der $\Delta P$ -HOXB4 Einfach- und Doppelmutanten ( $\Delta P$ -HOXB4-W144A, $\Delta P$ -HOXB4-N211S und $\Delta P$ -HOXB4-C-DEL).



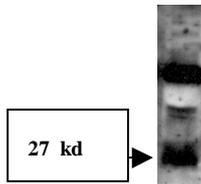
**Abbildung 10:**

Expressionsniveau von  $\Delta P$ -HOXB4 und der Doppelmutante der PBX interagierenden Domäne (**W144A**). Nach Transfektion in 293-T Zellen wurden Ganzelleextrakte gewonnen. Mittels Immunpräzipitation konnte das spezifische  $\Delta P$ -HOXB4 Protein und die Doppelmutante  $\Delta P$ -HOXB4-**W144A** isoliert werden. Nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf einem 12% Trenngel wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Antikörper gegen die Flagregion (24 BP) von  $\Delta P$ -HOXB4 inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte mittels Chemiluminiszenz. Die Grösse des  $\Delta P$ -HOXB4-Flag Proteins (733 BP) und des  $\Delta P$ -HOXB4-W144A (733 BP) beträgt 26,9 kd.

**Abbildung 11:**

Expressionsniveau der Homeodomänen Mutante  $\Delta P$ -HOXB4-**N\_211\_S** und der C-terminalen Mutante  $\Delta P$ -**HOXB4-C-DEL** von HOXB4. Nach Transfektion in 293-T Zellen wurden die Proteine auf einem 12% Trenngel aufgetrennt und ebenfalls, nach Übertragung auf eine Membran, mit dem Flag-Antikörper (24 BP) inkubiert. In Abbildung 11 ist das  $\Delta P$ -HOXB4-N\_211\_S-Flag Protein (733 BP) in seiner Grösse von 26,9 kd dargestellt. Die Grösse des  $\Delta P$ -HOXB4-C-DEL-Flag Proteins (643 BP) beträgt 23,6 kd.

## HOXB4-Wildtyp



### Abbildung 12:

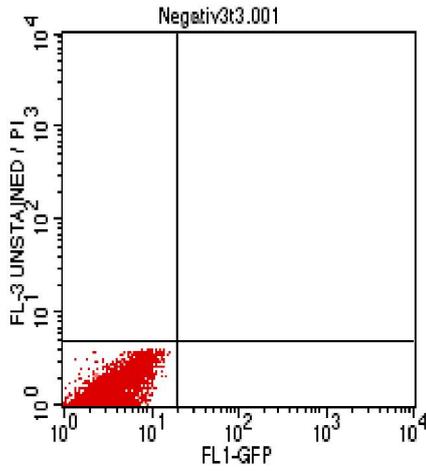
Expressionsniveau des HOXB4-Wildtyp Proteins. Nach Transfektion in 293-T Zellen wurde das Protein auf einem 10% Trenngel aufgetragen und nach Übertragung auf eine Membran mit einem spezifischen, gegen HOXB4 gerichteten Antikörper inkubiert. In Abbildung 12 ist das HOXB4-Wildtypprotein (753 BP) mit seiner Grösse von 27,6 kd dargestellt.

## 3.4 Funktionelle Analysen

### 3.4.1 Virusüberstandanalyse

Die Effizienz der transienten Transfektion von 293-T Zellen mit  $\Delta$ P-HOXB4, der Doppelmutanten  $\Delta$ P-HOXB4-W144A,  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S und  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL konnte in einem Titerversuch mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt werden. Wie in dem Materialien/Methodenteil beschrieben, wurde die Virustitration der  $\Delta$ P-HOXB4 und der Doppelmutanten sowohl unverdünnt, als auch in einer 1/3 und 1/10 Verdünnung durchgeführt.

**Negativ Kontrolle**



**Quadranten Statistik**

Quad	%Gated	%Total
------	--------	--------

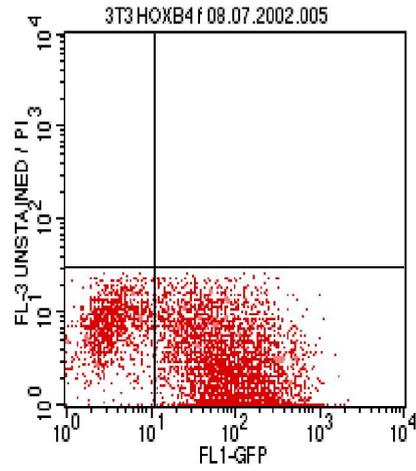
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	100.00	54.56
LR	0.00	0.00

**Abbildung 13:**

**Negativkontrolle**

0% der gemessenen Zellen sind transfiziert (GFP negativ).

**ΔP-HOXB4 Unverdünnt**



**Quadranten Statistik**

Quad	%Gated	%Total
------	--------	--------

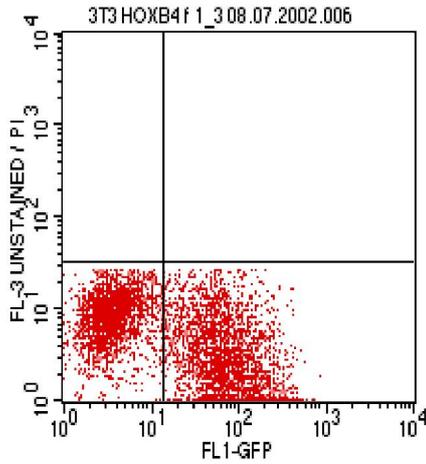
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	17.69	12.58
LR	82.31	58.54

**Abbildung 14:**

**ΔP-HOXB4-Unverdünnt**

82.31 % der gemessenen, lebenden Zellen sind transfiziert (GFP positiv).

**$\Delta$ P-HOXB4 1:3 Verdünnt**



**Quadranten Statistik**

Quad	%Gated	%Total
------	--------	--------

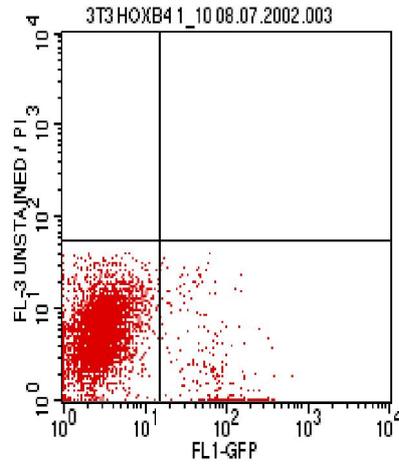
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	45.14	28.76
LR	54.86	34.95

**Abbildung 15:**

$\Delta$ P-HOXB4 1:3

54.86 % der gemessenen, lebenden Zellen sind transfiziert (GFP positiv).

**$\Delta$ P-HOXB4 1:10 Verdünnt**



**Quadranten Statistik**

Quad	%Gated	%Total
------	--------	--------

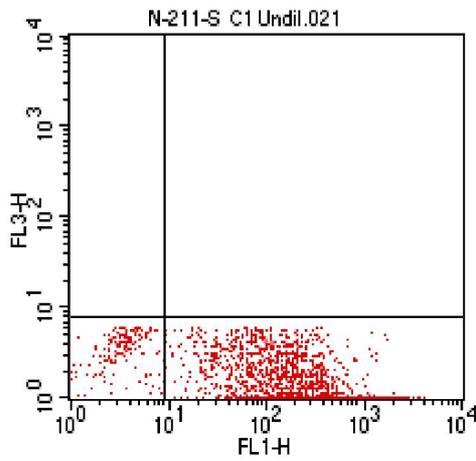
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	95.84	60.59
LR	4.16	2.63

**Abbildung 16:**

$\Delta$ P-HOXB4 1:10

4.16 % der gemessenen, lebenden Zellen sind transfiziert (GFP positiv).

**$\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211</sub>S Unverdünnt**



**Quadranten Statistik**

Quad	%Gated	%Total
------	--------	--------

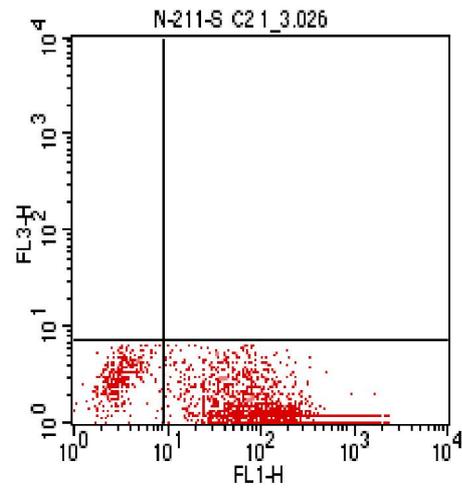
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	5.89	2.92
LR	94.11	46.62

**Abbildung 17:**

**$\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211</sub>S Unverdünnt**

94.11 % der gemessenen, lebenden Zellen sind transfiziert (GFP positiv).

**$\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211</sub>S 1:3 Verdünnt**



**Quadranten Statistik**

Quad	%Gated	%Total
------	--------	--------

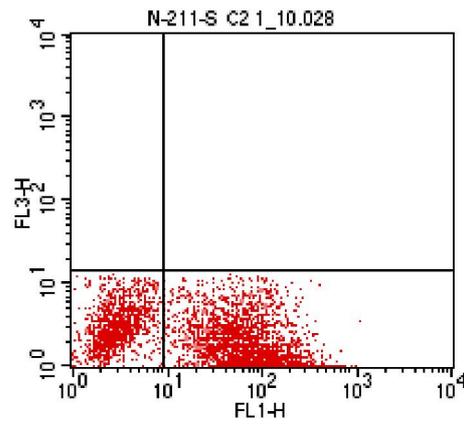
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	8.67	5.52
LR	91.33	58.11

**Abbildung 18:**

**$\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211</sub>S 1:3**

91.33 % der gemessenen, lebenden Zellen sind transfiziert (GFP positiv).

## $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S 1:10 Verdünnt



### Quadranten Statistik

Quad	%Gated	%Total
------	--------	--------

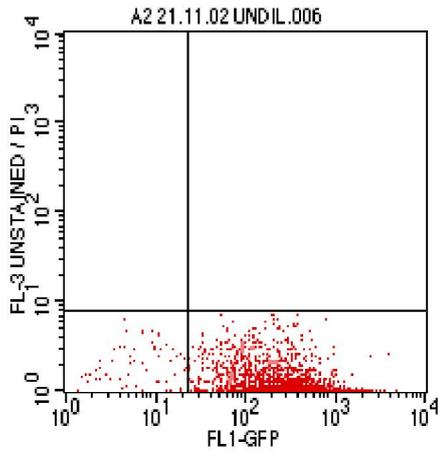
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	32.11	26.30
LR	67.89	55.60

### Abbildung 19:

$\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S 1:10

67,89 % der gemessenen, lebenden Zellen  
sind transfiziert (GFP positiv).

**$\Delta$ P-HOXB4-W144A Unverdünnt**



**Quadranten Statistik**

Quad	% Gated	% Total
------	---------	---------

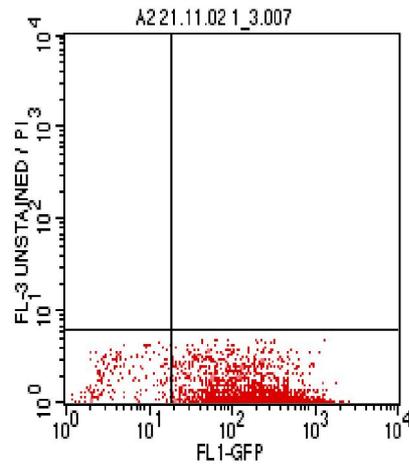
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	2.07	1.22
LR	97.93	57.62

**Abbildung 20:**

$\Delta$ P-HOXB4-W144A Unverdünnt

97.93 % der gemessenen,  
lebenden Zellen sind transfiziert (GFP positiv).

**$\Delta$ P-HOXB4-W144A 1:3 Verdünnt**



**Quadranten Statistik**

Quad	% Gated	% Total
------	---------	---------

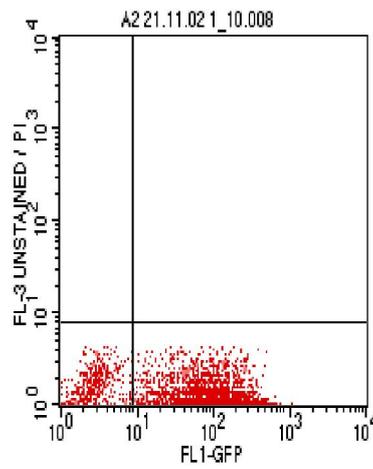
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	5.53	3.64
LR	94.47	62.24

**Abbildung 21:**

$\Delta$ P-HOXB4-W144A 1:3

94.47 % der gemessenen, lebenden Zellen  
sind transfiziert (GFP positiv).

## $\Delta$ P-HOXB4-W144A 1:10 Verdünnt



### Quadranten Statistik

Quad	% Gated	% Total
------	---------	---------

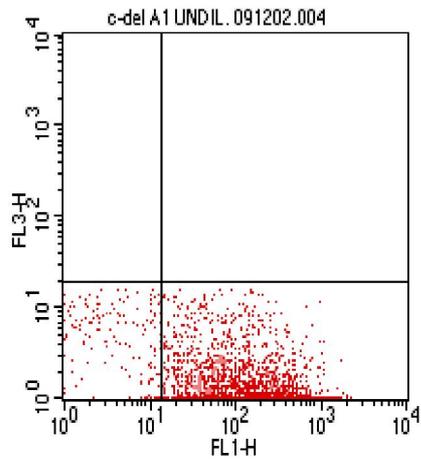
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	15.50	8.36
LR	84.50	45.56

### Abbildung 22:

$\Delta$ P-HOXB4-W144A 1:10

84.50 % der gemessenen, lebenden Zellen sind transfiziert (GFP positiv).

**$\Delta$ P-HOXB4-C-DEL Unverdünnt**



**Quadranten Statistik**

Quad	% Gated	% Total
------	---------	---------

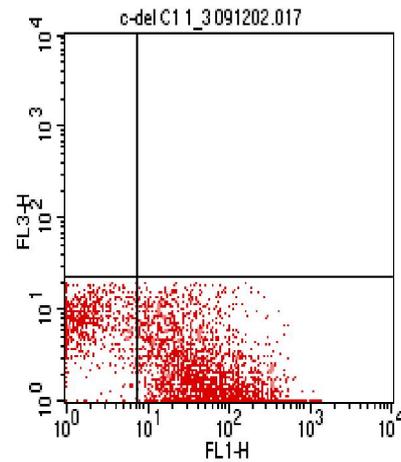
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	2.72	1.27
LR	97.28	45.34

**Abbildung 23:**

**$\Delta$ P-HOXB4-C-DEL Unverdünnt**

97.28 % der gemessenen, lebenden Zellen sind transfiziert (GFP positiv).

**$\Delta$ P-HOXB4-C-DEL 1:3 Verdünnt**



**Quadranten Statistik**

Quad	% Gated	% Total
------	---------	---------

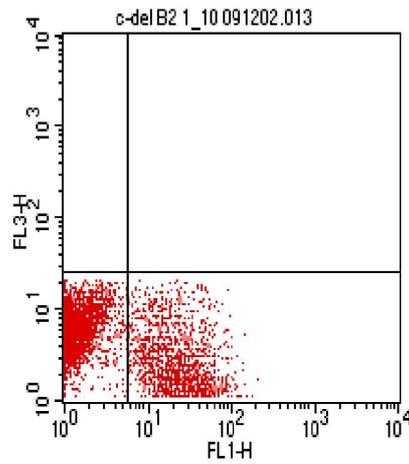
UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	10.96	7.35
LR	89.04	59.71

**Abbildung 24:**

**$\Delta$ P-HOXB4-C-DEL 1:3**

89.04 % der gemessenen, lebenden Zellen transfiziert (GFP positiv).

### $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL 1:10 Verdünnt



#### Quadranten Statistik

Quad	% Gated	% Total
------	---------	---------

UL	0.00	0.00
UR	0.00	0.00
LL	15.50	8.36
LR	31.39	16.15

#### Abbildung 25:

##### $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL 1:10

31.39 % der gemessenen, lebenden Zellen  
sind transfiziert (GFP positiv).

Es folgt eine Titerberechnung der unverdünnten Versuchsreihen von  $\Delta$ P-HOXB4 und der Doppelmutanten (Formel im Methodenteil dieser Arbeit unter 2.2.3.2 beschrieben).

Für  $\Delta$ P-HOXB4 ergibt sich eine Titerkonzentration von  $1,05E+07$  Virus/ml.

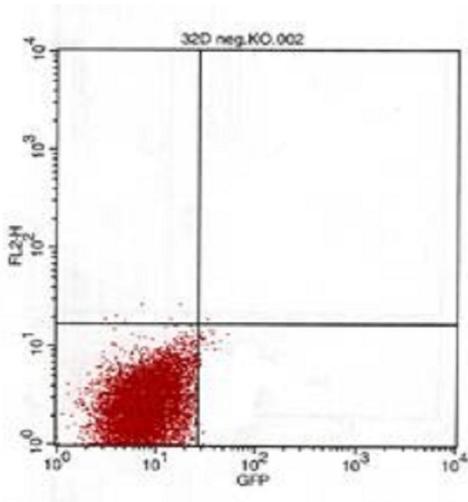
Für  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S ergibt sich eine Titerkonzentration von  $4,66E+06$  Virus/ml.

Für  $\Delta$ P-HOXB4-W144A ergibt sich eine Titerkonzentration von  $9,22E+06$  Virus/ml.

Für  $\Delta P$ -HOXB4-C-DEL ergibt sich eine Titerkonzentration von  $9,07E+06$  Virus/ml.

**3.4.2 Ergebnisse der Transduktionseffizienz primär muriner Progenitorzellen mit Virusüberstand des MIG-Vektors,  $\Delta P$ -HOXB4 und den Doppelmутanten  $\Delta P$ -HOXB4-N 211 S,  $\Delta P$ -HOXB4-W144A,  $\Delta P$ -HOXB4-C-DEL**

**Negativ Kontrolle**



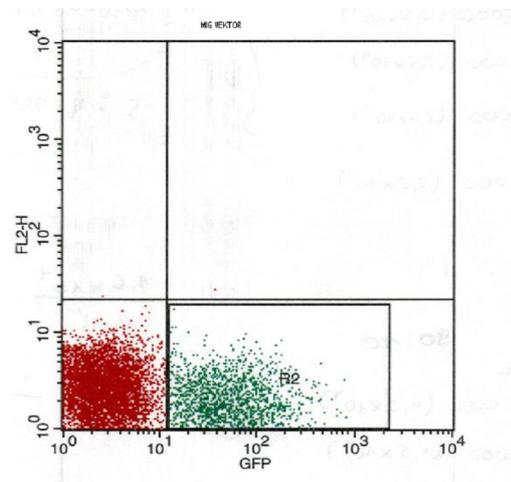
**Quadranten Statistik**

Quadrant:	99.08
LL	
Quadrant:	0.92
LR	

**Abbildung 26:**

Nicht transduzierte GFP negative Kontrollzellen.

**GFP Kontrollvektor**



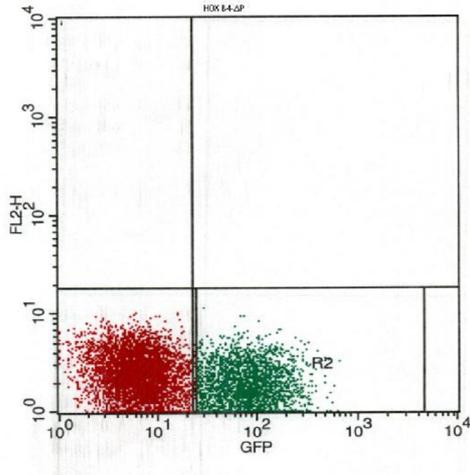
**Quadranten Statistik**

Quadrant:	78.93
LL	
Quadrant:	21.07
LR	

**Abbildung 27:**

Transduktion des GFP Kontrollvektors in murine Progenitorzellen. 21,07 % der transduzierten, lebenden Zellen sind GFP positiv.

### $\Delta P$ -HOXB4



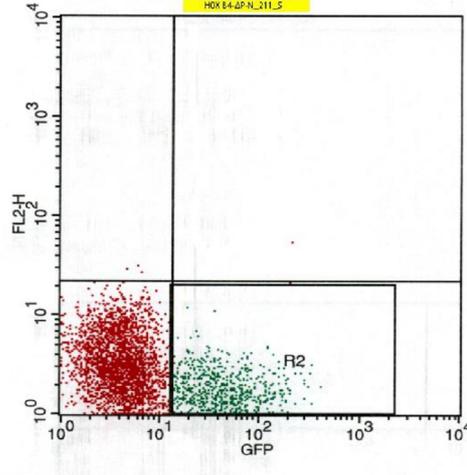
#### Quadranten Statistik

Quadrant: LL	63.54%
Quadrant: LR(R2)	36.46%

#### Abbildung 28:

Darstellung  $\Delta P$ -HOXB4 transduzierter muriner Progenitorzellen. 36,46 % der transduzierten, lebenden Zellen sind GFP positiv.

### $\Delta P$ -HOXB4-N\_211\_S



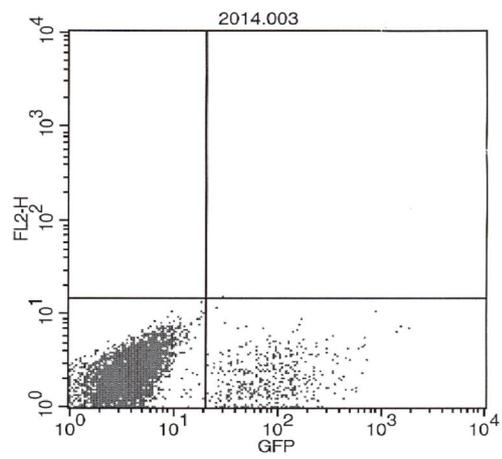
#### Quadranten Statistik

Quadrant: LL	79.86%
Quadrant: LR(R2)	20.02%

#### Abbildung 29:

Darstellung  $\Delta P$ -HOXB4-N\_211\_S transduzierter muriner Progenitorzellen. 20,02 % der transduzierten, lebenden Zellen sind GFP positiv.

### HOXB4 - Wildtyp



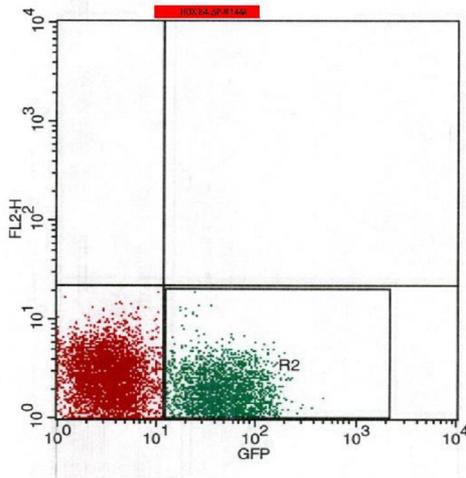
### Quadrantenstatistik

Quadrant: LL	92.42%
Quadrant: LR(R2)	7.56%

#### Abbildung 30:

Darstellung HOXB4-Wildtyp transduzierter, muriner Progenitorzellen. 7.56% der transduzierten, lebenden Zellen sind GFP positiv.

### $\Delta P$ -HOXB4-W144A



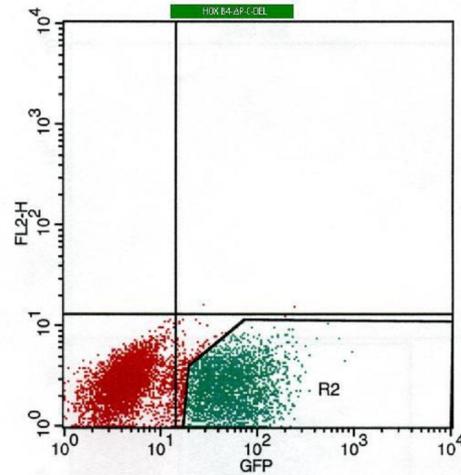
#### Quadranten Statistik

Quadrant: LL	61.66
Quadrant: LR(R2)	38.34

#### Abbildung 31:

Darstellung  $\Delta P$ -HOXB4-W144A transduzierter, muriner Progenitorzellen.  
38,34 % der transduzierten, lebenden Zellen sind GFP positiv.

### $\Delta P$ -HOXB4-C-DEL



#### Quadranten Statistik

Quadrant: LL	55.98
Quadrant: LR(R2)	44.02

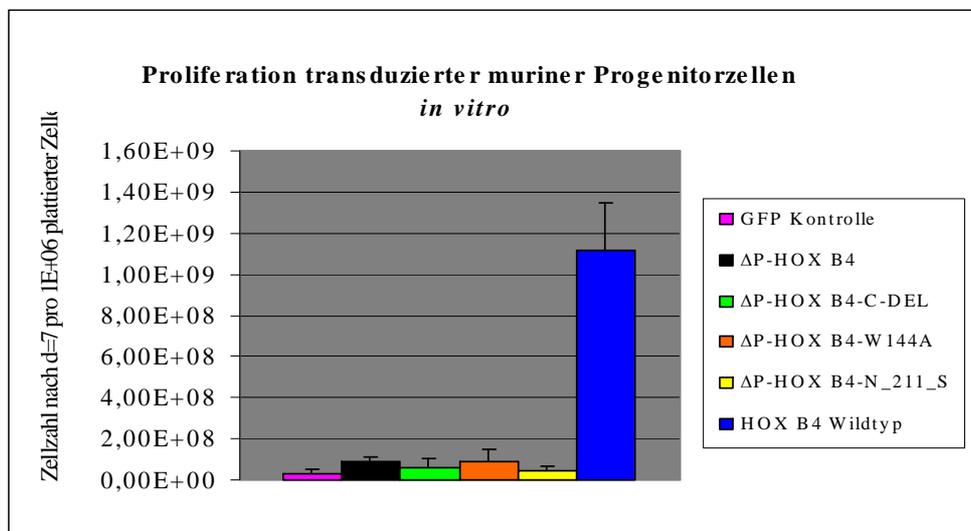
#### Abbildung 32:

Darstellung  $\Delta P$ -HOXB4-C-DEL transduzierte, murine Progenitorzellen  
44,02 % der transduzierten, lebenden Zellen sind GFP positiv.

Nach der Sortierung und Bestimmung der Prozentzahl transduzierter GFP positiver Zellen bestimmten wir jeweils die Zellzahl der transduzierten Knochenmarkzellen in 5 ml Resuspensionsmedium. Für die reine GFP-Kontrollvektortransduktion ergab sich eine Zellzahl von  $3.8 \times 10^5$  GFP positiver, transduzierter Knochenmarkzellen pro 5 ml Resuspensionsmedium; in Abbildung 27 zeigt sich eine Transduktionseffizienz von 21.07%. Die Transduktion muriner Knochenmarkzellen mit der  $\Delta P$ -HOXB4 Einfachmutante ergab bei der Zellbestimmung eine Zellzahl von  $4.6 \times 10^5$  GFP positiver, transduzierter Zellen pro 5 ml; in Abbildung 28 ist eine Transduktionseffizienz von 36.46 % dargestellt. Die Zahl GFP positiver, mit der Doppelmutante  $\Delta P$ -HOXB4-N\_211\_S transduzierter Zellen belief sich auf  $1.6 \times 10^4$  Zellen pro 5 ml Medium; in Abbildung 29 sind 20.02% der Gesamtzellzahl GFP

positiv. In Abbildung 30 ist die Effizienz von HOXB4 Wildtyp transduzierten, murinen Progenitorzellen dargestellt, die bei 7,56% liegt. Mit der Doppelmutante  $\Delta P$ -HOXB4-W144A transduzierte Zellen ergaben eine Zahl von  $4.8 \times 10^5$  GFP positiver Zellen pro 5 ml; in Abbildung 31 zeigt sich eine Transduktionseffizienz von 38.34 % der Gesamtzellzahl. Mit der Doppelmutante  $\Delta P$ -HOXB4-C-DEL transduzierte Zellen ergaben eine Anzahl von  $9.5 \times 10^5$  GFP positiver Zellen pro 5 ml Resuspensionsmedium; in Abbildung 32 zeigt sich eine Transduktionseffizienz von 44.02% der Gesamtzellzahl.

### 3.5 Proliferationsexperiment HOXB4 transduzierter muriner Progenitorzellen



**Abbildung 33:** *In vitro* Proliferationsversuch aus N = 4 unabhängigen Experimenten über einen Zeitraum von d = 7 Tagen.

Probe	Mittelwert
GFP Kontrollvektor	3,23E+07 ( ± 1,79E+07 )
ΔP-HOXB4	9,08E+07 ( ± 2,30E+07 )
ΔP-HOXB4-N_211_S	4,12E+07 ( ± 2,51E+07 )
ΔP-HOXB4-W144A	8,84E+07 ( ± 6,37E+07 )
ΔP-HOXB4-C-DEL	5,67E+07 ( ± 4,46E+07 )
HOXB4-Wildtyp	1,11E+09 ( ± 5,30E+08 )

**Tabelle 1:** Darstellung der Probenmittelwerte aus vier unabhängigen *in vitro* Experimenten (N=4) und deren Standardabweichungen.

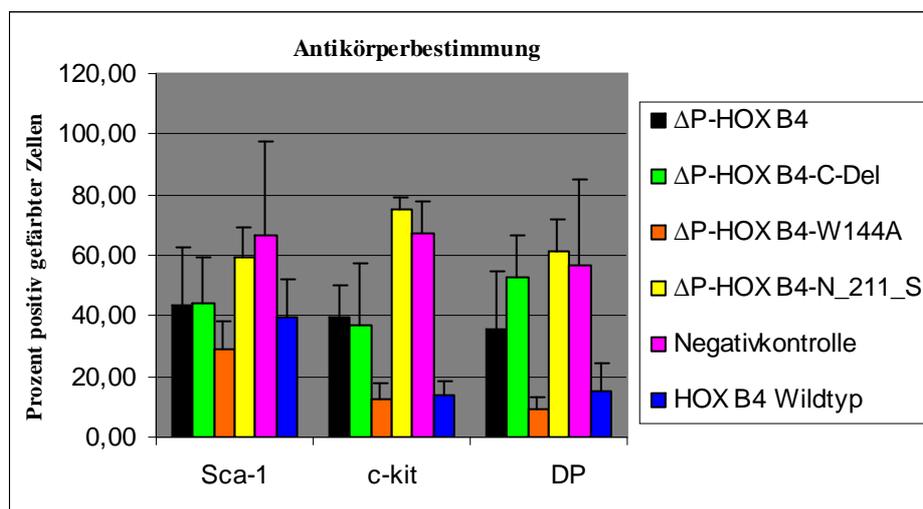
### **3.5.1 Der Effekt des HOXB4 Wildtyps und der generierten HOXB4 Mutanten auf unreife hämatopoetische Progenitorzellen in vitro**

Der Tabelle 1 und Abbildung 33 ist zu entnehmen, dass die Proliferation des HOXB4-Wildtyps (Wt) gegenüber der GFP positiven Vektorkontrolle um das 34,4 fache erhöht ist. Im Vergleich zu der Einfachmutante  $\Delta$ P-HOXB4 ist die Zellzahl des Wildtyps um das 12,2 fache gesteigert. Der Wildtyp verglichen mit der Doppelmutante (DM)  $\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211</sub>S besitzt eine 26,9-fach höhere Zellzahl, im Verhältnis zu der DM  $\Delta$ P-HOXB4-W144A eine um das 12,6 fache erhöhte Zellzahl und verglichen mit der  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL DM eine um das 19,6-fach gesteigerte Proliferationsrate. Weiterhin weist die Einfachmutante  $\Delta$ P-HOXB4 im Vergleich zur GFP Kontrollprobe eine annähernd 3-fach (2,8-fach) höhere Zellzahl, zur N<sub>211</sub>S-Doppelmutante eine doppelt so hohe (2,2-fach) und zur C-DEL Doppelmutante eine 1,6-fach erhöhte Zellzahl auf. Die Zahl der  $\Delta$ P-HOXB4-W144A mutierten Zellen ist nach einer Woche annähernd so hoch (1,02-fach) wie die Zahl  $\Delta$ P-HOXB4 mutierter Zellen.  $\Delta$ P-HOXB4-W144A transduzierte Zellen führten im Proliferationsversuch zu einer 2-fach höheren Zellzahl im Vergleich zu  $\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211</sub>S transduzierten Zellen, zu einer 1,5-fach höheren Zellzahl im Vergleich zu  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL transduzierten Zellen und eine um das 2,7 fache gesteigerte Proliferation im Vergleich zur GFP+ Kontrollprobe. Die Zellzahl der  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL Probe ist im Vergleich zur Zellzahl der Doppelmutante  $\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211</sub>S um das 1,4 fache und zur Kontrollprobe um das 1,8 fache gesteigert. Die Zellvermehrung von  $\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211</sub>S transduzierten Zellen im Vergleich zur GFP Kontrollprobe ist nur leicht (1,3-fach), jedoch nicht signifikant gesteigert.

Eine Signifikanz bezüglich der Proliferationsrate nach d=7 Tagen konnte mit Hilfe des t-Test für den HOXB4-Wildtyp (Wt) im Vergleich zu allen Mutanten sowie im Vergleich zur GFP Kontrolle ermittelt werden; (Wt versus N<sub>211</sub>S p=0,025; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-W144A p=0,012; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL p=0,009; Wt versus GFP-Kontrollvektor p=0,008). Weiterhin ist die Proliferationsrate der Einfachmutante  $\Delta$ P-HOXB4 im Vergleich zur GFP-Kontrolle signifikant gesteigert (p=0,043). Aufgrund der in Tabelle 1 zusätzlich aufgeführten Standardabweichungen ergab der Vergleich der restlichen Proben zueinander im t-Test keine signifikanten Werte (p>0,05).

**3.5.2 Testung eines Effektes der HOXB4 Mutanten auf die myeloische Differenzierung muriner Progenitorzellen *in vitro* durch die Analyse ihrer Oberflächenantigene mittels durchflusszytometrischer Immunphänotypisierung**

Um einen Effekt de HOXB4-Wildtyps und der HOXB4 Mutanten auf die myeloische Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen zu testen, wurden Oberflächenantigene der *in vitro* kultivierten, hämatopoetischen Progenitorzellen mittels spezifischer für Sca-1, c-kit, Mac-1, Gr-1, Ter119 und B220 positiven Antikörper gefärbt und analysiert.



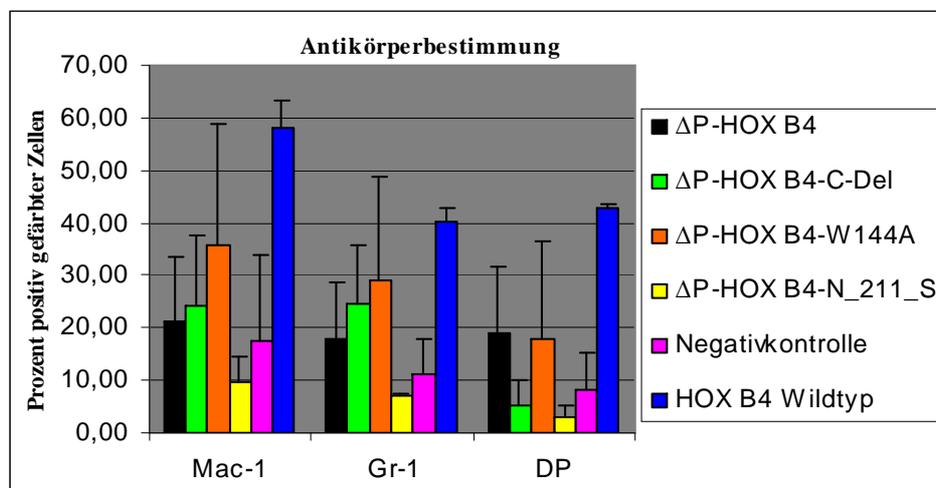
**Abbildung 34:** N=3 Antikörperfärbungen der murinen Progenitorzellen nach d=7 Tage *in vitro*. In der Abbildung sind in Prozent Sca-1 positive, c-kit positive und Sca-1/c-kit doppelpositive (DP) gefärbte, murine Progenitorzellen dargestellt.

HOXB4 Wt	ΔP-HOXB4	ΔP-HOXB4-C-DEL	ΔP-HOXB4-W144A	ΔP-HOXB4-N_211_S	Negativ Kontrolle	
39,4 % (±17,95 %)	43,61 % (± 37,56%)	44,37 % (±25,93 %)	28,97 % (±16,58 %)	59,5 % (±16,87 %)	66,80 % (±43,48 %)	Sca-1
13,79 % (± 6,94 %)	39,41 % (± 21,09 %)	36,66 % (±36,01 %)	12,71 % (± 8,64 %)	75,40 % (± 6,80 %)	67,35 % (±14,86 %)	c-kit
15,28 % (± 12,6 %)	35,56 % (±33,01 %)	52,63 % (±19,42 %)	9,30 % (± 5,49 %)	61,62 % (±14,16 %)	56,67 % (±39,95 %)	DP

**Tabelle 2:** In Tabelle 2 sind die Probenmittelwerte aus N=3 unabhängigen Antikörperfärbungen und deren Standardabweichungen aufgeführt. Die Zahlen in Prozent beziehen sich jeweils auf den Anteil an Sca-1, c-kit und Sca-1/c-kit doppelpositiv gefärbten, murinen Progenitorzellen.

HOXB4 Wt	$\Delta$ P-HOXB4	$\Delta$ P-HOXB4-C-DEL	$\Delta$ P-HOXB4-W144A	$\Delta$ P-HOXB4-N_211_S	Negativ Kontrolle	
4,37E+08 ( $\pm$ 1,99E+08)	3,96E+07 ( $\pm$ 3,41E+07)	3,05E+07 ( $\pm$ 1,55E+07)	2,56E+07 ( $\pm$ 1,47E+07)	2,45E+07 ( $\pm$ 6,97E+06)	2,16E+07 ( $\pm$ 1,41E+07)	Sca-1
1,53E+08 ( $\pm$ 7,74E+07)	3,75E+07 ( $\pm$ 1,96E+07)	4,22E+07 ( $\pm$ 1,10E+07)	1,12E+07 ( $\pm$ 7,64E+06)	3,11E+07 ( $\pm$ 2,82E+06)	2,18E+07 ( $\pm$ 4,74E+06)	c-kit
1,70E+08 ( $\pm$ 1,40E+08)	3,23E+07 ( $\pm$ 3,00E+07)	2,99E+07 ( $\pm$ 1,00E+07)	8,29E+06 ( $\pm$ 4,86E+06)	2,54E+07 ( $\pm$ 5,80E+06)	1,78E+07 ( $\pm$ 1,22E+07)	DP

**Tabelle 3:** In Tabelle 3 sind die in Tabelle 2 angegebenen Prozentzahlen und deren Standardabweichungen von c-kit, Sca-1 und Sca-1 / c-kit doppelpositiv (DP) gefärbten Zellen als Zellzahlen in Bezug auf die absolute, im Proliferationsversuch für jeden Arm detektierte Zellzahl nach d=7 dargestellt.



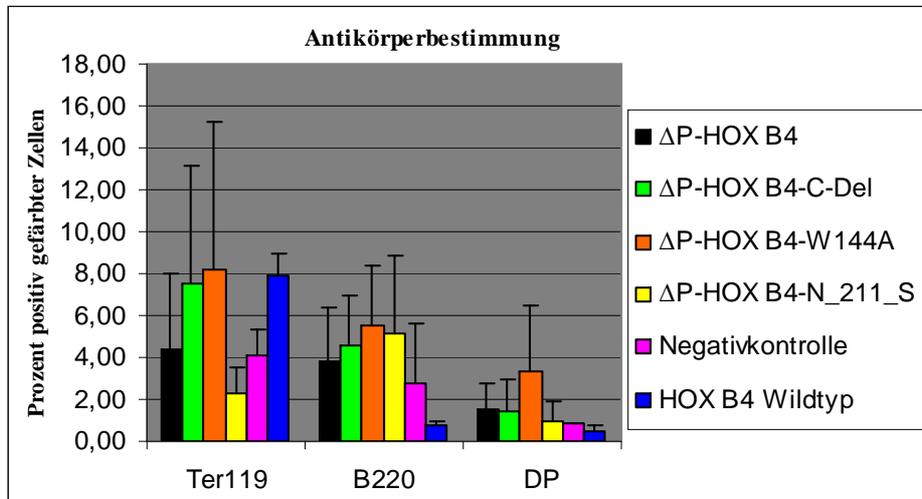
**Abbildung 35:** N=3 Antikörperfärbungen der murinen Progenitorzellen nach d=7 Tage *in vitro*. In der Abbildung sind in Prozent Mac-1 positive, Gr-1 positive sowie Mac-1/Gr-1 doppelpositiv gefärbte, murine Progenitorzellen dargestellt.

HOXB4 Wt	$\Delta$ P-HOXB4	$\Delta$ P-HOX B4-C-DEL	$\Delta$ P-HOXB4- W144A	$\Delta$ P-HOXB4- N_211_S	Negativ Kontrolle	
58,16 % ( $\pm$ 7,39 %)	21,08 % ( $\pm$ 24,98 %)	24,21 % ( $\pm$ 23,19 %)	35,69 % ( $\pm$ 23,12 %)	9,74 % ( $\pm$ 8,57 %)	17,35 % ( $\pm$ 23,38 %)	Mac-1
40,39 % ( $\pm$ 3,37 %)	17,84 % ( $\pm$ 21,84 %)	24,48 % ( $\pm$ 19,72 %)	28,96 % ( $\pm$ 19,95 %)	7,10 % ( $\pm$ 0,87 %)	11,09 % ( $\pm$ 9,39 %)	Gr-1
42,78 % ( $\pm$ 1,13 %)	19,11 % ( $\pm$ 21,57 %)	5,13 % ( $\pm$ 7,04 %)	17,78 % ( $\pm$ 18,70 %)	2,93 % ( $\pm$ 3,03 %)	8,08 % ( $\pm$ 10,28 %)	DP

**Tabelle 4:** In Tabelle 4 sind die Probenmittelwerte aus N=3 unabhängigen Antikörperfärbungen und deren Standardabweichungen aufgeführt. Die Zahlen in Prozent beziehen sich jeweils auf den Anteil an Mac-1,Gr-1 und Mac-1/Gr-1 doppelpositiv gefärbten, murinen Progenitorzellen.

HOXB4 Wt	$\Delta$ P-HOXB4	$\Delta$ P-HOXB4- C-DEL	$\Delta$ P-HOXB4- W144A	$\Delta$ P-HOXB4- N_211_S	Negativ Kontrolle	
6,46E+08 ( $\pm$ 8,20E+07)	2,55E+07 ( $\pm$ 2,30E+07)	4,33E+06 ( $\pm$ 3,93E+06)	3,16E+07 ( $\pm$ 2,03E+07)	4,01E+06 ( $\pm$ 3,53E+06)	5,58E+06 ( $\pm$ 7,52E+06)	Mac-1
4,49E+08 ( $\pm$ 3,75E+07)	1,63E+07 ( $\pm$ 1,98E+07)	8,02E+06 ( $\pm$ 1,05E+07)	2,56E+07 ( $\pm$ 1,76E+07)	2,93E+06 ( $\pm$ 3,57+05)	3,59E+06 ( $\pm$ 3,03E+06)	Gr-1
4,75E+08 ( $\pm$ 1,27E+07)	2,66E+07 ( $\pm$ 1,85E+07)	2,91E+06 ( $\pm$ 3,99E+06)	1,57E+07 ( $\pm$ 1,65E+07)	1,17E+06 ( $\pm$ 1,19E+06)	2,61E+06 ( $\pm$ 3,32E+06)	DP

**Tabelle 5:** In Tabelle 5 sind die in Tabelle 4 angegebenen Prozentzahlen und deren Standardabweichungen als Zellzahlen in Bezug auf die absolute, im Proliferationsversuch für jeden Arm detektierte Zellzahl nach d=7 dargestellt.



**Abbildung 36:** N= 3 Antikörperfärbungen der murinen Progenitorzellen nach d=7 Tage *in vitro*. In der Abbildung sind in Prozent Ter119 positive, B220 positive sowie Ter119/B220 doppelpositiv gefärbte, murine Progenitorzellen dargestellt.

HOXB4 Wt	ΔP-HOXB4	ΔP-HOX B4-C-DEL	ΔP-HOXB4-W144A	ΔP-HOXB4-N_211_S	Negativ Kontrolle	
7,86 % (± 1,61 %)	4,39 % (± 7,15 %)	7,53 % (± 9,70 %)	8,15 % (± 12,30 %)	2,31 % (± 2,16 %)	4,07 % (± 1,82 %)	Ter119
0,77 % (± 0,25 %)	3,85 % (± 5,06 %)	4,58 % (± 4,09 %)	5,57 % (± 4,80 %)	5,13 % (± 6,49 %)	2,75 % (± 3,94 %)	B220
0,49 % (± 0,33%)	1,53 % (± 2,16 %)	1,47 % (± 2,07 %)	3,33 % (± 4,46 %)	0,98 % (± 1,33 %)	0,81 % (± 0 %)	DP

**Tabelle 6:** In Tabelle 6 sind die Probenmittelwerte aus N=3 unabhängigen Antikörperfärbungen und deren Standardabweichungen in Prozent aufgeführt. Die Zahlen in Prozent beziehen sich jeweils auf den Anteil an Ter119, B220 und Ter119 / B220 doppelpositiv gefärbten Zellen .

HOXB4 Wt	$\Delta$ P-HOXB4	$\Delta$ P-HOXB4-C-DEL	$\Delta$ P-HOXB4-W144A	$\Delta$ P-HOXB4-N_211_S	Negativ Kontrolle	
8,73E+07 ( $\pm$ 1,79+07)	7,98E+06 ( $\pm$ 7,95E+06)	4,33E+06 ( $\pm$ 3,93E+06)	7,19E+06 ( $\pm$ 1,08E+07)	9,52E+05 ( $\pm$ 8,90E+05)	1,31E+06 ( $\pm$ 5,88E+05)	Ter119
8,45E+06 ( $\pm$ 2,76E+06)	6,98E+06 ( $\pm$ 3,80E+06)	1,32E+06 ( $\pm$ 1,66E+06)	2,56E+07 ( $\pm$ 1,76E+07)	2,14E+06 ( $\pm$ 2,70+06)	9,00E+05 ( $\pm$ 1,27E+06)	B220
5,39E+06 ( $\pm$ 3,69E+06)	2,09E+06 ( $\pm$ 2,18E+06)	8,30E+05 ( $\pm$ 1,17E+06)	2,94E+06 ( $\pm$ 3,95E+06)	4,04E+05 ( $\pm$ 5,48E+05)	1,31E+05 ( $\pm$ 1,85E+05)	DP

**Tabelle 7:** In Tabelle 7 sind die in Tabelle 6 angegebenen Prozentzahlen und deren Standardabweichungen als Zellzahlen in Bezug auf die absolute, im Proliferationsversuch für jeden Arm detektierte Zellzahl nach d=7 dargestellt.

### 3.5.3 Vergleich der mittels Antikörper gefärbten, hämatopoetischen Progenitorzellen

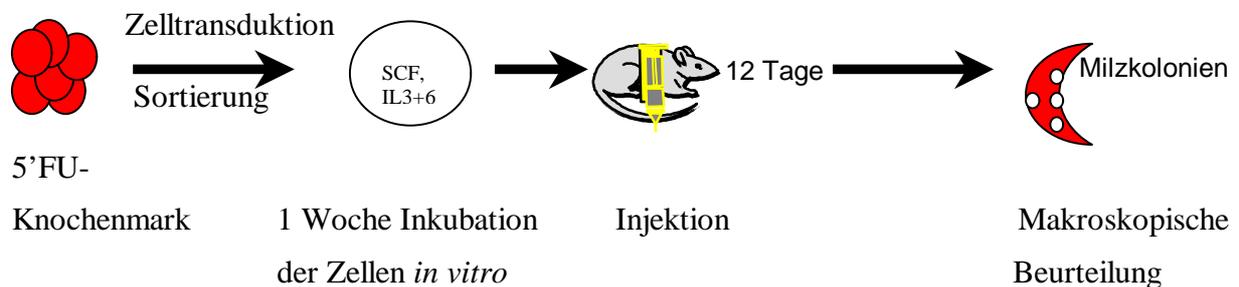
In Anwesenheit der Zytokine Interleukin 3 und 6, von denen bekannt ist, dass sie zu einer myeloischen Differenzierung der Zellen beitragen, wurden die Zellen der Wildtyp bzw. der Mutantenversuchsreihe *in vitro* kultiviert und nach einer Woche mittels Antikörper ihre Differenzierung bestimmt. Die prozentuale Menge an Sca-1 gefärbten Zellen der HOXB4-Wildtypreihe und der Mutanten sind aufgrund der Standardabweichung im Vergleich zueinander und zur Negativkontrolle nicht signifikant gesteigert oder vermindert. Dies trifft auch für den Vergleich der prozentualen Menge an Sca-1/c-kit doppelpositiv gefärbten Zellen zu. Eine signifikant verringerte prozentuale Menge an c-kit gefärbten Zellen ergab sich bei dem Vergleich des Wildtyps (Wt) und der  $\Delta$ P-HOXB4-W144A Doppelmutante (DM) mit der  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S DM, der  $\Delta$ P-HOX B4-C-Del DM, sowie mit der Negativkontrolle; (Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S, p=0,002; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL, p=0,026; Wt versus Negativkontrolle, p=0,044;  $\Delta$ P-HOXB4-W144A versus  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S, p=0,001;  $\Delta$ P-HOXB4-W144A versus  $\Delta$ P-HOXB4-C-Del, p=0,007;  $\Delta$ P-HOXB4-W144A versus Negativkontrolle, p=0,012). Die prozentuale Menge der c-kit positiv gefärbten Zellen der  $\Delta$ P-HOXB4-W144A Reihe war gegenüber der Menge an c-kit positiven Zellen in der  $\Delta$ P-HOXB4 Reihe signifikant vermindert (p=0,047), der Vergleich zwischen dem Wildtyp und der Einfachmutante ergab keinen signifikanten Unterschied.

Die Mac-1 Färbung ergab eine signifikant gesteigerte, prozentuale Menge an positiven Zellen des Wildtyps (Wt) gegenüber der  $\Delta$ P-HOXB4- N\_211\_S DM (p=0,007) und des Wt gegenüber der  $\Delta$ P-HOXB4-C-Del Doppelmutante (p=0,004). Eine signifikant erhöhte Menge an Gr-1 positiven Zellen zeigte der Vergleich des Wildtyps mit der  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S Doppelmutante (p=0,0004). Die prozentuale Menge an Mac-1/Gr-1 doppelpositiven Zellen war im Wildtyp gegenüber der  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S Doppelmutante signifikant erhöht (p=0,003). Die weiteren Doppelmutanten wiesen in der Gr-1/Mac-1 Färbung im Vergleich zueinander, sowie im Vergleich zum Wildtyp und der Negativkontrolle keine signifikanten Unterschiede auf. Der prozentuale Anteil an Ter119 und B220 positiven Zellen und Ter119/B220 doppelpositiv gefärbten Zellen des Wildtyps gegenüber der Einfach-/Doppelmutanten sowie der Negativkontrolle wiesen im t-Test keine signifikanten P-Werte ( $P > 0,05$ ) auf. Dies trifft auch für die prozentuale Menge an B220 positiven bzw. Ter119/B220 doppelpositiven Zellen der Einfach./Doppelmutanten im Vergleich zueinander sowie zur Negativkontrolle zu.

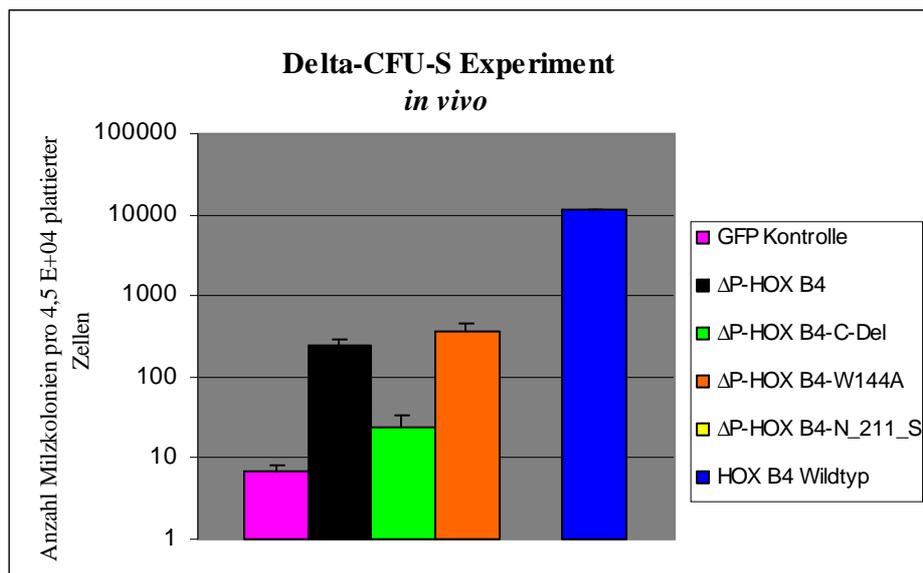
Die in Tabelle 2, 4 und 6 aufgeführten Prozentzahlen ergaben in Bezug auf die im Proliferationsexperiment detektierten Zellzahlen (s. Tabelle 1) absolute Zahlen c-kit, Sca-1, Gr-1, Mac-1 und Ter119 exprimierender Zellen des Wildtyps, der Konstrukte sowie der Negativkontrolle (s. Tabelle 3, 5, 7). Die absoluten Zahlen positiv gefärbter Zellen, denen der HOXB4-Wildtyp (Wt) transduziert wurde, waren in allen Färbungen im Vergleich zu der absoluten Zahl der Einfach-/Doppelmutanten sowie zu der Negativkontrolle gesteigert. Signifikanzen konnten bei dem Vergleich folgender Proben miteinander ermittelt werden: **C-kit:** (Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-W144A, P= 0,04); **Sca-1:** (Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4, P=0,01; Wt vs.  $\Delta$ P-HOXB4- N\_211\_S, P=0,03; Wt vs.  $\Delta$ P-HOXB4-W144A, P=0,03; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-C-Del, P= 0,03). **Mac-1:** (Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4, P= 0,001 Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S DM, P= 0,0007; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-W144A, P= 0,0009; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-C-Del, P= 0,0007; Wt versus Negativkontrolle, P= 0,008). **Gr-1:** (Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4, P=0,0003; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4- N\_211\_S, P= 0,0002; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-W144A, P= 0,0004; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-C-Del, P= 0,0002; Wt versus Negativkontrolle, P= 0,0004). **Mac-1/Gr-1 doppelpositiv:** (Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4, P= 0,001; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4- N\_211\_S DM, P= 0,0004; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-W144A, P= 0,001; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-C-Del, P= 0,0004; Wt versus Negativkontrolle, P= 0,0004). **Ter119:** (Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4, P= 0,03; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4- N\_211\_S DM, P= 0,003; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-W144A, P= 0,008; Wt versus  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL, P= 0,003; Wt versus Negativkontrolle, P= 0,02).

### 3.6 Kolonie bildender Milz Versuch *in vivo* ( $\Delta$ CFU-S):

Der Delta Colony Forming Units Spleen Versuch ( $\Delta$ CFU-S) wurde durchgeführt, um den individuellen Einfluss der Expression von HOXB4 und der Einfach-/ Doppelmutanten auf Kurz-zeit repopulierende Vorläuferzellen zu testen. Hierbei wird die Fähigkeit der einzelnen Zellen geprüft, durch Teilung Kolonien in der Milz zu bilden, nachdem transduzierte, hochrein sortierte Knochenmarkzellen in letal bestrahlte Mäuse injiziert und die gebildeten Milzkolonien nach zwölf Tagen makroskopisch gezählt werden.



**Abbildung 37:** Schematische Präsentation des Kolonie bildenden Milzversuches ( $\Delta$ CFU-S).



**Abbildung 38:** Delta CFU-S (Colony- Forming Unit-Spleen) Experiment *in vivo*. Anzahl der Milzkolonien am Tag zwölf nach Injektion transduzierter Knochenmarkzellen in letal bestrahlte (C3H x C57BL) Empfängermäuse.

Probe	Anzahl der Mäuse	Mittelwert der Kolonienanzahl aus N Versuchen und deren Standardabweichung
GFP Kontrollvektor	N= 11	6,82 ( 4,35 )
HOXB4 Wildtyp	N= 2	11467,74 ( 2,12 )
$\Delta$ P-HOXB4	N= 14	244,5 ( 178,86 )
$\Delta$ P-HOXB4-N_211_S	N= 10	0,00 ( 0,00 )
$\Delta$ P-HOXB4-W144A	N= 11	361,77 ( 312,28 )
$\Delta$ P-HOXB4-C-DEL	N= 10	24,57 ( 30,24 )

**Tabelle 8:** Darstellung der Mittelwerte und deren Standardabweichung der Milzkolonien aus N Versuchsreihen des HOXB4-Wildtyps, der einzelnen Mutanten und der GFP-Kontrollreihe.

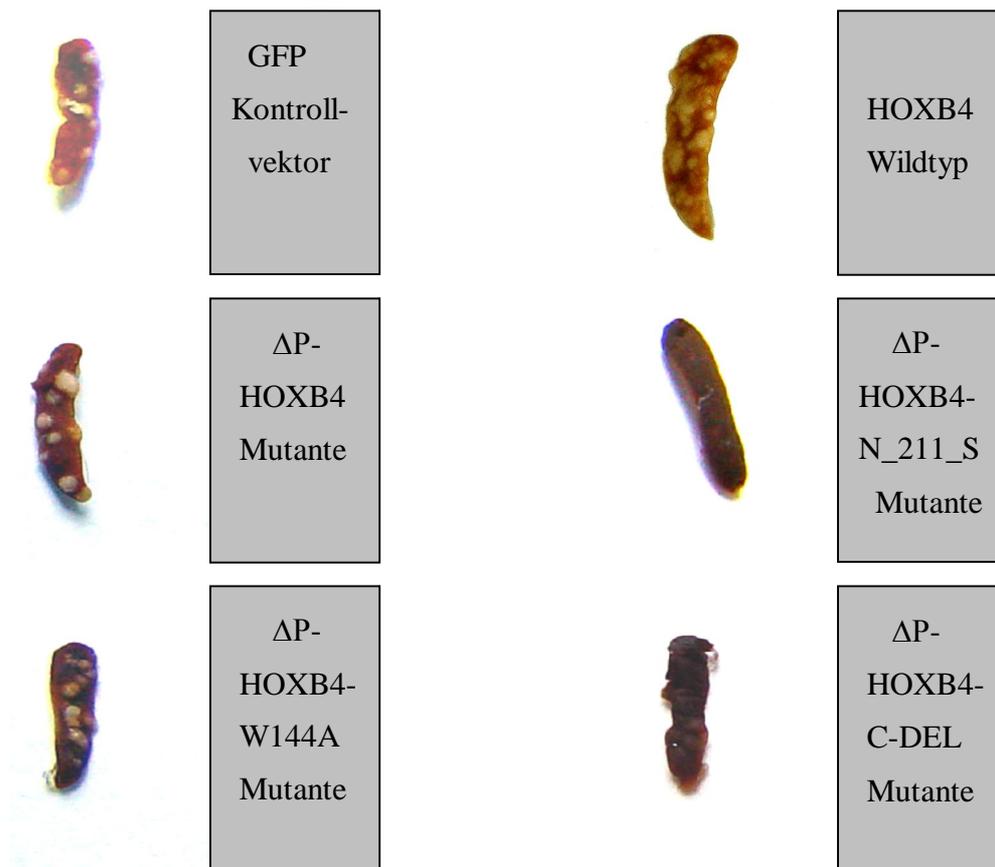
### **3.6.1 Die Wirkung von HOXB4 und der Mutanten auf Kurz-zeit repopulierender, hämatopoetischer Stammzellen in vivo**

Nach d=12 Tagen wurden die Mäuse getötet und die Kolonien in den Milzen makroskopisch erfasst und gezählt. Die Milzen der Mäuse, denen der Wildtyp HOXB4 injiziert wurde wiesen eine 46,9 fach signifikant ( $p=0,00016$ ) höhere Kolonienzahl verglichen zu der Einfachmutante  $\Delta$ P-HOXB4 auf. Im Vergleich zu den Doppelmutanten zeigt der Wildtyp eine 31,7 fach signifikant ( $p=0,00021$ ) höhere Kolonienanzahl gegenüber  $\Delta$ P-HOX B4-W144A, eine 466,7 fach signifikant ( $p=0,00043$ ) höhere Anzahl gegenüber  $\Delta$ P-HOXB4-C-Del und schliesslich eine um das  $11,47 \times 10^3$  - fache signifikant ( $p=0,00038$ ) gesteigerte Kolonienanzahl im Vergleich zu  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S. Bezogen auf die Anzahl der Milzkolonien in den GFP-Kontrollmäusen weist der Wildtyp eine um das  $1,68 \times 10^3$ -fach signifikant ( $p=0,00014$ ) erhöhte Anzahl an Kolonien auf. Der angestellte Vergleich der Kolonienzahl des Wildtyps mit den Mutanten und der GFP-Kontrolle wies in allen Fällen (s.o) eine signifikante Steigerung Kurz-zeit repopulierender Stammzellen in den Milzen der HOXB4 Wildtypmäusen auf.

Mäusen, denen  $\Delta$ P-HOXB4 transduzierte Knochenmarkzellen injiziert wurden, ergaben im Mittelwert eine signifikante ( $p=0,0002$ ), um das 35,9 fache gesteigerte Anzahl an Milzkolonien gegenüber der GFP-Kontrollprobe, eine signifikante ( $p=0,0003$ ), um das 244,5 fache gesteigerte Anzahl an Kolonien gegenüber der  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S und eine signifikante ( $p=0,0009$ ), um das 10 fache gesteigerte Anzahl an Kolonien gegenüber der

$\Delta$ P-HOXB4-C-DEL injizierten Mäuse. Die Milzen der  $\Delta$ P-HOXB4-W144A injizierten Mäuse zeigten eine nicht signifikant gesteigerte Anzahl an Kolonien gegenüber  $\Delta$ P-HOXB4 Mäusen, jedoch eine signifikante ( $p=0,0001$ ), um das 53,1-fach gesteigerte Kolonienanzahl im Vergleich zu den Milzen der GFP-Kontrollmäuse. In den Milzen von Mäusen, denen  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S positive Zellen gespritzt wurden, bildeten sich keine Kolonien und ein Vergleich der Kolonienanzahl zwischen Milzen der  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S injizierten Mäuse und Milzen der GFP-Kontrollmäuse führte zu keinem signifikanten Unterschied. Vorher wurde der Kolonienvergleich zwischen Milzen von  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL injizierten Mäusen und  $\Delta$ P-HOXB4 bzw. HOXB4-Wildtypmäusen angestellt.  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL transduzierte Zellen produzierten eine signifikante ( $p=0,02$ ), um das 24,6 fache erhöhte Kolonienanzahl verglichen zu den  $\Delta$ P-HOXB4-N\_211\_S transduzierten Zellen, verglichen mit der Kolonienanzahl in Milzen der GFP Kontrollmäuse war die Anzahl jedoch nicht signifikant erhöht.

### 3.6.2 Repräsentative Darstellung der makroskopisch sichtbaren Milzkolonien



## **4. Diskussion**

Eine Charakterisierung molekularer Mechanismen, die zu einer Expansion humaner Stammzellen führen, spielt eine bedeutende Rolle für therapeutische Strategien zur Stammzelltransplantation. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Homeoboxgen HOXB4 eine Wachstumssteigerung primitiver, muriner Lang-zeit repopulierender Stammzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* induziert, ohne die normale hämatopoetische Differenzierung zu stören oder eine überschüssige Stammzellexpansion zu verursachen (Antonchuk, Sauvageau & Humphries 2001; Thorsteinsdottir, Sauvageau & Humphries 1999). Dieser Effekt des HOXB4 Gens konnte im weiteren Verlauf auch in humanen hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden (Buske, Feuring-Buske, Abramovich, Spiekermann, Eaves, Coulombel, Sauvageau, Hogge & Humphries 2002).

Die Kenntnis über interagierende Proteine und spezifische biochemische Reaktionen der N-terminalen Domäne von HOX Proteinen ist bisher gering (Mortlock, Sateesh & Innis 2000). Wir stellten die Hypothese auf, dass eine gezielte Strukturveränderung der N-terminalen Domäne von HOXB4 dessen stammzellamplifikatorische Eigenschaften beeinflussen könnte. Hierfür wählten wir eine Mutante, die sich durch eine N-terminale Deletion einer prolinreichen Sequenz auszeichnet, um einen Einblick in die Funktion des N-Terminus von HOXB4 zu erlangen. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde initial der Effekt der Einfachmutante  $\Delta$  P-HOXB4 auf unreife, hämatopoetische Vorläuferzellen Zellen *in vitro* und auf Kurzzeit-repopulierende Stammzellen *in vivo* analysiert und ein Vergleich zwischen der Einfachmutante und dem HOX B4 Wildtyp bzw. der GFP Kontrollreihe angestellt.

In dem in Abbildung 33 dargestellten Proliferationsexperiment *in vitro* ist der charakteristische, amplifikatorische Effekt des HOXB4-Wildtyps deutlich daran zu erkennen, dass sich murine, unreife Progenitorzellen innerhalb einer Woche und unter gleichen Kulturbedingungen um das vierunddreissigfache (34,4 fache) im Vergleich zu der GFP-Vektor Kontrollgruppe vermehrten. Aus der Anzahl der Milzkolonien, die sich durch Amplifikation Kurz-zeit repopulierender Stammzellen im murinen Mausmodell *in vivo* (Delta CFU-S) nach zwölf Tagen bildeten, kann der durch HOXB4 induzierte, proliferative Effekt auf Progenitorzellen *in vitro* auch auf Ebene der Kurz-zeit repopulierenden Stammzellen deutlich gezeigt und bestätigt werden. Das stammzellamplifikatorische Potential des HOXB4-Wildtyps auf Kurz-zeit repopulierende hämatopoetische Stammzellen spiegelt sich wieder in der Anzahl an Milzkolonien in Mäusen, denen HOXB4-Wildtyp transduzierte Zellen injiziert wurden. Diese ist gegenüber der Kolonienanzahl in Milzen von GFP Negativkontrollmäusen

um das eintausendsechshundertachtzigfache erhöht (s. Abb.38, 3.6.1). Diese Beobachtung war nicht überraschend, da der stammzellamplifikatorische Effekt des HOXB4 Gens in der Literatur schon beschrieben wurde.

Interessant erschien uns der Vergleich zwischen der Einfachmutante  $\Delta$ P-HOXB4 und dem HOXB4-Wildtyp. Die in Abbildung 33 bzw. unter 3.5.1 dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Mutation im N-terminalen Bereich die Eigenschaft des HOXB4 Gens, hämatopoetische Zellen *in vitro* zu amplifizieren, modifiziert. So scheint  $\Delta$ P-HOXB4 nicht mehr in der Lage zu sein, unreife hämatopoetische Zellen in dem gleichen Ausmaß zur Proliferation anzuregen, wie es der HOXB4-Wildtyp vermag. Die Vermutung, dass eine partielle Ausschaltung der N-terminalen Domäne ( $\Delta$ P) nicht zu einem kompletten Verlust der proliferativen Eigenschaft von HOXB4 führt, diese jedoch in ihrer Aktivität erheblich eingeschränkt zu sein scheint, kann aufgrund der in Abb. 38 bzw. unter 3.6.1 dargestellten  $\Delta$ CFU-S *in vivo* Daten in ihrer Richtigkeit bestätigt werden. Im Hinblick auf die Anzahl der Milzkolonien besitzt die Einfachmutante  $\Delta$ P-HOXB4 die Fähigkeit, Kurz-zeit repopulierende Stammzellen zu amplifizieren und deren Proliferation gegenüber der GFP Negativkontrolle signifikant zu steigern. Im direkten Vergleich mit dem HOXB4-Wildtyp ist die stammzellamplifikatorische Eigenschaft von  $\Delta$ P-HOXB4 jedoch erheblich und signifikant gemindert.

Zur Stützung der Hypothese, dass eine N-terminale Mutation die Eigenschaften von HOXB4 verändert, wurden zusätzlich zu der N-terminalen  $\Delta$ P-Deletion Mutationen in HOXB4 erzeugt, deren Wirkung auf das Gen in der Literatur bereits beschrieben wurden. In einer Arbeit von Sauvageau et al. wurde diskutiert, dass der HOXB4 Kofaktor PBX1 möglicherweise als negativer Regulator die HOXB4 induzierte Proliferation hämatopoetischer Stammzellen beeinflusst. HOXB4 exprimierende Zellen, in denen die endogene PBX1 Expression supprimiert wurde, wiesen einen signifikanten Proliferationsvorteil (>20 fach gesteigert) gegenüber HOXB4-Wildtyp exprimierenden Zellen auf, in denen die PBX Expression nicht verändert wurde (Krosl, Beslu, Mayotte, Humphries & Sauvageau 2003). Es konnte gezeigt werden, dass wenn die PBX-HOXB4 Interaktion durch eine Punktmutation (W→G) in dem YPWM Motiv von HOXB4 inhibiert wird, die PBX Mutante eine Expansion hämatopoetischer Stammzellen induziert, diese jedoch im Vergleich zum HOXB4-Wildtyp verringert ist. Daraus wurde geschlossen, dass eine direkte HOXB4-PBX Interaktion für die stammzellamplifikatorische Eigenschaft von HOXB4 keine Voraussetzung zu sein scheint (Beslu, Krosl, Laurin, Mayotte, Humphries & Sauvageau 2004).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde durch den Austausch der Aminosäure Tryptophan (W) durch Alanin (A) das YPWM Motiv von  $\Delta$ P-HOXB4 mutiert und eine PBX- $\Delta$ P-HOXB4 Interaktion supprimiert. Wir erwarteten, dass durch die N-terminale Deletion in der Doppelmutante  $\Delta$ P-HOXB4-W144A der von Beslu et al. beschriebene, abschwächende Effekt der PBX Mutation auf die Stammzellamplifikation von HOXB4 verstärkt wird.

*In vitro* konnten wir keinen Unterschied der Einfachmutante zu der  $\Delta$ P-HOXB4-W144A feststellen. Sie verhielten sich angesichts der Proliferation unreifer, hämatopoetischer Progenitorzellen ähnlich. Die Einfachmutante zeigte jedoch im Vergleich zu der GFP Kontrollreihe eine signifikante Steigerung der Zellzahl, die bei der Doppelmutante  $\Delta$ P-HOXB4-W144A zu GFP nicht vorhanden war. Dies ließ die Überlegung zu, dass eine zweifache Mutation in dem Homeoboxgen möglicherweise zu einem kompletten Verlust der Fähigkeit von HOXB4, Vorläuferzellen zu amplifizieren, führen könnte. *In vivo* bestätigte sich diese Vermutung nicht. Die Doppelmutante  $\Delta$ P-HOXB4-W144A war durchaus in der Lage, die Proliferation Kurz-zeit repopulierende Stammzellen signifikant über das Niveau der GFP Kontrolle zu steigern. In Bezug auf den Wildtyp hingegen war die Amplifikation der Doppelmutanten exprimierenden Kurz-zeit repopulierenden Stammzellen ähnlich der Einfachmutante stark vermindert. Im direkten Vergleich der Einfach- und Doppelmutante zueinander konnte wider Erwarten kein Unterschied in der Aktivität der Stammzellamplifikation festgestellt werden. Die Beobachtung der  $\Delta$ P-HOXB4-W144A Doppelmutante im Proliferationsversuch *in vitro* deckt sich zwar mit der Vermutung, dass eine N-terminale Deletion den von Beslu et al. beschriebenen, abschwächenden Effekt der PBX Mutation auf HOXB4 verstärkt. Interessanterweise führte die zusätzliche Ausschaltung der PBX – Interaktionsdomäne jedoch nicht zu einer weiteren Aktivitätsverminderung der N-terminalen  $\Delta$ P-Deletion.

Die gleiche Gruppe beschrieb ebenfalls den Effekt einer einfachen Punktmutation in der Homeodomäne von HOXB4 (W→A) auf dessen stammzellamplifikatorische Eigenschaft. Sie zeigte in einem *in vivo* Transplantationsversuch, dass die retrovirale Expression des HOXB4-Wildtyps im Vergleich zu der HOXB4 Mutante (W→A) zu einer signifikant gesteigerten Frequenz Langzeit-repopulierender Stammzellen führte. In dem *in vitro* Proliferationsversuch war die Vermehrung der Wildtyp transduzierten, hämatopoetischen Zellen um ein 3,38 faches gesteigert gegenüber Zellen, denen die Mutante transduziert wurde. Hieraus zogen Beslu et al. den Schluss, dass die Fähigkeit von HOXB4 eine Expansion hämatopoetischer Stammzellen zu induzieren, von der HOXB4 Bindungsaktivität an DNA abhängig ist (Beslu, KrosI, Laurin, Mayotte, Humphries & Sauvageau 2004).

Es stellte sich im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit folgende Frage: ist die N-terminale Deletion in der  $\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211\_S</sub> Doppelmutante von Bedeutung, d.h. verändert sie den von Beslu et al. erwähnten Effekt, den eine Mutation in der Homeodomäne von HOXB4 zur Folge hat.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde unter anderem der Vergleich (s. 3.5.1 bzw. 3.6.1) zwischen der in ihrer Homeodomäne und dem N-terminalen Bereich genetisch veränderten Doppelmutante  $\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211\_S</sub> und der GFP Negativkontrolle angestellt.  $\Delta$ P-HOXB4-N<sub>211\_S</sub> steigert weder *in vitro* die Proliferation noch in dem *in vivo* durchgeführten  $\Delta$ CFU-S Experiment die Zahl hämatopoetischer Stammzellen signifikant über das Niveau der GFP Negativkontrolle. Dagegen führte die einfache N-terminalen Deletion in HOXB4 im Vergleich zur GFP- Kontrolle zu einem signifikanten Anstieg der transduzierten Zellen *in vitro* und *in vivo*. Dies weist darauf hin, dass die verbleibende stammzellamplifikatorische Aktivität der N-terminal deletierten Einfachmutante  $\Delta$ P-HOXB4 von der DNA-Bindungsfähigkeit des Konstruktes abhängt.

Wir untersuchten zudem die Bedeutung der C-terminalen Domäne indem die  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL Doppelmutante mit der GFP Kontrolle, dem HOXB4-Wildtyp und der  $\Delta$ P-HOXB4 Einfachmutante verglichen wurde. Die additive Deletion der 29 C-terminal gelegenen Aminosäuren von  $\Delta$ P-HOXB4 ( $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL) führte im Vergleich zum HOXB4-Wildtyp sowohl *in vitro* zu einer Reduktion der proliferierenden Zellen als auch im  $\Delta$ CFU-S *in vivo* Versuch zu einer signifikanten Beeinträchtigung des stammzellamplifikatorischen Effektes von HOXB4 auf Kurz-zeit repopulierende hämatopoetische Zellen. Dies war zunächst nicht überraschend, da wir eine signifikant verminderte Zellproliferation von  $\Delta$ P-HOXB4 exprimierenden Zellen im Vergleich zu Zellen mit retroviraler Expression von HOXB4-Wildtyp bereits beobachtet hatten. Der Vergleich der Doppelmutante zur GFP-Kontrolle jedoch zeigt, dass  $\Delta$ P-HOXB4-C-DEL exprimierende Zellen anscheinend nicht mehr die Fähigkeit besitzen, sich in dem Masse zu amplifizieren, dass sie hinsichtlich ihrer Proliferation den GFP exprimierenden Kontrollzellen signifikant überlegen sind. Hingegen zeigen die Abbildungen 33 und 38 bzw. deren korrespondierenden Beschreibungen unter 3.5.1 und 3.6.1, dass  $\Delta$ P-HOXB4 exprimierende Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stärker proliferieren als GFP exprimierende Kontrollzellen. Dies legt nahe, dass der C-terminalen Deletion für die verbleibende Stammzellaktivität der N-terminalen  $\Delta$ P Mutation eine wesentliche Bedeutung zukommt. Die Frage, ob die C-terminale Mutation nur in Verbindung mit der N-terminalen Deletion zu einer Verminderung der Stammzellaktivität von

HOXB4 führt oder auch als alleinige Veränderung die HOXB4 Aktivität einschränkt, kann allerdings anhand der durchgeführten Experimente nicht belegt werden.

Für die Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Systems ist neben einer Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen die Differenzierung dieser unreifen Vorstufen bis hin zu reifen Endstufen unabdingbar. Es ist bekannt, dass HOXB4 in der Lage ist, das Wachstum primitiver, hämatopoetischer Zellen zu verstärken, ohne jedoch dem Differenzierungsprozess dieser Zellen zu schaden. (Antonchuk, Sauvageau & Humphries 2001). Ann C.M. Brun et al. beobachteten in einem Mausmodell, dem das gesamte HOXB4 Gen entfernt wurde (engl. knockout), neben einer signifikant reduzierten Zellzahl in der Milz und im Knochenmark auch eine leichte Reduktion roter Blutzellen und myeloischer Vorläuferzellen. (Brun, Bjornsson, Magnusson, Larsson, Leveen, Ehinger, Nilsson & Karlsson 2004). Dies stützt die Hypothese, dass Mutationen des HOXB4 Gens möglicherweise die zelluläre, myeloische Differenzierung hämatopoetischer unreifer Zellen beeinflussen könnten. Beslu et al. wiederum zeigten, dass die Differenzierung muriner, transduzierte Knochenmarkszellen *in vivo* durch eine Punktmutation (W→G) in der PBX bindenden Domäne nicht beeinträchtigt ist (Beslu, Kros, Laurin, Mayotte, Humphries & Sauvageau 2004).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit stellte sich die Frage, ob die einfache N-terminale Deletion  $\Delta P$  bzw. die doppelten Mutationen in HOXB4 im Vergleich zum Wildtyp zum einen die Generierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen beeinflussen und ob die HOXB4 Mutanten weiterhin einen Effekt auf das zelluläre, myeloische Differenzierungsmuster hämatopoetischer Progenitorzellen *in vitro* besitzen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der Einfach-/ und Doppelmutanten hämatopoetische Vorläuferzellen *in vitro* zu expandieren bzw. Kurzzeit-repopulierende Stammzellen *in vivo* zu amplifizieren im Vergleich zum HOXB4-Wildtyp verringert ist. Wie in Tabelle 3 gezeigt generierten die Einfach-/und Doppelmutanten im Vergleich zu dem Wildtyp substantiell weniger unreife, c-kit und Sca-1 positive Progenitorzellen innerhalb einer Woche in der Flüssigkeitskultur. Somit liegt nahe, dass die deletierten Domänen für die stammzellamplifizierende Wirkung des HOXB4 Gens von Bedeutung sind. Grundsätzlich müsste diese interessante Beobachtung durch *in vivo* Experimente ergänzt werden, um zu analysieren, ob die Beobachtung ein *in vitro* Phänomen darstellt oder ob tatsächlich die analysierten Gendomänen für die *in vivo* Aktivität von HOXB4 entscheidend sind.

Da bekannt ist, dass HOXB4 in der Lage ist, das Wachstum primitiver, hämatopoetischer Zellen zu verstärken (s.o), ohne deren zellulären Differenzierungsprozess zu beeinträchtigen, erschien es interessant, das Differenzierungsverhalten der HOXB4 mutierten Zellen nach einer Woche *in vitro* zu untersuchen. Unter 3.5.3 wurde schon erwähnt, dass nach einer Woche kein signifikanter Unterschied zwischen der prozentualen Verteilung Mac-1 und Gr-1 exprimierender Zellen des Wildtyps im Vergleich zu den Doppelmutanten  $\Delta P$ -HOXB4,  $\Delta P$ -HOXB4-W144-A und der Negativkontrolle bestand. Daraus lässt sich ableiten, dass weder die  $\Delta P$ -Deletion allein, noch in Verbindung mit einer Mutation in der PBX interagierenden Domäne, oder im C-terminalen Bereich von HOXB4 zu einem Differenzierungsblock hämatopoetischer Progenitorzellen hin zu reifen myeloischen Endstufen führt. Auch diese Beobachtungen beschränkten sich auf *in vitro* Versuche, so dass nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass die untersuchten Mutanten *in vivo* zu Veränderungen in der zellulären, hämatopoetischen Entwicklung führen.

Zusammengefasst zeigen unsere Untersuchungen, dass molekulargenetische Veränderungen des HOXB4 Gens dessen Eigenschaften, unreife hämatopoetische Zellen zu expandieren, beeinflusst, ohne jedoch deren zellulären Differenzierungsprozess zu beeinträchtigen.

## **5. Zusammenfassung und klinischer Aspekt**

Die bemerkenswerte Kapazität spezifischer HOX Proteine, die Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen zu verstärken, sorgt für ein enormes Interesse an einer experimentellen Erforschung des molekularen Mechanismus. Eine der wesentlichen therapeutischen Strategien bei der Behandlung bösartiger hämatologischer Erkrankungen ist die Gabe einer hochdosierten Chemotherapie gefolgt von der Transplantation autologer Stammzellen des Knochenmarks oder peripheren Blutes des Patienten. Dieses therapeutische Konzept ist allerdings in seiner Durchführbarkeit abhängig von der Gewinnung einer ausreichenden Anzahl so genannter Lang-zeit repopulierender Stammzellen, die als alleinige Klasse humaner Vorläuferzellen in der Lage sind, im myeloablativ behandelten Patienten zur Rekonstitution der körpereigenen Hämatopoese zu führen. Die Gewinnung einer ausreichenden Anzahl peripherer Stammzellen ist jedoch zum Beispiel chemotherapeutisch multipel vorbehandelten Patienten nach Verwendung stammzelltoxischer Chemotherapeutika wie Melphalan oder stammzelltoxischer Kombinationstherapien wie dem MCP Schema bestehend aus Mitoxantron, Cyclophosphamid und Prednison, deutlich erschwert (Hiddemann, Unterhalt, Buske & Sack 1997). Eine mögliche Alternative besteht in der Transplantation von Nabelschnurblutzellen, die eine höhere Frequenz hämatopoetischer Stammzellen aufweisen und weniger ausgeprägte Abstoßungsreaktionen hervorrufen, als Stammzellen von verwandten oder nicht verwandten Spendern. Allerdings ist auch dieser Ansatz häufig durch die begrenzte Menge an hämatopoetischen Stammzellen in seiner Anwendung beschränkt (Barker & Wagner 2003). Somit wäre die Etablierung einer Methodik, die in effektiver Weise eine Amplifikation Lang-zeit repopulierender Stammzellen *ex vivo* erlauben würde, von hohem klinischen Interesse. Versuche, dies durch die Applikation von Zytokinen *ex vivo* zu bewirken, konnten sich nicht durchsetzen, da die extrinsischen Faktoren zwar zu einer Zunahme der Anzahl von Progenitorzellen führen, diese jedoch in hohem Prozentsatz nicht mehr in der Lage sind, ein Lang-zeit Engraftment in den Patienten zu bewirken und somit nicht die Kriterien von Lang-zeit repopulierenden Stammzellen erfüllen (Scheding, Kratz-Albers, Meister, Brugger & Kanz 1998). Ein anderer Ansatz ist es, durch Veränderung der molekularen Signatur in den gewonnen Vorläuferzellen eine Stammzellamplifikation zu induzieren.

Da von HOXB4 gezeigt werden konnte, dass es in der Lage ist, menschliche Stammzellen des Nabelschnurblutes zu vermehren (Buske, Feuring-Buske, Abramovich, Spiekermann, Eaves, Coulombel, Sauvageau, Hogge & Humphries 2002), ist es von hohem Interesse,

Proteindomänen von HOXB4 zu definieren, die für den stammzellamplifikatorischen Effekt des Transkriptionsfaktors verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit beschränkten wir uns darauf, die Funktion des N-terminalen Bereich von HOXB4 zu untersuchen. Zusammengefasst lassen die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse die Aussage zu, dass ein partieller Funktionsverlust der N-terminale Domäne ( $\Delta P$ ) von HOXB4 zu einer Reduktion der stammzellproliferativen Wirkung des HOXB4 -Wildtyps führt. Diese Arbeit ist Grundlage für sich anschließende eingehendere Untersuchung der Wirkung der N-terminalen Einfachmutante  $\Delta P$ -HOX B4 auf Lang-zeit repopulierende Stammzellen zum Beispiel mit Hilfe von murinen Transplantationsexperimenten, um einen tieferen Einblick in die Biologie HOXB4 induzierter Stammzellvermehrung zu erhalten. Zudem dient das beschriebene Modell dazu, ultrakompetente HOXB4 Mutanten herzustellen und Protokolle für die Amplifikation hämatopoetischer Stammzellen zu optimieren.

## **6. Literaturverzeichnis**

Abate-Shen C. 2002. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* 2(10):777-85.

Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhausz D, Weissman IL. 2000. Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* 12(2):144-50.

Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. 2001. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp Hematol* 29(9):1125-34.

Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. 2002. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 109(1):39-45.

Barba P, Magli MC, Tiberio C, Cillo C. 1993. HOX gene expression in human cancers. *Adv Exp Med Biol* 348:45-57.

Barker JN, Wagner JE. 2003. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev Oncol Hematol* 48(1):35-43.

Beslu N, Krosl J, Laurin M, Mayotte N, Humphries KR, Sauvageau G. 2004. Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood* 104(8):2307-14.

Bonnet D. 2003. Hematopoietic stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(3):219-29.

Brun AC, Bjornsson JM, Magnusson M, Larsson N, Leveen P, Ehinger M, Nilsson E, Karlsson S. 2004. Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood* 103(11):4126-33.

Buske C, Feuring-Buske M, Abramovich C, Spiekermann K, Eaves CJ, Coulombel L, Sauvageau G, Hogge DE, Humphries RK. 2002. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood* 100(3):862-8.

Buske C, Feuring-Buske M, Antonchuk J, Rosten P, Hogge DE, Eaves CJ, Humphries RK. 2001. Overexpression of HOXA10 perturbs human lymphomyelopoiesis in vitro and in vivo. *Blood* 97(8):2286-92.

Buske C, Humphries RK. 2000. Homeobox genes in leukemogenesis. *Int J Hematol* 71(4):301-8.

Care A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C, Colombo MP. 1996. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol* 16(9):4842-51.

Chang CP, Brocchieri L, Shen WF, Largman C, Cleary ML. 1996. Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Mol Cell Biol* 16(4):1734-45.

Christopherson K, Hromas R. 2001. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem Cells* 19(5):388-96.

De Vita G, Barba P, Odartchenko N, Givel JC, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E, Cillo C. 1993. Expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 29A(6):887-93.

Elwood NJ, Zogos H, Pereira DS, Dick JE, Begley CG. 1998. Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood* 91(10):3756-65.

Felli MP, Maroder M, Mitsiadis TA, Campese AF, Bellavia D, Vacca A, Mann RS, Frati L, Lendahl U, Gulino A, Screpanti I. 1999. Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int Immunol* 11(7):1017-25.

Gehring WJ, Affolter M, Burglin T. 1994. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* 63:487-526.

Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wuthrich K. 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78(2):211-23.

Giampaolo A, Pelosi E, Valtieri M, Montesoro E, Sterpetti P, Samoggia P, Camagna A, Mastroberardino G, Gabbianelli M, Testa U, . 1995. HOXB gene expression and function in differentiating purified hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 13 Suppl 1:90-105.

Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. 1996. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* 19(5):421-8.

Goodman F, Giovannucci-Uzielli ML, Hall C, Reardon W, Winter R, Scambler P. 1998. Deletions in HOXD13 segregate with an identical, novel foot malformation in two unrelated families. *Am J Hum Genet* 63(4):992-1000.

Han W, Ye Q, Moore MA. 2000. A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 95(5):1616-25.

Hiddemann W, Unterhalt M, Buske C, Sack H. 1997. Treatment of follicular follicle centre lymphomas: current status and future perspectives. *J Intern Med Suppl* 740:55-62.

Iscove NN, Nawa K. 1997. Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion. *Curr Biol* 7(10):805-8.

Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Sakano S, Bhatia M. 2000. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192(9):1365-72.

Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. 1999. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 13(5):687-98.

Kojika S, Griffin JD. 2001. Notch receptors and hematopoiesis. *Exp Hematol* 29(9):1041-52.

Kros J, Beslu N, Mayotte N, Humphries RK, Sauvageau G. 2003. The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity* 18(4):561-71.

Krumlauf R. 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78(2):191-201.

Lawrence HJ, Sauvageau G, Ahmadi N, Lopez AR, LeBeau MM, Link M, Humphries K, Largman C. 1995. Stage- and lineage-specific expression of the HOXA10 homeobox gene in normal and leukemic hematopoietic cells. *Exp Hematol* 23(11):1160-6.

Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. 1996. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 14(3):281-91.

Monica K, Galili N, Nourse J, Saltman D, Cleary ML. 1991. PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Mol Cell Biol* 11(12):6149-57.

Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. 1997. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124(10):1929-39.

Mortlock DP, Sateesh P, Innis JW. 2000. Evolution of N-terminal sequences of the vertebrate HOXA13 protein. *Mamm Genome* 11(2):151-8.

Ohishi K, Katayama N, Shiku H, Varnum-Finney B, Bernstein ID. 2003. Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol* 14(2):143-50.

Owens BM, Hawley RG. 2002. HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 20(5):364-79.

Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. 2003. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1:11842-9.

Pawliuk R, Eaves C, Humphries RK. 1996. Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* 88(8):2852-8.

Perkins A, Kongsuwan K, Visvader J, Adams JM, Cory S. 1990. Homeobox gene expression plus autocrine growth factor production elicits myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(21):8398-402.

Petzer AL, Eaves CJ, Barnett MJ, Eaves AC. 1997. Selective expansion of primitive normal hematopoietic cells in cytokine-supplemented cultures of purified cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 90(1):64-9.

Phelan ML, Rambaldi I, Featherstone MS. 1995. Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol Cell Biol* 15(8):3989-97.

Rempel RE, Saenz-Robles MT, Storms R, Morham S, Ishida S, Engel A, Jakoi L, Melhem MF, Pipas JM, Smith C, Nevins JR. 2000. Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol Cell* 6(2):293-306.

Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423(6938):409-14.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859):105-11.

Sahr K, Dias DC, Sanchez R, Chen D, Chen SW, Gudas LJ, Baron MH. 2002. Structure, upstream promoter region, and functional domains of a mouse and human Mix paired-like homeobox gene. *Gene* 291(1-2):135-47.

Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK. 2004. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* 23(43):7223-32.

Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM, Humphries RK. 1995. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 9(14):1753-65.

Scheding S, Kratz-Albers K, Meister B, Brugger W, Kanz L. 1998. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells for clinical use. *Semin Hematol* 35(3):232-40.

Schnabel CA, Jacobs Y, Cleary ML. 2000. HoxA9-mediated immortalization of myeloid progenitors requires functional interactions with TALE cofactors Pbx and Meis. *Oncogene* 19(5):608-16.

Shanmugam K, Featherstone MS, Saragovi HU. 1997. Residues flanking the HOX YPWM motif contribute to cooperative interactions with PBX. *J Biol Chem* 272(30):19081-7.

Shen WF, Chang CP, Rozenfeld S, Sauvageau G, Humphries RK, Lu M, Lawrence HJ, Cleary ML, Largman C. 1996. Hox homeodomain proteins exhibit selective complex stabilities with Pbx and DNA. *Nucleic Acids Res* 24(5):898-906.

Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, Moskow JJ, Lawrence HJ, Buchberg AM, Largman C. 1997. AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 17(11):6448-58.

Siminovitch L, Till JE, McCulloch EA. 1964. DECLINE IN COLONY-FORMING ABILITY OF MARROW CELLS SUBJECTED TO SERIAL TRANSPLANTATION INTO IRRADIATED MICE. *J Cell Physiol* 64:23-31.

Singh N, Phillips RA, Iscove NN, Egan SE. 2000. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp Hematol* 28(5):527-34.

Smith C. 2003. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* 10(1):9-16.

Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F, Sauvageau G. 2001. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 21(1):224-34.

Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. 1999. Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood* 94(8):2605-12.

Tupler R, Perini G, Green MR. 2001. Expressing the human genome. *Nature* 409(6822):832-3.

Wang Y, Hung C, Koh D, Cheong D, Hooi SC. 2001. Differential expression of Hox A5 in human colon cancer cell differentiation: a quantitative study using real-time RT-PCR. *Int J Oncol* 18(3):617-22.

Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. 2004. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 23(43):7164-77.

Watrin F, Wolgemuth DJ. 1993. Conservation and divergence of patterns of expression and lineage-specific transcripts in orthologues and paralogues of the mouse Hox-1.4 gene. *Dev Biol* 156(1):136-45.

Zandstra PW, Conneally E, Petzer AL, Piret JM, Eaves CJ. 1997. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9):4698-703.

Zhu J, Emerson SG. 2002. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21(21):3295-313.

## **7. Anhang**

### **7.1 Danksagung**

Es ist mir ein großes Anliegen, nochmals ausdrücklich meinen herzlichsten Dank an folgende Personen zu richten.

An erster Stelle möchte ich meiner Freundin Monica Cusan ganz herzlich danken, die durch Ihren unglaublichen Einsatz im Labor, ihre Hilfsbereitschaft und Leidenschaft zur Forschung wesentlich an dem erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit beteiligt war. Ohne ihre weitreichende Unterstützung wäre mein Forschungsprojekt nicht zur Doktorarbeit ausgereift. Zudem ist sie mir über die Zeit zu einer guten und wichtigen Freundin geworden, worüber ich sehr glücklich bin.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn PD Dr. med. Christian Buske aussprechen, der mir dieses interessante und medizinisch relevante Thema überließ. Seine Unterstützung und sein Vertrauen ermöglichte mir eine erfolgreiche Bearbeitung und Fertigstellung meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Dr. human.biol. Anirrudha Desphande, der mich in die Komplexität der Molekularbiologie einführte und mir den Alltag im Labor durch seine Kompetenz, Geduld und gute Betreuung sowie seinen Humor sehr erleichtert hat.

Den weiteren Mitarbeitern der Laborgruppe, Bianca Ksienziek, Farid Ahmed, Natalia Arseni, Vijay Rawat, Konstantin Petropoulos, Jasmin Jonas möchte ich einen großen Dank für ihre hilfreiche, unkomplizierte und unglaublich nette Unterstützung im Labor aussprechen.

Ein ganz besonderes und mir persönlich sehr wichtiges Dankeswort gilt meinen Eltern, Dieter und Sabine Wagner, meinen Geschwistern Julie und Daniel Wagner, sowie meinen engsten Freunden Annett Walker, Karin Mair, Tanja Kanzian, Sabine Galster und André Weidemann, auf deren Unterstützung ich mich in jeglicher Hinsicht immer verlassen konnte. Euren Rückhalt und Eure Unterstützung, die Ihr mir entgegenbringt, bedeutet mir sehr viel und ich möchte mich nochmals ganz herzlich dafür bei Euch bedanken.

## 7.2 Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name: Wagner  
Vorname: Anne  
Geburtsdatum / Ort: 05.11.1978 / Freiburg i.Brsg.  
Familienstand: ledig  
Konfession: evangelisch

### Schulbildung

08/1985 -06/1989 Weierhof-Grundschule, Freiburg i.Brsg.  
08/1989 -07/1998 Humanistisches Friedrich-Gymnasium, Freiburg i.Brsg.  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium

11/1998 Ludwig-Maximilian-Universität München  
Studiengang: Humanmedizin

04/2001 Ärztliche Vorprüfung

08/2001 Famulatur: University of Alberta, Edmonton, Canada  
Fachrichtung: Kardiologie  
Labor: Mitarbeit in der Vascular Biology Research Group

04/2002 Famulatur: AKH, Wien, Österreich  
Fachrichtung: Anästhesie

08/2002-09/2002 Famulatur: Helios Krankenhaus, Müllheim  
Fachrichtung: Gynäkologie und Geburtshilfe

03/2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

03/2003-04/2003 Famulatur: Princess Margaret Hospital, Kingston, Jamaika  
Fachrichtung: Allgemein Chirurgie und Notfallaufnahme

08/2003-09/2003 Famulatur: Klinikum Großhadern München, Med.Klinik3  
Fachrichtung: Innere Medizin, Hämatologie/Onkologie

21/3/2004

Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

09/08/2004-10/07/2005

Praktisches Jahr

1. Hälfte des 1. Tertials:

District General Hospital Eastbourne, GB

Lehrkrankenhaus der Universität London, GB

Fachrichtung: Gynäkologie und Geburtshilfe

2. Hälfte des 1. Tertials:

Universitätsklinikum Großhadern, München

Fachrichtung: Gynäkologie/Geburtshilfe

2. Tertial:

Städt. Krankenhaus München-Neuperlach

Fachrichtung: Innere Medizin

3. Tertial des Praktischen Jahres

Victoria Hospital, Wynberg, Kapstadt, Südafrika

Lehrkrankenhaus der Universität Kapstadt (UCT)

Fachrichtung: Allgemein Chirurgie

06/12/2005

Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

(Erhalt der Approbation)

10/2006

Trainee Doctor in Gynaecology/Obstetrics

at Somerset Hospital, Capetown, South-Africa

Promotion

03/2002-07/2004

PD Dr. med. Christian Buske

Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum Großhadern

In Zusammenarbeit mit dem ‚National Research Center for

Environment and Health‘ (GSF) (Direktor Prof. Dr. W.

Hiddemann)

Thema: Bedeutung des Homeoboxgen HOXB4 für die  
Regulierung muriner hämatopoetischer Progenitorzellen.

2004

Datenvorstellung auf der DGHO 2004:

‘HOXB4 induced stem cell amplification can be increased by  
inactivation of its PBX binding site and inhibition of histone  
deacetylase activity’.