

Technische Universität München

Deutsches Herzzentrum, München und
1. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar,
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Der Einfluss des Integrin-Co-Aktivators Kindlin-3 auf das Homing hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen in das murine Knochen- mark

Sarah Longhi

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. St. Massberg

2. Univ.- Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 18.06.2014 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.05.2015 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Die hämatopoetische Stammzelle	1
1.1.1 Historisches und Definition	1
1.1.2 Ein Überblick über die Entwicklung der Hämatopoese der Maus ..	2
1.1.3 Charakterisierung der murinen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle	2
1.1.4 Die hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle im Knochenmark	4
1.1.5 Zirkulation im Organismus und Homing der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle	4
1.2. Integrine	6
1.2.1 Grundlagen – Struktur	6
1.2.2 Grundlagen – Funktion	7
1.2.3 Die Bedeutung der Integrine für hämatopoetische Stammzellen	7
1.2.4 Die Aktivierung von Integrinen	9
1.3. Kindline	10
1.3.1 Charakterisierung der Molekülfamilie	10
1.3.2 Kindlin-1 und Kindlin-2: ein Überblick	11
1.3.3 Kindlin-3: Integrin-Aktivierung in hämatopoetischen Zellen	12
1.4 Fragestellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Geräte, Chemikalien und verwendete Mauslinien	15
2.1.1 Geräte	15
2.1.2 Chemikalien.....	15
2.1.3 Puffer und Lösungen	16
2.1.4 Narkose und Operation.....	16
2.1.5 Antikörper	17
2.1.6 Sonstige fluoreszenzmarkierte Stoffe	18
2.1.7 Mausstämme und Chimären	18
2.2. Zellulär-immunologische Methoden	19
2.2.1 Zellkultur	19

2.2.2	Bestimmung des Gehalts an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mittels Durchflusszytometrie	20
2.2.3	Isolation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark mittels Durchflusszytometrie.....	21
2.2.4	Färbung der sortierten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mit fluoreszierenden Farbstoffen zur Visualisierung im Zwei-Photonen-Mikroskop	22
2.3.	Darstellung des Homing- und des interstitiellen Verhaltens hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie	22
2.3.1	Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie.....	22
2.3.2	Operation der Empfängertiere	24
2.3.3	Digitale Bildbearbeitung.....	29
2.4.	Statistische Auswertung	29
3.	Ergebnisse	30
3.1.	Bestimmung des Gehalts an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in drei verschiedenen Kompartimenten mittels <i>Colony Forming Unit-Assays</i> 30	
3.1.1	Bestimmung der Zellzahl im Knochenmark.....	30
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl in der Milz	31
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl im Blut.....	33
3.2.	Bestimmung des Gehalts an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in drei verschiedenen Kompartimenten mittels Durchflusszytometrie	34
3.2.1	Bestimmung der Zellzahl im Knochenmark.....	34
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl in der Milz	37
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl im Blut.....	40
3.3.	Vergleich der im Zuge der CFU-Assays und der Durchflusszytometrie ermittelten Gesamtzellzahlen innerhalb der drei Kompartimente	42
3.4.	Visualisierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im murinen Knochenmark mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie	44
3.4.1	Untersuchung 18h nach Injektion.....	44
3.4.2	Untersuchung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen 0-6h nach Injektion.....	47
4.	Diskussion.....	50
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	50

4.1.1 Bestimmung des Anteils an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in den drei Kompartimenten Knochenmark, Milz und Blut mittels Colony Forming Unit-Assays.....	50
4.1.2 Bestimmung der Anteils an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in den drei Kompartimenten Knochenmark, Milz und Blut mittels Durchflusszytometrie	50
4.1.3 Untersuchung des Verhaltens der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in murinen Knochenmarksgefäßen in vivo mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie 18h nach Injektion.....	50
4.1.4 Untersuchung des Verhaltens der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in murinen Knochenmarksgefäßen in vivo mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie 0-6h nach Injektion.....	51
4.2. Methodendiskussion.....	51
4.2.1 Bestimmung des Gehalts an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in verschiedenen Kompartimenten mittels CFU-Assay und Durchflusszytometrie.....	51
4.2.2 Visualisierung des murinen Knochenmarks und injizierter hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Zwei-Photonen-Mikroskop	53
4.2.3 Intravenöse und intraarterielle Injektion der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	54
4.3. Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur	55
4.3.1 Anteil an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in den CFU-Assays und der Durchflusszytometrie	55
4.3.2 Visualisierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen <i>in vivo</i> im Zwei-Photonen-Mikroskop 18h und 0-6h nach Injektion	56
4.4. Ausblick.....	58
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis.....	62
7. Abbildungsverzeichnis.....	69
8. Danksagung	71

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGM	Aorto-gonadaler Mesonephros
APC	Allophycocyanin
BrdU	Bromdesoxyuridin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
c-kit	Tyrosinkinase KIT (Stammzelleffektor-Rezeptor)
CMTMR	[5-(6-(((4-Chloromethyl)Benzoyl)Amino)Tetramethylrodamin)]
CXCL	CXC-Motiv-Ligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothyocyanat
Fik-2	<i>Fetal Liver Kinase-2</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Gy	<i>Gray</i>
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
Ig	Immunglobulin
kin3 ^{-/-}	Kindlin3-Knockout-Chimäre
kin3 ^{+/+}	Wildtyp-Chimäre
LAD	<i>Leukocyte Adhesion Deficiency</i>

LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i>
lin	<i>Lineage</i>
LSK	<i>Lineage negativ, Sca-1 positiv, c-kit positiv</i>
LT-HSPC	<i>Long Term-hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen</i>
OP	<i>Operation</i>
PB	<i>Pacific Blue</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP/Cy5.5	<i>Peridinin-chlorophyll Protein</i>
PI	<i>Propidium-Iodid</i>
RPMI-Medium	<i>Roswell-Park Memorial Institute – Medium</i>
Sca-1	<i>Stem Cell Antigen 1</i>
SDF-1 α	<i>Stromal Derived Factor 1α</i>
siRNA	<i>Small interfering Ribonucleic Acid</i>
SLAMF1	<i>Signaling lymphocytic activation molecule 1</i>
TLR	<i>Toll-Like-Receptor</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

1. Einleitung

1.1 Die hämatopoetische Stammzelle

1.1.1 Historisches und Definition

Die Bildung der zellulären Bestandteile des Blutes, folglich der Blutplättchen (Thrombozyten), der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) sowie der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) wird in ihrer Gesamtheit als Hämatopoese bezeichnet.

Alexander Maximow stellte 1924 erstmals die These auf, dass alle Zellen des Blutes von einer gemeinsamen Vorläuferzelle, einer hämatopoetischen Stammzelle abstammen könnten (Maximow, 1924). In den folgenden Jahrzehnten konnte diese These durch Tierexperimente bestätigt werden.

Lorenz et al. zeigten 1951, dass letal bestrahlte Mäuse durch die Injektion von Knochenmark gerettet werden können (Lorenz et al., 1951). Wagers et al. konnten 2002 beweisen, dass eine einzige, dem Knochenmark entnommene hämatopoetische Stammzelle ausreicht, um in einer letal bestrahlten Maus das gesamte hämatopoetische System zu erneuern und somit diese Zelle Ausgangspunkt für die Bildung der Thrombozyten (Thrombozytopoese), der Erythrozyten (Erythropoese) und der Leukozyten (Leukopoese) ist (Wagers, 2002). Dadurch wurde bestätigt, dass eine hämatopoetische Stammzelle zur Selbsterneuerung, zur Differenzierung in alle Zelllinien sowie zur Repopulierung des Knochenmarks fähig ist.

Die hämatopoetische Stammzelle ist jedoch im Gegensatz zu einer omnipotenten Zelle, beispielsweise der befruchteten Eizelle (Zygote), nicht in der Lage, sich in eine beliebige Zelle embryonalen oder extraembryonalen Ursprungs zu entwickeln. Auch gehört sie nicht zu den sogenannten pluripotenten Stammzellen, die sich zu Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Entoderm) differenzieren können (Mitalipov and Wolf, 2009). Definitionsgemäß gehören die hämatopoetischen Stammzellen zu den multipotenten Zellen, aus welchen zwar noch die unterschiedlichen Zellreihen des Blutes, nicht jedoch Zellen anderer Organe hervorgehen können.

Die Unterscheidung zur hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle (HSPC), der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Population, erfolgt über bestimmte Oberflächenmarker (siehe 1.1.3) (Spangrude et al., 1988) und scheint - trotz ausführlicher Untersuchung - noch nicht abschließend geklärt (Schroeder, 2010).

1.1.2 Ein Überblick über die Entwicklung der Hämatopoese der Maus

Die genaue Entwicklung der murinen Hämatopoese, also der Hämatopoese der Maus, ist nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass sich bereits im Dottersack, außerhalb des Embryos, multipotente Progenitorzellen befinden, die in entsprechenden Assays zur Koloniebildung fähig sind. Diese sind jedoch in einer letal bestrahlten Maus nicht durch Transplantation ins Knochenmark zu überführen, sofern sie vor Beginn der Blutzirkulation an Tag 8.25 der Embryonalperiode (E8.25) entnommen wurden (Moore and Metcalf, 1970, McGrath et al., 2003, Ueno and Weissman, 2010). Aus diesen Zellen scheinen erste, primitive rote Blutkörperchen, die Erythrozyten, hervor zu gehen, die während der Fetalperiode verschwinden. Innerhalb des Embryos zeigen sich die ersten, hämatopoetischen Zellen im Bereich der paraaortalen Splanchnopleura um E8.5 (Cumano et al., 2001). Multipotente Progenitorzellen werden wohl erstmals um E10.5 in der Aorto-gonadalen-Mesonephros-Region (AGM) gebildet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen transplantierbar sind (Medvinsky and Dzierzak, 1996). Ob die Zellen der AGM-Region einen anderen Ursprung als diejenigen des Dottersacks haben oder ob es sich um deren gereifte Form handelt, konnte noch nicht abschließend geklärt werden (Ueno and Weissman, 2010).

Bekannt ist jedoch, dass die hämatopoetischen Vorläuferzellen im Verlauf der Embryonalentwicklung zunächst in die fötale Leber und später, ungefähr zum Zeitpunkt der Geburt, in das Knochenmark wandern, wo sie für den Rest des adulten Lebens verbleiben und für die Aufrechterhaltung der Hämatopoese verantwortlich sind (Johnson and Moore, 1975, Clapp et al., 1995). In der neugeborenen Maus ist wohl auch die Milz Ort hämatopoetischer Aktivität, welche sich jedoch im Verlauf auf reine Erythropoese reduziert (Wolber et al., 2002).

1.1.3 Charakterisierung der murinen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle

Sowohl die humane als auch die murine HSPC ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein bzw. das Fehlen bestimmter Oberflächenmoleküle auf der Außenseite der Zellmembran, im Folgenden als Oberflächenmarker bezeichnet. Reife Blutzellen, z.B. Leukozyten, tragen ganz bestimmte Oberflächenmarker, sogenannte Lineage-Marker, die sie beispielsweise von Erythrozyten unterscheiden. Lineage-Marker für murine Zellen sind, unter anderen, CD45 für B-Zellen, CD71 für Zellen der erythroiden Reihe oder

CD13 und CD33 für Granulozyten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Population von Knochenmarkszellen existiert, die noch keine Oberflächenmarker exprimiert, welche bereits auf eine Differenzierung in eine bestimmte Zelllinie hindeuten würden. Daher wird diese Zellpopulation als *lineage*-negativ (lin-) bezeichnet. Unter diesen Zellen finden sich vermehrt solche, die als Progenitorzellen zu bezeichnen sind (Spangrude et al., 1988).

Zwei ebenfalls von Spangrude et al. zur Selektion von Progenitorzellen verwendete Oberflächenmarker sind Thy-1/CD90 und Sca-1. Irving Weissman und Kollegen aus Stanford zeigten, dass HSPC durch das Fehlen von lin- Markern, eine niedrige Expression von Thy-1 und das Vorhandensein von Sca-1 charakterisiert sind und mit großer Wahrscheinlichkeit die einzigen multipotenten Stammzellen darstellen. Schritte zur weiteren Aufreinigung dieser Zellen waren jedoch unumgänglich. In ihrem Übersichtsartikel zur Biologie der HSPC von 1995 geben Weissman et al. eine Zusammenfassung relevanter Marker zur Isolation muriner HSPC und ergänzten das Oberflächenmolekül c-kit (CD117), eine Rezeptor-Tyrosinkinase, als positiven Marker für die multipotenten Progenitorzellen (siehe Tabelle 1) (Morrison et al., 1995). Da Thy-1 nur in einer ganz bestimmten Mauslinie (C57BL/Ka-Thy1.1.) existiert, hat c-kit diesen Oberflächenmarker zur Zellisolierung weitgehend abgelöst (Morrison and Weissman, 1994).

Oberflächenmarker	Primärer Expressionsort	Multipotente Progenitorzellen
Thy-1	T-Zellen	niedrig
Sca-1	T-Zellen	hoch
c-kit	Progenitorzellen	positiv
Mac-1	Granulozyten, Monozyten	negativ bis niedrig
CD4	T-Zellen	negativ bis niedrig
CD3	T-Zellen	negativ
CD5	T-Zellen, B1a B-Zellen	negativ
CD8	T-Zellen	negativ
B220	B-Zellen	negativ
Gr-1	Granulozyten	negativ
Ter119	Erythroide Progenitorzellen	negativ
CD34	Progenitorzellen	positiv
WGA	Zellen, die Reste von Sialsäure exprimieren	hoch
H2-K	Alle hämatopoetischen Zellen	hoch
Ly5	Großteil der hämatopoetischen Zellen	positiv

Tabelle 1: Übersicht Oberflächenmarker

Übersicht über die von Weissman et al. zur Charakterisierung hämatopoetischer Vorläuferzellen postulierten Oberflächenmarker. (Morrison et al., 1995).

Innerhalb der so definierten Population (lin-, Sca-1+, c-kit+) kann weiter unterschieden werden zwischen sogenannten *Long-term-HSPC*, aus denen lebenslang alle Zellreihen der Hämatopoese hervorgehen können, und *Short-term-HSPC*, deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung eingeschränkt ist und die nur 8-12 Wochen lang die Bildung lympho-

ider und erythroider Zellen gewährleisten können. Ein Marker, der sich typischerweise auf LT-HSPC findet, ist SLAMF1 (CD150), wohingegen Flk-2 (CD135) (Christensen, 2001), CD48 und CD244 fehlen (Kiel et al., 2005). Charakteristisch für die Unterscheidung zwischen LT- und ST-HSPC ist vor allem die Expression von CD34, ein Marker der sich erst auf ST-HSPC findet (Osawa et al., 1996).

1.1.4 Die hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle im Knochenmark

Wie Adams und Scadden in ihrem Übersichtsartikel von 2006 zusammenfassen, geht die HSPC ihren zahlreichen Aufgaben hauptsächlich im Knochenmark nach, und bedarf dort spezieller Umweltbedingungen – sogenannter Nischen – um diese optimal erfüllen zu können (Adams and Scadden, 2006). Die Nischenzellen unterstützen durch Membran-gebundene sowie sezernierte Faktoren das Überleben und die Selbsterneuerung der HSPC und regulieren Wanderung, Differenzierung in die unterschiedlichen hämatopoetischen Zelllinien oder den Übergang in ein ruhendes Stadium (Schofield, 1978). Sowohl Zellen, die sich an der Innenschicht des Knochens (Endost) als auch Zellen, die sich an der Außenseite der Gefäßwände befinden (perivaskulär), scheinen hier einen Beitrag zu leisten, da sich HSPC vor allem in ihrer Umgebung aufhalten (Gong, 1978, Kiel et al., 2005).

1.1.5 Zirkulation im Organismus und Homing der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle

HSPC finden sich nicht ausschließlich im Knochenmark, vielmehr ist bereits seit 1962 bekannt, dass auch das Blut einen rezirkulierenden Besatz hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen enthält (Goodman and Hodgson, 1962, Wright et al., 2001). Auch in anderen Organen, wie beispielsweise der Leber (Cardier and Barbera-Guillem, 1997) und der Milz (Wright et al., 2001) können HSPC nachgewiesen werden. Die genauen Wege dieser Zellen sowie der physiologische Sinn dieser Zirkulation durch unterschiedliche Kompartimente des Körpers waren lange Zeit unklar. 2007 konnten Massberg et al. erstmals zeigen, dass auch die Lymphwege einen relativ konstanten Anteil an HSPC enthalten. Es wurde ein Modell für die Reise dieser aus dem Knochenmark stammenden Zellen durch den Körper aufgestellt (Massberg et al., 2007).

Dieses Modell wurde 2009 von Massberg et al. noch weiter ergänzt und soll im Folgenden dargestellt werden (Massberg and Von Andrian, 2009).

HSPC verlassen das Knochenmark über den Blutkreislauf, wandern in nicht-lymphatisches, extramedulläres Gewebe, wie beispielsweise die Leber, und gelangen nach ca. zweitägigem Aufenthalt in letzterem über die Lymphe wieder in das Blut und damit letztlich auch zurück an ihren Ursprungsort. Diese Rückkehr ins Knochenmark wird auch als *Homing* bezeichnet. Während die Zirkulation zwischen Blut und Knochenmark wahrscheinlich der gleichmäßigen Besetzung aller Nischen dient (Wright et al., 2001), zeigten Massberg et al., dass HSPC in extramedullären Organen auch zur Bildung von Abwehrzellen vor Ort fähig sind und somit zur Immunabwehr in diesen Geweben beitragen (Massberg et al., 2007). HSPC tragen sogenannte Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf Ihrer Oberfläche. Diese Rezeptoren, die für das angeborene Immunsystem eine bedeutende Rolle spielen, erkennen spezifische Komponenten auf potenziell pathogenen Organismen (Antigene) und lösen dadurch nicht nur eine Entzündungsreaktion aus, sondern bewirken auch eine zusätzliche, Antigen-spezifische Aktivierung des erworbenen Immunsystems (Hashimoto et al., 1988, Takeda et al., 2003). Die Bindung bakterieller Moleküle an TLR von HSPC im Knochenmark führen zu deren verstärkter Selbsterneuerung sowie zur Differenzierung in Zellen der myeloiden Reihe (Nagai et al., 2006).

Im peripheren Gewebe können HSPC ebenfalls Gefahr durch mögliche Infektionen erkennen, dementsprechend reagieren und durch Proliferation den Bestand der im jeweiligen Gewebe ansässigen Zellen des Immunsystems gewährleisten bzw. erhöhen. Die zirkulierenden HSPC scheinen demnach eine Art Wächter-Funktion zu übernehmen und gleichsam durch den Körper zu patrouillieren, um im Falle einer Verletzung oder einer Entzündung für ausreichend Nachschub an Immunzellen vor Ort zu sorgen. Auch unter nicht entzündlichen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass HSPC im peripheren Gewebe zu Zellen der myeloiden Linie differenzieren. Folglich ist ihre Migration auch für die Erhaltung des peripheren Status Quo unerlässlich (siehe Abb.1) (Massberg and Von Andrian, 2009, Mazo et al., 2011)

Um diesen Weg zu bewältigen, verfügen HSPC über eine Fülle von Molekülen, wie beispielsweise Integrine (Wright et al., 2002), auf deren Bedeutung im nächsten Kapitel eingegangen wird.

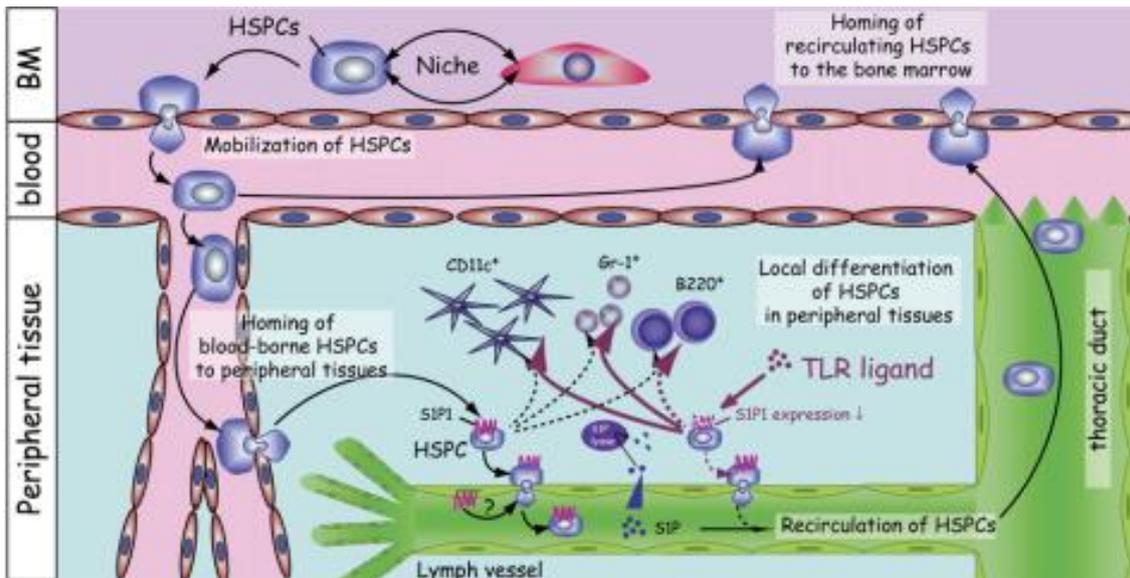


Abb.1: Der Weg der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle durch die unterschiedlichen Kompartimente

Dargestellt ist der Austritt der HSPC aus dem Knochenmark ins Blut (links oben) und konsekutiv in peripheres Gewebe. Hier erfolgt lokal und in Abhängigkeit von Faktoren wie S1-P und TLR-Liganden die Differenzierung in verschiedene Zelltypen, z.B. B-Zellen (Bildmitte). Ein Teil der HSPC kehrt über die Lymph- und Blutgefäße ins Knochenmark zurück (rechts oben) – ein Prozess, der als Homing bezeichnet wird (Massberg et al., 2007).

1.2. Integrine

1.2.1 Grundlagen – Struktur

Integrine gelten als die wichtigsten Rezeptormoleküle auf den Zellen eukaryotischer Organismen. Sie vermitteln Kontakte zwischen Zellen und nicht-zellulären Bestandteilen (extrazelluläre Matrix), sowie auch Kontakte unter den Zellen selbst. Integrine haben über die Zellmembran hinweg Kontakt zum Zytoskelett und können damit zur Aktivierung zahlreicher Signalwege in der Zelle (intrazellulär) beitragen. Hynes beschrieb die Familie der Integrine erstmalig 1987 (Hynes, 1987) und fasst in seinem Übersichtsartikel von 2002 den bisherigen Kenntnisstand in Bezug auf diese multifunktionalen Moleküle zusammen (Hynes, 2002).

Bei Integrinen handelt es sich um sogenannte heterodimere Transmembranproteine, die jeweils aus einer sogenannten α - und einer β -Kette bestehen, welche wiederum jeweils eine extra- und eine intrazelluläre Domäne aufweisen. Die α -Kette legt die Lig-

andenspezifität des Integrins fest, während die β -Kette vor allem für die Vorgänge innerhalb der Zelle verantwortlich zu sein scheint (Barczyk et al., 2010).

Säugetiere haben acht unterschiedliche β - Ketten und 18 α -Ketten zur Verfügung, um die bisher bekannten 24 verschiedenen Integrine zu bilden. Jedes dieser Integrine scheint eine besondere Funktion zu erfüllen, da Mäuse, in denen das entsprechende Integrin durch eine genetische Veränderung nicht mehr hergestellt werden kann (Knockout), jeweils einen charakteristischen Defekt zeigen. Bei fehlendem $\beta 2$ Integrin beispielsweise kommt es zu einer massiv kompromittierten Leukozytenfunktion mit Leukozytose und eingeschränkter Immunantwort (Scharffetter-Kochanek et al., 1998).

1.2.2 Grundlagen – Funktion

Zweierlei Mechanismen der Signalvermittlung durch Integrine gelten als gesichert, das sogenannte ‚*outside-in-signaling*‘ und das ‚*inside-out-signaling*‘ (Hynes, 1992). Unter *outside-in-signaling* versteht man die auf ein Signal von außen folgende Konformationsänderung des Moleküls, welches dann eine Reaktion innerhalb der Zelle nach sich zieht. Das Signal stellt ein Bindungsmolekül dar (Ligand), das in diesem Fall an das Integrin bindet. Ein mögliches Beispiel wäre die Bindung des Liganden Fibrinogen an das auf Thrombozyten vorhandene Integrin $\alpha IIb\beta 3$, welche intrazellulär diverse Reaktionen auslöst, die für die Blutgerinnung wichtig sind (Shattil and Brugge, 1991).

Inside-out-signaling beschreibt hingegen einen umgekehrten Prozess, nämlich die Vermittlung von Information aus dem Inneren der Zelle nach außerhalb. Entscheidend ist in diesem Zusammenhang die Aktivierung der Integrine, auf welche unter Punkt 1.2.4 noch ausführlich eingegangen wird.

1.2.3 Die Bedeutung der Integrine für hämatopoetische Stammzellen

Wie bereits erwähnt, bedürfen die HSPC auf ihrem Weg durch die verschiedenen Kompartimente – Knochenmark, Blut und extramedulläres, nicht-lymphatisches Gewebe – der Hilfe unterschiedlicher Moleküle. Von großer Bedeutung ist vor allem die Fähigkeit, am Gefäßendothel anzuhafte, sei es beim Eintritt in periphere Gewebe, wie z.B. die Leber, sei es bei der Rückkehr – dem sogenannten Homing – ins Knochenmark (Wright et al., 2002, Massberg and Von Andrian, 2009).

Eines der an diesen Mechanismen beteiligten Moleküle ist das Integrin $\alpha_4\beta_1$, auch bekannt als VLA-4 (very late antigen 4), das sowohl für die Stammzellmobilisierung als auch den Homingvorgang von großer Bedeutung zu sein scheint. Der entsprechende Ligand ist VCAM-1 (vascular cell adhesion protein 1), der vom Gefäßendothel exprimiert wird (Papayannopoulou and Nakamoto, 1993, Papayannopoulou et al., 1995). Mazo und Kollegen gelang es 1998 durch Intravitalmikroskopie zu beweisen, dass neben anderen Adhäsionsmolekülen (P- und E-Selektine), auch die Verbindung VLA-4/VCAM-1 am sogenannten Rollen der HSPC auf dem Endothel von Knochenmarksgefäßen beteiligt ist und Integrine hier demnach eine wichtige Rolle im Homing-Prozess spielen. Diese Art der Aufgabenteilung zwischen Integrinen und Selektinen scheint darüber hinaus knochenmarksspezifisch zu sein (Schulz et al., 2010, Mazo et al., 1998). Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung von VLA-4 liefert die Tatsache, dass eine Unterbrechung der Verbindung VLA-4/VCAM-1 durch BIO5192, ein *small molecule inhibitor*, zu einer um den Faktor 30 erhöhten Mobilisierung von HSPC führt (Ramirez et al., 2009).

Vanderslice und Kollegen gelang zudem jüngst die Synthese eines *small molecule agonist* an VLA-4, THI0019, der *in vitro* zu einer verstärkten Bindung von Progenitorzellen an VCAM-1 führte und somit in Zukunft ein verbessertes Einnisten von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (*Engraftment*) nach Stammzelltransplantation ermöglichen könnte (Vanderslice et al., 2013).

Auch das Phänomen der Chemotaxis scheint beim Weg der HSPC durch den Körper eine Rolle zu spielen. Chemotaxis beschreibt einen Prozess, bei welchem Zellen durch Botenstoffe bzw. Signalmoleküle angelockt werden – diese Stoffe werden dementsprechend auch als Chemokin bezeichnet. Für humane HSPC konnte gezeigt werden, dass SDF-1 α (stromal cell derived factor 1 α), ein Chemokin, das an den auf HSPC exprimierten Chemokin-Rezeptor CXCR4 bindet, zu einer Aktivierung von VLA-4 und somit zu einer höheren Affinität zum Gefäßendothel führt. Ebenfalls durch SDF-1 α aktiviert wird wohl auch das Integrin $\alpha L\beta 2$, besser bekannt als LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1), dessen Ligand ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) sich unter anderem auch an der Oberfläche von Gefäßendothelien findet (Peled et al., 2000). Wright et al. konnten 2002 vergleichbare Ergebnisse für murine HSPC nachweisen (Wright et al., 2002).

Außerdem zeigte sich, dass der funktionelle CXCR4-Antagonist ATI-2341 zu einer verbesserten Mobilisierung von HSPC führte (Tchernychev et al., 2010).

In jüngster Vergangenheit konnten weitere Faktoren, wie beispielsweise Sphingosin-1-Phosphat (S1-P), identifiziert werden (Ratajczak et al., 2012).

Eine Arbeit vom Mai 2011 konnte weiterhin zeigen, dass die Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges, also eines Signalweges, der über eine Interaktion zwischen Stickstoffmonoxid und cyclischem Guanosinmonophosphat funktioniert, in Stammzellen zu einer Konformationsänderung im Sinne einer Deaktivierung von VLA-4 führt und damit zur Lösung einer zuvor eingegangenen Bindung zu VCAM-1 (Chigaev et al., 2011).

Aus den bisher gewonnenen Erkenntnissen lässt sich folglich schließen, dass Integrine – wahrscheinlich insbesondere VLA-4 – für den nach wie vor nur in Ansätzen verstandenen Weg der hämatopoetischen Stammzellen durch das Gefäßendothel ins Knochenmark eine wichtige Rolle spielen.

1.2.4 Die Aktivierung von Integrinen

Wie bereits mehrfach angedeutet, liegen Integrine nicht dauerhaft in aktivierter, also bindungsfähiger Form vor, sondern können vielmehr durch Signale aus dem Inneren der Zelle – *Inside-Out* – ihre Konformation ändern. Die Möglichkeit eines inaktiven Zustands („OFF-State“) ist aus biologischer Sicht essentiell: wären beispielsweise die von Thrombozyten in großer Zahl exprimierte $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrine ständig aktiv, so käme es regelmäßig durch Bindung ihres Hauptliganden Fibrinogen zu thrombotischen Ereignissen im Gefäß (Hynes, 2002).

Zahlreiche Elemente beeinflussen den Zustand der Integrine, seien es die Art des Integrins, die extrazelluläre Matrix oder auch die komplexe Interaktion verschiedener G-Protein-Rezeptoren mit Wachstumsfaktoren (Baker and Zaman, 2010, Schwartz and Ginsberg, 2002). Ein Beispiel wäre die schon erwähnte Chemokin-getriggerte Aktivierung von VLA-4.

Die einzelnen Schritte, die dann letztendlich zu einem aktivierten Integrin an der Zelloberfläche führen, sind bereits teilweise bekannt. Entscheidend scheint ein intrazellulär vor allem an die β -Kette adhärierender Proteinkomplex zu sein, der aus mindestens 156 Proteinen besteht und auch als „Adhesom“ bezeichnet wird. Unter anderen finden sich hier Paxillin, Filamin, ILK (Integrin-linked Kinase), FAK (Focal adhesion Kinase) und Talin (Zaidel-Bar et al., 2007).

Talin ist ein Molekül, dessen Rolle im Prozess der Aktivierung bereits verhältnismäßig genau charakterisiert werden konnte. Dieses große, 2541 Aminosäuren lange Protein, enthält an seinem N-Terminus, dem Amino-Terminus, die sogenannte FERM-Domäne, benannt nach den vier Proteinen, in denen ihre Existenz erstmals nachgewiesen wurde (band Four-point one, Ezrin, Radixin und Moesin) (Chishti et al., 1998). Diese kann

wiederum in drei Unterdomänen unterteilt werden, F1, F2, und F3, wobei F3 direkt an die β -Kette des Integrins binden kann. Am C-Terminus, dem Carboxy-Terminus, erfolgt die Bindung von F-Aktin, folglich kann Talin eine direkte Verbindung zwischen der β -Kette des Integrins und dem Zytoskelett schaffen. Eine mögliche Hypothese zur Aktivierung ist, dass es durch die Anlagerung von Talin an den intrazellulären Teil der β -Kette zu einer Destabilisierung der Interaktionen zwischen der Transmembran- und der zytoplasmatischen Domäne des Integrins kommt. Außerdem scheint Talin eine veränderte Ausrichtung der Transmembrandomäne zu bedingen (Anthis et al., 2009).

Allerdings scheinen auch andere Moleküle eine entscheidende Rolle bei der Konformationsänderung von Integrinen hin zur vollständigen Aktivierung zu spielen. Der Familie der Kindline wird in letzter Zeit eine zunehmende Bedeutung bei diesem komplexen Prozess attestiert (Larjava et al., 2008, Meves et al., 2009, Lai-Cheong et al., 2010).

1.3. Kindline

1.3.1 Charakterisierung der Molekülfamilie

Die Entdeckung der Kindline 1994 durch Wick et al. erfolgte nicht im Kontext der Integrin-Aktivierung. Vielmehr war man auf der Suche nach Proteinen, die möglicherweise eine Progression der Zelle von der G0/1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase triggern könnten. Im Zuge dieser Versuche wurde ein Protein identifiziert, welches heute als Kindlin-2 bezeichnet wird (Wick et al., 1994, Siegel et al., 2003). Bereits 1954 beschrieb die Dermatologin Therese Kindler den Fall eines 14-jährigen Mädchens, das an durch mechanische Traumata induzierbarer Blasenbildung, progressiver Atrophie der Haut, sowie Poikilodermie (dt.: *bunte Haut*) litt. Die dieser nun als Kindler-Syndrom bekannten Erkrankung zugrunde liegende Mutation beeinträchtigt das Protein UNC-112, welches 2003 aufgrund der 62%igen Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit Kindlin-2 in Kindlin-1 umgetauft wurde (Kindler, 1954, Siegel et al., 2003). Ein weiteres Protein, das in seiner Aminosäuresequenz zu 49% mit Kindlin-1 übereinstimmt, wurde Kindlin-3 genannt (Siegel et al., 2003).

Die Tatsache, dass alle drei Kindline an den intrazellulären Anteil der β -Kette von Integrinen binden können, legt den Schluss nahe, dass auch diese Molekülfamilie zur Aktivierung der Integrine beitragen könnte. Möglich wird dies durch die zunächst bei

Kindlin-1 nachgewiesene FERM-Domäne, die jener von Talin sehr ähnlich ist und ebenfalls aus drei Untereinheiten besteht (Kloeker et al., 2004).

Es bestehen verschiedene Theorien darüber, wie diese beiden Proteine miteinander interagieren. Eine Möglichkeit wäre die aufeinander folgende Bindung von Talin und einem Kindlin an die gleiche β -Kette, um eine Konformationsänderung hin zu einer höheren Affinität zu extrazellulären Liganden herbeizuführen. Alternativ könnten die Proteine auch gleichzeitig an die β -Kette binden, um diesen Effekt hervorzurufen. Ebenfalls diskutiert wird die Bindung von Talin und Kindlin an jeweils unterschiedliche β -Ketten, die dann eine Art Cluster bilden würden (Moser et al., 2009b). Unabhängig von den genauen Mechanismen konnte jedoch mehrfach gezeigt werden, dass Kindline zur Aktivierung von Integrinen unerlässlich sind (Moser et al., 2008, Moser et al., 2009a, Montanez et al., 2008).

1.3.2 Kindlin-1 und Kindlin-2: ein Überblick

Kindlin-1 findet sich nach immunhistochemischer Färbung vor allem an der Grenze zwischen Dermis und Epidermis, nahe der Basalmembran, sowie in Epithelzellen des Verdauungstraktes. Es kann an β 1- und β 3- Ketten binden (Siegel et al., 2003, Kloeker et al., 2004, Ussar et al., 2008). Wie bereits erwähnt, können Mutationen im Gen, das für Kindin-1 codiert, dem Kindler-Syndrom zugrunde liegen. Diese Erkrankung zählt zu den erblichen Epidermolysis-bullosa-Störungen, die klinisch durch die damit einhergehenden Hautveränderungen diagnostiziert werden.

Mäuse, die genetisch so verändert wurden, dass sie Kindlin-1 nicht exprimieren (Kindlin1-Knock-Out), zeigen einen anderen Phänotyp. Sie fallen durch eine massive Entzündung im Darmtrakt auf, die an eine Colitis Ulcerosa erinnert, perinatal meist letal verläuft, und auf eine verminderte Anhaftung des Epithels an die Basalmembran zurückzuführen ist. Dieser geht wiederum eine mangelnde Aktivierung der entsprechenden Integrine voraus. Die Haut ist zwar atrophisch, Blasen können jedoch nicht nachgewiesen werden. Daraus lässt sich ableiten, dass mögliche Frühformen des Kindler-Syndroms primär durch intestinale Probleme imponieren und deshalb möglicherweise als chronisch entzündliche Darmerkrankung fehldiagnostiziert werden (Ussar et al., 2008).

Kindlin-2 hingegen wird im Körper nahezu ubiquitär exprimiert, die einzige Ausnahme bilden die Zellen der hämatopoetischen Reihe. Kindlin-2 findet sich des Weiteren als

einziges der drei Moleküle bereits in embryonalen Stammzellen. Wie Kindlin-1 bindet auch Kindlin-2 an β 1- und β 3-Ketten von Integrinen.

Es überrascht nicht, dass Mäuse, denen Kindlin-2 fehlt, bereits kurz nach der Implantation versterben, da die Integrinfunktion in Zellen des Entoderms und Epiblasts gestört ist. Dies führt zu massiven Adhäsionsdefekten, sowie einem mangelhaften Aufbau der Basalmembranen (Montanez et al., 2008).

Eine Genmutation, die beim Menschen zu einem Ausfall von Kindlin-2 führt, wäre wahrscheinlich ebenfalls schon in der Embryonalphase letal, demnach ist in diesem Fall keine assoziierte Erbkrankheit bekannt.

1.3.3 Kindlin-3: Integrin-Aktivierung in hämatopoetischen Zellen

Die ersten Erkenntnisse über die Bedeutung von Kindlin-3 bei der Aktivierung von Integrinen liefern Moser et al. in einer Arbeit, deren Fokus auf der Aggregation von Thrombozyten liegt (Moser et al., 2008). Hier konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten, denen Kindlin-3 fehlt, trotz normaler Expression von Talin nicht zur Aktivierung von Integrinen, z.B. α IIb β 3, und somit auch nicht zu regelhafter Funktion fähig sind.

Die In Vivo-Versuche wurden an Chimären durchgeführt, da Kindlin-3-Knockout-Mäuse bereits kurz nach der Geburt an schweren Blutungen versterben. Chimären sind definitionsgemäß Lebewesen, die Zellen mit unterschiedlichem genetischem Material enthalten, welche aus zwei befruchteten Eizellen stammen. Damit unterscheiden sich Chimären vom Mosaik, welches ebenfalls Zellen mit unterschiedlichem Genmaterial enthält, diese stammen jedoch von einer einzigen Eizelle ab. Für die Herstellung der Chimären werden HSPC aus den fötalen Lebern der Knockout-Mäuse entnommen und in letal bestrahlte Wildtypen transplantiert. Bei diesen Mäusen zeigt sich eine deutlich verlängerte Blutungszeit, wobei die Thrombozytenzahl an sich unauffällig ist. Moser et al. konnten aus ihren Versuchen schließen, dass Kindlin-3, neben Talin, für die Aktivierung von β 1- und β 3-Integrinen eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

Doch auch die für verschiedene Leukozytenfunktionen essentiellen β 2-Integrine arbeiten nicht unabhängig von Kindlin-3. So werden beispielsweise in der komplexen Adhäsionskaskade, die der Transmigration von Leukozyten in entzündete Gewebe vorausgeht, einzelne Schritte bei fehlender Kindlin-3-Expression deutlich beeinträchtigt. Während das sogenannte Rollen auf dem Gefäßendothel, ein früher Schritt, der hauptsächlich durch Selektine vermittelt wird, nicht gestört zu sein scheint, ist ein stabiles Anhaften auf aktiviertem Endothel für Leukozyten ohne Kindlin-3 kaum noch möglich.

Für diesen Schritt zeichnen vor allem die Verbindungen LFA-1/ICAM-1 sowie zu geringeren Anteilen VLA-4/VCAM-1 verantwortlich. Dass ein Ausschalten von Kindlin-3 diese Verbindungen erschwert bzw. unmöglich macht, beweist auch die herausragende Bedeutung dieses Moleküls für eine intakte Funktion des Immunsystems (Moser et al., 2009a, Malinin et al., 2009, Ley et al., 2007).

Dies zeigt sich umso deutlicher bei Patienten, deren Leukozyten ein Adhäsionsdefizit aufweisen und die an *Leukocyte adhesion deficiency-III (LAD III)* leiden. Diese autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung geht mit einer verstärkten Blutungsneigung, der Glanzmann-Thrombasthenie, die ihrerseits auf einem Defekt in den Genen GPIIb oder GPIIIa beruht, nicht unähnlich, sowie einer massiven Infektneigung einher (Etzioni and Alon, 2004). Genanalysen bei mehreren Patienten konnten nachweisen, dass Mutationen im Gen von Kindlin-3 dieser Erkrankung höchstwahrscheinlich ursächlich zu Grunde liegen. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Expression von Wildtyp-Kindlin-3 in Leukozyten, die zuvor nicht zu Adhäsion und Migration fähig waren, wieder zu einer normalen Funktion dieser Zellen von LADIII-Patienten führt (Svensson et al., 2009).

Um differenzieren zu können, welche Rolle Kindlin-3 genau bei den Funktionseinschränkungen von Leukozyten spielt, untersuchten Manevich-Mendelson et al. den Einfluss von Kindlin-3 auf LFA-1 und VLA-4 bei Lymphozyten. Interessanterweise zeigten sich hier insofern Unterschiede, als nach Stimulation durch Chemokine (*inside-out*) in Effektor-T-Zellen ohne Kindlin-3 jedwede durch LFA-1 vermittelte Adhäsion ausfiel, während ein erstes Andocken durch VLA-4 noch möglich war. Eine stabile Bindung durch VLA-4 kam nicht zustande. Unter kontinuierlichem Fluss, dem sogenannten *shear stress*, und ohne Chemokine konnte VLA-4 durch VCAM1 normal aktiviert werden, während LFA-1 kaum auf ICAM-1 reagierte (*outside-in*). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Kindlin-3 für die Aktivierung von LFA-1 eine größere Rolle spielt (Manevich-Mendelson et al., 2009).

Verhältnismäßig neu ist die Erkenntnis, dass Kindlin-3, anders als lange Zeit vermutet, nicht nur von Zellen der hämatopoetischen Reihe exprimiert wird, sondern auch von Endothelzellen. Allerdings konnten Versuche zeigen, dass ein Verlust von Kindlin-3 in diesen Zellen nicht zu Problemen bei der Adhäsion von Leukozyten führt (Bialkowska et al., 2010).

1.4 Fragestellung

Fasst man die bereits gewonnenen Erkenntnisse zu Kindlin-3 zusammen, so können drei Punkte als wahrscheinlich gelten: 1) wird Kindlin-3 in relevanter Form nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert, 2) wird sowohl die Funktion von Leukozyten als auch die von Thrombozyten bei Fehlen von Kindlin-3 massiv beeinträchtigt und somit kann, 3), geschlossen werden, dass Kindlin-3 als Integrin-Co-Aktivator, neben Talin und möglicherweise anderen Molekülen, unerlässlich ist.

Nun liegt der Gedanke nahe, hämatopoetische Stammzellen, aus denen sowohl Leukozyten als auch Thrombozyten hervorgehen, in Hinblick auf ihre Abhängigkeit von Kindlin-3 zu untersuchen. Gerade mit Bezug auf das Homing ins Knochenmark, ein Vorgang, bei welchem Integrine eine wichtige Rolle spielen, erscheint es sinnvoll, Mäuse zu untersuchen, deren HSPC kein Kindlin-3 exprimieren. Hierbei stellen sich folgende Fragen:

1. Zeigen sich Unterschiede in der Verteilung der HSPC auf die verschiedenen Kompartimente Knochenmark, Blut und Milz als extramedulläres Gewebe?
2. Ist der Prozess des Homings in das Knochenmark beeinträchtigt oder gar unmöglich?
3. Sofern sich Auffälligkeiten finden: Welcher Schritt der Adhäsionskaskade ist gestört – erstes Anheften, Rollen, Crawling, stabiler Arrest oder die Migration durchs Gefäßendothel?
4. Falls die Transmigration durch das Endothel möglich ist – finden sich Unterschiede bezüglich des Zellverhaltens im Knochenmarksinterstitium?

Um festzustellen, ob sich der Gehalt an HSPC in Knochenmark, Milz und Blut zwischen Kindlin-3-Knockout-Chimären und Wildtypen jeweils unterscheiden, wurden CFU-Assays angefertigt und der Gehalt an lin^- , Sca-1^+ , c-kit^+ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Um den Homingprozess als solchen zu visualisieren, wurden durch Zwei-Photonenmikroskopie, einer Form der Fluoreszenzmikroskopie, das Knochenmark sowie die Knochenmarksgefäße einer Maus sichtbar gemacht und entsprechend sortierte und markierte HSPC injiziert.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien und verwendete Mauslinien

2.1.1 Geräte

Cs-Bestrahlungsquelle	Fa. Buchler GmbH (Braunschweig, D)
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Durchlichtmikroskop Axiovert 100	Fa. Zeiss (Jena, D)
Eismaschine AF 100	Fa. Scotsman-Enodis(Bettolino, ML, ITA)
FACS Aria	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
FACSCyanADP	Fa. Beckman-Coulter (Krefeld, D)
Isofluranverdampfer	Fa. Völker (Kaltenkirchen, D)
Kamera AxioCam HRc	Fa. Zeiss (Jena, D)
Lamin Air Flow Herasafe	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Megafuge 1.OR	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Multifuge 1.L-R	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Neubauer Zählkammer	Fa. Marienfeld (Lauda-Königshofen, D)
OP-Lampe KL 200	Fa. Zeiss (Jena, D)
OP-Mikroskop Wild M3Z	Fa. Wild-Heerbrugg (Heerbrugg, CH)
Sterigard Hood	Fa. Baker Company (Maine, USA)
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 R	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Vortexer REAX 2000	Fa. Heidolph (Schwabach, D)
Waage LC 2200 P	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Wärmeschüttler Thermomixer Comfort	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Laser Neslar KMC 100	Fa. Spectra Physics (Santa Clara, USA)
Hydrauliktisch ST -UT2	Fa. Newport (Darmstadt, D)
2-Photonen-Mikroskop	Fa. LaVision Biotec (Bielefeld, D)
Mauspräparationsvorrichtung	Dipl.ing. Martin Humps

2.1.2 Chemikalien

Ammoniumchlorid	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. Pan Biotech (Aidenbach, D)
Kollagenase I/XI	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Methylcellulose medium with recombinant cytokines and EPO (MethoCult®)	Fa. StemCell Technologies(Grenoble,F)
Penicillin (5000 U), Streptomycin (5000µg/ml) (PenStrep ⁵)	Fa. Invitrogen (Darmstadt, D)
Phosphate-buffered Saline (PBS)	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI)	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Trypan Blue Solution 0,4 %	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Propidium Iodid	Fa. eBioscience (San Diego, USA)

2.1.3 Puffer und Lösungen

FACS-Puffer

2mM EDTA
2 Vol % FCS
pH 7,4
in PBS

Red Blood Cell Lysis Buffer

14 ml H₂O + 4ml Sol A + 1ml Sol B + 1 ml Sol C

Solution A (1000ml)

NH ₄ Cl 654 mM 35g	Fa. Merck (Darmstadt, D)
KCl 24,8 mM 1,85g	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Na ₂ HPO ₄ X 12H ₂ O 4,2 mM 1,5g	Fa. Merck (Darmstadt, D)
KH ₂ PO ₄ 88µM 0,12g	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Glucose 27,7 mM 5g	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Phenolred 0,05g	Fa. Roth (Karlsruhe, D)

Solution B (100ml)

MgCl ₂ X 6H ₂ O 20,7 mM 0,42g	Fa. Merck (Darmstadt, D)
MgSO ₄ X 7H ₂ O 5,68 mM 0,14g	Fa. Merck (Darmstadt, D)
CaCl ₂ 30,6 mM 0,34g	Fa. Merck (Darmstadt, D)

Solution C (100ml)

NaHCO ₃ 268 mM 2,25g	Fa. Merck (Darmstadt, D)
---------------------------------	--------------------------

2.1.4 Narkose und Operation

Fentanyl 0,5 mg	Fa. Janssen Cilag (Neuss, D)
Fibrinkleber Histoacryl	Fa. Braun (Melsungen, D)
Isofluran 100%	Fa. Abbott (Wiesbaden, D)
Katheter Propylene 0,28id/0,62od	Fa. Smith Medical Ltd.(St. Paul, USA)
Medetomidinhydrochlorid 1mg/ml	Fa. Fort Dodge (Würselen, D)
Midazolam 5mg/ml	Fa. Actavis (München, D)
NaCl 0,9%	Fa. Delta Select (München, D)
Nahtmaterial	Fa. Ethicon (Norderstedt, D)
OP-Besteck	Fa. Medicon (Tuttlingen, D)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg, D), Falcon (Heidelberg, D), und Greiner (Frickhausen, D) bezogen.

2.1.5 Antikörper

Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Für die Durchflusszytometrie (nicht fluoreszenzmarkiert-Primärantikörper = Lineage-Mix, Biotin-markiert)

Bezeichnung	Spezies	Klon	Herkunft
Anti CD5	Confidential	Confidential	Miltenyi Biotec
Anti B220	Confidential	Confidential	Miltenyi Biotec
Anti CD11b	Confidential	Confidential	Miltenyi Biotec
Anti GR1	Confidential	Confidential	Miltenyi Biotec
Anti Ter 119	Confidential	Confidential	Miltenyi Biotec
Anti 7-4	Confidential	Confidential	Miltenyi Biotec

Für die Durchflusszytometrie (fluoreszenzmarkiert-Primär- und Sekundärantikörper)

Bezeichnung	Klon	Fluorochrom	Herkunft
Anti Sca-1	D7	PerCP/Cy5.5	eBioscience
Anti c-kit/CD117	2B8	APC	eBioscience
Anti CD 34	RAM34	FITC	eBioscience
Anti Flk-2/CD135	A2F10	PE	eBioscience
Anti Biotin/Streptavidin	Sekundärer AK	PB	eBioscience

Für die Zellisolation mittels FACS (nicht fluoreszenzmarkiert-Primärantikörper = Lineage-Mix, Biotin-markiert)

Bezeichnung	Spezies	Klon	Herkunft
Anti CD3e	Hamster IgG1	145-2C11	Pharmingen
Anti Mac1	Ratte IgG2b,k	M1/70	Pharmingen
Anti Ter 119	Ratte IgG2b	Ter 119	Pharmingen
Anti GR1	Ratte IgG2b,k	RB6-8C5	Pharmingen
Anti CD8a	Ratte IgG2a	53-6.7	eBioscience
Anti B220	Ratte IgG2a	RA3-6B5	eBioscience
Anti CD4	Ratte IgG2a,k	GK 1.5	eBioscience
Anti NK1.1	Maus	PK 136	eBioscience

Für die Zellisolation mittels FACS (fluoreszenzmarkiert-Primär-/Sekundärantikörper)

Bezeichnung	Klon	Fluorochrom	Herkunft
Anti-Biotin/Streptavidin	sekundärer AK	PerCP Cy 5.5	Pharmingen

Anti c-kit/CD117	2B8	APC	eBioscience
Anti Sca-1	D7	PE	Pharmingen

2.1.6 Sonstige fluoreszenzmarkierte Stoffe

Bezeichnung	Fluorochrom	Herkunft
Dextran 150 kDa	FITC	Sigma Aldrich
CellTracker Orange CMTMR 2,5mM	TRITC	Molecular Probes

2.1.7 Mäusstämmen und Chimären

Als Wildtypen wurden C57/Bl6-Mäuse verwendet, die über Charles River Laboratories, Wilmington, USA bezogen wurden und in der laboreigenen Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums (Lazarettstraße 36, 80636 München) gehalten wurden. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden in vierer- bis sechser Käfigen gehalten.

Die Kindlin3-Knockout-Chimären, sowie auch die Wildtyp-Chimären wurden freundlicherweise vom Max-Planck-Institut für Biochemie (Am Klopferspitz 18, 82152 München) zur Verfügung gestellt (Moser et al., 2008).

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG, in der Fassung vom 25.05.1998) genehmigt.

2.2. Zellulär-immunologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeines Vorgehen

Sämtliche Experimente mit und Manipulationen an Zellen wurden ausnahmslos unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

Die Bestimmung von Zellzahl und Vitalität erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer im Trypanblauausschlusstest im Durchlichtmikroskop bzw. mittels Propidium-Iodid-Test in der Durchflusssytometrie, wobei lebende Zellen den Farbstoff jeweils nicht aufnehmen.

2.2.1.2 Bestimmung des Gehalts an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen durch Colony Forming Unit – Assays

Zur Bestimmung der Anzahl an HSPC in den Kompartimenten Knochenmark, Milz und Blut wurden jeweils für Kindlin-3-Knockout-Chimären und C57/Bl6-Wildtyp-Chimären sogenannte Colony Forming Unit- Assays durchgeführt.

Für dieses Verfahren wurden Zellen aus dem Knochenmark des Oberschenkels (Femur) der Maus, sowie aus Milz und Blut isoliert. Die Blutentnahme aus dem Herzen (intrakardial) erfolgte in Isoflurannarkose, die Entnahme von Knochen und Milz erfolgte im Anschluss nach Tötung des Versuchstiers durch Genickbruch.

Danach wurden die Femuren mit PBS/EDTA über einen 40µm-Filter ausgepült und das Knochenmark aufgefangen. Nach einem ersten Waschschrift in der Zentrifuge bei 1500 Umdrehungen pro Minute (*rpm*), Raumtemperatur, über fünf Minuten erfolgte die Auflösung der Erythrozyten (Erylyse) über drei Minuten mit 2 ml Ammoniumchlorid auf Eis. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der verbleibende Rückstand (das *Pellet*) in 600µl RPMI wieder gelöst und die Gesamtzahl vitaler Zellen mittels Trypanausschlusstest (Verdünnung 1:100) in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Nun wurden 20000 Knochenmarkszellen in Methocult® aufgenommen, 200µl antibiotischer/antimykotischer Lösung hinzugefügt und in einer 6-Well-Platte ausplattiert.

Zur Isolierung der Zellen aus der Milz wurde diese nach Entnahme zunächst in einer Lösung zum Auflösen der Bindegewebsfasern (Kollagen I und XI) eingelegt und eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das gelöste Milzgewebe

mit Phosphate Buffered Saline/Fetal Calf Serum 5% durch einen 70µm-Filter gespült. Die Zentrifugation erfolgte bei 2100 *rpm*. Nach der Erylyse wurde abermals zentrifugiert. Zellzählung und Ausplattierung erfolgten analog zum Knochenmark, wobei 200000 Milzzellen verwendet wurden.

Die Verarbeitung des Blutes, das mit einer citrathaltigen Spritze entnommen wurde, um eine vorzeitige Koagulation zu vermeiden, erfolgte ähnlich. Nach Auffüllung mit PBS wurde bei 2100*rpm* zentrifugiert und im Anschluss die Erythrozyten mit 4ml Ammoniumchlorid über 3 Minuten aufgelöst. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurde ebenfalls analog zu Knochenmark und Milz verfahren, allerdings wurde das gesamte Blutvolumen ausplattiert.

Die Bebrütung der 6-Well-Platten erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem 5%igen CO₂-Luftgemisch über sieben Tage. Jede in dieser einen Woche gewachsene Kolonie repräsentiert eine HSPC. Von der Anzahl der Kolonien, die mittels Durchlichtmikroskopie bestimmt und fotografisch festgehalten wurde, konnte dann wiederum auf die Zahl an HSPC in einem Femur, einer Milz bzw. einem Milliliter Blut geschlossen werden.

2.2.2 Bestimmung des Gehalts an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mittels Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse erfolgt durch die Bestimmung des Vorhandenseins spezieller Oberflächenmarker, die von HSPC exprimiert bzw. nicht exprimiert werden. Fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen diese Moleküle werden vom FACS-Gerät detektiert und mittels Messung und Vergleich der Intensität des Fluoreszenz-Signals kann auf Art und Anzahl der gemessenen Zellen geschlossen werden.

Um tote Zellen von den Messungen ausnehmen zu können, wurde kurz vor Beginn der FACS-Analyse zu jeder Probe Propidium-Iodid gegeben.

Untersucht wurden die drei Kompartimente Knochenmark, Milz und Blut, jeweils bei Kindlin-3-Knockout-Chimären, C57/Bl6-Wildtyp-Chimären und reinen C57/Bl6-Wildtypen.

Die Aufbereitung der Zellen erfolgte bis einschließlich Zellzählung analog zum Vorgehen bei den CFU-Assays, wobei die Zellen nach der letzten Zentrifugation jeweils in 150µl FACS-Puffer (PBS, 2 % FCS, 2 mM EDTA) resuspendiert und anschließend zu gleichen Teilen auf zwei FACS-Röhrchen verteilt wurden.

Nach Zugabe weiterer 225 µl FACS-Puffer wurden der Inhalt des einen Röhrchens wiederum auf sechs weitere verteilt, in die jeweils nur ein Antikörper pipettiert wurde. Dies diente der Kompensation der einzelnen Fluoreszenz-Signale vor Beginn der eigentlichen Messung.

In das zweite Röhrchen, die eigentliche Probe, wurde zunächst der Biotin-Lineage-Mix in einer Verdünnung von 1:10 gegeben und 20 Minuten lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift in der Zentrifuge wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen c-kit/CD117 (APC), Sca-1 (PeCy5.5), CD34 (FITC), Flk-2/CD135 (PE) und Biotin/Streptavidin (Pacific Blue) in einer Verdünnung von 1:50 dazu gegeben und wiederum 20 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde mit FACS-Puffer zweimal gewaschen.

Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem FACSCyan ADP gemessen, die Analyse erfolgte mit der Software FlowJo (Tree Star, San Carlos, Californien, USA)

2.2.3 Isolation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark mittels Durchflusszytometrie

Zweck der Isolierung der HSPC aus dem Knochenmark war die spätere Injektion dieser Zellen in eine letal bestrahlte Maus. Es wurden bei jedem Versuch HSPC aus drei bis vier Kindlin-3-Knockout-Chimären sowie drei bis vier C57/Bl6-Wildtyp-Chimären sortiert.

Um eine möglichst große Zahl an HSPC zu gewinnen – im Durchschnitt jeweils ca. 150000 Zellen – wurden der in Isoflurannarkose durch Genickbruch getöteten Maus neben den Femuren auch die Unterschenkel (Tibiae), die Beckenknochen sowie die Oberarmknochen (Humeri) entnommen und das Knochenmark wiederum durch einen 40µm-Filter gespült. Nach einem ersten Waschschrift erfolgte die Erylyse über 10 Minuten bei 4°C mit dem *Red Cell Lysis Buffer for Bone Marrow*.

Nach zwei weiteren Waschschriften wurden die Zellen analog zum Vorgehen bei der bloßen Zellzahlbestimmung zunächst mit den Biotin-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle, die im *Lineage-Mix* enthalten sind, für 20 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift kamen die Fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen Biotin (PerCP Cy5.5), c-kit/CD117 (APC) und Sca-1 (PE) hinzu. Nach einer weiteren Inkubation von ebenfalls 20 Minuten unter den oben genannten Bedingungen und zwei weiteren Waschschriften wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und mit einem FACSAria sortiert. Die sortierten HSPC wurden

anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit Trypanblau auf ihre Vitalität hin geprüft.

2.2.4 Färbung der sortierten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mit fluoreszierenden Farbstoffen zur Visualisierung im Zwei-Photonen-Mikroskop

Im Anschluss an die Isolation der HSPC mittels FACS und vor der Injektion in eine letal bestrahlte Maus wurden die Zellen mit einem fluoreszierenden Farbstoff, einem sogenannten *CellTracker*, gefärbt, der die Zellmembran durchdringt und sich intrazellulär ablagert. Das Ziel hierbei war die Sichtbarmachung der Zellen mittels des 2-Photonen-Mikroskops. Verwendet wurde hierbei Chloromethyl(Benzoyl)Amin) Tetramethylrhodamin (CMTMR, rot-orange).

Die sortierten Zellen wurden abzentrifugiert und in 500µl RPMI/10% FCS wieder aufgenommen. In einer Verdünnung von 1:100 wurde der Farbstoff dazu gegeben und die Zellen wurden anschließend für 20 Minuten bei 37°C und 450 *rpm* in den Thermomixer gestellt. Danach wurde mit RPMI aufgefüllt und ein FCS-Gradient pipettiert, durch welchen die Zellen für 3 Minuten bei 3600 *rpm* zentrifugiert wurden. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, um zu gewährleisten, dass ungebundener Farbstoff im FCS-Gradienten abgefangen wird. Das *Pellet* wurde dann in 300 µl PBS wiederaufgelöst. Die Zellen wurden daraufhin gezählt und falls mehr als 150000 Zellen in der Lösung waren, in einer Konzentration von 50000 Zellen pro 100 µl PBS gelöst.

2.3. Darstellung des Homing- und des interstitiellen Verhaltens hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie

2.3.1 Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie

Bereits 1931 stellte Maria Göppert-Mayer erste Vermutungen über die Möglichkeit der Teilchenanregung durch mehrere Lichtteilchen (Photonen) an, doch erst 1990 gelang Denk et al. an der Cornell University die Mikroskopie mit Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Anregung (M.Göppert-Mayer, 1931, Denk et al., 1990).

Bei normaler Fluoreszenzmikroskopie wird ein Photon vom Farbstoff absorbiert, mit geringerer Wellenlänge und Energie wieder abgegeben und dadurch Fluoreszenz erzeugt. Wird beispielsweise mit blauem Licht angeregt, so wird im Mikroskop ein grünes Signal sichtbar.

Statt mit einem Anregungsphoton kann auch mit zwei Photonen Fluoreszenz erzeugt werden, sofern deren Energie in der Summe derjenigen Energie eines Anregungsphotons entspricht. Entscheidend ist außerdem, dass beide Photonen gleichzeitig bzw. mit maximal einer Attosekunde ($=10^{-18}$ s) Verzögerung eintreffen. Auf diese Weise kann auch die Anregung mit dunkelrotem oder infrarotem Licht zu einem grünen Signal führen. Bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie haben die beiden Photonen folglich eine größere Wellenlänge und weniger Energie.

Um ein möglichst gleichzeitiges Eintreffen der beiden Photonen im Fokuspunkt des Mikroskops sicherzustellen, muss mit sehr hohen Photonendichten gearbeitet werden. Möglich wird dies durch einen sogenannten gepulsten Laser mit Modenkopplung, der bis zu 80 Millionen Mal in der Sekunde sehr kurze und intensive Laserpulse aussendet. Der Laserstrahl wird durch das Objektiv des Mikroskops auf einen Punkt des Präparats gelenkt. Im Strahlengang des Lasers befinden sich Spiegel, auch Scanspiegel genannt, die durch Ablenkung des Laserstrahls in bestimmte Richtungen eine Durchsicht des gesamten Präparats möglich machen. Die hierbei entstehende Fluoreszenz wird durch Strahlteiler spektral aufgetrennt und zu den Detektoren, den sogenannten *Photomultipliern*, weitergeleitet. Diese messen die Helligkeit der Bildpunkte, im Steuerungscomputer erfolgt dann die optische Zusammensetzung des gesamten Präparates (siehe Abb. 2).

Die Zwei-Photonen-Mikroskopie bietet gegenüber der einfachen Fluoreszenzmikroskopie sowie auch der konfokalen Mikroskopie zahlreiche Vorteile. Zum einen werden sowohl mögliche phototoxische Effekte als auch das Ausbleichen der fluoreszierenden Farbstoffe auf den äußerst kleinen Bereich des Fokuspunktes beschränkt. Zum anderen erlauben die größeren Wellenlängen und niedrigeren Frequenzen der beiden Photonen durch ihre geringere Streuung eine höhere Eindringtiefe ins Präparat. Violettes Licht mit einer Wellenlänge von ca. 400 nm bedingt beispielsweise eine 16-fach höhere Streuung als rotes Licht, dessen Wellenlänge bei ca. 800 nm liegt. Die durchschnittliche Eindringtiefe mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop wird mit circa 200 μm angegeben, möglich sind in Einzelfällen bis zu 1000 μm .

Außerdem reicht die Anregung durch die Photonen außerhalb der Fokusebene nicht mehr aus, um weitere Fluoreszenz auszulösen. Insofern sind anders als zum Beispiel beim konfokalen Laser-Mikroskop keine Lochblenden oder dergleichen nötig, um diese

herauszufiltern. Dies ermöglicht es, die eigentliche Detektion näher am Präparat selbst erfolgen zu lassen.

Ein weiterer Punkt, der für den Einsatz des Zwei-Photonen-Mikroskops spricht, ist die Erzeugung eines sogenannten *Second Harmonic Signals*, auch Frequenzverdoppelung genannt. Dieses Phänomen, das darauf beruht, dass bei Bestrahlung bestimmter Objekte Strahlung mit doppelter Frequenz entsteht, zeigt sich nur bei nicht-symmetrischen Materialien. In den hier durchgeführten Versuchen wurde diese Technik genutzt, um die Kollagenfasern des Schädelknochens und damit den Knochen selbst darzustellen.

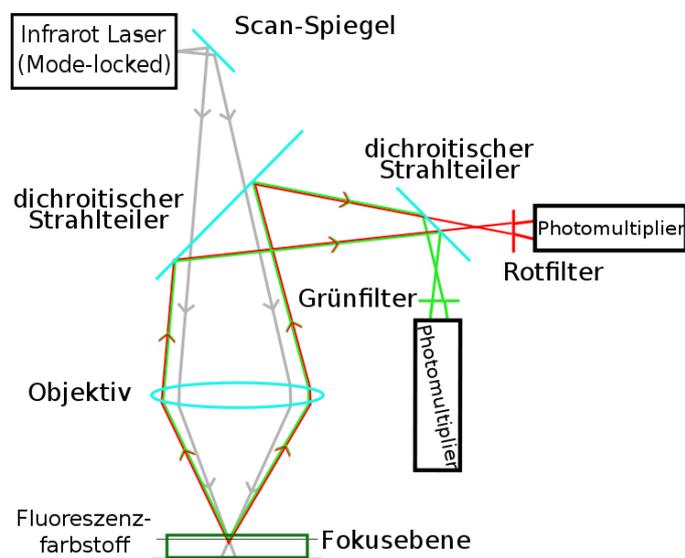


Abb. 2: Funktionsprinzips eines Zwei-Photonen-Mikroskops

Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines Zwei-Photonen-Mikroskops mit Detektoren (*Photomultiplier*) für grüne und rote Fluoreszenz.

(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagram_of_a_two-photon_excitation_microscope_de.svg)

2.3.2 Operation der Empfängertiere

2.3.2.1 Visualisierung des murinen Knochenmarks der Schädelkalotte im Zwei-Photonen-Mikroskop

Angelehnt an die von Mazo et al. etablierte Methode zur Darstellung von HSPC im murinen Knochenmark des Schädels, erfolgte die Operation der Maus im Vorfeld der Verwendung des Zwei-Photonen-Mikroskops (Mazo et al., 1998).

Die Maus wurde zunächst durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran ruhig gestellt und anschließend durch die intraperitoneale Injektion einer Kombination aus Fentanyl

(Dosierung: 0,05 mg / Kilogramm Körpergewicht), Midazolam (Dosierung: 5,0 mg/Kilogramm Körpergewicht) und Medetomidin 0,5mg / Kilogramm Körpergewicht) in tiefe Narkose versetzt (Erhardt and Kölle, 2004). Die ausreichende Narkosetiefe wurde durch Testung des Zwischenzehenreflexes ermittelt, der fehlende Lidschluss durch das Auftragen von Augensalbe kompensiert und der Maus wurde sowohl während der folgenden Operation als auch während des Versuchs selbst Sauerstoff zugeführt.

Die Enthaarung der Haut oberhalb der Schädelkalotte erfolgte mit einem elektrischen Rasierer und Enthaarungscreme. Die Maus wurde dann in einer eigens dafür angefertigten Fixierungsvorrichtung fixiert, die durch eine Wärmeplatte konstant bei 37°C, also der physiologischen Körpertemperatur der Maus, gehalten wurde.

Im Anschluss wurde die Kopfhaut im Bereich der vorderen Fontanelle eröffnet, der Knochen freipräpariert und ein Kunststoffring mit Gewebekleber an der Innenseite der Haut angebracht, um die Feuchthaltung des zu untersuchenden Bereichs durch isotonische Kochsalzlösung zu ermöglichen (siehe Abb. 3).

Die Kochsalzlösung innerhalb des Kunststoffrings wurde zur Konstanthaltung der Schädeltemperatur durch ein beheizbares Objektiv auf 37°C erwärmt.

Die entscheidenden Strukturen, die Kreuzung der Schädelnähte an der vorderen Fontanelle bzw. die Kreuzung der beiden großen venösen Sinus, konnten durch das *Second Harmonic Signal*, welches die Kollagenfasern des Knochens dunkelblau erscheinen lässt sowie durch Applikation des grün fluoreszierenden Plasmafärbstoffes FITC-Dextran aufgefunden werden (siehe Abb. 4).

Untersucht wurden jeweils die sogenannten Endothelkissen, folglich die Bereiche, in denen sich ein besonders dichtes Netz an Gefäßen findet, in allen vier Quadranten über eine Tiefe von im Schnitt ca. 300µm.

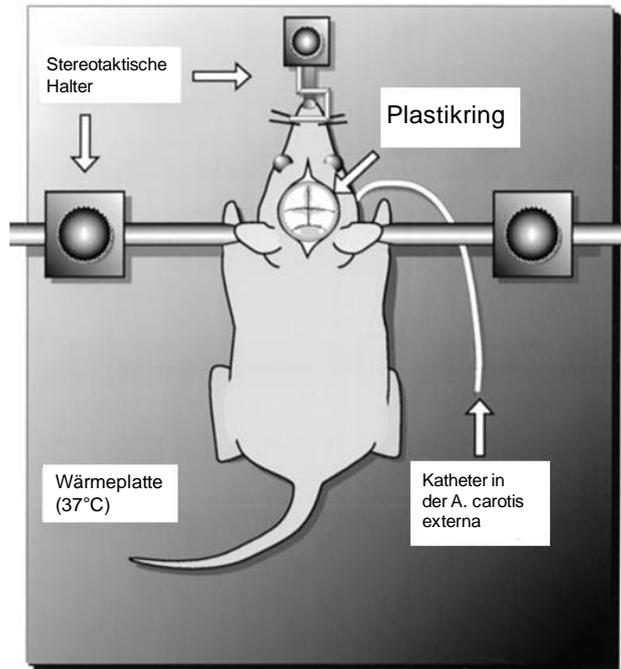


Abb. 3: Schematische Darstellung des operierten Tieres

Narkotisiertes und operiertes Empfängertier mit intraarteriellem Katheter in der A. carotis externa; vorbereitet zur Applikation von Plasmafärbstoff FITC-Dextran und CMTMR-gefärbter HSPC; frei präparierte Schädelkalotte zur Visualisierung der Kreuzung der venösen Sinus im Knochenmark (Mazo and von Andrian, 1999).

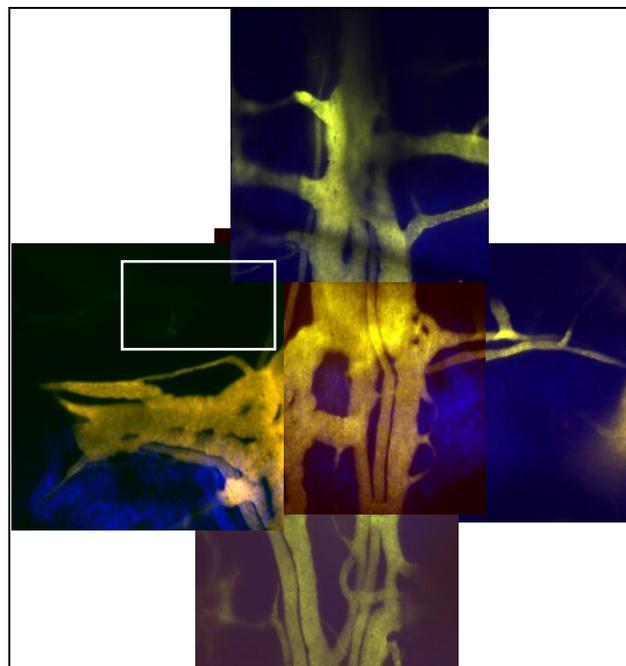


Abb. 4: Kreuzung der beiden venösen Sinus im Bereich der vorderen Fontanelle

Der Knochen erscheint durch das *Second Harmonic Signal* dunkelblau, Gefäße durch Gabe von FITC-Dextran hellgrün. Markiert ist einer von vier untersuchten Quadranten. Insgesamt entspricht der untersuchte Bereich einem Volumen von ca. 4,8 μ l.

2.3.2.2 Visualisierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen 18 Stunden nach Injektion

Da davon auszugehen ist, dass HSPC, die in eine letal bestrahlte Maus injiziert werden, sich nach 18 Stunden im Knochenmarksinterstitium befinden sofern kein Homing-Defekt besteht, wurde dieser Zeitpunkt gewählt.

Ziel dieser Versuchsreihe war es zu überprüfen, ob und in welcher Anzahl HSPC, die wie unter 2.2.3 beschrieben aus Kindlin-3-Knockout-Chimären sortiert wurden und dann in mit 9,5 Gy bestrahlte C57/Bl6-Wildtypen injiziert wurden, im Interstitium nachzuweisen sind.

Als Kontrolle wurde mit aus C57/Bl6-Wildtyp-Chimären gewonnenen HSPC analog verfahren.

Die sortierten und mit CMTMR gefärbten HSPC – im Durchschnitt ca. 200000 Zellen – wurden in die Schwanzvene des Empfängertieres injiziert und 18 Stunden später erfolgten die Präparation des Schädelknochens sowie die Injektion des Plasmafärbestoffs wie oben beschrieben.

Verglichen wurden die Gesamtzahl der im Knochenmarksinterstitium befindlichen CMTMR gefärbten Zellen, die Geschwindigkeit ihrer Bewegung innerhalb des Knochenmarksinterstitiums, ihre Distanz zum Endost, und ihre Distanz zum nächstgelegenen Gefäß (Lo Celso et al., 2008). Letztere Daten wurden durch manuelles Tracking der Zellen, sowie manuelle Abstandsmessungen zum Endost bzw. Gefäß mit der Software Volocity® (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, US) erhoben (siehe auch 2.3.3).

2.3.2.3 Visualisierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in den ersten sechs Stunden nach Injektion

Dieser Versuch zielte auf die Sichtbarmachung der einzelnen Schritte des *Homing*-Prozesses in das Knochenmark in Echtzeit, um mögliche Einschränkungen des *Homing*-Verhaltens der HSPC aus Kindlin-3-Knockout-Chimären nachzuweisen.

Sortierte HSPC aus Kindlin-3-Knockout-Chimären und C57/Bl6-Wildtyp-Chimären wurden hier bereits unter dem Zwei-Photonen-Mikroskop injiziert und ihr Verhalten am Gefäßendothel untersucht.

Anders als bei Lo Celso et al., die parallel zu diesen Versuchen im Januar 2011 ein ähnliches Protokoll publizierten, erfolgte die Injektion nicht intravenös, sondern intraar-

teriell, um ein mögliches Hängenbleiben der HSPC im pulmonalen Kapillarsystem zu vermeiden (Lo Celso et al., 2011). Die bei Mazo et al. beschriebene Injektion in die A. carotis communis wurde ebenfalls weiter modifiziert (Mazo and von Andrian, 1999).

Beim analog zur Präparation des Schädelknochens narkotisierten Tier wurde ein Hautschnitt im Bereich des Halses gesetzt und die Arteria carotis communis frei präpariert. Nach Ligation des internen Astes, der hauptsächlich das Gehirn versorgt und durch welchen womöglich Zellen dorthin verloren gegangen wären, wurde eine Katheter in die Arteria carotis externa geschoben, den Ast, der hauptsächlich für die Versorgung des Knochenmarkraums verantwortlich ist. Der Katheter wurde belassen (siehe Abb. 5). Im Anschluss wurde der Hautschnitt vernäht und die Präparation des Schädeldachs erfolgte wie beschrieben.

Bereits unter mikroskopischer Sicht wurden dann die sortierten HSPC der Kindlin-3-Knockout-Chimären bzw. der C57/Bl6-Wildtyp-Chimären injiziert. Es handelte sich jeweils um ca. 150000 Zellen, wobei diese zuvor mit CMTMR gefärbt wurden. Außerdem wurde zur Visualisierung der Knochenmarksgefäße FITC-Dextran appliziert.

Verglichen wurde die Anzahl der Zellen, die mit dem Endothel interagieren und unter diesen wiederum die Anzahl derer, die fest adhären.

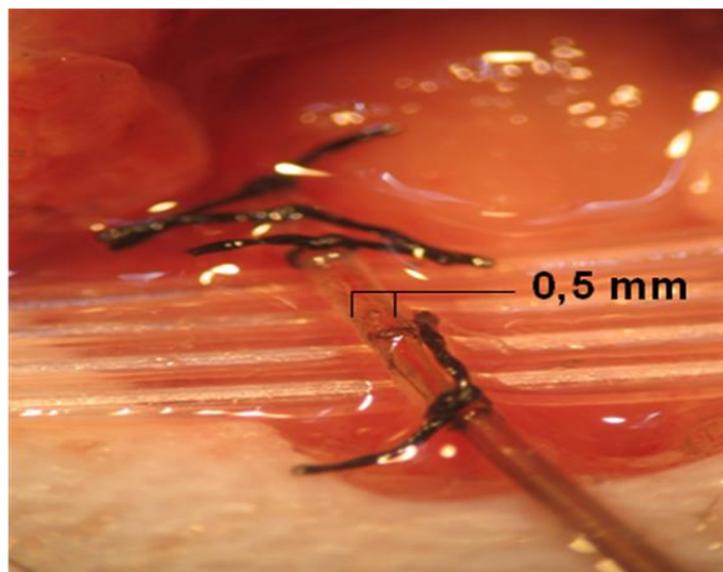


Abb. 5: Katheter in der Arteria carotis externa des Empfängertieres

Gefäß zur besseren Präparation und Kathetereinbringung mit 4 Katheterschläuchen unterlegt.

Als Empfängertiere wurden C57/Bl6-Wildtypen verwendet. Diese Tiere wurden im Vorfeld mit 9,5 Gy letal bestrahlt um die Einnistung (*Engraftment*) der HSPC zu optimieren (Lo Celso et al., 2008).

2.3.3 Digitale Bildbearbeitung

Das mittels des Zwei-Photonen-Mikroskops gewonnene Bildmaterial wurde digital nachbearbeitet und ausgewertet. Zellzahlen wurden bestimmt, außerdem wurden Abstandsmessungen durchgeführt und Geschwindigkeiten bei Zellbewegungen ermittelt. Informationen wurden weder hinzugefügt noch entfernt.

Dazu dienten sowohl die Software des Steuerungscomputers selbst, Inspector Pro® (LaVision Biotech, Bielefeld, D), als auch Volocity® (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, US).

2.4. Statistische Auswertung

Bei zahlreichen Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben, die Streuung der Werte wurde als Standardabweichung dargestellt. Die Prüfung auf Signifikanz der Daten erfolgte mittels des T-Tests.

Außerdem wurden zahlreiche Versuche in Form von DotBlots ausgewertet, die eine sehr gute Visualisierung der Streuung um den Mittelwert bzw. Median möglich machen. Für die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung wurden die Programme Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, CA, USA) und SigmaPlot (Systat Inc., CA, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung des Gehalts an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in drei verschiedenen Kompartimenten mittels *Colony Forming Unit-Assays*

3.1.1 Bestimmung der Zellzahl im Knochenmark

Untersucht wurde das Femurknochenmark von jeweils sechs Kindlin3-Knockout-Chimären sowie C57/Bl6-Wildtyp-Chimären.

Das Knochenmark wurde entnommen, die Erythrozyten aufgelöst und die verbliebenen Zellen anschließend in einem speziellen Nährmedium für HSPC (Methocult®) ausplattiert. Nach einer Woche Kultur im Begasungsbrutschrank konnten die Kolonien unter Durchlichtmikroskopie ausgezählt werden. Da jede gezählte Kolonie aus einer Stamm- bzw. Progenitorzelle hervorgegangen ist, kann von der Zahl der vorhandenen Kolonien auf den ursprünglichen Gehalt an Vorläuferzellen geschlossen werden.

Im Mikroskop zeigten sich die Kolonien als mehr oder minder große Ansammlungen identischer Zellen, wobei eine weitere Untersuchung in Bezug auf die Differenzierung der Zellen in Granulozyten, Lymphozyten usw. – nicht erfolgte (siehe Abb. 6).

Die Gesamtzahl an Zellen im Femur der C57/Bl6-Wildtyp-Chimäre betrug im Mittel ca. 72000 Zellen, im Femur der Kindlin3-Knockout-Chimäre ca. 44000 Zellen; $p=0.29$ (siehe Abb. 7).

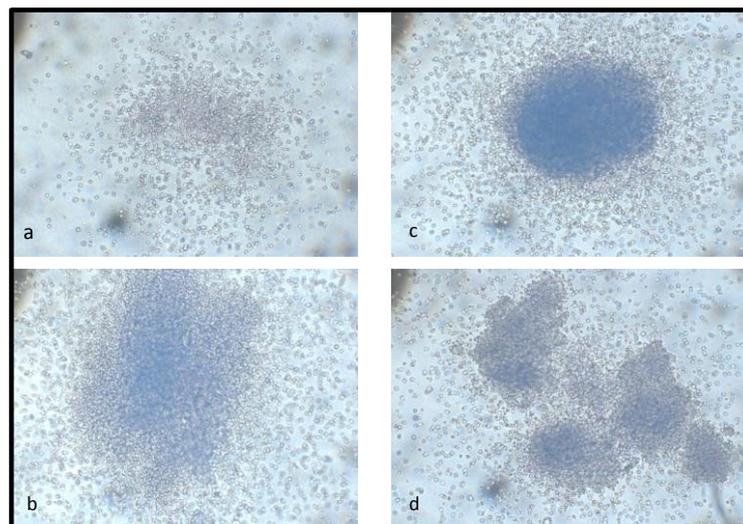


Abb. 6: Kolonien im Knochenmark

Die Bilder **a)** und **b)** zeigen Kolonien, die aus dem Knochenmark der C57/Bl6-Wildtypchimären entstanden sind, **c)** und **d)** zeigen Beispielkolonien aus Kindlin3-Knockout-Chimären. In den Bildern a) bis c) sind je eine, in Bild d) vier Kolonien zu sehen.

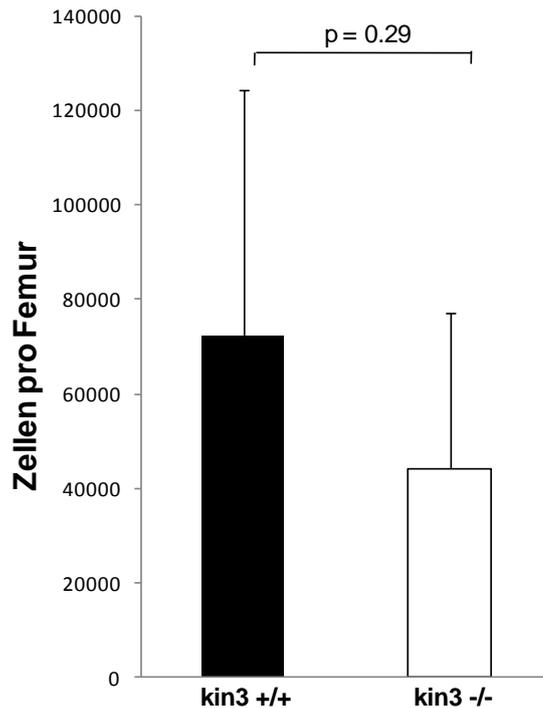


Abb. 7: Zellen pro Femur im CFU-Assay

Dargestellt sind das arithmetische Mittel der Zellzahlen, die über die Anzahl der gewachsenen Kolonien pro Femur ermittelt wurden, sowie die Standardabweichung (n=6 für Wildtyp-Chimäre und Kindlin3-Knockout-Chimäre).

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl in der Milz

Ebenfalls von sechs Kindlin3-Knockout-Chimären und sechs C57/Bl6-Chimären wurden die Milzen entnommen und nach entsprechender Aufbereitung in Methocult® ausplattiert. Nach einer Woche zeigten sich im Durchlichtmikroskop die erwarteten Kolonien (siehe Abb. 8).

Bei der Auswertung der Koloniezahl wurde analog zum Knochenmark verfahren.

Die ermittelten Kolonien pro untersuchte Milz betragen bei den Wildtyp-Chimären im Mittel ca. 6600 Zellen und bei den Knockout-Chimären ca. 10000 Zellen; p=0.29 (siehe Abb. 9).

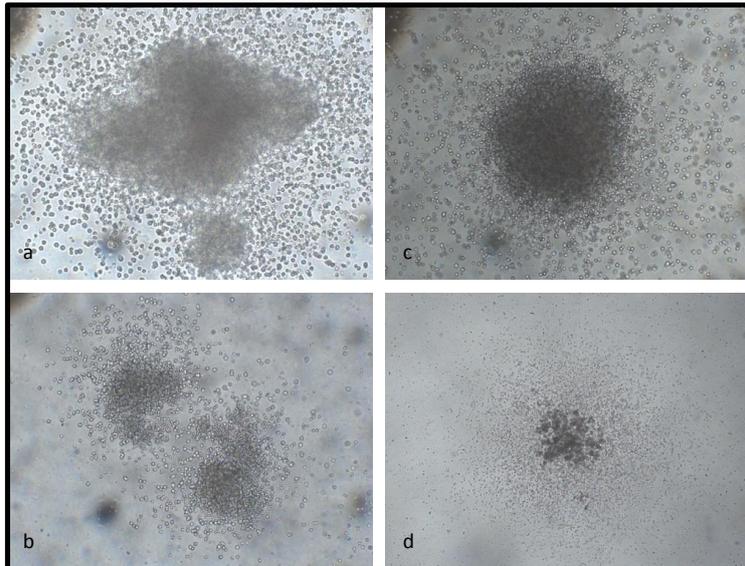


Abb. 8: Kolonien in der Milz

Die Bilder **a)** und **b)** zeigen Kolonien, die aus den Milzen der C57/Bl6-Wildtypchimären entstanden sind, **c)** und **d)** zeigen Beispielkolonien aus Kindlin3-Knockout-Chimären. In Bild **a)** und **b)** werden jeweils zwei Kolonien, in Bild **c)** und **d)** jeweils 1 Kolonie gezählt.

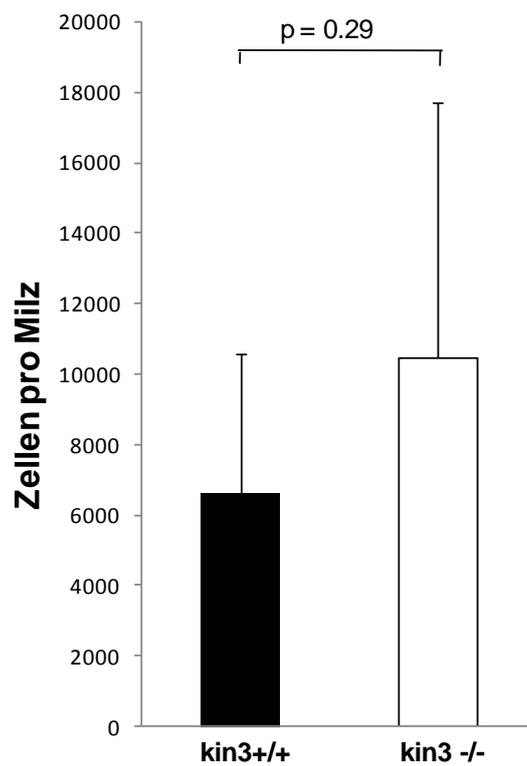


Abb. 9: Zellen in der Milz im CFU-Assay

Dargestellt sind das arithmetische Mittel der Zellzahlen, die über die Anzahl der gewachsenen Kolonien pro Milz ermittelt wurden sowie die Standardabweichung (n=6 für Wildtyp-Chimäre und Kindlin3-Knockout-Chimäre).

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl im Blut

Auch für die Untersuchung der Stamm- und Progenitorzellen im Blut wurden Gruppen zu vier Kindlin3-Knockout-Chimären und sechs C57/Bl6-Wildtyp-Chimären gebildet. Das intrakardial entnommene Blut wurde nach Reinigung und Erylyse ebenfalls in Methocult® ausplattiert. Die Kolonien, die aus den im Blut enthaltenen Stamm- und Progenitorzellen hervorgingen, waren im Durchlichtmikroskop ebenfalls gut beurteilbar (siehe Abb. 10).

Die Anzahl der Kolonien bei den Wildtyp-Chimären ließ auf im Mittel ca. 13 Zellen pro Milliliter Blut schließen, bei den Knockout-Chimären auf 145 Zellen pro Milliliter Blut; $p=0.37$ (siehe Abb. 11).

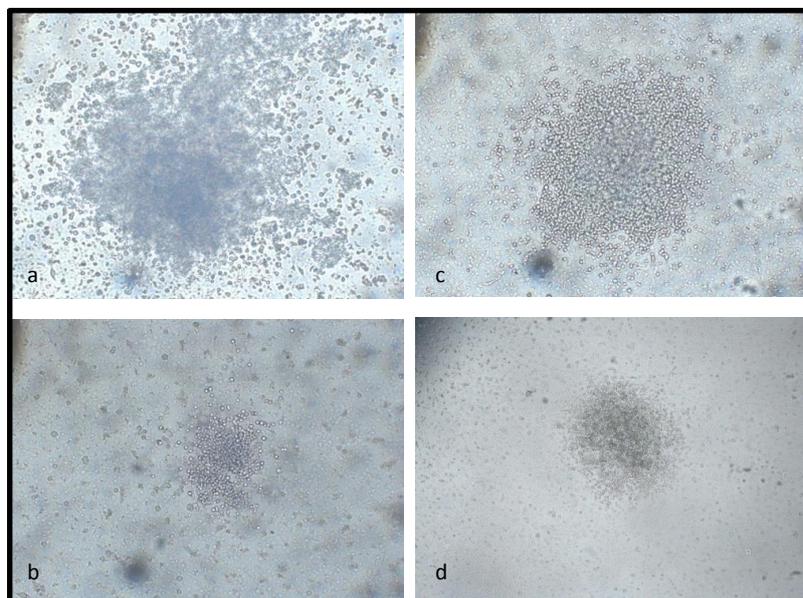


Abb. 10: Kolonien im Blut

Die Bilder **a)** und **b)** zeigen Kolonien, die aus dem Blut der C57/Bl6-Wildtypchimären entstanden sind, **c)** und **d)** zeigen Beispielkolonien aus dem Blut von Kindlin3-Knockout-Chimären.

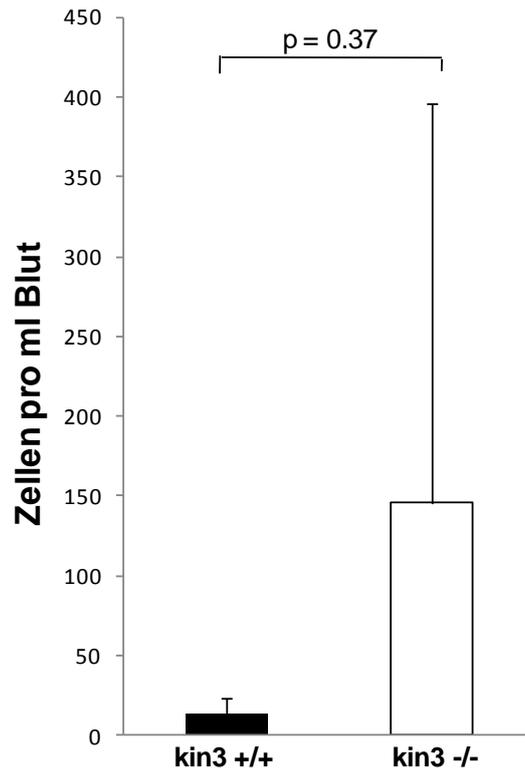


Abb. 11: Zellen im Blut im CFU-Assay

Dargestellt sind das arithmetische Mittel der Zellzahlen, die über die Anzahl der gewachsenen Kolonien pro Milliliter Blut ermittelt wurden, sowie die Standardabweichung (n=4 für Wildtyp-Chimäre und Kindlin3-Knockout-Chimäre).

3.2. Bestimmung des Gehalts an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in drei verschiedenen Kompartimenten mittels Durchflusszytometrie

3.2.1 Bestimmung der Zellzahl im Knochenmark

Untersucht wurde das Knochenmark aus beiden Femuren von jeweils vier C57/Bl6-Wildtypen, C57/Bl6-Wildtyp-Chimären und Kindlin3-Knockout-Chimären.

Das Knochenmark durchlief nach der Erylyse mehrere Waschschrte und wurde dann zunächst mit den Biotin-gelabelten Primär-Antikörpern des Lineage-Mix inkubiert. Danach folgten die Fluoreszenz-gelabelten Primär-Antikörper gegen c-kit/CD117 (APC), Sca-1 (PeCy5.5), CD34 (FITC) und Flk-2/CD135 (PE), sowie der Sekundär-Antikörper gegen Biotin (Pacific Blue).

Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde außerdem Propidium-Iodid zu der jeweiligen Probe gegeben, um tote Zellen von den Messungen auszunehmen.

Analysiert wurde der Gehalt an lin⁻, c-kit⁺ und Sca-1⁺ Zellen und unter diesen wiederum die Anzahl an Flk-2⁻ und CD34⁻ Zellen.

Der in Abb.12 exemplarisch dargestellte Dot-Plot einer Messung zeigt einen prozentualen Anteil der HSPC an allen lebenden Zellen von 0,39% bei den Wildtyp-Chimären im Vergleich zu 0,38% bei den Knockout-Chimären.

In der statistischen Auswertung aller durchgeführten Messungen findet sich im Knochenmark der Kindlin3-Knockout-Chimären prozentual ein höherer Anteil an HSPC an den Gesamtzellen als bei den Wildtyp-Chimären, beim Vergleich der absoluten Zellzahlen allerdings ist die Differenz zwischen den Wildtyp-Chimären und den Knockout-Chimären gering. Im Mittel finden sich im Femur-Knochenmark des Wildtyps ca. 52000 Zellen, bei der C57/Bl6-Wildtyp-Chimäre 44000 Zellen und bei der Kindlin3-Knockout-Chimäre ca. 37000 Zellen (siehe Abb. 13).

Die Messung des Gehalts an CD34⁻, Flk-2⁻ Zellen innerhalb der lin⁻, c-kit⁺ und Sca-1⁺ Zellen ergab, dass sich prozentual im Knochenmark der Kindlin3-Knockout-Chimären signifikant weniger putative Long-Term-HSPC befanden, als bei den C57/Bl6-Wildtyp-Chimären (Abb. 14).

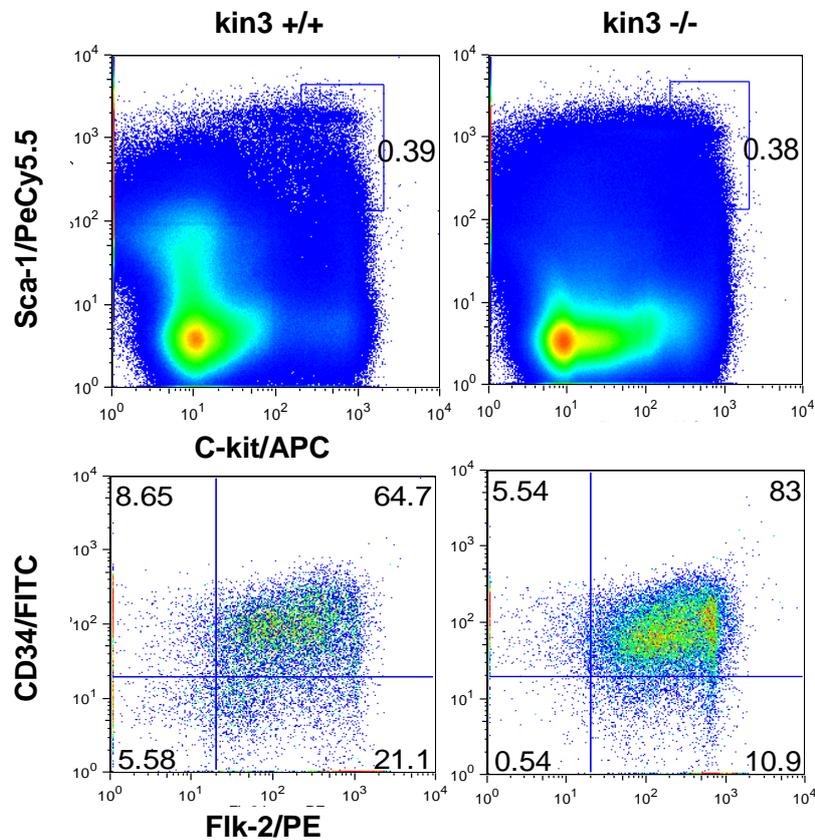


Abb. 12: Dot-Plot einer durchflusszytometrischen Bestimmung des prozentualen Anteils an HSPC am Gesamtzellbestand im Knochenmark

Die **linke** Spalte zeigt exemplarisch das Ergebnis des prozentualen Anteils von HSPC (oben) bzw. LT-HSPC (unten) im Knochenmark einer Wildtyp-Chimäre. **Rechte** Spalte: Kindlin3-Knockout-Chimäre. n=1.

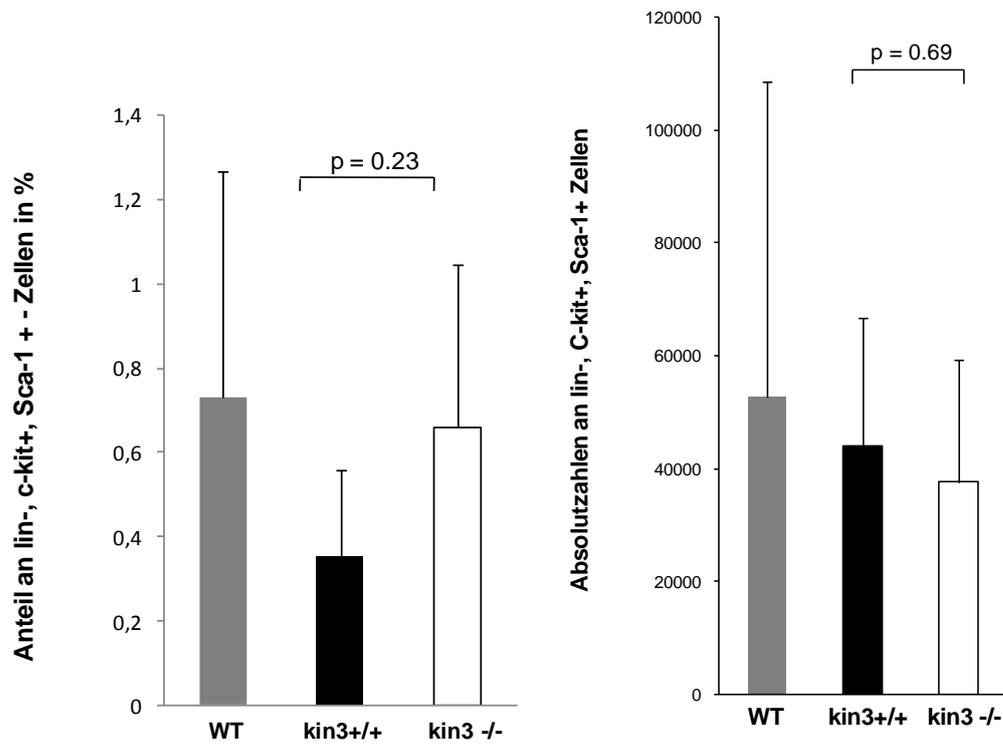


Abb. 13: Bestimmung der Anzahl der HSPC im Knochenmark in der Durchflusszytometrie

Das **linke** Diagramm zeigt die durch FACS ermittelten, prozentualen Anteile der HSPC (lin-, c-kit+, Sca-1+) am Gesamtzellbestand im Knochenmark von Wildtyp, Wildtyp-Chimäre und Kindlin-3-KO-Chimäre. Das **rechte** Diagramm zeigt die entsprechenden Absolutzahlen. Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel mit Standardabweichung. n=4.

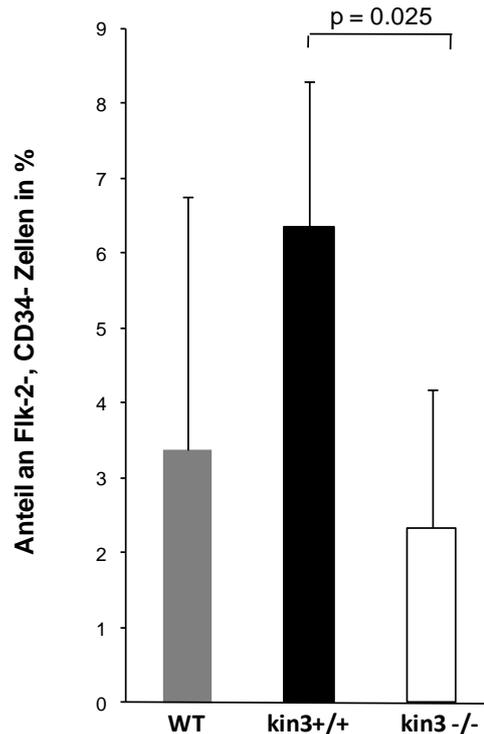


Abb. 14: Bestimmung des prozentualen Anteils der Long-term-HSPC im Knochenmark in der Durchflusszytometrie

Das Diagramm zeigt jeweils den prozentualen Anteil an putativen LT-HSPC (CD34-, Fli2-) im Knochenmark von Wildtyp, Wildtyp-Chimäre und Kindlin3-Knockout-Chimäre. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung. n=4.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl in der Milz

Auch für die Untersuchung der Milz wurden jeweils vier C57/Bl6-Wildtypen, C57/Bl6-Wildtyp-Chimären und Kindlin3-Knockout-Chimären verwendet. Die Milzen wurden analog zum Knochenmark nach Erylyse und den folgenden Waschschritten mit den genannten Antikörpern inkubiert und zum Ausschluss toter Zellen mittels Zugabe von Propidium-Iodid gefärbt.

Bei der Analyse des Zellgehalts in der Milz wurde wiederum innerhalb eines Versuchs auf die Vergleichbarkeit der Gates geachtet und sowohl der Gehalt an lin-, c-kit+ und Sca-1+ Zellen als auch der an CD34-, Fli2- Zellen gemessen.

Die exemplarisch dargestellten Daten einer Messung als Dot-Plot zeigen deutlich höhere prozentuale Anteile an HSPC in den Milzen der Kindlin3-Knockout-Chimären (0,18%) im Vergleich zu den C57/Bl6-Wildtyp-Chimären (0,028%) (siehe Abb. 15).

Die statistische Auswertung der prozentualen Anteile sowie der absoluten Zahlen konnte dieses Bild weiter bestätigen. Im Durchschnitt finden sich prozentual gesehen in der

Milz der Knockout-Chimären ca. fünfmal so viele HSPC wie in den Wildtyp-Chimären und ca. dreimal so viele wie in den Wildtypen (siehe Abb. 16).

Beim Vergleich des Gehalts an CD34-, Flk-2- Zellen hingegen fällt auf, dass dieser in den Milzen der Knockout-Chimären ca. 2,5mal geringer ist, als in den Wildtyp-Chimären und ca. halb so groß wie in den Wildtypen (Abb. 17)

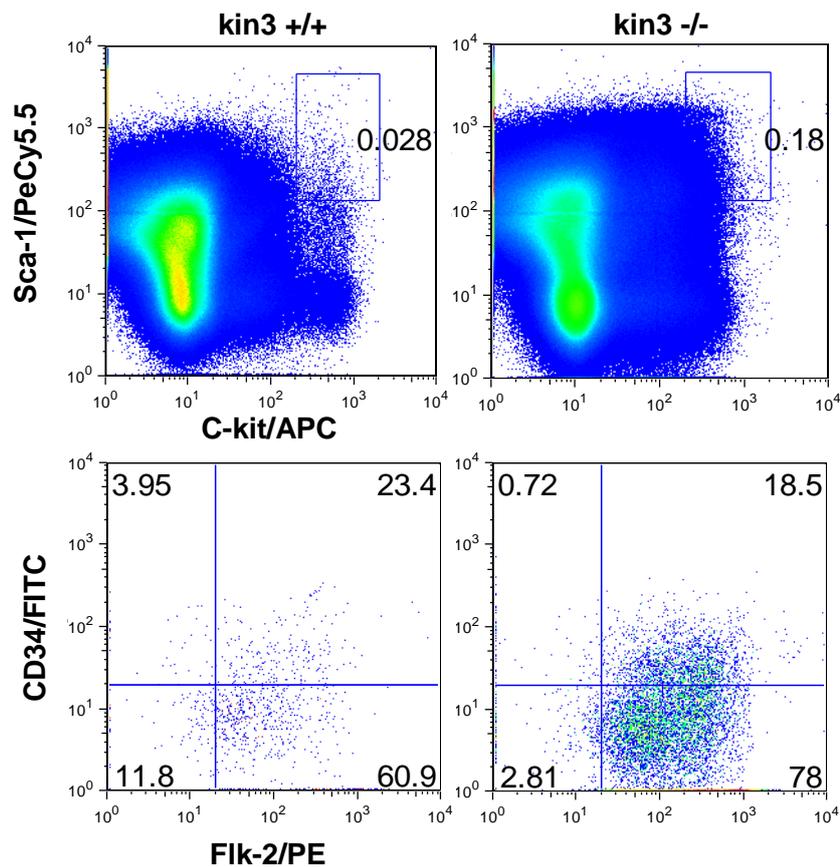


Abb. 15: Dot-Plot einer durchflusszytometrischen Bestimmung des prozentualen Anteils an HSPC am Gesamtzellbestand in der Milz

Die **linke** Spalte zeigt exemplarisch das Ergebnis des prozentualen Anteils von HSPC (oben) bzw. LT-HSPC (unten) in der Milz einer Wildtyp-Chimäre. **Rechte** Spalte: Kindlin3-Knockout-Chimäre. n=1.

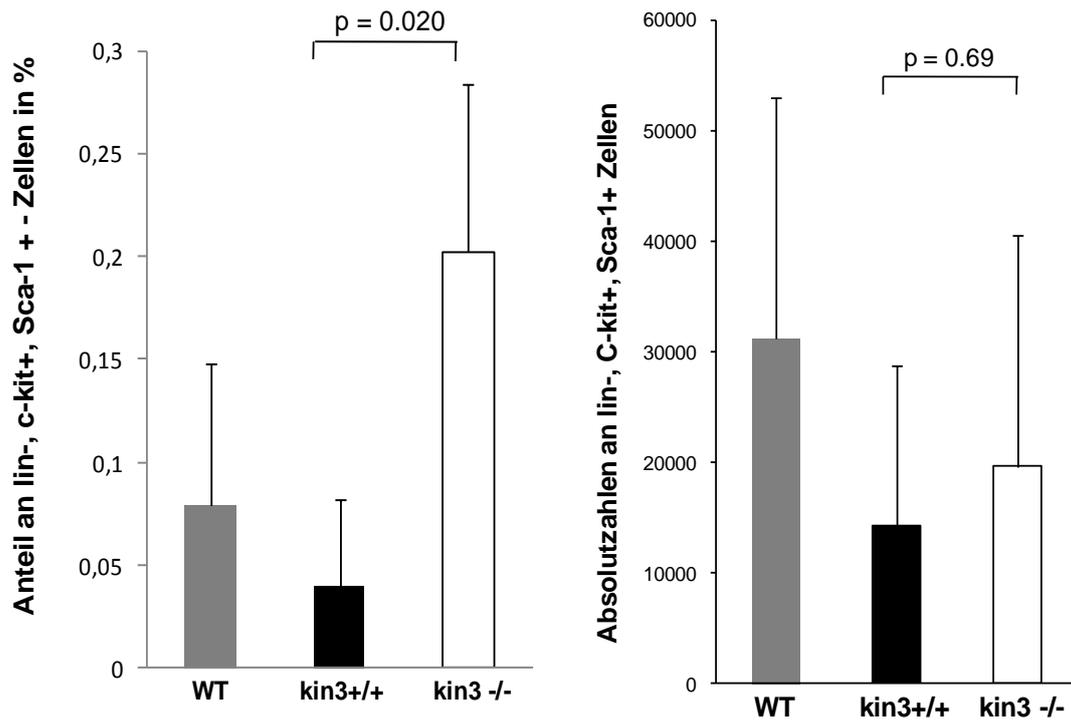


Abb. 16: Bestimmung der Anzahl der HSPC in der Milz in der Durchflusszytometrie

Das **linke** Diagramm zeigt die durch FACS ermittelten, prozentualen Anteile der HSPC (lin-, c-kit+, Sca-1+) am Gesamtzellbestand in der Milz von Wildtyp, Wildtyp-Chimäre und Kindlin-3-KO-Chimäre. Das **rechte** Diagramm zeigt die entsprechenden Absolutzahlen. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung. n=4

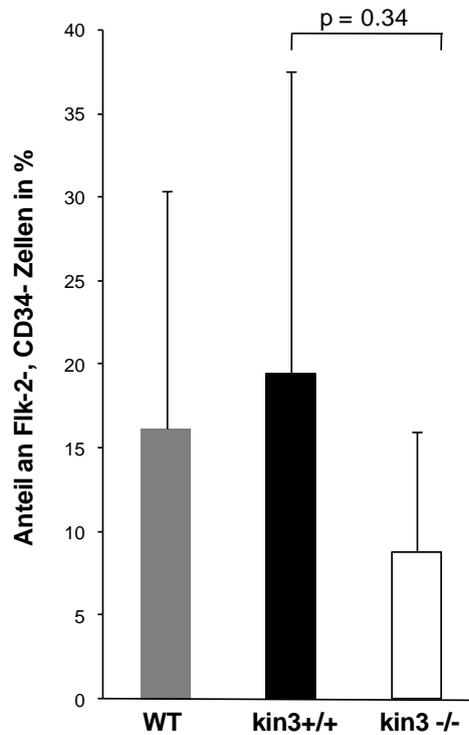


Abb. 17: Bestimmung des prozentualen Anteils der LT-HSPC in der Milz in der Durchflusszytometrie

Das Diagramm zeigt jeweils den prozentualen Anteil an möglichen LT-HSPC (CD34-, Flk-2-) in den Milzen von Wildtyp, Wildtyp-Chimäre und Kindlin3-KO-Chimäre. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung. n=4.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl im Blut

Für die Messungen des Gehalts an HSPC in diesem Kompartiment wurde jeweils vier C57/Bl6-Wildtypen, vier C57/Bl6-Wildtyp-Chimären und vier Kindlin3-Knockout-Chimären intrakardial Blut entnommen. Wie bei Knochenmark und Milz wurden zunächst die Erythrozyten lysiert, die Proben mehrfach gewaschen und dann mit den Antikörpern inkubiert. Auch bei der Analyse des Blutes erfolgte der Ausschluss toter Zellen mittels Zugabe von Propidium-Iodid.

Die Setzung der Gates erfolgte analog zu den anderen Kompartimenten und es wurde ebenfalls der Gehalt an HSPC und möglichen LT-HSPC bestimmt.

Der exemplarisch dargestellt Dot-Plot einer einzelnen durchflusszytometrischen Messung zeigt im Blut der Knockout-Chimäre einen prozentual höheren Anteil an HSPC am Gesamtbestand lebender Zellen (0,31%) als bei den Wildtyp-Chimären (0,063%) (siehe Abb. 18).

Auch in der statistischen Auswertung und anschließenden graphischen Darstellung der prozentualen Anteile sowie der Absolutzahlen aller durchgeführten Messungen bestätigt sich dieses Ergebnis. Prozentual gesehen finden sich im Blut der Knockout-Chimären ca. viermal mehr HSPC als bei den Wildtyp-Chimären und ca. 1,5mal mehr als bei den Wildtypen. Bei den absoluten Zahlen finden sich ähnliche Ergebnisse (siehe Abb. 19).

Der Gehalt an CD34- und Flk-2- Zellen ist jedoch im Blut der Knockout-Chimären prozentual nur halb so hoch wie bei den Wildtyp-Chimären. Es zeigen sich demnach diesbezüglich ähnliche Befunde wie in der Milz (Abb. 20).

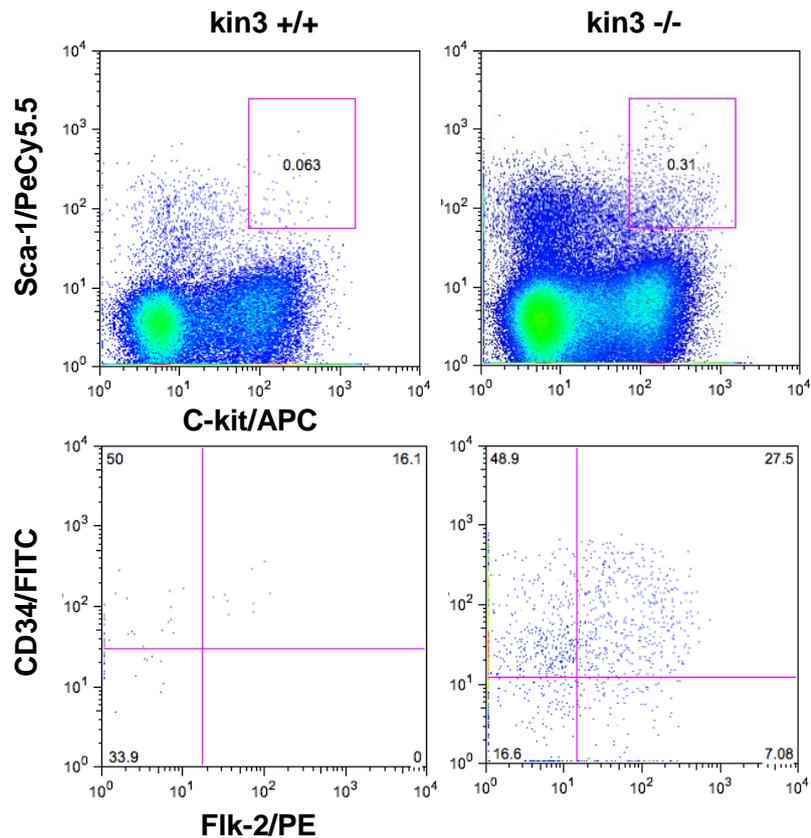


Abb. 18: Dot-Plot einer durchflusszytometrischen Bestimmung des prozentualen Anteils an HSPC am Gesamtzellbestand im Blut

Die **linke** Spalte zeigt exemplarisch das Ergebnis des prozentualen Anteils von HSPC (oben) bzw. LT-HSPC (unten) im Blut einer Wildtyp-Chimäre. **Rechte** Spalte: Kindlin3-Knockout-Chimäre. n=1.

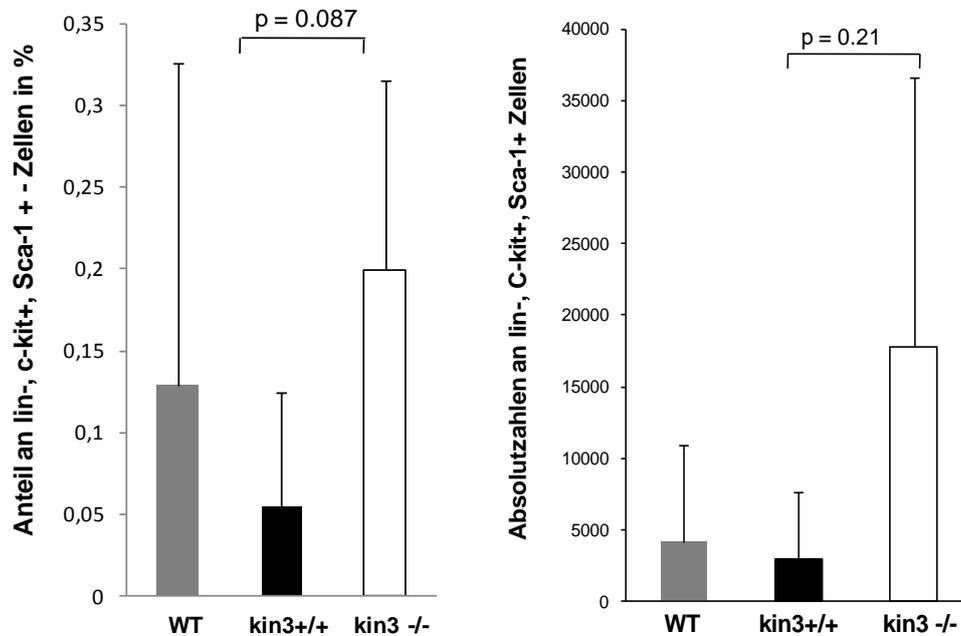


Abb. 19: Bestimmung der Anzahl der HSPC im Blut in der Durchflusszytometrie

Das **linke** Diagramm zeigt die durch FACS ermittelten, prozentualen Anteile der HSPC (lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺) am Gesamtzellbestand im Blut von Wildtyp, Wildtyp-Chimäre und Kindlin-3-KO-

Chimäre. Das **rechte** Diagramm zeigt die entsprechenden Absolutzahlen. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung. n=4.

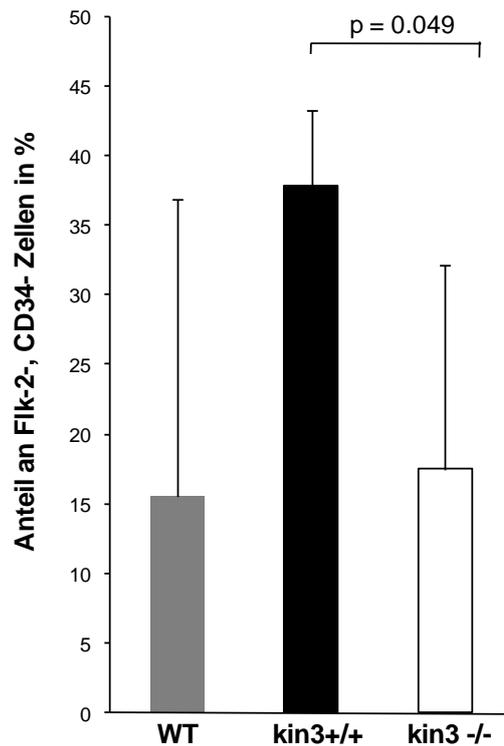


Abb. 20: Bestimmung des prozentualen Anteils der LT-HSPC im Blut in der Durchflusszytometrie

Das Diagramm zeigt jeweils den prozentualen Anteil an möglichen LT-HSPC (CD34-, Fli2-) im Blut von Wildtyp, Wildtyp-Chimäre und Kindlin3-KO-Chimäre. Dargestellt ist das arithmetische Mittel mit Standardabweichung. n=4.

3.3. Vergleich der im Zuge der CFU-Assays und der Durchflusszytometrie ermittelten Gesamtzellzahlen innerhalb der drei Kompartimente

Bei jeder Untersuchung der drei Kompartimente wurde nach der Erylyse und vor der weiteren Bearbeitung die Anzahl der vitalen Zellen mit Hilfe der Trypanblau-Färbung und einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Es liegen die Zahlen für das Knochenmark und die Milzen von vier Wildtypen und jeweils zehn Wildtyp- und Knockout-Chimären vor, sowie die Daten für das Blut von vier Wildtypen und jeweils acht Wildtyp- und Knockout-Chimären vor.

Bei der statistischen Auswertung zeigen sich im Knochenmark der Knockout-Chimären geringfügig niedrigere Gesamtzellzahlen als bei den beiden Kontrollen, wohingegen der Unterschied in der Milz gravierender imponiert. Während sich bei den Wildtyp-Chimären pro Milz ca. 4,5 Millionen Zellen fanden, sind es bei den Knockout-Chimären

nur ca. 1,6 Millionen Zellen. Im Blut der Knockout-Chimären hingegen finden sich ca. fast dreimal so viele Zellen wie im Blut der Wildtyp-Chimären; dieser Unterschied war signifikant (siehe Abb. 21).

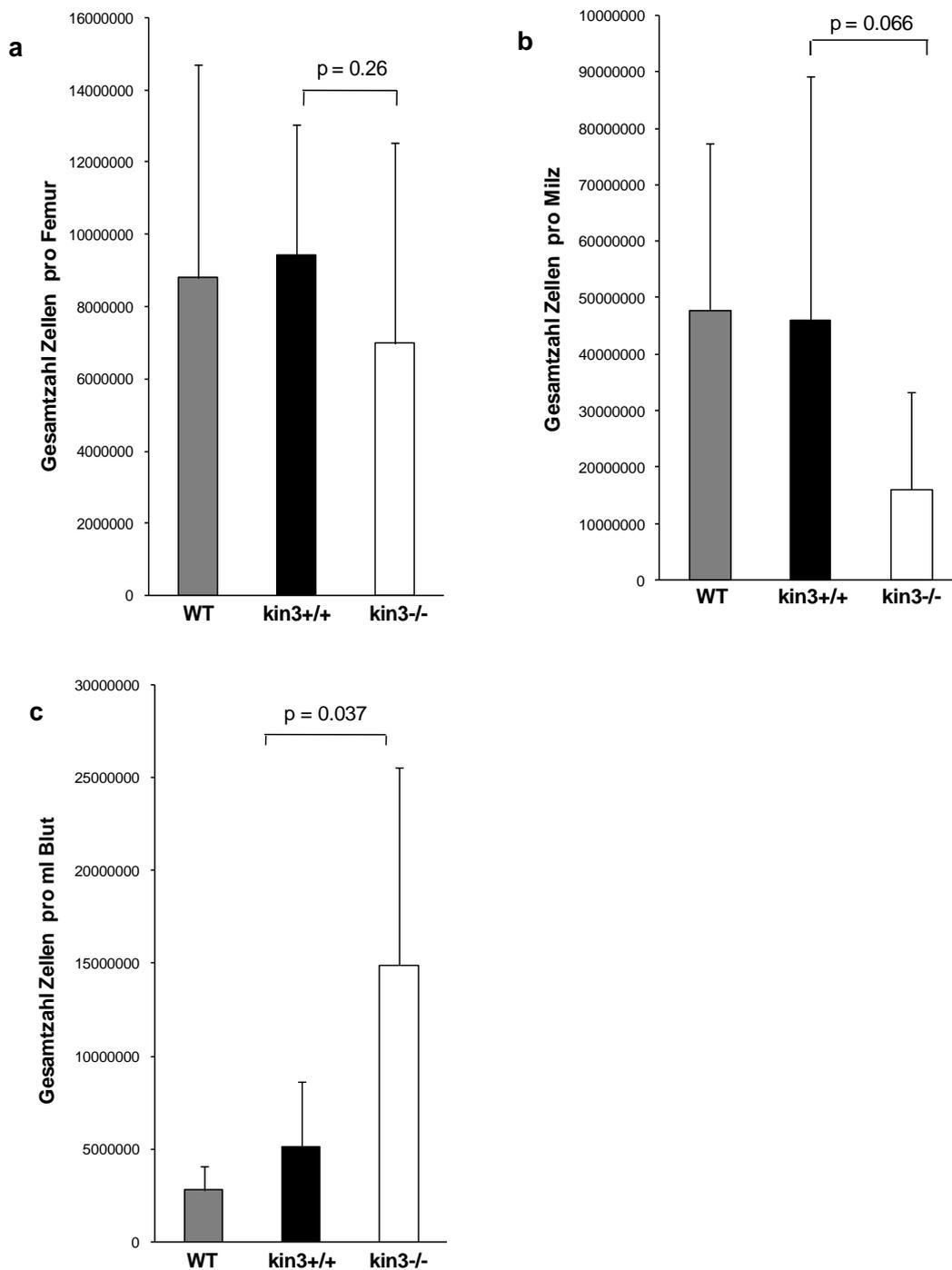


Abb. 21: Absolutzahl lebender Zellen in den untersuchten Kompartimenten

Dargestellt ist jeweils die Gesamtzahl lebender Zellen nach Erylyse, ermittelt durch Färbung mit Trypanblau-Lösung und Auszählung in der Neubauer-Zählkammer im Durchlichtmikroskop. Arithmetisches Mittel mit Standardabweichung. **a)** Gesamtzellzahl pro Femur. kin3+/+: n=10; kin3-/-: n=10. **b)** Gesamtzellzahl pro Milz. kin3+/+: n=10; kin3-/-: n=10. **c)** Gesamtzellzahl pro ml Blut. kin3+/+: n=8; kin3-/-: n=8.

3.4. Visualisierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im murinen Knochenmark mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie

3.4.1 Untersuchung 18h nach Injektion

Ziel dieser Versuchsreihe war es zum einen festzustellen, ob und wenn ja, wie viele, HSPC sich 18h nach Injektion in die Schwanzvene im Knochenmark der Schädelkalotte des Empfängertiers befinden, zum anderen sollte auch ihr Verhalten in selbigem untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Geschwindigkeit der Zellbewegung im Interstitium sowie auf den Abstand zum nächstgelegenen Gefäß und zum Endost gelegt. Verglichen wurden wiederum HSPC aus Kindlin3-Knockout-Chimären sowie aus Wildtyp-Chimären.

Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, mittels Durchflusszytometrie sortiert (lin-, c-kit+, Sca-1+) und anschließend mit CMTMR gefärbt. Die Injektion der jeweils ca. 200000 Zellen in die Schwanzvene der mit 9,5Gy bestrahlten C57/Bl6-Wildtypen erfolgte 18h vor Beginn der Aufnahmen mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop. Untersucht wurden alle vier Quadranten, die sich aus der Kreuzung der venösen Sinus ergeben, bis zu einer Tiefe von jeweils ca. 300µm. Zur Sichtbarmachung der Gefäße wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn FITC-Dextran appliziert.

Es zeigte sich bereits während des Mikroskopierens ein Unterschied in Bezug auf die Zahl der transmigrierten Zellen. Es fanden sich bei den HSPC der Wildtyp-Chimären pro 100000 injizierte Zellen im Schnitt 7,25 Zellen im Knochenmarksinterstitium, bei den HSPC der Knockout-Chimären im Durchschnitt 1,24 Zellen. Dieser Unterschied war hochsignifikant (siehe Abb. 22, Abb. 23).

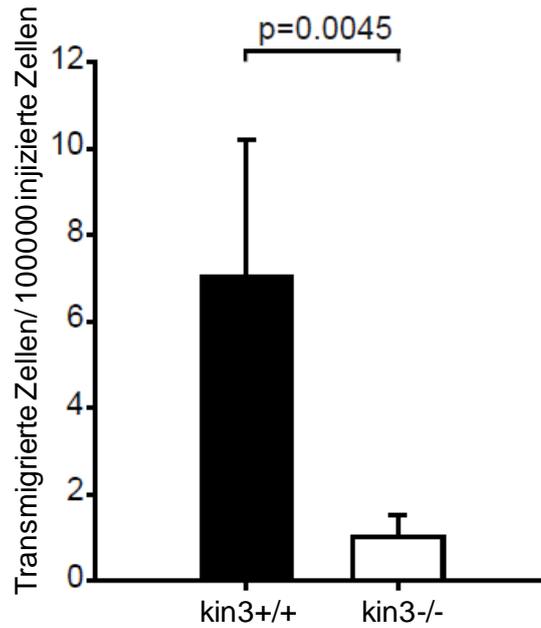


Abb. 22: Anteil transmigrierter Zellen pro 100000 injizierte Zellen

Dargestellt ist jeweils die Anzahl ins Interstitium transmigrierter Zellen pro 100000 in die Schwanzvene injizierte Zellen für Wildtyp-Chimären bzw. Kindlin-3-Knockout-Chimären. Mittelwert ± Standardabweichung. n=4 für kin3+/+; n=5 für kin3-/-.

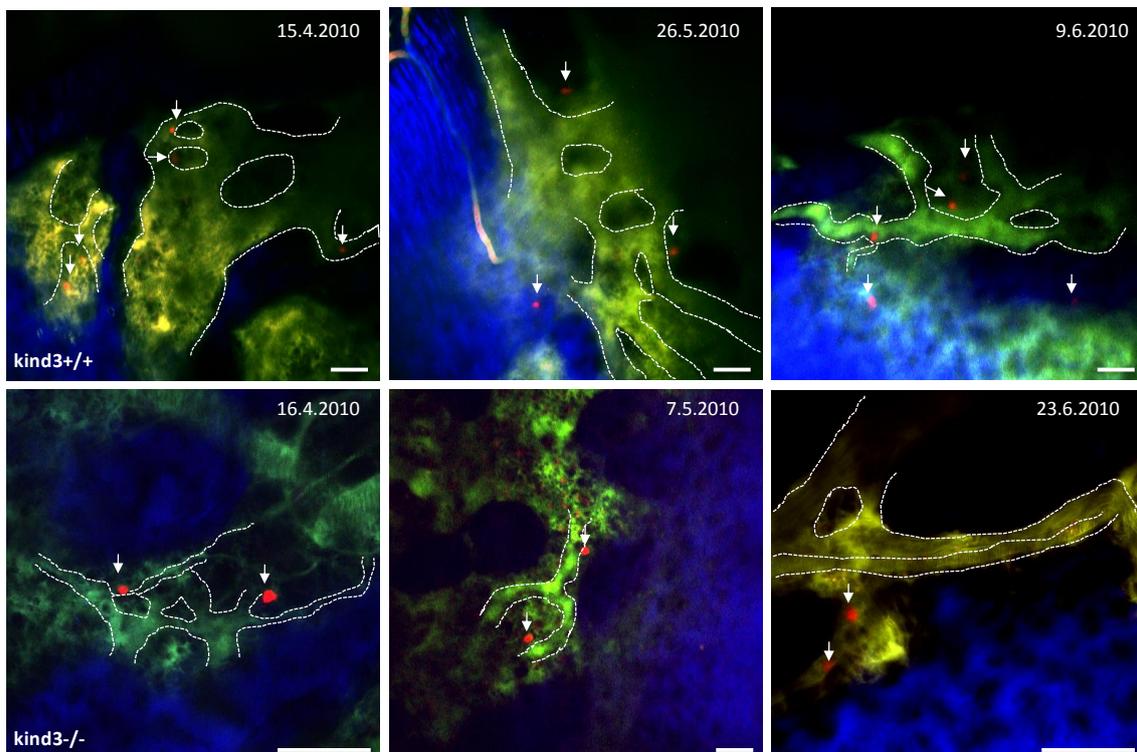


Abb. 23: HSPC im Interstitium 18h nach Injektion

Repräsentative Aufnahmen von HSPC aus Wildtyp-Chimären (obere Reihe) bzw. Knockout-Chimären (untere Reihe) 18h nach Injektion in die Schwanzvene. Gezeigt werden jeweils Aufnahmen aus drei Versuchen. Die Zellen befinden sich im Interstitium. HSPC rot (CMTMR);

Knochen blau (*Second Harmonic Signal*); Plasma grün (FITC-Dextran). Die Pfeile markieren HSPC. Die Balken rechts unten im Bild entsprechen 100µm.

Als nächstes wurde untersucht, mit welcher Geschwindigkeit sich die HSPC jeweils im Interstitium bewegen. Hierzu wurden die am Zwei-Photonen-Mikroskop erstellten Videos mit der Volocity® Software ausgewertet und die von den HSPC zurückgelegte Strecke (in µm) pro Zeit erfasst. Für die HSPC aus Wildtyp-Chimären ergab sich eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 57µm/h, während sich die HSPC aus Knockout-Chimären fast doppelt so schnell bewegten (Durchschnittsgeschwindigkeit: 118,8µm/h) (siehe Abb. 24).

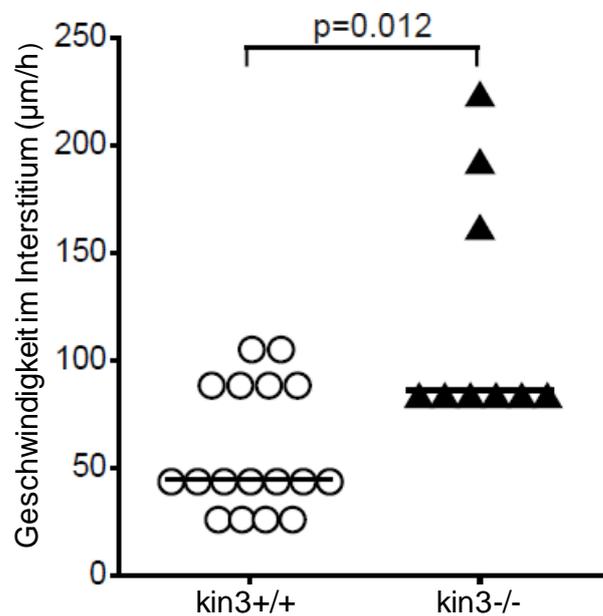


Abb. 24: Geschwindigkeit der HSPC im Knochenmarksinterstitium

Dargestellt ist jeweils die Geschwindigkeit der Zellen im Knochenmarksinterstitium in µm/h für HSPC aus den Wildtyp-Chimären bzw. Kindlin-3-Knockout-Chimären 18h nach Injektion in die Schwanzvene. Jedes Symbol repräsentiert eine einzelne Zelle (Kreise: kin3+/+; Dreiecke: kin3-/-). Die Linien entsprechen dem Median. n=4 für kin3+/+; n=5 für kin3-/-.

Die Bestimmung des Abstands der HSPC zum nächstgelegenen Gefäß innerhalb des Knochenmarks erfolgte ebenfalls durch manuelle Abstandsmessung mittels Volocity®. Gemessen wurde jeweils der geringstmögliche Abstand. Es ergab sich hierbei ein Durchschnittsabstand von 8µm bei den HSPC aus Wildtyp-Chimären gegenüber 7µm bei den HSPC aus Knockout-Chimären.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei den Abstandsmessungen zum Endost, die ebenfalls mittels Volocity® durchgeführt wurde. Der Abstand zum Endost bei den HSPC aus

Wildtyp-Chimären betrug im Durchschnitt 21 μ m, bei den HSPC aus den Knockout-Chimären ca. 19 μ m (siehe Abb. 25).

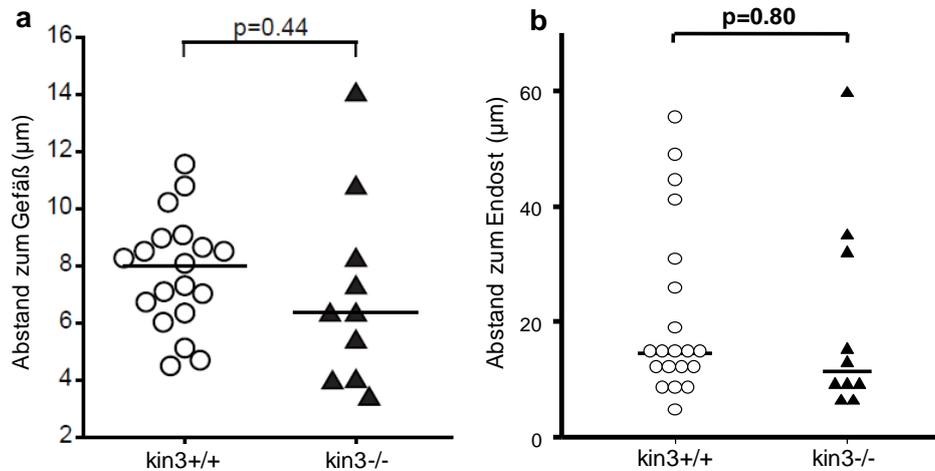


Abb. 25: Abstand der interstitiellen HSPC zum Gefäß bzw. zum Endost

a) Dargestellt ist jeweils der Abstand der einzelnen Zellen zum nächstgelegenen Knochenmarksgefäß in μ m, für HSPC aus den Wildtyp-Chimären bzw. Kindlin-3-Knockout-Chimären 18h nach Injektion in die Schwanzvene.

b) Dargestellt ist jeweils der Abstand der einzelnen Zellen zum Endost in μ m, für HSPC aus den Wildtyp-Chimären bzw. Kindlin-3-Knockout-Chimären 18h nach Injektion in die Schwanzvene. Jedes Symbol repräsentiert eine einzelne Zelle (Kreise: kin3+/+; Dreiecke: kin3-/). Die Linien entsprechen dem Median. n=4 für kin3+/+; n=5 für kin3-/.

3.4.2 Untersuchung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen 0-6h nach Injektion

Aus den Ergebnissen der 18h-Versuche ergab sich, dass weniger Kindlin3-Knockout-HSPC im Knochenmarkinterstitium vorhanden sind als HSPC aus Wildtyp-Chimären. Ob die geringe Zahl durch eine schlechtere Immigration erklärt wird, sollte im nächsten Experiment geklärt werden. Dazu erfolgte die Visualisierung der HSPC unmittelbar bei ihrer Ankunft in den Gefäßen des Schädelknochenmarks.

Hierzu wurden die HSPC wiederum jeweils aus Kindlin3-Knockout-Chimären und Wildtyp-Chimären durchflusszytometrisch sortiert (lin-, c-kit+, Sca-1+) und mit CMTMR als CellTracker® gefärbt (jeweils n=5). Als Empfängertiere dienten mit 9,5Gy bestrahlte C57/Bl6-Wildtypen. Die Applikation der Zellen und des Plasmafärbestoffs FITC-Dextran erfolgte über einen in der A. carotis externa liegenden Katheter (siehe 2.3.2.3), die Knochenmarksgefäße wurden analog zu den 18h-Versuchen dargestellt. Diese Versuchsanordnung erlaubte es, die HSPC direkt nach der Applikation in den Gefäßen sichtbar zu machen und ihr Verhalten am Gefäßendothel zu beurteilen. Von besonde-

rem Interesse war hier, wie viele der gespritzten Zellen jeweils längerfristig an der Gefäßwand adhäreren. Es zeigte sich bereits unter Sicht, dass die HSPC aus den Kindlin3-Knockout-Chimären weniger adhärent waren, als die HSPC aus den Wildtyp-Chimären. Bei der statistischen Auswertung ergab sich entsprechend ein hochsignifikanter Unterschied beim Anteil der adhärennten Zellen an den insgesamt visualisierten Zellen (83,5% für HSPC aus Wildtyp-Chimären vs. 20,3% für Kindlin3-Knockout-Chimären), wobei die Zahlen bei den Kindlin3-Knockout-Chimären deutlich unter denen der Wildtyp-Chimären lagen (n=48 vs. n =139) (siehe Abb. 26, Abb. 27).

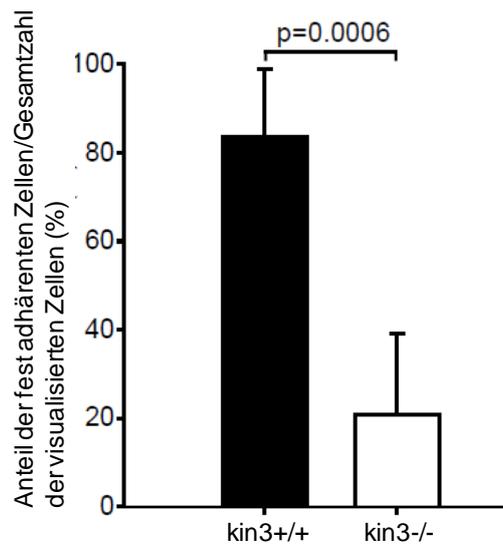


Abb. 26: Anteil an der Gefäßwand adhärennter HSPC an allen visualisierten HSPC

Dargestellt ist der Anteil an fest am Gefäßendothel adhärennten HSPC an der Gesamtzahl der im Zwei-Photonen-Mikroskop visualisierten HSPC in den ersten 6 Stunden nach Injektion in die A. carotis externa. Mittelwert \pm Standardabweichung. n=5 für kin3+/+; n=5 für kin3-/-.

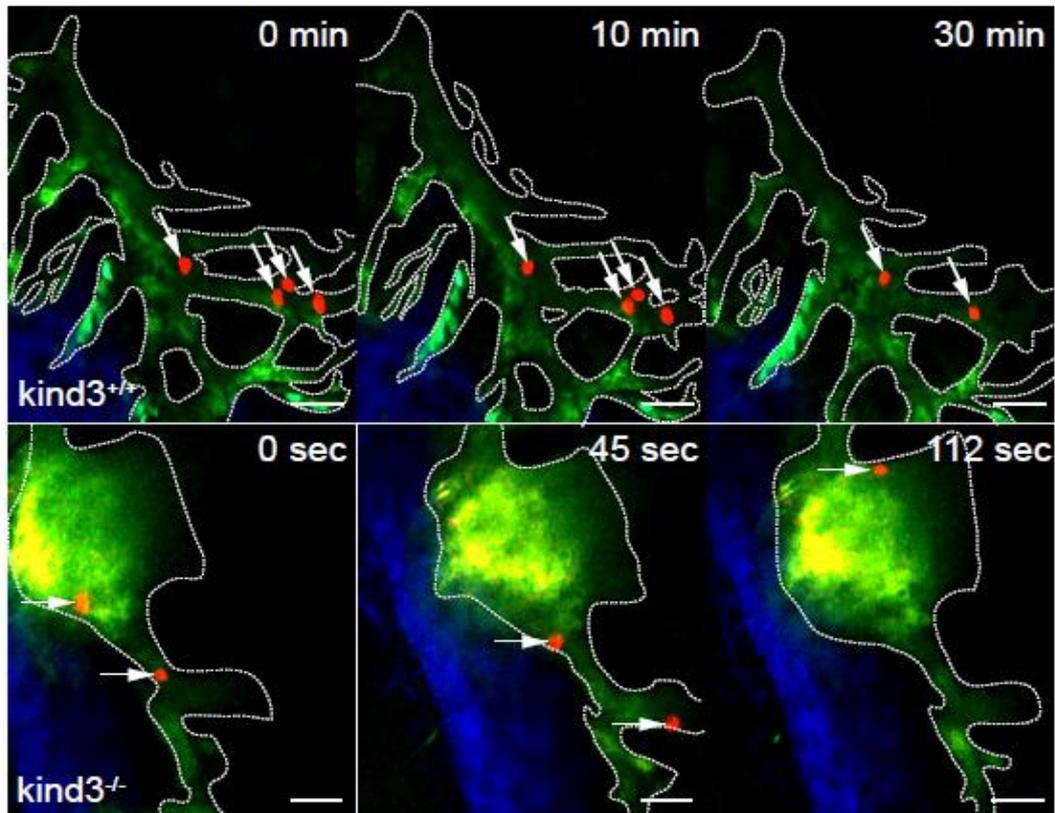


Abb. 27: Visualisierung der HSPC zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraarterieller Injektion

Repräsentative Aufnahmen adhärenter HSPC aus Wildtyp-Chimären (obere Reihe) und Knock-out-Chimären (untere Reihe) zu unterschiedlichen Zeitpunkten unmittelbar nach der intraarteriellen Injektion. HSPC rot (CMTMR); Knochen blau (*Second Harmonic Signal*); Plasma grün (FITC-Dextran). Die Pfeile markieren einzelne HSPC. Die Balken rechts unten im Bild entsprechen 100µm.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1.1 Bestimmung des Anteils an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in den drei Kompartimenten Knochenmark, Milz und Blut mittels Colony Forming Unit-Assays

In den Ergebnissen dieser Versuchsreihe zeigte sich eine leicht, aber nicht signifikant erniedrigte Konzentration von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark der Kindlin3-Knockout-Chimären, während der Anteil in Milz und Blut jeweils höher lag als bei den Wildtyp-Chimären. Auch dieses Ergebnis erreichte nicht das Signifikanzniveau.

4.1.2 Bestimmung der Anteils an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in den drei Kompartimenten Knochenmark, Milz und Blut mittels Durchflusszytometrie

In der Fluoreszenz-gestützten, durchflusszytometrischen Analyse der HSPC-Anteile fand sich ein ähnliches Bild wie bei den CFU-Assays, allerdings lag in diesem Fall der prozentuale Anteil an HSPC im Knochenmark der Kindlin3-Knockout-Chimären über demjenigen der Wildtyp-Chimären. Die Absolutzahlen lagen jedoch knapp unter denen der Kontroll-Tiere. Die Ergebnisse für Milz und Blut hingegen entsprachen in etwa denjenigen aus den Versuchen in der Zellkultur und zeigten erhöhte HSPC-Zahlen bei den Kindlin3-Knockout-Chimären. Auffällig war der signifikant niedrigere, prozentuale Gehalt an putativen Longterm-HSPC, die innerhalb der oben genannten Gruppe die Differenzierungsmarker CD34 und Flk-2 nicht exprimieren, im Knochenmark der Kindlin3-Knockout-Chimären. Insgesamt zeigen sich also erhöhte Anteile an HSPC in den peripheren Kompartimenten bei vergleichbaren Zellzahlen im Knochenmark.

4.1.3 Untersuchung des Verhaltens der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in murinen Knochenmarksgefäßen in vivo mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie 18h nach Injektion

Bei der Visualisierung der gefärbten HSPC im Knochenmarksinterstitium der bestrahlten Empfängertiere 18h nach Injektion in die Schwanzvene zeigte sich, dass sich signifikant weniger Zellen aus Kindlin3-Knockout-Chimären im Knochenmarksinterstitium befanden als Zellen aus Wildtyp-Chimären. Die im Interstitium befindlichen Kindlin3-Knockout-Zellen bewegten sich deutlich schneller. In Bezug auf die Abstände zum nächstgelegenen Gefäß bzw. dem Endost, fielen keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf.

4.1.4 Untersuchung des Verhaltens der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in murinen Knochenmarksgefäßen in vivo mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie 0-6h nach Injektion

Bei der darauffolgenden Darstellung der HSPC unmittelbar bei Ankunft in den Knochenmarksgefäßen und bis zu 6h danach fiel insbesondere das überwiegende Unvermögen der Kindlin3-Knockout-Zellen im Vergleich zu aus Wildtyp-Chimären isolierten Zellen auf, fest ans Gefäßendothel zu adhären.

4.2. Methodendiskussion

4.2.1 Bestimmung des Gehalts an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in verschiedenen Kompartimenten mittels CFU-Assay und Durchflusszytometrie

Der Einsatz spezieller Nährböden zur Isolierung und Anreicherung muriner, hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen *in vitro* ist ein etabliertes Verfahren, das zunächst mit Hilfe sogenannter Feeder-Layer durchgeführt wurde (Till and Mc, 1961, Bradley and Metcalf, 1966). Im Verlauf kam es zur Entwicklung spezieller Nährmedien, die die Feeder-Layer ablösen und mittlerweile fester Bestandteil der Arbeit mit hämatopoetischen Stammzellen in der Zellkultur sind (Miller and Lai, 2005, Sarma et al., 2010, Wognum et al., 2013)

In der vorliegenden Arbeit wurden Knochenmark, sowie Milz und Blut als periphere Kompartimente auf ihren Gehalt an HSPC hin untersucht. Die Kolonien wurden nach 7 Tagen Inkubation ausgezählt und von diesen Zahlen auf den Anteil der HSPC an den Zellen des gesamten Organs, bzw. 1ml Blut geschlossen. Diese Methode unterliegt

insofern einer gewissen Subjektivität, als unter Umständen Differenzen bei der Zählung der Kolonien durch die jeweiligen Untersucher vorliegen könnten. Dieser Aspekt wurde jedoch durch stete Kontrolle mittels einer zweiten Zählung eingedämmt. Ein weiterer Punkt ist die mangelnde Charakterisierung der kultivierten Zellen im Hinblick auf Leukozytensubpopulationen. Für einen ersten Hinweis auf mögliche Unterschiede bei der Verteilung der HSPC auf die jeweiligen Kompartimente, an den sich dann weitere Untersuchungen anschlossen, war der CFU-Assay durchaus geeignet.

Die durchflusszytometrische Bestimmung des Gehalts an HSPC in unterschiedlichen Organen ist ebenfalls eine bereits bewährte Methode. Zellen mit zahlreichen Kombinationen an Oberflächenmolekülen können auf diese Weise genau selektiert und aufgereinigt werden. Zellen, die keine Lineage-Marker, dafür jedoch Sca-1 und c-kit (CD117) exprimieren werden als LSK-Zellen bezeichnet und gelten in der Durchflusszytometrie als klassische pluripotente Stamm- und Progenitorzellen (Morrison and Weissman, 1994). Innerhalb dieser Population erfolgt die Differenzierung in Short-Term- und Long-Term-HSPC mittels weiterer Oberflächenmarker. Hier sind v.a. Flk-2 (CD135) (Christensen, 2001) sowie CD34 (Osawa et al., 1996) zu nennen, die von Long-Term-HSPC jeweils noch nicht exprimiert werden. Die Auftrennung in Short- und Long-Term-HSPC wurde jedoch nur mit wenigen Experimenten überprüft (n=4 pro Kompartiment). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen sowohl bei der durchflusszytometrischen Analyse ihrer Anzahl als auch bei der Sortierung zur späteren Injektion in die Maus nach etablierten Protokollen gefärbt (Lin and Goodell, 2011), die Auswertung der Rohdaten erfolgte ebenfalls anhand standardisierter Methoden. Somit wurde eine größtmögliche Verlässlichkeit der Ergebnisse erzielt.

Zwei problematische Aspekte müssen in diesem Kontext erwähnt werden. Zum einen sorgt die geringe Anzahl an Experimenten bei den jeweiligen Assays für eine sehr breite Streuung der Ergebnisse: so kann bereits ein Tier in schlechtem Gesundheitszustand und möglicherweise dadurch bedingt veränderten Zellzahlen bei insgesamt vier Versuchen eine hohe Standardabweichung bedingen und dadurch die Signifikanz der Daten schwächen.

Zum anderen wurde in der vorliegenden Arbeit mit Stamm- und Progenitorzellen (LSK-Zellen) anstelle von reinen Stammzellen gearbeitet, folglich mit einer Population, die mit weiteren Oberflächenmarkern, beispielsweise aus der Familie der SLAM-Marker, noch spezifischer charakterisiert und aufgereinigt werden könnte (Kiel et al., 2005, Morita et al., 2010). Grund für die Wahl dieser Zellpopulation war, dass für die Darstellung von ca. 10 Zellen im Knochenmark der Schädelkalotte mittels der Zwei-Photonen-Mikroskopie mindestens 10000 Zellen injiziert werden müssen; dies entspricht in etwa

dem Ergebnis der durchflusszytometrischen Isolierung der Zellen von vier Tieren (Lo Celso et al., 2011). Bei der Untersuchung möglichst reiner, hämatopoetischer Stammzellen wäre die Isolierung von maximal 1000 Zellen pro Tier realistisch und somit kaum ausreichend für die Darstellung im Zwei-Photonen-Mikroskop (Schroeder, 2010).

4.2.2 Visualisierung des murinen Knochenmarks und injizierter hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Zwei-Photonen-Mikroskop

Der 1990 von Denk et al. erstmals beschriebene Einsatz des Zwei-Photonenmikroskops führte zu einer breiten Anwendung im Bereich der biomedizinischen Forschung, da die Multi-Photonen-Mikroskopie im Vergleich zur länger etablierten konfokalen Mikroskopie zahlreiche Vorteile bietet, die unter 2.3.1 bereits ausführlich dargelegt wurden (Denk et al., 1990, Rubart, 2004).

Zur Darstellung des Knochenmarks innerhalb der murinen Schädelkalotte *in vivo* sowie auch injizierter und gefärbter HSPC kam diese Methode 1998 zum ersten Mal bei Mazo et al. zum Einsatz und konnte sich in der Folge nicht nur bei dieser speziellen Fragestellung durchsetzen (Mazo et al., 1998, Mazo and von Andrian, 1999). Die Schädelkalotte eignet sich besonders gut, da aufgrund der dünnen Knochenschicht und der hohen Eindringtiefe des Zwei-Photonen-Mikroskops im Gegensatz zur Untersuchung des Femur-Knochenmarks kein vorheriges Anbohren des Knochens oder das Einführen einer endoskopischen Sonde nötig ist. Die Applikation des Plasma-Farbstoffs FITC-Dextran sowie der sortierten und gefärbten HSPC und die Nutzung des *Second Harmonic Signals* zur Untersuchung des Verhaltens der Zellen in den Knochenmarksgefäßen und im Interstitium wurde auch von Lo Celso et al. aufgegriffen und weiterentwickelt (Lo Celso et al., 2008, Lo Celso et al., 2011).

Allerdings dürfen auch die möglichen Fehlerquellen nicht unerwähnt bleiben. Es ist unklar, inwieweit sich die Erkenntnisse, die aus der Beobachtung des Knochenmarkraums der Schädelkalotte gewonnen werden, auf andere Bereiche, v.a. die Markräume der langen Röhrenknochen, übertragbar sind. Lo Celso und Kollegen konnten zeigen, dass die beiden Knochenmarksräume bezüglich Dichte an HSPC und Repopulationspotential der Zellen vergleichbar sind, Unterschiede bei der Visualisierung jedoch nicht ausschließen (Lo Celso et al., 2008). Darüber hinaus kann aktuell noch nicht ausgeschlossen werden, dass die vorherige Bestrahlung der Empfängertiere, die Transplantation der HSPC oder der Imaging-Prozess selbst einen Einfluss auf das Verhalten der

HSPC in den Knochenmarksgefäßen und dem Interstitium hat. So wurde gezeigt, dass durch die letale Bestrahlung der Empfängertiere die Knochenmarksgefäße hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit für kleinste Partikel, nicht aber für Zellen, kompromittiert werden (Lo Celso et al., 2008).

Zusammenfassend kann jedoch festgestellt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete Zwei-Photonen-Mikroskopie sich auf dem Gebiet der Visualisierung des Markraums der Schädelkalotte, seiner Gefäße und von Zellen auf Einzelzell-Niveau als valide Methode etabliert hat (Lo Celso et al., 2011, Mazo and von Andrian, 1999).

4.2.3 Intravenöse und intraarterielle Injektion der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Sowohl die intravenöse als auch die intraarterielle Applikation der mittels Durchflusszytometrie sortierten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen sind in der Literatur beschrieben (Mazo and von Andrian, 1999, Lo Celso et al., 2011) und zur Sichtbarmachung eben jener Zellen im Knochenmark der Schädelkalotte erfolgreich angewandt worden. Während die intravenöse Injektion – wahlweise in die Schwanzvene oder den retroorbitalen Venenplexus der Maus – vergleichsweise rasch und ohne den größeren Aufwand einer Operation des Tieres durchgeführt werden kann, ist bei der intraarteriellen Injektion in die A. carotis communis das Legen eines Katheters notwendig. Die intravenöse Injektion birgt das Risiko, dass der große Teil der Zellen zunächst im pulmonalen Kapillarnetz verbleibt und somit das Imaging im Knochenmark unmittelbar nach der Injektion erschwert wird. Die intraarterielle Injektion ist mit einem größeren OP-Risiko für das Empfängertier verbunden und technisch anspruchsvoller, führt jedoch zu höheren Zellzahlen im Knochenmark, da auf dem Weg dorthin keine Kapillaren passiert werden müssen. Ein weiterer Vorteil ist, dass über den liegenden Katheter gegebenenfalls auch FITC-Dextran nachinjiziert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst beide Methoden auf ihre Vorteile bei den 18h- respektive 0-6h-Versuchen hin verglichen. Es zeigte sich, dass die intravenöse Injektion bei Visualisierung 18h danach gute Ergebnisse mit adäquat hohen Zellzahlen bei minimalem Risiko brachte. Der Versuch, die Ankunft der Zellen im Knochenmark unmittelbar (0-6 Stunden) nach intravenöser Applikation darzustellen, verlief wenig erfolgreich. Die intraarterielle Injektion wurde insofern zunächst modifiziert, als die A. carotis interna ligiert wurde und der Katheter über die Bifurkation hinaus in die A. caro-

tis externa, die das Knochenmark über einen ihrer Endäste, die A. meningeae, versorgt, geschoben wurde. Ziel war es, einen übermäßigen Verlust an Zellen im hirnversorgenden Gefäßnetz zu vermeiden. Diese Variante der bereits etablierten Operation führte zu sehr guten Ergebnissen bei der Visualisierung der Zellen in den 0-6h-Versuchen. Für die 18h-Versuche war sie insofern nicht geeignet, als weder ein Entfernen des Katheters mit Verschluss der Arterie noch das Belassen desselben über 18h praktikabel und tiermedizinisch vertretbar war.

Schlussfolgernd ist die intravenöse Injektion für eine Darstellung der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt besser geeignet, während die intraarterielle Injektion vor allem bei der unmittelbaren Visualisierung der Zellen von Vorteil zu sein scheint.

4.3. Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

4.3.1 Anteil an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in den CFU-Assays und der Durchflusszytometrie

In beiden Versuchsreihen zeigten sich vergleichbare oder leicht erniedrigte Anteile an HSPC im Knochenmark der Kindlin3-Knockout-Chimären im Vergleich zu den Wildtyp-Chimären bei erhöhten Zellzahlen in Milz und Blut. Der prozentuale Anteil an LT-HSPC im Knochenmark der Kindlin3-Knockout-Chimären war signifikant niedriger als bei den Wildtyp-Chimären.

Ein möglicher Erklärungsansatz wäre eine diskret eingeschränkte Homing-Kapazität derjenigen HSPC, die kein Kindlin3 exprimieren. Alternativ muss auch an eine Störung der Nischenfindung im Knochenmark bei weitgehend intaktem Homing gedacht werden. Beide Theorien würden sowohl die leicht verminderte HSPC-Zahl im Knochenmark als auch die erhöhten Zellzahlen in der Peripherie erklären. Auf eine Störung der Einnischung könnte auch der niedrige Anteil an LT-HSPC hindeuten, da der Übergang der HSPC in dieses Ruhestadium von Faktoren der Nische abhängig ist (Schofield, 1978).

Wie bereits eingangs erläutert, scheint bei HSPC vor allem das Integrin VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) eine entscheidende Rolle zu spielen (Mazo et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe eines gegen VLA-4 gerichteten Antikörpers vor Transplantation von HSPC zu erhöhten Zellzahlen in Blut und Milz bei geringeren Zahlen im Knochenmark führte (Papayannopoulou et al., 1995). Auch der Verbleib in letztgenanntem Kompartiment innerhalb einer Nische scheint - unter anderen - von VLA-4 beeinflusst zu wer-

den. So konnte gezeigt werden, dass transplantierte HSPC vor allem in perivaskuläre Nischen homen, in denen die Expression von CXCL12, einem Chemokin, das für die *inside-out*-Aktivierung von VLA-4 sorgt, erhöht ist (Sipkins et al., 2005). Außerdem fand sich bei leukämischen Blasten mit einer Überexpression von VLA-4 eine verstärkte Adhäsion an Fibronectin innerhalb des Knochenmarks (Matsunaga et al., 2003). Die verstärkte Mobilisierung von HSPC aus dem Knochenmark durch den *small molecule inhibitor* BIO5192, der die Verbindung VLA-4/VCAM-1 unterbricht, soll in diesem Zusammenhang ebenfalls nochmals erwähnt werden, sowie auch die *in vitro* bestätigte Wirksamkeit des *small molecule agonist* an VLA-4, THI0019 (Ramirez et al., 2009, Vanderslice et al., 2013).

Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, hinter dem in dieser Arbeit bei den Kindlin3-Knockout-HSPC vermuteten Problem bei der Nischenfindung eine Störung auf Ebene der Interaktion zwischen dem Integrin-Co-Aktivator Kindlin3 und VLA-4 anzunehmen. Auf die Auswirkungen auf den Homing-Prozess als solchen soll im folgenden Punkt näher eingegangen werden.

4.3.2 Visualisierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen *in vivo* im Zwei-Photonen-Mikroskop 18h und 0-6h nach Injektion

Bei der Darstellung des Knochenmarksinterstitiums 18h nach Injektion fiel auf, dass sich signifikant weniger HSPC aus Kindlin3-Knockout-Chimären fanden als HSPC aus Wildtyp-Chimären. Außerdem bewegten sich erstgenannte deutlich schneller innerhalb des Interstitiums. Bei der Visualisierung der Ankunft der Zellen in den Knochenmarksgefäßen zeigten sich eindeutige Einschränkungen der Kindlin3-Knockout-HSPC bei der festen Adhärenz an das Endothel.

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Transmigration durch das Endothel der Knochenmarksgefäße für HSPC, die Kindlin3 nicht exprimieren, grundsätzlich möglich ist. Allerdings lassen die Daten aus den Versuchen mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop auf eine Störung der initialen Adhärenz an die Gefäßwand schließen. Die erhöhte Geschwindigkeit der HSPC aus Kindlin3-Knockout-Chimären im Interstitium könnte, ebenso wie die Daten aus der Durchflusszytometrie, auf eine gestörte Einnischung der Zellen im Knochenmark hindeuten.

Bezüglich der Fähigkeit zur Überwindung der Endothel-Barriere unterscheiden sich die HSPC drastisch von Leukozyten mit dem entsprechenden Gendefekt. Es wurde nach-

gewiesen, dass Neutrophile ohne Kindlin3 zu fester Adhäsion und Arrest auf dem Endothel sowie zur Transmigration nicht fähig sind und dass diese Einschränkung bei Patienten mit LADIII zu schweren, infektionsbedingten Komplikationen führt (Moser et al., 2009a, Svensson et al., 2009). Entscheidend für die Adhäsion und Extravasation von Leukozyten ist LFA-1, ein β_2 -Integrin, für welches gezeigt werden konnte, dass seine Funktionsfähigkeit durch den Verlust von Kindlin3 stark herabgesetzt wird (Manevich-Mendelson et al., 2009, Feigelson et al., 2011).

Doch wie bereits erläutert, scheint das Integrin VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) bei HSPC die entscheidendere Rolle zu spielen (Mazo et al., 2011). Zum einen ist die Expression dieses β_1 -Integrins auf HSPC höher als diejenige von β_2 (Voura et al., 1997). Zum anderen zeigten HSPC von Mäusen, bei denen β_2 -Integrine ausgeknockt wurden, kein gestörtes Homing-Verhalten, während die Inaktivierung von VLA-4 zu einem um ca. 40% verminderten Homing führte (Papayannopoulou et al., 2001).

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass HSPC, die kein Kindlin3 exprimieren, nur eingeschränkt zu fester Adhäsion am Endothel und zur Transmigration durch selbiges fähig sind. Eine bereits erwähnte Arbeit von Manevich-Mendelson et al. untersuchte, inwieweit die Abwesenheit von Kindlin3 die Funktion von LFA-1 und VLA-4 bei Lymphozyten beeinträchtigt. Es zeigte sich, dass SDF-1 α (=CXCL12) auch bei Zellen, die kein Kindlin3 exprimieren, zur Verbindung von VLA-4 mit VCAM-1 im Sinne eines *inside-out-Signaling* führt, dass diese Verbindung jedoch in der Folge weniger stabil und dauerhaft war, als diejenige bei Wildtypen. Dass *outside-in-Signaling* nach Bindung an VCAM-1 unter *Shear Flow* war bei Lymphozyten nicht merklich beeinträchtigt (Manevich-Mendelson et al., 2009).

Diese Ergebnisse wurden weiter bestätigt durch Versuche, die zeigen konnten, dass in Monozyten, in welchem die Transkription des Gens, das für Kindlin3 kodiert, durch *small interfering RNA* (siRNA) ausgeschaltet wurde, die Bindung von VLA-4 an VCAM-1 in Anwesenheit von SDF-1 α nicht signifikant reduziert wurde. Die Dauer der Adhäsionskontakte war jedoch deutlich kürzer (<1s) als bei den Kontrollen. Gefolgert wurde daraus, dass Kindlin3 vor allem für die Festigung des Adhäsionskontaktes nach Chemokin-induzierter Affinitätsänderung des $\alpha_4\beta_1$ -Integrins und Bindung von VLA-4 an VCAM-1 verantwortlich sein könnte (Hyduk et al., 2011).

Inwiefern diese Ergebnisse auch auf die Stammzellen der hämatopoetischen Reihe übertragbar sind, wurde bisher nicht untersucht. Unter der Prämisse, dass sich VLA-4 und Kindlin3 hier jedoch ähnlich zueinander verhalten, erscheinen die folgenden Annahmen plausibel.

Die injizierten Kindlin3-Knockout-HSPC sind zu kurzen, wahrscheinlich Chemokin-induzierten Kontakten zum Gefäßendothel über die Verbindung VLA-4/VCAM-1 fähig. Im Anschluss an diesen ersten Adhäsionskontakt kommt es jedoch nur bei einer Minderheit der HSPC zu einer Stabilisierung dieses Kontaktes und einem dauerhaften Arrest auf dem Gefäßendothel sowie zur Transmigration durch selbiges. Die übrigen Zellen lösen sich wieder von der Gefäßwand und zirkulieren erneut durch die Peripherie. Innerhalb des Knochenmarksinterstitiums können die transmigrierten HSPC nur zum Teil in ihre Nische finden, da auch der Kontakt zu den Zellen, die die Nische bilden, sowie zur extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Fibronectin, zumindest zum Teil von einem stabilen, über VLA-4 vermittelten Kontakt, abhängig ist. Der verminderte Anteil an LT-HSPC – das Ruhestadium ist, wie oben erwähnt, von der Einnischung abhängig – sowie die erhöhte Geschwindigkeit der Zellbewegung im Interstitium könnte dadurch erklärt werden. Wenn man davon ausgeht, dass die transmigrierten Zellen mangels einer Nische in einem Stadium verbleiben, dass zu vermehrter Proliferation innerhalb des Knochenmarks führt, ergibt sich ein schlüssiges Bild, das sowohl die annähernd mit der Kontrollgruppe vergleichbaren Zellzahlen im Knochenmark als auch die erhöhten Zellzahlen in den peripheren Kompartimenten Blut und Milz erklären würde.

4.4. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit regen in vielerlei Hinsicht zu weiteren, tiefergehenden Untersuchungen des Verhaltens von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen an, die kein Kindlin-3 exprimieren. Zunächst wäre eine kompetitive Transplantation von HSPC aus Wildtyp- und Kindlin-3-Knockout-Chimären, jeweils unterschiedlich gefärbt, in ein letal bestrahltes Empfängertier denkbar. Eine Darstellung der Ankunft der Zellen im Knochenmark mittels des Zwei-Photonen-Mikroskops wäre insofern sinnvoll, als eventuelle äußere Einflussfaktoren, die das Homing-Verhalten beeinflussen könnten - Gesundheitszustand der Maus, der Imaging-Prozess selbst – auf beide Zellpopulationen gleichzeitig wirken würden und sich dadurch eine bessere Vergleichbarkeit ergäbe. Eine Untersuchung des Empfängerstiers 18h nach Injektion der HSPC würde die Visualisierung beider Populationen nebeneinander innerhalb des Interstitiums ermöglichen, kleinere Unterschiede im Verhalten könnten so gegebenenfalls klarer detektiert werden. Auch eine, sich eventuell an die Versuche unter dem

Mikroskop anschließende, durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks und peripherer Kompartimente in Bezug auf die Verteilung der Wildtyp- bzw. Knockout-Zellen erscheint sinnvoll.

Ein späterer Untersuchungszeitpunkt, beispielsweise vier Tage nach intravenöser Applikation der Zellen, könnte zu klareren Ergebnissen bezüglich der Einnischung der HSPC im Knochenmark führen und möglicherweise fänden sich hierbei deutlichere Unterschiede beim Abstand zu den Gefäßen und zum Endost als nach 18h. Bereits geplant ist eine genaue Untersuchung der Interaktion zwischen HSPC und Osteoblasten.

Die Vermutung, dass der ähnliche Gehalt an HSPC im Knochenmark von Wildtyp- und Kindlin-3-Knockout-Chimären durch ein eingeschränktes Ruhestadium in den Nischen und somit durch eine höhere Proliferationsrate der transmigrierten HSPC ohne Kindlin-3-Expression bedingt ist, sollte ebenfalls weiter untersucht werden. Denkbar wären hier durchflusszytometrische Assays zur Bestimmung des Stadiums des Zellzyklus, in welchem sich die Zellen befinden. Sowohl die Applikation des Thymidin-Analogons BrdU (5-Bromodeoxyuridin), welches in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut wird und konsekutiv durch fluoreszierende Antikörper im FACS detektiert werden kann, als auch die Färbung mit einem fluoreszierenden CellTracer®, dessen Intensität nach jeder Zellteilung sinkt, könnten weiteren Aufschluss bringen (Bohmer, 1979, Rothaeusler and Baumgarth, 2007, Nordon et al., 1999).

Schlussendlich könnte auch ein Versuchsaufbau, der die Ausschaltung des Gens, das für Kindlin-3 kodiert, *in vivo* erlaubt, weitere Erkenntnisse zum Verhalten der Zellen liefern. Ein Mausmodell, das dies ermöglicht, wäre die sogenannte Cre-LoxP-Maus, bei welcher das zu entfernende Gen von zwei spezifischen Sequenzen flankiert wird, welche wiederum von der Rekombinase Cre erkannt werden. Diese sorgt dafür, dass das Zielgen nicht mehr abgelesen wird, stattdessen wird ein Reporter-Gen, beispielsweise eGFP (*Green Fluorescent Protein*) exprimiert (Orban et al., 1992). Die Aktivität der Rekombinase Cre ist nicht unbedingt konstitutiv, sondern kann beispielsweise durch die Gabe des selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen zu einem bestimmten Zeitpunkt induziert werden (Feil et al., 1997). Ein solches Modell würde einen Vergleich des Verhaltens aller Zellen der hämatopoetischen Reihe vor und nach Ausschaltung von Kindlin-3 erlauben, ohne die Transplantation fetaler Lebern zur Entwicklung von Chimären notwendig zu machen.

5. Zusammenfassung

Hämatopoetische Stammzellen sind der Ausgangspunkt für die Bildung der zellulären Bestandteile des Blutes, folglich der Erythrozyten, der Thrombozyten und der Leukozyten. Diese Stammzellen erfüllen einen Teil ihrer Aufgaben innerhalb des Knochenmarks, können dieses Kompartiment jedoch auch verlassen und über die Blut- und Lymphgefäße in periphere, nicht lymphatische Gewebe migrieren, um eine Wächterfunktion innerhalb des Immunsystems zu übernehmen. Zudem sind sie in der Lage aus peripheren Geweben in das Knochenmark zurückkehren, ein Prozess, der auch als Homing bezeichnet wird. Diese Migrationsschritte sind auch von der Funktionsfähigkeit der Integrine abhängig, Moleküle, die beispielsweise für die Transmigration durch das Gefäßendothel von großer Bedeutung sind. Um voll funktionsfähig zu sein, müssen die Integrine aktiviert werden. Ein Molekül, das hierbei eine wichtige Rolle spielt, ist Kindlin3. Bekannt ist, dass es bei Kindlin3-Knockout-Mäusen zu massiven Defiziten in der Funktionsfähigkeit sowohl von Thrombozyten als auch Leukozyten kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss von Kindlin3 auf die Funktion, insbesondere auf das Homing, hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen, untersucht.

In der Zellkultur sowie auch in den durchflusszytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilung auf die drei Kompartimente Knochenmark, Milz und Blut zwischen Kindlin3-Knockout-Chimären und Wildtyp-Chimären insofern unterscheidet, als sich bei ähnlichen Zellzahlen im Knochenmark deutlich höhere Zellzahlen in der Milz und dem Blut fanden. Außerdem konnte ein signifikant geringerer Anteil an Long-term hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark der Kindlin3-Knockout-Chimären mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen *in vivo* mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie zeigten sich 18h nach Injektion markierter HSPC signifikant weniger Zellen aus Kindlin3-Knockout-Chimären im Interstitium des Knochenmarks; die in das Knochenmark gelangten Zellen aus Kindlin3-Knockout-Chimären bewegten sich auch signifikant schneller als diejenigen aus Wildtyp-Chimären. Bei der Darstellung der Adhärenz am Endothel der Knochenmarksgefäße 0-6h nach Injektion waren signifikant weniger HSPC aus Kindlin3-Knockout-Chimären zu fester Adhärenz am Gefäßendothel fähig als HSPC aus Wildtyp-Chimären.

Diese Ergebnisse zeigen, dass HSPC, die kein Kindlin3 exprimieren, im Gegensatz zu Leukozyten, grundsätzlich zur Transmigration durch das Endothel fähig sind. Es bestehen jedoch auch bei HSPC Einschränkungen, die vermutlich auf eine gestörte Interaktion zwischen dem $\alpha_4\beta_1$ -Integrin VLA-4 und Kindlin3 zurückzuführen sind. VLA-4 und

sein Ligand VCAM-1 sind bei HSPC von entscheidender Bedeutung, sowohl für die feste Adhäsion ans Endothel als auch für die Nischenfindung im Knochenmark selbst. Kindlin3 sorgt wohl vor allem für eine Stabilisierung des wahrscheinlich zunächst über Chemokine vermittelten Kontakts zwischen VLA-4 und VCAM-1 und ermöglicht damit die feste Adhäsion und konsekutiv die Transmigration durch das Gefäßendothel. Das Fehlen von Kindlin-3 wirkt vermutlich destabilisierend auf diese Verbindung. Innerhalb des Interstitiums unterstützt VLA-4 die Einnistung der HSPC in die Knochenmarksnischen, beispielsweise über den Kontakt zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin. Dadurch könnte die höhere interstitielle Wanderungsgeschwindigkeit der HSPC aus Kindlin3-Knockout-Chimären erklärt werden.

Es ist weiterhin unbekannt, ob und wie genau Kindlin-3 die Migration im Knochenmarksinterstitium und die Einnistung in das Knochenmark beeinflusst. Weiterhin ist die Wirkung der Kindlin-3-Defizienz auf das Verhalten der LT-HSPC unzureichend erforscht. Diese Aspekte müssen durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

- ADAMS, G. B. & SCADDEN, D. T. 2006. The hematopoietic stem cell in its place. *Nature Immunology*, 7, 333-337.
- ANTHIS, N. J., WEGENER, K. L., YE, F., KIM, C., GOULT, B. T., LOWE, E. D., VAKONAKIS, I., BATE, N., CRITCHLEY, D. R., GINSBERG, M. H. & CAMPBELL, I. D. 2009. The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J*, 28, 3623-32.
- BAKER, E. L. & ZAMAN, M. H. 2010. The biomechanical integrin. *J Biomech*, 43, 38-44.
- BARCZYK, M., CARRACEDO, S. & GULLBERG, D. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res*, 339, 269-80.
- BIALKOWSKA, K., MA, Y. Q., BLEDZKA, K., SOSSEY-ALAOUI, K., IZEM, L., ZHANG, X., MALININ, N., QIN, J., BYZOVA, T. & PLOW, E. F. 2010. The Integrin Co-activator Kindlin-3 Is Expressed and Functional in a Non-hematopoietic Cell, the Endothelial Cell. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 18640-18649.
- BOHMER, R. M. 1979. Flow cytometric cell cycle analysis using the quenching of 33258 Hoechst fluorescence by bromodeoxyuridine incorporation. *Cell Tissue Kinet*, 12, 101-10.
- BRADLEY, T. R. & METCALF, D. 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 44, 287-99.
- CARDIER, J. E. & BARBERA-GUILLEM, E. 1997. Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 26, 165-75.
- CHIGAEV, A., SMAGLEY, Y. & SKLAR, L. A. 2011. Nitric oxide/cGMP pathway signaling actively down-regulates alpha4beta1-integrin affinity: an unexpected mechanism for inducing cell de-adhesion. *BMC Immunol*, 12, 28.
- CHISHTI, A. H., KIM, A. C., MARFATIA, S. M., LUTCHMAN, M., HANSPAL, M., JINDAL, H., LIU, S. C., LOW, P. S., ROULEAU, G. A., MOHANDAS, N., CHASIS, J. A., CONBOY, J. G., GASCARD, P., TAKAKUWA, Y., HUANG, S. C., BENZ, E. J., JR., BRETSCHER, A., FEHON, R. G., GUSELLA, J. F., RAMESH, V., SOLOMON, F., MARCHESI, V. T., TSUKITA, S., HOOVER, K. B. & ET AL. 1998. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci*, 23, 281-2.
- CHRISTENSEN, J. L. 2001. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 14541-14546.
- CLAPP, D. W., FREIE, B., LEE, W. H. & ZHANG, Y. Y. 1995. Molecular evidence that in situ-transduced fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells give rise to medullary hematopoiesis in adult rats. *Blood*, 86, 2113-22.
- CUMANO, A., FERRAZ, J. C., KLAINE, M., DI SANTO, J. P. & GODIN, I. 2001. Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity*, 15, 477-85.
- DENK, W., STRICKLER, J. H. & WEBB, W. W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248, 73-6.

- ERHARDT, W. & KÖLLE, P. 2004. *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen : mit 128 Tabellen*, Stuttgart [u.a.], Schattauer.
- ETZIONI, A. & ALON, R. 2004. Leukocyte adhesion deficiency III: a group of integrin activation defects in hematopoietic lineage cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 4, 485-90.
- FEIGELSON, S. W., GRABOVSKY, V., MANEVICH-MENDELSON, E., PASVOLSKY, R., SHULMAN, Z., SHINDER, V., KLEIN, E., ETZIONI, A., AKER, M. & ALON, R. 2011. Kindlin-3 is required for the stabilization of TCR-stimulated LFA-1:ICAM-1 bonds critical for lymphocyte arrest and spreading on dendritic cells. *Blood*, 117, 7042-52.
- FEIL, R., WAGNER, J., METZGER, D. & CHAMBON, P. 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*, 237, 752-7.
- GONG, J. K. 1978. Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science*, 199, 1443-5.
- GOODMAN, J. W. & HODGSON, G. S. 1962. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood*, 19, 702-14.
- HASHIMOTO, C., HUDSON, K. L. & ANDERSON, K. V. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52, 269-79.
- HYDUK, S. J., RULLO, J., CANO, A. P., XIAO, H., CHEN, M., MOSER, M. & CYBULSKY, M. I. 2011. Talin-1 and kindlin-3 regulate alpha4beta1 integrin-mediated adhesion stabilization, but not G protein-coupled receptor-induced affinity upregulation. *J Immunol*, 187, 4360-8.
- HYNES, R. O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48, 549-54.
- HYNES, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- HYNES, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.
- JOHNSON, G. R. & MOORE, M. A. 1975. Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature*, 258, 726-8.
- KIEL, M. J., YILMAZ, O. H., IWASHITA, T., TERHORST, C. & MORRISON, S. J. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121, 1109-21.
- KINDLER, T. 1954. Congenital poikiloderma with traumatic bulla formation and progressive cutaneous atrophy. *Br J Dermatol*, 66, 104-11.
- KLOEKER, S., MAJOR, M. B., CALDERWOOD, D. A., GINSBERG, M. H., JONES, D. A. & BECKERLE, M. C. 2004. The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. *J Biol Chem*, 279, 6824-33.
- LAI-CHEONG, J. E., PARSONS, M. & MCGRATH, J. A. 2010. The role of kindlins in cell biology and relevance to human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 595-603.
- LARJAVA, H., PLOW, E. F. & WU, C. 2008. Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion. *EMBO Rep*, 9, 1203-8.

- LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. & NOURSHARGH, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-89.
- LIN, K. K. & GOODELL, M. A. 2011. Detection of hematopoietic stem cells by flow cytometry. *Methods Cell Biol*, 103, 21-30.
- LO CELSO, C., FLEMING, H. E., WU, J. W., ZHAO, C. X., MIAKE-LYE, S., FUJISAKI, J., CÔTÉ, D., ROWE, D. W., LIN, C. P. & SCADDEN, D. T. 2008. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*, 457, 92-96.
- LO CELSO, C., LIN, C. P. & SCADDEN, D. T. 2011. In vivo imaging of transplanted hematopoietic stem and progenitor cells in mouse calvarium bone marrow. *Nat Protoc*, 6, 1-14.
- LORENZ, E., UPHOFF, D., REID, T. R. & SHELTON, E. 1951. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*, 12, 197-201.
- M.GÖPPERT-MAYER 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys*, 9, S. 273–95.
- MALININ, N. L., ZHANG, L., CHOI, J., CIOCEA, A., RAZORENOVA, O., MA, Y.-Q., PODREZ, E. A., TOSI, M., LENNON, D. P., CAPLAN, A. I., SHURIN, S. B., PLOW, E. F. & BYZOVA, T. V. 2009. A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. *Nature Medicine*, 15, 313-318.
- MANEVICH-MENDELSON, E., FEIGELSON, S. W., PASVOLSKY, R., AKER, M., GRABOVSKY, V., SHULMAN, Z., KILIC, S. S., ROSENTHAL-ALLIERI, M. A., BEN-DOR, S., MORY, A., BERNARD, A., MOSER, M., ETZIONI, A. & ALON, R. 2009. Loss of Kindlin-3 in LAD-III eliminates LFA-1 but not VLA-4 adhesiveness developed under shear flow conditions. *Blood*, 114, 2344-2353.
- MASSBERG, S., SCHAERLI, P., KNEZEVIC-MARAMICA, I., KÖLLNBERGER, M., TUBO, N., MOSEMAN, E. A., HUFF, I. V., JUNT, T., WAGERS, A. J., MAZO, I. B. & VON ANDRIAN, U. H. 2007. Immunosurveillance by Hematopoietic Progenitor Cells Trafficking through Blood, Lymph, and Peripheral Tissues. *Cell*, 131, 994-1008.
- MASSBERG, S. & VON ANDRIAN, U. H. 2009. Novel Trafficking Routes for Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1176, 87-93.
- MATSUNAGA, T., TAKEMOTO, N., SATO, T., TAKIMOTO, R., TANAKA, I., FUJIMI, A., AKIYAMA, T., KURODA, H., KAWANO, Y., KOBUNE, M., KATO, J., HIRAYAMA, Y., SAKAMAKI, S., KOHDA, K., MIYAKE, K. & NIITSU, Y. 2003. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*, 9, 1158-65.
- MAXIMOW, A., A. 1924. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *Physiol. Rev.*, 4, 533-563.
- MAZO, I. B., GUTIERREZ-RAMOS, J. C., FRENETTE, P. S., HYNES, R. O., WAGNER, D. D. & VON ANDRIAN, U. H. 1998. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*, 188, 465-74.
- MAZO, I. B., MASSBERG, S. & VON ANDRIAN, U. H. 2011. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking. *Trends Immunol*, 32, 493-503.

- MAZO, I. B. & VON ANDRIAN, U. H. 1999. Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels. *J Leukoc Biol*, 66, 25-32.
- MCGRATH, K. E., KONISKI, A. D., MALIK, J. & PALIS, J. 2003. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood*, 101, 1669-76.
- MEDVINSKY, A. & DZIERZAK, E. 1996. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, 86, 897-906.
- MEVES, A., STREMMEL, C., GOTTSCHALK, K. & FASSLER, R. 2009. The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends Cell Biol*, 19, 504-13.
- MILLER, C. L. & LAI, B. 2005. Human and mouse hematopoietic colony-forming cell assays. *Methods Mol Biol*, 290, 71-89.
- MITALIPOV, S. & WOLF, D. 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 114, 185-99.
- MONTANEZ, E., USSAR, S., SCHIFFERER, M., BOSL, M., ZENT, R., MOSER, M. & FASSLER, R. 2008. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev*, 22, 1325-30.
- MOORE, M. A. & METCALF, D. 1970. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol*, 18, 279-96.
- MORITA, Y., EMA, H. & NAKAUCHI, H. 2010. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med*, 207, 1173-82.
- MORRISON, S. J., UCHIDA, N. & WEISSMAN, I. L. 1995. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 35-71.
- MORRISON, S. J. & WEISSMAN, I. L. 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1, 661-73.
- MOSER, M., BAUER, M., SCHMID, S., RUPPERT, R., SCHMIDT, S., SIXT, M., WANG, H.-V., SPERANDIO, M. & FÄSSLER, R. 2009a. Kindlin-3 is required for β 2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nature Medicine*, 15, 300-305.
- MOSER, M., LEGATE, K. R., ZENT, R. & FASSLER, R. 2009b. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*, 324, 895-9.
- MOSER, M., NIESWANDT, B., USSAR, S., POZGAJOVA, M. & FÄSSLER, R. 2008. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nature Medicine*, 14, 325-330.
- NAGAI, Y., GARRETT, K. P., OHTA, S., BAHRUN, U., KOURO, T., AKIRA, S., TAKATSU, K. & KINCADE, P. W. 2006. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, 24, 801-12.
- NORDON, R. E., NAKAMURA, M., RAMIREZ, C. & ODELL, R. 1999. Analysis of growth kinetics by division tracking. *Immunol Cell Biol*, 77, 523-9.
- ORBAN, P. C., CHUI, D. & MARTH, J. D. 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 6861-5.
- OSAWA, M., HANADA, K., HAMADA, H. & NAKAUCHI, H. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273, 242-5.

- PAPAYANNOPOULOU, T., CRADDOCK, C., NAKAMOTO, B., PRIESTLEY, G. V. & WOLF, N. S. 1995. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9647-51.
- PAPAYANNOPOULOU, T. & NAKAMOTO, B. 1993. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9374-8.
- PAPAYANNOPOULOU, T., PRIESTLEY, G. V., NAKAMOTO, B., ZAFIROPOULOS, V. & SCOTT, L. M. 2001. Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. *Blood*, 98, 2403-11.
- PELED, A., KOLLET, O., PONOMARYOV, T., PETIT, I., FRANITZA, S., GRABOVSKY, V., SLAV, M. M., NAGLER, A., LIDER, O., ALON, R., ZIPORI, D. & LAPIDOT, T. 2000. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, 95, 3289-96.
- RAMIREZ, P., RETTIG, M. P., UY, G. L., DEYCH, E., HOLT, M. S., RITCHEY, J. K. & DIPERSIO, J. F. 2009. BIO5192, a small molecule inhibitor of VLA-4, mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 114, 1340-3.
- RATAJCZAK, M. Z., KIM, C., JANOWSKA-WIECZOREK, A. & RATAJCZAK, J. 2012. The expanding family of bone marrow homing factors for hematopoietic stem cells: stromal derived factor 1 is not the only player in the game. *ScientificWorldJournal*, 2012, 758512.
- ROTHAEUSLER, K. & BAUMGARTH, N. 2007. Assessment of cell proliferation by 5-bromodeoxyuridine (BrdU) labeling for multicolor flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*, Chapter 7, Unit7 31.
- RUBART, M. 2004. Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ Res*, 95, 1154-66.
- SARMA, N. J., TAKEDA, A. & YASEEN, N. R. 2010. Colony forming cell (CFC) assay for human hematopoietic cells. *J Vis Exp*.
- SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K., LU, H., NORMAN, K., VAN NOOD, N., MUNOZ, F., GRABBE, S., MCARTHUR, M., LORENZO, I., KAPLAN, S., LEY, K., SMITH, C. W., MONTGOMERY, C. A., RICH, S. & BEAUDET, A. L. 1998. Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med*, 188, 119-31.
- SCHOFIELD, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4, 7-25.
- SCHROEDER, T. 2010. Hematopoietic stem cell heterogeneity: subtypes, not unpredictable behavior. *Cell Stem Cell*, 6, 203-7.
- SCHULZ, S., SIBBING, D., BRAUN, S., MORATH, T., MEHILLI, J., MASSBERG, S., BYRNE, R. A., SCHOMIG, A. & KASTRATI, A. 2010. Platelet response to clopidogrel and restenosis in patients treated predominantly with drug-eluting stents. *Am Heart J*, 160, 355-61.
- SCHWARTZ, M. A. & GINSBERG, M. H. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol*, 4, E65-8.
- SHATTIL, S. J. & BRUGGE, J. S. 1991. Protein tyrosine phosphorylation and the adhesive functions of platelets. *Curr Opin Cell Biol*, 3, 869-79.
- SIEGEL, D. H., ASHTON, G. H., PENAGOS, H. G., LEE, J. V., FEILER, H. S., WILHELMSSEN, K. C., SOUTH, A. P., SMITH, F. J., PRESCOTT, A. R., WESSAGOWIT, V., OYAMA, N., AKIYAMA, M., AL ABOUD, D., AL ABOUD, K.,

- AL GITHAMI, A., AL HAWSAWI, K., AL ISMAILY, A., AL-SUWAID, R., ATHERTON, D. J., CAPUTO, R., FINE, J. D., FRIEDEN, I. J., FUCHS, E., HABER, R. M., HARADA, T., KITAJIMA, Y., MALLORY, S. B., OGAWA, H., SAHIN, S., SHIMIZU, H., SUGA, Y., TADINI, G., TSUCHIYA, K., WIEBE, C. B., WOJNAROWSKA, F., ZAGHLOUL, A. B., HAMADA, T., MALLIPEDDI, R., EADY, R. A., MCLEAN, W. H., MCGRATH, J. A. & EPSTEIN, E. H. 2003. Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. *Am J Hum Genet*, 73, 174-87.
- SIPKINS, D. A., WEI, X., WU, J. W., RUNNELS, J. M., COTE, D., MEANS, T. K., LUSTER, A. D., SCADDEN, D. T. & LIN, C. P. 2005. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*, 435, 969-73.
- SPANGRUDE, G. J., HEIMFELD, S. & WEISSMAN, I. L. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241, 58-62.
- SVENSSON, L., HOWARTH, K., MCDOWALL, A., PATZAK, I., EVANS, R., USSAR, S., MOSER, M., METIN, A., FRIED, M., TOMLINSON, I. & HOGG, N. 2009. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nature Medicine*, 15, 306-312.
- TAKEDA, K., KAISHO, T. & AKIRA, S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 21, 335-76.
- TCHERNYCHEV, B., REN, Y., SACHDEV, P., JANZ, J. M., HAGGIS, L., O'SHEA, A., MCBRIDE, E., LOOBY, R., DENG, Q., MCMURRY, T., KAZMI, M. A., SAKMAR, T. P., HUNT, S., 3RD & CARLSON, K. E. 2010. Discovery of a CXCR4 agonist pepducin that mobilizes bone marrow hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 22255-9.
- TILL, J. E. & MC, C. E. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-22.
- UENO, H. & WEISSMAN, I. L. 2010. The origin and fate of yolk sac hematopoiesis: application of chimera analyses to developmental studies. *Int J Dev Biol*, 54, 1019-31.
- USSAR, S., MOSER, M., WIDMAIER, M., ROGNONI, E., HARRER, C., GENZEL-BOROVICZENY, O. & FASSLER, R. 2008. Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction. *PLoS Genet*, 4, e1000289.
- VANDERSLICE, P., BIEDIGER, R. J., WOODSIDE, D. G., BROWN, W. S., KHOUNLO, S., WARIER, N. D., GUNDLACH, C. W., CAIVANO, A. R., BORNMANN, W. G., MAXWELL, D. S., MCINTYRE, B. W., WILLERSON, J. T. & DIXON, R. A. 2013. Small Molecule Agonist of VLA-4 Integrin Induces Progenitor Cell Adhesion. *J Biol Chem*.
- VOURA, E. B., BILLIA, F., ISCOVE, N. N. & HAWLEY, R. G. 1997. Expression mapping of adhesion receptor genes during differentiation of individual hematopoietic precursors. *Exp Hematol*, 25, 1172-9.
- WAGERS, A. J. 2002. Little Evidence for Developmental Plasticity of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Science*, 297, 2256-2259.
- WICK, M., BURGER, C., BRUSSELBACH, S., LUCIBELLO, F. C. & MULLER, R. 1994. Identification of serum-inducible genes: different patterns of gene regulation during G0-->S and G1-->S progression. *J Cell Sci*, 107 (Pt 3), preceding table of contents.

- WOGNUM, B., YUAN, N., LAI, B. & MILLER, C. L. 2013. Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. *Methods Mol Biol*, 946, 267-83.
- WOLBER, F. M., LEONARD, E., MICHAEL, S., ORSCHELL-TRAYCOFF, C. M., YODER, M. C. & SROUR, E. F. 2002. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. *Exp Hematol*, 30, 1010-9.
- WRIGHT, D. E., BOWMAN, E. P., WAGERS, A. J., BUTCHER, E. C. & WEISSMAN, I. L. 2002. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med*, 195, 1145-54.
- WRIGHT, D. E., WAGERS, A. J., GULATI, A. P., JOHNSON, F. L. & WEISSMAN, I. L. 2001. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*, 294, 1933-6.
- ZAIDEL-BAR, R., ITZKOVITZ, S., MA'AYAN, A., IYENGAR, R. & GEIGER, B. 2007. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol*, 9, 858-67.

7. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Der Weg der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzelle durch die unterschiedlichen Kompartimente
- Abb. 2: Funktionsprinzips eines 2-Photonen-Mirkoskops
- Abb. 3: Schematische Darstellung des operierten Tieres
- Abb. 4: Kreuzung der beiden venösen Sinus im Bereich der vorderen Fontanelle
- Abb. 5: Katheter in der Arteria carotis externa des Empfängertieres
- Abb. 6: Kolonien im Knochenmark
- Abb. 7: Zellen pro Femur im CFU-Assay
- Abb. 8: Kolonien in der Milz
- Abb. 9: Zellen in der Milz im CFU-Assay
- Abb. 10: Kolonien im Blut
- Abb. 11: Zellen im Blut im CFU-Assay
- Abb. 12: Dot-Plot einer durchflusszytometrischen Bestimmung des prozentualen Anteils an HSPC am Gesamtzellbestand im Knochenmark
- Abb. 13: Bestimmung der Anzahl der HSPC im Knochenmark in der Durchflusszytometrie
- Abb. 14: Bestimmung des prozentualen Anteils der Long-term-HSPC im Knochenmark in der Durchflusszytometrie
- Abb. 15: Dot-Plot einer durchflusszytometrischen Bestimmung des prozentualen Anteils an HSPC am Gesamtzellbestand in der Milz
- Abb. 16: Bestimmung der Anzahl der HSPC in der Milz in der Durchflusszytometrie
- Abb. 17: Bestimmung des prozentualen Anteils der LT-HSPC in der Milz in der Durchflusszytometrie
- Abb. 18: Dot-Plot einer durchflusszytometrischen Bestimmung des prozentualen Anteils an HSPC am Gesamtzellbestand im Blut
- Abb. 19: Bestimmung der Anzahl der HSPC im Blut in der Durchflusszytometrie
- Abb. 20: Bestimmung des prozentualen Anteils der LT-HSPC im Blut in der Durchflusszytometrie

Abb. 21: Absolutzahl lebender Zellen in den untersuchten Kompartimenten

Abb. 22: Anteil transmigrierter Zellen pro 100000 injizierte Zellen

Abb. 23: HSPC im Interstitium 18h nach Injektion

Abb. 24: Geschwindigkeit der HSPC im Knochenmarksinterstitium

Abb. 25: Abstand der interstitiellen HSPC zum Gefäß bzw. zum Endost

Abb. 26: Anteil an der Gefäßwand adhärenter HSPC an allen visualisierten HSPC

Abb. 27: Visualisierung der HSPC zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraarterieller Injektion

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. med. Steffen Massberg für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für die stete fachliche und sehr freundliche Unterstützung. Die neuen Impulse und das große Interesse am Thema der Dissertation waren sehr hilfreich bei der Anfertigung dieser Arbeit im Labor für experimentelle Kardiologie am Deutschen Herzzentrum München.

Des Weiteren möchte ich mich insbesondere bei Herrn Dr. med. Martin Orban für die herausragende Betreuung und die Anleitung zum exakten, wissenschaftlichen Arbeiten bedanken. Sein Enthusiasmus und seine Freude an der experimentellen Forschung waren mir stets eine Inspiration und haben mir des Öfteren über Momente der Frustration hinweg geholfen.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Aufnahme und die geduldige Hilfe und Unterstützung während der gesamten experimentellen Arbeit, insbesondere Herrn Michael Lorenz, Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl, Dr. med. Sascha Kandoga und Frau Birgit Niehues.

Bei Prof. Dr. med. Reinhard Fässler, Herrn PD Dr. med. Markus Moser und Herrn Raphael Ruppert von der Abteilung für molekulare Medizin des Max-Planck-Instituts für Biochemie, München, bedanke ich mich für die Isolierung und Überlassung der HSPC aus den im Max-Planck-Institut gezüchteten Kindlin-3-Knockout-Chimären.

Herrn Dr. rer. nat. Christian Stemberger und Herrn Veit Buchholz vom Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität München danke ich für ihre freundliche Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Alexander Hapfelmeier vom Institut für medizinische Epidemiologie und Statistik danke ich für seine freundliche und geduldige Beratung.

Schließlich danke ich meinem Vater, Silvano Longhi, der mir Studium und Promotion überhaupt erst ermöglicht hat, für seine unschätzbare, moralische Unterstützung und zuletzt und im Besonderen Felix Müller für seine unendliche Geduld und seinen klaren Blick für das Wesentliche.