

AUS DER ABTEILUNG FÜR HÄMATOLOGIE UND  
ONKOLOGIE DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE  
MEDIZIN I

DIREKTOR: PROF. DR. R. ANDREESEN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Der Einfluss von Bone Morphogenetic Protein (BMP-) 2, BMP-4  
und BMP-7 auf die Regulation der Proliferation und  
Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem  
peripheren Blut

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Michaela Simon  
aus Regensburg

2009



AUS DER ABTEILUNG FÜR HÄMATOLOGIE UND  
ONKOLOGIE DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE  
MEDIZIN I  
DIREKTOR: PROF. DR. R. ANDREESEN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Der Einfluss von Bone Morphogenetic Protein (BMP-) 2, BMP-4  
und BMP-7 auf die Regulation der Proliferation und  
Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem  
peripheren Blut

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Michaela Simon  
aus Regensburg

2009

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Burkhard Hennemann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Oliver Kölbl

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2009

In Erinnerung an

**Michael Simon**

**1947 - 2006**

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Bone Morphogenetic Proteins</i>.....</b>	<b>11</b>
	2.1.1 Molekularstruktur.....	12
	2.1.2 Signaltransduktionsweg.....	13
	2.1.2.1 Smad-Signalkaskade.....	14
	2.1.2.2 Extrazelluläre und zytoplasmatische Kontrollmechanismen.....	15
	2.1.3 Pleiotropie.....	15
	2.1.3.1 BMPs während der frühen Embryonalentwicklung.....	16
	2.1.3.2 BMPs im adulten Organismus.....	16
	2.1.3.2.1 Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase.....	16
	2.1.3.2.2 Bedeutung für die Pathophysiologie und Therapie einiger Krankheiten.....	17
<b>2.2</b>	<b>Hämatopoese.....</b>	<b>18</b>
	2.2.1 Charakterisierung hämatopoetischer Zellen.....	18
	2.2.1.1 Immunphänotypische Merkmale.....	18
	2.2.1.2 Funktionelle Typisierung.....	19
	2.2.1.2.1 In vivo Methoden zur Stammzelltypisierung.....	20
	2.2.1.2.2 In vitro Assays zur Stammzelltypisierung.....	20
	2.2.1.3 Stammzellplastizität.....	22
	2.2.2 Regulationsmechanismen.....	22
	2.2.2.1 <i>Microenvironment</i> .....	22
	2.2.2.2 Humorale Kontrollmechanismen.....	23
	2.2.3 Primitive Hämatopoese.....	24
<b>2.3</b>	<b>Regulation der Hämatopoese durch BMPs.....</b>	<b>25</b>
	2.3.1 Entstehung hämatopoetischer Zellen aus Mesoderm und embryonalen Stammzellen durch BMP-4.....	25
	2.3.2 Einfluss von BMPs auf postnatale Stammzellen aus Nabelschnurblut, Knochenmark und mobilisiertem, peripheren Blut.....	27
	2.3.3 Regulation des <i>microenvironments</i> durch BMPs.....	28

<b>3.</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>29</b>
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>31</b>
4.1.1	Humane Zellen.....	31
4.1.1.1	Zellgewinnung.....	31
4.1.1.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	31
4.1.1.3	Zellzählung in der Neubauer Zählkammer.....	31
4.1.1.4	Zellseparation durch <i>Ficoll Hypaque</i> Dichtezentrifugation.....	32
4.1.1.5	Zellselektion durch <i>StemSep</i> immunomagnetische Säule.....	32
4.1.2	Durchflusszytometrie.....	33
4.1.2.1	Grundprinzipien.....	33
4.1.2.2	Antikörperfärbung und Vitalitätsnachweis mit PI.....	34
4.1.2.3	Durchflusszytometrische Sortierung von Zellen.....	35
4.1.2.4	Ermittlung der CD 34 + und der CD 34 +/ CD 38 – Zellfraktion.....	35
4.1.3	Rezeptornachweis mittels (RT)-PCR Analyse.....	35
4.1.4	Zellkulturen.....	36
4.1.4.1	Einzelzellversuche mit BMPs in steigender Konzentration.....	37
4.1.4.2	Expansionskultur mit BMPs in steigender Konzentration.....	38
4.1.4.3	Expansionskultur mit BMPs in Permutation.....	38
4.1.5	Funktionelle Assays.....	39
4.1.5.1	CFC-Kurzzeitkultur.....	39
4.1.5.2	LTC-IC-Langzeitkultur.....	40
4.1.6	Statistik .....	41
4.1.6.1	Darstellung der Ergebnisse mit Standardfehler.....	41
4.1.6.2	t-Test nach Student.....	41
4.1.6.3	Berechnung der LTC-IC Frequenz.....	43
<b>4.2</b>	<b>Material.....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Geräte.....	44

4.2.2 Verbrauchsmaterialien.....	45
4.2.3 Zytokine.....	45
4.2.4 Antikörper.....	46
4.2.5 Zellkulturmedien.....	46
4.2.6 Reagenzien und Chemikalien.....	47
4.2.7 PCR-Oligonukleotide.....	48
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Nachweis von Typ I und Typ II BMP-Rezeptoren.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Einzelzellversuche mit BMP-4 und BMP-2 in steigender Konzentration.....</b>	<b>50</b>
<b>5.3 Expansion in Flüssigkulturen.....</b>	<b>51</b>
5.3.1 Charakterisierung der Ausgangszellpopulation.....	52
5.3.2 Expansionskultur mit BMP-2 und BMP-7 in steigender Konzentration.....	53
5.3.2.1 Proliferation der Gesamtzellzahl, der CD 34+ und CD 34+/38- Subpopulationen.....	53
5.3.2.2 Funktionelle Eigenschaften der Zellpopulationen.....	56
5.3.3 Expansionskultur mit BMP-4: Proliferation und Differenzierung der Zellpopulationen.....	58
5.3.4 Expansionskultur mit BMPs in Permutation.....	61
5.3.4.1 Proliferation der Gesamtzellzahl, der CD 34+ und CD 34+/38- Subpopulationen.....	62
5.3.4.2 Funktionelle Eigenschaften der Zellpopulationen.....	64
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>66</b>
<b>6.1 Expression von BMP Rezeptoren in CD 34+ Vorläuferzellen.....</b>	<b>66</b>
<b>6.2 Einfluss von BMPs allein und in Kombination auf Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen.....</b>	<b>67</b>
<b>7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>8. Abkürzungen.....</b>	<b>74</b>

<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>91</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>92</b>

## 1. Zusammenfassung

*Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) sind Glykoproteine aus der TGF- $\beta$ -Superfamilie. Sie aktivieren über Transmembranrezeptoren mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität eine intrazelluläre Signalkaskade, die von Smad-Proteinen getragen wird. Durch Veränderung der Genexpression werden in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration pleiotrope Effekte vermittelt. Die effektive Ligandenkonzentration kann durch extrazelluläre Antagonisten (Noggin, Dan, Follistatin...), inhibitorische Rezeptoren (BAMBI) und inhibitorische Proteine des Zytoplasmas (Smurf1) moduliert werden.

BMPs sind während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus aktiv. Bereits in der frühen Embryogenese stehen entscheidene Entwicklungsschritte unter der Kontrolle von BMPs: die Strukturierung der Keimscheibe entlang der dorsoventralen Achse, die Ausbildung einer Rechts-Links-Asymmetrie und die Weiterentwicklung der drei Keimblätter, zum Beispiel die Genese der ersten Blutinseln aus ventralem Mesoderm. In späteren Abschnitten der pränatalen Hämatopoese taucht BMP-4 im Zusammenhang mit dem Erscheinen hämatopoetischer Marker auf. Dabei wirken Zytokine wie etwa FGF, Aktivin A, SCF, FL3 und andere synergistisch. Postnatal erfüllen Liganden der BMP-Familie Aufgaben in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase von Knochen, Niere, Leber und anderen Organen. Sie konnten weiterhin als pathophysiologische Faktoren für maligne (z.B. Osteosarkom, Mammakarzinom...) und hereditäre (z.B. FOP, Polyposis-Syndrome...) Erkrankungen identifiziert werden.

Auch in der postnatalen Hämatopoese finden sich Hinweise auf die Bedeutung von BMPs: Sie werden in adultem Knochenmark und in peripheren Blutzellen exprimiert. Bestandteile des Signaltransduktionssystems können in hämatopoetischen Vorläuferzellen und in Stromazellen des *microenvironments* gefunden werden. In Studien konnten spezifische Effekte aufgedeckt werden: BMP-2, BMP-4 und BMP-7 konnten *in vitro* und *in vivo* die Proliferation, Differenzierung und Repopulationskapazität einer aus Nabelschnurblut gewonnenen, CD 34+/CD 38- Lin-Population beeinflussen [92]. Über den Smad-5-vermittelten Signaltransduktionsweg wirkt BMP-4 als positiver Stimulus auf die Generierung erythroider Progenitoren ohne sich auf die Granulozyten-Makrophagen-Zelllinie auszuwirken [107]. Hinweise auf eine Linienspezifität von BMP-4 liefern auch andere Arbeiten [108], jedoch scheint diese Eigenschaft auch vom Zusammenspiel mit anderen Faktoren abzuhängen

[109]. In einem anderen, experimentellen System konnten GM-CSF, EPO und SCF als synergistische Wachstumsfaktoren identifiziert werden [110]. Neben der direkten Einwirkung auf hämatopoetische Zellen können BMPs auch indirekt über Modifikation des *microenvironments* in die Hämatopoese eingreifen [82].

In der vorliegenden Arbeit soll ein weiterer Beitrag zum Verständnis der Rolle von BMPs in der Hämatopoese geleistet werden.

Initial gelang es, die Anwesenheit von BMP-Rezeptoren auf CD 34+, hämatopoetischen Zellen mittels (RT-) PCR Analyse zu bestätigen und somit prinzipiell die Fähigkeit dieser Population, auf BMP-Aktivität zu reagieren, nachzuweisen. Im nächsten Schritt wurden aus humanem, mobilisierten, peripheren Blut Lin-, CD34+ bzw. Lin-, CD 34+/CD 38- Zellen extrahiert und zusammen mit BMP-2, BMP-4 oder BMP-7 in ansteigenden Konzentrationen eine Woche lang inkubiert. Die Kultur erfolgte unter serumfreien Bedingungen, als Standardstimulus wurde die Kombination SCF+IL-3+FL3 zugesetzt. Sowohl vor als auch nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Oberflächenantigene CD 34 und CD 38 untersucht. Weiterhin wurden funktionelle Assays durchgeführt. Im CFC-Kurzzeitkultur-Assay wurden Vorläuferzellen nachgewiesen, die nach vierzehntägiger Kultur im semisoliden Medium zur Bildung von Kolonien fähig waren. Im LTC-IC-Langzeitkultur-Assay wurden Zellen detektiert, die auch nach mehreren Wochen noch die Fähigkeit, Kolonien zu bilden, aufwiesen.

Es gelang nicht, für einen der untersuchten BMP-Liganden einen signifikant stimulierenden oder inhibierenden Effekt auf die Gesamtzellzahl, die CD 34+ oder CD34+/CD38- Population zu beobachten. Es ließ sich lediglich eine tendenzielle Steigerung der Proliferation dieser Zellpopulationen für BMP-2 bei 5 ng/ml feststellen. Auch der Einfluss der BMPs auf die CFC-Ausbeute war im Vergleich mit der Kontrollexpansion sehr gering. Lediglich im Zuge der Langzeitkulturen konnte in der Expansion mit BMP-2 bei 5 ng/ml teilweise eine vergleichsweise deutliche Hemmung des erwarteten LTC-IC-Verlusts verzeichnet werden. Im Anschluss wurde dieser Ligand in Permutationsversuchen mit den übrigen BMPs weiter getestet. Hierbei gelang es, Hinweise darauf zu finden, dass BMP-2 und BMP-4 synergistisch auf die Generierung von LTC-ICs wirken.

## 2. Einleitung

### 2.1 *Bone Morphogenetic Proteins*

Die systematische experimentelle und klinische Erforschung der *bone morphogenetic proteins* (BMPs) begann -vor allem hinsichtlich ihres Einflusses auf Knochen- in den 1980er Jahren, jedoch reicht ihre Geschichte weiter zurück [1-3].

Bereits 1889 tauchten erste Hinweise für die Existenz der BMPs in der klinischen Arbeit von SENN auf. Er versuchte, osteomyelitische Defekte antiseptisch zu behandeln, wobei er entkalkten Ochsenknochen als Träger für Iodoform benutzte, was neben einer Eindämmung der Entzündung auch zur Neubildung von Knochengewebe führte [4]. Weitere Hinweise darauf, dass Knochengrundsubstanz einen osteoinduktiven Effekt ausüben kann, wurden in den folgenden Jahrzehnten sowohl in klinischen als auch experimentellen Studien gefunden, es blieb jedoch weitgehend bei einer bloßen Beobachtung dieser Wirkung, ohne dass diesem Phänomen systematisch nachgegangen worden wäre [5-8].

Erst 1965 prägte URIST die Bezeichnung *bone morphogenetic protein* oder *osteogenic protein* für die Proteinfraction der entkalkten Knochenmatrix, die er für die ektope Knochenbildung im Rattenmuskel verantwortlich machte [9]. Jedoch wurde erst Anfang der 80er Jahre von SAMPATH und REDDI ein reproduzierbarer Bioassay eingeführt, durch das gezeigt werden konnte, dass der von der Knochengrundsubstanz abgetrennte Proteinanteil ausschlaggebend für die Knocheninduktion ist [10].

Im Anschluss daran wurden BMPs erstmals gezielt in klinische Studien eingesetzt, wie etwa von JOHNSON, der Pseudarthrosen mit autologen oder allogenen Knochenimplantaten in Kombination mit BMP erfolgreich behandelte [11]. In der Orthopädie sind Fragen nach der Dosisabhängigkeit und geeigneten Carriersystemen in der klinischen Erprobung der BMPs auch gegenwärtig von Interesse, welches durch die überwiegend positiven Ergebnisse aus klinischen Studien und Multicenterstudien bestärkt wird [13-17].

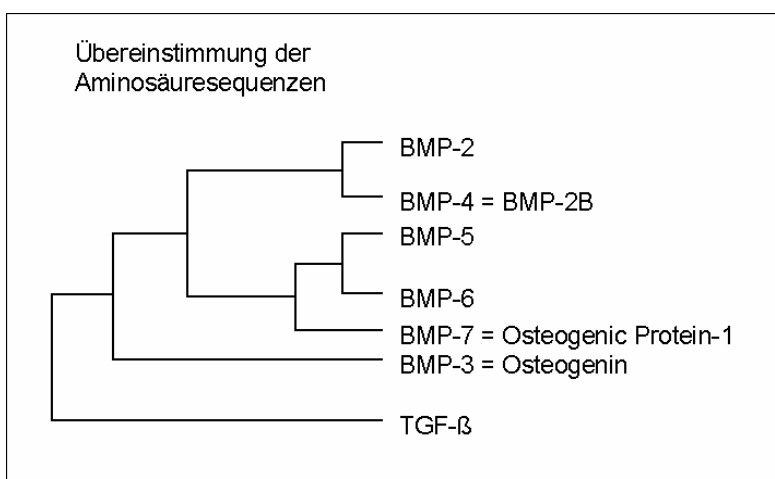
Die Gensequenzierung verschiedener BMPs in den 90er Jahren ermöglichte deren rekombinante Herstellung, die nun viel billiger produziert und ohne die Risiken einer Infektion oder allergischen Reaktion eingesetzt werden können. Die aufwändigen Methoden zur Isolierung und Aufreinigung aus entkalkter Knochenmatrix sind somit

obsolet, allerdings beschrieben BESSHO et al eine Verminderung des osteoinduktiven Potentials von rekombinatem im Vergleich zu humanem BMP [12].

### 2.1.1 Molekularstruktur

Die BMPs sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 15 und 30 kDa und bilden eine zur TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) Superfamilie gehörende Untergruppe. Sie umfasst mittlerweile etwa 30 Mitglieder, von denen 15 für den Menschen beschrieben worden sind [1]. Diese werden als Präkursoren in einer Länge von ungefähr 400 Aminosäuren synthetisiert. Im Rahmen der posttranslationalen Proteolyse entstehen die maturen Proteine mit etwa 110 Aminosäuren [18].

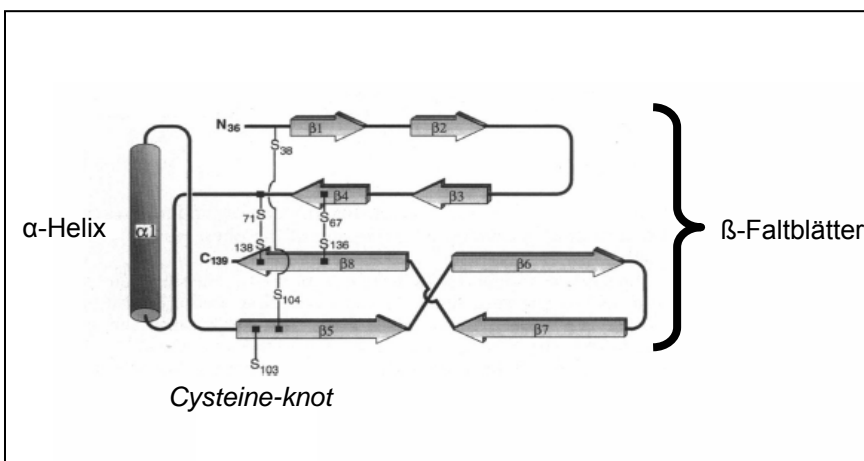
Ausser BMP-1, einer Metalloproteinase, besitzen alle BMPs eine Primärstruktur, die zu etwa 40% mit der von TGF- $\beta$  übereinstimmt, worin sieben für die Ausbildung der Tertiär- und Quartärstruktur wesentliche Cysteinyreste enthalten sind. Sechs von ihnen bilden drei intramolekulare Disulfidbrücken aus und formen eine starre *cysteine-knot* Region. Der siebte Cysteinyrest steht für intermolekulare Bindungen zur Verfügung. Es können biologisch aktive Hetero- und Homodimere entstehen. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass dadurch ein größeres Repertoire von Molekülen mit einer ähnlichen Funktion bereitgestellt werden kann. Entsprechend der Homologie in der Aminosäuresequenz ist es möglich, drei BMP-Untergruppen abzugrenzen (vgl. Abb.1): BMP-2 (früher BMP-2A) und BMP-4 (früher BMP-2B) stimmen zu ungefähr 80% überein. BMP-5, BMP-6 und BMP-7 (auch *osteogenic protein 1*, OP-1) bilden eine Gruppe mit 78% Übereinstimmung, während BMP-3 sich deutlich von den anderen Mitgliedern der BMP-Familie unterscheidet und für sich alleine steht [1-3].



**Abbildung 1:** Verwandtschaftsgrad von BMPs und TGF- $\beta$ . Die Länge der horizontalen Linien ist proportional zur Anzahl der Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Modifiziert übernommen aus [19].

Im Menschen befinden sich die für BMP-2 codierenden Gene auf Chromosom 20p12. BMP-4 wird auf Chromosom 14q22-23 codiert und tritt außer als Homodimer auch als Heterodimer auf, letzteres vor allem mit BMP-7. BMP-4/BMP-7 Dimere vermitteln einen stärkeren osteoinduktiven Effekt als Homodimere [20].

Die genetische Information für BMP-7 befindet sich ebenfalls auf Chromosom 20. Seine dreidimensionale Struktur wurde 1996 aufgeklärt [21]. Der *cysteine-knot* Abschnitt repräsentiert die *core* Region des Proteins, von der vier antiparallele  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausgehen, die zwei Finger bilden. Auf der gegenüberliegenden Seite des *cysteine-knot* befindet sich eine  $\alpha$ -Helix (vgl. Abb. 2).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des BMP-7 Monomers. Der *cysteine-knot* besteht aus drei Disulfidbrücken: Zwei (Cys-67-Cys-136 und Cys-71-Cys-138) bilden einen Ring, den die dritte (Cys-38-Cys-104) durchläuft. Weiterhin sind die  $\alpha$ -Helix und die  $\beta$ -Faltblattstrukturen dargestellt. Modifiziert übernommen aus [21].

### 2.1.2 Signaltransduktionsweg

Die Signalkaskade der BMPs basiert auf einem einfachen Modell, das sie sich mit anderen Mitgliedern der TGF- $\beta$  Superfamilie teilen. Es besteht aus Transmembranrezeptoren mit Serin/Threonin-Kinase Aktivität und sekundären Botenstoffen der Smad Familie.

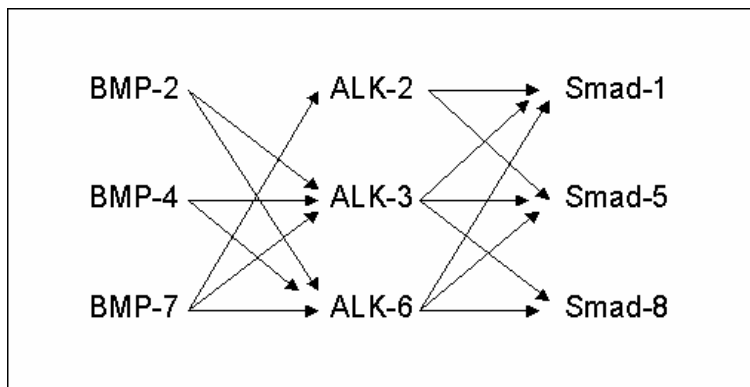
Die große Vielfalt von unterschiedlichen Effekten, die durch dieses simple System vermittelt werden, kommt zustande, indem das Signal sukzessive spezifiziert wird. Dies findet auf drei Ebenen statt [22]:

1. Es existieren mehrere Isoformen der Rezeptoren, die gegenüber unterschiedlichen Liganden stärkere oder schwächere Affinität zeigen (vgl. Abb. 3)[23, 24].
2. Für die Untergruppen der TGF- $\beta$  Superfamilie gibt es spezifische, zytoplasmatische Messengerproteine. Smad-2 und Smad-3 stehen für die Signaltransduktion von TGF- $\beta$ , *activins* und *nodal-related proteins* zur

Verfügung, während BMPs ihr Signal über Smad-1, Smad-5 und Smad-8 weiterleiten.

- Die Bindung zwischen DNA und intrazellulären Signalproteinen wird reguliert von nukleären Kofaktoren. Sie sind sowohl Signalweg-spezifisch als auch Gen-spezifisch und werden nur in bestimmten Zelltypen exprimiert [25].

Darüberhinaus existieren weitere Transduktionswege für BMPs z.B. Signalkaskaden über p38, RAS, Erk, JNK oder PI3, die zum Teil noch nicht gänzlich erforscht sind [26, 27].



**Abbildung 3:** Spezifität von Typ I Rezeptoren für BMP Liganden und Smad Proteine. BMP-2 und -4 binden an ALK-3 und -6, BMP-7 bindet mit hoher Affinität an ALK-2, kann aber auch mit ALK-3 und -6 interagieren.

Modifiziert übernommen aus [28].

### 2.1.2.1 Smad- Signalkaskade

Die Smad-Signalkaskade reguliert vor allem die Differenzierung von Zellen. Sie beginnt mit der Bindung von BMP an präformierte, transmembrane Rezeptordimere, die aus mindestens einem Typ I Rezeptor und einem Typ II Rezeptor bestehen. Es kommen drei Isoformen des Typ I Rezeptors vor: *activin receptor-like kinase (ALK) 2*, 3 (auch *BMP receptor Ia*, BR1a), 6 (auch *BMP receptor Ib*, BR1b). Ebenso gibt es drei Isoformen vom Typ II Rezeptor: *BMP receptor II (BRII)*, *activin type receptor IIA* und *IIB* (ActRIIA und ActRIIB). BMPs binden an diese Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität, was zu der Annahme führt, dass die Bindungspräferenzen der einzelnen Liganden zum breiten Spektrum der von BMP hervorgerufenen Wirkungen beitragen [23-25, 29].

Der Typ II Rezeptor aktiviert den Typ I Rezeptor durch Phosphorylierung, dieser wiederum phosphoryliert zwei Serinreste an der C-terminalen SSxS-Sequenz von Smad-1, Smad-5 oder Smad-8, welche die Gruppe der Rezeptor-aktivierten Smads (R-Smads) bilden. Aktivierte R-Smads dimerisieren mit Smad-4, einem unspezifischen Signalprotein, das auch in die Signaltransduktion von TGF- $\beta$

eingebunden ist. Mit Hilfe von Koaktivatoren und Korepressoren modifiziert der Komplex Smad-4/R-Smad nach Translokation in den Nukleus die Transkription von Zielgenen [25-27].

### 2.1.2.2 Extrazelluläre und zytoplasmatische Kontrollmechanismen

BMPs sind Morphogene, die über einen Konzentrationsgradienten den Entwicklungsweg von Zellen bestimmen. Die Tatsache, dass unterschiedliche Konzentrationen zu verschiedenen Ergebnissen führen, wurde in vitro nachgewiesen und wird auch unter in vivo Bedingungen für wahrscheinlich gehalten [22]. Das zur Modulierung des Konzentrationsniveaus benötigte System von Antagonisten und Inhibitoren ist komplex und erstreckt sich über drei Ebenen:

1. Die Gruppe der bekannten extrazellulären Antagonisten vergrößert sich ständig. Sie wurden hauptsächlich als Regulatoren der Embryonalentwicklung entdeckt (z.B. Noggin, Chordin, Follistatin, Cerberus und Gremlin) und binden an spezifische BMPs. *Twisted granulation proteins* (Tsgs) können in Kooperation mit Chordin BMP-Signale sowohl stimulieren als auch inhibieren [26, 30]. USAG-1 (*uterine sensitization-associated gene-1*) wird hauptsächlich in der Niere synthetisiert, Sclerostin wird vor allem in langen Röhrenknochen und Knorpelgewebe nachgewiesen [31].
2. Auf Rezeptorebene wurde von ONICHTCHOUK et al [32] der Inhibitor BAMBI (*BMP and activin membrane-bound inhibitor*) gefunden, der durch Heterodimerisation mit dem Typ I Rezeptor diesen inaktiviert.
3. Im Zytoplasma existiert eine weitere Gruppe von Smads, bestehend aus Smad-6 und Smad-7, die das C-terminale SSxS-Motiv nicht besitzen und eine inhibitorische Rolle spielen [33]. Weiterhin wurde von ZHU et al [34] der *Smad ubiquitination regulatory factor-1* (Smurf1) als hemmendes Protein identifiziert.

### 2.1.3 Pleiotropie

BMPs steuern als pleiotrope Morphogene das Schicksal von Zellen sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus. Pleiotropie bezeichnet die Fähigkeit eines einzelnen Gens oder Proteins, multiple biologische Reaktionen hervorzurufen, wie etwa Apoptose, Proliferation und Differenzierung sowie Adhäsion und Migration. Die Bezeichnung Morphogen weist darauf hin, dass die hervorgerufenen Effekte wesentlich vom Kontext bestimmt sind, in dem BMPs

auftreten. Durch Modulation der BMP-Aktivität, zum Beispiel mittels extrazellulärer Antagonisten, wird ein Konzentrationsgradient hergestellt, entlang welchem im Extremfall sogar entgegengesetzte Effekte ausgelöst werden können.

### **2.1.3.1 BMPs während der frühen Embryonalentwicklung**

Seit den 1980er Jahren ist bekannt, dass zytoplasmatische Signalproteine des BMP-Signalwegs für die Differenzierung des homogenen Morulazellclusters in die gegliederte Struktur des frühen Embryos eine entscheidende Rolle spielen [35-37].

Ein weiterer Schritt in der Gliederung des frühen Embryos ist die Strukturierung der dreiblättrigen Keimscheibe entlang der dorsoventralen Achse, wodurch die späteren Derivate der Keimblätter bestimmt werden. Hierbei konnte BMP-4 als wichtigster ventralisierender Faktor identifiziert werden [30, 31, 38-40]. Für Wirbeltiere ist die Ausbildung einer Rechts-Links-Asymmetrie wichtig für Positionierung, Morphogenese und regelrechte Funktion innerer Organe. Dieser Vorgang ist abhängig von BMPs, BMP-Antagonisten und anderen Mitgliedern der TGF- $\beta$  Superfamilie [41, 42].

### **2.1.3.2 BMPs im adulten Organismus**

Zwar ist das Vorkommen von BMPs in den meisten Organen und Geweben des adulten Säugers bekannt, aber ihre genaue Funktion ist bis jetzt weitgehend noch nicht erforscht worden. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Bereiche der Physiologie und Pathophysiologie gegeben werden, in denen detailliertere Kenntnisse über die Rolle von BMPs existieren.

#### **2.1.3.2.1 Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase**

##### LEBER:

Die Arbeitsgruppe von MILLER et al konnte zeigen, dass die Expression von BMP-9 in der Leber der adulten Ratte dominiert. Die Synthese beschränkt sich auf Endothel- und Kupffer-Zellen, die dem mononukleären, phagozytierenden System (MPS) angehören. Der Nachweis eines Rezeptors mit hochspezifischer Bindungsaffinität zu BMP-9 auf diesen Zellen bestärkt die Vermutung, dass BMP-9 einen autokrinen/parakrinen Regulationsfaktor des hepatischen MPS darstellt [43].

##### NIERE:

Die Expression von BMP-7 dominiert in der Niere. Nach Induktion eines ischämischen, akuten Nierenversagens fällt der Spiegel von BMP-7 ab, was nicht nur

durch nekrotischen Zelluntergang bedingt ist, sondern auch durch Verminderung der Genexpression in gesunden Zellen [44].

#### HAARFOLLIKEL:

BMPs begünstigen die Ausdifferenzierung von epidermalen Vorläuferzellen in Haarfollikel und supprimieren die Talgdrüsenbildung. Dieser Effekt wird durch Noggin aufgehoben [45].

#### INTESTINALES EPITHEL:

Epithelzellen des GIT regenerieren sich aus Stammzellen, die sich am Boden der Dünndarmkrypten befinden und sich auf dem Weg zur Zottenspitze in resorptives Epithel differenzieren. Einer der zentralen Informationswege hierfür ist die Shh/BMP-Signalkaskade [46].

#### WEIBLICHER REPRODUKTIONSTRAKT:

ALK-6-Nullmutanten verdeutlichen die Bedeutung des BMP-Signalwegs für die Fertilität weiblicher Mäuse: Die Estradiol-Produktion ist gestört und damit der ovulatorische Zyklus [47].

#### NEUROGENESE:

In der adulten, subventrikuläre Zone (SVZ), in der BMP-2 und BMP-4 sowie deren Rezeptoren produziert werden, persistiert die Neurogenese. Durch Zugabe von Noggin entwickeln sich SVZ-Zellen in neuronale, ohne Noggin in gliale Richtung. Da Noggin in vivo im Ventrikelependym exprimiert wird, kann spekuliert werden, dass durch Inhibition subventrikulärer BMPs eine Nische für die Bildung von Neuronen geschaffen wird [48]. BREDERLAU et al beschreiben eine proastrozytäre Wirkung von BMPs auf hippocampale Vorläuferzellen der adulten Ratte [49].

#### OSTEOGENESE:

Die Knochenheilung nach Fraktur läuft in Stadien ab: Nach initialer Inflammation folgt die Bildung von Knorpel, der schließlich in Knochen umgewandelt wird. BMP-2 bis BMP-8 tauchen in verschiedenen Phasen auf. Sie leisten ihren Beitrag zur chemotaktischen Anlockung von Mesenchymzellen und deren Transformation in Osteoprogenitoren sowie zur Chondrogenese [3].

### **2.1.3.2.2 Bedeutung für die Pathophysiologie und Therapie einiger Krankheiten**

Neben ihren physiologischen Aufgaben in der Zellbiologie üben BMPs auch in der Pathophysiologie verschiedener Krankheitsbilder eine Funktion aus. Analog zu ihren

zahlreichen Wirkungsbereichen im gesunden Organismus zeichnen sich BMPs auch als pathogenetische Einflussfaktoren durch ihre Kontextabhängigkeit aus.

In den letzten Jahren konnte eine ganze Reihe von malignen Erkrankungen identifiziert werden, bei denen sich Abweichungen vom BMP-Signalweg entweder positiv oder negativ auf den Krankheitsverlauf und die Tumorentstehung auswirken. Dazu gehören neben Osteosarkomen [50] und anderen Knochentumoren auch Karzinome der Mamma, des Pankreas und des Magens [28] sowie das maligne Melanom [51] und Prostatakarzinom [52].

Auch Erbkrankheiten wie Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) [53, 54], hamartomatöse Polyposis-Syndrome [55, 56] und die familiäre und sporadische Variante der primären pulmonalen Hypertonie (PPH) stehen in pathogenetischem Zusammenhang mit BMPs [57, 58].

## **2.2 Hämatopoese**

Die Bildung von Blutzellen findet beim Erwachsenen physiologischerweise im Knochenmark statt, ihr Ausmaß wird über positive und negative Rückkopplungsmechanismen reguliert. Sobald die Konzentration bestimmter Zellen abfällt oder der Bedarf, beispielsweise im Rahmen eines bakteriellen Infekts, ansteigt, wird unter dem Einfluss hämatopoetischer Botenstoffe die Zellnachbildung angeregt. Alle Blutzellen entstehen aus primitiven, undifferenzierten Stammzellen, die sich in der hämatopoetischen Nische des Knochenmarks befinden [59].

### **2.2.1 Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen**

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) gehören zu den am besten charakterisierten Stammzellen des Körpers. Sie werden durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Zelltypen definiert.

#### **2.2.1.1 Immunphänotypische Merkmale**

Die eigentliche pluripotente HSC konnte bisher nicht phänotypisch isoliert werden, es ist jedoch möglich, den HSC-Pool durch Oberflächenmerkmale in Subpopulationen einzuteilen. Einer der üblichsten Marker ist das Glykoprotein CD (*cluster of differentiation*) 34, das als Ligand für L-Selektin fungiert und auch auf Zellmembranen des Endothels vorkommt. Im Knochenmark sind 1-4% der kernhaltigen Zellen CD 34+, im peripheren Blut weniger als 0,1%. In diese

Untergruppe gehört die Mehrheit der humanen Zellen, die zum *engraftment* (= Anwachsen des funktionell kompetenten Knochenmarktransplantats) fähig sind, außerdem alle LTC-ICs (*long term culture-initiating cells*) und die meisten CFCs (*colony forming cells*). Es existiert jedoch auch eine CD 34- Subpopulation von primitiven Zellen, die das Potential zum *engraftment* besitzt [60]. Ein weiteres Charakteristikum unreifer hämatopoetischer Zellen ist die Abwesenheit von linienspezifischen Markern (Lin-), die auf ausgereiften Blutzellen zu finden sind, z.B. CD 3 für T-Lymphozyten, CD 8 für zytotoxische T-Zellen oder CD 15 für Granulozyten. Innerhalb der CD 34+ Population kann eine primitive Untergruppe durch die Abwesenheit von CD 38 beschrieben werden [61]. Gemessen an der LTC-IC- Aktivität und am Repopulationsvermögen gehört die Fraktion der CD 34+ KDR (= Rezeptor für VEGF)+ Zellen (entsprechen 0,1%-0.5% der CD 34+ Zellen) zu den ursprünglichsten der HSCs [62].

Weitere membranassoziierte Moleküle, die eine Aufteilung der CD 34+ Population erlauben, sind Thy-1 (= CD 90), CD 33 (für Monozyten und myeloische Vorläuferzellen), c-kit (Rezeptor für *stem cell factor*, SCF) oder *human leucocyte antigen* (HLA-) DR [63-65].

### 2.2.1.2 Funktionelle Typisierung

Mittlerweile stehen verschiedene *in vitro* und *in vivo* Assays zur Verfügung, die die funktionelle Charakterisierung von HSC und hämatopoetischen Progenitorzellen erlauben sowie deren hierarchische Einordnung nach ihrem funktionellen Potential (vgl. Abb. 4).

Wenn sich pluripotente HSCs sukzessive auf bestimmte Zelllinien festlegen, verlieren sie während dieses Prozesses die Fähigkeit zur Autoreproduktion ebenso wie ihre Pluripotenz. Zu den frühesten Schritten auf dem Weg zur terminal differenzierten Zelle gehört die Entscheidung zwischen myeloischer (für Granulozyten, Makrophagen, Thrombozyten und Erythrozyten) und lymphoider (für T-, B- und NK-Zellen) gemeinsamer Progenitorzelle. Durch Modulation der Genexpression, z.B. durch Down-Regulation von Rezeptoren, schlagen Progenitorzellen eine Entwicklungsrichtung ein, die ab einem bestimmten Zeitpunkt irreversibel ist und zur reifen Blutzelle führt.

Ferner sind HSCs zur Migration durch den Blutkreislauf fähig; in diesem Zusammenhang bezeichnet *homing* die Wanderung aus dem peripheren Blut ins

Knochenmark, *mobilization* die aus dem Knochenmark in die Peripherie. Die Bereitstellung schnell rekrutierbarer Vorläuferzellen durch extramedulläre Hämatopoese bei dramatischen Blutverlusten könnte eine mögliche Erklärung für die Existenz zirkulierender hämatopoetischer Zellen im Erwachsenen sein [62].

#### **2.2.1.2.1 In vivo Methoden zur Stammzelltypisierung**

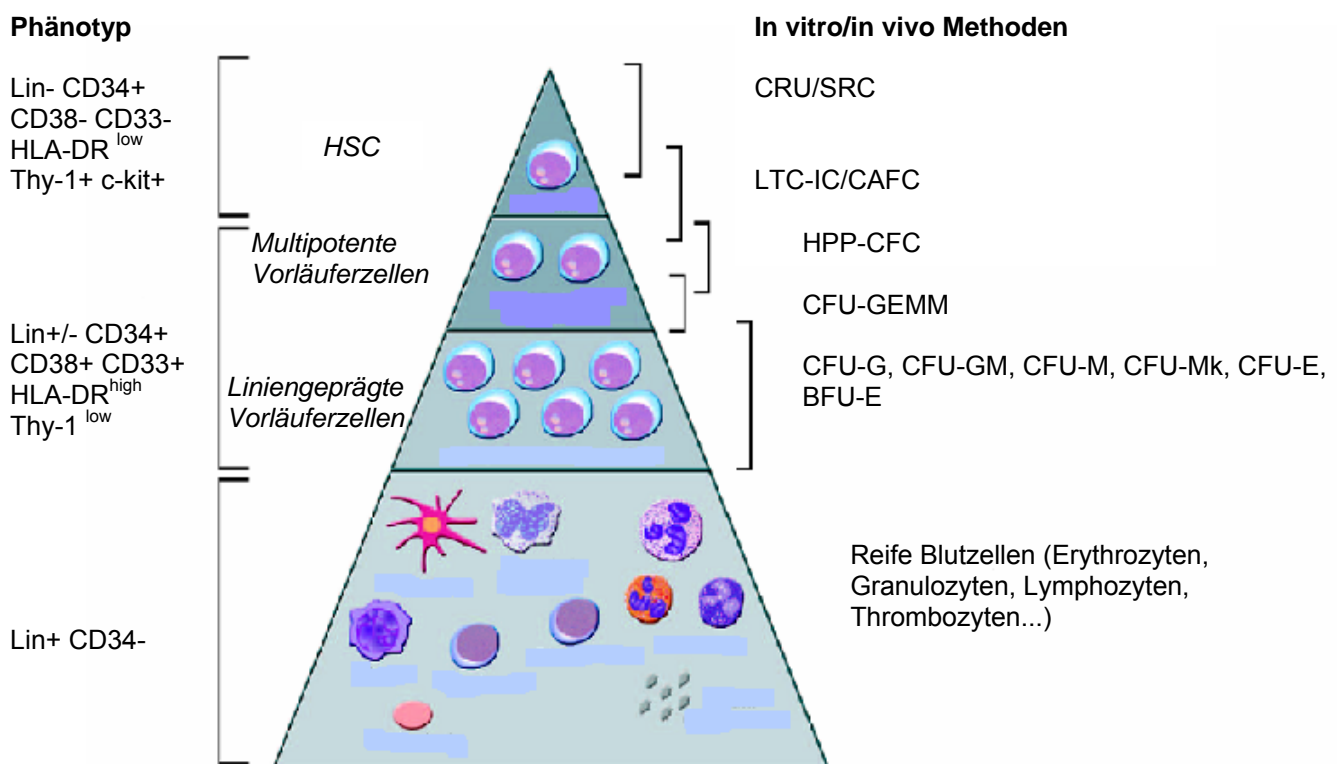
Der Goldstandard zum Nachweis humaner HSCs ist die Xenotransplantation in immundefiziente Mäuse, deren *engraftment* die erhaltene Kapazität zur multipotenten Differenzierung und Selbsterneuerung widerspiegelt. Die Empfängertiere müssen in ihrem Immunsystem beeinträchtigt sein, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern. Einer der ersten verwendeten, murinen Zuchtstämmen wies eine homozygote SCID- (*severe combined immunodeficient*) Mutation auf mit kombiniertem T- und B- Zelldefekt, aber funktionierenden Makrophagen und NK-Zellen. Durch Rückkreuzung mit *nonobese diabetic* (NOD) Mäusen konnte dieser Nachteil teilweise ausgeglichen werden. In der SCID-hu Zuchtlinie sind die Bedingungen im *microenvironment* (vgl. 2.2.2.1) des Empfängertiers für humane Zellen durch Implantation von menschlichem Gewebe (Thymus, Leber, Lymphknoten...) optimiert, jedoch ist das NOD/SCID System gegenwärtig das am häufigsten eingesetzte. Zellen, die zum *engraftment* von NOD/SCID-Mäusen imstande sind, heißen SRCs (*SCID repopulating cells*) bzw. CRUs (*competitive repopulating units*). Diese Gruppe kann anhand ihrer Rekonstitutionskinetik in a) zur Langzeitrekonstitution (ab einigen Monaten nach der Transplantation bis zum Lebensende) und b) zur Kurzzeitrekonstitution (während der ersten Wochen nach der Transplantation) fähige Zellen eingeteilt werden, wobei erstgenannte in der Stammzellhierarchie höher stehen [62, 66-68].

Als alternatives Modellsystem werden Schafföten eingesetzt, anhand derer auch die Plastizität adulter Stammzellen unterschiedlichen Ursprungs erforscht werden kann [69].

#### **2.2.1.2.2 In vitro Assays zur Stammzelltypisierung**

Alternative Ansätze zur Qualifizierung hämatopoetischer Zellen stellen in vitro Versuche dar, die im Vergleich mit in vivo Experimenten deutlich günstiger und weniger aufwändig sind. Obwohl sie als Surrogatmethoden anzusehen sind, korrelieren die Ergebnisse aus in vitro Assays recht gut mit denen aus

Transplantationsversuchen. Als Beispiel sei der *cobblestone-area-forming cell* (CAFC) Assay genannt, in dem primitive Stammzellen in Langzeitkulturen als pflastersteinähnlichen Cluster aus nicht refraktären Zellen unterhalb einer supportiven Stromazellschicht detektiert werden [70, 71]. Eine weitere Möglichkeit zur Messung primitiver Zellen in Langzeitkulturen stellt der *long term culture-initiating cell* (LTC-IC) Assay dar, in dem HSCs nach ihrer Kultivierung in Verdünnungsreihen anhand ihrer Fähigkeit zur Koloniebildung gemessen werden [72-74]. Der Nachweis von reiferen Vorläuferzellen, die bereits einer Ausreifungslinie zugeordnet sind, kann durch deren Kultivierung im semisoliden Medium erbracht werden. Nach zwei Wochen ist es möglich, die Kolonien nach ihrer Morphologie einer spezifischen Reihe zuzuordnen: *colony forming unit* (CFU)-E für Erythrozyten, CFU-GM für Granulozyten und Makrophagen, CFU-GEMM für myelolymphoide Kolonien und CFU-Mega für Thrombozyten [75-77].



**Abbildung 4:** Hierarchie der hämatopoetischen Zellen [62]

Pluripotente HSC entwickeln sich unter Verlust ihres Selbsterneuerungspotentials zu multipotenten Vorläuferzellen. Diese ordnen sich als liniengeprägte Vorläuferzellen immer spezifischeren Ausreifungslinien zu, z.B. über das Stadium der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle (für Makrophagen, Megakaryozyte, Granulozyten, Erythrozyten) zur granulomonozytären Vorläuferzelle, bis zur reifen Blutzelle.

Links eine Auswahl typisierender Oberflächenantigene, rechts funktionelle Nachweismethoden (CRU = competitive repopulating unit, SRC= SCID repopulating cell, LTC-IC= long term colony-initiating cell, CAFC= cobblestone-area-forming cell, CFU-GEMM, -G, -GM, -M, -Mk, -E= colony forming unit-granulocyte/erythrocyte/macrophage/megacaryocyte, -granulocyte, -granulocyte/macrophage, -megacaryocyte, -erythrocyte, BFU-E= burst forming unit-erythrocyte).

### **2.2.1.3 Stammzellplastizität**

Das Entwicklungspotential von HSCs ist nicht allein auf die hämatopoetische Reihe beschränkt. HAO et al berichten, dass CD 34+/CD 3- HSCs aus der fetalen Leber in neuronale Stammzellen und Astrozyten differenzieren können und somit die Grenze zwischen verschiedenen Keimblättern (HSCs als Derivat des Mesoderms, neuronale Stammzellen als Derivat des Ektoderms) überschreiten [78]. In anderen Studien am Mausmodell konnte die Differenzierung von HSCs in Hepatozyten gezeigt werden. Weiterhin wird behauptet, dass im adulten Herzen nach einem akuten, ischämischen Ereignis, das Myokard durch Knochenmarkszellen ersetzt werden kann. Dieser Vorgang der Transdifferenzierung adulter Stammzellen eröffnet enorme therapeutische Möglichkeiten für verschiedene Erkrankungen. Es wird allerdings nicht allgemein akzeptiert, dass Transdifferenzierung tatsächlich stattfindet. Da die meisten dieser Studien nicht auf Einzelzellexperimente beruhen, sondern mit nicht oder nur teilweise aufgereinigten Zellpopulationen durchgeführt wurden, besteht die Möglichkeit, dass die berichteten Resultate auf die Verunreinigung durch mesenchymale Stammzellen, die ebenfalls im Knochenmark vorkommen, zurückzuführen sind [62, 79, 80].

## **2.2.2 Regulationsmechanismen**

Um die Blutbildung an die unterschiedlichen Anforderungen der Umwelt anzupassen, unterliegt sie komplexen Steuerungsmechanismen (vgl. Abb. 5). Diese werden durch korpuskuläre und humorale Faktoren vermittelt.

### **2.2.2.1 *Microenvironment***

Die Hämatopoese wird wesentlich durch nicht-hämatopoetische Zellen dirigiert. Diese konstituieren das hämatopoetische *microenvironment* und bilden zusammen mit Stammzellen die Stammzellnische. Kenntnisse über die Zusammensetzung des *microenvironments* werden mit Hilfe von klonalen, humanen und vor allem murinen Stammzelllinien gewonnen [81]. Im Stroma befindet sich eine große Anzahl unterschiedlicher Zelltypen, die man grob nach dem Vorkommen des Oberflächenepitops CD 45 gliedern kann: Der kleinere Anteil CD 45+ Zellen beinhaltet hauptsächlich Makrophagen, vereinzelt auch Osteoklasten und dendritische Zellen. Zu den CD 45- Stromazellen gehören Myofibroblasten bzw. glatte Gesäßmuskulatur, Endothelzellen, Adipozyten und Osteoblasten. Erst in

jüngerer Zeit tauchten Hinweise auf, dass letztere eine Schlüsselrolle spielen können [81, 82]. Die akzessorischen Zellen regulieren die Blutbildung auf humoralem Wege oder über Zell-Zell-Kontakte. Im Verlauf der Differenzierung verändert sich der Grad der Adhäsion. Vor allem HSCs und frühe Vorläuferzellen sind eng an das Stroma gebunden, während ausreifende Vorläuferzellen und terminal differenzierte Zellen nicht adhären sind. Weiterhin üben Komponenten der extrazellulären Matrix als Bindungsstellen für Zellen und durch Modifikation der Zytokoinaktivität einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung hämatopoetischer Zellen aus [83-85].

### 2.2.2.2 Humorale Kontrollmechanismen

Das Schicksal von Stamm- und Vorläuferzellen wird durch eine Vielzahl von humoralen Regulatoren bestimmt, zu denen Wachstumsfaktoren, Interleukine und Chemokine gehören. Einige von ihnen existieren sowohl als lösliche Moleküle als auch als transmembrangebundene Oberflächenmoleküle. Es kann zwischen eher linienspezifischen Botenstoffen, die vor allem einzelne Zelllinien beeinflussen, und breit wirksamen Signalmolekülen unterschieden werden. Zur ersten Gruppe gehören Thrombopoetin (TPO) für die Thrombopoese, Erythropoetin (EPO) für die Erythropoese oder G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) für die Granulopoese. Es wird jedoch immer deutlicher, dass fast alle Regulatoren der Hämatopoese zusätzlich zu ihrer primären Funktion pleiotrope Effekte auslösen. G-CSF zum Beispiel aktiviert reife neutrophile Granulozyten und wirkt stimulierend auf relativ primitive HPP-CFCs (*highly proliferative potential-colony forming cells*).

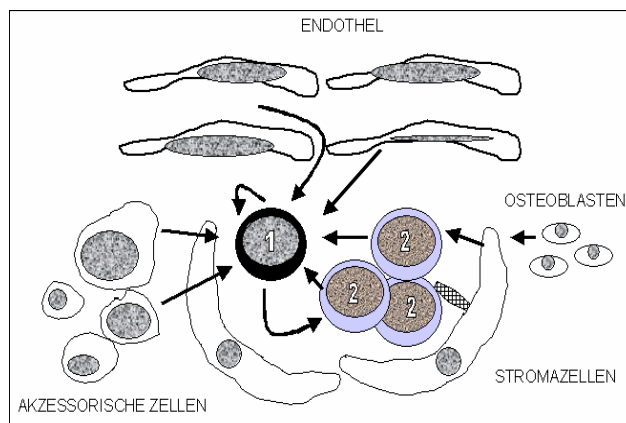
Weiterhin sind Zytokine in der Lage, ihre eigene Expression und Freisetzung zu modulieren und auch die anderer Zytokine. Dies führt zur Bildung komplexer Regulationskreisläufe. Eine wichtige Gruppe von Induktoren sind inflammatorische Botenstoffe wie etwa TNF (*tumor necrosis factor*)- $\alpha$ , Lipopolysaccharide und IL (*interleukin*)-1 [84].

Die humoralen Signale der Blutbildung stammen von den akzessorischen Zellen des *microenvironments* (Endothelzellen, Osteoblasten, Fibroblasten...), aus nicht-hämatopoetischen Organen (z. B. EPO aus der Niere) und auch von frühen und differenzierenden Vorläuferzellen. Viele Zytokine können als mRNA und/oder sezernierte Proteine in primitiven CD 34+ Zellen und liniengeprägten CFUs nachgewiesen werden. Es kann also eine parakrine Steuerung der Hämatopoese stattfinden. Für einige (TPO, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ ) werden autokrine

Rückkopplungsmechanismen postuliert, weil sie zusammen mit ihrem Rezeptor in CD 34+ Zellen gefunden werden können [86].


### 2.2.3 Primitive Hämatopoese

Im murinen System kann erstmals gegen Ende der Gastrulation hämatopoetische Aktivität im Dottersack nachgewiesen werden. In mesodermalen Zellverdichtungen (= Blutinseln) aus posterioren Anteilen des Primitivstreifens entstehen nach Stimulation durch BMP-4, TGF- $\beta$ 1 und andere Signalproteine primitive, kernhaltige Erythrozyten und Endothelzellen. Für diese beiden Zelltypen wird ein gemeinsamer Vorläufer, der Hämangioblast, postuliert. Danach tauchen multipotente Vorläuferzellen auf, im Anschluß daran Zellen, die zur Koloniebildung in der Milz (CFU-S) und zur Repopulation adulter Empfänger fähig sind.



**Abbildung 5:** Hämatopoetische Zellen sind verschiedenen Einflüssen ausgesetzt: Botenstoffe werden von Stromazellen, Endothelzellen, akzessorischen Zellen, differenzierenden hämatopoetischen Zellen, Osteoblasten und frühen, hämatopoetischen Zellen sezerniert. Andere stammen aus nicht-hämatopoetischen Organen und werden durch den Blutstrom antransportiert. Auch durch Interaktion mit Adhäsionsrezeptoren werden Signale übermittelt.

1 = frühe hämatopoetische Zelle  
2 = differenzierende hämatopoetische Zelle

 = Adhäsionsrezeptor Modifiziert aus [86].

Seit Kurzem sind weitere primäre hämatopoetische Regionen bekannt: das Gebiet des paraaortalen Splanchnopleuras (PAS) und aorto-gonadalen Mesonephros (AGM) [87].

Gestützt auf Phänotypanalysen und das zeitliche und räumliche Erscheinungsmuster wird angenommen, dass Zellen aus dem Dottersack und der PAS/AGM-Region in zwei Wellen die fetale Leber kolonisieren: In der ersten Phase wird ein temporäres, embryonales, hämatopoetisches System konstituiert. Danach siedeln sich definitive HSCs und Vorläuferzellen an, die wahrscheinlich schon das adulte System bilden. Die fetale hepatische Blutbildung dauert in geringem Umfang bis wenige Wochen nach der Geburt an. Ab dem 5. Fetalmonat nimmt im menschlichen Embryo das gesamte Knochenmark an der Blutbildung teil. Bei Anämie und malignen

Knochenmarkerkrankungen können fetale Bildungsstätten (neben der Leber auch Milz und lange Röhrenknochen) reaktiviert werden [88, 89].

### **2.3 Regulation der Hämatopoese durch BMPs**

Wegen der Expression von BMP-Genen im Knochenmark und hämatopoetischen Zellen kommen BMPs als Kandidaten für die autokrine/parakrine Regulation der Blutbildung in Frage. Im unfraktionierten, adulten Knochenmark können BMP-2 und BMP-4 nachgewiesen werden, wohingegen BMP-7 nur in peripheren B- und T-Zellen vorkommt. Es wird spekuliert, dass BMP-7 spezifisch für die lymphoide Zellreihe ist [90]. Weiterhin kann BMP-4 in CD 34+ Zellen, Monozyten und T-Zellen detektiert werden [91]. BHATIA et al zeigten, dass Komponenten des BMP-Signalwegs in CD 34+ CD38- Lin- Vorläuferzellen auftauchen: Die Typ I Rezeptoren ALK-3 und ALK-6 werden von Vorläuferzellen aus adultem Knochenmark und Nabelschnurblut exprimiert. Die BMP-spezifischen, intrazellulären Signalproteine Smad-1 und Smad-5 sowie das unspezifische Smad-4 kommen nicht nur in Vorläuferzellen, sondern auch in Stromazellen des *microenvironments* vor [92].

Die essentielle Bedeutung von BMP-4 für die Entstehung erster hämatopoetischer und endothelialer Zellen aus Mesoderm ist gut belegt, außerdem gibt es zahlreiche Studien zur Wirkung von BMPs auf embryonale Stammzellen. Der Wissensstand über postnatale Stammzellen und ihre Reaktion auf BMP-Signale ist hingegen beschränkter, vor allem in Hinblick auf Vorläuferzellen aus mobilisiertem, peripheren Blut.

#### **2.3.1 Entstehung hämatopoetischer Zellen aus Mesoderm und embryonalen Stammzellen durch BMP-4**

Die ersten terminal differenzierten Zellen in der Ontogenese des Vertebraten sind primitive Blutzellen, die in Blutinseln des Dottersacks entstehen. Sie entstammen dem extraembryonalen Mesoderm, dem eine Schicht aus primitivem (viszeralem) Endoderm (VE) anliegt. In enger Nachbarschaft zu den Blutinseln sind Zellen zu finden, die hochgradig BMP-4 produzieren [93]. BMP-4 Rezeptoren werden von Zellen der Blutinseln exprimiert [94]. In der intraembryonalen AGM-Region entstehen hämatopoetische Zellcluster an der ventralen Wand der dorsalen Aorta. Im darunterliegenden Mesoderm und genau darauf begrenzt wird BMP-4 stark exprimiert [93]. Weitere Hinweise auf den Einfluss von BMP-4 liefern Experimente

mit homozygoten Mausmutanten: Die Ausschaltung des BMP-4 Gens bewirkt meist ein frühes Absterben des Embryos, ohne dass der mesodermale Marker T (Brachyury) nachgewiesen werden kann. Wenige Embryonen erreichen spätere Entwicklungsstadien, sie überleben wahrscheinlich durch maternales BMP-4 oder andere kompensatorisch wirkende BMP-Liganden. Dennoch entsteht ein defekter Phänotyp [95]. Für Kulturen aus murinen embryonalen Stammzellen in serumfreien Medium ist BMP-4 nötig, um die Expression von Brachyury zu aktivieren, wobei ein optimales Ergebnis konzentrationsabhängig ist. Darüberhinaus induziert BMP-4 den für primitive Erythrozyten spezifischen Marker  $\beta$ H1 und damit hämatopoetische Aktivität [96]. Dem widersprechen die Ergebnisse von ADELMAN et al: Embryonale Stammzellen, die unter serumfreien Bedingungen und in Abwesenheit von BMP-4 zu sogenannten *embryoid bodies* aggregieren, exprimieren nicht nur Brachyury, sondern auch Marker für Hämangioblasten und hämatopoetische Progenitorzellen [97]. PARK et al gewinnen im serumfreien Medium nur sehr wenige embryonale Stammzellen, die das mesodermale Stadium erreicht haben. Die Kultivierung in Anwesenheit von BMP-4 hingegen führt zum starken Anstieg von Brachyury und parallel dazu zum Abfall des ektodermalen Markers. Dies legt nahe, dass BMP-4 Mesoderm auf Kosten von Ektoderm induziert. Unter mehreren getesteten Signalmolekülen (unter anderem Activin A, Shh, VEGF) sind nur BMPs zur Generierung von Hämangioblasten imstande. BMP-2 ist weniger wirksam als BMP-4, dessen Wirkung durch Noggin antagonisiert werden kann [98]. Diese gegensätzlichen Resultate können wahrscheinlich durch die Verwendung unterschiedlicher embryonaler Stammzelllinien und Differenzierungsbedingungen erklärt werden.

Einige Studien betonen, dass das hämatopoetische Potential von BMP-4 im Embryo vom Synergismus mit anderen Wachstumsfaktoren abhängt, z.B. von VEGF, Activin A, SCF, FL, IL-3, LIF (*leukemia inhibitory factor*) und anderen [94, 98-103]. Weiterhin wird vermutet, dass das Startsignal zur primitiven Hämatopoese im Dottersack von Ihh (*Indian Hedgehog*) initiiert und anschließend über BMP-4-Aktivität vermittelt wird. Intrazellulär kann das BMP-4-Signal durch CamKIV (= Calmodulin abhängige Proteinkinase IV) modifiziert werden [87, 105, 106].

### **2.3.2 Einfluss von BMPs auf postnatale Stammzellen aus Nabelschnurblut, Knochenmark und mobilisiertem, peripheren Blut**

Im Vergleich zur Datenlage über die Bedeutung von BMPs für die embryonale Entwicklung von HSCs ist die über den Einfluss auf adulte bzw. postnatale Stamm- und Vorläuferzellen beschränkter. In vivo Versuche mit Knockout-Mäusen können keine Aussage über spätere Entwicklungsstadien als die frühe Ontogenese liefern, da das Embryonalstadium nicht überschritten wird. Allerdings deuten in vitro Studien mit adulten Zellen darauf hin, dass BMPs auch jenseits der Embryonalzeit eine Funktion im hämatopoetischen System ausüben.

BHATIA et al gelang es nachzuweisen, dass BMP-2, BMP-4 und BMP-7 dosisabhängig die Proliferation, Differenzierung und Repopulationsfähigkeit CD 34+ CD38- Lin- Zellen modulieren. Derartige, aus humanem Nabelschnurblut, Knochenmark oder mobilisiertem, peripheren Blut gewonnene Zellpopulationen besitzen die zelluläre Ausstattung, auf BMP-Signale zu reagieren. Nach dreitägiger Kultur führen BMP-2 und BMP-7 zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition von Proliferation und funktionellem Potential (gemessen anhand der CFC-Kapazität). Durch BMP-4 kommt es dosisabhängig zu einer Zunahme des Zellwachstums und der CFC-Frequenz sowie zur Generierung einer quantitativ signifikanten CD 38-Subpopulation. In Transplantationsexperimenten zum Nachweis von SRCs erwies sich BMP-4 als Faktor, der den unreifen Stammzellstatus aufrechterhält [92].

Linien-spezifische Effekte, die von BHATIA nicht beobachtet werden konnten, wurden in anderen Studien nachgewiesen: In aus Nabelschnurblut gewonnenen CD 34+ Zellkulturen induziert BMP-4 die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Progenitoren ohne sich auf die Granulozyten-Makrophagen-Zelllinie auszuwirken [107].

LENOX et al beschreiben ähnliche Ergebnisse im Hinblick auf die Erythropoese: Aktivierung der murinen Signalkette BMP-4/Madh-5 (entspricht dem humanen Smad-5) durch Gewebshypoxie stimuliert Differenzierung und Expansion erythroider Vorläuferzellen der Milz, wobei in diesem Versuchsaufbau nur hämatopoetische Zellen aus der Milz und nicht Zellen des Knochenmarks auf BMP-Aktivität reagierten [108].

In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Erythropoese reagieren Vorläuferzellen unterschiedlich auf BMP-Signale, da sich im in vitro Modell das Expressionsmuster der BMP-Rezeptoren in der frühen und späten Phase der Erythropoese verändert.

BMP-2 stimuliert in funktionellen Assays unreife erythroide Kolonien (frühe BFU-Es) und ist gegenüber reiferen erythroiden Kolonien, CFU-GM und CFU-GEMM unwirksam. BMP-4 allein hat keinen signifikanten Einfluss auf erythroide Kolonien, scheint aber in Verbindung mit Activin A als erythropoetischer Stimulus zu wirken [109].

Der Synergismus hämatopoetischer Zytokine mit BMPs auf humane CD 34+ Zellpopulationen, die überwiegend aus liniengeprägten Zellen bestehen, wurde von DETMER et al genauer untersucht: Nach Kultivierung im serumhaltigen, semisoliden Medium erhöht sich die Anzahl von CFU-GM signifikant für BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 und BMP-7 jeweils in Kombination mit GM-CSF und EPO. Erythroide Kolonien werden ausschliesslich von BMP-4 beeinflusst, hier im Zusammenspiel mit GM-CSF und EPO. Im Hinblick auf CFU-GM stellt BMP-4 den potentesten Proliferationsstimulus dar. Einen weiteren Hinweis auf die Abhängigkeit der BMP-Aktivität von Kofaktoren gibt die Beobachtung, dass es unter serumfreien Bedingungen zur Bildung von kleineren, unreiferen und weniger Kolonien kommt [110].

### **2.3.3 Regulation des *microenvironments* durch BMPs**

Eine weitere Möglichkeit, die Hämatopoese durch BMPs zu steuern, ist die Modulation der Stammzellnische durch Komponenten des BMP-Signalwegs.

Zu den korpuskulären Bestandteilen der Stammzellnische gehören verschiedene osteoblastische Zelltypen. Eine kleine Untergruppe wird von spindelförmigen, N-Cadherin+, CD 45- Osteoblasten (SNO) gebildet. Deren Zunahme korreliert mit der Zunahme von Lin-, Sca-1+, c-kit+, CD 45+, N-Cadherin+ HSCs; die beiden Zelltypen sind über N-Cadherin und  $\beta$ -Catenin aneinander adhärent. Es wird vermutet, dass ALK-3-vermittelte BMP-Signale die Anzahl der Stammzellen über Eingriffe in die SNO-Aktivität der hämatopoetischen Nische regulieren [82].

Rekombinantes, humanes BMP-2 ruft in der Ratte die ektopische Bildung von Knochenmark mit einem funktionstüchtigen, hämatopoetischen *microenvironment* hervor. Neben CFU-S sind darin auch erythroide, myeloide und megakaryozytäre Zelllinien enthalten. Durch *engraftment* können auch zur Repopulation fähige Stammzellen nachgewiesen werden [111].

### 3. Zielsetzung

BMPs sind pleiotrope Zytokine, die während der frühen Ontogenese mit der Ausbildung erster hämatopoetischer Aktivität in Zusammenhang stehen. Sie sind unerlässlich für die Entstehung von ventralem Mesoderm, dem hämatopoetischen Stammgewebe, und später für die Ausbildung der ersten Blutinseln. Während die Bedeutung von BMPs –vor allem von BMP-4- für die embryonale Hämatopoese das Thema zahlreicher Studien ist, ist ihr Einfluss auf die postnatale Hämatopoese weit weniger gut erforscht. In Studien mit HSCs aus Knochenmark, Nabelschnurblut und mobilisiertem, peripheren Blut mehren sich die Hinweise darauf, dass BMPs die Proliferation, Differenzierung und Repopulationsfähigkeit postnataler hämatopoetischer Vorläuferzellen modulieren können. BHATIA et al konnten dies für BMP-2, BMP-4 und BMP-7 zeigen. In Transplantationsexperimenten wurde in dieser Studie festgestellt, dass das *engraftment* bestrahlter Empfängertiere durch BMP-4 zeitlich verlängert und somit der Verlust der Selbsterneuerungsfähigkeit hinausgezögert werden kann [92].

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern BMP-2, BMP-4 und BMP-7 das Proliferations- und Differenzierungsverhalten hämatopoetischer Vorläuferzellen aus mobilisiertem, peripheren Blut beeinflussen.

In einem ersten Schritt wird ermittelt, ob frische hämatopoetische Progenitoren und Zellen nach *in vitro* Inkubation BMP-Rezeptoren exprimieren und damit in der Lage sind, auf diese Liganden zu reagieren. Weiterhin werden vor und nach Kultur mit BMPs neben den immunphänotypischen Merkmalen (Durchflusszytometrie) die funktionellen Eigenschaften der Zellen in Kurzzeit- (CFC) und Langzeitkulturen (LTC-IC) gemessen. Dabei wird versucht, für die einzelnen BMP-Liganden die Konzentration zu ermitteln, die eine möglichst optimale Proliferation und die Konservierung eines primitiven Stammzelltypus bewirkt. Letzteres wird nicht in Transplantationsexperimenten untersucht, sondern im Rahmen von *in vitro* Versuchen (LTC-IC), die für diese Fragestellung als kostengünstigere und weniger aufwändige Alternativmethode herangezogen werden. Nach Austestung der jeweils vielversprechendsten Konzentration von BMP-2, BMP-4 und BMP-7 werden diese in Kombination untereinander eingesetzt und ihre Auswirkung auf Proliferation und Differenzierung immunphänotypisch und in funktionellen Assays erfasst.

Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Informationen über die Rolle von BMPs in der postnatalen Hämatopoese zu gewinnen. Für den klinischen Alltag ist hierbei von

## Zielsetzung

Bedeutung, ob BMPs als Wachstumsfaktoren in Frage kommen, die einen Verlust der Stammzellfunktion verhindern und daher in Expansionsprotokollen für die in vitro Vermehrung von zur Transplantation vorgesehenen Stammzellen eingesetzt werden könnten.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Methoden**

#### **4.1.1 Humane Zellen**

Es wurden Zellen von freiwilligen, gesunden Spendern verwendet, die im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation mit G-CSF stimuliert worden sind. Die Aufklärung und Einwilligung der Spender erfolgte gemäß den von der Ethikkommission vorgegebenen Richtlinien.

##### **4.1.1.1 Zellgewinnung**

Durch Leukapherese im *Cobe Spectra Zellseparator* wurde die mononukleäre Zellfraktion (MNC) vom Vollblut der Spender abgetrennt. Nach Zentrifugation des mit Citratlösung versetzten Blutes bei 2040 rpm, wurden die Zellen anhand ihres Dichtekoeffizienten maschinell aufgetrennt, so dass ein hauptsächlich aus Lymphozyten, Monozyten und einigen Granulozyten bestehender *buffy coat* zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung stand. Falls eine Weiterverarbeitung der frisch gewonnenen Zellen nicht möglich war, wurden sie eingefroren.

##### **4.1.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Nach Zentrifugation bei 1300 rpm und Zählung der Zellen erfolgte das Einfrieren in einer Konzentration von  $4 \times 10^7$  Zellen pro ml Einfriermedium aus Dimethylsulfoxid und *fetal calf serum* (FCS). In einer Einfrierbox wurden jeweils 1 ml Zellsuspension pro Cryoröhrchen bei -80 °C eingefroren. Die weitere Aufbewahrung fand in flüssigem Stickstoff statt.

Zum Auftauen wurden die Zellproben mit 500 µl Auftaumedium (Heparin, FCS, IMDM+Glutamax, BSA) versetzt und in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Das aufgetaute Material wurde als Suspension mit PBS bei 1300 rpm zentrifugiert, das erhaltene Zellpellet mit 5 ml PBS resuspendiert. Die Konzentration der Zellsuspension wurde durch Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer ermittelt.

##### **4.1.1.3 Zellzählung in der Neubauer Zählkammer**

Dazu wurde in 50 µl der Zellsuspension 50 µl Trypanblau pipettiert und sorgfältig durchgemischt. Trypanblau durchdringt die beschädigte Zellwand toter Zellen und

färbt sie an. Auf diese Weise können die vitalen Zellen gezählt und von avitalen unterschieden werden. Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors und des Zählkammervolumens kann aus der gezählten Zellzahl die Gesamtzahl der Zellen berechnet werden.

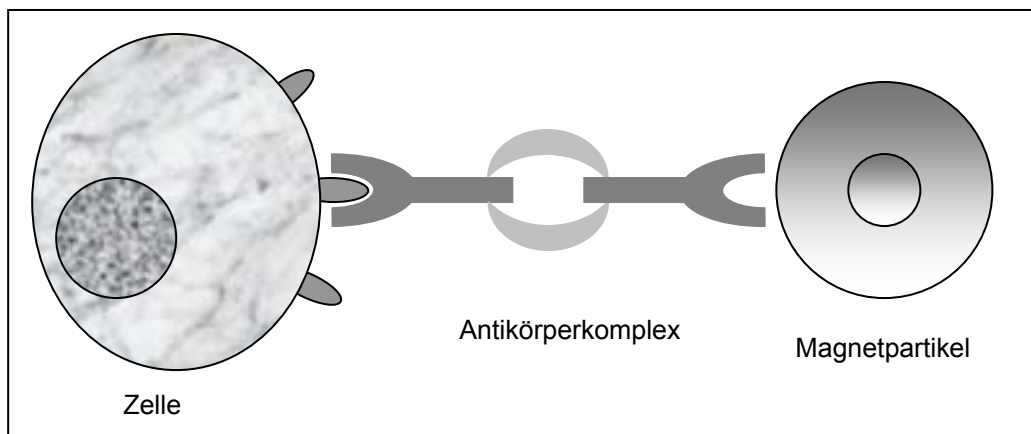
#### 4.1.1.4 Zellseparation durch *Ficoll Hypaque* Dichtezentrifugation

Anhand manueller Dichtezentrifugation wurden Verunreinigungen durch Thrombozyten und Erythrozyten beseitigt. Initial wurde eine Vorverdünnung mit PBS im Verhältnis 1 : 3 vorgenommen. In einem Falcon-Röhrchen 2070 wurde Ficoll-Lösung im Verhältnis Zellsuspension : Ficoll = 1 : 3 vorgelegt, mit der Zellsuspension überschichtet und mit ungebremstem Rotor bei 1900 rpm und bei 25°C 20 Minuten lang zentrifugiert. Entsprechend der jeweiligen Dichtegradienten entstanden vier Trennschichten: als Bodensatz die Zellfraktion mit Erythrozyten und Granulozyten, darüber Ficoll-Trennlösung, daran angrenzend eine weissliche Schicht mit MNCs und abschließend die Thrombozytenfraktion. Die MNC-Schicht wurde vorsichtig abpipettiert, zweimal gewaschen und weiterverarbeitet.

#### 4.1.1.5 Zellselektion durch *Stem Sep* immunomagnetische Säule

Um eine mit CD 34+ Zellen angereicherte Zellpopulation zu erhalten, wurde diese Zellfraktion nach dem Prinzip der Negativselektion aufgereinigt. Hierfür wurde die *Stem Sep* immunomagnetische Negativsäule eingesetzt.

Die Zellen wurden mit tetrameren Antikörperkomplexen versetzt, welche einerseits an Oberflächenepitope unerwünschter Zellen binden, andererseits an kolloidale, magnetische Partikel, die mit Dextran ummantelt sind (vgl. Abb.6).



**Abbildung 6:** Schemazeichnung des tetrameren Antikörpers und seiner Bindung an Oberflächenantigene von Zellen und magnetische Eisenpartikeln mit Dextranmantel.

Zellen, die die entsprechenden Oberflächenantigene besitzen, binden den Antikörper und werden dadurch mit magnetischen Partikeln beladen. Beim Durchlaufen einer Säule, die in einem magnetischen Feld platziert ist, bleiben die gebundenen Zellen zurück, während die gewünschten Zellen nach Passage der Säule gesammelt werden können. Abhängig von den eingesetzten Antikörpern kann bestimmt werden, welche Zellen aus der Suspension entfernt werden sollen.

Vorbedingung für den Einsatz der Negativsäule ist ein Hämatokritwert der Zellsuspension kleiner als 5 % -dies wird durch Dichtezentrifugation erreicht- und ein MNC-Anteil größer als 90 %. Die Zellzahl wurde auf  $8 \times 10^7$  Zellen pro ml PBS und 2 % FCS eingestellt. Danach erfolgte für 30 Minuten die Inkubation der Zellsuspension mit 100 µl Antikörpercocktail pro ml Zellsuspension. Letzterer besteht aus monoklonalen IgG1 Maus-Antikörpern und IgG1 Ratten-Antikörpern. Sie richten sich gegen Oberflächenantigene liniengeprägter Zellpopulationen: gegen CD 2 und CD 3 von T-Lymphozyten, gegen CD 14 und CD 16 von Monozyten, CD 19 und CD 24 von B-Zellen, CD 56 von NK-Zellen, CD 66b von Granulozyten und gegen Glykophorin A der Erythrozyten. Weiterhin wurden pro ml Zellsuspension 10 µl CD 41-Antikörper gegen Thrombozyten zugefügt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit den magnetischen Partikeln für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Säule wurde im magnetischen Feld platziert und durch Spülung mit 25 ml PBS und 2 % FCS vorbereitet. Danach wurde die mit Antikörpern versetzte Zellsuspension auf die Säule gegeben, und es konnte nach magnetischer Bindung der unerwünschten, differenzierten Zellen eine hochangereicherte CD 34+ Zellpopulation extrahiert werden. Der genaue Anteil der CD 34+ Zellfraktion wurde nun durchflusszytometrisch evaluiert.

### **4.1.2 Durchflusszytometrie**

Die immunphänotypischen Merkmale der Zellen wurden mit Hilfe eines FACS (*fluorescence activated cell sorting*) Calibur der Firma Becton & Dickinson bestimmt.

#### **4.1.2.1 Grundprinzipien**

Das Prinzip dieser Untersuchungstechnik beruht auf der Messung des Streulichts, das von Zellen emittiert wird, die einen Laserstrahl queren. Das Streulicht wird zum einen annähernd in Richtung des Laserstrahls als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), zum anderen in einem Winkel von ungefähr 90° als Seitwärtsstreulicht

(*sideangel scatter*, SSC) gemessen. Diese Parameter geben Auskunft über Größe (FSC) und Granularität (SSC) der untersuchten Zellen. Zur weiteren Differenzierung werden an Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die durch Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge (Argonlaser mit  $\lambda = 488$  nm und Helium-Neonlaser mit  $\lambda = 635$  nm) angeregt und auf diese Weise gemessen werden können. Im FACSCalibur können vier verschiedene Fluoreszenzspektren in jeweils spezifischen Fluoreszenzkanälen (FL-1 bis FL-4) detektiert werden: Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und Peridin-Chlorophyll-a Proteinkomplex (PerCP). Da sich die Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe teilweise überlappen, muss diese Fehlerquelle durch Kompensation korrigiert werden, indem man den Teil des Fluoreszenzsignals, der vom „falschen“ Farbstoff stammt, abzieht. Für die Kompensation wurden Zellen aus der zu messenden Population entnommen und gefärbt.

Die optische Darstellung der Messdaten erfolgte im Programm *Cellquest* (B&D) auf einem Apple Mcintosh in Form von *Dot-Plots* (Punktdiagrammen). Durch das Anlegen von *Gates* (Fenstern) wurden die gewünschten Zellpopulationen markiert und isoliert in ein weiteres Diagramm geschleust. Dabei wurden die *Gates* so gesetzt, dass  $> 98$  % der Isotyp-Events negativ waren. Die *Gates* wurden individuell an die jeweiligen Bedingungen angepasst.

### **4.1.2.2 Antikörperfärbung und Vitalitätsnachweis mit PI**

Zur Antikörperfärbung wurden die zu messenden Zellen in 2058 Falcons sieben Minuten lang bei 1300 rpm zentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes mit den mit Fluoreszenzfarbstoffe konjugierten Antikörpern oder Antikörperkombinationen versetzt. Es wurden entsprechend der eingesetzten Antikörper Isotypkontrollen zum Ausschluss falsch positiver Messungen mitgeführt. Die Inkubation erfolgte bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten. Es wurden bei Zellzahlen unter  $2 \times 10^5$  20  $\mu\text{l}$  Antikörperlösung in einer Verdünnung von 1 : 25 eingesetzt. Um überflüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellsuspensionen zweimal mit PBS gewaschen.

Die Vitalitätsfärbung erfolgte im Rahmen des letzten Waschschriffs, indem die Zellen in mit Propidium Jodid (PI) versetztem PBS (100  $\mu\text{l}$  PI/100 ml PBS) resuspendiert wurden. Die Membran toter Zellen verliert ihre Integrität, so dass der Farbstoff PI in das Zellinnere eindringen und sich dort anlagern kann. Die Anregung durch Licht mit

der Wellenlänge 488 nm ermöglicht es, die PI-Fluoreszenz im FL-3 Kanal zu messen und auf diese Weise die Fraktion avitaler Zellen zu eliminieren.

Die gefärbten Zellsuspensionen wurden in einer für eine optimale Durchflussrate günstigen Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro 100  $\mu$ l PBS sofort nach dem Färbvorgang gemessen.

### 4.1.2.3 Durchflusszytometrische Sortierung von Zellen

Zur Zellsortierung wurde ein FACStar (B&D) Dreikanal-Durchflusszytometer eingesetzt. Die gefärbten Zellen wurden unmittelbar nach Passage der Detektionseinheit entsprechend der gewünschten *Gates* elektromagnetisch abgelenkt und in Auffangbehälter gesammelt.

### 4.1.2.4 Ermittlung der CD 34+ und der CD 34+/ CD 38- Zellfraktion

Die Zellen wurden nach dem in 4.2.2.2 beschriebenen Verfahren in getrennten Probenröhrchen mit CD 45 FITC + ISO PE + ISO APC, ISO FITC + ISO PE + ISO APC sowie CD 45 FITC + CD 38 PE + CD 34 APC und PI gefärbt und gemessen. In aufeinanderfolgenden *gating*-Schritten wurden die vitalen (also PI-negativen), die CD 45 (= Leukozytenmarker) +, CD 34+ und CD 34+/ CD 38- Zellpopulationen identifiziert und ihre Absolutzahl den Diagrammen entnommen. Nach Subtraktion der in den Isotypproben detektierten, unspezifischen Bindungen wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellfraktion berechnet. Es wurden dabei die von der *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) herausgegebenen Leitlinien befolgt.

### 4.1.3 Rezeptornachweis mittels (RT-) PCR Analyse

Zellen, die imstande sind, auf BMP-Signale zu reagieren, müssen spezifische Rezeptoren für diese Zytokine exprimieren. Um nachzuweisen, dass die hier eingesetzte, CD 34+ Population dazu fähig ist, wurden die Zellen durchflusszytometrisch sortiert und auf Vorhandensein von mRNA (*messenger ribonucleic acid*), die BMP-Rezeptoren codiert, untersucht. Dies wurde sowohl vor als auch nach einwöchiger Inkubation der Zellen mit SCF, IL-3 und FL (=SF3) (vgl. 4.2.4) durchgeführt.

Die mRNA der aufgereinigten CD 34+ Population wurde mit Hilfe eines *Dynabeads* mRNA DIRECT™ Kits nach Anleitung des Herstellers isoliert. Das Verfahren beruht

auf der Fähigkeit des mRNA Polyadenyl-Rests an komplementäre Oligo- Thymidin-Stränge, die mit magnetische Partikel konjugiert sind, zu binden.

Nach Umwandlung der mRNA in cDNA (*complementary desoxyribonucleid acid*) in einer RT-PCR (*reverse transcriptase-chain reaction*) wurden jeweils < 1 µg cDNA in eine PCR eingesetzt, die mit Hilfe eines Hot Star Taq Master Mix Kit nach Anweisung des Herstellers in einem programmierbaren PTC-200 Peltier Thermal Cycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt wurde:

Aktivierung der DNA Polymerase:	15 Minuten	bei	94°C
<u>30 Zyklen</u> Denaturierung:	30 Sekunden	bei	94°C
Annealing:	30 Sekunden	bei	55°C
			(Aktin 55°C; ALK-3 61°C; ALK-6 65°C)
Extension:	1 Minute	bei	72°C

Nach Beendigung der PCR wurden die Probenröhrchen für 10 Minuten bei 72°C aufbewahrt, anschließend bei 4°C. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne DNA mitgeführt. Die Positivkontrollen stellten Gewebeproben aus humanem Leber-, Muskel-, Nerven- und Nierengewebe dar. Das 5' Actin PCR-Produkt besitzt eine Größe von 1kb und wurde über ein 1% Agarosegel (80ml TAE Puffer+ 1,2g Agarose) aufgetrennt. Die Größe des PCR-Produktes wurde mit Hilfe einer 1kb DNA-Leiter verifiziert.

#### **4.1.4 Zellkulturen**

Die Kultivierung der Zellen wurde ohne Zugabe von Serum durchgeführt, um repräsentative und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Um eine Expansion der ausplattierten Zellen zu erreichen, wurde eine Kombination mit SCF (*stem cell factor*) in einer Konzentration von 100 ng/ml serumfreies Medium, Interleukin 3 (IL-3) mit 20 ng/ml serumfeies Medium und Flt-3 Ligand (FL) mit 100 ng/ml serumfeies Medium eingesetzt [111]. Diese Kombination (SF3) wurde als Standardexpansion ohne BMPs neben der Expansion mit BMPs mitgeführt.

SCF ist ein lösliches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 18,4 kDa bzw. von 30-35 kDa nach Glykosilierung. Neben dem löslichen Zytokin existiert auch eine membrangebundene Form. SCF wird von Stromazellen des Knochenmarks, Fibroblasten und Endothelzellen sezerniert und kodiert auf Chromosom 12q22-

12q24. Alleine oder in Kombination mit anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren stimuliert SCF verschiedene hämatopoetische Zellen, schützt gegen letale Bestrahlung und mobilisiert Vorläuferzellen ins periphere Blut [112].

Das Glykoprotein IL-3 tritt in vielen unterschiedlich glykolisierten Formen auf und wird vornehmlich von T-Lymphozyten und Mastzellen sezerniert. Es kodiert auf Chromosom 5q21-5q32. Von allen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren vermittelt IL-3 das breiteste Aktivitätsspektrum auf pluripotente Stammzellen, Vorläuferzellen und einige mature Zellen. Unter anderem stimuliert es das Wachstum seiner Zielzellen und fördert das Überleben durch Inhibition der Apoptose [113].

FL codiert auf Chromosom 19q3.3 als transmembranöses Protein, das durch Proteolyse in eine lösliche Form überführt werden kann. Es handelt sich um ein Glykoprotein von 60 kDa, das aus zwei Homodimeren besteht und zwei Stellen zur Glykolisierung aufweist. FL-RNA kann in fast allen hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden. FL fördert als Kostimulator die Proliferation von Vorläuferzellen aus verschiedenen Zelllinien, kann aber auch alleine die Proliferation CD 34+ humaner Zellen anregen [114].

### **4.1.4.1 Einzelzellversuche mit BMPs in steigender Konzentration**

CD 34+/38- Zellen wurden mit dem FACStar einzeln in 96-*well*-Zellkulturplatten mit Rundboden sortiert. Dazu wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gefärbt und in die jeweiligen *wells* sortiert. In jedes *well* wurden 100 µl serumfreies, SF3-haltiges Medium (CellGro) vorgelegt sowie BMP in steigender Konzentration (1 ng/ml, 5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml). Zusätzlich wurden Zellen nur mit SF3 und nur mit BMP in einer mittleren Konzentration (25 ng/ml) inkubiert. Am Tag eins wurde die Anzahl der mit einer einzelnen Zelle belegten *wells* mit Hilfe eines Lichtmikroskops gezählt. Am Tag sieben wurde die Anzahl der *wells*, in denen sich nun mindestens zwei Zellen befanden, nochmals gezählt. Aus diesen Daten wurde das relative Verhältnis der *wells*, in denen sich Klone der eingesetzten Zellen befunden hatten, berechnet.

#### **4.1.4.2 Expansionskultur mit BMPs in steigender Konzentration**

Ein Aliquot der linienspezifisch depletierten Zellpopulation, die für die Expansionskultur bestimmt war, wurde im Durchflusszytometer bezüglich seiner Oberflächenmerkmale charakterisiert (vgl. 4.2.2) und im Hinblick auf das funktionelle Potential untersucht (vgl. 4.2.5).

Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml Expansionsmedium (Stem Span) in einer 35 oder 60 mm Kulturschale ausplattiert je nachdem, wieviele Zellen zur Verfügung standen. Das Medium wurde mit den entsprechenden Zytokinen und 10  $\mu$ l/ml Medium Penicillin/Streptomycin zur Verhinderung einer bakteriellen Verunreinigung versetzt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 94% Luftfeuchtigkeit. Nach sieben bzw. vierzehn Tagen wurden die Zellen geerntet, wobei adhärente Zellen mit EDTA-Trypsin vom Untergrund gelöst wurden, gewaschen, gezählt und immunphänotypisch sowie funktionell getestet.

Zur Ermittlung der BMP-Konzentration, die die größte Expansion der Zellen bewirkt, wurden drei Versuchsarme mit SF3 und ansteigenden BMP-Konzentrationen (5ng/ml Medium, 25 ng/ml Medium, 50 ng/ml Medium) angelegt. Es wurde, um Vergleichswerte zu gewinnen, eine Expansion mit SF3 mitgeführt. Weiterhin wurden für die höchste und niedrigste BMP-Konzentration sowie für die Kontrollexpansion CFC und LTC-IC Kulturen ausplattiert, um Aufschluss über den Einfluss auf die funktionelle Kapazität der kultivierten Zellen zu erhalten.

#### **4.1.4.3 Expansionskultur mit BMPs in Permutation**

In den Konzentrationsversuchen waren die funktionellen Ergebnisse, die durch BMP-2 erzielt worden sind, am vielversprechendsten. Daher wurde BMP-2 mit den anderen getesteten BMPs jeweils in der potentesten Konzentration kombiniert, um eventuell vorhandene synergistische Effekte nachzuweisen. Neben einer Standardexpansion mit SF3 wurde BMP-2 (5 ng/ml) mit SF3, BMP-2 (5 ng/ml) mit SF3 und BMP-4 (25 ng/ml), BMP-2 mit SF3 und BMP-7 (5 ng/ml) sowie BMP-2 (5 ng/ml) mit SF3 und den beiden anderen BMPs unter den in 4.2.4.2 beschriebenen Kulturbedingungen getestet. Anders als in den Konzentrationsversuchen wurden jedoch nur LTC-IC angelegt, um die funktionellen Eigenschaften der Zellen nach Kultur zu testen.

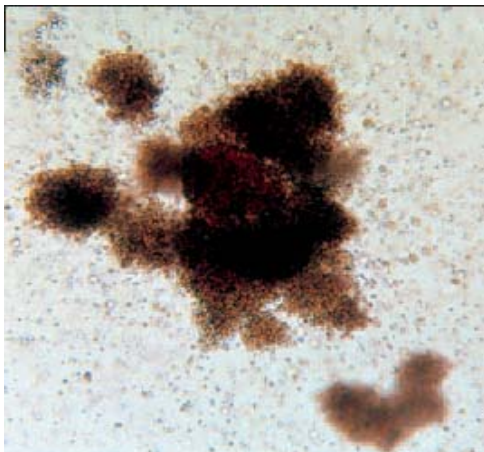
#### 4.1.5 Funktionelle Assays

Das Ziel von funktionellen Kulturanalysen ist es, Informationen über das Entwicklungsstadium zu erhalten anhand des Potentials zur Koloniebildung nach Ablauf einer kürzeren (CFC) oder längeren (LTC-IC) Zeitspanne. Das Verhältnis von roten zu weissen Kolonien kann als Ergebnis einer Linienspezifität der eingesetzten Zytokine gewertet werden. Weiterhin ist die Detektion von gemischten Kolonien (CFU-GEMM) ein Hinweis auf das Vorhandensein von frühen, multipotenten Vorläuferzellen.

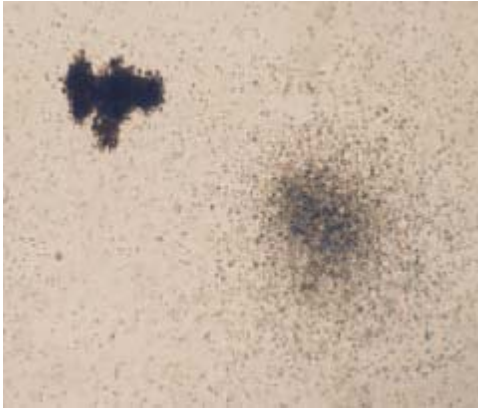
##### 4.1.5.1 CFC-Kurzzeitkultur

Im *colony forming cells* Assay werden Vorläuferzellen nachgewiesen, die nach vierzehntägiger Kultur in semisolidem Medium (MethoCult GF H4434) Kolonien bilden können.

Es wurden vor Expansion 100 und 400 Lin- Zellen pro Petrischale ausplattiert, nach Expansion 500 und 2000 Zellen pro Schale. Dazu wurden die vorbereiteten Zellen auf 1200 und 4800 bzw. 6000 und 24000 Zellen pro ml ISC/ 10% FCS eingestellt. 300 µl dieser Zellsuspension wurden in 3,6 ml MethoCult überführt und gründlich vermischt. Nach fünf Minuten, in denen sich die enthaltenen Luftblasen auflösen, wurden jeweils 1 ml Zellsuspension in eine Greiner Petrischale mit einem Durchmesser von 35 mm ausplattiert. Die zweiwöchige Kultur erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 94% Luftfeuchtigkeit. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden neben der Anzahl aller Kolonien die morphologisch unterschiedenen Untergruppen (vgl. Abb.7 und 8) detektiert: CFU-E, BFU-E, CFU-GEMM und CFU-GM [73].



**Abbildung 7:**  
Große CFU-GEMM und BFU-E im Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 50x.



**Abbildung 8:**

Links BFU-E, rechts CFU-GM im Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 25x.

#### 4.1.5.2 LTC-IC-Langzeitkultur

Im *long term culture-initiating cell* Assay wachsen während der ersten drei bis fünf Wochen Inkubation die liniengeprägten Vorläuferzellen, die in der ausplattierten Zellpopulation enthalten waren, zu Kolonien aus reifen Blutzellen heran und gehen schließlich zugrunde. Die Zellen, die noch nach mehreren Wochen proliferieren und Kolonien bilden können, sind Nachkommen der initial ausplattierten, primitiven LTC-IC und somit Marker für deren Anwesenheit am Tag des Kulturstarts [74].

Die Kultivierung erfolgte in 96-*well*-Rundboden-Zellkulturplatten und in Anwesenheit von adhärennten, murinen Fibroblasten (M2-10B4), die als Stromazellen bis zu einem gewissen Grad ein hämatopoetisches *microenvironment* imitieren sollen. Diese Fibroblasten wurden mit einer <sup>137</sup>Cäsiumquelle bestrahlt (8000 cGy), um sie am Proliferieren zu hindern, wobei die Fähigkeit zur Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (G-CSF, IL-3 und SCF) erhalten blieb. Dem Medium H5100 wurden 10 µl pro ml Medium P/S beigefügt, um bakteriellen Verunreinigungen vorzubeugen, ausserdem wurden 10 µl pro ml Medium 10<sup>-4</sup> M Hydrocortisonlösung zugefügt, welche die Proliferation von Lymphozyten unterdrücken sollte. Die Zellen wurden in Verdünnungsreihen von 10, 50, 250, 1250 (vor Expansion) und 50, 250, 1250, 6250, 12500 (für die LTC-IC Kulturen nach Expansion) Zellen pro *well* ausplattiert, wobei für jede Verdünnungsstufe fünf *wells* angelegt wurden. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 94% Luftfeuchtigkeit über einen Zeitraum von sechs Wochen inkubiert. In der zweiten bis sechsten Woche erfolgte ein Halbmediumswechsel, bei dem 50 µl H5100 mit P/S und Hydrocortisonlösung zugefüttert wurden. In der siebten Woche wurden die Zellen geerntet: Der Inhalt der *wells* wurde in jeweils entsprechend beschriftete, mit 2 ml ISC und 10% FCS befüllte 2063 Röhrrchen überführt. Danach wurden die adhärennten Zellen durch Trypsin/EDTA gelöst und ebenfalls in die Röhrrchen

pipettiert. Nachdem die Zellen gewaschen worden sind, wurden sie mit 1 ml pro *well* Methocult (H4434) entsprechend dem Vorgehen bei CFC (vgl. 4.2.5.1) ausplattiert und nach zweiwöchiger Inkubation im Brutschrank ausgewertet. Dabei gilt ein *well* als positiv, sobald mindestens eine Kolonie zu detektieren ist. Die Berechnung der LTC-IC Frequenz erfolgte mittels L-Calc® (vgl. 4.2.6.3).

#### 4.1.6 Statistik

##### 4.1.6.1 Darstellung der Ergebnisse mit Standardfehler

Die erhobenen Daten wurden überwiegend als arithmetische Mittelwerte in Säulendiagrammen dargestellt. Da nur der begrenzte Datensatz von Stichproben zur Verfügung stand, wurde zur Güteabschätzung der Mittelwerte der Standardfehler herangezogen.

Der Standardfehler gibt die Streuung der aus Stichproben gewonnenen Mittelwerte um den wahren Grundgesamtheitsmittelwert an. Er wird mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Standardfehler } \sigma = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

mit  $n = \text{Stichprobenumfang}$

$$\text{Standardabweichung } s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$$

$x_i = \text{Einzelwert}$

$\bar{x} = \text{Mittelwert}$

##### 4.1.6.2 t-Test nach Student

In der statistischen Auswertung der erhobenen Daten werden zwei Hypothesen,  $H_0$  und  $H_1$  aufgestellt.  $H_0$ , die Nullhypothese, besagt, dass sich zwei Ergebnisse nicht signifikant voneinander unterscheiden, während  $H_1$ , die Alternativhypothese, von einem signifikanten Unterschied ausgeht. Weiterhin wird eine

Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  angegeben, deren Vergleich mit der berechneten, tatsächlichen Fehlerwahrscheinlichkeit zur Annahme von  $H_1$  oder  $H_0$  führt. Üblicherweise wird  $\alpha$  definiert als

$\alpha \geq 0,05$ : nicht signifikant

$\alpha \leq 0,05$ : signifikant (\*)

$\alpha \leq 0,01$ : sehr signifikant (\*\*)

$\alpha \leq 0,001$ : hochsignifikant (\*\*\*)

Wird ein Ergebnis unter diesen Vorgaben als signifikant bezeichnet, so bedeutet dies, dass in  $\alpha \cdot 100\%$  der Fälle  $H_0$  zu Unrecht verworfen worden ist. Die Wahrscheinlichkeit, sich bei der Annahme von  $H_1$  zu irren, beträgt also 5%.

Da in der vorliegenden Arbeit normalverteilte, unverbundene Stichproben miteinander verglichen werden sollen, wurde zur statistischen Interpretation der Testergebnisse der Studentsche t-Test herangezogen. Eine weitere Voraussetzung hierfür ist die Varianzgleichheit der Stichproben, die fordert, dass sich die Varianzen der beiden Stichproben nicht signifikant voneinander unterscheiden dürfen. Die Homogenität der Varianzen kann im F-Test von Fisher geklärt werden. Man berechnet

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{für } s_1^2 \geq s_2^2 \quad \text{oder} \quad F = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad \text{für } s_1^2 < s_2^2,$$

$$\text{wobei die Varianz } s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \text{ ist.}$$

Der ermittelte F-Wert wird mit  $F_{\text{krit}}$ , der einer von  $\alpha$  abhängigen Tabelle entsprechend der Freiheitsgrade ( $v = n - 1$ ) entnommen wird, verglichen. Wenn  $F < F_{\text{krit}}$ , kann von einer Varianzgleichheit ausgegangen werden.

Im t-Test wird die Prüfgröße

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{1,2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

berechnet mit

$$s_{1,2} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Man vergleicht nun den positiven Wert von  $t$  mit den von  $\alpha$  abhängigen, aus einer Tabelle entnommenen Wert  $t_{\text{krit}}$ . Für  $|t| \geq t_{\text{krit}}$  wird die Alternativhypothese, also ein signifikantes Ergebnis, angenommen, ansonsten die Nullhypothese, also kein signifikantes Ergebnis.

#### 4.1.6.3 Berechnung der LTC-IC Frequenz

Zur Berechnung der LTC-IC-Frequenz wurde das L-Calc<sup>®</sup>-Programm (StemCell) benutzt. Die Zellen wurden hierfür unter *limiting dilution*-Bedingungen ausplattiert. Eingabeparameter sind die ausplattierte Zellzahl, die Gesamtzahl der *wells* und die Anzahl der als positiv befundenen *wells*. L-Calc<sup>®</sup> arbeitet mit der Poisson-Verteilung. Die Poisson-Verteilung ist eine diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung, die natürlichen Zahlen  $n$  die Wahrscheinlichkeiten

$$P_\lambda(n) = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}$$

zuordnet. Hierbei ist  $\lambda$  die Wahrscheinlichkeit für das mittlere Auftreten eines Ereignisses in einem Intervall.

## 4.2 Material

### 4.2.1 Geräte

Apharesegerät	Cobe Spectra Zellseparator, Cobe, Lakewood, CO, USA
Brutschrank	Heraeus, BBD 6220, Hanau, Deutschland
<sup>137</sup> Caesiumquelle	Modell IBL 437 C, CIS Diagnostik, Dreieich, Deutschland
Elektrophoresekammer	MiniGel, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
FACS/FACS-Sorter	FACSCalibur, FACSSStarPlus, Becton&Dickinson (B&D), St. José, CA, USA
Linearbeschleuniger	Primus, Siemens, München, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Axiovert25, Jena Leica, Wild MPS 52, Wetzlar
PCR-Gerät	PTC-200 Peltier Thermal Cyclers, Biozym, Oldendorf
Sterilbank	Clean Air, Modell CA/ REVS 4, Clean Air Deutschland GmbH, Hilden
Vortexer	Genie 2, Scientific Ind., Bohemia, N.Y., USA
Zentrifuge	Megafuge 1.0, Heraeus Sepa Tech, Hanau, Deutschland
Zählkammer	Neubauer improved, Tiefe 0,100 mm, Marienfeld, Deutschland

#### 4.2.2 Verbrauchsmaterialien

Cellscraper, Costar 3008	Corning Incorporated, Corning, N.Y., USA
Cryotubes	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Immunomagnetische Säule	0,3/0,5/0,6 inch, Stem Sep., Stem Cell Tech., Vancouver, BC, Kanada
96-Well-Platte	LTC-IC Platte FALCON 3872 Primaria, Heidelberg Rundbodenplatte COSTAR 3799, Corning Inc.
Pipetten	Costar Stripette 1/5/10/25/50 ml, Corning Inc.
Röhrchen	Falcon 2058, 2063, 2097, 2070 B&D
Schalen	Corning 35 mm Schale TLD, Corning Inc. Corning 60 mm Schale TLD, Corning Inc. Greiner 35 mm Petri Schale, Greiner bioone Inc., Longwood, USA

#### 4.2.3 Zytokine

BMP-2	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
BMP-4	R&D Systems
BMP-7	R&D Systems
SCF	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
IL-3	Peprtech
FL	Peprtech

#### 4.2.4 Antikörper

FITC: Fluorescein Isothiocyanat, PE: Phycoerythrin, APC: Allophycocyanin

<u>Isotypen</u>	
Maus IgG <sub>1</sub> FITC (X40)	B&D
Maus IgG <sub>1</sub> PE (X40)	B&D
Maus IgG <sub>1</sub> APC (X40)	B&D
<u>Anti-Human Antikörper</u>	
CD 33 APC (P67.6)	B&D
CD 34 APC (8G12)	B&D
CD 38 APC (HB-7)	B&D
CD 45 FITC (HI30)	B&D
CD 45 PE (HI30)	B&D

#### 4.2.5 Zellkulturmedien

Cellgro	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
Iscove`s	Iscove`s modifiziertes Dulbecco`s, GIBCO BRL Invitrogen, Karlsruhe
MethoCult GF H4434	Cell Systems, Stem Cell Tech., Vancouver, BC, Kanada
MyeloCult H5100	Cell Systems
Stem Span	Cell Systems

**4.2.6 Reagenzien und Chemikalien**

<u>Auftaumedium</u>	
0,2 ml Heparin	Roche, Basel, CH
15 ml FCS	GIBCO BRL
34,8 ml IMDM+Glutamax	GIBCO BRL, Invitrogen, Karlsruhe
BSA	Calbiochem, Schwalbach/TS
DNA Leiter, 1 kb	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Dynabeads mRNA direct Kit	Invitrogen, Karlsruhe
<u>Einfriermedium</u>	
100 µl DMSO	Dimethylsulfoxid, Merck Eurolab, Darmstadt
900 µl FCS	GIBCO BRL
FCS	Fetal Calf Serum, GIBCO BRL
Hot Star Taq Master Mix Kit	Quiagen, Hilden
Hypaque	Pharmacia, Uppsala, Sweden
Hydrocortison-21-hydrogensuccinat	Na-Salz, Pharmacia, Erlangen, Deutschland
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, GIBCO BRL
Peq Gold Universal Agarose	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen
PI	Propidiumiodid, Sigma, Taufkirchen
P/S	Penicillin/Streptomycin, GIBCO BRL

Retronectin CH 29b Reverses Transkriptionssystem	Promega Corp., Madison, WI
<u>TAE Puffer</u> 242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA 1 l Aqua dest.	Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	trypan blue solution (0,4%), Sigma
Trypsin EDTA	GIBCO BRL

#### 4.2.7 PCR-Oligonukleotide

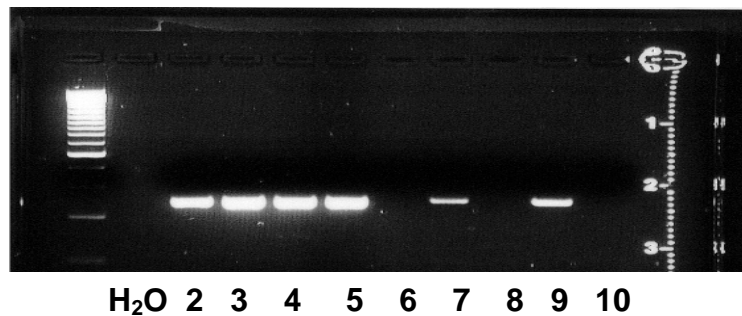
5`-Actin	5`-GCTCACCATGGATGATGATATCGC-3` 5`-GGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3`
ALK-3 (=BMP-RIA)	5`-ACTCCGACCAGAAAAGTCA-3` 5`-CGGCGTAGCTGGGCTTTTA-3`
BMP-RII (=BRII)	5`-ATGACTTCCTCGCTGCAGC-3` 5`-AGTGGTGTGTCAGGAG-3`

## 5. Ergebnisse

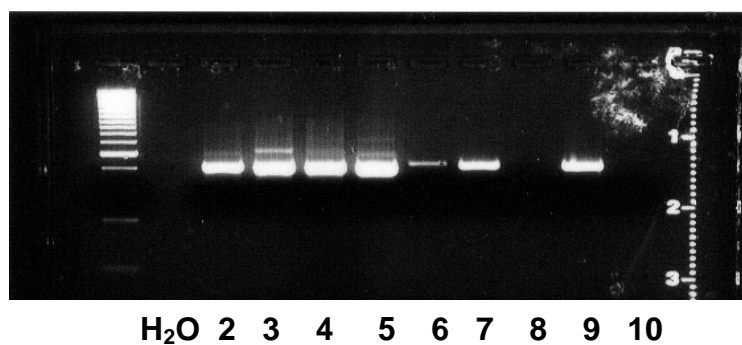
### 5.1 Nachweis von Typ I und Typ II BMP Rezeptoren

In CD 34+/38- Lin- hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut oder Knochenmark werden die Typ I Rezeptoren ALK-3 und ALK-6 sowie Komponenten des intrazellulären Signalwegs exprimiert [92]. Um zu untersuchen, ob CD 34+ Zellen aus peripherem Blut potentiell mit BMPs stimuliert werden können, wurde die Expression der Typ I Rezeptoren ALK-3 (BMPRIA) und ALK-6 (BMPRIIB) sowie des Typ II Rezeptors BRII auf gesorteten, aus peripheren Blut mobilisierten CD 34+ Zellen mittels (RT-) PCR Analyse (n = 2) untersucht. Neben frisch isolierten Zellen (Bahn 6 und 8) wurden auch die Zellpopulationen nach siebentägiger Inkubation mit SF3 untersucht (Bahn 7 und 9).

#### ALK-3



#### BRII

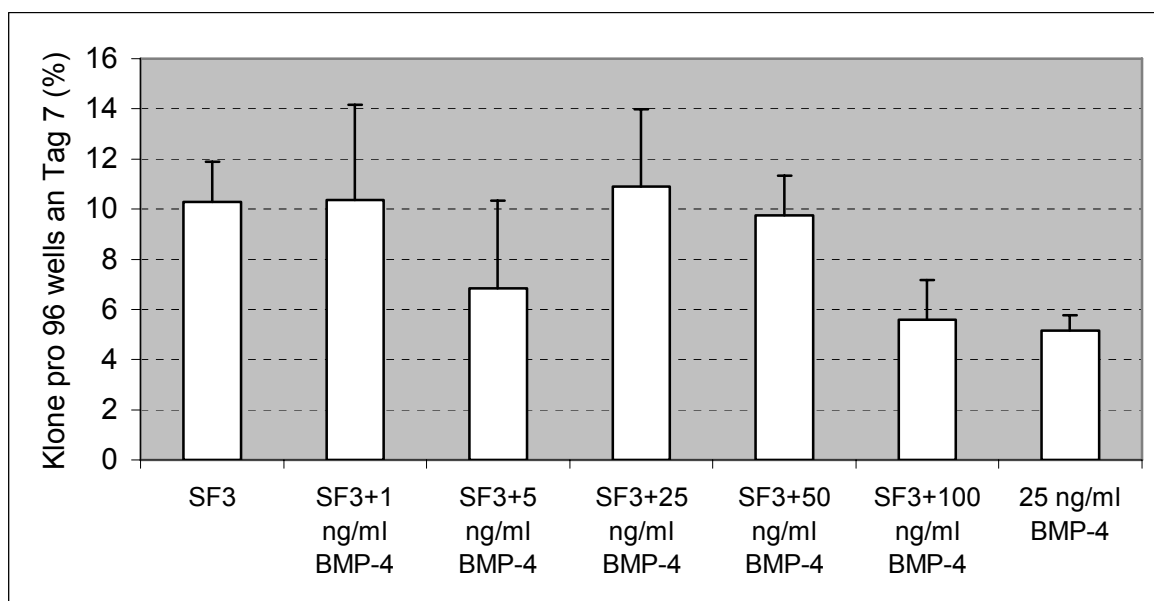


**Abbildung 9:** Expression von BMP Rezeptoren in CD 34+ Zellen aus peripherem Blut. ALK-3 ist ein Typ I BMP Rezeptor, BRII ein Typ II Rezeptor. Zwei unabhängige RT-PCR Versuche wurden durchgeführt vor (Bahn 6 und 8) und nach siebentägiger Kultur (Bahn 7 und 9) in serumfreiem Medium mit SF3. Als Positivkontrollen dienten humane Leber-, Muskel-, Nerven- und Nierenzellen (Bahn 2 bis 5).

Es zeigte sich, dass ALK-3 von frischen Zellen nicht exprimiert wurde, nach Kultur jedoch detektierbar war. BR11 war an beiden Messpunkten nachweisbar; wobei seine Expression im Verlauf von sieben Tagen Inkubation zunahm (vgl. Abb. 9). Das Ergebnis in Bezug auf ALK-6 war vor und nach Kultur negativ (nicht dargestellt).

## 5.2 Einzelzellversuche mit BMP-4 und BMP-2 in steigender Konzentration

Um die BMP Konzentration zu ermitteln, durch die eine möglichst hohe Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen bewirkt wird, wurden einzelne Zellen mit SF3 und BMPs in ansteigender Konzentration für eine Woche inkubiert. Darüber hinaus wurde SF3 ohne weitere Zusätze mitgeführt, desweiteren eine Expansion ohne SF3 nur mit BMP in einer mittleren Konzentration von 25 ng/ml. Die fünf BMP- und SF3-haltigen Expansionen wurden mit BMP in einer Konzentration von 1 ng/ml, 5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml versetzt.

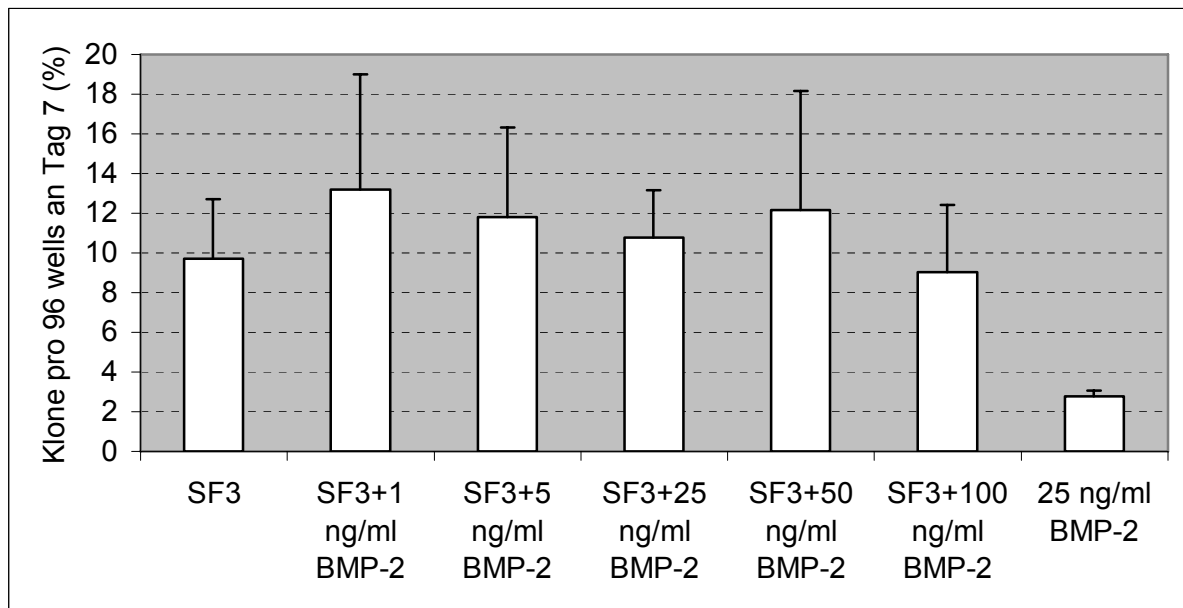


**Abbildung 10:** Einzelne CD34+/38- Zellen gesunder Spender wurden mit SF3 und BMP für sieben Tage inkubiert. BMP-4 wurde in ansteigender Konzentration eingesetzt. An Tag 7 wurde die Anzahl der Klone ausgezählt.  $n = 3$ , Fehlerindikator = Standardfehler  $\sigma$ .

Es zeigte sich in diesen Experimenten keine ideale Stimulation der Klonzahl durch BMP-4 (vgl. Abb. 10). Im Vergleich zur Kontrollexpansion mit SF3 bewirkte BMP-4 in keiner Konzentration eine deutliche Zunahme der Proliferation. Eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum übten SF3 mit 100 ng/ml BMP-4 und mit BMP-4 allein (25 ng/ml) aus, SF3 bewirkte mit 5 ng/ml BMP-4 eher eine Inhibition. Die Kultivierung

nur mit BMP-4 führte wegen des fehlenden Stimulus von SF3 erwartungsgemäß zu einem deutlichen Zellverlust. Die im Vergleich mit den übrigen BMP-haltigen Kulturen stabilste Aufrechterhaltung der Klonzahl zeigt SF3 mit BMP-4 in einer mittleren Konzentration von 25 ng/ml.

In einem analogen Versuchsaufbau wurde die optimale Konzentration für BMP-2 ausgetestet.



**Abbildung 11:** Einzelne CD34+/38- Zellen gesunder Spender wurden mit SF3 und BMP-2 für sieben Tage inkubiert. BMP-2 wurde in ansteigender Konzentration eingesetzt. An Tag 7 wurde die Anzahl der Klone ausgezählt. n = 3, Fehlerindikator = Standardfehler  $\sigma$ .

BMP-2 erwies sich in diesen Versuchen als überwiegend wachstumsstimulierender Faktor (vgl. Abb. 11). Ausser BMP-2 alleine (25 ng/ml) und SF3 mit 100 ng/ml BMP-2 wurde in den übrigen Kulturen die Anzahl der Klone im Vergleich mit SF3 aufrechterhalten (SF3 mit 25 ng/ml BMP-2) oder es zeigte sich ein Trend zur Proliferation, der am ausgeprägtesten bei SF3 mit 1 ng/ml BMP-2 (Faktor 1,4) zu erkennen war, weiterhin auch bei SF3 mit 5 ng/ml (Faktor 1,2) und mit 50 ng/ml BMP-2 (Faktor 1,3).

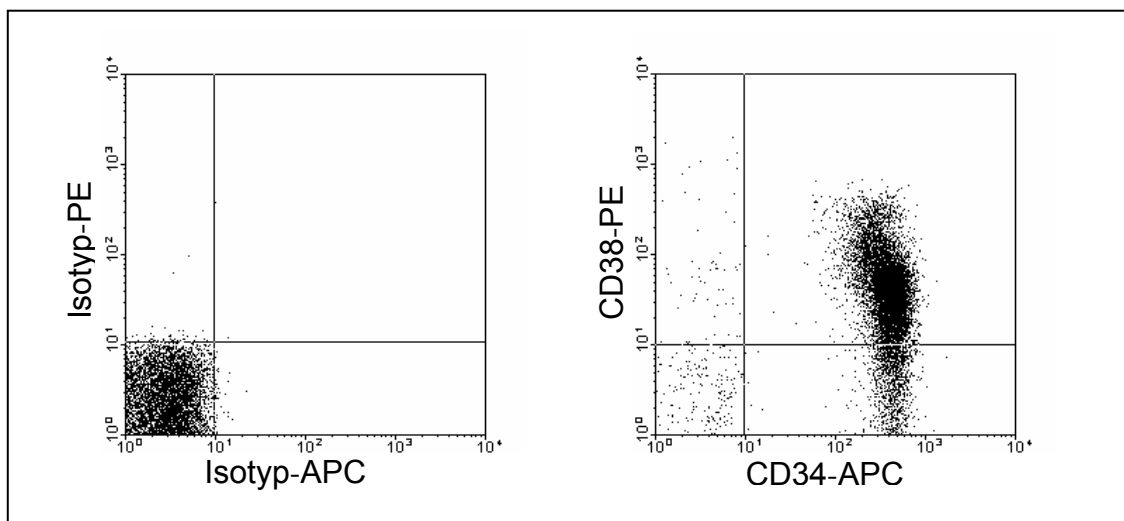
### 5.3 Expansionsexperimente in Flüssigkulturen

Da sich anhand der Ergebnisse aus den Einzelzellversuchen allenfalls eine Aussage über ein tendenzielles Verhalten der Zellpopulationen unter dem Einfluss von BMPs treffen lässt, wurde ein anderer Versuchsansatz mit einer initial ausplattierten

Zellpopulation von 100 000 Lin- Zellen in flüssigem, serumfreien Medium gewählt, um die bereits erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen. Darüberhinaus konnten, da mit Zellpopulationen und nicht mit Einzelzellen gearbeitet wurde, zusätzlich auch CFC und LTC-IC Assays angelegt werden, und damit Informationen über die funktionellen Fähigkeiten der Zellen nach Kultur mit BMPs gewonnen werden.

### 5.3.1 Charakterisierung der Ausgangszellpopulation

Die von freiwilligen, G-CSF mobilisierten Spendern stammenden Zellen wurden mittels Negativselektion angereichert, so dass mit einem hohen CD 34+ Anteil gearbeitet werden konnte. Diese Fraktion machte vor Kultur durchschnittlich 87+/-3% der Lin- Zellen aus (n = 13) und verminderte sich nach einer Woche Inkubation mit SF3 auf 29+/-2%. Der prozentuale Anteil der CD 34+/38- Zellen (vgl. Abb. 12) am Messpunkt Tag 0 betrug im Durchschnitt 2+/-0,5% (n = 13). Er erhöhte sich auf im Mittel 7+/-1% nach sieben Tagen Kultur mit SF3.



**Abbildung 12:** Repräsentatives, durchflusszytometrisches Punktdiagramm mit den Oberflächenmarker CD 34 und CD 38 auf linienspezifisch depletierten Zellen aus mobilisiertem, peripheren Blut vor Kultur im Vergleich mit der entsprechenden Isotyp-Kontrolle.

In der Ausgangspopulation war durchschnittlich eine von 3+/-0,4 Lin- Zellen in der Lage, nach Kurzzeitkultur in semisolidem Medium Kolonien zu bilden (n = 7). Nach Kultivierung mit SF3 besaß diese Fähigkeit eine von 4+/-0,4 Zellen. Das Potential zur Koloniebildung nach Langzeitkultur konnte initial für im Durchschnitt eine von 53+/-15

Lin- Zellen nachgewiesen werden (n = 10). Diese Frequenz betrug nach Kultur 1 in 7340+/-2940.

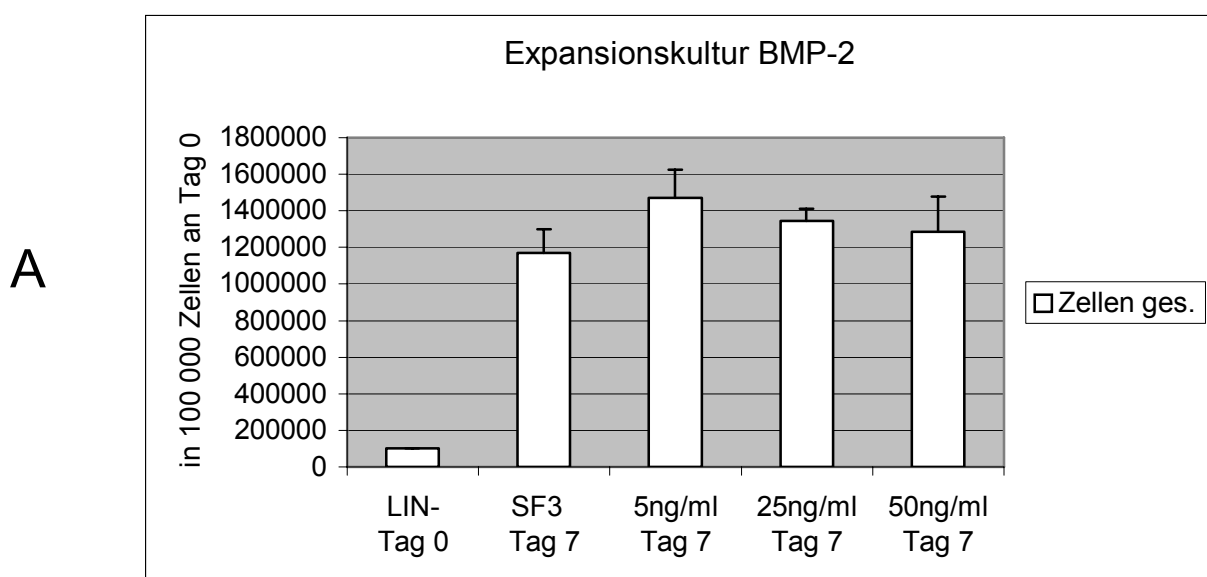
### 5.3.2 Expansionskultur mit BMP-2 und BMP-7 in steigender Konzentration

#### 5.3.2.1 Proliferation der Gesamtzellzahl, der CD 34+ und CD 34+/38- Subpopulationen

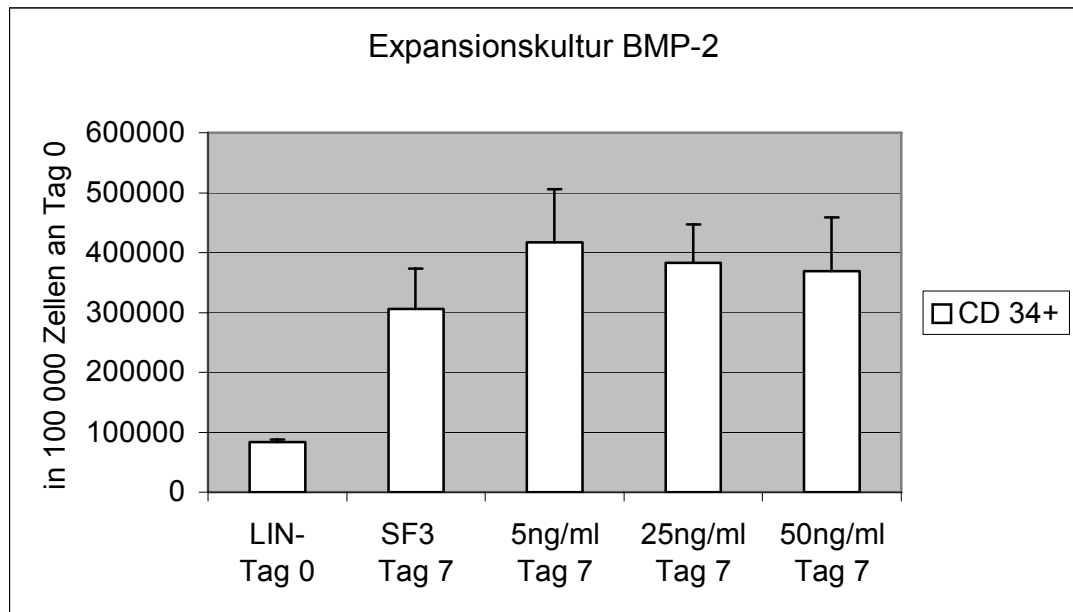
Linienpezifisch depletierte Zellen wurden nach immunophäntypischer Evaluierung im Bezug auf die Oberflächenantigene CD 34 und CD 38 mit  $1 \times 10^5$  Zellen pro 1 ml serumfreies Medium und SF3 ausplattiert. Neben einem Expansionsarm unter Standardbedingungen (nur mit SF3) wurden drei weitere Kulturen angelegt mit jeweils SF3 und BMP-2 mit einer Konzentration von 5 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml. Nach Inkubation der Zellen für sieben Tagen wurde wiederum die Gesamtzellzahl bestimmt und der Anteil der CD 34+ sowie CD34+/38- Untergruppen.

Wie schon in den Einzelzellversuchen erwies sich BMP-2 als eher wachstumsfördernder Faktor. Die Gesamtzellzahl, die CD 34+ und die CD 34+/38- Population verhalten sich im Bezug auf die Proliferation ähnlich (vgl. Abb. 13).

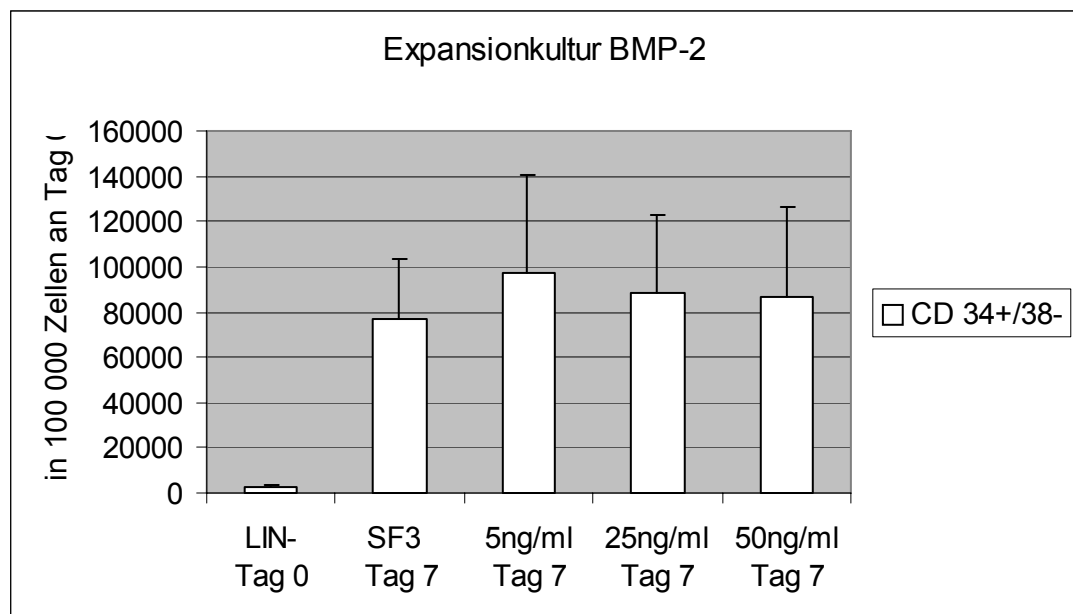
**Abbildung 13:** Evaluation der Zellzahlen vor (Tag 0) und nach Kultur (Tag 7) im serumfreien Medium mit SF3 und mit oder ohne BMP-2 in ansteigenden Konzentrationen. Es ist die Gesamtzellzahl (A), die CD 34+ (B) und die CD34+/38- (C) Zellfraktion dargestellt bezogen auf 100 000 ausplattierte, linienspezifisch depletierte Zellen (Lin-) an Tag 0. Die Konzentrationsangaben 5 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml beziehen sich auf BMP-2. Fehlerindikator = Standardfehler  $\sigma$ , n = 5.



B



C

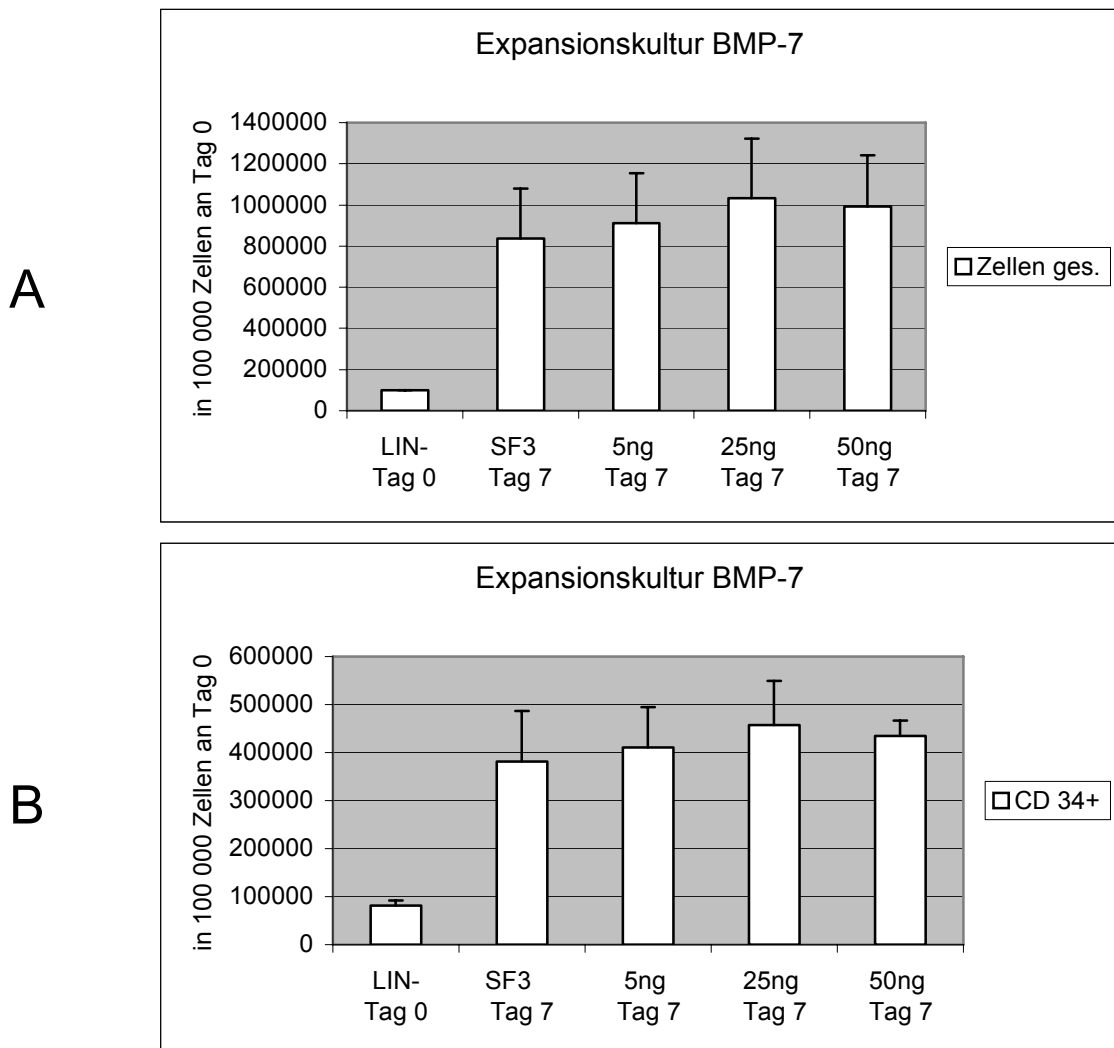


In Anwesenheit von BMP-2 in einer niedrigen Konzentration von 5 ng/ml wird die Proliferation aller drei Zellpopulationen am effizientesten stimuliert. Mit steigenden BMP Konzentrationen schwächt sich dieser Effekt kontinuierlich ab. Die CD 34+ Zellfraktion war mit einem Wachstumsfaktor von 1,4 im Vergleich mit der Kontrollkultur SF3 am empfänglichsten für den durch BMP-2 mit 5 ng/ml vermittelten Stimulus, der sich auf CD34+/38- Zellen (Faktor 1,3) und die Gesamtzellzahl (Faktor 1,3) milder auswirkte.

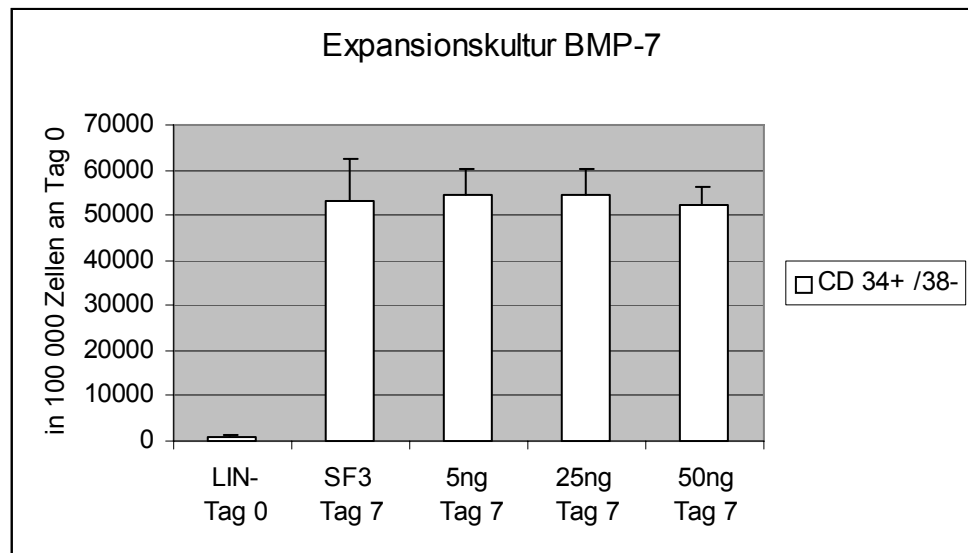
Die Konzentrationsaustestung von BMP-7 erfolgte nach demselben Protokoll wie die von BMP-2. Einzelzellversuche wurden nicht mehr durchgeführt.

Im Gegensatz zu BMP-2 wirkte sich die Anwesenheit von BMP-7 auf die drei untersuchten Zellpopulationen unterschiedlich aus (vgl. Abb. 14). Im Vergleich mit SF3 vermehrte sich die Gesamtzellzahl und die CD 34+ Population unter Stimulation mit BMP-7 in geringem Maße. Die maximale Zunahme findet sich jeweils mit dem Faktor 1,2 bei 25 ng/ml BMP-7. Die Proliferation der CD 34+/38- Untergruppe ließ sich mit BMP-7 hingegen nicht modulieren.

**Abbildung 14:** Evaluation der Zellzahlen vor (Tag 0) und nach Kultur (Tag 7) in serumfreiem Medium mit SF3 und mit oder ohne BMP-7 in ansteigenden Konzentrationen. Es ist die Gesamtzellzahl (A) mit  $n = 4$ , die CD 34+ (B) und CD 34+/38- (C) Zellfraktion jeweils mit  $n = 3$  dargestellt. Die Werte beziehen sich auf 100 000 ausplattierte, linienspezifisch depletierte Zellen (Lin-) Zellen an Tag 0. Die Konzentrationsangaben 5 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml beziehen sich auf BMP-7. Fehlerindikator = Standardfehler  $\sigma$ .



C



### 5.3.2.2 Funktionelle Eigenschaften der Zellpopulationen

Sowohl vor als auch nach Kultivierung mit oder ohne BMPs wurden die Zellen auf ihr funktionelles Potential hin untersucht. Dazu wurden Kurzzeitkulturen zum Nachweis von CFC und Langzeitkulturen zur Detektion primitiver LTC-IC angelegt. Diese Experimente wurden für die Kontrollexpansion mit SF3 und für die Kulturen mit SF3 und BMP in den Konzentrationen 5 ng/ml und 50 ng/ml durchgeführt.

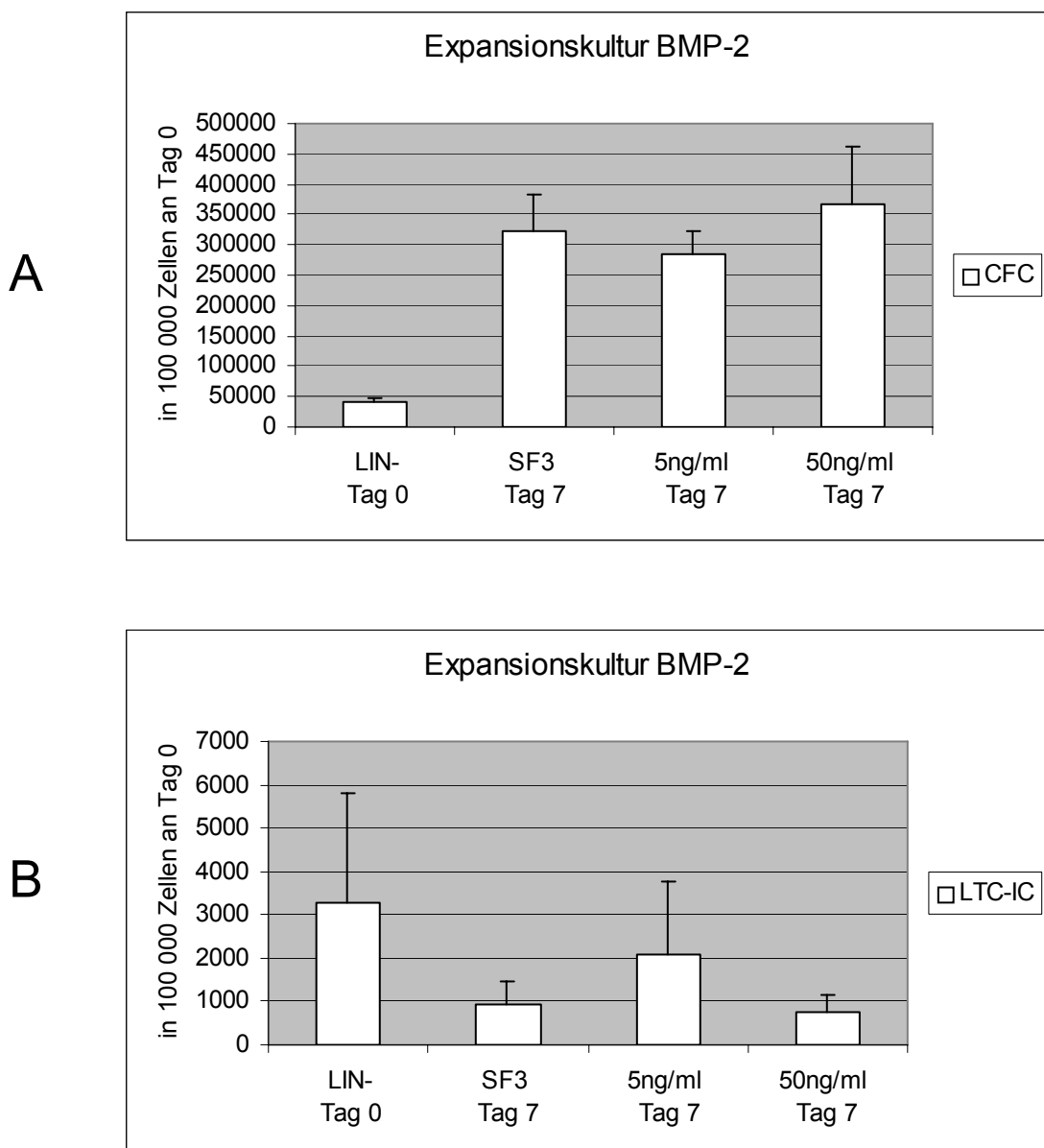
Während die liniengeprägten CFC sich generell von Tag 0 auf Tag 7 bei allen Expansionen auf mehr als das 5fache (Expansionskultur BMP-7) und mehr als das 7fache (Expansionskultur BMP-2) vermehrten, kam es regelmäßig zu teilweise dramatischen Verlusten unreifer LTC-IC (vgl. Abb. 15 B und 16 B) nach einwöchiger Kultur auf bis zu 22,7% vom Ausgangswert an Tag 0 in der Expansionskultur mit BMP-2 und bis zu 5,2% in der Expansionskultur mit BMP-7.

BMP-2 wirkte sich auf die Generierung von CFC nicht wesentlich aus (vgl. Abb. 15 A). Die Anzahl der LTC-IC (vgl. Abb. 15 B) aus der Zellpopulation, die mit 5 ng/ml BMP-2 versetzt worden ist, fiel nach sieben Tagen Inkubation geringer ab als LTC-IC aus SF3. Im Vergleich ergibt sich ein Zuwachs um den Faktor 2,2. Bei 50 ng/ml BMP-2 ist der Verlust an LTC-IC sogar etwas größer als unter Standardbedingungen. Insgesamt gehen bei 5 ng/ml BMP-2 nach sieben Tagen Inkubation weniger LTC-IC verloren als unter Standardbedingungen.

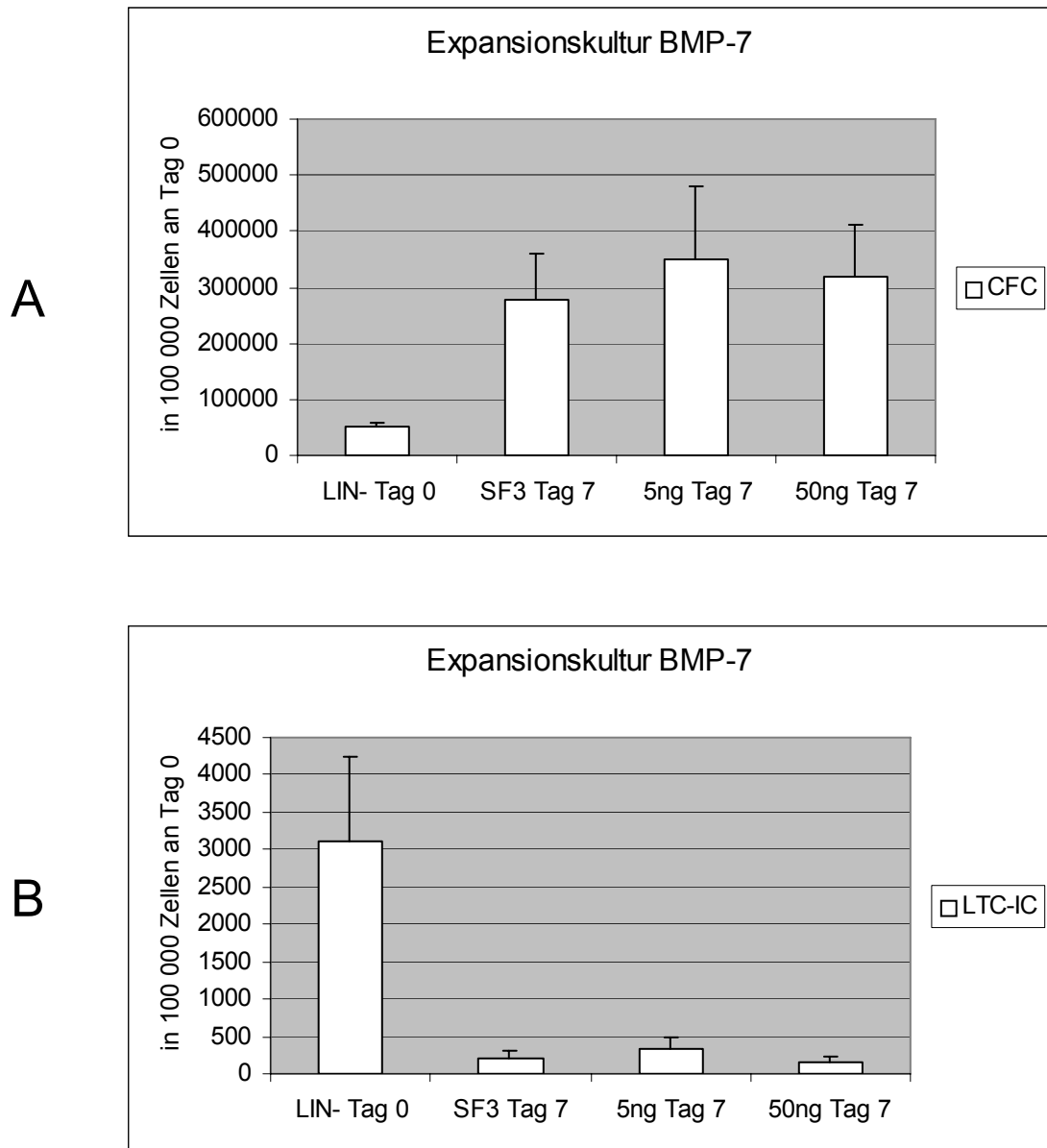
BMP-7 konnte bei der Gewinnung von CFC keine größere Wirkung erzielen; nur bei 5 ng/ml BMP-7 erhöhte sich die CFC Ausbeute im Vergleich mit SF3 um den Faktor 1,3, während bei 50 ng/ml BMP-7 die Anzahl der CFC annähernd konstant blieb (vgl. Abb. 16 A). LTC-IC verhielten sich in der Anwesenheit von BMP-7 ähnlich wie unter

Zusatz von BMP-2, jedoch weniger ausgeprägt (vgl. Abb.16 B): Unter dem Einfluss der niedrigen BMP-Konzentration verminderte sich der Verlust von LTC-IC von Tag 0 auf Tag 7 geringfügig. Im Vergleich mit SF3 kommt es zu einem Gewinn um den Faktor 1,6. Bei der hohen BMP-7 Konzentration können nur 75% der LTC-IC unter Standardbedingungen detektiert werden.

**Abbildung 15:** CFC (A) und LTC-IC (B) der Zellpopulationen aus der Expansionskultur mit BMP-2. Die Daten stammen von Zellen vor (Tag 0) und nach (Tag 7) Kultur. 5 ng/ml und 50 ng/ml bezieht sich auf BMP-2, diesen beiden Expansionen wurde auch SF3 zugefügt. Fehlerindikator = Standardfehler  $\sigma$ ,  $n = 4$ .



**Abbildung 16:** CFC (A) und LTC-IC (B) der Zellpopulationen aus der Expansionskultur mit BMP-7. Die Daten stammen von Zellen vor (Tag 0) und nach (Tag 7) Kultur. 5 ng/ml und 50 ng/ml bezieht sich auf BMP-7, diesen beiden Expansionen wurde auch SF3 zugefügt. Fehlerindikator = Standardfehler  $\sigma$ ,  $n = 4$ .



### 5.3.3 Expansionkultur mit BMP-4: Proliferation und Differenzierung der Zellpopulationen

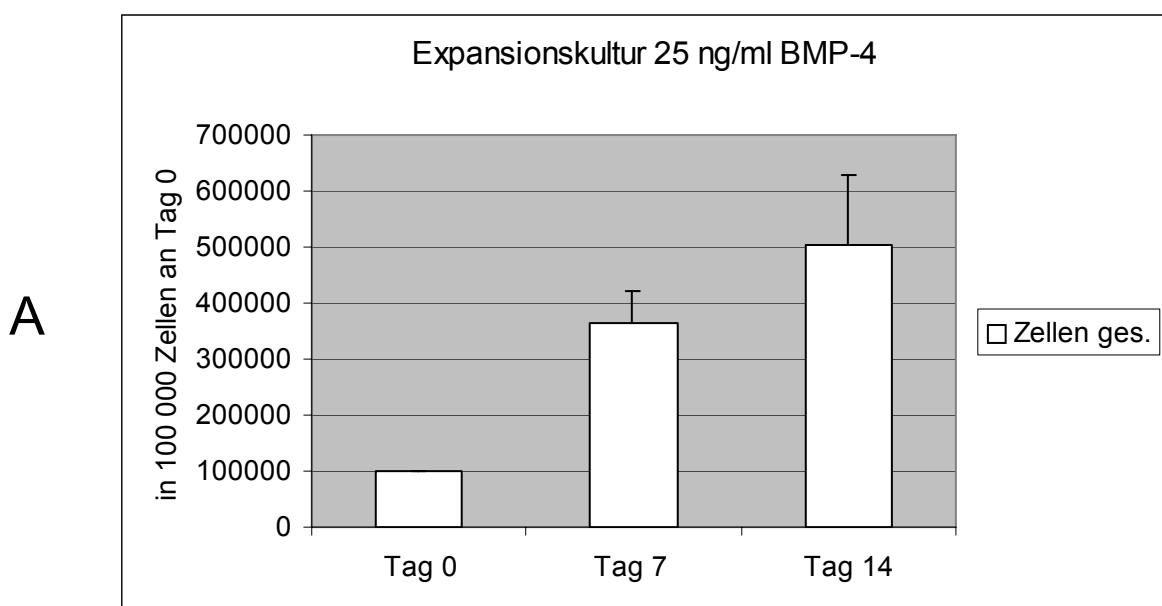
$1 \times 10^5$  Lin- Zellen pro ml serumfreies Medium wurden zusammen mit SF3 und BMP-4 in einer Konzentration von 25 ng/ml ausplattiert und für sieben und vierzehn Tage inkubiert. An Tag 0, Tag 7 und Tag 14 wurde die Ausprägung der Oberflächenmerkmale CD 34 und CD 38 festgestellt. Weiterhin wurden für die drei Messpunkte funktionelle Assays angefertigt.

In der Konzentration von 25 ng/ml übermittelte BMP-4 kein inhibitorisches Signal auf proliferierende Zellen (vgl. 5.2). Ausserdem zeigten BATHIA et al, dass BMP-4 in dieser Konzentration die Überlebensfähigkeit von zur Repopulation fähigen Progenitoren vergrößert und den unreifen Entwicklungsstatus von HSC aufrechterhält [92].

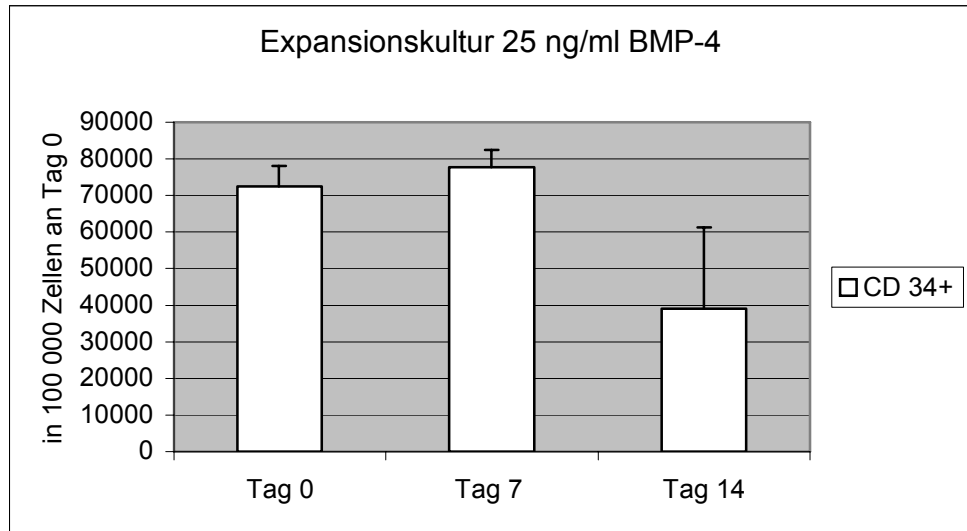
Die drei untersuchten Zellpopulationen verhielten sich unter dem Einfluss von BMP-4 unterschiedlich (vgl. Abb. 17 A-C). Die Gesamtzellzahl vermehrte sich in der ersten Woche um das 3,6-fache bezogen auf Tag 0, in der zweiten Woche um das 1,4-fache bezogen auf Tag 7 bzw. das 5-fache bezogen auf Tag 0. Die Größe der CD 34+ Zellfraktion blieb über die erste Woche konstant und fiel an Tag 14 auf 53,8% vom Ausgangswert ab. Die CD 34+/38- Subpopulation erfuhr einen deutlichen Wachstumsschub nach den ersten sieben Tagen (Wachstumsfaktor 8,7), um danach auf 86,4% der Zellzahl an Tag 0 zurückzufallen.

In den funktionellen Assays vermehrten sich CFC (vgl. Abb. 18 A) um den Faktor 2,8 nach sieben Tagen in Kultur; anschließend kam es zu einem Abfall auf den Wert vor Kultur. LTC-IC (vgl. Abb. 18 B) reduzierten sich an Tag 7 beträchtlich auf 10,9% des Ausgangswerts und nach weiterer Inkubation auf 2,9% der Zellzahl an Tag 0.

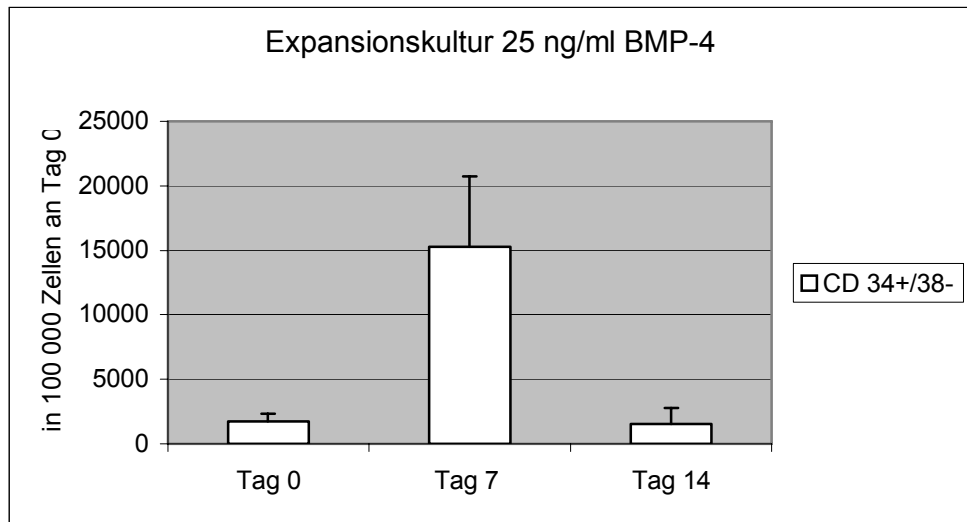
**Abbildung 17:** Darstellung der Zellzahlen vor (Tag 0) und nach (Tag 7, Tag 14) Kultur mit 25 ng/ml BMP-4 in serumfreien Medium mit SF3. Neben der Gesamtzellzahl (A) wurden CD 34+ (B) und CD 34+/38- (C) Zellen ausgezählt. n = 3, Fehlerindikator = Standardfehler  $\sigma$ .



B

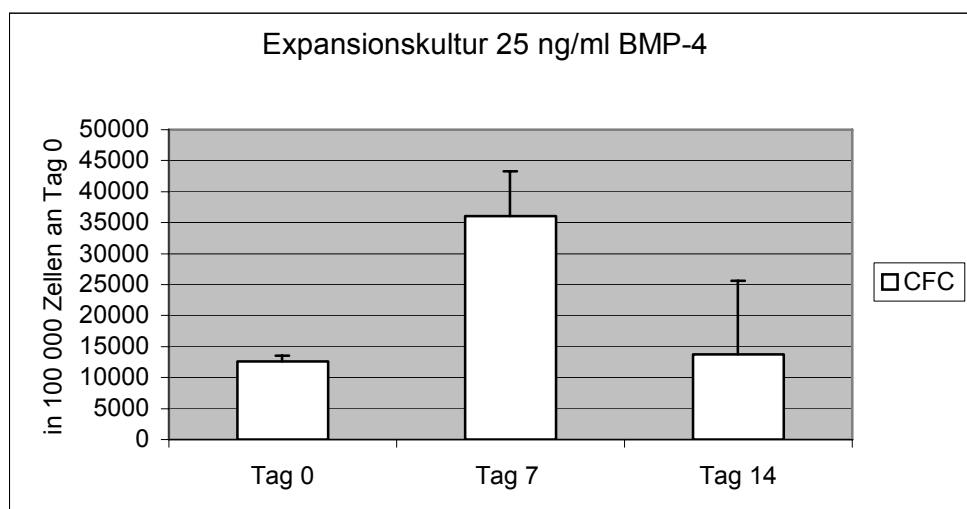


C

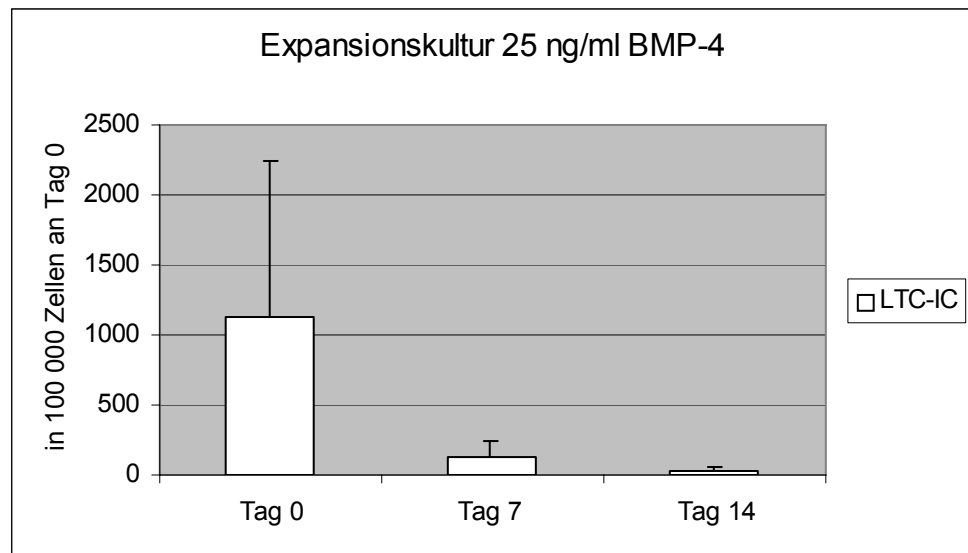


**Abbildung 18:** CFC (A) und LTC-IC (B) der Zellpopulationen aus der Expansionskultur mit 25 ng/ml BMP-4. Die Daten stammen von Zellen vor (Tag 0) und nach (Tag 7, Tag 14) Kultur mit BMP-4 mit SF3. Fehlerindikator = Standardfehler  $\sigma$ , n = 3.

A



B



### 5.3.4 Expansionskultur mit BMPs in Permutation

Nachdem für die einzelnen BMP Subtypen in den vorausgegangenen Experimenten jeweils eine Konzentration bestimmt worden ist, die im Hinblick auf Proliferation oder Differenzierung vielversprechend erschien, wurden BMPs in wechselnden Kombinationen untereinander als Stimulus in weiteren Expansionsexperimenten eingesetzt.

Hierbei wurde der Focus auf 5 ng/ml BMP-2 gelegt, da in der Langzeitkultur bei dieser Konzentration ein geringerer Verlust (auf 63,7 % des Ausgangswerts an Tag 0) an LTC-IC zu verzeichnen war, als unter Standardbedingungen (auf 28,7 % des Ausgangswerts). BMP-4 wurde mit 25 ng/ml eingesetzt, da in dieser Konzentration keine Inhibition des Zellwachstums stattfand und in einer anderen Studie mit dieser Dosierung die Fähigkeit zur Selbsterneuerung bewahrt werden konnte [92]. BMP-7 wurde mit 5 ng/ml zugesetzt, da sich in dieser Konzentration ein leichter Vorteil bezüglich des Erhalts von LTC-IC zu zeigen schien (Abfall auf 10,9% des Ausgangswerts vs. 6,9% unter Standardbedingungen). Für die einwöchige Kultur wurden fünf Expansionen angelegt: die Kontrollexpansion mit SF3, SF3 nur mit BMP-2, SF3 mit BMP-2 und BMP-4, SF3 mit BMP-2 und BMP-7 sowie SF3 mit allen drei BMP-Liganden. Messparameter waren wiederum die Gesamtzellzahl, die CD 34+ und CD 34+/38- Populationen. Darüberhinaus wurden für alle Expansionen Langzeitkulturen ausplattiert. Auf Kurzzeitkulturen wurde verzichtet, da aus ihnen in den Vorversuchen keine weiterführenden Ergebnisse gewonnen werden konnten.

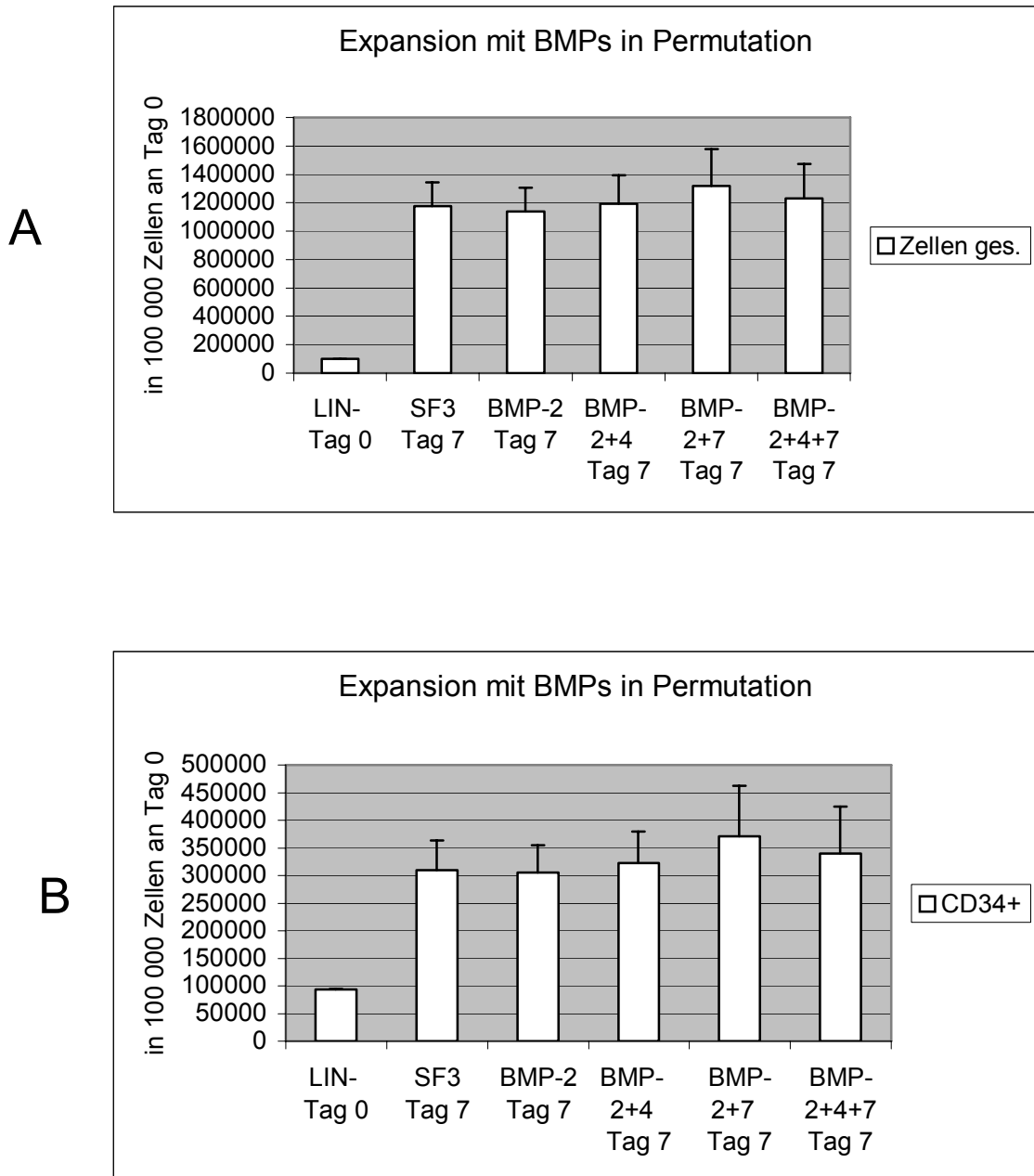
### **5.3.4.1 Proliferation der Gesamtzellzahl, der CD 34+ und CD 34+/38- Subpopulationen**

Der Vergleich zwischen den auf die Gesamtzellzahl bezogenen Proliferationsraten mit und ohne Einwirkung von BMPs förderte nur geringe Unterschiede zu Tage (vgl. Abb. 19 A). Mit der Kontrollexpansion als Referenzwert zeigte sich für BMP-2 (Faktor 0,96), BMP-2 und BMP-4 (Faktor 1,01) und für die Kombination aus allen drei BMPs (Faktor 1,05) keine maßgebliche Auswirkung auf die Proliferation. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus der Konzentrationsaustestung mit BMP-2, in der für alle Konzentrationen ein leichter Vorteil für die Zellvermehrung zu erkennen war, vor allem für die auch hier verwendete Konzentration von 5 ng/ml mit dem Faktor 1,3. Im Vergleich mit den anderen BMP-haltigen Expansionen scheint ein gewisser stimulierender Effekt durch die Kombination von BMP-2 und BMP-7 verursacht zu werden mit einer Proliferation um den Faktor 1,12.

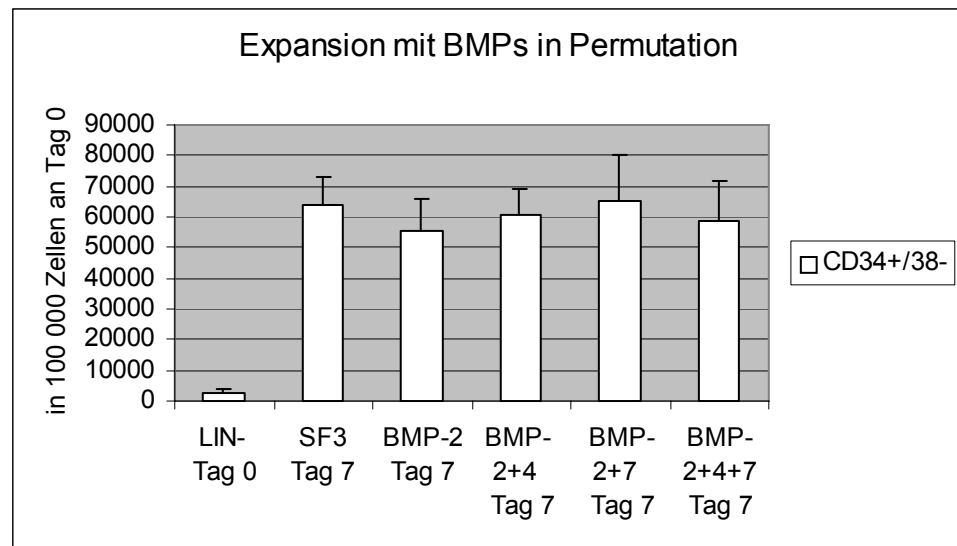
Auch in der CD 34+ Subpopulation (vgl. Abb 19 B) konnte die im Vergleich größte Proliferation (Faktor 1,2) unter dem Einfluss von BMP-2 und BMP-7 gemessen werden. Die übrigen Expansionen schwankten mit geringen Differenzen um den Kontrollwert mit SF3 (für BMP-2 Faktor 0,99; für BMP-2 plus BMP-4 Faktor 1,04; für BMP-2 plus BMP-4 plus BMP-7 Faktor 1,05).

Im Hinblick auf die CD 34+/38- Zellfraktion (vgl. Abb. 19 C) konnte ebenfalls keine Stimulation der Proliferation nachgewiesen werden; es schien sogar unter BMP-2 alleine eher eine Inhibition (Faktor 0,86) der Zellexpansion stattzufinden, was wiederum im Gegensatz zu den Werten aus der Konzentrationsbestimmung steht. Die übrigen Werte pendelten mit geringem Ausschlag um den Wert der Kontrollexpansion (mit Faktor 0,95 für BMP-2 plus BMP-4, Faktor 1,03 für BMP-2 plus BMP-7, Faktor 0,92 für die Kombination aller drei BMPs).

**Abbildung 19:** Evaluation der Zellzahlen vor (Tag 0) und nach Kultur (Tag 7) in serumfreiem Medium mit SF3 und mit oder ohne BMPs in Permutation. Es ist die Gesamtzellzahl (A), die CD 34+ (B) und CD 34+/38- (C) Zellfraktion jeweils mit n = 5 dargestellt. Die Werte beziehen sich auf 100 000 ausplattierte, linienspezifisch depletierte Zellen (Lin-) Zellen an Tag 0. BMP-2 wurde in einer Konzentration von 5 ng/ml, BMP-4 mit 25 ng/ml und BMP-7 mit 5 ng/ml eingesetzt. Fehlerindikator = Standardfehler  $\sigma$ .



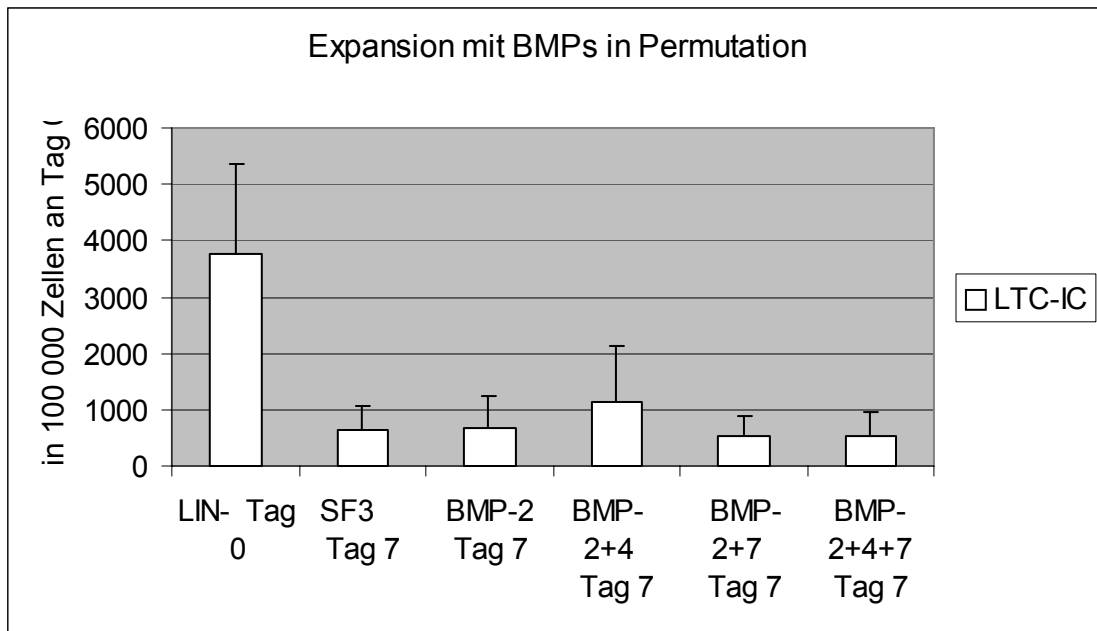
C



#### 5.3.4.2 Funktionelle Eigenschaften der Zellpopulationen

Im Langzeitkulturversuch ergab sich nach sieben Tagen Inkubation wie erwartet für alle Expansionen ein starker Abfall der LTC-IC Frequenz auf bis zu 14% des Wertes von Tag 0 in der Expansion mit BMP-2 und BMP-7 (vgl. Abb. 20). Anders als in den vorausgegangenen Experimenten konnte durch BMP-2 mit 5 ng/ml im Vergleich mit der Kontrollexpansion kein Vorteil festgestellt werden (Faktor 1,06), ebensowenig für die Kombination von BMP-2 und BMP-7 und für die Kombination aller BMPs (Faktor jeweils 0,8). Nur der Zusatz von BMP-2 zusammen mit BMP-4 konnte den Gewinn an LTC-IC verglichen mit der Standardexpansion verbessern (Faktor 1,75). Bezogen auf Tag 0 kam es nur zu einem Abfall auf 29,7% des Ausgangswerts.

**Abbildung 20:** LTC-IC der Zellpopulationen aus der Expansionskultur mit BMPs in Permutation. Die Daten stammen von Zellen vor (Tag 0) und nach (Tag 7) Kultur. Alle Expansionen wurden mit SF3 versetzt; BMP-2 wurde in einer Konzentration von 5 ng/ml eingesetzt, BMP-4 mit 25 ng/ml und BMP-7 mit 5 ng/ml. Fehlerindikator = Standardfehler  $\sigma$ ,  $n = 4$ .



## 6. Diskussion

### 6.1 Expression von BMP Rezeptoren durch CD 34+ Vorläuferzellen

Die untersuchten, linienspezifisch depletierten CD 34+ Vorläuferzellen können sowohl den Typ I Rezeptor ALK-3 als auch den Typ II Rezeptor BRII exprimieren und sind somit prinzipiell in der Lage, den Smad vermittelten BMP-Signalweg zu aktivieren. Vor Kultur war es nicht möglich, ALK-3 zu detektieren; jedoch können BMPs auch an homomere Rezeptoren binden, wenn auch mit geringerer Affinität. Für ein optimales Bindungsverhalten wird ein Dimer aus Typ I und Typ II Rezeptor benötigt [117]. Diese Voraussetzung war nur für die Zellpopulation nach siebentägiger Kultur gegeben. Nach Inkubation konnte die Expression von ALK-3 nachgewiesen werden; zu diesem Zeitpunkt war auch die Expression von BRII deutlich größer als am ersten Messpunkt, an dem BRII nur schwach positiv war.

Für BMP-2, BMP-4 und BMP-7 existieren jeweils spezifische Rezeptoren, die eine optimale Ligandenbindung möglich machen. BMP-2 bindet vor allem an ALK-3, kann jedoch auch ALK-6 aktivieren. Der entsprechende Typ II Rezeptor ist BRII. BMP-4 und BMP-2 bilden eine auf Homologie der Aminosäuresequenz basierende BMP Untergruppe; sie teilen sich auch die bevorzugten Rezeptoren [23, 118, 119]. BMP-7 wird einer anderen Untergruppe zugeordnet. In erster Linie besetzt BMP-7 den Typ I Rezeptor ALK-2, dessen Anwesenheit hier nicht untersucht worden ist. Laut TEN DIJKE et al kann BMP-7 schwach an ALK-3 binden [120]; übereinstimmende Angaben finden sich in neuerer Literatur [29, 119]. BRII übt für BMP-7 die Funktion eines Typ II Rezeptors aus [29, 118, 119].

Die Fähigkeit hämatopoetischer Vorläuferzellen, auf BMP-Signale reagieren zu können, wurde bereits nachgewiesen: CD 34+ Zellen aus Knochenmark und peripherem Blut, die in einem in vitro Modell der Erythropoese eingesetzt wurden, exprimierten ALK-2, ALK-3, ALK-6, ActRIIA, ActRIIB und BRII, wobei sich das Expressionsmuster in den verschiedenen Reifungsstadien änderte [109]. Auch in unreifen CD34+/38- Zellpopulationen aus Knochenmark oder Nabelschnurblut sind ALK-3 und ALK-6 nachweisbar sowie Smad-Proteine der intrazellulären Signalkaskade [92].

## 6.2 Einfluss von BMPs allein und in Kombination auf Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen

Effekte, die in diesen Experimenten bei der Stimulation hämatopoetischer Progenitoren durch BMPs erzielt wurden, waren nur in moderatem Maße zu beobachten und erreichten keine Signifikanz. Häufig konnte lediglich eine gewisse Tendenz im Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen festgestellt werden. Dennoch sollen die erhobenen Daten hier vor dem Hintergrund der bereits existierenden Literatur diskutiert werden.

Es kommen viele Möglichkeiten in Frage, durch die die Wirkung von BMPs abgeschwächt werden kann. Im extrazellulären Raum existiert eine Vielzahl von Antagonisten, die durch Bindung der BMP-Liganden deren Assoziation mit dem entsprechenden Rezeptor verhindern und somit die effektive BMP-Konzentration verringern. Dazu gehören z.B. Chordin und Noggin, die in erster Linie in frühen Abschnitten der Ontogenese gefunden wurden [26, 30], weiterhin Dan, Cerberus, Gremlin und Tsg [31]. Noggin wird in CD34+/CD 38- Nabelschnurblutzellen nach 12 Stunden Kultur in serumfreiem Medium exprimiert und hemmt die Proliferation der CD 34+/CD 38- Subpopulation [121]. Postnatal konnten USAG-1 und Sclerostin als BMP-Antagonisten identifiziert werden. Beide binden BMP-2, BMP-4 und BMP-7, Sclerostin mit verschieden hoher Affinität. Die Expression von USAG-1 kann im Laufe der Zahnentwicklung in einer negativen Feedbackschleife durch Zugabe von BMP-2 und BMP-7 induziert werden [31]. Möglicherweise werden in ähnlicher Weise auch hämatopoetische Zellen durch BMP-Aktivität dazu angeregt, Antagonisten zu produzieren. Einen Hinweis hierfür fanden DETMER et al [110]: BMP-7 scheint TGF- $\beta$ 1 zu induzieren und dadurch die Proliferation hämatopoetischer Progenitoren einzuschränken. Eine weitere Möglichkeit stellt die Hemmung durch Pseudorezeptoren dar. In der Embryogenese von *Xenopus laevis* wird der hemmende Rezeptor BAMBI exprimiert, der Ähnlichkeiten mit einem Typ I Rezeptor aufweist, aber keine intrazelluläre Kinase-Domäne besitzt. Er ist zu 89% identisch mit der Aminosäuresequenz des humanen Gens *nma*. BAMBI wird mit BMP-4 ko-exprimiert und seine Expression durch BMP-4 reguliert [32]. Intrazellulär kann das BMP-Signal durch inhibitorisch wirksame, zytoplasmatische Proteine wie z.B. Smurf-1 [34] und durch Inhibitoren aus der Smad-Familie (Smad-6 und Smad-7) [33] moduliert werden. Die Expression von Smad-6 und in höherem Grade von Smad-7

konnte in zwei primitiven HSC-Populationen (LSK CD 34-, Lhx2-HPC) nachgewiesen werden [122].

In der vorliegenden Arbeit wirkte sich die Inkubation der HPCs mit BMPs jeweils mit 5 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml nicht wesentlich auf die Generierung von CFCs aus.

BHATIA et al [92] untersuchten die CFC-Kapazität von Lin- CD 34+/CD 38- Zellen nach drei Tagen Kultur unter serumfreien Bedingungen mit BMP-2, BMP-4 und BMP-7 in vergleichbaren Konzentrationen. BMP-2 und BMP-7 hemmten die Proliferation der CFCs, während BMP-4 in Abhängigkeit von seiner Konzentration einerseits inhibierend (bei 5 ng/ml), andererseits deutlich stimulierend (bei 25 ng/ml) auf die Vermehrung linienspezifisch geprägter Vorläuferzellen einwirkte.

Im Gegensatz dazu beschreiben DETMER et al [110] einen Gewinn von CFUs im serumfreien, semisoliden Medium nach Zugabe von BMP-2, BMP-4 und BMP-7 in einer Konzentration von 50 ng/ml.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der drei Studien können wahrscheinlich mit den verschiedenen Zellquellen und Kulturbedingungen erklärt werden. In letzterer wurden aus Knochenmark gewonnene, CD 34+ Zellen direkt in mit EPO, GM-CSF und dem jeweiligen BMP angereicherte Methylcellulose ausplattiert und 14 Tage lang kultiviert. In den Experimenten von BHATIA et al wurden Lin- CD 34+/CD 38- Progenitorzellen aus Nabelschnurblut eingesetzt. Diese Untergruppe ist sehr klein und stellt eine primitivere Population dar als die CD 34+ Zellfraktion [123]. Die Inkubation dauerte drei Tage und erfolgte unter Zugabe von SCF, FL3, IL-3, IL-6, und G-CSF. Die beiden letzten Zytokine stellen möglicherweise einen zusätzlichen Stimulus für die Zellproliferation dar, wie es für aus dem Knochenmark stammende CFCs nachgewiesen werden konnte [124]. Wahrscheinlich ist aber der bedeutendste Grund für die unterschiedlichen Ergebnissen der drei Studien die Herkunft der Zellen, da dadurch die Reaktion der Zellen auf externe Stimuli beeinflusst wird: Setzt man Zellen aus Nabelschnurblut und adultem Knochenmark dem Einfluss einer Kombination von FL3, SCF und IL-3 aus, reagieren sie im Hinblick auf die Expansion von LTC-ICs unterschiedlich [113].

In den meisten Fällen bewirkt die ex vivo Proliferation von HSCs Zelldifferenzierung und Zelltod und damit einen Verlust von HSCs, die zur Langzeit-Repopulation fähig sind [62]. Im Laufe der Expansion gehen also vor allem die Zellen, die weiter oben in

der hämatopoetischen Hierarchie stehen und zur Selbsterneuerung ihres primitiven, multipotenten Zelltyps fähig sind, verloren. Der Nachweis dieser seltenen Stammzellen geschieht vorzugsweise im murinen System über das *engraftment* immundefizienter Empfängertiere [62, 66-68]. Der Arbeitsgruppe um NISHIOKA gelang es, zu zeigen, dass die von ihnen etablierte, mesenchymale Stammzelllinie HMSC-1 als hämatopoetische Stimuli neben Jagged-1 und SCF auch BMP-4 produziert. In Transplantationsexperimenten konnte die Repopulationskapazität CD34+/CD38-, hämatopoetischer Progenitorzellen aus Nabelschnurblut durch Kokultur mit HMSC-1 vergrößert werden [125]. In SRC-Assays von BHATIA et al war BMP-4 alleine als Faktor ausreichend, um das *engraftment* in NOD/SCID-Mäusen zu verbessern [92]. Weiterhin ist bekannt, dass Shh den BMP-Signalweg reguliert und dadurch die Proliferation von primitiven, hämatopoetischen Zellen induziert. Der stimulierende Effekt von Shh konnte mittels Noggin aufgehoben werden, während anti-Shh Antikörper die BMP-4-getriggerte Proliferation nicht störten [121].

Vor dem Hintergrund dieser Informationen stellt sich die Frage, ob BMP-Liganden auch im Rahmen anderer Nachweismethoden primitiver HSCs das Potential besitzen, diese in undifferenziertem Zustand zu amplifizieren. Als Surrogatmethode zur Detektion unreifer Progenitorzellen wurde für diese Arbeit das LTC-IC-Assay gewählt. Anhand dieser *in vitro* Methode können HSCs nachgewiesen werden, die für nur wenig differenzierter gehalten werden als SRCs (vgl. Abb. 4). Allerdings ist die Schlussfolgerung unzulässig, dass primitive Zellpopulationen, die im *in vitro* Modell erfolgreich ermittelt werden konnten, automatisch auch im *in vivo* System bestätigt werden können.

In der vorliegenden Arbeit konnten Anhaltspunkte dafür gefunden werden, dass auch BMP-2 die Expansion primitiver HSCs positiv beeinflussen kann. Es gelang mit der Zugabe von BMP-2 in einer Konzentration von 5 ng/ml die Ausbeute an LTC-ICs im Vergleich mit SF3 zu erhöhen (vgl. Abb.15 B). Während LTC-ICs nach siebentägiger Inkubation mit SF3 auf 28,7% des Ausgangswerts an Tag 0 zurückgingen, konnte mit 5 ng/ml BMP-2 ein Abfall auf 63,7% erreicht werden. In einer höheren Konzentration von 50 ng/ml war dies nicht möglich, der Verlust an LTC-IC war sogar etwas größer als unter Standardbedingungen (22,7% des Wertes an Tag 0). Somit scheint die Wirkung von BMP-2 auch in diesem Kontext, wie schon in anderen Situationen und von anderen BMP-Liganden bekannt, konzentrationsabhängig zu sein [126, 127, 92]. Problematisch für die Interpretation der Ergebnisse ist die Tatsache, dass sie nicht

signifikant waren und oftmals einen sehr großen Fehlerindikator aufwiesen. Darüberhinaus konnte in den Permutationsexperimenten, im Zuge derer auch eine Expansion allein mit BMP-2 mitgeführt worden ist, der positive Effekt von 5 ng/ml BMP-2 auf den Erhalt von LTC-ICs nicht mehr beobachtet werden (vgl. Abb. 20). Die Kombination von BMP-2 mit BMP-4 hingegen bewirkte einen LTC-IC-Verlust auf 29,7% vom Wert an Tag 0, während sich unter Standardbedingungen die Ausbeute auf 17% reduzierte. Möglicherweise entspricht dies einem Effekt, der für BMP-Dimere im Rahmen der Knochenbildung festgestellt worden ist: BMP-4/BMP-7 Heterodimere sind in diesem Zusammenhang stärker osteoinduktiv wirksam als Homodimere [20].

Unsere Arbeitsgruppe versuchte, durch weitere Experimente nach dem beschriebenen Versuchsaufbau statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen [128]. Es ergab sich hierbei ein statistisch signifikanter Gewinn von LTC-IC durch BMP-7 in einer Konzentration von 5 ng/ml im Vergleich mit der Expansion unter SF3. In den hier gezeigten Experimenten hatte sich diese stimulierende Wirkung tendenziell bereits abgezeichnet (vgl. 5.3.2.2), war jedoch weniger ausgeprägt als in der Inkubation mit BMP-2 bei 5 ng/ml. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch keine statistische Signifikanz zu erreichen war, sind die Ergebnisse von GRASSINGER et al überzeugender.

Abschließend muss für die durchgeführten Versuche festgestellt werden, dass es nicht gelungen ist, eindeutige Ergebnisse im Bezug auf das Verhalten hämatopoetischer Vorläuferzellen in Gegenwart von BMPs zu erzielen. Es kann jedoch festgestellt werden, dass die Rezeptorausstattung, um auf BMP-Aktivität reagieren zu können, vorhanden ist. Weiterhin scheint sich mittels BMP-2 und/oder BMP-7 unter den gegebenen Expansionsbedingungen eine positive Tendenz auf die Amplifizierung unreifer Progenitoren erzielen zu lassen, wobei die Ergebnisse für BMP-7 sicherlich als verlässlicher anzusehen sind. Dieser Umstand weist auf BMPs als geeignete Kandidaten für die in vitro Expansion transplantationsfähiger Stammzellen hin. Jedoch muss diese Möglichkeit in weiteren und für diese Fragestellung valideren Versuchen, das heißt anhand von Xenotransplantationsexperimenten in immundefizienten Empfängern, abgeklärt

werden. Dabei sollte neben dem Potential von BMP-7, unreife Stadien von HPC zu erhalten, auch das von BMP-2 untersucht werden.

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildung</u>	<u>Seite</u>	
1	12	Verwandtschaftsgrad von BMPs und TGF- $\beta$
2	13	Schematische Darstellung des BMP-7 Monomers
3	14	Rezeptorspezifität der BMP-Liganden
4	21	Hierarchie der hämatopoetischen Zellen
5	24	Hämatopoetische Einflussfaktoren
6	32	Tetramere Antikörper für die Negativselektion
7	39	CFU-GEMM und BFU-E im Lichtmikroskop
8	40	BFU-E und CFU-GM im Lichtmikroskop
9	49	Nachweis von BMP-Rezeptoren
10	50	Einzelzellversuch BMP-4
11	51	Einzelzellversuch BMP-2
12	52	Durchflusszytometrisches Punktdiagramm mit der Expression von CD 34 und CD 38
13	53	Expansion BMP-2: Proliferation der Zellen insgesamt, der CD 34+ und CD 34+/38- Population
14	55	Expansion BMP-7: Proliferation der Zellen insgesamt, der CD 34+ und CD 34+/38- Population

15	57	Expansion BMP-2: Funktionelle Assays
16	58	Expansion BMP-7: Funktionelle Assays
17	59	BMP-4: Proliferation der Zellen insgesamt, der CD 34+ und CD 34+/38- Population
18	60	BMP-4: Funktionelle Assays
19	63	BMPs in Permutation: Proliferation der Zellen insgesamt, der CD 34+ und CD 34+/38- Population
20	65	BMPs in Permutation: Funktionelle Assays

## 8. Abkürzungen

$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
ActR	<i>activin type receptor</i>
AGM	aortogonadales Mesonephron
ALK	<i>activin receptor-like kinase</i>
APC	Allophycocyanin
AV-Kanal	atrioventrikulärer Kanal
BAMBI	<i>BMP and activin membrane-bound receptor</i>
$\beta$ H1	spezifischer Marker für primitive Erythrozyten
BFU-E	<i>burst forming unit-erythroide</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaar
BR	BMP-Rezeptor
Brachyury	mesodermaler Marker
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
CAFC	<i>cobblestone-area-forming cell</i>
CamKIV	Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV
CBP	Histon-Acetyltransferase
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFC	<i>colony forming cell</i>
CFU-E	<i>colony forming unit-erythroide</i>
CFU-G	<i>colony forming unit-granulocyte</i>
CFU-GM	<i>colony forming unit-granulocyte/macrophage</i>
CFU-M	<i>colony forming unit-macrophage</i>
CFU-Mk	<i>colony forming unit-megacaryocyte</i>
CFU-S	<i>colony forming unit-spleen</i>

cGy	Centigray
c-kit	Rezeptor für SCF
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRU	<i>competitive repopulating unit</i>
Dan	<i>differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
Erk	<i>extracellular regulated protein kinase</i>
EPO	Erythropoietin
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FL	FIt-3 Ligand ( <i>fms-like tyrosine kinase 3 ligand</i> )
FOP	Fibrodysplasia ossificans progressiva
FSC	<i>forward scatter</i>
GABA	γ-Aminobutyrat
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
H <sub>0</sub>	Nullhypothese

H <sub>1</sub>	Alternativhypothese
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HMSC-1	mesenchymale Stammzelllinie
HPP-CFC	<i>high proliferative potential-colony forming cell</i>
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IgG	Immunglobulin G
Ihh	<i>indian hedgehog</i>
IL	Interleukin
ISC	Iscove`s modifizierte Dulbecco`s
ISHAGE	<i>International Society of Hematotherapy and Graft Engineering</i>
ISO	Isotyp
JNK	<i>c-jun amino-terminal kinase</i>
JP	familiäre juvenile Polyposis
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
KDR	Rezeptor für VEGF
λ	Wellenlänge
LC	Locus coeruleus
Lhx2-HPC	Lhx2 hämatopoetische Progenitorzellen
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
Lin-	linienspezifisch depletiert
LSK CD 34-	Lin-Sca-1+c-kit+ CD 34- hämatopoetische Progenitorzellen
LTC-IC	<i>long term culture-initiating cell</i>

Madh	<i>Mothers against decapentaplegic homolog-interacting protein</i>
MAN1	Protein der inneren Kernmembran
MH	<i>Mad-homology</i> Domäne
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MNC	mononukleäre Zelle
MPS	mononukleäres, phagozytierendes System
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Stichprobenumfang
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NOD	<i>nonobese</i>
OAZ	<i>olf-1/EBF associated zinc finger</i>
OP	<i>osteogenic protein</i>
p300	Histon-Acetyltransferase
PAS	paraaortales Splanchnopleura
Pax1	<i>paired box gene 1</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a Proteinkomplex
PI	Propidium Iodid
PI3	<i>phosphatidyl-inositol 3 kinase</i>
PNS	peripheres Nervensystem
PPH	primäre pulmonale Hypertonie
P/S	Penicillin/Streptomycin

RAS	<i>rat sarcoma (oncogene)</i>
rhBMP	rekombinantes, humanes BMP
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
R-Smad	Rezeptor-aktiviertes Smad
RT	reverse Transkriptase
s	Standardabweichung
s <sup>2</sup>	Varianz
σ	Standardfehler
SBE	<i>Smad-binding element</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficient</i>
SF3	serumfreies Medium+SCF+IL-3+FL3
Shh	<i>sonic hedgehog</i>
Smad	<i>smaller worms mothers against decapentaplegic</i>
Smurf	<i>Smad ubiquitination regulatory factor</i>
SNO	spindelförmige, N-Cadherin+, CD 45- Osteoblasten
SRC	<i>SCID repopulating cell</i>
SSC	<i>sideangel scatter</i>
SVZ	subventrikuläre Zone
TAB	<i>TAK binding protein</i>
TAK	<i>TGF-β activated kinase</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
Thy-1	Marker für HSC
TNF-α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
Tob	<i>transducer of erbB2</i>
TPO	Thrombopoetin
Tsg	<i>twisted granulation protein</i>
USAG	<i>uterine sensitization-associated gene</i>

v	Anzahl der Freiheitsgrade
VE	viszerales Endoderm
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
—	
x	Mittelwert
$x_i$	Einzelwert
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1	Reddi AH. The Cytokine Handbook, Elsevier Science Ltd. 2003
2	Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, et al. BMPs: from structure to clinical use. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2005; 38:1463-73
3	Rengachary SS. BMPs: basic concepts. Neurosurg Focus 2002; 13: Article 2
4	Senn N. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. Am J Med Sci 1889; 98: 219-43
5	Levander G. On the formation of new bone in bone transplantation. Acta Chir Scand 1934; 74: 425-26
6	Levander G. A study of bone regeneration. Surg Gynaecol Obstet 1938; 67: 705-14
7	Sharrard WJ, Collins DH. The fate of human decalcified bone grafts. Proc Roy Soc Med 1961; 54: 1101-02
8	Ray AD, Holloway JA. Bone implants. Preliminary report of an experimental study. J Bone Joint Surg Am 1957; 39: 1119-28
9	Urist MA. Bone: formation by autoinduction. Science 1965, 150: 893-9 und Clin Orthop Relat Res 2002; 395: 4-10
10	Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of bone matrix components involved in local bone differentiation. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 7599-7603
11	Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. BMP augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report. Clin Orthop Relat Res 1988; 230: 257-65
12	Bessho K, Kusumoto K, Fujimura K, Konishi Y, Ogawa Y, Tani Y, Izuka T. Comparison of recombinant and purified human BMP. Br J Oral Maxillofac Surg 1999; 37: 2-5
13	Boden SD, Kang J, Sandhu H, Heller JG. Use of recombinant BMP-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial. Spine 2002; 27: 2662-73
14	Burkus JK, Transfeldt EE, Kitchel SH, Watkins RG, Balderston RA. Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human BMP-2. Spine 2002; 27: 2396-2408

15	Groeneveld EH, Burger EH. BMPs in human bone regeneration. <i>Eur J Endocrinol</i> 2000; 142: 9-21
16	Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G et al. Osteogenic protein-1 (BMP-7) in the treatment of tibial nonunions. <i>J Bone Joint Surg Am</i> 2001; 83-A Suppl 1: 159-60
17	Schedel H, Schneller A, Vogl T et al. MRI: a follow-up study after femur core decompression and instillation of rhBMP-2 in avascular femur head necrosis. <i>Röntgenpraxis</i> 2000; 53: 16-24
18	Constam DB, Robertson EJ. Regulation of BMP activity by prodomains and proprotein convertases. <i>J Cell Biol</i> 1999; 144: 139-49
19	Detmer K, Walker AN. BMPs act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. <i>Cytokine</i> 2002; 17: 36-42
20	Leong LM, Brickell PM. Molecules in focus: BMP-4. <i>Int J Biochem Cell Biol</i> 1996; 28: 1293-96
21	Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein -1: structural paradigm of the TGF- $\beta$ superfamily. <i>Proc Natl Acad Sci</i> 1996; 93: 878-83
22	Massague J, Chen Y-G. Controlling TGF- $\beta$ signaling. <i>Genes &amp; Development</i> 2000; 14: 627-644
23	Ebisawa T, Tada K, Kitajima I, Tojo K, Sampath TK, Kawabata M, Miyazono K, Imamura T. Characterization of BMP-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. <i>Journal of Cell Science</i> 1999; 112: 3519-27
24	Carcamo J, Weis FMB, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to TGF- $\beta$ and activin. <i>Molecular and Cellular Biology</i> 1994; 14:3810-21
25	Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- $\beta$ /Smad signalling system. <i>The EMBO Journal</i> 2000; 19: 1745-54
26	Nohe A, Keating E, Knaus P, Peterson NO. Signal transduction of BMP receptors. <i>Cellular Signaling</i> 2004; 16: 291-99
27	Zwijssen A, Verschueren K, Huylebroek D. New intracellular components of BMP/Smad signaling cascade. <i>FEBS Letters</i> 2003; 546: 133-39

28	Hsu M-Y, Rovinsky R, Penmatcha S, Herlyn M, Muirhaed D. BMPs in melanoma: angel or devil? <i>Cancer and Metastasis Reviews</i> 2005; 24: 251-263
29	Macias-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, Buchwald M, Wrana JL. Specific activation of Smad 1 signaling pathways by the BMP-7 Type I Receptor ALK-2. <i>J Biol Chem</i> 1998; 273: 25628-36
30	Yamamoto Y, Oelgeschläger M. Regulation of BMPs in early embryonic development. <i>Naturwissenschaften</i> 2004; 91: 519-34
31	Yanagita M. BMP antagonists: Their role in development and involvement in pathophysiology. <i>Cytokine &amp; Growth Factors Reviews</i> 2005; 16: 309-17
32	Onichtchouk D, Chen Y-G, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs CH. Silencing of TGF- $\beta$ signalling by the pseudoreceptor BAMBI. <i>Nature</i> 1999; 401: 480-85
33	Christian JL, Nakayama T. Can't get no SMADisfaction: Smad proteins as positive and negative regulators of TGF- $\beta$ family signals. <i>BioEssays</i> 1999; 21: 382-90
34	Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. A Smad ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. <i>Nature</i> 1999; 400: 687-93
35	Wozney JM. The BMP family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. <i>Eur J Oral Sci</i> 1998; 106: 160-66
36	Zhao G-Q. Consequences of knocking out BMP Signaling in the mouse. <i>Genesis</i> 2003; 35: 43-56
37	Kishigami S, Mishina Y. BMP signalling and early embryonic patterning. <i>Cytokine and Growth Factors Review</i> 2005; 16: 265- 78
38	Nishimatsu S, Thomsen GH. Ventral mesoderm induction and patterning by BMP heterodimers in <i>Xenopus</i> embryo. <i>Mech Dev</i> 1998; 74: 75-88
39	Graff JM. Embryonic patterning: To BMP or not to BMP, that is the question. <i>Cell</i> 1997; 89: 171-74
40	Dale L, Jones CM. BMP signalling in early <i>Xenopus</i> development. <i>BioEssays</i> 1999; 21: 751-60

41	Capdevila J, Vogan KJ, Tabin CJ, Belmonte JCI. Mechanisms of left-right determination in vertebrates. <i>Cell</i> 2000; 101: 9-21
42	Branford WW, Essner JJ, Yost HJ. Regulation of gut and heart left-right asymmetry by context-dependent interactions between <i>Xenopus</i> lefty and BMP-4 signaling. <i>Dev Biol</i> 2000; 223: 291-306
43	Miller AF, Harvey SAK, Thies RS, Olson MS. BMP-9. An autocrine/ paracrine cytokine in the liver. <i>J Biol Chem</i> 2000; 275: 17937-945
44	Simon M, Maresh JG, Harris SE et al. Expression of BMP-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. <i>Am J Physiol</i> 1999; 45: F382-89
45	Guha U, Mecklenburg L, Cowin P, Kessler JA et al. BMP signaling regulates postnatal hair follicle differentiation and cycling. <i>American Journal of Pathology</i> 2004; 165: 729-40
46	Ishizuya-Oka A. Epithelial-connective tissue cross-talk is essential for regeneration of Intestinal epithelium. <i>J Nippon Med Sch</i> 2005; 72: 13-18
47	Yi SE, LaPolt PS, Yoon BS, Chen JY-C, Lu JKH, Lyons KM. The Type I BMP receptor <i>Bmpr1B</i> is essential for female reproductive function. <i>PNAS</i> 2001; 98: 7994-7999
48	Lim DA, Tramontin AD, Alvarez-Buylla A et al. Noggin antagonizes BMP signalling to create a niche for adult neurogenesis. <i>Neuron</i> 2000; 28: 713-726
49	Brederlau A, Faigle R, Elmi M, Zarebski A, Funa K et al. The BMP Type Ib receptor is a major mediator of glial differentiation and cell survival in adult hippocampal progenitor cell culture. <i>Mol Biol Cell</i> 2004; 15: 3863-75
50	Yoshikawa H, Nakase T, Myoui A, Ueda T. BMPs in bone tumors. <i>J Orthop Sci</i> 2004; 9: 334-40
51	Rothhammer T, Poser I, Soncin F, Bataille F, Moser M, Bosserhoff A-K. BMPs are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. <i>Cancer Res</i> 2005; 65: 448-56
52	Haudenschild DR, Palmer SM, Moseley SA, You Z, Reddi AH. BMP-6 signaling and BMP antagonist noggin in prostate cancer. <i>Cancer Res</i> 2004; 64: 8276- 84

53	De La Peña LS, Billings PC, Fiori JL, Ahn J, Kaplan FS, Shore EM. FOP, a disorder of ectopic osteogenesis, misregulates cell surface expression and trafficking of BMPRIA. <i>J Bone Miner Res</i> 2005; 20: 1168-76
54	Kan L, Hu M, Gomes WA, Kessler JA. Transgenic mice overexpressing BMP-4 develop a FOP-like phenotype. <i>Am J Pathol</i> 2004; 165: 1107-15
55	Zhou X-P, Woodford-Richens K, Aaltonen LA, Tomlinson IPM, Eng CH et al. Germline mutations in <i>BMPR1A/ALK3</i> cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. <i>Am J Hum Genet</i> 2001; 69: 704-11
56	Howe JR, Bari JL, Sayed MG, Anderson ME, Bert Vogelstein et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. <i>Nature Genetics</i> 2001; 28: 184-87
57	Eddahibi S, Morrell N, Naeije R, Adnot S. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. <i>Eur Respir J</i> 2002; 20: 1559–1572
58	De Caestecker M, Meyrick B. Bone morphogenetic proteins, genetics and the pathophysiology of primary pulmonary hypertension. <i>Respir Res</i> 2001; 2:193–197
59	Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM. Wnt 5a inhibits canonical Wnt signalling in HSCs and enhancesrepopulation. <i>PNAS</i> 2007; 104: 15436-441
60	Verfaillie CM, Almeida-Porada G, Wissink S, Zanjani ED. Kinetics of engraftment of CD34- and CD34+ cells from mobilized blood differs from that of CD34- and CD34+ cells from bone marrow. <i>Exp Hematol</i> 2000; 28:1071-9.
61	Oh I-H, Lao A, Eaves CJ. During ontogeny primitive (CD34+ CD38-) hematopoietic cellsshow altered expressionof a subset of genes associated withearly cytokine and different responses of their adult counterpart. <i>Blood</i> 2000; 96:4160-8
62	Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoetic stem cells and progenitors: implications for clinical application. <i>Annu Rev Immunol</i> 2003; 21: 759-806

63	Muench MO, Cupp J, Polakoff J, Roncarolo MG. Expression of CD33, CD38, and HLA-DR on CD34+ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential. <i>Blood</i> . 1994; 83: 3170-81
64	Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on Human Hematopoietic Progenitor Cells. <i>J Exp Med</i> 1993; 177: 1331-1342
65	D`Arena G, Musto P, Cascavilla N, Carotenuto M. Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34+ hematopoietic progenitor cells: a five dimensional flow cytometric study. <i>Haematologica</i> 1998; 83:587-592
66	Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition characterization and potential uses. <i>Annu Rev Immunol</i> 1991; 9: 323-50
67	Greiner DL, Hesselton RA, Schultz LD. SCID mouse models of human stem cell engraftment. <i>Stem Cells</i> 1998; 16: 166-77
68	Namikawa R, Weilbaecher RN, Kaneshima H, Yee EJ, McCune JM. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. <i>J Exp Med</i> 1990; 172: 1055-63
69	Almeida-Porada G, Porada C, Zanjani ED. The fetal sheep: a unique model system for assessing the full differentiative potential of HSC. <i>Yonsei Medical J</i> 2004; 45: 7-14
70	Van Hennik PB, Verstegen MMA, Bierhuizen MFA, Limon A, Wognum AW, Cancelas JA, Wagemaker G et al. Highly efficient transduction of the green fluorescent protein gene in human umbilical CB stem cells capable of cobblestone formation in long-term cultures and multilineage engraftment in immunodeficient mice. <i>Blood</i> 1998; 92: 4013-22
71	De Haan G, Ploemacher R. The cobblestone-area-forming cell assay. <i>Methods in Molecular Medicine</i> , vol. 63: HSC Protocols; Hrsg: Klug CA, Jordan TC. Humana Press Inc., Totowa, NJ
72	Miller CL, Eaves CJ. Long-term culture-initiating cell assays for human and murine cells. <i>Methods in Molecular Medicine</i> , vol. 63: HSC Protocols; Hrsg: Klug CA, Jordan TC. Humana Press Inc., Totowa, NJ
73	Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC. Functional characterization of individual human HSCs cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. <i>Proc Natl Acad Sci</i> 1990; 87: 3584-88

74	Hogge DE, Landsdorp PM, Reid D, Gerhard B, Eaves CJ. Enhanced detection, maintenance and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, IL-3, and G-CSF. <i>Blood</i> 1996; 88: 3765-73
75	Ogawa M, Livingston AG. Hematopoietic colony-forming cells. <i>Methods in Molecular Medicine</i> , vol. 63: HSC Protocols; Hrsg: Klug CA, Jordan TC. Humana Press Inc., Totowa, NJ
76	Fauser AA, Messner HA. Proliferative state of human pluripotent hematopoietic progenitors (CFU-GEMM) in normal individuals and under regenerative conditions after bone marrow transplantation. <i>Blood</i> 1979; 54: 1197-1200
77	Stephenson JR, Axelrad AA. Separation of erythropoietin sensitive cells from hematopoietic spleen colony-forming stem cells of mouse fetal liver by unit gravity sedimentation. <i>Blood</i> 1971; 37: 417-27
78	Hao HN, Zhao J, Thomas RL, Parker GC, Lyman WD. Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro. <i>J Hematother Stem Cell Res</i> 2003; 12: 23-32
79	Masson S, Harrison DJ, Plevris JN, Newsome PN. Potential of HSC therapy in hepatology: a critical review. <i>Stem Cells</i> 2004; 22: 897-907
80	Orlic D. BM stem cells and cardiac repair: where do we stand in 2004? <i>Cytotherapy</i> 2005; 7: 3-15
81	Moore KA. Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche. <i>Current opinion in Hematology</i> 2004; 11: 107-11
82	Zhang J, Niu C, Mishina Y, Li L et al. Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. <i>Nature</i> 2003; 425: 836-41
83	Charbord P. Microenvironmental cell populations essential for the support of HSC. <i>Hematopoiesis. A Developmental Approach</i> . Hrsg: Zon L, Oxford University Press 2001
84	Charbord P. Mediators involved in the control of hematopoiesis by the microenvironment. <i>Hematopoiesis. A Developmental Approach</i> . Hrsg: Zon L, Oxford University Press 2001
85	Verfaillie CM. Ex vivo expansion of HSC. <i>Hematopoiesis. A Developmental Approach</i> . Hrsg: Zon L, Oxford University Press 2001

<b>86</b>	Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Autocrine/ paracrine mechanisms in human hematopoiesis. <i>Stem Cells</i> 2001; 19: 99-107
<b>87</b>	Baron MH. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. <i>Exp Hematol</i> 2003; 31: 1160-69
<b>88</b>	Dzierzak E, Oostendorp R. HSC development in mammals. <i>Hematopoiesis. A Developmental Approach</i> . Hrsg: Zon L, Oxford University Press 2001
<b>89</b>	Baron MH. Embryonic induction of mammalian hematopoiesis and vasculogenesis. <i>Hematopoiesis. A Developmental Approach</i> . Hrsg: Zon L, Oxford University Press 2001
<b>90</b>	Detmer K, Steele TA, Shoop MA, Dannawi H. Lineage restricted expression of BMP genes in human hematopoietic cell lines. <i>Blood Cells, Molecules and Diseases</i> 1999; 25: 310-23
<b>91</b>	Sharrock WJ. Bone and the hematopoietic and immune systems: a report of the proceedings of a scientific workshop. <i>J Bone Miner Res</i> . 1998 Apr;13(4):537-43
<b>92</b>	Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, Dick JE. BMPs regulate the developmental program of human HSC. <i>J Exp Med</i> 1999; 189: 1139-47
<b>93</b>	Marshall CJ, Kinnon C, Thrasher AJ. Polarized expression of BMP-4 in the human AGM region. <i>Blood</i> 2000; 96: 1591-93
<b>94</b>	Huber TL, Zhou Y, Mead PE, Zon LI. Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. <i>Blood</i> 1998; 92: 4128-37
<b>95</b>	Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. BMP-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. <i>Genes Dev</i> 1995; 9: 2105-16
<b>96</b>	Johansson BM, Wiles MV. Evidence of involvement of Activin A and BMP-4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. <i>Molecular and Cellular Biology</i> 1995; 15: 141-151
<b>97</b>	Adelman CA, Chattopadhyay S, Bieker JJ. The BMP/BMPR/Smad pathway directs expression of the erythroid-specific EKLF and GATA 1 transcription factors during embryoid body differentiation in serum free media. <i>Dev</i> 2002; 129: 539-49

<b>98</b>	Park C, Afrikanova I, Rosendahl A, Choi K et al. A hierarchical order of factors in the generation of FLK-1 and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. <i>Development and Diseases</i> 2004; 131: 2749-62
<b>99</b>	Li F, Lu S, Vida L, Thomson JA, Honig GR. BMP-4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in vitro. <i>Blood</i> 2001; 98: 335-342
<b>100</b>	Nakayama N, Lee J, Chiu L. VEGF synergistically enhances BMP-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells in vitro. <i>Blood</i> 2000; 95: 2275-83
<b>101</b>	Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Bhatia M. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. <i>Blood</i> 2003; 102: 906-15
<b>102</b>	Ying Q-L, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP Induction of Id suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. <i>Cell</i> 2003; 115: 281-92
<b>103</b>	Varga AC, Wrana JL. The disparate role of BMP in stem cell biology. <i>Oncogene</i> 2005; 24: 5713-21
<b>104</b>	Dyer MA, Farrington SM, Mohn D, Munday JR, Baron MH. Ihh activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neuroectodermal cell fate in the mouse embryo. <i>Dev</i> 2001; 128: 1717-1730
<b>105</b>	Baron MH. Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals. <i>Differentiation</i> 2001; 68: 175-85
<b>106</b>	Walters MJ, Wayman GA, Notis JC, Goodman RH, Soderling TR, Christian JL. Calmodulin dependent protein kinase IV mediated antagonism of BMP signalling regulates lineage and survival of hematopoietic progenitors. <i>Dev</i> 2002; 129: 1455-66
<b>107</b>	Fuchs O, Simakova O, Klener P, Stopka T et al. Inhibition of Smad 5 in human hematopoietic progenitors blocks erythroid differentiation induced by BMP-4. <i>Blood Cells, Molecules and Diseases</i> 2002; 28: 221-33
<b>108</b>	Lenox LE, Perry JM, Paulson RF. BMP-4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. <i>Blood</i> 2005; 105: 2741-48

<b>109</b>	Maguer-Satta V, Bartholin L, Jeanpierre S, Ffrench M, Rimokh R et al. Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP-2 and BMP-4, members of the TGF- $\beta$ family. <i>Exp Cell Res</i> 2003; 282: 110-20
<b>110</b>	Detmer K, Walker AN. BMPs act synergistically with hematopoietic cytokines in the differentiation of hemaopoietic progenitors. <i>Cytokine</i> 2002; 17: 36-42
<b>111</b>	An J, Rosen V, Cox K, Beauchemin N, Sullovan AK. Recombinant human BMP-2 induces a hematopoietic microenvironment in the rat that supports the growth of stem cells. <i>Exp Hemat</i> 1996; 24: 768-75
<b>112</b>	Sutherland DA, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD 34+ cell determination by flow cytometrie. <i>International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematolther</i> 1996; 5: 213-26
<b>113</b>	Zandstra PW, Conneally E, Petzer AL, Piret JM, Eaves CJ. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self- renewal. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1997; 94: 4698-703
<b>114</b>	Bernstein A, Motro B. Stem Cell Factor (SCF). <i>Guidebook to the Cytokines and their Receptors</i> . Hrsg. Nicola NA. Oxford University Press 1994
<b>115</b>	Schrader JW. Interleukin 3 (IL-3). <i>Guidebook to the Cytokines and their Receptors</i> . Hrsg. Nicola NA. Oxford University Press 1994
<b>116</b>	Ballaun C. flt3 Ligand. <i>Cytokines</i> . Hrsg. Mire-Sluis A, Thorpe R. Academic Press, London 1998
<b>117</b>	Ducy P, Kasentry G. The family of BMPs. <i>Kidney International</i> 2000; 57: 2207-14
<b>118</b>	Massague J. TGF- $\beta$ Signaling: Receptors, transducers and Mad Proteins. <i>Cell</i> 1996; 85: 947-50
<b>119</b>	Snyder A, Fraser ST, Baron MH. BMPs in vertebrate hematopoietic development. <i>J Cell Biochem</i> 2004; 93: 224-232
<b>120</b>	Ten Dijke P et al. Identification of type I recptor for OP-1 and BMP-4. <i>J Biol Chem</i> 1994; 269: 16985-8
<b>121</b>	Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling ME, Karanu FE, Bhatia M. Shh induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. <i>Nat Immunol</i> 2001; 2: 172-80

122	Utsugisawa T, Moddy JL, Aspling M, Nillsson E, Carlsson L, Karlsson F. A Road Map Toward Defining the Role of Smad Signaling in Hematopoietic Stem Cells. <i>Stem Cells</i> 2006; 24: 1128–1136
123	Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion <i>in vitro</i> of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic– <i>scid/scid</i> mice. <i>Proc Natl Acad Sci</i> 1997;94, 9836–41
124	Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive (CD 34+ CD 38-) human hematopoietic cells: novel responses to flt3-ligand and thrombopoietin. <i>J Exp Med</i> 1996; 183: 2551-58
125	Nishioka K, Fujimori Y, Hashimoto-Tamaoki T, Kai S, Qui H, Kobayashi N, Tanaka N, Westerman KA, Leboulch P, Hara H. Immortalization of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells by removable simian virus 40T antigen gene: Analysis of the ability to support expansion of cord blood hematopoietic progenitor cells. <i>International Journal of Oncology</i> 2003; 23: 925-932
126	Davies JA, Fisher CE. Genes and proteins in renal development. <i>Exp. Nephrol.</i> 2002: 10:102-13
127	Santa Barbara P, Williams J, Goldstein AM, Doyle AM et al. BMP signalling pathway plays multiple roles during gastrointestinal development. <i>Dev Dynamics</i> 2005;234: 312-22
128	Grassinger J, Simon M, Mueller G, Drewel D, Andreesen R, Hennemann B. BMP-7 but not BMP-2 and BMP-4 improves maintenance of primitive peripheral blood derived hematopoietic progenitor cells (HPC) cultured in serum-free medium supplemented with early acting cytokines. <i>Cytokine</i> 2007; 40(3):165-71

## 10. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinen Doktorvater, **Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Hennemann**, nennen und ihm für die Überlassung der Fragestellung danken. Die Zusammenarbeit war stets kollegial und konstruktiv. Besonders hervorheben möchte ich die sehr gute Betreuung und partnerschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Während der praktischen Durchführung der Versuche haben sich **Frau Dr. rer. nat. Diana Drewel** und **Herr Gunnar Müller** als verlässliche Helfer und kompetente Ansprechpartner bewährt. Für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei allen Problemen und Problemchen möchte ich ihnen herzlich danken.

Weiterhin gilt mein Dank:

**Herrn Dr. med. Jochen Grassinger**, der mir freundlicherweise für Fragen zur Verfügung stand.

**Herrn Prof. Dr. med. Holler** und **Herrn PD Dr. med. Hahn**, die mir freundlicherweise das Zellmaterial für meine Versuche zur Verfügung stellten.

**Herrn PD Dr. rer. nat. Brockhoff** und Mitarbeitern für die Einweisung in den Zytometer sowie für die Möglichkeit, diesen zu nutzen.

**Herrn Prof. Dr. med. Andreesen**, in dessen Abteilung ich meine wissenschaftliche Arbeit durchführen durfte.

Schließlich bedanke ich mich bei **Herrn Markus Rohn**, für die moralische Unterstützung und die Bereitschaft, sich auf ein ihm fremdes Thema einzulassen.

Bei meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht hat, bedanke ich mich ganz herzlich. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## 11. Lebenslauf

1999	Allgemeine Hochschulreife
1999	Humanmedizin an der Universität Rostock
ab 2000	Humanmedizin an der Universität Regensburg
2007	Ärztliche Prüfung, Approbation durch die Regierung von Oberbayern
2007 bis 2008	Ärztin in Weiterbildung an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin 1, Universität Regensburg
seit 2009	Ärztin in Weiterbildung am Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg

### Posterpräsentationen

“Effect of BMP-2 alone and in Combination with BMP-4 and BMP-7 on the Proliferation and Differentiation of human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells”  
Cellular Therapy, 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products, Regensburg 2005

“Influence of BMP-2, BMP-4 and BMP-7 on the Proliferation, Self-Renewal and Differentiation Capacity of CD34+ Peripheral Blood derived Progenitor Cells”  
nominiert für den Posterpreis der Europäischen Akademie für Wissenschaft und Kunst auf dem 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, München 2005

### Publikationen

Bone morphogenetic protein (BMP)-7 but not BMP-2 and BMP-4 improves maintenance of primitive peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells (HPC) cultured in serum-free medium supplemented with early acting cytokines.

Grassinger J, **Simon M**, Mueller G, Drewel D, Andreesen R, Hennemann B.  
Cytokine. 2007 Dec;40(3):165-71. Epub 2007 Oct 29.

True gastric diverticulum: a case report. **Simon M**, Zuber-Jerger I, Schölmerich J.  
Eingereicht bei Digestive and Liver Disease im Mai 2008

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen entnommenen Gedanken und Ergebnisse sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher noch keinen anderen Prüfungsbehörden vorgelegt.

Regensburg, den 16.06.2009