

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik

Klinikum rechts der Isar

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Christian Peschel

Die Rolle von Cks1 in der murinen Hämatopoese

Elke Pietschmann

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

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. C. Peschel

2. Priv.-Doz. Dr. K. S. Götze

Die Dissertation wurde am 26.01.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2012 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Zusammenfassung	7
2 Einleitung	9
2.1 Hämatopoese	9
2.1.1 Entwicklung	10
2.1.2 Das hämatopoetische System	11
2.1.3 Regulation der Hämatopoese	14
2.2 Zellzyklus	17
2.3 p27 ^{Kip1}	20
2.3.1 Funktionen von p27 ^{Kip1}	20
2.3.2 Regulation von p27 ^{Kip1}	22
2.3.3 Rolle von p27 ^{Kip1} in der murinen Hämatopoese	24
2.4 Cks1	25
2.4.1 Funktionen von Cks1	25
2.4.2 Regulation von Cks1	27
2.5 Zielsetzung und Fragestellung	27
3 Material und Methoden	29
3.1 Material	30
3.1.1 Chemikalien	30
3.1.2 Primer	31
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	32
3.1.4 Antikörper	33
3.1.5 Reaktionssysteme	34
3.1.6 Softwareprogramme	34
3.1.7 Geräte	35
3.1.8 Puffer	35
3.1.9 Medien	36
3.1.10 Mäuse	36
3.2 Methoden	36
3.2.1 Genotypisierung	36
3.2.2 Gewinnung von murinem Probenmaterial	39

3.2.3	Colony Forming Assay	40
3.2.4	Durchflusszytometrie	41
3.2.5	5-FU und BrdU-Applikation	42
3.2.6	RNA-Isolation, cDNA und Real time PCR	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Der gleichzeitige Verlust von <i>Cks1</i> verändert den $p27^{Kip1-/-}$ Phänotyp	45
4.2	In Abwesenheit von <i>Cks1</i> sind die Zellzahlen der hämatopoetischen Organen verringert	46
4.3	Die Knochenstruktur und die Zellularität verändern sich in Abwesenheit von <i>Cks1</i> nicht	48
4.4	Im peripheren Blut verfügen die Knockouttiere über leicht erhöhte Erythrozytenkonzentrationen	49
4.5	HSCs und hämatopoetische Vorläuferzellen	50
4.5.1	Der Verlust von <i>Cks1</i> führt zu einer verminderten Anzahl an HSCs und hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark	50
4.5.2	Der Verlust von <i>Cks1</i> führt zu einer verminderten Anzahl an HSCs und hämatopoetischen Vorläuferzellen in fetaler Leber	54
4.6	Das <i>Cks1^{-/-}</i> Knochenmark verfügt im R1- und R3-Stadium der Erythrozytenvorläufer über weniger Zellen	57
4.7	Im Colony Forming Assay bilden <i>Cks1^{-/-}</i> Zellen weniger Kolonien als Wildtypzellen	59
4.8	In Abwesenheit von <i>Cks1</i> bilden kultivierte Knochenmarkszellen weniger Kolonien als die des Wildtyps	60
4.9	Der Einfluss von <i>Cks1</i> auf die Proliferation hämatopoetischer Zellen im Steady-State und unter Stressbedingungen	63
4.9.1	Im Steady-State gibt es im Hinblick auf die BrdU-Inkorporation keine Unterschiede zwischen <i>Cks1^{-/-}</i> und <i>Cks1^{+/+}</i> Zellen	64
4.9.2	Nach 5-FU Applikation ist der Anteil der BrdU-positiven Zellen im <i>Cks1^{-/-}</i> Knochenmark stark vermindert	64
4.10	In LT-HSCs sind die mRNA- Level von <i>Cks1</i> erhöht	66
5	Diskussion	69
5.1	Zusätzlicher <i>Cks1</i> -Verlust gleicht den $p27^{Kip1-/-}$ Phänotyp aus	70
5.2	Der Verlust von <i>Cks1</i> führt zu verminderten Zellzahlen in hämatopoetischen Organen	70
5.3	<i>Cks1</i> beeinflusst weder die Knochenstruktur noch die Zellularität	71
5.4	<i>Cks1</i> ist für die Aufrechterhaltung der Steady-State Hämatopoese entbehrlich	71
5.5	<i>Cks1</i> ist ein Regulator der Poolgröße von HSCs und hämatopoetischen Vorläuferzellen	72

5.6	Cks1 beeinflusst die embryonale Hämatopoese	75
5.7	Der Verlust von <i>Cks1</i> führt zur Akkumulation von CMPs	76
5.8	Cks1 hat keinen Einfluss auf die Erythrozytenvorläufer	78
5.9	Einschränkung der funktionellen Kapazität der hämatopoetischen Progenitoren durch <i>Cks1</i> -Verlust	78
5.10	Kultivierte <i>Cks1</i> ^{-/-} Knochenmarkszellen verlieren ihr Koloniebildungspotential	79
5.11	Cks1 reguliert die Stress-induzierte Hämatopoese	79
5.12	<i>Cks1</i> wird vermehrt in LT-HSCs exprimiert	81
5.13	Schlussfolgerung	82
	Abbildungsverzeichnis	85
	Tabellenverzeichnis	87
	Literaturverzeichnis	89
	Abkürzungsverzeichnis	107
	Publikationen	111
	Danksagung	113

Kapitel 1

Zusammenfassung

Zellzykluskontrolle ist die Voraussetzung für den ungestörten Ablauf der Hämatopoese, wobei der nur eingeschränkt mögliche Eintritt in den Zellzyklus für die Balance zwischen Proliferation und Ruhezustand der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) sorgt. Der Zellzyklusinhibitor p27^{Kip1} verfügt über starke antiproliferative Aktivität und übernimmt im Rahmen der murinen Hämatopoese kritische Inhibitorfunktionen. Einer der wichtigsten Regulationsmechanismen für p27^{Kip1} besteht in dessen Markierung für den Abbau im Proteasom mithilfe der Polyubiquitinierung durch die SCF^{SKP2} Ubiquitin Ligase, an der Cks1 (cyclin-dependent kinase subunit 1) als Schlüsselprotein beteiligt ist. Der Verlust von *Cks1* selbst führt zur Stabilisierung von Cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKIs), wie p21^{Cip1/Waf1}, p57^{Kip2}, p130 und p27^{Kip1}, was zu Proliferationsdefekten in zahlreichen Geweben führt. Überexpression ist hingegen in vielen Tumorarten mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Protein Cks1 Einfluss auf die murine Hämatopoese hat, wobei p27^{Kip1}-abhängige und -unabhängige Funktionen analysiert wurden. Die Versuche sind im Maus-Modell mit Zellen aus Knochenmark, fetaler Leber sowie peripherem Blut von *p27^{Kip1}^{-/-}*, *Cks1^{-/-}* und *p27^{Kip1}^{-/-}/*Cks1^{-/-}** Knockout-Mäusen durchgeführt und jeweils mit Wildtypkontrollen verglichen worden. Der Verlust von *Cks1* führte zu einer Verminderung der Zellzahlen in den hämatopoetischen Organen, was mit einer deutlich reduzierten Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und den verschiedenen Populationen hämatopoetischer Progenitoren einherging. Cks1 konnte als potenter Regulator der Poolgröße von Stamm- und Progenitorzellen identifiziert werden. Dennoch scheint das Protein für die Steady-State Hämatopoese und die

terminale Differenzierung entbehrlich zu sein. Des Weiteren ließ sich beobachten, dass der Verlust von *Cks1* im Rahmen der Stress-induzierten Hämatopoese mit schwerwiegenden Proliferationsproblemen einhergeht, was mit einer potentiell protektiven Rolle von Cks1 bei der Repopulation des Knochenmarks durch hämatopoetische Stammzellen (HSCs) vereinbar wäre. Daneben ist Cks1 möglicherweise an der Regulation bestimmter Transkriptionsfaktoren beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Deletion von *Cks1* in der adulten und embryonalen Hämatopoese nicht immer in gleicher Form manifestiert. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass Cks1 kritische sowohl von der p27^{Kip1}-Ubiquitinierung abhängige als auch -unabhängige Aufgaben bei der Regulation der frühen Hämatopoese übernimmt, wobei die Stress-induzierte Hämatopoese in besonderer Weise betroffen ist.

Kapitel 2

Einleitung

In diesem Kapitel werden zunächst die Grundlagen der Hämatopoese dargestellt. Da sowohl adulte als auch embryonale Zellen im Verlauf der Experimente analysiert wurden, beginnt die Arbeit mit einem kurzen Überblick über die Orte der murinen Blutbildung in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Es folgt eine Beschreibung des hämatopoetischen Stammbaums, in der besonders auf die von uns untersuchten frühen Vorläufer der reifen Blutzellen eingegangen wird. Zum besseren Verständnis des allgemeinen Verhaltens sowie der optimalen Wachstumsbedingungen von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wird schließlich die Regulation der Hämatopoese erläutert. Der nächste Abschnitt des Kapitels befasst sich mit den Grundlagen des Zellzyklus, da die Proteine p27^{Kip1} und Cks1, auf deren Untersuchung sich dieses Projekt konzentriert, beide an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind. Im weiteren Verlauf werden deren genaue Funktionen und Regulation dargestellt, bevor am Ende der Einleitung die Zielsetzung und Fragestellung erläutert wird. Da diese Arbeit auf einem Maus-Modell basiert, beziehen sich alle Angaben auf die murine Hämatopoese.

2.1 Hämatopoese

Der Begriff Hämatopoese beschreibt den Prozess der Blutbildung sowohl im adulten als auch im embryonalen Stadium eines Organismus. Das Verständnis der zellulären Grundlagen der Hämatopoese wurde 1961 durch die Experimente von Till und Mc Culloch [160] entscheidend geprägt. Sie machten die Beobachtung, dass die intravenöse Injektion von murinen Spenderknochenmarkszellen in tödlich bestrahlte Mäuse zur Entwicklung makroskopisch sichtbarer Kolonien proliferie-

render hämatopoetischer Zellen in der Milz der Empfängertiere führt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass jede dieser Kolonien von einem einzigen Zellklon ausging, der sogenannten Colony-Forming-Unit-Spleen (CFU-S) [7] und dass dieser sowohl in der Lage zur Differenzierung als auch zur Selbsterneuerung war. Damit etablierten Till und McCulloch den Begriff der hämatopoetischen Stammzelle [161] und erweiterten die Bedeutung des Ausdrucks Hämatopoese auf Entwicklung, Selbsterneuerung und Differenzierung dieses Zelltyps.

Heute weiß man, dass pluripotente hämatopoetische Stammzellen (HSCs) nur ca. 0,05 % der murinen Knochenmarkszellen ausmachen [166] und dass diese in der Lage sind, durch symmetrische Teilung zwei Tochterzellen mit Stammzelleigenschaften hervorzubringen. Alternativ kann eine asymmetrische Teilung stattfinden, wobei sowohl eine neue pluripotente Stammzelle entsteht als auch eine Tochterzelle, die die Möglichkeit zur Differenzierung in alle Linien des hämatopoetischen Systems besitzt [180, 121]. Obwohl die Stammzellen sich unter normalen Bedingungen hauptsächlich in der Ruhephase des Zellzyklus befinden [118], besitzen sie die Fähigkeit, tödlich bestrahlte Mäuse mit allen Blutzellen zu repopulieren [123] und somit deren Überleben sicherzustellen.

2.1.1 Entwicklung

Das Knochenmark stellt beim Menschen den Hauptort der adulten Hämatopoese dar, wobei nur das sogenannte rote Mark die Fähigkeit zur Blutbildung besitzt. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus fungieren während der embryonalen Entwicklung allerdings auch andere Gewebe, wie der Dottersack, die Leber und die Milz, als Orte der frühen Hämatopoese [195]. Nach heutigem Wissensstand beginnt die primitive Hämatopoese in der Maus mit der Entstehung des Hämangioblasten, einem gemeinsamen Vorläufer der hämatopoetischen und der endothelialen Zelllinien, der sich zwischen Embryonaltag 2.5 und 4 (E2.5-E4) entwickelt [26]. Man nimmt an, dass die hämatopoetischen Vorläuferzellen ausgehend vom Primitivstreifen in den Dottersack wandern [140]. Dort entstehen zwischen E7 und E8.5 Blutinseln und erste primitive erythroide Zellen, wobei es sich um kernhaltige, noch relativ große Erythroblasten handelt [4]. An Tag 9 ist das Kapillarnetzwerk soweit ausgebildet, dass reife Zellen in die Zirkulation übertreten können. Nach ausreichender Entwicklung der Leber kommt es zwischen E9.5 und E10.5 zur deren Kolonialisierung mit vorwiegend myelo-erythroiden hämatopoetischen Zellen [105, 75]. Vieles deutet darauf hin, dass die hämatopoetischen

Stammzellen (HSCs) in der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM)-Region, entstehen [33, 50, 34], wobei auch der Dottersack und möglicherweise die Plazenta zum späteren HSC-Pool beitragen [48, 103].

Beginnend mit E11 wird die primitive durch die definitive Hämatopoese abgelöst, was durch die Produktion kernloser Erythrozyten gekennzeichnet ist, die ab E12.5 aus der Leber in die Zirkulation übertreten [132]. Von diesem Zeitpunkt an stellt die Leber das Hauptorgan der fetalen Hämatopoese dar. Auch nachdem zwischen E16 und E18 das Knochenmark und die Milz zu Orten der Blutbildung werden, behält die Leber während der gesamten Embryonalzeit sowie einige Wochen postpartal ihren Status als wichtiges hämatopoetisches Organ [82]. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem das Knochenmark allein Ort der Blutbildung ist, sind an der murinen Hämatopoese lebenslang sowohl Knochenmark als auch Milz beteiligt.

2.1.2 Das hämatopoetische System

Hämatopoetische Zellen zeichnen sich durch bestimmte Oberflächenmarker aus, die sich aus experimenteller Sicht als sehr hilfreich im Bezug auf ihre Unterscheidung erwiesen haben. Eine Übersicht des hämatopoetischen Systems mit den wichtigsten Markern der verschiedenen Zellpopulationen ist in Abbildung 2.1 zu finden. Im murinen Knochenmark zeigt die Fraktion der Lin^- , Sca1 (Ly6A/E)⁺ und c-kit (CD117)⁺ LSK-Zellen Stammzellaktivität [154, 71, 123]. Lineage negativ (Lin^-) bedeutet, dass noch keine hämatopoetischen Oberflächenantigene wie B220, CD3 (cluster of differentiation 3), CD4, CD8, Mac-1 (CD11b/CD18), Gr-1 (granulocyte-1) oder Ter 119, vorhanden sind. Diese befinden sich erst auf den weiter ausdifferenzierten Zelltypen wie zum Beispiel B- und T-Zellen, Makrophagen oder Granulozyten [148]. Wichtige Unterscheidungsmerkmale innerhalb der Thy1.1 (CD90)^{lo} LSK-Population sind die Oberflächenproteine CD34 und Flk-2 (CD135). Es konnte gezeigt werden, dass die CD34^+ Zellen in letal bestrahlten Empfängertieren sofort radioprotektive Wirkung zeigten, während die CD34^- Zellen für die Langzeit-Rekonstitution von sowohl myeloiden als auch lymphoiden Zelllinien verantwortlich waren [123].

Derzeit geht man davon aus, dass die LSK-Fraktion mindestens zwei verschiedene Stammzellpopulationen enthält. Am Anfang der hämatopoetischen Reihe stehen die CD34^- Flk-2^- Langzeit hämatopoetischen Stammzellen (Long Term Hematopoietic Stem Cells, LT-HSCs), die lebenslang zur Selbsterneuerung fähig

sind und die primitivste Stammzellfraktion darstellen. Aus den LT-HSC können sich $CD34^+Flk-2^+$ Kurzzeit hämatopoetische Stammzellen (Short Term Hematopoietic Stem Cells, ST-HSCs) entwickeln, deren Selbsterneuerungskapazität sich nach einigen Wochen erschöpft [175]. Die multipotenten Vorläufer (Multipotent Progenitors, MPPs) entstehen weiter abwärts der Differenzierungslinie aus den ST-HSC und haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung fast vollständig verloren [123]. Diese Zellgruppe ist jedoch noch immer in der Lage, verschiedene Differenzierungsrichtungen einzuschlagen, wobei eine Dedifferenzierung von MPP zu ST-HSC nicht beobachtet wird und weder MPPs noch ST-HSCs sich wieder in LT-HSCs zurückentwickeln können [107].

Man geht davon aus, dass es im MPP-Stadium zur Separation des lymphatischen von dem myeloischen Weg kommt [83]. Andere Theorien basieren hingegen darauf, dass diese Aufteilung schon stattfindet, bevor die Zellen dieses Entwicklungsstadium erreichen und dass bereits die HSC-Population in myeloisch- und lymphatisch-orientierte Stammzellen aufgeteilt werden kann [108]. Die Vorläufer der $Il-7R\alpha^+$ lymphatischen Reihe und der $Il-7R\alpha^-$ myeloischen Reihe verfügen über kein relevantes Selbsterneuerungspotential mehr und ihre Möglichkeiten zur Differenzierung sind eingeschränkt [174]. Myeloide Vorläufer (Common Myeloid Progenitors, CMPs), die durch die Oberflächenmarker $c-Kit^+$, $Sca-1^-$, $CD34^+$ und $Fc\gamma R(CD16/32)^-$ gekennzeichnet sind, sind in der Lage, sowohl $CD34^-Fc\gamma R^{lo}$ Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläufer (Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitors, MEPs) als auch $CD34^+Fc\gamma^{hi}$ Granulozyten-Makrophagen Vorläufer (Granulocyte-Macrophage Progenitors, GMPs) hervorzubringen [1]. Aus den MEPs entwickeln sich reife Erythrozyten und Thrombozyten, während sich die GMPs zu Granulozyten, Monozyten und antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen differenzieren können. Die lymphatischen Vorläufer (Common Lymphoid Progenitors, CLPs) zeichnen sich durch die Oberflächenproteine $c-Kit^{lo}$, $Sca-1^{lo}$, $CD34^+$ und $Fc\gamma R^-$ aus. Aus ihnen entstehen T-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) [80, 45]. Obwohl lange angenommen wurde, dass die lymphatische und die myeloische Reihe streng voneinander getrennt sind, gibt es heute Hinweise darauf, dass dies nicht der Fall ist und sich unter bestimmten Bedingungen lymphatische Vorläufer auch in die myeloische Richtung differenzieren können [8, 172].

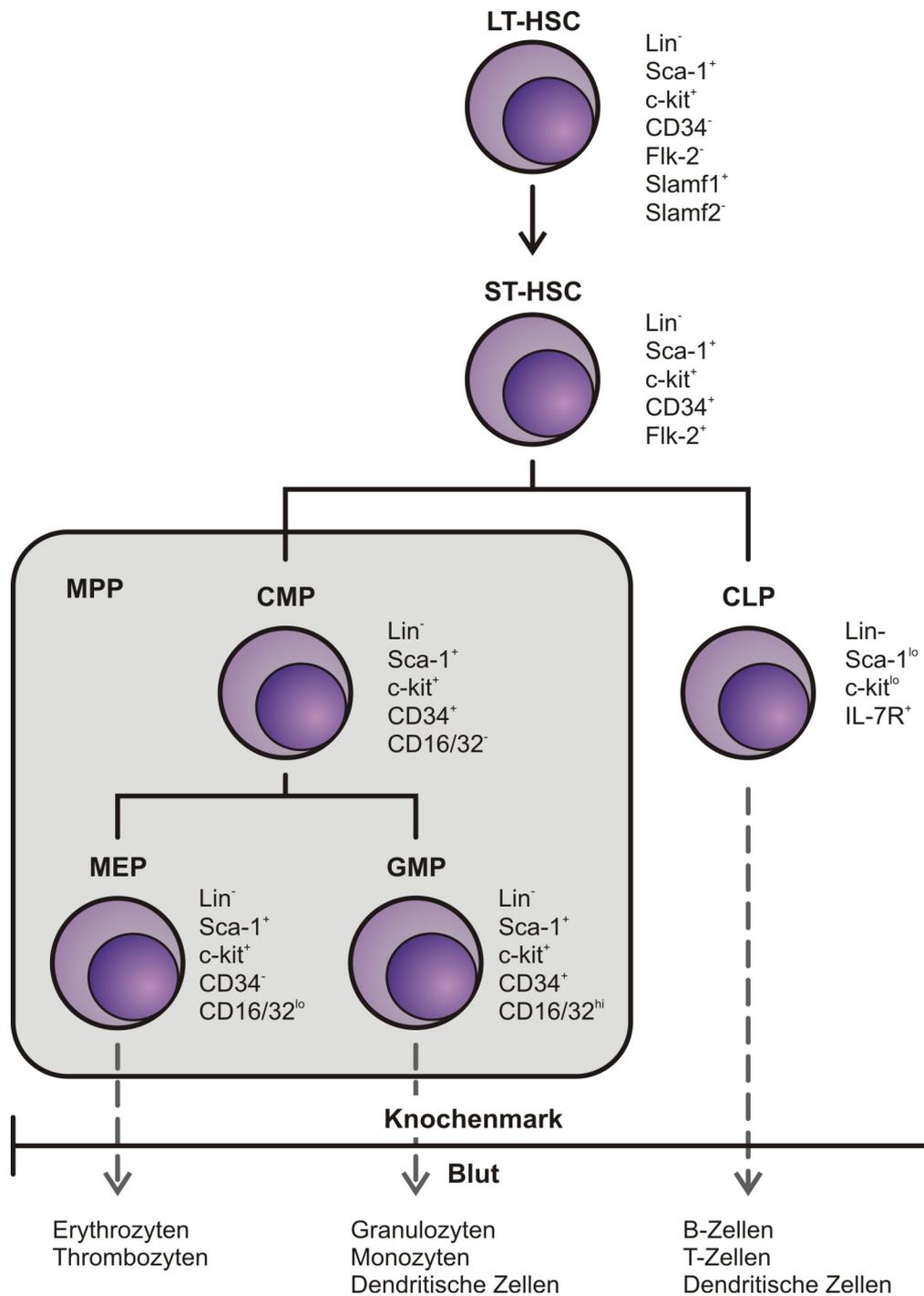


Abbildung 2.1: **Das hämatopoetische System der Maus.** LT-HSC: Langzeit hämatopoetische Stammzelle (Long Term Hematopoietic Stem Cell), ST-HSC: Kurzzeit hämatopoetische Stammzelle (Short Term Hematopoietic Stem Cell), MPP: multipotenter Vorläufer (Multipotent Progenitor), CMP: myeloischer Vorläufer (Common Myeloid Progenitor), CLP: Lymphatischer Vorläufer (Common Lymphoid Progenitor), MEP: Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläufer (Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor), GMP: Granulozyten-Makrophagen Vorläufer (Granulocyte-Macrophage Progenitor).

2.1.3 Regulation der Hämatopoese

Unter ungestörten Bedingungen ist die Zahl der differenzierten Zellen in der Blutbahn relativ konstant. Um dies zu gewährleisten, müssen aufgrund der Kurzlebigkeit der meisten Blutzellen von ihnen täglich mehrere Milliarden neu gebildet werden, wobei der Organismus unter Stress die Produktion um ein Vielfaches steigern kann. Sobald der Bedarf wieder in die Ausgangslage zurückgekehrt ist, normalisiert sich auch die Produktion wieder. Durch Regulierung von Selbsterneuerung und Differenzierung wird der hämatopoetische Stammzellpool aufrechterhalten und bei ungestörter Hämatopoese ein Gleichgewichtszustand, der sogenannte Steady-State, erreicht [103].

Im Rahmen der Steady-State-Hämatopoese, die im Gegensatz zur Stress-induzierten Hämatopoese steht, kommt es bei allen hämatopoetischen Zellgruppen zu spontanen Teilungen, die sich allerdings in der Häufigkeit unterscheiden. Je weiter die Differenzierung fortschreitet, desto weniger Zellen befinden sich in der G0-Phase des Zellzyklus und umso höher ist ihre Proliferationsrate [126]. Während bei der Steady-State-Hämatopoese zu jedem Zeitpunkt ca. 67 % der LT-HSCs die Ruhephase durchlaufen, sind es bei den ST-HSCs nur noch 59 %. Dagegen befinden sich ungefähr die Hälfte der MPPs und CMPs sowie nahezu keine Zellen des GMP-Typs in der G0-Phase [126]. Die Ruhephase (G0-Phase) beschreibt einen Zustand, in dem der Metabolismus und die S-Phase Maschinerie maximal herunterreguliert sind. Sie ist essentiell für die Erhaltung der hämatopoetischen Stammzellen und das dauerhafte Anwachsen hämatopoetischer Zellen vor allem nach Transplantationen [196]. Als Antwort auf Stress wie z.B. Infektionen werden sogenannte ruhende HSCs durch bestimmte Signalstoffe, unter anderem $\text{INF}\alpha$, aktiviert, was wiederum zu Proliferation und Selbsterneuerung führt [41]. Das Selbsterneuerungspotential der hämatopoetischen Stammzellen ist allerdings begrenzt, was an der zunehmenden Erschöpfung ihrer Regenerationsmöglichkeiten bei der Antwort auf umweltbedingten Stress wie z.B. serielle Transplantationen oder myeloablative Chemotherapie deutlich wird [171].

Die Entstehung neuer Blutzellen unterliegt strengen Kontrollen, da einerseits ständig Zellen nachgebildet werden müssen, andererseits aber auch die unkontrollierte Proliferation verhindert werden muss. Eine adäquate Kontrolle des Zellzyklus, besonders dem der hämatopoetischen Stammzellen und der frühen Vorläuferstufen, ist die Voraussetzung für eine normale Hämatopoese [42]. Das Versagen der Zellzyklusregulation kann zur Transformation von normalen hämatopoeti-

schen Zellen in maligne Leukämiezellen führen oder aber zu deren Elimination über Apoptose, wie es bei einem Teil der aplastischen Anämien und der myelodysplastischen Syndrome der Fall ist [38, 184].

Bei der hämatopoetischen Homöostase spielt die Mikroumgebung eine wichtige Rolle. Im Knochenmark befinden sich zusätzlich zu den unterschiedlichen Differenzierungsstufen der Blutzellen auch verschiedene CD45-negative Zellen [150]. Dazu gehören Stromazellen im engeren Sinne, bei denen es sich um Myofibroblasten handelt [21]. Außerdem finden sich Stromazellen im weiteren Sinne, nämlich Endothelzellen [183], Adipozyten [53] und Osteoblasten [49], sowie Makrophagen, Osteoklasten und Dendritische Zellen [76]. Die Stromazellen, insbesondere die Makrophagen, produzieren eine Reihe von Zytokinen [21] wie M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), SCF (stem cell factor) und IL-6 (Interleukin 6), während der für die Hämatopoese äußerst wichtige Wachstumsfaktor IL-3 (Interleukin 3) hauptsächlich von T-Zellen sezerniert wird. Zytokine sind Proteine, die nach ihrer Freisetzung Zellen über die entsprechenden Rezeptoren in ihrem Verhalten beeinflussen und an der Zellinteraktion beteiligt sind. Sie sind für die Hämatopoese von essentieller Bedeutung, da das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren sowohl Überleben als auch Proliferation hämatopoetischer Stammzellen und deren Nachkommen sichert [118]. Auch bei Selbsterneuerung und Differenzierung spielen externe Signale von Zytokinen eine Rolle [102], wobei zum Beispiel die Kombination aus SCF, FL (Flt3-ligand), TPO (Thrombopoietin) und IL-6 die Selbsterneuerung von HSCs *in vitro* induziert [167]. TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1, Transformierender Wachstumsfaktor Beta 1) stellt hingegen einen Inhibitor für das Wachstum von hämatopoetischen Stammzellen dar [133].

Nicht nur Stromazellen, sondern auch Bestandteile der Extrazellulärmatrix (ECM) spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen. Die ECM besteht aus einer Vielfalt von Molekülen, wie z.B. Fibronectin (FN), Proteoglykanen, Kollagen und Laminin, die für die Formgebung und Stabilisierung der Gewebe verantwortlich sind [42]. Bestimmte Proteoglykane in der ECM von adhärennten Stromazellen besitzen die Fähigkeit, Zytokine zu binden und diese dann in ihrer biologisch aktiven Form den hämatopoetischen Progenitoren zu präsentieren. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen sind wiederum in der Lage, selbst an spezifische Bestandteile der ECM zu binden

und können so über die ECM-Komponenten oder benachbarte Moleküle mit den aktivierten Wachstumsfaktoren in Kontakt treten [169]. Laminin, Kollagen und Fibronectin fungieren als Liganden für Integrine, die sowohl das Ankerverhalten und die Migration von hämatopoetischen Zellen kontrollieren, als auch bestimmte Signaltransduktionswege in diesen Zellen aktivieren [70]. Die Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen basiert zu einem Großteil auf der direkten Interaktion mit Stromazellen und der Extrazellulärmatrix [30]. Für die Erhaltung des Ruhezustands von HSCs ist z.B. sowohl das Zusammenspiel von Sdf1 (stromal cell-derived factor 1alpha, Cxcl12) mit seinem Rezeptor als auch die Interaktion von Tie2 (Tek, endothelial-specific receptor tyrosine kinase) mit seinem Liganden Ang1 (Angiopoetin1) von großer Bedeutung [3, 115]. Auch THPO (Thrombopoietin) und sein Rezeptor MPL (myeloproliferative leukemia virus oncogene, TPO-R, CD110), sowie N-Cadherin/ β -Cathenin zählen zu den extrazellulären Faktoren, die den Ruhezustand der HSCs regulieren [185, 67]. Solche Interaktionen finden in den sogenannten Stammzellnischen in der Mikroumgebung des Knochenmarks statt [138, 178], wobei zwischen der endostealen Nische an der Oberfläche der trabekulären Knochenstrukturen und der vaskulären Nische in den Knochenmarkssinusoiden unterschieden wird [68]. Hier findet die Kontrolle der Balance zwischen HSC Ruhezustand, Selbsterneuerung und Differenzierung sowie die adäquate Reaktion auf Stress statt [40]. Die Tatsache, dass sich alle LT-HSCs, die nach einer Transplantation im Empfänger anwachsen, in der G0-Phase befinden [126], führt zu der Annahme, dass die Zellteilung der Stammzellen nur gefahrlos in der korrekten Nische stattfinden kann [103].

Zusätzlich zu den äußeren Bedingungen sind intrinsische Transkriptionsfaktoren, die nahezu alle Arten von DNA-Bindungsproteinen umfassen können [122], für die Zellzyklusregulation von großer Bedeutung, die im Rahmen der Differenzierung sowohl hemmende als auch verstärkende Effekte auf die Genexpression haben können [120]. Ein bemerkenswerter Aspekt der an der Hämatopoese beteiligten Transkriptionsfaktoren ist, dass die Mehrheit von ihnen an chromosomalen Translokationen oder somatischen Mutationen hämatologischer Krankheitsbilder, wie z.B. Leukämien, beteiligt ist [122]. Zu den wichtigen hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren gehören unter anderem SCL (stem cell leukemia hematopoietic transcription factor), PU.1, GATA-1 (GATA binding protein 1), GATA-2 (GATA binding protein 2) und Lmo-2 (LIM (Lin11, Isl-1, Mec-3) domain only 2), die sowohl bei der primitiven als auch bei der definitiven Hämatopoese eine wesentli-

che Rolle spielen, sowie AML-1 (acute myeloid leukemia 1), welcher hauptsächlich für die definitive Hämatopoese benötigt wird [194] [17]. Der Transkriptionsfaktor c-Myb (myeloblastosis oncogene) fördert z.B. durch Induktion von c-Myc (myelocytomatosis oncogene) und Hochregulierung der Expression von c-Kit und Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3) das Wachstum von hämatopoetischen Stammzellen [100]. Es konnte gezeigt werden, dass das Protoonkogen c-Myc essentiell für Selbsterneuerung und Differenzierung von HSCs ist [177]. Daneben stellen auch die Mitglieder der HOX (homeobox)-Familie Transkriptionsfaktoren von zentraler Bedeutung für die Regulation der Hämatopoese dar [42].

2.2 Zellzyklus

Im Verlauf des Zellzyklus kommt es zunächst zur DNA-Duplikation und dann zur Zellteilung. Er gliedert sich in verschiedenen Phasen, nämlich die G₀- beziehungsweise G₁-Phase (Gap 1), die S-Phase (Synthese), die G₂-Phase (Gap 2) und die M-Phase (Mitose) (Abb. 2.2). Der Übergang von einer in die nächste Phase wird im Allgemeinen durch die sogenannten Cyclin-abhängigen Kinasen (Cyclin-dependent kinases, Cdks) kontrolliert [125], die als katalytische Einheit an phasenspezifische regulatorische Cykline binden [144]. Im Verlauf des Zellzyklus werden die instabilen Cykline stets neu synthetisiert und, sobald sie nicht mehr benötigt werden, wieder degradiert. Durch die Interaktion von Cdks und den dazugehörigen Cyklinen ändert sich der Phosphorylierungsstatus bestimmter intrazellulärer Proteine, was schließlich zur Zellzyklusprogression führt [94]. Allerdings ist für die vollständige Aktivierung der Cyclin-Cdk-Komplexe noch ein weiteres Protein, nämlich die Cdk-aktivierende Kinase (Cdk-activating kinase, CAK), notwendig, die die Cdks phosphoryliert und deren Aktivität durch kleine Konformationsänderungen noch erhöht. Um den korrekten Ablauf des Zellzyklus zu garantieren, verfügen Zellen über eine Reihe von sogenannten "Checkpoints", die den Übertritt in eine neue Zellzyklusphase verhindern, solange eine andere noch nicht abgeschlossen ist [60]. Der Verlust dieser Kontrollpunkte durch Mutationen kann zu unkontrollierter Proliferation und gegebenenfalls zu neoplastischem Wachstum führen [93].

Die Proliferationsrate von Zellen wird zum Großteil durch den Verlauf der G₁-Phase festgelegt [146]. In diesem Stadium reagiert die Zelle auf externe Signale und die in der S-Phase stattfindende DNA-Synthese wird vorbereitet. Sobald die

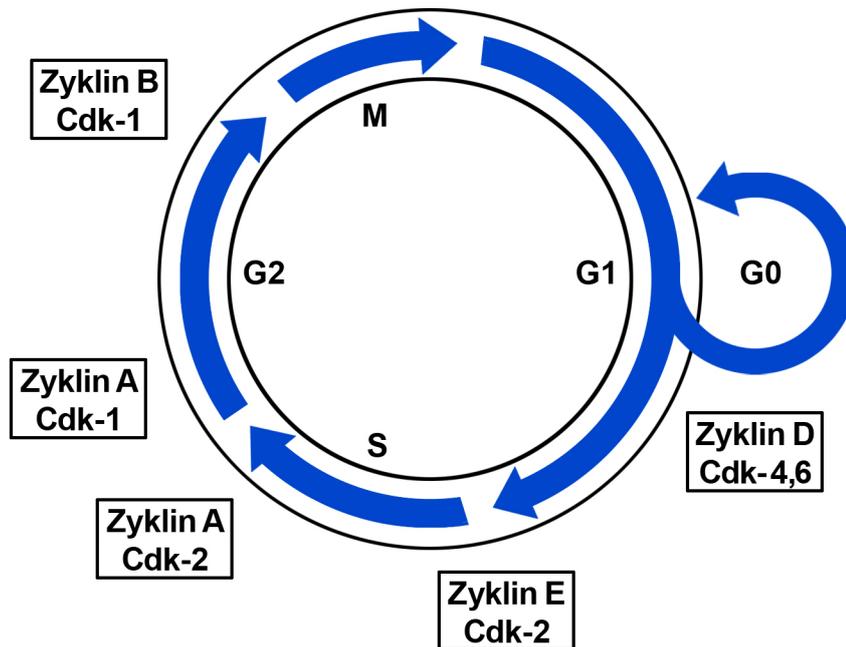


Abbildung 2.2: **Zellzyklus**. Cyklin-Cdk-Komplexe regulieren den Übergang von einer in die nächste Zellzyklusphase. M: M-Phase (Mitose), G0: G0-Phase (Ruhephase), G1: G1-Phase (Gap1), S: S-Phase (Synthese), G2: G2-Phase (Gap2).

Zelle mit der DNA-Replikation begonnen hat, ist sie irreversibel darauf festgelegt, den Zyklus zu beenden [125]. Den Zeitpunkt in der späten G1-Phase, an dem diese Entscheidung getroffen wird, nennt man Restriktionspunkt, da im Folgenden keine wachstumsfördernden Stimuli mehr benötigt werden [144].

Mitogene Signale führen zur Induktion von Typ D Cyklinen, die spezifische G1-Cdks, nämlich Cdk4 und Cdk6, binden und aktivieren, was zur Phosphorylierung von bestimmten Zielproteinen wie z.B der Retinoblastom (Rb)-Familie führt [143, 126]. Die in der Ruhephase vorherrschende wachstumshemmende Wirkung der hypophosphorylierten Mitglieder der Rb-Gruppe, nämlich pRb, p107 und p130, kommt durch Assoziation mit der E2f-Transkriptionsfaktorenfamilie zustande, deren Transkriptionsaktivität dadurch inhibiert wird. Durch Phosphorylierung der Proteine der Rb-Familie wird diese Hemmung aufgehoben und die E2f-Transkriptionsfaktorenfamilie ist nun in der Lage, bestimmte für den Übergang in die S-Phase notwendige Gene zu aktivieren [114, 58]. Dazu gehören unter anderem Typ E Cykline, die an Cdk2 binden, und für einen korrekten Abschluss der G1-Phase benötigt werden [94].

Die Aktivität der G1 Cyklin-Cdk-Komplexe wird durch zwei verschiedene Gruppen von Cdk Inhibitoren (CKIs) reguliert: Die Ink4 Familie, zu der p16^{INK4a} [139], p15^{INK4b} [56], p18^{INK4c} und p19^{INK4d} [64] gehören, blockiert die Aktivität des Cyklin D-Cdk4-6-Komplexes, während die Cip/Kip Familie mit p21^{Cip1/Waf1} [181], p27^{Kip1} [130, 129, 163] und p57^{Kip2} [99] vor allem den Cyklin E-Cdk2-Komplex inhibiert, gleichzeitig aber auch als Gerüst für katalytisch aktive Cyklin D-Cdk4-6-Komplexe dient [23]. In Zellen, die sich in der G0-Phase also in einem Ruhezustand befinden, sind im Vergleich zu den Cyklin-Cdk-Komplexen mehr CKIs vorhanden, was gemeinsam mit der transkriptionellen Hemmung der E2f-Familie zu einem Proliferationsstopp führt [144]. In hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) zeigen die CKIs unterschiedliche Funktionen. Obwohl es zahlreiche Hinweise dafür gab, dass p21^{Cip1/Waf1} ein wichtiger Regulator der normalen HSC-Funktion im Steady-State ist, ergaben neueste Untersuchungen, dass die Rolle von p21^{Cip1/Waf1} sich wahrscheinlich auf die Stress-induzierte Hämatopoese beschränkt und das Protein auch nur unter Stressbedingungen in HSCs exprimiert wird [168]. p27^{Kip1} dagegen wird in allen hämatopoetischen Fraktionen exprimiert [98] und reguliert höchstwahrscheinlich den Pool der Progenitorzellen [25]. Bisher ging man davon aus, dass das Protein keinen spezifischen Einfluss auf die Funktion der hämatopoetischen Stammzellen hat, da weder Anzahl oder Zellzyklus noch Selbsterneuerung der HSCs durch den Verlust von p27^{Kip1} verändert wurden [25]. Neueste Daten sprechen allerdings dafür, dass die beiden CKIs p27^{Kip1} und p57^{Kip2} kooperieren, um den Ruhezustand der HSCs aufrecht zu erhalten [98]. Dafür spricht auch, dass sich die Expression von p57^{Kip2} in den frühen Stammzellen am höchsten präsentiert und sobald sich die HSCs zu Progenitoren differenzieren nicht mehr nachweisbar ist [182, 196]. Der Verlust von p18^{INK4c} hingegen führt zur Expansion von Stamm- und Progenitorzellen mit verbessertem Langzeit-Wachstum, das mit gesteigerter Selbsterneuerungsfähigkeit vergesellschaftet ist. Dies bringt einen kompetitiven Vorteil gegenüber den Kontrollen in seriellen Transplantationen und macht p18^{INK4c} zu einem wichtigen Regulator hämatopoetischer Stammzellen [186, 25, 188]. Der CKI p16^{INK4a} spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der altersabhängigen Funktionsminderung der HSCs und auch die Expression steigt mit zunehmendem Alter der Stammzellen an [74]. Während der Verlust von p15^{INK4b} die HSC Funktion nicht beeinträchtigt, ist die Proliferation von Vorläufern der Granulozyten und Monozyten in Abwesenheit von p15^{INK4b} gesteigert [135]. Trotz großer Strukturähnlichkeit innerhalb

der beiden CKI-Familien entsprechen sich deren Rollen im Rahmen der murinen Hämatopoese also keineswegs.

Für den Übertritt in die S-Phase scheint die Kinaseaktivität des Cyklin E-Cdk2-Komplexes von essentieller Bedeutung zu sein, da neben der Phosphorylierung des Rb-Proteins auch die DNA-Replikation eingeleitet wird [69]. Um eine erneute Replikation zu vermeiden, werden Bestandteile des Komplexes jedoch kurz darauf durch Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut [94]. Neben zahlreichen anderen Proteinen ist der Cyklin E-Cdk2-Komplex auch in der Lage, seinen eigenen Inhibitor p27^{Kip1} zu phosphorylieren und dessen Abbau zu erleichtern [69, 142]. Um die S-Phase abzuschließen, sind die Cyklin A-Cdk2-Komplexe von großer Bedeutung, die zahlreiche Proteine, wie z.B. E2f1 oder b-Myb, phosphorylieren können [93]. Zur selben Zeit bilden sich auch Cykline A-Cdk1-Komplexe, die über ein recht ähnliches Substratspektrum verfügen [94].

Im Laufe der G2-Phase, die als Vorbereitung für die M-Phase dient, werden Typ A Cykline ubiquitiniert und abgebaut, während Typ B Cykline aktiv synthetisiert werden. Infolgedessen bildet sich der für den Übergang in die Mitose essentielle Cyklin B1-Cdk1-Komplex, der sogenannten M-Phase promoting factor (MPF) [91, 117]. Um nach der Zellteilung den korrekten Austritt aus der M-Phase sicherzustellen, werden die Typ B Cykline mithilfe von APC/C (Anaphase-promoting complex/cyclosome) proteolytisch abgebaut [59, 112].

Der Zellzyklusstatus ist in jedem Stadium der Hämatopoese eng mit der Funktion der jeweiligen Zellen verknüpft. Ein langsames Durchlaufen des Zellzyklus oder der Ruhezustand sind wichtig für die Selbsterneuerung primitiver Stammzellen, während ein schnelles Durchlaufen des Zellzyklus für die effektive Expansion der Progenitorpopulationen von Bedeutung ist. Dagegen spielt der engültige Austritt aus dem Zellzyklus eine Rolle bei der terminalen Differenzierung von hämatopoetischen Zellen [44].

2.3 p27^{Kip1}

2.3.1 Funktionen von p27^{Kip1}

p27^{Kip1} gehört zur Familie der Cip/Kip Cdk-Inhibitoren und kann als Reaktion auf anti-mitogene Signale den Zellzyklus in der G1 Phase anhalten [129, 145]. Im Zellkern hemmt das Protein die Aktivität der Cykline und Cdks über seinen N-Terminus, indem es einerseits eine Substratinteraktionsdomäne auf der Cykli-

noberfläche bedeckt und andererseits als kompetetiver Hemmer das katalytische Zentrum der Cdks besetzt, sodass ATP nicht mehr daran binden kann [137]. Die Hemmung von Cdk2, Cdk4 und Cdk6 durch $p27^{Kip1}$ führt dazu, dass sich das Rb-Protein weiterhin im hypophosphorylierten Zustand befindet [55]. Überexpression von $p27^{Kip1}$ führt zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase [31]. Im Gegensatz zu vielen anderen Tumorsuppressoren wird $p27^{Kip1}$ in Tumoren selten mutiert oder deletiert vorgefunden. In den meisten Fällen handelt es sich vielmehr um eine Fehlregulation des Proteinlevels [165, 29], wobei eine Missregulation, die zu verstärktem $p27^{Kip1}$ -Abbau führt, mit Krebsentstehung in Verbindung gebracht werden kann [63, 104].

Die $p27^{Kip1-/-}$ Maus, die auf keinem der beiden Allele über ein $p27^{Kip1}$ -Gen verfügt, zeichnet sich durch eine insgesamt erhöhte Zellproliferation aus, was zu einer Zunahme der Körpergröße um ca. 30 % und multiplen Organhyperplasien z.B von Thymus und Nebennieren führt. Es kommt zur Fehlorganisation der Epithelien in Retina und Innenohr und aufgrund einer Dysfunktion der Ovarien und des Uterus sind die weiblichen $p27^{Kip1}$ Knockout-Mäuse steril [43, 79, 110, 162, 22, 89, 39]. Die tumorsuppressive Wirkung des Proteins wird durch die Entstehung von Hypophysenadenomen sowie erhöhte Sensitivität auf chemische Karzinogene oder Bestrahlung in $p27^{Kip1-/-}$ Mäusen deutlich [43, 79, 110]. Beim Menschen ist ein intranukleärer Mangel an $P27^{Kip1}$ mit sporadischer Tumorentstehung sowie bei einigen Tumorarten mit erhöhter Aggressivität und schlechterer Prognose assoziiert [19, 90, 151].

Sowohl in normalen als auch in Tumorzellen spielt die zelluläre Lokalisation von $p27^{Kip1}$ eine wichtige Rolle, da das Protein im Zytoplasma und im Zellkern gegensätzliche biologische Wirkungen haben kann [87]. Einerseits agiert im Zellkern enthaltenes $p27^{Kip1}$ durch Cyklin-Cdk Inaktivierung als Tumorsuppressor, andererseits verfügt das Protein vor allem in zytoplasmatischer Lokalisation auch über onkogene Eigenschaften, wie z.B. Förderung der Zellmotilität und Begünstigung der Verbindung von Cyklin D-Cdk4-Komplexen, was wiederum Metastasierung und Progression des Zellzyklus zur Folge hat [11, 9, 149, 170]. Viele von der Zellzyklus-Kontrolle unabhängige Funktionen laufen wahrscheinlich über die Interaktion des C-Terminus mit verschiedenen Proteinen, wie z.B. RhoA, Rac, Stathmin und Grb2, ab [16].

Einen Hinweis auf onkogene Eigenschaften des Proteins ergaben Experimente mit heterozygoten $p27^{Kip1+/-}$ Mäusen, die für einige Tumorarten empfänglicher

als die $p27^{Kip1-/-}$ Maus waren [109, 47]. Durch die Kreation der Knockin-Maus $p27^{CK-}$ wurde die onkogene Funktion von $p27^{Kip1}$ allerdings besonders deutlich. In dieser Maus ist durch Alterationen in der für $p27^{Kip1}$ kodierenden *cdkn1b*-Region das Genprodukt nicht mehr in der Lage, mit Cyklinen und Cdks zu interagieren, wodurch seine Funktion als Cdk-Inhibitor aufgehoben wird. Die $p27^{CK-}$ Maus entwickelt, im Gegensatz zu der $p27^{Kip1-/-}$ Maus, zahlreiche hyperplastische Läsionen und Tumoren in multiplen Organen, was die Cyklin-Cdk-unabhängige Funktion als dominantes Onkogen in vivo deutlich macht [10].

2.3.2 Regulation von $p27^{Kip1}$

$p27^{Kip1}$ -Level werden durch transkriptionale, translationale und post-translationale Mechanismen reguliert, wobei die Aktivität von Konzentration, Lokalisation und Phosphorylierungsstatus abhängt [62, 18, 13, 170, 147]. Verschiedene Signaltransduktionswege phosphorylieren das Protein auf unterschiedliche Weise, wobei z.B. Phosphorylierung an Thr187 (Threonin 187) zur Ubiquitinierung und zum Abbau von $p27^{Kip1}$ im Proteasom führt, während Thr198 (Threonin 198) Phosphorylierung durch die Ribosomale S6 Kinase 1 (RSK1) die Zellmotilität begünstigt [54, 86]. Obwohl die $p27^{Kip1}$ Protein-Level im Verlauf des Zellzyklus variieren, sind die mRNA-Level relativ konstant [12], da ein Großteil der Kontrolle auf dem Abbau des Proteins durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse basiert [124]. Die $p27^{Kip1}$ -Konzentration und seine Aktivität steigern sich als Antwort auf erhöhte Zelldichte, Differenzierungssignale oder als Reaktion auf wachstumshemmende Signale, wie $TGF\beta$ (transforming growth factor beta, Transformierender Wachstumsfaktor Beta) und Lovastatin [13, 29]. Zellzyklusprogression und der Eintritt in die S-Phase hingegen erfordern die Degradation von $p27^{Kip1}$, dessen maximales Level in der G0- und G1-Phase erreicht wird [124]. Da die $p27^{Kip1}$ Proteolyse nicht nur für die Aktivierung von Cdk2, sondern auch von Cdc2 (Cdk1) notwendig ist, geht man davon aus, dass $p27^{Kip1}$ nicht nur eine Rolle bei dem G1/S-Phasen-Übergang spielt, sondern auch über regulatorische Funktionen bei der G2/M-Progression verfügt [111].

Den wichtigsten Faktor für den Abbau des $p27^{Kip1}$ -Proteins stellt dessen Polyubiquitinierung (Abb. 2.3) durch den SCF^{Skp2} -Komplex in der S- und G2-Phase dar [18, 92, 111]. Dieser besteht aus Skp1 (S-phase kinase associated protein 1), Cull1 (Cullin 1), dem Ringfingerprotein Rbx1 (Roc1), dem F-Box-Protein Skp2 (S-phase kinase associated protein 2) sowie dem Adapterprotein

Cks1 (cyclin-dependent kinase subunit 1) und agiert im Ubiquitin-System als Ubiquitin-Ligase (E3), nachdem die Ubiquitin-Aktivierung durch das E1-Enzym und die Ubiquitin-Konjugierung durch Ubc3 (E2) abgeschlossen ist [5]. Cyclin-Cdk2-gebundenes, an Thr187 phosphoryliertes $p27^{Kip1}$, bindet an die Phosphatbindungsstelle von Cks1, an die Substraterkennungskomponente Skp2 und an die Cks1-Skp2-Kopplungsstelle [57]. Die Bindung des Cyclin A-Cdk2-Komplexes fördert zusätzlich das Zusammentreffen von $p27^{Kip1}$ und SCF^{Skp2} -Ubiquitin-Ligase, da Cyclin A an Skp2 sowie Cdk2 und Cks1 bindet. Vor der Ubiquitinierung wird $p27^{Kip1}$ durch aktives Cyclin E- oder Cyclin A-Cdk2 an Thr187 phosphoryliert [12]. Der Wechsel von p27 vom Cyclin E-Cdk2-Inhibitor in der G₀-Phase zum Cyclin-Cdk2-Komplex Substrat in der G₁-Phase wird durch die Abl- und Src-Kinasen reguliert [28]. Erst nach abgeschlossener Ubiquitinierung kann $p27^{Kip1}$ im Proteasom abgebaut werden.

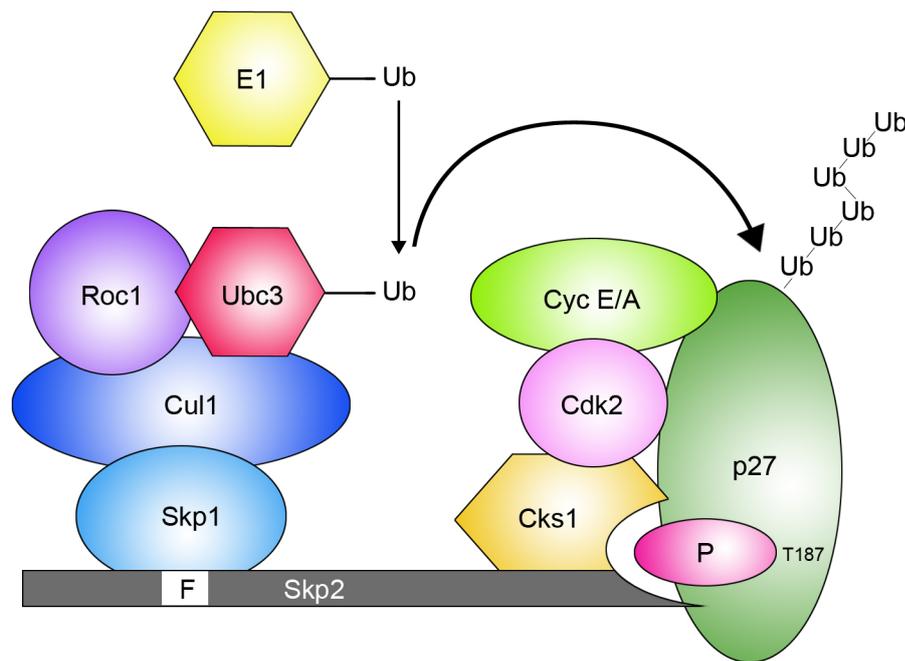


Abbildung 2.3: **$p27^{Kip1}$ -Ubiquitinierung.** Nach Ubiquitin-Aktivierung durch E1 und -Konjugierung durch Ubc3 (E2) wird Cyclin-Cdk-gebundenes, an Threonin187 phosphoryliertes $p27^{Kip1}$ durch die SCF^{Skp2} -Ubiquitin-Ligase (E3) ubiquitiniert und so für den Abbau im Proteasom markiert. Für die Erkennung von $p27^{Kip1}$ und die Bindung an den SCF^{Skp2} -Komplex ist an Skp2 gebundenes Cks1 ein essentieller Faktor (nach Bartek 2001).

Skp2-vermittelte p27-Proteolyse kann auch unabhängig von Thr187- Phos-

phorylierung in der G0 und G1 Phase stattfinden [92]. Es existiert ein von Cks1-unabhängiger Komplex aus Skp2, Cullin 4A (Cul4A), damaged-DNA binding protein (Ddb1) und COP9 Signalosom (Csn), der ebenfalls p27^{Kip1} für die Ubiquitinierung markieren kann [14]. In der frühen G1-Phase wird der Export von p27^{Kip1} aus dem Zellkern durch Phosphorylierung mittels KIS (Kinase-interacting stathmin) oder MIRK (Minibrain-related kinase) gefördert [13, 36]. Im Zytoplasma lokalisiertes p27^{Kip1} wird dann durch die Ubiquitin Ligase KPC (Kip1-ubiquitylation-promoting complex) ubiquitiniert [112].

2.3.3 Rolle von p27^{Kip1} in der murinen Hämatopoese

Das Protein p27^{Kip1} ist in allen hämatopoetischen Fraktionen nachweisbar [98], jedoch ergaben immunhistochemische Analysen des Knochenmarks von Wildtypmäusen lediglich eine schwache p27^{Kip1} Expression in CD34⁻ HSCs, während es in den Lineage negativen Fraktionen der hämatopoetischen Vorläufer deutlich stärker exprimiert wurde [182]. Die Tatsache, dass der Verlust von p27^{Kip1} zu einer Erhöhung der Zellzahlen und dem Gewicht hämatopoetischer Organe wie Milz und Thymus führt, die weit über die allgemeine Erhöhung des Körpergewichts und der Körpergröße hinausgeht [43], spricht dafür, dass das Protein ein spezifischer Regulator für Zellzykluseintritt und Proliferation in hämatopoetischen Geweben darstellt [153]. Im Maus-Modell betrifft die Abwesenheit von p27^{Kip1} hauptsächlich hämatopoetische Progenitorzellen und führt zu einer Erhöhung deren Zellzahl und der Teilungsrate. Des Weiteren zeigen hämatopoetische Vorläufer, denen p27^{Kip1} fehlt, einen deutlichen Vorteil gegenüber Wildtypkontrollen in seriellen und kompetitiven Transplantationen. Der Verlust von p27^{Kip1} führt außerdem zu einer verbesserten funktionellen Kapazität der Progenitorzellen mit verlängertem Überleben der Mäuse nach Transplantation von Zellen aus der 4. Knochenmarkstransplantation in tödlich bestrahlte Empfängertiere, den sogenannten Kurzzeit Radio-Protektions-Assays. Demgegenüber hat die Abwesenheit von p27^{Kip1} keinen Einfluss auf die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), deren Zellzyklus oder Repopulationspotential [24, 25]. Lange Zeit ging man also davon aus, dass p27^{Kip1} in der Hämatopoese eine kritische Inhibitorfunktion auf Ebene der Vorläuferzellen ausübt, ohne eine bedeutende Rolle bei der Funktion der HSCs zu spielen. Weitere Untersuchungen ergaben allerdings, dass unter bestimmten Bedingungen p27^{Kip1} mit dem Myc-Antagonisten Mad1 kooperieren und so Selbsterneuerung und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen

reguliert. Dafür spricht, dass $p27^{Kip1}/Mad1$ Doppelknockouts über eine erhöhte Anzahl an HSCs verglichen mit den Wildtypkontrollen verfügen [173]. Neueste Daten sprechen dafür, dass $p27^{Kip1}$ im Rahmen der Hämatopoese noch weitere Aufgaben übernimmt. Es wird angenommen, dass die beiden CKIs $p27^{Kip1}$ und $p57^{Kip2}$ kooperieren, um den Ruhezustand der HSCs aufrechtzuerhalten, wobei Vieles daraufhin deutet, dass ihre Funktion mit der Regulation der zellulären Lokalisation des Hsc70/Cyklin D1 Komplexes in den Stammzellen zusammenhängt [196]. Die Blutbilder von $p27^{Kip1}$ Knockout-Mäusen zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu denen der Wildtypen [43].

2.4 Cks1

2.4.1 Funktionen von Cks1

Cks1 (cyclin-dependent kinase subunit 1), neben Cks2, eines der beiden Cks-Orthologe in Säugetieren, gehört zu der Suc1/Cks-Familie hochkonservierter Proteine, die als Komponenten der Cyklin-Cdk-Komplexe an der Zellzykluskontrolle in allen Eukaryonten beteiligt sind, wobei beide humanen Homologe Cks1 in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ersetzen können [37, 131, 128].

Das Protein ist Bestandteil der SCF^{Skp2} Ubiquitin Ligase und essentiell für die Erkennung und das korrekte Andocken von $p27^{Kip1}$ sowie dessen Ubiquitinierung, was schließlich zur Zellzyklusprogression führt [46]. Auch bei der Degradierung von p130, einem Protein der Rb-Familie, sowie den CKIs $p21^{Cip1/Waf1}$ und $p57^{Kip2}$ spielt Cks1 als Kofaktor der SCF^{Skp2} Ubiquitin Ligase eine wichtige Rolle [157, 15, 134]. In niedrigeren Eukaryonten verfügen die Cks Proteine über zahlreiche etablierte mitotische Funktionen. So ist Cks1 in *Saccharomyces cerevisiae* über Komplexbildung mit Cdc28 (Cdk-1) [101, 187] an der Rekrutierung des Proteasoms zu spezifischen Promotorregionen beteiligt und spielt auf diese Weise bei der effizienten Transkription von *cdc20* [106], einem Aktivator von APC/C, *Gal1* (Galactose 1) sowie zahlreichen weiteren Genen [187] eine wichtige Rolle.

Nach aktuellem Wissensstand besteht die Schlüsselrolle von Cks1 in Säugetierzellen in der Zellzyklusregulation im Rahmen der $p21^{Cip1/Waf1}$, $p57^{Kip2}$, p130 und $p27^{Kip1}$ -Ubiquitinierung, wobei mRNA- und Proteinkinetik-Studien sowie Knockout- und Überexpressionsexperimente mögliche mitotische Rollen für Cks1 auch beim Menschen suggerieren [81]. Heute weiß man, dass humane CKS-Proteine z.B. am Abbau von Cyklin A und wahrscheinlich auch von Cyklin B

beteiligt sind und außerdem eine regulatorische Rolle beim cdc2-Umsatz spielen könnten [65, 164, 179]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Cks1 an der Regulation der Transkription von *Cdc2*, *Cyklin B* und *Cyklin A* in Säugetierzellen beteiligt ist [96, 176].

Der Phänotyp der *Cks1* Knockout-Maus ist dem der *p27^{Kip1}* Knockout-Maus teilweise entgegengerichtet. Die *Cks1*^{-/-} Maus wird durch ihre im Vergleich zum Wildtyp geringere Körpergröße charakterisiert, die von frühen embryonalen Stadien an das ganze Erwachsenenalter hindurch bestehen bleibt [155]. Da die *Cks1*^{-/-} Zellen selbst nicht kleiner als die der Wildtyp-Kontrollen sind und auch nicht mehr zu Apoptose neigen, ist die geringere Körpergröße auf eine reduzierte Proliferationskapazität zurückzuführen. Dies wird unter eingeschränkten mitogenen Bedingungen besonders deutlich. Ein Merkmal der Zellen der *Cks1* Knockout-Mäuse besteht in der Akkumulation von p27^{Kip1}, was darauf zurückgeführt wird, dass in Abwesenheit von *Cks1* p27^{Kip1} nicht durch die SCF^{Skp2} Ubiquitin Ligase ubiquitiniert und daraufhin abgebaut werden kann [155]. Während auch die *Cks2* Knockout-Maus lebensfähig ist, sterben die *Cks1*^{-/-} *Cks2*^{-/-} Doppelknockout-Mäuse noch vor der Implantation im Morulastadium, was auf eine kritische Rolle der Cks-Proteine in der frühen Embryogenese hindeutet [96].

Die Überexpression von *Cks1*, teilweise mit *Skp2*-Überexpression kombiniert, ist in zahlreichen Tumorarten, wie z.B. dem Mammakarzinom, Magenkarzinom oder Kolonkarzinom, mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet und spricht für eine onkogene Funktion des Proteins [97, 78, 141]. Häufig, jedoch nicht immer, korreliert dabei die *Cks1*-Expression invers mit den p27^{Kip1}-Leveln, was auf p27^{Kip1}-abhängige und -unabhängige Funktionen von Cks1 bei der Tumorentstehung hindeutet [78, 152, 85]. Beim Multiplen Myelom konnte bereits gezeigt werden, dass Cks1 Zellwachstum und Überleben sowohl durch p27^{Kip1}-abhängige als auch -unabhängige Mechanismen beeinflusst, wobei auch hier eine *Cks1*-Überexpression als prognostisch ungünstig gilt und therapeutische Eliminierungsstrategien für *Cks1* als aussichtsreiche Behandlungsoptionen gesehen werden [20]. Hohe Cks1-Level sind unter anderem kennzeichnend für *Eμ-Myc*-Lymphome und das Burkitt-Lymphom. Der Verlust von *Cks1* in *Eμ-Myc* B-Zellen erhöht die p27^{Kip1}-Level, setzt die Proliferationsrate herab und verzögert die Lymphomentwicklung und die Krankheitsausbreitung [77]. Da der *Skp2*-Verlust in *Eμ-Myc*-Lymphomen jedoch nicht zur Verzögerung von Lymphomentwicklung und Dissemination führt, scheint Cks1 auch eine von p27^{Kip1}-unabhängige Rolle bei der

Zellmigration zu spielen [119]. Für die These, dass die Rolle von Cks1 im Rahmen der Tumorgenese auch auf seiner regulatorischen Funktion bei der Mitose basiert, spricht z.B., dass es in MEFs (mouse embryonic fibroblasts), in denen beide *Cks*-Gene ausgeschaltet wurden, zunächst zum Zellzyklusarrest in G2 und dann zu einer Rereplikation ohne Zellteilung kommt, die zur Polyploidie führt [96].

2.4.2 Regulation von Cks1

Die Expression von *Cks1* variiert im Verlauf des Zellzyklus, wobei es in der späten M- und der frühen G1-Phase zu einem deutlichen Abfall und kurz vor der S-Phase es wieder zu einem Anstieg des Cks1-Levels kommt [6]. Die Expression von *Cks1* mRNA ist in der G0-Phase sehr gering und beginnt in der späten G1-Phase. Sie erreicht ihren Höhepunkt in der S/G2-Phase, was auch im Hinblick auf die gleichzeitige Cks1-Promotoraktivität für eine Regulation der Zellzyklus-abhängigen Cks1-Synthese auf transkriptionalem Level spricht [136]. Die Transkription von *Cks1* wird z.B. durch den Transkriptionsfaktor MYC induziert, der in einem Großteil aller menschlichen Krebserkrankungen überexprimiert ist [77], während der Tumorsuppressor P53 *Cks1* wahrscheinlich ebenfalls auf transkriptionaler Ebene herunterreguliert [136]. Zumindest in primären T-Lymphozyten scheint die Transkription von *Cks1* und *Skp2* auch durch Ko-Stimulation mit CD28 erreicht zu werden [2].

Das Cks1 Protein wird außerdem auf post-translationaler Ebene reguliert [61]. Genau wie Skp2 befindet sich das Protein Cks1 in der G0- und G1-Phase in einem instabilen Zustand und wird mithilfe der Ubiquitin Ligase APC/*Cdh1* (Anaphase-promoting complex and its activator Cdh1) für den Abbau im Proteasom markiert. Dies stellt einen der wichtigen Mechanismen für die Aufrechterhaltung der G1-Phase dar und verhindert einen zu frühen Eintritt in die S-Phase [6].

2.5 Zielsetzung und Fragestellung

Während der hämatopoetischen Entwicklung befindet sich der Zellzyklus unter strenger Kontrolle [42] und der nur eingeschränkt mögliche Eintritt in den Zellzyklus sorgt für die Balance zwischen Proliferation und Ruhezustand der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs). Der CKI p27^{Kip1} stellt einen wichtigen Regu-

lator für Zellzykluseintritt und Proliferation in hämatopoetischen Geweben dar und übernimmt im Verlauf der murinen Hämatopoese kritische Inhibitoraufgaben besonders auf Ebene der reiferen hämatopoetischen Zellen [24, 25]. Unter bestimmten Umständen scheint das Protein aber auch Einfluss auf die HSCs zu haben [196, 173]. Der am $p27^{Kip1}$ -Abbau beteiligte Zellzyklusregulator *Cks1* spielt im Rahmen des normalen Zellzyklusverlaufs und bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle. Der Verlust von *Cks1* stabilisiert nicht nur $p27^{Kip1}$ sondern auch die CKIs $p21^{Cip1/Waf1}$, $p57^{Kip2}$ und p130, denen ebenfalls wichtige Aufgaben bei der Hämatopoese zugeschrieben werden. Die Abwesenheit von *Cks1* führt in zahlreichen Geweben zu Zellzyklusarrest, während eine Überexpression in verschiedenen Malignomen zu finden ist und als prognostisch ungünstig gilt [5, 157, 78].

Die Rolle von *Cks1* in der murinen Hämatopoese wurde bisher nicht näher untersucht. Das Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob *Cks1* an der Regulation der hämatopoetischen Stammzellen und Progenitoren beteiligt ist. Die $p27^{Kip1}$ -abhängigen und -unabhängigen Funktionen von *Cks1* in der Hämatopoese werden im Mausmodell mit *Cks1*^{-/-} Mäusen, $p27^{Kip1}$ ^{-/-} Mäusen und *Cks1*/ $p27^{Kip1}$ Doppelknockout-Mäusen analysiert. Als Orte der adulten und embryonalen Blutbildung werden das Knochenmark und die fetale Leber auf die Verteilung der HSC- und Vorläuferpopulationen sowie deren funktionelle Kapazität hin untersucht. Ergebnisse anderer Autoren haben ergeben, dass bestimmte Zellzyklusregulatoren wie z.B. der CKI $p21^{Cip1/Waf1}$ in der Hämatopoese vor allem eine Rolle bei der Antwort auf genotoxischen Stress spielen [168]. Um herauszufinden, ob dies auch für das Protein *Cks1* der Fall ist, werden sowohl die Steady-State-Hämatopoese als auch die Stress-induzierte Hämatopoese untersucht.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose NEEO ultra quality Roti®Garose	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Destilliertes Wasser (aqua dest.)	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Riedel-de Haën
dNTP Mix (je 10mM)	Fermentas
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	Invitrogen
Ethanol	Riedel-de Haën
Ethidiumbromid	Carl Roth
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
5-Fluoruracil (5-FU)	Sigma-Aldrich
Gelantine(0,1 mg/ml)	Carl Roth
Glycerol	Sigma-Aldrich
Hank's buffered salt solution (HBSS)	PAA Laboratories GmbH
4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Interleukin-3 Maus (mIL-3)	R&D Systems GmbH
Interleukin-6 Maus (mIL-6)	R&D Systems GmbH
Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)	Invitrogen
Isopropanol	Fluka
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol 50 mM	Invitrogen
MethoCult M3434 (rm SCF, rm IL-3, rh IL-6, rh Epo)	StemCell Technologies
Dinatriumtetraborat	Sigma-Aldrich
Neupogen® Filgrastim (G-CSF)	Amgen GmbH

Chemikalien	Hersteller
Nonidet P40 (NP40)	Carl Roth
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Invitrogen
Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
Proteinkinase K	Invitrogen
RNase OUT	Invitrogen
Stem cell factor Maus (mSCF)	R&D Systems
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth
Trypanblau 0,4 Prozent	Invitrogen
Tween 20	Carl Roth

3.1.2 Primer

Genotypisierung

Name	Sequence 5' → 3'
Cks1-1	CGGAGGATGTAAAACAATGAAA
Cks1-2	GGGAAATCGCCACAACAAAG
Cks1-Neo	CTGTGGTTTCCAAATGTGTCA
mgK3	TGGAACCCTGTGCCATCTCTAT
mcK5	GAGCAGACGCCCAAGAAGC
p27-Neo	CCTTCTATGGCCTTCTTGACG

Real-Time PCR

Name	Sequence 5' → 3'
UbiRT Fw mur	TGGCTATTAATTATTCGGTCTGCAT
UbiRT Rev mur	GCAAGTGGCTAGAGTGCAGAGTAA
p27RT Fw mur	GGCCCGGTCAATCATGAA [126]
p27RT Rev mur	TTGCGCTGACTCGCTTCTTC [126]

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Einfriergefäß (CryoTube™)	Corning
Einmalküvetten	Carl Roth
Einmalspritze(5 ml)	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritze(50 ml)	Fresenius Kabi AG
Einwegskalpell No. 21	Feather Safety Razor Co.LTD
FACS-Röhrchen	Nunc GmbH & Co. KG
Sterican	B. Braun Melsungen AG
Einmal-Injektions-Kanüle(Gr. 20)	
MicroAmp™ (Optical 96-Well Reaction Plate)	Applied Biosystems
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
S-Monovette® 1,2 ml K3E EDTA	Sarstedt AG & Co.
Tuberkulin-Sicherheitsspritze(1 ml)	Tyco Healthcare Deutschland GmbH
6-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturschalen	TPP AG

3.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Farbe	Volumen/ 1x10 ⁶ Zellen	Hersteller
CD16/32	93	PE	0.3 μ l	eBioscience
		eFluor405	0.5 μ l	eBioscience
CD34	RAM34	FITC	0.5 μ l	eBioscience
		AlexaFluor647	1.0 μ l	eBioscience
CD45.1(Ly5.1)	A20	PE	0.5 μ l	eBioscience
CD45.2(Ly5.2)	104	FITC	0.5 μ l	eBioscience
CD45	30-F11	APC	0.5 μ l	eBioscience
		PE-Cy7	0.5 μ l	eBioscience
		PE	0.5 μ l	eBioscience
		eFluor450	0.5 μ l	eBioscience
CD71	R17217	Biotin	0.5 μ l	eBioscience
CD117(c-Kit)	2B8	PE	0.5 μ l	eBioscience
		APC	1.0 μ l	eBioscience
		FITC	1.0 μ l	eBioscience
CD127(IL-7R α)	A7R34	Biotin	0.4 μ l	eBioscience
Gr-1(Ly-6G)	RB6-8C5 PE	eFluor405	0.3 μ l	eBioscience
Lin-Cocktail (CD3,B220, Ter119, Gr-1, CD11b)		Biotin	1.0 μ l	eBioscience
Ly-6C	AL-21	FITC	0.5 μ l	BD
Sca-1(Ly-6A/E)	D7	PE-Cy5	0.5 μ l	eBioscience
		PE-Cy7	0.5 μ l	eBioscience
TER-119	Ter119	FITC	0.5 μ l	BD

Sekundäre Antikörper für die Durchflusszyometrie

Streptavidin-PE-Cy5.5	0.5 $\mu\text{l}/1 \times 10^6$ Zellen	Invitrogen (SA1018)
Streptavidin-Pacific Blue	0.5 $\mu\text{l}/1 \times 10^6$ Zellen	Invitrogen (S11222)
Streptavidin-APC	0.5 $\mu\text{l}/1 \times 10^6$ Zellen	Invitrogen (S868)

3.1.5 Reaktionssysteme

Reaktionssysteme	Hersteller
Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit	Invitrogen
FITC BrdU Flow Kit	BD Bioscience
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen
MACS Lineage Cell Depletion Kit, mouse	Miltenyi Biotec
Qiagen® Omniscript RT Kit	Qiagen
Qiagen® Qiashredder	Qiagen
Qiagen® RNeasy Mini Kit	Qiagen

3.1.6 Softwareprogramme

CorelDRAW X4
 JabRef 2.6
 FlowJo Version 7
 Graph Pad Prism Version 5
 Microsoft Excel Version 2010
 Adobe Photoshop CS3
 TeXnicCenter

3.1.7 Geräte

Geräte	Hersteller
BD FACS Aria IIu	Becton Dickinson
Brutschrank Heraeus Hera cell 240	Heraeus
CyAn ADP Lx P8	Beckman Coulter
-20°C Gefrierschrank(Liebherr Premium)	Liebherr GmbH
-80°C Gefrierschrank (V.I.P. TM -86°C ULT,MDF-U52V)	SANYO ElectricBiomedical
-4°C Kühlschranks (Liebherr Premium)	Liebherr GmbH
Gel-Doc XR Imaging System	Bio-Rad
Glaswaren Labware	SCHOTT AG
Mikrozentrifuge (MiniSpin)	Eppendorf AG
Minishaker(MS1)	IKA® Werke GmbH & Co. KG
Pipetboy	Integra Biosciences AG
Präparierbesteck	Fine Science Tools GmbH
7900HT Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems
Reinluftwerkbank (HeraSafe HSP 18)	Heraeus
Spectrophotometer(SmartSpec TM Plus)	Bio-Rad
Stickstofftank (K-Series Cryo Storage Systems)	Taylor-Wharton Germany
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge fresco)	Heraeus
Tischzentrifuge (Heraeus Megafuge 3.0 RS)	Heraeus
Tischzentrifuge (Heraeus Multifuge 3s)	Heraeus
QuadroMACS TM -Separator(LD)	Miltenyi Biotec
Zählkammer (Neubauer improved)	LO-Laboroptik

3.1.8 Puffer

FACS-Puffer

0,5 % DPBS
BSA

HF2+ Puffer

10 % HBSS
1 % HEPES 1M
2 % FCS
0,5 % P/S
aqua dest.

3.1.9 Medien

CFA-Medium		
	10 %	IMDM FCS
Kultur-Medium		
	20 %	IMDM FCS
	1 %	P/S
	50ng/ml	mSCF
	10ng/ml	mIL-3
	10ng/ml	mIL-6

3.1.10 Mäuse

Cks1^{+/-} Mäuse (C57BL/6-129, gemischter Hintergrund) [155] wurden mit *p27^{Kip1}*^{+/-} Mäusen (C57BL/6) [43] für mehr als sechs Generationen gekreuzt, um die *Cks1/p27^{Kip1}* Doppelknockout-Maus sowie Kontrolltiere mit gemischtem C57BL/6-129-Hintergrund zu generieren. Die Genotypisierung erfolgte nach dem in 3.2.1 angegebenen etablierten Schema [155, 43]. Da sowohl die weiblichen *p27^{Kip1}*^{-/-} Mäuse [43] also auch die weiblichen *Cks1*^{-/-}*p27^{Kip1}*^{-/-} Mäuse steril waren, mussten für alle Verpaarungen *p27^{Kip1}*^{+/-} Weibchen verwendet werden. Ein genehmigter Tierversuchsantrag für die Experimente liegt vor.

3.2 Methoden

3.2.1 Genotypisierung

Bevor die Mäuse für Experimente verwendet werden konnten, musste der Genotyp mittels PCR (polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion) bestimmt werden. Die DNA-Gewinnung fand bei adulten Mäusen aus einem Stück des Schwanzes und bei Embryonen aus deren Kopf statt. Zu diesem Zweck wurde das Gewebe zunächst mit folgender Pufferzusammensetzung lysiert:

500 mM	KCl
100 mM	Tris-Puffer (pH 8,3)
0,1 mg/ml	Gelatine
1 %	NP40
1 %	Tween 20
200 μ g/ml	Proteinkinase K
	H ₂ O

Tabelle 3.1: Puffer für die Gewebelyse

Der Verdau wurde bei 50 Grad Celsius über Nacht oder für ein Minimum von vier Stunden bei 55 Grad Celsius durchgeführt. Danach fand eine Hitzeinaktivierung bei 95 Grad Celsius für 5 Minuten statt und im Anschluss daran wurde 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthält, wurde für die Genotypisierung verwendet. Nach der PCR wurden die Proben auf ein 1-prozentiges Agarosegel, das NaB-Puffer (0,01M Dinatriumtetraborat) und Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml) enthielt, aufgetragen. Als DNA-Marker wurde die 1kb DNA-Ladder von Invitrogen verwendet. Das Gel wurde für 15 Minuten bei 200V laufengelassen und anschließend mit dem BioRad Gel-Doc XR Imaging System analysiert.

***p27^{Kip1}*-Genotypisierung**

Da sich die Banden von Wildtyp- und Mutanten-Allel überschneiden, mussten sie getrennt untersucht werden. Für *p27^{Kip1}* wurde das in Tab.3.2 angegebene Pipettierschema sowie das in Tab. 3.3 aufgeführte PCR-Programm verwendet.

1 μ l	DNA
0.3 μ l	Primer 1[100 pmol/ μ l]
0.3 μ l	Primer 2[100 pmol/ μ l]
2 μ l	10x Puffer
4 μ l	5x Q Lösung
0,7 μ l	dNTPs (je 10mM)
0,3 μ l	Taq Polymerase
11,4 μ l	H ₂ O

Tabelle 3.2: Pipettierschema für die *p27^{Kip1}*-Genotypisierung

	Vorheizen	95°C
4x	96°C	30 sek
	57°C	30 sek
	65°C	2 min
36x	93°C	30 sek
	57°C	30 sek
	65°C	2 min
1x	65°C	2 min
	4°C	forever

Tabelle 3.3: PCR-Programm für die $p27^{Kip1}$ -Genotypisierung

Bei der PCR des Wildtyp-Allels wird ein Fragment der Größe 1 kB und bei der Reaktion des Mutanten-Allels ($p27^{Kip1}$ Knockout) ein Fragment der Größe 0,5 kB amplifiziert. Zu diesem Zweck wurden folgende Primer eingesetzt:

Wildtyp-Allel	mgK3
	mcK5
Mutanten-Allel	mgK3
	p27-Neo

***Cks1*-Genotypisierung**

Für die *Cks1*-Genotypisierung wurde das in Tab. 3.4 angegebene Pipettierschema sowie das in Tab. 3.5 aufgeführte PCR-Programm verwendet.

1 μ l	DNA
0.6 μ l	Primer Cks1-2[100 pmol/ μ l]
0.3 μ l	Primer Cks1-1[100 pmol/ μ l]
0.3 μ l	Primer Cks1-Neo[100 pmol/ μ l]
2.5 μ l	10x Puffer
5 μ l	5x Q Lösung
0,7 μ l	dNTPs (je 10mM)
1 μ l	MgCl ₂
0,3 μ l	Taq Polymerase
13,1 μ l	H ₂ O

Tabelle 3.4: Pipettierschema für die *Cks1*-Genotypisierung

1x	94°C	2 min
30x	94°C	30 sek
	55°C	30 sek
	72°C	1 min
1x	72°C	10 min
	4°C	forever

Tabelle 3.5: PCR-Programm für die *Cks1*-Genotypisierung

Bei der PCR des Wildtyp-Allels wird ein Fragment der Größe 150 bp und bei der Reaktion des Mutanten-Allels (*Cks1* Knockout) ein Fragment der Größe 200 bp amplifiziert.

3.2.2 Gewinnung von murinem Probenmaterial

Die in dieser Arbeit analysierten Gewebearten sind das Knochenmark und periphere Blut adulter Mäuse sowie fetale Leberzellen. Für die Untersuchung des Knochenmarks wurden Femur und Tibia der Hinterläufe entnommen und mit jeweils 3 ml HF2+ Puffer durchgespült. Um Kontamination zu vermeiden, wurde

diese Zellsuspension anschließend mit einem $30\mu\text{m}$ Filter gefiltert und weiterverwendet. Für die Analyse der fetalen Leber wurden Embryonen am Embryonaltag 15.5 entnommen. Ihre Leber wurde isoliert und durch einen $70\mu\text{m}$ Filter gepresst. Peripheres Blut wurde durch Punktieren der Fazialvene entnommen und in EDTA-Röhrchen gesammelt. Bei bereits getöteten Mäusen wurde das periphere Blut mithilfe einer Tuberkulin-Sicherheitsspritze direkt aus dem Herzen entnommen.

3.2.3 Colony Forming Assay

Der Colony Forming Assay wurde verwendet, um die Anzahl der hämatopoetischen Vorläufer im Knochenmark und in fetaler Leber zu ermitteln. Die verwendete Methylzellulose M3434 enthält die oben angegebenen Zytokine, die das Wachstum myeloischer Progenitoren zu Kolonien fördern. Dazu wurden entweder 2.5×10^4 frische bzw. kultivierte Knochenmarkszellen oder frisch präparierte fetale Leberzellen in $250\mu\text{l}$ Langzeitkultur-Medium zu 2.25 ml Methylzellulose gegeben. 3 cm große Zellkulturschalen wurden mit jeweils 1 ml dieser Mischung gefüllt und bei 37 Grad Celsius für 12 Tage inkubiert. Die Unterscheidung der Kolonien erfolgte nach ihrer Größe und Form. Erythroide Kolonien, die sogenannten BFU-E (burst-forming unit erythroid), zeichnen sich durch erythroide Cluster von mindestens 30 Zellen aus, die normalerweise nicht über ein verdichtetes Zentrum verfügen. Diese relativ kleinen Zellen erscheinen inhomogen in ihrer Form und sind schwierig voneinander abzugrenzen. Daneben gibt es Granulozyten/Makrophagen- Kolonien, die sogenannten CFU-GM (granulocytic/monocytic colony-forming unit), die entweder Granulozyten (CFU-G) (Abb. 3.1, a), Makrophagen (CFU-M) (Abb. 3.1, b) oder beide Zelltypen beinhalten (Abb. 3.1, c). Es handelt sich meistens um mehrere aus mindestens 30 Zellen bestehende Cluster, die jeweils über ein verdichtetes Zentrum verfügen. Während die Makrophagen sich durch eine ovale bis runde Form auszeichnen, erscheinen die Granulozyten als helle, runde Zellen, die wesentlich kleiner als die Makrophagen sind. Gemischte Kolonien, die sogenannten CFU-GEMM (granulocytic/erythroid/megakaryocytic/monocytic colony-forming unit), enthalten Granulozyten-, Erythrozyten-, Megakaryozyten- und Monozytenanteile (Abb. 3.1, d). Es handelt sich um sehr große Kolonien, die in den meisten Fällen mehr als 500 Zellen beinhalten und über ein sehr stark verdichtetes Zentrum verfügen.

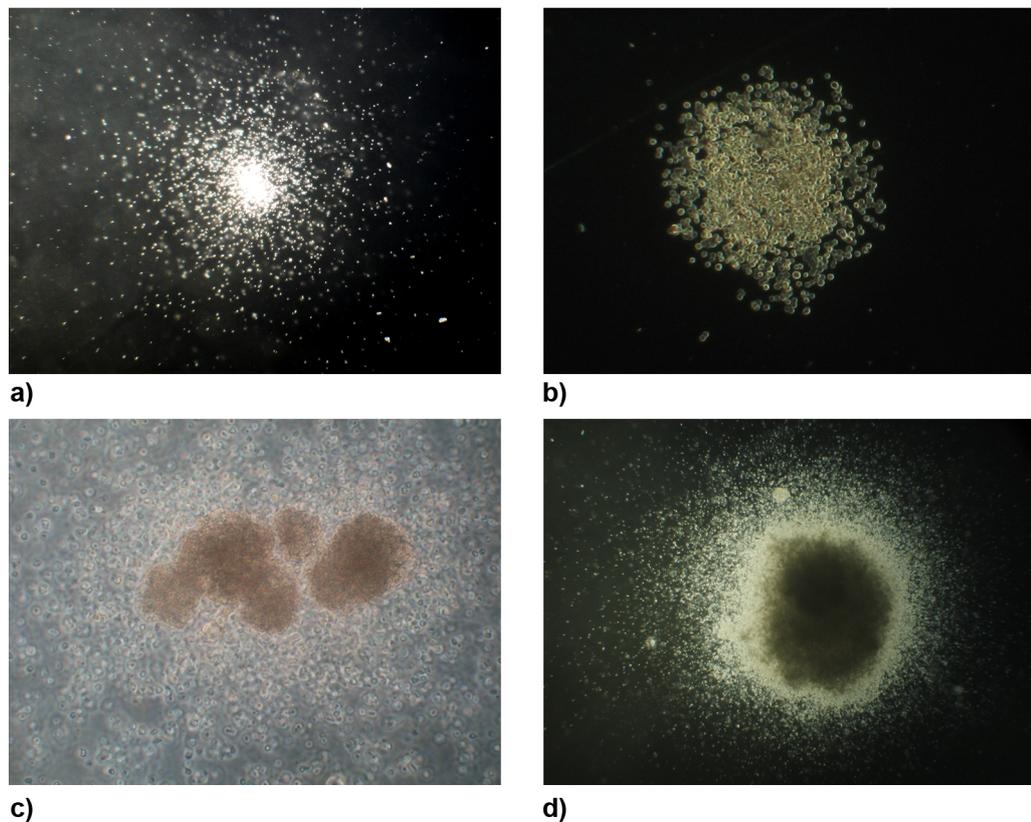


Abbildung 3.1: **Colony Forming Assay aus murinem Knochenmark an Tag 12.** a) CFU-G (granulocytic colony-forming unit) b) CFU-M (monocytic colony forming unit) c) CFU-GM (granulocytic/monocytic colony-forming unit) d) CFU-GEMM (granulocytic/erythroid/megakaryocytic/monocytic colony-forming unit).

3.2.4 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting) wurden murine Knochenmarkszellen und fetale Leberzellen ihren Oberflächenmarkern entsprechend analysiert. Bei der Färbung der frühen hämatopoetischen Progenitoren und HSCs setzte man fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD34, CD16/32, Lin (hämatopoetischer Lineage-Cocktail), Il-7R α , c-Kit und Sca-1 eingesetzt. Für die Analyse der erythroiden Zellpopulationen wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen CD71, Ter119 und c-Kit verwendet. 5×10^6 Zellen wurden in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert und mit der in 3.1.4 angegebenen Menge an Primärantikörpern 15 min bei 4 Grad Celsius inkubiert. Daraufhin mussten die Proben mit FACS-Puffer gewaschen werden

und sofern notwendig mit 0.5 μl Sekundärantikörper wiederum 15 min bei 4 Grad Celsius inkubiert werden. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in FACS-Puffer mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidium-Iodid(PI) resuspendiert und im CyAn ADP Lx P8 Durchflusszytometer analysiert. Für den sogenannten Zell-Sort, also die Aufteilung der unterschiedlichen Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker, wurden unter Einsatz des MACS Lineage Cell Depletion Kits Wildtyp-Knochenmarkszellen mit dem im Kit enthaltenen Lineage-Antikörper-Cocktail-Biotin und Anti-Biotin MicroBeads magnetisch markiert. Mithilfe einer magnetischen Säule trennte man daraufhin die Lineage positiven von den Lineage negativen Zellen. Letztere wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und am BD FACS Aria IIu Durchflusszytometer analysiert.

3.2.5 5-FU und BrdU-Applikation

Für die Untersuchung der Steady-State- und der Stress-induzierten Hämatopoese wurde entweder BrdU allein oder BrdU in Kombination mit 5-FU appliziert. Den Mäusen injizierte man zunächst 150 mg/kg Körpergewicht 5-FU intraperitoneal und fünf Tage später 50 mg/kg Körpergewicht BrdU ebenfalls intraperitoneal. 16 Stunden später wurden die Versuchstiere per Genickbruch getötet und ihr Knochenmark wurde auf die Inkorporation von BrdU in die DNA während der S-Phase in verschiedenen Zellpopulationen untersucht. Dazu hielt man sich an das Herstellerprotokoll des BrdU Flow Kits (BD Bioscience). Zunächst wurden die Zellen mithilfe des Cytofix/Cytoperm-Puffers und des Cytoperm-plus-Puffers, die Paraformaldehyd und Saponin enthalten, fixiert und permeabilisiert. Danach behandelte man die Zellen für eine Stunde bei 37 Grad Celsius mit DNase, um die Epitope der BrdU Moleküle, die während der Replikation in die DNA integriert worden waren, zu exponieren. Im folgenden Schritt wurde der BrdU-Antikörper zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend mussten die Proben mit FACS-Puffer gewaschen werden, um anschließend am CyAn ADP Lx P8 Durchflusszytometer analysiert werden zu können.

3.2.6 RNA-Isolation, cDNA und Real time PCR

RNA-Aufbereitung

Die RNA-Isolation wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem RNeasy Mini Kits (Qiagen®) durchgeführt. Die Zellpellets lysierte man in Guanidinthiocyanat enthaltendem RLT-Puffer, wodurch die RNasen inaktiviert wurden. Die Homogenisierung der Proben wurde mit dem Einsatz der QIAshredder spin columns erreicht. Um die Bindungsbedingungen zu optimieren, wurden die homogenisierten Proben auf die RNeasy Mini spin columns geladen, wo die RNA an eine silizium-basierte Membran binden konnte. Durch Waschen mit den Puffern RW1 und RPE entfernte man Verunreinigungen und in einem letzten Schritt wurde die RNA eluiert, die für die Reverse Transkription weiterverwendet werden sollte. Für die Genexpressionsanalysen der verschiedenen Stammzellen- und Progenitorpopulationen wurde die RNA mithilfe des Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (Invitrogen) entsprechend dem enthaltenen Protokoll isoliert. Die Zellpellets resuspendierte man für die Zell-Lyse in Lysis/Binding Puffer, woraufhin Dynabeads Oligo (dT)25 hinzugegeben wurden. Die Thymidin-Residuen binden zusammen mit den Dynabeads an die Poly(A)-Schwänze der mRNAs. Dank der superparamagnetischen Eigenschaften der Dynabeads lässt sich mit einem externen Magnetfeld die Dynabead-gebundene mRNA von den Verunreinigungen enthaltenden Überstand isolieren. Nach zwei weiteren Reinigungsschritten konnte die Dynabead-gebundene mRNA schließlich in 10 mM Tris/HCS(pH7.5) resuspendiert und direkt für die Reverse Transkription verwendet werden.

Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die cDNA-Synthese wurde das Omniscript RT Kit (Qiagen) sowie oligo-dT-Primer und RNaseOUT™ von Invitrogen verwendet. 2 µg RNA wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 24 µl verdünnt. Dann wurden 4 µl 10x RT-Puffer, 4 µl dNTP, 4 µl oligo-dT (Verdünnung 1:5), 2 µl RNaseOUT™ (Verdünnung 1:4) und 2 µl Reverse Transkriptase dazugegeben. Die Proben wurden für 1 Stunde bei 37 Grad Celsius inkubiert und danach für 5 Minuten auf 93 Grad Celsius erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Nun konnte die cDNA in der RT-PCR eingesetzt werden.

Real time PCR(RT-PCR)

RT-PCR ist ein etabliertes Verfahren für die Quantifizierung spezifischer DNA oder RNA Sequenzen und wird für die Analyse der Expressions-Level verschiedener Gene verwendet. Die Methode basiert darauf, dass man misst, wieviele PCR-Zyklen notwendig sind, um eine bestimmte Menge an DNA zu amplifizieren. In diesem Projekt wurde wie bereits beschrieben die mRNA zunächst in cDNA transkribiert. In der dann folgenden RT-PCR Reaktion wurde das in Tab. 3.6 angegebende Pipettierschema sowie das in Tab. 3.7 aufgeführte PT-PCR Programm verwendet. Als sogenanntes Housekeeping-Gen für die Normalisierung wurde Ubiquitin gewählt, da es ubiquitär in allen Zellen gleichermaßen exprimiert wird.

15.6 μ l	SYBR®Green
0.5 μ l	Rox
0.05 μ l	Primer A
0.05 μ l	Primer B
8 μ l	H2O
0.8 μ l	cDNA

Tabelle 3.6: RT-PCR Pippetierschema

1x	
	50°C 2 min
	95°C 10 min
40x	
	95°C 15 sek
	60°C 1 min

Tabelle 3.7: RT-PCR Programm

Die Reaktion wurde in einem 7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt.

Kapitel 4

Ergebnisse

Im Folgenden wird die $Cks1^{-/-}$ Maus als $Cks1$ Knockout ($Cks1$ KO), die $p27^{Kip1^{-/-}}$ Maus als $p27^{Kip1}$ Knockout ($p27^{Kip1}$ KO), die $p27^{Kip1^{-/-}}Cks1^{-/-}$ Maus als Doppelknockout (DKO) und die $p27^{Kip1^{+/+}}Cks1^{+/+}$ Maus als Wildtyp (WT) bezeichnet. In Abbildungen ist der Ausdruck $p27$ KO mit der ausführlichen Bezeichnung $p27^{Kip1}$ KO gleichzusetzen. Da es sich bei allen Auswertungen um von einander unabhängige Stichproben mit angenommener Normalverteilung handelt, wurde für die statistische Analyse der Unpaired Student's T-Test verwendet, wobei sich sämtliche Angaben von Signifikanzwerten (p-Wert), soweit nicht anders angegeben, auf das jeweilige Ergebnis des Wildtyps beziehen.

4.1 Der gleichzeitige Verlust von $Cks1$ verändert den $p27^{Kip1^{-/-}}$ Phänotyp

Mit der Generierung der $p27^{Kip1}/Cks1$ Knockout-Maus (Doppelknockout) sollte die Möglichkeit geschaffen werden, von $p27^{Kip1}$ unabhängige Funktionen des Proteins $Cks1$ zu ermitteln [51]. Wie bereits beschrieben führt der Verlust von $Cks1$ zu verminderter Proliferation und einer im Vergleich zum Wildtyp geringeren Körpergröße [155], während der Verlust von $p27^{Kip1}$ zu einer deutlichen Zunahme der Körpergröße führt [43, 79, 110]. Interessanterweise unterschied sich die $p27^{Kip1}/Cks1$ Knockout-Maus kaum vom Wildtyp und war im Vergleich zu der $p27^{Kip1}$ Knockout-Maus bedeutend kleiner (Abb. 4.1), was mit einem reduzierten Körpergewicht einherging [52].

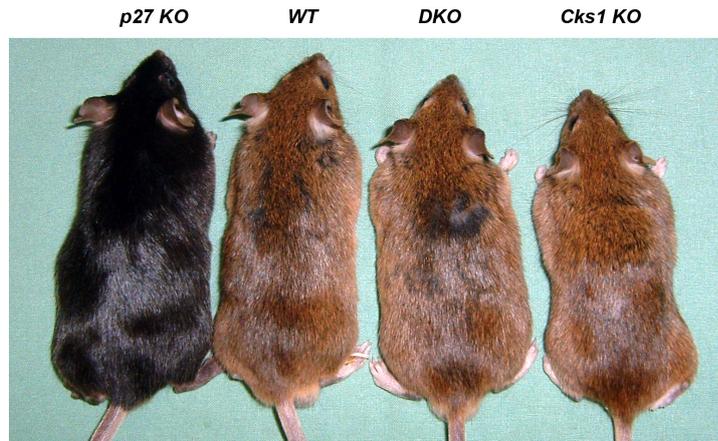


Abbildung 4.1: Die Phänotypen der Knockout-Mäuse. Zwischen den verschiedenen Genotypen sind deutliche Größenunterschiede zu erkennen: $p27^{Kip1}$ KO, WT, DKO, $Cks1$ KO.

4.2 In Abwesenheit von $Cks1$ sind die Zellzahlen der hämatopoetischen Organen verringert

Mit dem Ziel die Funktionen von $Cks1$ im Rahmen der Hämatopoese zu analysieren, wurden zunächst die Zellzahlen der hämatopoetischen Organe der verschiedenen Genotypen bestimmt. Im Knochenmark führte der Verlust von $Cks1$ verglichen mit den Kontrolltieren zu einer deutlich reduzierten Zellzahl, während der Verlust von $p27^{Kip1}$ die Zellzahl nicht veränderte (Abb. 4.2, a). Auch die DKO-Maus zeigte keine signifikante Änderung der Knochenmarksgesamtzellzahl. Die Untersuchung der fetalen Leber von $Cks1$ KO-Mäusen ergab ebenfalls eine Reduktion der Zellzahl im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.2, b). Lediglich bei der Anzahl der Zellen im peripheren Blut konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Abb. 4.2, c).

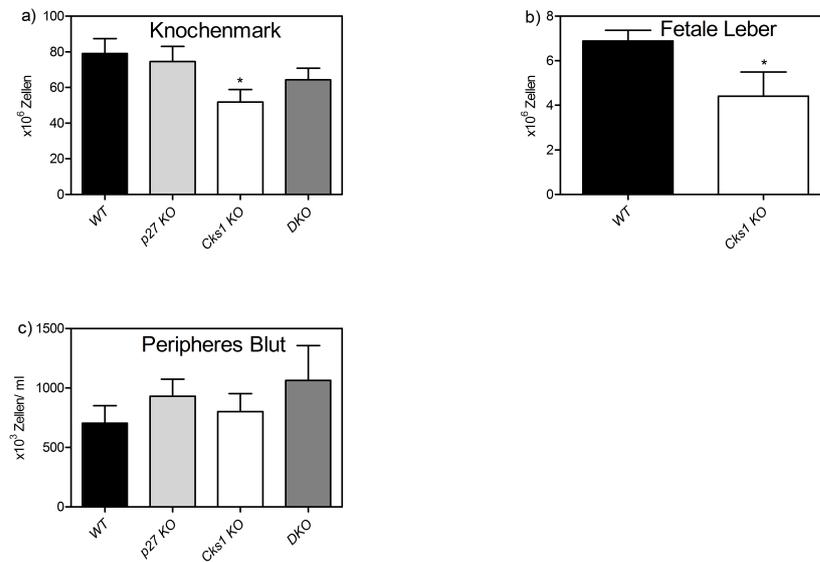


Abbildung 4.2: **Zellzahlen der hämatopoetischen Organe.** a) Knochenmark (2 Femora und 2 Tibiae pro Maus): WT n=10, p27 KO n=9, Cks1 KO n=9, DKO n=10; b) fetale Leber: WT n=10, Cks1 KO n=8; c) Peripheres Blut: WT n=6, p27 KO n=6, Cks1 KO n=6, DKO n=4. Mean \pm SEM, * p<0,05.

4.3 Die Knochenstruktur und die Zellularität verändern sich in Abwesenheit von *Cks1* nicht

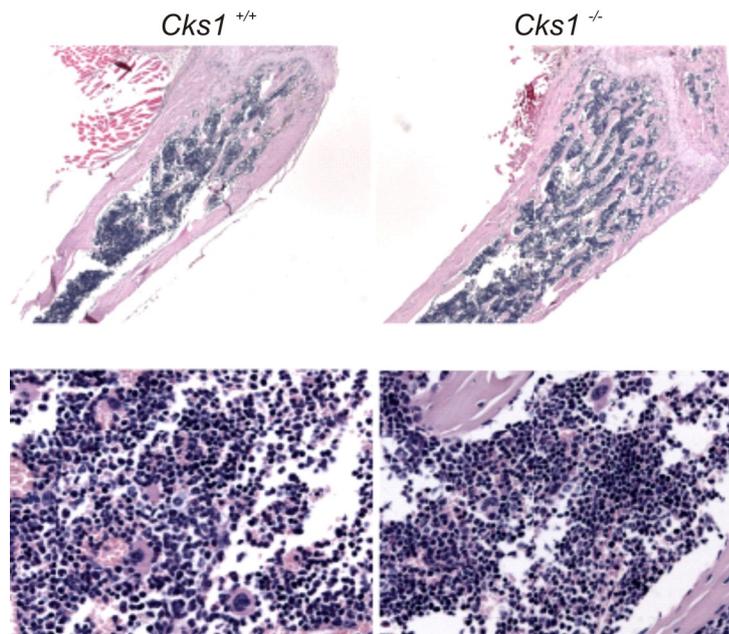


Abbildung 4.3: HE Färbung der langen Röhrenknochen von *Cks1* KO-Mäusen und Kontrolltieren. Keine Unterschiede in Knochenstruktur und Zellularität (Kollaboration mit PD Dr. Leticia Quintanilla-Fend).

Die verminderte absolute Anzahl an hämatopoetischen Zellen im Knochenmark der *Cks1* KO-Mäusen könnte neben der geringeren Knochengröße auf eine veränderte Knochenstruktur oder Durchblutung zurückzuführen sein. Falls die *Cks1* KO-Mäuse z.B. über einen geringeren trabekulären Knochenanteil verfügten, hätten die Stammzellen weniger Platz für Selbsterneuerung und Differenzierung, was die geringere Zellzahl erklären könnte. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Leticia Quintanilla-Fend eine histopathologische und strukturelle Untersuchung der langen Röhrenknochen der *Cks1* KO- und Kontrollmäuse durchgeführt. Dabei konnten allerdings keine Unterschiede in Knochenstruktur und Zellularität zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden (Abb. 4.3).

4.4 Im peripheren Blut verfügen die Knockouttiere über leicht erhöhte Erythrozytenkonzentrationen

Um die Auswirkungen des Verlustes von *Cks1* und *p27^{Kip1}* auf das periphere Blut zu analysieren, wurden von allen Mäusen Blutbilder angefertigt. Dabei zeigte sich, dass alle Knockout-Mäuse, nämlich der *Cks1*-, der *p27^{Kip1}*- und der Doppelknockout, über eine höhere Konzentration an roten Blutkörperchen (Erythrozyten pro μl) im peripheren Blut als der Wildtyp verfügten (Abb. 4.4, a). Bei den Thrombozytenzahlen ließen sich hingegen keine Unterschiede zwischen den Genotypen feststellen (Abb. 4.4, b). Auch die Leukozyten (Abb. 4.4, c) und deren Untergruppen, also Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, unterschieden sich im Blut der Knockout-Mäuse im Vergleich zu dem des Wildtyps weder anteilig noch in ihrer Gesamtzahl.

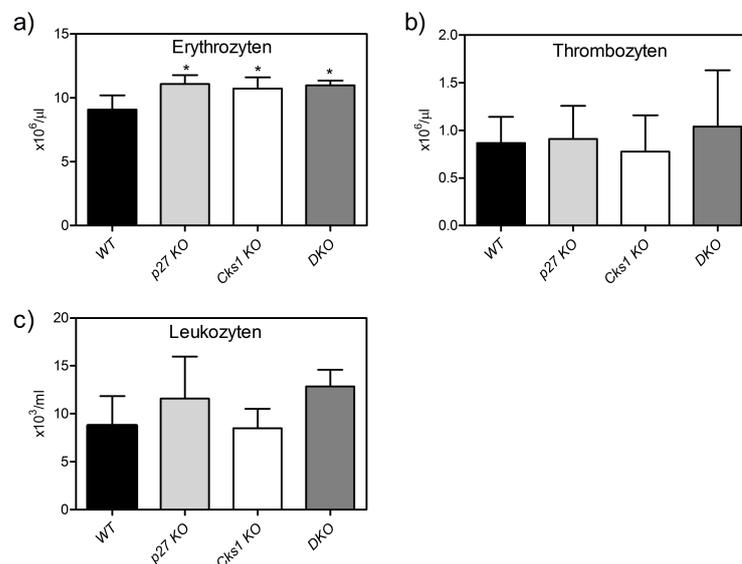


Abbildung 4.4: **Blutbilder der Knockout-Mäuse und Kontrolltiere.** Peripheres Blut: WT n=6, *p27* KO n=6, *Cks1* KO n=6, DKO n=4. Mean \pm SEM, * p < 0,05

4.5 HSCs und hämatopoetische Vorläuferzellen

Um herauszufinden, in welchen Stadien die Hämatopoese durch den Verlust von *Cks1* beeinflusst wird, wurden die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und frühen hämatopoetischen Progenitoren per Durchflusszytometrie bestimmt. Es wurde die in Abb. 4.6 zu sehende Gating-Strategie verwendet.

4.5.1 Der Verlust von *Cks1* führt zu einer verminderten Anzahl an HSCs und hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark

Die Knochenmarkanalyse ergab in den *Cks1* KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte absolute Anzahl an Lin- (Abb. 4.5), LSK-Zellen, MPPs, CMPs, GMPs und MEPs (Abb. 4.7). Die *p27^{Kip1}* KO- und die DKO-Mäuse zeigten beide eine absolute Erhöhung der LSK-Zellen (Abb. 4.7 b), wobei die *p27^{Kip1}* KO-Maus verglichen mit den Kontrollmäusen zusätzlich durch eine verminderte absolute Anzahl an Lineage negativen Zellen auffiel. Die anderen Vorläuferpopulationen im Knochenmark des *p27^{Kip1}*- und des Doppelknockouts wiesen hingegen keine Veränderungen auf.

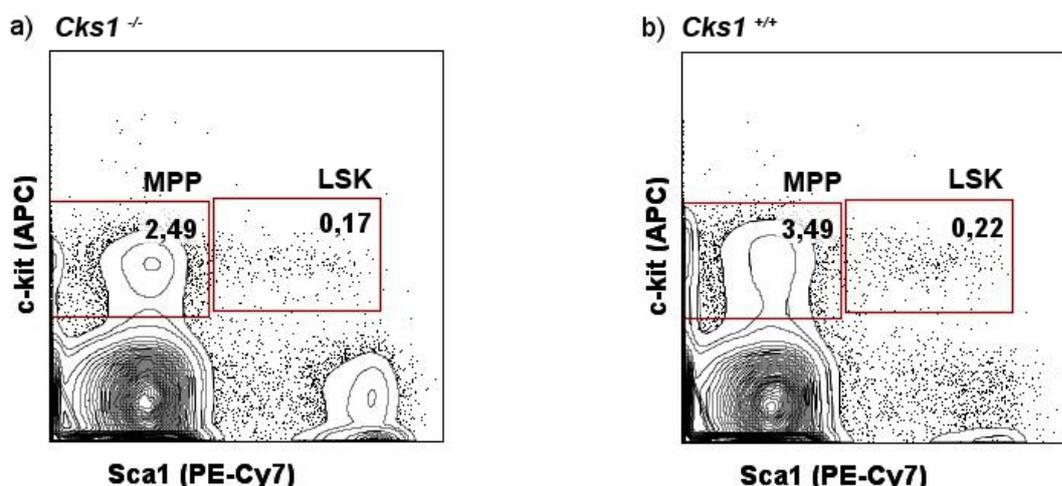


Abbildung 4.5: Durchflusszytometrie der Lineage negativen Populationen aus dem Knochenmark von *Cks1* Knockout und Wildtyp.

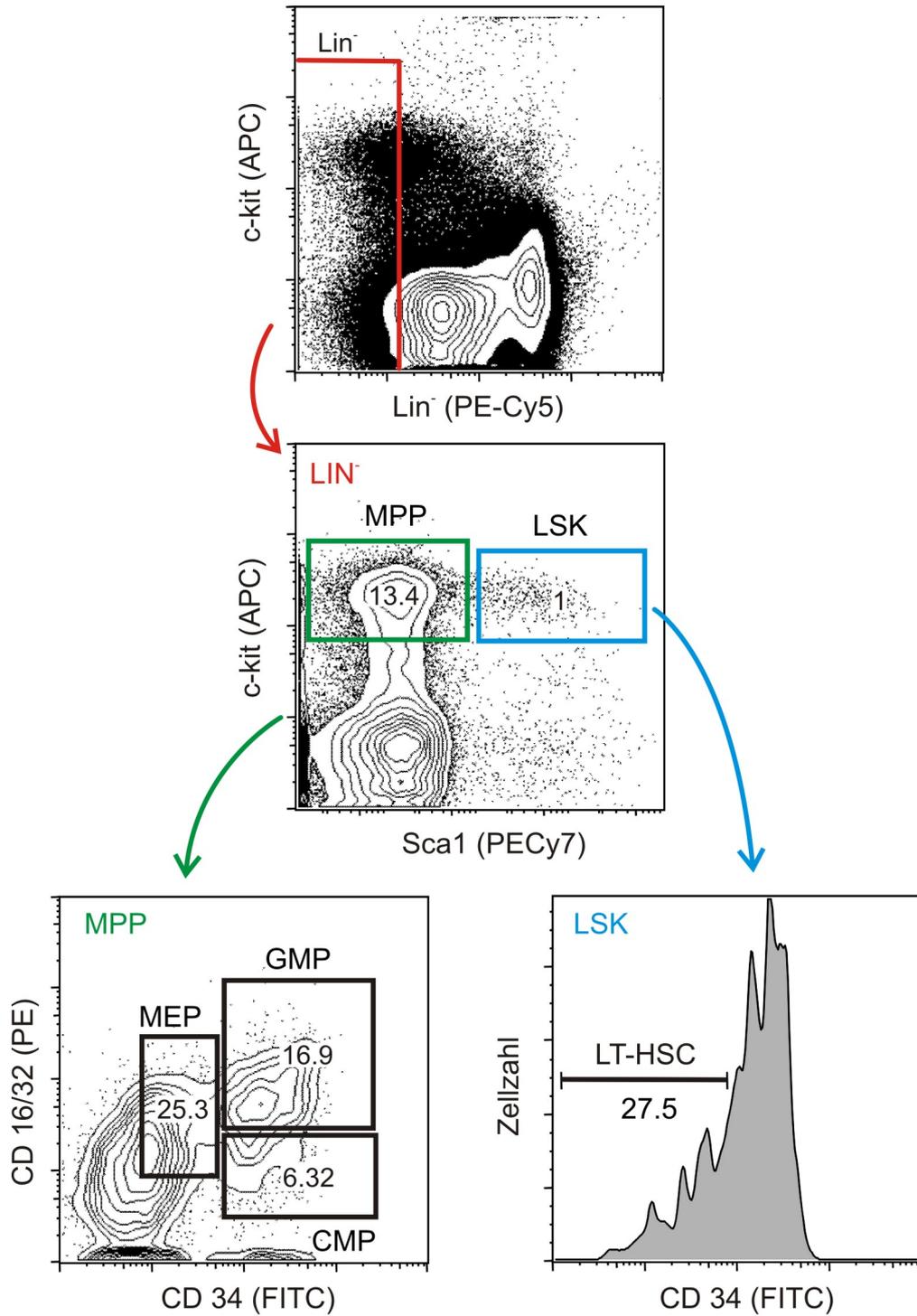


Abbildung 4.6: Gating Strategie für die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der HSCs und Progenitorpopulationen.

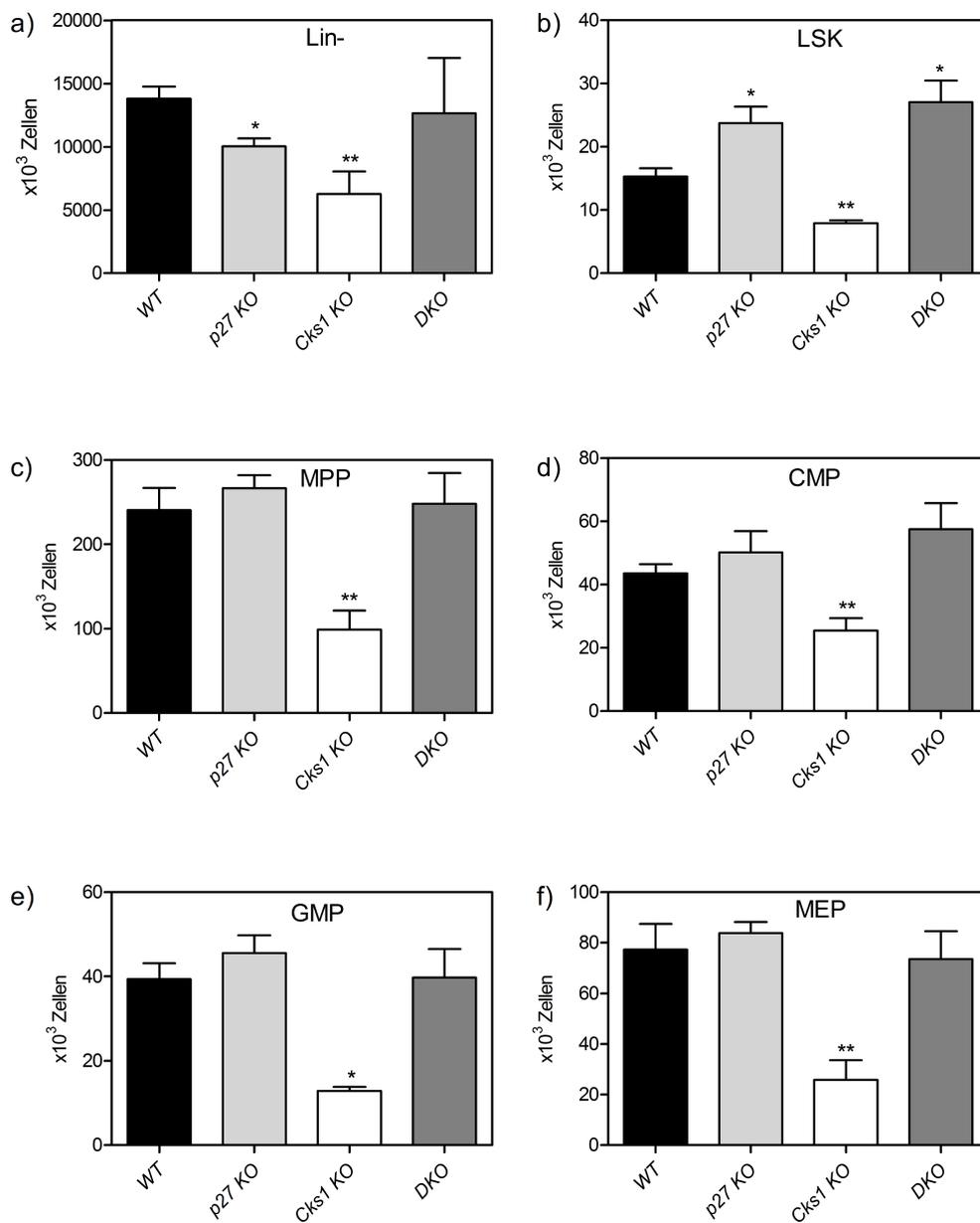


Abbildung 4.7: HSCs und Progenitorpopulationen im Knochenmark der Knockout- und Kontrollmäuse. Absolute Zellzahlen aus 2 Femora und 2 Tibiae pro Maus WT n=5, p27 KO n=4, Cks1 KO n=4, DKO n=6. Mean ± SEM, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Bei der Untersuchung der relativen Anteile der verschiedenen Progenitorpopulationen und Stammzellfraktionen im Knochenmark (Abb. 4.9) ergab sich ein erhöhter Anteil von CMPs an den MPPs in *Cks1* KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.8, a), während der Anteil der MEPs an den CMPs in den *Cks1* KO-Mäusen leicht vermindert war (Abb. 4.8, c) und der Anteil der GMPs an den MPPs keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte (Abb. 4.8, b). Der relative Anteil der LSK Zellen an der Linage negativen Fraktion war in *Cks1* KO Mäusen gegenüber dem Wildtyp ebenfalls unverändert.

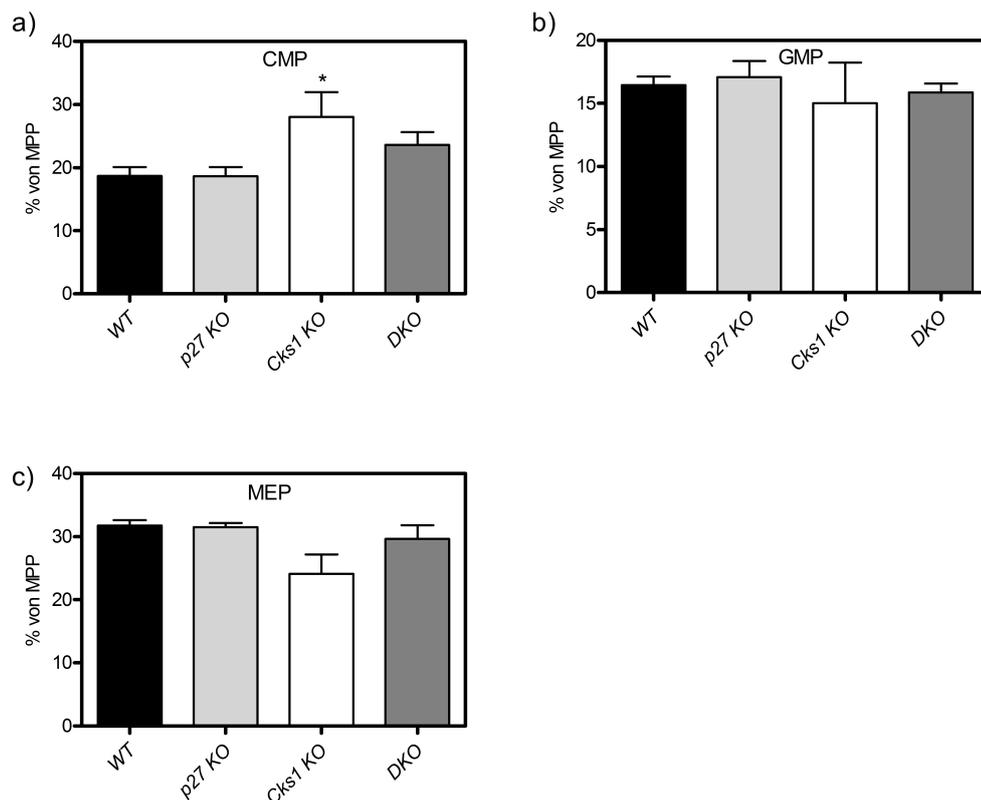


Abbildung 4.8: **Relative Anteile der Stammzellfraktionen und Progenitorpopulationen im Knochenmark der Knockout- und Kontrollmäuse.** a) Anteil der CMP and den MPP b) Anteil der GMP and den MPP c) Anteil der MEP an den MPP. WT n=5, p27 KO n=4, Cks1 KO n=4, DKO n=6. Mean±SEM, * p<0,05.

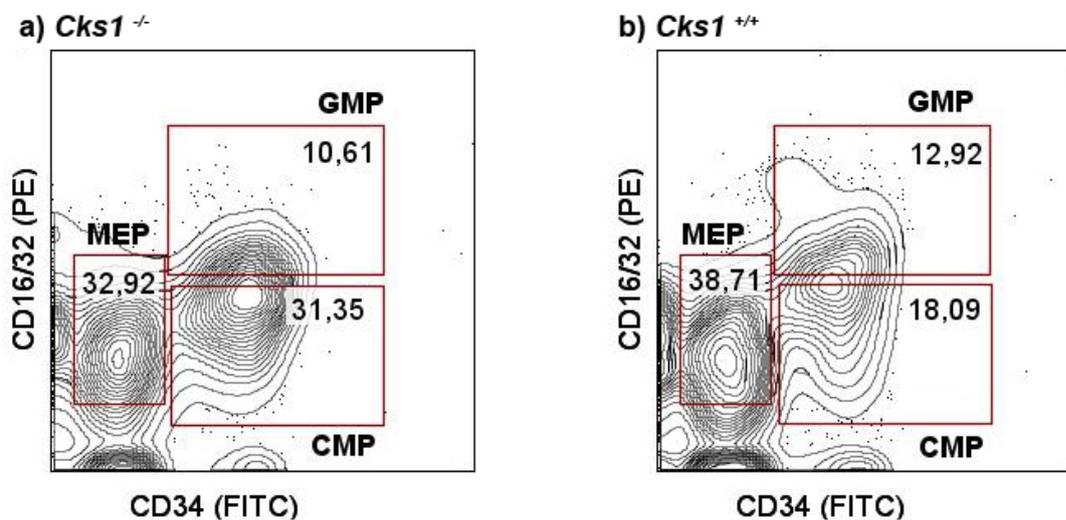


Abbildung 4.9: Durchflusszytometrie der multipotenten Progenitoren (MPPs) aus dem Knochenmark von *Cks1* Knockout und Wildtyp.

4.5.2 Der Verlust von *Cks1* führt zu einer verminderten Anzahl an HSCs und hämatopoetischen Vorläuferzellen in fetaler Leber

Die Analyse der hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferpopulationen in fetaler Leber von *Cks1* KO-Mäusen und Kontrolltieren zeigte ein ähnliches Bild wie die Knochenmarkanalyse (Abb. 4.10). Im Vergleich zum Wildtyp war die absolute Anzahl der LSK-Zellen und insbesondere der LT-HSCs im *Cks1* Knockout deutlich vermindert (Abb. 4.12, b-c). Daneben wiesen die *Cks1* KO-Mäuse auch geringere absolute Zellzahlen gegenüber den Kontrolltieren in der MPP-, CMP- und MEP-Fraktion auf (Abb. 4.12, d-f). Lediglich die absolute Anzahl der Lin-Zellen zeigte sich unverändert (Abb. 4.12, a). Die relativen Anteile der Stammzellfraktionen und Progenitorpopulationen in der fetalen Leber der *Cks1* KO- und Kontrollmäuse verhielten sich jedoch etwas anders als im Knochenmark (Abb. 4.11). Auch hier bewirkte der Verlust von *Cks1* einen deutlich erhöhten Anteil von CMPs an den MPPs (Abb. 4.13, a). Allerdings kam es in der fetalen Leber des *Cks1* Knockouts - anders als im Knochenmark - im Vergleich zum Wildtyp zu einer Erhöhung des Anteils von GMPs an den MPPs (Abb. 4.13, b). Der MEP-Anteil blieb unverändert (Abb. 4.13, c). Auch der Anteil der Stammzellen (LSK) an den Lineage negativen Zellen war im Gegensatz zu den Verhältnissen im Knochenmark in den *Cks1* KO-Mäusen deutlich geringer als in den Kontrolltieren

(Abb. 4.13, d).

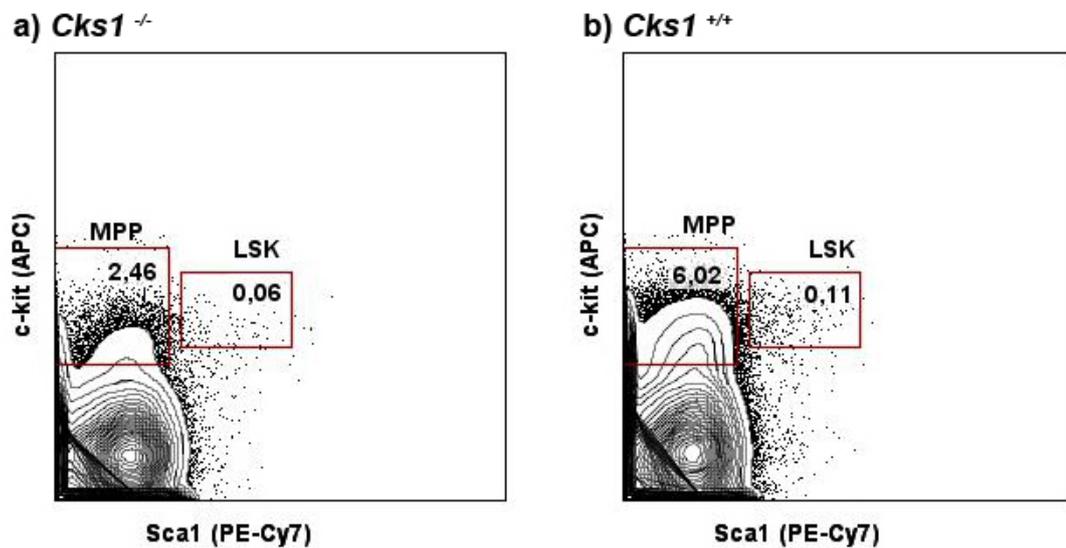


Abbildung 4.10: Durchflusszytometrie der Lineage negativen Populationen aus fetaler Leber von *Cks1* Knockout und Wildtyp.

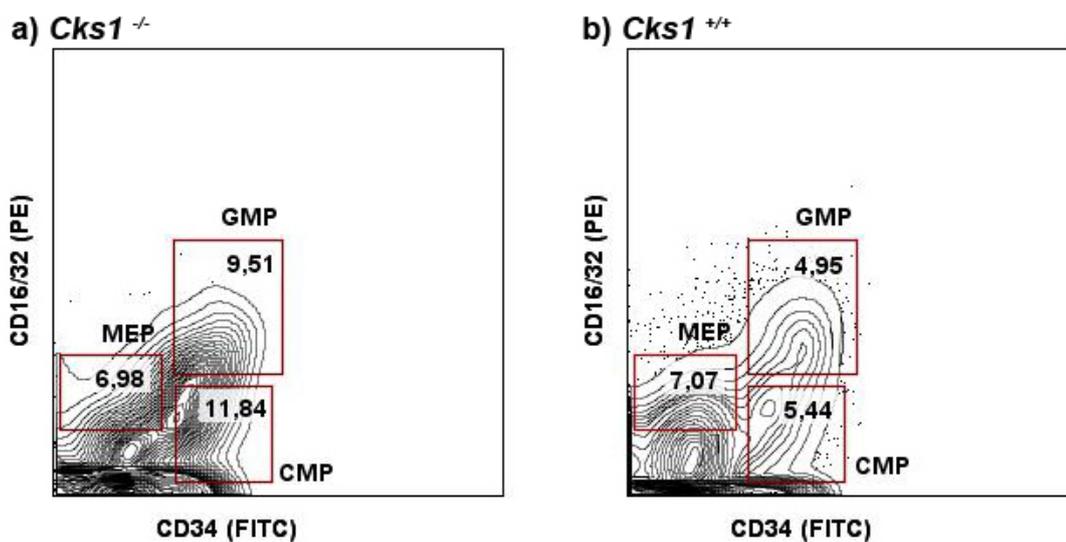


Abbildung 4.11: Durchflusszytometrie der multipotenten Progenitoren (MPPs) aus fetaler Leber von *Cks1* Knockout und Wildtyp.

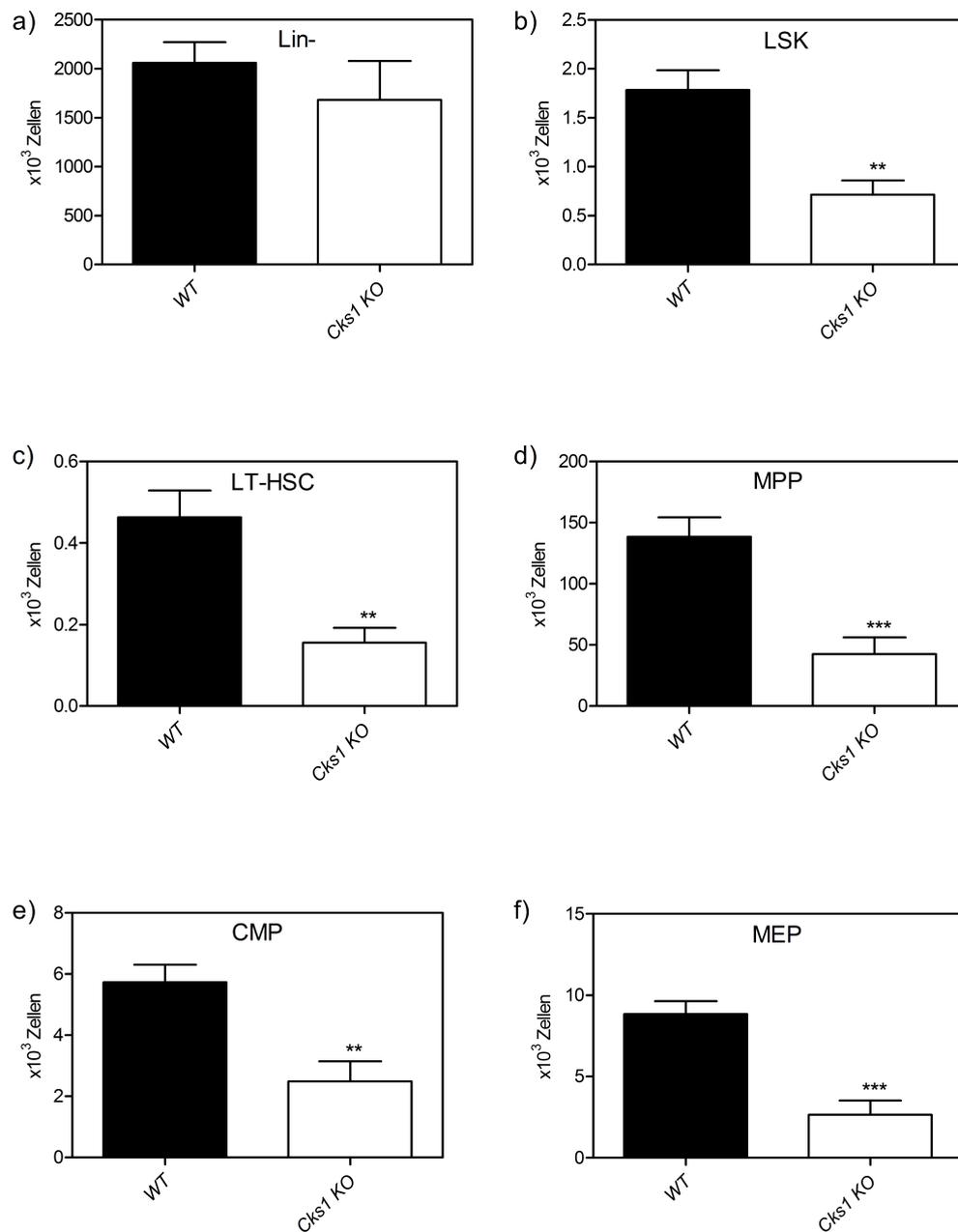


Abbildung 4.12: HSCs und Progenitorpopulationen in fetaler Leber der *Cks1* KO- und Kontrollmäuse. Fetale Leber: WT n=10, *Cks1* KO n=8. Mean ± SEM, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

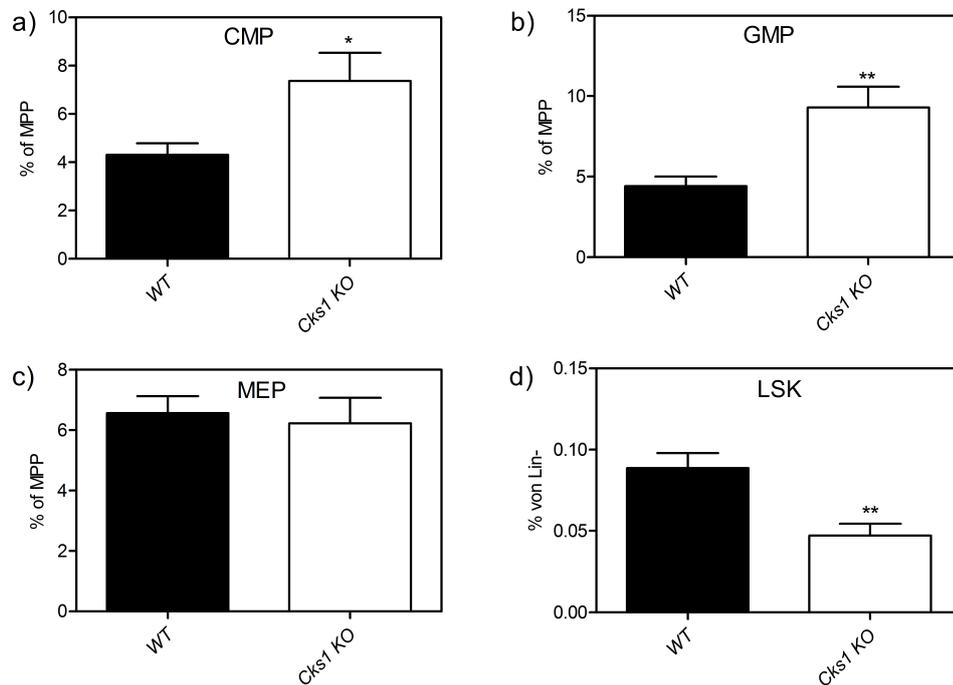


Abbildung 4.13: **Relative Anteile der Stammzellfraktionen und Progenitorpopulationen in der fetalen Leber der *Cks1* KO- und Kontrollmäuse.** a) Anteil der CMP an den MPP b) Anteil der GMP an den MPP c) Anteil der MEP an den MPP d) Anteil der LSK an den Lin negativen. Fetale Leber: WT n=10, *Cks1* KO n=8. Mean ± SEM, * p<0,05, ** p<0,01.

4.6 Das *Cks1*^{-/-} Knochenmark verfügt im R1- und R3-Stadium der Erythrozytenvorläufer über weniger Zellen

Auch die Entwicklung der erythroiden Zellen findet im Knochenmark statt. Die auf den erythroiden Weg festgelegten Zellen exprimieren zunächst den Oberflächenmarker CD71 (Transferrin-Rezeptor), gefolgt von der Expression des für die erythroide Reihe spezifischen Ter119-Antigens. In späteren Stadien verschwindet CD71 dann wieder [190]. Basierend auf diesen Markern können erythroide Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie in verschiedene Entwicklungsstufen von Erythrozytenvorläufern, nämlich R1 bis R5, eingeteilt werden. R1 (CD71^{me}Ter119^{lo}) stellt das am wenigsten differenzierte Stadium, nämlich die primitiven Vorläufer

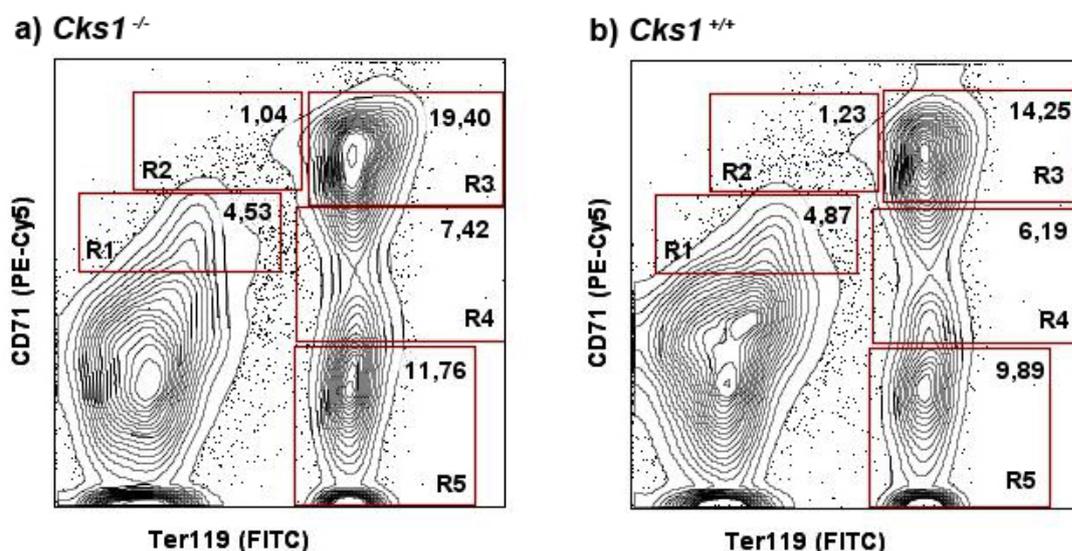


Abbildung 4.14: Gating Strategie der Erythrozytenvorläufer

ferzellen und Proerythroblasten dar. Proerythroblasten und frühe basophile Erythroblasten werden in der R2-Population ($CD71^{hi}Ter119^{lo}$) gefunden. Die Stufe R3 ($CD71^{hi}Ter119^{hi}$) beinhaltet die frühen sowie die späten basophilen Erythroblasten, während sich chromatophile und orthochromatophile Erythroblasten im Stadium R4 ($CD71^{me}Ter119^{hi}$) befinden. Die am weitesten ausdifferenzierte Entwicklungsstufe stellt die R5-Population ($CD71^{lo}Ter119^{hi}$) dar, die späte orthochromatophile Erythroblasten und Retikulozyten enthält [190]. Die Gating Strategie ist in Abb. 4.14 abgebildet. Bei der Analyse des Knochenmarks von *Cks1* KO-Mäusen und Kontrolltieren befanden sich in den *Cks1*-Knockouttieren signifikant weniger Zellen im Stadium R1 und R3 als im Wildtyp-Knochenmark (Abb. 4.15, a,c). Die anderen Erythroblastenentwicklungsstufen zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 4.15).

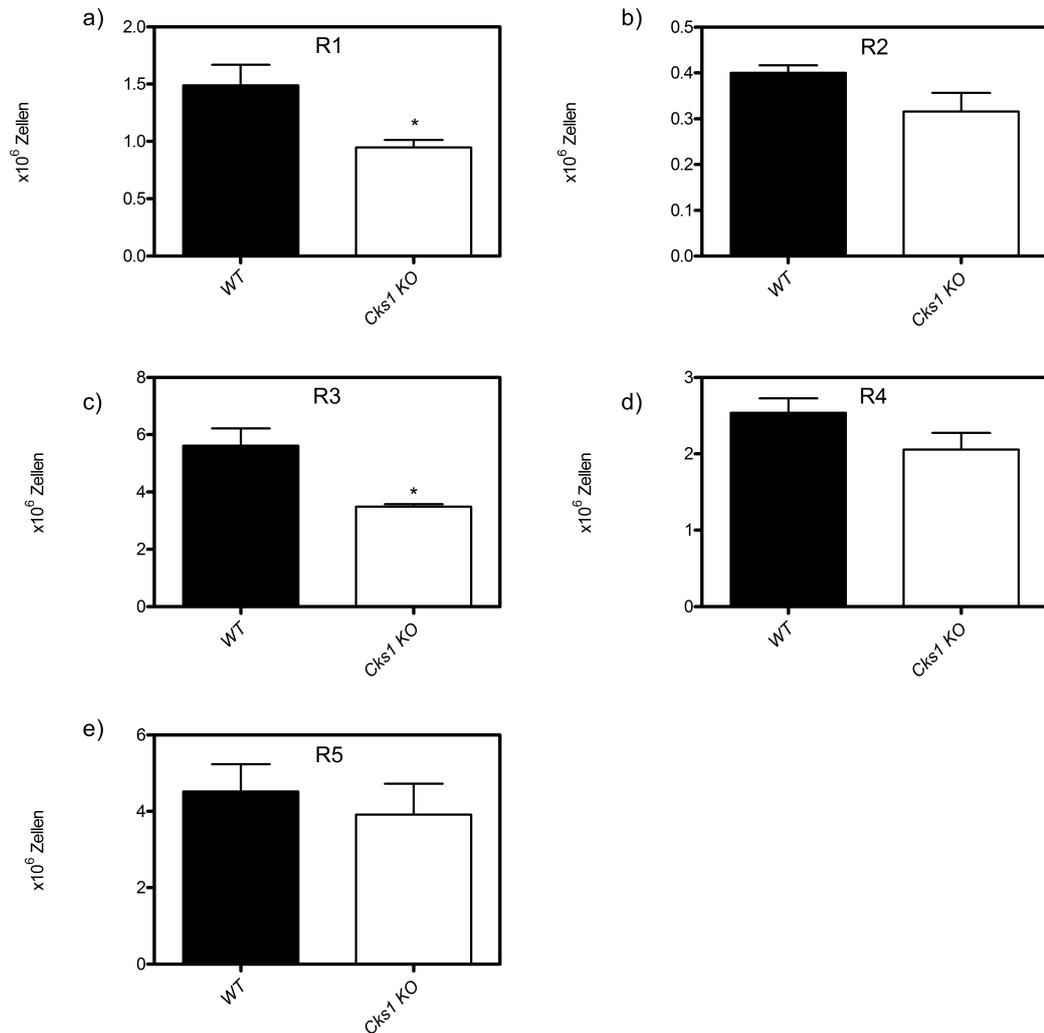


Abbildung 4.15: Erythrozytenvorläufer im Knochenmark der *Cks1* KO- und Kontrollmäuse. a) R1-Population b) R2-Population c) R3-Population d) R4-Population e) R5-Population. Absolute Zellzahlen aus 2 Femora und 2 Tibiae pro Maus: WT n=3, *Cks1* KO n=3. Mean± SEM, * p<0,05.

4.7 Im Colony Forming Assay bilden *Cks1*^{-/-} Zellen weniger Kolonien als Wildtypzellen

Die funktionelle Kapazität der hämatopoetischen Progenitoren wurde mithilfe des Colony Forming Assays (CFA) bestimmt. Die Analyse der Kolonien aus dem Knochenmark der Mäuse ergab keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen, jedoch war eine Tendenz des *Cks1* Knockouts zu einer geringeren

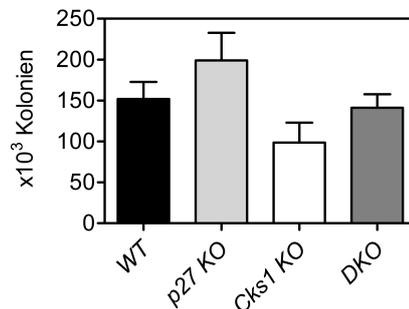


Abbildung 4.16: **Colony Forming Assay (CFA) aus dem Knochenmark der Knockout- und Kontrollmäuse.** Gesamtkoloniezahl aus 2 Femora und 2 Tibiae pro Maus, WT n=6, *p27* KO n=5, *Cks1* KO n=5, DKO n=7. Mean±SEM.

absoluten Anzahl an Kolonien erkennbar, während aus dem Knochenmark von je zwei Femora und zwei Tibiae der *p27^{Kip1}* KO-Maus eher eine höhere Koloniezahl als beim Wildtyp entstand (Abb. 4.16). In *Cks1* KO-Mäusen und Kontrolltieren wurde auch mit Zellen der fetalen Leber ein Colony Forming Assay durchgeführt. Hier kam es durch den Verlust von *Cks1* zu einer Reduktion sowohl der absoluten (Abb. 4.18) als auch der relativen Anzahl der Kolonien, wobei die relative Anzahl die Koloniezahl pro 10⁴ eingesetzte Zellen beschreibt (Abb. 4.17). In den *Cks1* KO-Mäusen waren davon alle Koloniearten, nämlich die Erythrozyten-Kolonien (BFU-E) (Abb. 4.18, a und Abb. 4.17, a), die Granulozyten/Makrophagen-Kolonien (CFU-GM) (Abb. 4.18, b und Abb. 4.17, b) sowie die gemischten Kolonien (CFU-GEMM) mit erythroiden und myeloiden Anteilen (Abb. 4.18, c und Abb. 4.17, c) gleichermaßen betroffen. Der Anteil der verschiedenen Kolonien an der Gesamtkoloniezahl unterschied sich im Vergleich zu dem der WT-Mäuse nicht.

4.8 In Abwesenheit von *Cks1* bilden kultivierte Knochenmarkszellen weniger Kolonien als die des Wildtyps

Die Kombination der Wachstumsfaktoren Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6) und SCF (stem cell factor) fördert die Differenzierung multipotenter häma-

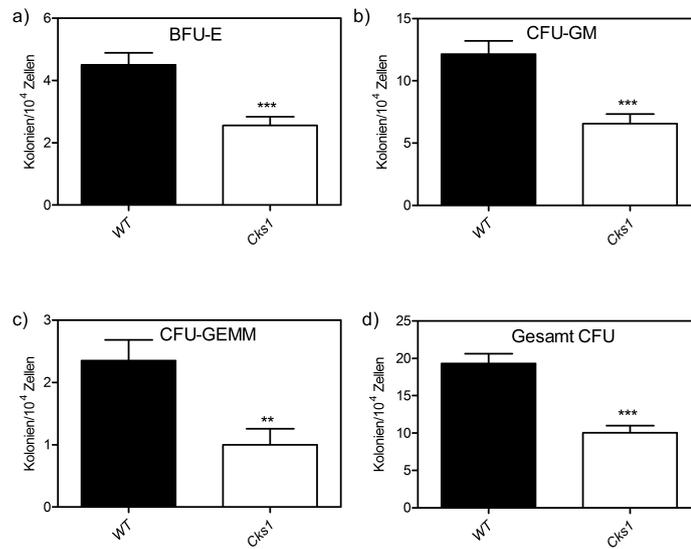


Abbildung 4.17: Colony Forming Assay (CFA) aus fetaler Leber der *Cks1* Knockoutmäuse und der Kontrolltiere. Anzahl der Kolonien pro 10⁴ eingesetzte Zellen der fetalen Leber: WT n=10, *Cks1* KO n=9. Mean± SEM, ** p<0,01, *** p<0,001.

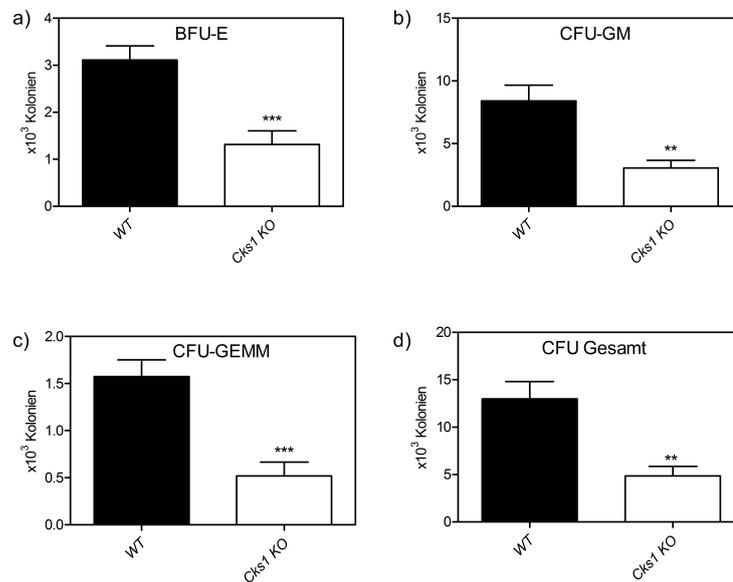


Abbildung 4.18: Colony Forming Assay (CFA) aus fetaler Leber der *Cks1* KO- und Kontrollmäuse. Gesamtkoloniezahl der fetalen Leber: WT n=10, *Cks1* KO n=9. Mean± SEM, ** p<0,01, *** p<0,001.

topoetischer Stammzellen und führt zur Expansion von myeloiden und erythroiden hämatopoetischen Progenitoren sowie zu einer erhöhten Anzahl an Koloniebildenden Zellen (CFC, colony forming cells) [189, 127]. Die CFC-Assays aus frischem Knochenmark und fetaler Leber der *Cks1* Knockouttiere hatten bereits verminderte Koloniezahlen im Vergleich zum Wildtyp ergeben. Um herauszufinden, ob unter diesen Stimulationsbedingungen Unterschiede in der funktionellen Kapazität der hämatopoetischen Progenitoren der verschiedenen Genotypen bestehen, wurden Kulturen mit den entsprechenden Zytokinen angelegt und nach 8 Tagen der CFC-Assays durchgeführt. Sowohl die kultivierten Knochenmarkszellen des *Cks1* Knockouts als auch die des Doppel-Knockouts wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verringerte Koloniebildungskapazität auf (Abb. 4.19, a). Außerdem bildeten die eingesetzten Knochenmarkszellen der *Cks1* KO-Maus und der DKO-Maus zu einem sehr viel geringeren Anteil Erythrozyten-Kolonien (BFU-E) als die der Kontrolltiere (Abb. 4.19, b). Gleichzeitig zeigte sich der Anteil der Granulozyten/Makrophagen-Kolonien (CFU-GM) an der Gesamtkoloniezahl des *Cks1* Knockouts und des Doppelknockouts im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht (Abb. 4.19, d), während sich der Anteil der gemischten Kolonien (CFU-GEMM) zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschied.

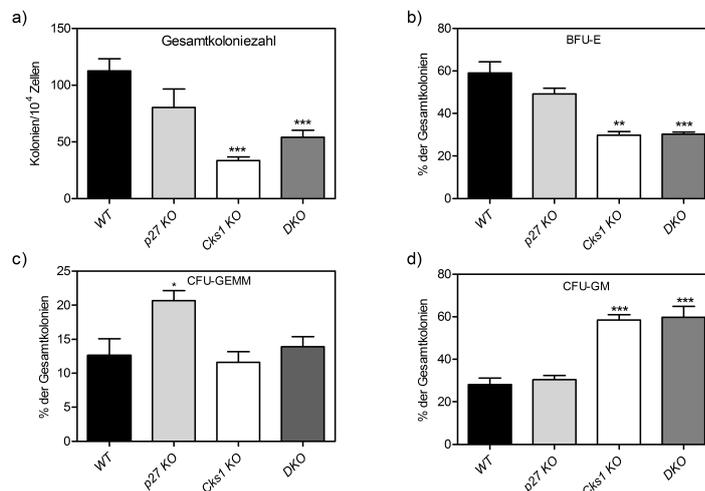


Abbildung 4.19: **Colony Forming Assay (CFA) aus dem Knochenmark der Knockout- und Kontrollmäuse nach 8 Tagen in Kultur.** Anzahl aus 10^4 eingesetzten Zellen pro Maus. WT n=5, p27 KO n=4, *Cks1* KO n=4, DKO n=6. Mean \pm SEM, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

4.9 Der Einfluss von Cks1 auf die Proliferation hämatopoetischer Zellen im Steady-State und unter Stressbedingungen

Um herauszufinden, ob Cks1 im murinen Knochenmark Einfluss auf die Proliferation hat, wurden Proliferationsexperimente mit BrdU (Bromdeoxyuridin) sowohl im Steady-State der Hämatopoese als auch unter Stress durchgeführt. BrdU, ein Thymidin-Analogon, ist ein labor diagnostischer Marker proliferierender Zellen. Während der Replikation in der S-Phase wird es in die DNA integriert und kann dann mithilfe einer intrazellulären Färbung in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Alle Zellen, die sich während des Vorhandenseins von BrdU geteilt haben, sind als BrdU-positiv markiert.

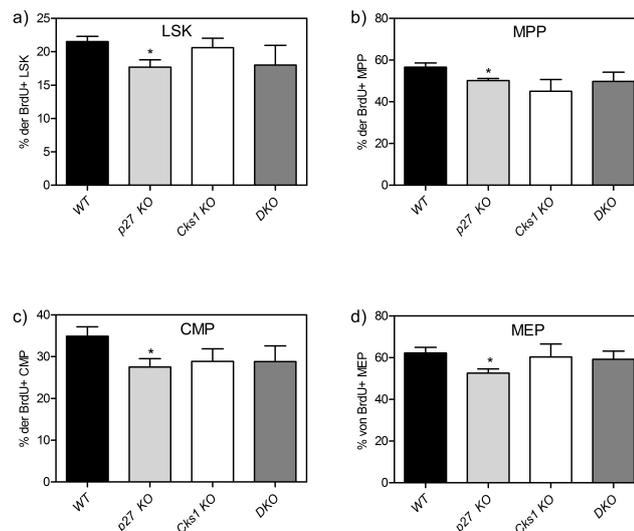


Abbildung 4.20: **BrdU-Analyse aus dem Knochenmark der Knockout- und Kontrollmäuse.** Anteil der BrdU-positiven Zellen an den verschiedenen Stammzell- und Progenitorpopulationen. a) Anteil der BrdU+ LSK an den Gesamt LSK b) Anteil der BrdU+ MPP an den Gesamt MPP c) Anteil der BrdU+ CMP an den Gesamt CMP d) Anteil der BrdU+ MEP an den Gesamt MEP. WT n=6, $p27^{Kip1}$ KO n=5, *Cks1* KO n=5, DKO n=7. Mean \pm SEM, * p<0,05.

4.9.1 Im Steady-State gibt es im Hinblick auf die BrdU-Inkorporation keine Unterschiede zwischen $Cks1^{-/-}$ und $Cks1^{+/+}$ Zellen

Für die Untersuchung der Steady-State Hämatopoese wurde Mäusen aller Genotypen 16 Stunden vor ihrer Tötung intraperitoneal BrdU gespritzt. Nur das Knochenmark der $p27^{Kip1}$ KO-Mäuse zeigte Proliferationsveränderungen und der Anteil an BrdU-positiven LSK-Zellen (Abb. 4.20, a), MPPs (Abb. 4.20, b), CMPs (Abb. 4.20, c) und MEPs (Abb. 4.20, d) war im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert. Im Knochenmark der $Cks1$ KO-Mäuse fand man keine Anzeichen für eine veränderte Proliferation der Stammzell- und Vorläuferpopulationen unter Steady-State Bedingungen.

4.9.2 Nach 5-FU Applikation ist der Anteil der BrdU-positiven Zellen im $Cks1^{-/-}$ Knochenmark stark vermindert

Um die Stress-induzierte Hämatopoese im Knochenmark von $Cks1$ KO-Mäusen und Kontrolltieren zu untersuchen, wurde ihnen 5-Fluorouracil (5-FU) injiziert. Das als Zytostatikum verwendete Uracil-Analogon wird aufgrund seiner Strukturähnlichkeit mit verschiedenen Pyrimidinderivaten in DNA und RNA eingebaut, woraus die Produktion nicht funktionsfähiger Nukleinsäuren resultiert. Aus diesem Grund führt 5-FU-Applikation zum Tod sich teilender Zellen, wie z.B. hämatopoetischer Progenitoren und weiter entwickelter hämatopoetischer Zellen. Ein Großteil der HSCs befindet sich in der Ruhephase, was das Überleben der Mäuse nach 5-FU-Injektion sichert. Durch die Vernichtung des Hauptanteils ihres hämatopoetischen Systems kommt es zur Aktivierung der Stammzellen, die diesen Verlust durch neue Zellproduktion wieder kompensieren müssen. Um die Proliferation im Rahmen der Stress-induzierten Hämatopoese zu analysieren, wurde den Mäusen fünf Tage nach der 5-FU-Injektion BrdU intraperitoneal gespritzt. 16 Stunden später wurden die Tiere getötet. Die Untersuchung des Knochenmarks der $Cks1$ KO- und Kontrollmäuse ergab eine Reduktion sowohl der absoluten Anzahl der LSK-Zellen (Abb. 4.21, a) und MPPs (Abb. 4.21, c) als auch ihres Anteils an der Gesamtzellzahl in $Cks1$ KO-Mäusen (Abb. 4.21, b und d). Der BrdU-positive Anteil der Knochenmarkszellen (Abb. 4.23), also die Fraktion der sich teilenden Zellen, zeigte sich im $Cks1$ Knockout Knochenmark unter Stressbedingungen signifikant vermindert (Abb. 4.22).

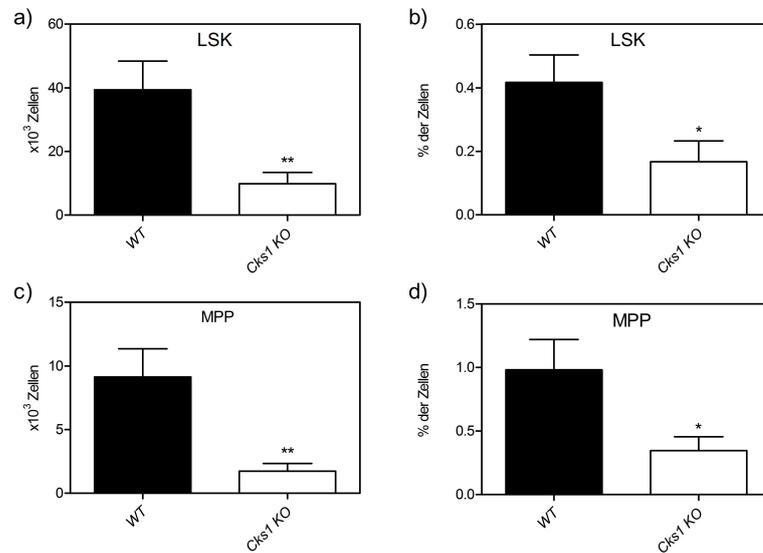


Abbildung 4.21: **Hämatopoetische Progenitoren und Stammzellen von *Cks1* KO- und Kontrollmäusen nach 5-FU- Applikation.** Analyse des Knochenmarks 5 Tage nach 5-FU-Injektion und 16 Stunden nach BrdU-Injektion. Gesamtzellzahl aus 2 Femora und 2 Tibiae pro Maus, WT n=8, *Cks1* KO n=8. Mean± SEM. * p<0,05 ** p<0,01.

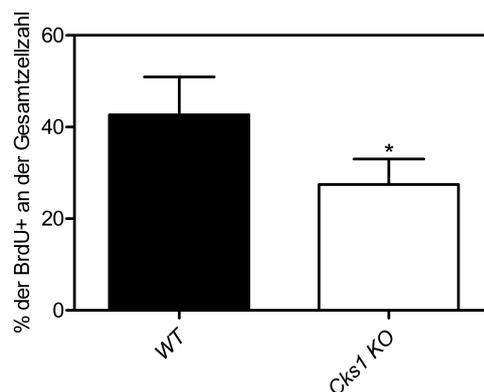


Abbildung 4.22: **Proliferation der Knochenmarkszellen von *Cks1* KO- und Kontrollmäusen nach 5-FU- Applikation.** Analyse des Knochenmarks 5 Tage nach 5-FU-Injektion und 16 Stunden nach BrdU-Injektion. Anteil der BrdU+ Zellen an der Gesamtzellzahl aus 2 Femora und 2 Tibiae pro Maus, WT n=4, *Cks1* KO n=4. Mean± SEM. * p<0,05.

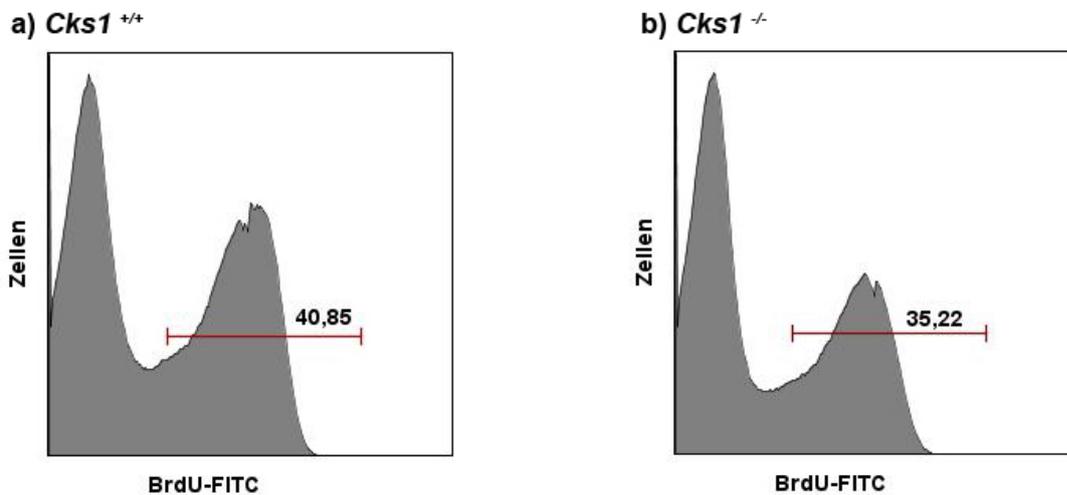


Abbildung 4.23: BrdU-Analyse aus dem Knochenmark 6 Tage nach 5-FU-Injektion und 16 Stunden nach BrdU-Injektion. Anteil der BrdU-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl.

4.10 In LT-HSCs sind die mRNA-Level von *Cks1* erhöht

Die Regulation der Cks1-Synthese findet hauptsächlich auf transkriptionalem Level statt. Aus diesem Grund war es wichtig, die mRNA-Level von *Cks1* in den Stammzellen und hämatopoetischen Progenitoren im Wildtyp-Knochenmark zu evaluieren. Die Stammzellfraktionen und multipotenten Vorläufer (MPP) wurden mithilfe der Durchflusszytometrie anhand ihrer Oberflächenmarker voneinander getrennt. Im Anschluss daran wurde eine Real Time PCR durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in den Langzeit hämatopoetischen Stammzellen (LT-HSC) die mRNA-Level von *Cks1* im Vergleich zu den anderen Populationen stark erhöht waren (Abb. 4.24, a). Obwohl $p27^{Kip1}$ hauptsächlich posttranskriptional reguliert wird, wurde ebenfalls eine RT-PCR durchgeführt. Hier zeigten sich erhöhte Level des $p27^{Kip1}$ -Transkripts in den LT-HSCs im Vergleich zu allen anderen Vorläufern und Stammzellen (Abb. 4.24, b).

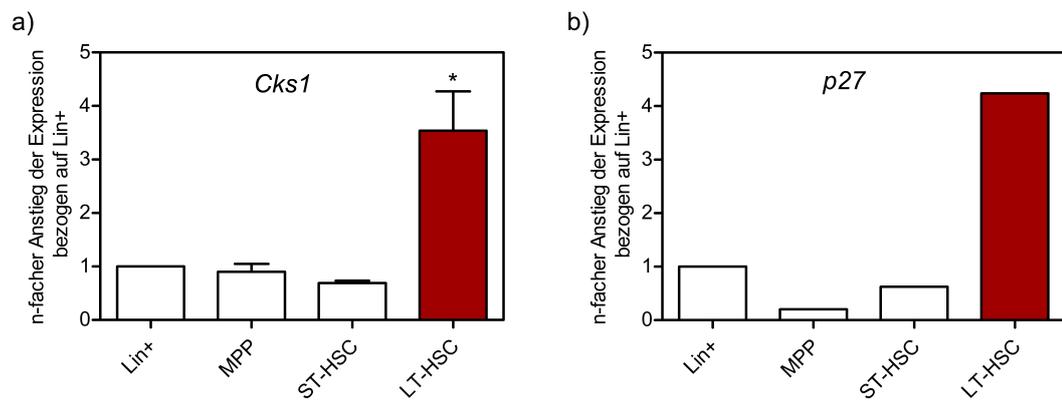


Abbildung 4.24: mRNA-Level von *Cks1* und *p27^{Kip1}* im Wildtyp-Knochenmark. a) Relative Expression des *Cks1*-Transkripts bezogen auf Lin+, b) Relative Expression des *p27^{Kip1}* Transkripts bezogen auf Lin+. Housekeeping-Gen Ubiquitin. Mean \pm SEM, * $p < 0,05$.

Kapitel 5

Diskussion

Das Verlassen des Ruhezustands und der Wiedereintritt in den Zellzyklus ist für die Selbsterneuerung und Regeneration hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) von zentraler Bedeutung. Der CKI p27^{Kip1} ist ein spezifischer Regulator für Zellzykluseintritt und Proliferation in hämatopoetischen Geweben [153]. Als bedeutender Inhibitor bestimmter Cyklin-Cdk-Komplexe führt seine Überexpression zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase [31]. Im Rahmen der murinen Hämatopoese reguliert das Protein hauptsächlich die etwas reiferen hämatopoetischen Progenitoren, hat aber unter bestimmten Bedingungen auch Einfluss auf die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) [24, 173, 196]. Zu den wichtigsten Regulationsmechanismen gehört die Polyubiquitinierung von p27^{Kip1} durch die SCF^{Skp2} E3 Ubiquitin Ligase [18, 111], an der Cks1 als Schlüsselprotein beteiligt ist [5]. Der Verlust von *Cks1* führt zur Stabilisierung von CKIs, wie p21^{Cip1/Waf1}, p57^{Kip2}, p130 und p27^{Kip1} [134], was Zellzyklusverzögerung oder -arrest begünstigt, während die Überexpression von *Cks1* in zahlreichen Tumorarten mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist [97, 78, 141]. Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob Cks1 Funktionen in der murinen Hämatopoese erfüllt und insbesondere ob diese als abhängig oder unabhängig von seiner Beteiligung am p27^{Kip1}-Abbau einzustufen sind. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Cks1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der frühen Hämatopoese spielt, wobei die Stress-induzierte Hämatopoese in besonderer Weise betroffen ist.

5.1 Zusätzlicher *Cks1*-Verlust gleicht den $p27^{Kip1-/-}$ Phänotyp aus

Bei der Untersuchung der verschiedenen Phänotypen der Knockout-Mäuse zeigte sich der $p27^{Kip1}$ Knockout wie erwartet [43, 79, 110] deutlich größer und schwerer als der Wildtyp, während die *Cks1* Knockout-Maus wie bereits in der Literatur beschrieben [155] im Vergleich zum Wildtyp sehr viel kleiner war (Kapitel 4.1). Die Doppelknockout-Mäuse, die weder $p27^{Kip1}$ noch *Cks1* besitzen, entsprachen entgegen der Erwartungen nicht etwa dem äußeren Erscheinungsbild der $p27^{Kip1}$ Knockout-Mäuse, sondern zeigten große Ähnlichkeit mit dem Wildtyp [51]. Falls *Cks1* in Säugetierzellen nur über $p27^{Kip1}$ -abhängige Funktionen verfügte, das heißt lediglich am $p27^{Kip1}$ -Abbau beteiligt wäre, würden sich der $p27^{Kip1}$ Knockout und der $p27^{Kip1}$ *Cks1* Knockout phänotypisch identisch präsentieren. Dass *Cks1* jedoch zusätzlich zahlreiche weitere regulatorische Funktionen im Rahmen des Zellzyklus besitzt, ist mittlerweile unumstritten [81]. Der deutliche Unterschied im äußeren Erscheinungsbild zwischen Doppelknockout und $p27^{Kip1}$ Knockout bestätigt eindrucksvoll, dass *Cks1* auch in Säugetieren noch weitere $p27^{Kip1}$ -unabhängige Aufgaben übernehmen muss. Die Tatsache, dass der Verlust von $p27^{Kip1}$ teilweise durch den Verlust von *Cks1* ausgeglichen werden kann, wird als Rescue-Phänomen bezeichnet [51].

5.2 Der Verlust von *Cks1* führt zu verminderten Zellzahlen in hämatopoetischen Organen

Um herauszufinden, ob der Verlust von *Cks1* direkten Einfluss auf die murine Hämatopoese hat, wurden zunächst die Zellzahlen in den hämatopoetischen Organen bestimmt. Sowohl im Knochenmark als auch in fetaler Leber verfügte der *Cks1* Knockout über signifikant weniger Zellen als der Wildtyp (Kapitel 4.2). Dieser Effekt wurde in der Literatur bereits in zahlreichen murinen Geweben beschrieben und auf eine reduzierte proliferative Kapazität der *Cks1*^{-/-} Zellen zurückgeführt [155]. In der fetalen Leber konnten die schwerwiegenden Proliferationsprobleme bereits in einem frühen Entwicklungsstadium, nämlich an Tag 15.5, wenn die Leber das Hauptorgan der fetalen Hämatopoese darstellt, beobachtet werden. In Kombination mit den reduzierten Zellzahlen in adultem murinen Knochenmark spricht dies dafür, dass die Hämatopoese in allen Entwicklungsstadien durch den

Verlust von *Cks1* beeinträchtigt wird. Die verminderten Zellzahlen in den hämatopoetischen Organen des *Cks1* Knockouts könnten auf eine Akkumulation des Zellzyklusinhibitors $p27^{Kip1}$ zurückzuführen sein, die bereits in einer Vielzahl anderer *Cks1*^{-/-} Geweben nachgewiesen wurde [155]. Neben dieser Annahme eines Proliferationsblocks in Abwesenheit von *Cks1* besteht bei geringeren Zellzahlen im Knochenmark natürlich auch die Möglichkeit, dass die Knockoutzellen in verstärktem Maße Apoptose oder anderen Formen des Zelltodes unterworfen sind [72]. Ex vivo Kulturen aus Linage negativen *Cks1*^{-/-} Zellen und Wildtypkontrollen haben bereits gezeigt, dass in Abwesenheit von *Cks1* Zytokinentzug zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl der apoptotischen Zellen in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen führt [116].

5.3 *Cks1* beeinflusst weder die Knochenstruktur noch die Zellularität

Die histopathologische Untersuchung der langen Röhrenknochen der *Cks1*^{-/-} Tiere wurde durchgeführt, um Hinweise darauf zu erhalten, ob der Verlust von *Cks1* zu einer veränderten Knochenstruktur oder Durchblutung führt und aus diesem Grunde weniger Stamm- und Progenitorzellen als in den Kontrolltieren vorhanden sind (Kapitel 4.3). Diese Theorie konnte jedoch anhand der Ergebnisse ausgeschlossen werden, die keinen Unterschied in Knochenstruktur und Zellularität zwischen den Genotypen zeigten.

5.4 *Cks1* ist für die Aufrechterhaltung der Steady-State Hämatopoese entbehrlich

Nachdem verminderte Zellzahlen in den hämatopoetischen Organen der *Cks1* Knockout-Mäuse aufgefallen waren, wurden von allen Mäusen Blutbilder angefertigt, um herauszufinden, ob dies auch Einfluss auf die Ausschwemmung reifer Blutzellen in die Peripherie hat. Die Untersuchungen des peripheren Blutes ergaben bezogen auf die Zellzahlen keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Kapitel 4.4), was die Ergebnisse anderer Autoren bezüglich des $p27^{Kip1}$ Knockouts bestätigt [43]. Unabhängig von eventuell bei der Blutbildung bestehenden Störungen, scheint der Verlust von *Cks1* so kompensiert werden zu können, dass die Versorgung der *Cks1* Knockout-Mäuse mit reifen Blutzellen nicht beeinträch-

tigt ist. Für die Steady-State Hämatopoese unter ungestörten homöostatischen Bedingungen und für die terminale Differenzierung der hämatopoetischen Progenitoren erweist sich *Cks1* folglich als entbehrlich. Bei der Zusammensetzung des peripheren Blutes fiel lediglich eine leichte Erhöhung der Erythrozytenkonzentration in allen Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp auf. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass Blutbilder immer zahlreichen endogenen und exogenen Störfaktoren unterliegen, wie z.B. dem Elektrolyt- und Wasserhaushalt der Versuchstiere, was mit individuellen Schwankungen der Werte verbunden ist. Aus diesem Grund kann die minimale Erhöhung der Erythrozytenkonzentration in diesem Falle nicht als Hinweis auf die Beeinflussung der Zusammensetzung der peripheren Blutes durch den Verlust von $p27^{Kip1}$ oder *Cks1* gewertet werden.

5.5 *Cks1* ist ein Regulator der Poolgröße von HSCs und hämatopoetischen Vorläuferzellen

In der Steady-State Hämatopoese führt der Verlust von *Cks1* zu verminderten Zellzahlen in den hämatopoetischen Organen, ohne die gesamte Hämatopoese und die Repräsentation reifer Blutzellen im peripheren Blut zu stören. Um den Einfluss von *Cks1* auf die verschiedenen Stammzell- und Vorläuferpopulationen genauer zu spezifizieren, wurde das Knochenmark der Mäuse mithilfe der Durchflusszytometrie genauer untersucht. Unter ungestörten homöostatischen Bedingungen zeigte sich eine deutlich verminderte absolute Anzahl an Lineage negativen Zellen im Knochenmark der *Cks1* Knockout-Mäuse, die sowohl die Stamm- als auch alle hämatopoetischen Vorläuferzellen betraf (Kapitel 4.5.1). *Cks1*, das Schlüsselprotein der SCF^{Skp2} E3 Ubiquitin Ligase, ist folglich ein Regulator der Poolgröße von HSCs und hämatopoetischen Vorläuferzellen. Es ist bekannt, dass E3 Ubiquitin Ligasen an der Regulation hämatopoetischer Zellen beteiligt sind [159]. Die CKIs $p27^{Kip1}$, $p21^{Cip1/Waf1}$, $p57^{Kip2}$ und p130 gehören zu den Zielproteinen der SCF^{Skp2} E3 Ubiquitin Ligase [157, 15, 134]. In Abwesenheit von *Cks1* kommt es folglich nicht nur zur Akkumulation von $p27^{Kip1}$, sondern auch der anderen Target Proteine, die in der murinen Hämatopoese sehr unterschiedliche Rollen übernehmen. $p27^{Kip1}$ übt eine starke inhibitorische Funktion auf hämatopoetische Progenitoren aus und der Verlust dieses CKIs führt zu gesteigerter Proliferation und Poolgröße der Vorläuferzellen [25, 24]. Es wurde gezeigt, dass im Steady-State die Deletion von $p27^{Kip1}$, $p21^{Cip1/Waf1}$ oder beiden Pro-

teinen gleichzeitig sich nicht auf adulte HSCs auswirkt [98]. Dennoch ergaben unsere Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie eine leichte Erhöhung der LSK-Zellen in Abwesenheit von $p27^{Kip1}$ mit und ohne gleichzeitigen *Cks1*-Verlust (Kapitel 4.5.1). Da die Daten anderer Autoren jedoch durch zahlreiche weiterführende Untersuchungen unterstützt werden [25, 24, 98] und von uns lediglich eine sehr geringe Anzahl an Versuchstieren verwendet wurde, muss hier von einem Messfehler ausgegangen werden, der möglicherweise mit der Knochenmarkisolation oder einer Gating-Ungenauigkeit korreliert und durch eine Erhöhung der Versuchstierzahl behoben werden könnte. In allen von uns untersuchten Populationen konnte daneben die Tendenz beobachtet werden, dass sowohl der $p27^{Kip1}$ Knockout als auch der Doppelknockout im Vergleich zum Wildtyp über erhöhte Zahlen an Progenitoren verfügte. Wahrscheinlich könnten hier übereinstimmend mit der Literatur durch den Einsatz von einer größeren Anzahl an Mäusen signifikante Ergebnisse erreicht werden [25, 24].

Ein weiterer von der Degradation durch die SCF^{Skp2} E3 Ubiquitin Ligase betroffener Cdk-Inhibitor, nämlich $p57^{Kip2}$, spielt eine essentielle Rolle für die Erhaltung sowie den Ruhezustand von hämatopoetischen Stammzellen. Der Verlust dieses Proteins führt zu deutlich verminderten HSC-Zahlen, was durch den Austritt aus der Ruhephase mit konsekutivem Eintritt in die Apoptose erklärt wird [98]. Trotz ihrer unterschiedlichen Funktionen bei der Hämatopoese gibt es Hinweise darauf, dass die Zielproteine der SCF^{Skp2} E3 Ubiquitin Ligase unter bestimmten Umständen einander ersetzen können, wobei z.B. die $p57^{Kip2}$ -Funktion der Erhaltung hämatopoetischer Stammzellen durch $p27^{Kip1}$ substituiert werden kann [98]. In Abwesenheit von $p27^{Kip1}$ hingegen, kann p130 dessen Rolle als Cdk2-Inhibitor übernehmen [153]. Es existiert die Hypothese, dass die spezifische Antwort der Zellen auf das Fehlen jedes einzelnen Cdk-Inhibitors eher von der Gesamtmenge der vorhandenen CKIs abhängt als von dem entsprechenden CKI-Typ und dass diese folglich auf molekularer Ebene nicht unterscheidbar sind [98]. Diese Kompensationsmechanismen sind möglicherweise die Erklärung dafür, dass es in Abwesenheit von $p27^{Kip1}$ nicht zu uneingeschränkter Proliferation in allen Zellarten kommt, sondern dass manche Entwicklungsstufen in der murinen Hämatopoese abhängig vom Expressionsgrad der verschiedenen Inhibitoren stärker betroffen sind als andere. In HSCs bedeutet dies z.B., dass im Falle eines $p27^{Kip1}$ Knockouts $p57^{Kip2}$ noch in größeren Mengen vorhanden ist und so der Verlust kompensiert werden kann. Andersherum geht die Deletion von $p57^{Kip2}$

in LSK-Zellen mit einer Erhöhung der p27^{Kip1}-Level einher [98]. Im Knochenmark der *Cks1* Knockouttiere kommt es durch die eingeschränkte Funktion der SCF^{*Skp2*} E3 Ubiquitin Ligase zur relativen Überexpression aller Target-CKIs, was die Gesamtmenge an Cdk-Inhibitoren in der Zelle stark erhöht. Diese Kombination führt möglicherweise noch zu einer Verstärkung ihrer inhibitorischen Funktionen auf den Zellzyklus hämatopoetischer Zellen, was eine Erklärung für die geringere Poolgröße an Stamm- und Progenitorzellen in Abwesenheit von *Cks1* sein könnte.

Obwohl sowohl das F-Box Protein *Skp2* als auch das Adapterprotein *Cks1* essentielle Bestandteile der SCF^{*Skp2*} E3 Ubiquitin Ligase und somit beide am Abbau ihrer verschiedenen Zielproteine beteiligt sind, entsprechen sich ihre Aufgaben in der Hämatopoese nicht uneingeschränkt. Während der Verlust von *Cks1* zu einer verminderten Poolgröße von HSCs und Vorläuferzellen führt, kommt es in Abwesenheit von *Skp2* zu erhöhten LSK-Zahlen, die sich zu einem geringeren Prozentsatz in der späten S-Phase befinden [134]. Die Zellzyklusaktivität von LSK-Zellen zeigte sich demnach in Abwesenheit von *Skp2* deutlich abgeschwächt, während unsere Proliferationsexperimente keine Unterschiede bezüglich der Inkorporation von BrdU zwischen den verschiedenen Genotypen im Steady-State gezeigt hatten (Kapitel 4.9.1). *Cks1* scheint also bei der Regulation der Poolgröße hämatopoetischer Zellen auch eine von der Ubiquitinierung der Targetproteine der SCF^{*Skp2*} E3 Ubiquitin Ligase unabhängige Rolle zu übernehmen.

Trotz der verminderten Zellzahlen im Knochenmark der *Cks1* Knockouttiere, die sowohl die Stamm- als auch die Progenitorzellen betrifft, ist die definitive Hämatopoese und die Repräsentation reifer Zellen im peripheren Blut nicht gestört. Möglicherweise führt eine beschleunigte Differenzierung der reiferen hämatopoetischen Vorstufen in Abwesenheit von *Cks1* dazu, dass die geringere Anzahl an Stamm- und Progenitorzellen kompensiert werden kann. Dies würde erklären, dass die Blutbilder der Tiere sich nicht unterscheiden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass auch das Knochenmark von *Skp2* Knockoutmäusen im Vergleich zum Wildtyp erniedrigte Progenitorzahlen aufweist, wobei sich verglichen mit den *SKP*^{+/+} deutlich weniger *SKP*^{-/-} Vorläuferzellen in der S-Phase befinden. Dennoch hatten sich keine signifikanten Veränderungen in den Blutbildern gezeigt, was auch in diesem Fall auf eine beschleunigte Differenzierung in Abwesenheit von *Skp2* hindeuten könnte [134].

5.6 Cks1 beeinflusst die embryonale Hämatopoese

Ein reduzierter Stamm- und Progenitorzellpool ließ sich auch in fetaler Leber beobachten, wobei in diesem Organ die Stammzellen (LSK) und insbesondere die LT-HSCs am stärksten betroffen waren (Kapitel 4.5.2). Nicht nur die absolute Anzahl, sondern auch der relative Anteil der LSK-Zellen an den Lineage negativen zeigte sich vermindert, was nicht allein auf die geringe Größe der hämatopoetischen Organe in den *Cks1* Knockouttieren zurückgeführt werden kann. Darüber, dass die intermediären hämatopoetischen Progenitoren in der fetalen Leber sich in ihren Eigenschaften von denen im Knochenmark unterscheiden, besteht mittlerweile ein Konsens [84]. Der CKI $p57^{Kip2}$ spielt z.B. in fetalen HSCs eine andere Rolle als in adulten hämatopoetischen Stammzellen, was dadurch erklärt wird, dass die Erhaltung des Ruhezustands deutlich wichtiger in adulten HSCs als in den fetalen Stammzellen ist. Der Verlust von $p57^{Kip2}$ hat bis auf eine leichte Erniedrigung der Knochenmark-Rekonstitutionsfähigkeit in der dritten seriellen Transplantation keinen Einfluss auf fetale HSCs, während es in adultem Knochenmark zu einer starken Verminderung der HSCs in Abwesenheit von $p57^{Kip2}$ kommt [196]. Im Embryonalstadium scheint *Cks1* einen stärkeren Einfluss auf die Regulation der Stammzellen, vor allem der LT-HSCs, zu haben als in der adulten Steady-State Hämatopoese, bei der keine Unterschiede im relativen Anteil der Stammzellen an der Gesamtzahl der Lineage negativen Zellen zwischen *Cks1* Knockout und Wildtyp festgestellt werden konnten. Untersuchungen ergaben, dass die Cks Proteine bereits im Morulastadium eine essentielle Funktion übernehmen und dass das Fehlen beider Homologe zum Zelluntergang und Tod des Embryos führt, was vor allem mit einem Defekt in der Cyklin B1-Expression in Verbindung gebracht wurde [96]. Auch in der embryonalen Hämatopoese scheint *Cks1* eine kritische Aufgabe zu übernehmen, wobei die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden muss, dass eine Akkumulation von $p27^{Kip1}$ und den anderen Targetproteinen der SCF^{*Skp2*} E3 Ubiquitin Ligase in LT-HSCs im Embryonalstadium weniger gut kompensiert werden kann als im adulten Zustand oder aber, dass *Cks1* hier noch weitere von der SCF^{*Skp2*} E3 Ubiquitin Ligase unabhängige Aufgaben übernimmt, die die Stammzellproliferation beeinflussen. Um dies zu klären, müssten weitere Untersuchungen an hämatopoetischen Zellen aus fetaler Leber durchgeführt werden.

5.7 Der Verlust von *Cks1* führt zur Akkumulation von CMPs

Obwohl sich in den *Cks1* Knockout-Mäusen alle multipotenten Vorläufer, also CMPs, GMPs und MEPs, vermindert zeigten, fiel interessanterweise sowohl im Knochenmark als auch in der fetalen Leber eine Erhöhung des relativen Anteils der myeloischen Vorläufer (CMPs) an den MPPs auf (Abb. 4.8). In diesem Zelltyp scheint *Cks1* eine von $p27^{Kip1}$ und der CKI- Ubiquitinierung unabhängige Funktion zu erfüllen und der Verlust von *Cks1* führt dazu, dass sich die hämatopoetischen Progenitoren eher im CMP-Stadium befinden als in den weiter ausdifferenzierten Stadien der MEPs oder GMPs. Möglicherweise spielt *Cks1* eine Rolle bei der Regulation bestimmter Transkriptionsfaktoren, die für die CMP-MEP-Transition oder den CMP-GMP-Übergang notwendig sind. In welche Richtung sich eine hämatopoetische Stammzelle (HSC) differenziert ist von verschiedenen Faktoren wie z.B. extrinsischen Signalen oder intrinsischen Ereignissen abhängig, wobei es immer zu Veränderungen in Genexpressionsprogrammen kommt, die letztendlich von Transkriptionsfaktoren abhängig sind [84]. Bedeutende hämatopoetische Transkriptionsfaktoren, die bei der Festlegung der Differenzierungsrichtung eine wichtige Rolle spielen, sind z.B. PU.1, GATA-1 und $C/EBP\alpha$ [17]. Die Eliminierung von *PU.1* in adultem Knochenmark führt zu einem kompletten Verlust von CMPs und GMPs [73, 35], während die Inaktivierung von $C/EBP\alpha$ in Knochenmarkszellen sich spezifisch durch die Abwesenheit von GMPs sowie einer reduzierten Anzahl an CMPs auszeichnet [192]. GATA-1 und PU.1 üben im Rahmen der hämatopoetischen Differenzierung durch Protein-Protein Interaktionen und auf transkriptionalem Level antagonistische Funktionen aus [113, 191, 193, 27]. Während PU.1 in allen hämatopoetischen Progenitoren vorhanden ist, findet man GATA-1 nur in HSCs, CMPs und MEPs. $C/EBP\alpha$ ist hingegen lediglich in HSCs, CMPs und GMPs vorhanden [158].

Die Erhöhung des relativen Anteils der CMPs an den multipotenten Vorläufern (MPPs) im Knochenmark und der fetalen Leber des *Cks1* Knockouts könnte ein Hinweis darauf sein, dass *Cks1* bei der Regulation des komplexen Netzes an Transkriptionsfaktoren, deren Aktivierung oder Hemmung für die hämatopoetische Differenzierungsrichtung ausschlaggebend ist, eine Rolle spielt. PU.1 ist beispielsweise in der Lage, mit zahlreichen Proteinen Komplexe zu bilden, die seine transkriptionale Aktivität beeinflussen und so die Expression verschiedener

lineage-spezifischer Gene regulieren [17]. In *Saccharomyces cerevisiae* wurde bereits die Funktion von Cks1 als Transkriptionsaktivator durch Rekrutierung des Proteasoms zu einigen Promotorregionen bestimmter Gene nachgewiesen [187]. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Gene wie *CDC20* und *GAL1* [106, 187], die eine schnelle Hochregulierung erfordern [66]. Basierend auf unseren Ergebnissen wäre es durchaus möglich, dass Cks1 z.B. durch Bindung an das ubiquitinierte Proteasom [66] oder Komplexbildung mit einem Transkriptionsfaktor, der an der CMP-GMP-Transition oder dem CMP-MEP-Übergang beteiligt ist, die Gentranskription aktiviert und dass sich aus diesem Grunde in Abwesenheit von *Cks1* die Zellen eher im CMP-Stadium befinden. Falls Cks1 eine essentielle Funktion bei dem Übergang von den CMPs in weiter ausdifferenzierte Stadien übernehmen würde, wäre ein verminderter Anteil von GMPs oder MEPs an den MPPs zu erwarten. Allerdings unterschied sich im Knochenmark weder der Anteil der GMPs noch der Anteil der MEPs an den MPPs von dem des Wildtyps, wobei berücksichtigt werden muss, dass sich der Anteil der MEPs an den MPPs zwar vermindert zeigte, allerdings nicht in einem signifikanten Bereich ($p=0,17$). Da der Versuch lediglich mit vier *Cks1*-Knockouttieren und fünf Wildtypen durchgeführt wurde, könnte eine Erhöhung der Versuchstieranzahl eventuell zu einem signifikanten Unterschied führen. Zusammenfassend führt der Verlust von *Cks1* im Knochenmark zu einem längeren Verweilen der Zellen im CMP-Stadium, was unter Umständen mit einer erschwerten CMP-MEP-Transition vergesellschaftet ist.

In *Cks1*^{-/-} fetaler Leber zeigte sich neben der Erhöhung des Anteils der CMPs an den MPPs auch der GMP-Anteil im Vergleich zum Wildtyp erhöht, während der Anteil der MEPs an den multipotenten Progenitoren sich unverändert darstellte (Abb. 4.13). Wiederum wird deutlich, dass sich der Verlust von *Cks1* in Knochenmarkszellen und in den Zellen fetaler Leber nicht immer in gleicher Weise manifestiert. Die hämatopoetischen Zellen in der *Cks1*^{-/-} fetalen Leber befinden sich bevorzugt im CMP- und im GMP-Stadium. Auch in diesem Fall könnte die Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Cks1 eine Rolle spielen und der CMP-MEP-Übergang durch den Verlust von *Cks1* erschwert sein, was die relative Erhöhung der GMPs begünstigen könnte. Interessant wäre es zu untersuchen, ob das längere Verweilen im GMP-Stadium bei der fetalen Blutbildung Einfluss auf die Anzahl der reiferen Granulozyten- und Makrophagenvorstufen hat.

5.8 Cks1 hat keinen Einfluss auf die Erythrozytenvorläufer

Da sich durch die Ergebnisse der Vorläuferfärbung im adulten murinen Knochenmark der Verdacht ergeben hatte, dass der Übergang vom CMP- in das MEP-Stadium durch den Verlust von *Cks1* gestört sein könnte, wurde untersucht, ob die sich in der hämatopoetischen Differenzierungsreihe abwärts der MEPs befindlichen Erythrozytenvorläuferstadien R1 bis R5 [190] durch diesen Umstand ebenfalls beeinträchtigt werden (Kapitel 4.6). Es wurde gezeigt, dass sich im Knochenmark der *Cks1* Knockout-Mäuse weniger erythroide Progenitorzellen insbesondere im R1- und R3-Stadium befinden als im Wildtypknochenmark. Signifikante Unterschiede ergaben sich allerdings lediglich bei Hochrechnung auf die Gesamtzellzahl des Knochenmarks, was darauf schließen lässt, dass dieses Ergebnis auf die insgesamt geringere Zellzahl im *Cks1* Knockout Knochenmark zurückzuführen ist. Trotz der leicht erniedrigten Anzahl an MEPs kann der Verlust von *Cks1* in späteren Stadien der Erythropoese wieder ausgeglichen werden, sodass sowohl die Zahlen der Erythrozytenvorläufer als auch die Blutbilder der *Cks1* Knockouttiere im Normalbereich liegen. Dies spricht ebenfalls dafür, dass *Cks1* in der Steady-State Hämatopoese kein essentielles Protein darstellt. Eine anschließende Untersuchung der Megakaryozyten und ihrer Vorläufer könnte eventuell aufschlussreich bezüglich der Rolle von *Cks1* sein, wobei allerdings berücksichtigt werden muss, dass sich auch die Thrombozytenzahlen im Blut der *Cks1* Knockout-Mäuse nicht von denen des Wildtyps unterschieden hatten.

5.9 Einschränkung der funktionellen Kapazität der hämatopoetischen Progenitoren durch *Cks1*-Verlust

In Abwesenheit von *Cks1* kommt es im Knochenmark zu einer leichten, in fetaler Leber zu einer starken Einschränkung der Fähigkeit zur Koloniebildung (Kapitel 4.7). Insbesondere die absolute und relative Reduktion der Anzahl aller Koloniestypen, nämlich BFU-E, CFU-E und CFU-GEMM, in fetaler Leber lässt darauf schließen, dass in Abwesenheit von *Cks1* die Hämatopoese empfindlich gestört ist. Untersuchungen anderer Autorengruppen hatten bereits eine Erhöhung der Koloniezahlen im CFC-Assay aus *p27^{Kip1}* Knockout Knochenmark ergeben [24],

was darauf hinweist, dass in diesem Fall die Verminderung der *Cks1*^{-/-} Kolonien auf die Akkumulation von p27^{Kip1} zurückzuführen sein könnte. Die Daten indizieren, dass die funktionelle Kapazität der hämatopoetischen Progenitoren in der embryonalen Hämatopoese stärker gestört ist, als dies in der adulten Hämatopoese der Fall ist, in deren Rahmen möglicherweise Kompensationsmechanismen greifen, die den Verlust ausgleichen können.

5.10 Kultivierte *Cks1*^{-/-} Knochenmarkszellen verlieren ihr Koloniebildungspotential

Die CFC-Assays aus frischem Knochenmark und fetaler Leber hatten eine Einschränkung der funktionellen Kapazität der hämatopoetischen Progenitoren durch *Cks1*-Verlust ergeben. Noch deutlicher wurde dieses Ergebnis durch die Analyse der CFC-Assays aus Knochenmarkszellen, die aus Kulturen mit einer Koloniebildung fördernden Wachstumsfaktorenkombination stammten [189, 127]. Es konnte gezeigt werden, dass die 8 Tage kultivierten *Cks1*^{-/-} hämatopoetischen Progenitoren ihre funktionelle Kapazität zum Großteil verloren hatten und offenbar nicht in der Lage waren auf die Stimulationsbedingungen in gleicher Weise wie der Wildtyp zu reagieren (Kapitel 4.8). Dies galt auch für die kultivierten Zellen des Doppelknockouts. Gleichzeitig kam es in beiden Genotypen zu einer relativen Erhöhung der Granulozyten/Makrophagen-Kolonien (CFU-GM) und einer relativen Erniedrigung der roten Kolonien (BFU-E), was die These, dass es in Abwesenheit von *Cks1* zu einer erschwerten CMP-MEP-Transition kommt, stützt. Durch Kultivierung von *Cks1*^{-/-} Knochenmarkszellen verringert sich also deren Koloniebildungspotential und gleichzeitig wird eine Entwicklung in Richtung der Granulozyten/Makrophagen-Reihe gegenüber der Roten Reihe bevorzugt.

5.11 *Cks1* reguliert die Stress-induzierte Hämatopoese

Die Untersuchung der BrdU-Inkorporation der verschiedenen Stammzell- und Vorläuferpopulationen ergab, dass der Verlust von *Cks1* in der Steady-State Hämatopoese die Proliferation nicht beeinträchtigt (Kapitel 4.9.1). Obwohl *Cks1* als Schlüsselprotein des p27^{Kip1}-Abbaus eine wichtige Rolle beim Übertritt in die S-Phase spielt [31] und die *Cks1* Knockout-Mäuse über eine geringere Poolgröße

ße an Stammzellen (HSCs) verfügen, ist die Zellzyklusprogression in den frühen hämatopoetischen Zellen unter normalen Bedingungen ungestört. Erst durch die Analyse der Stress-induzierten Hämatopoese nach 5-FU- und BrdU- Applikation, wurden gravierende Proliferationsprobleme deutlich, wobei die Zellen des *Cks1* Knockouts zu einem wesentlich geringeren Anteil BrdU-Inkorporation zeigten als die des Wildtyps und sowohl HSCs also auch hämatopoetische Progenitoren im *Cks1*^{-/-} Knochenmark stark vermindert waren (Kapitel 4.9.2). Die Funktionen von *Cks1* in der Stress-induzierten Hämatopoese unterscheiden sich folglich von denen in der Steady-State Hämatopoese.

Wie bereits erwähnt ist eine effiziente Hämatopoese von der Fähigkeit der Stammzellen zur Selbsterneuerung und zur Bildung bestimmter hämatopoetischer Vorläufer, die sich letztendlich zu reifen Blutzellen differenzieren, abhängig [174]. Im Rahmen der Steady-State Hämatopoese bedeutet dies, dass lediglich ein geringer Anteil an Stammzellen die G0-Phase verlassen muss, um eine konstante Anzahl an HSCs aufrechtzuerhalten [103]. Die Stress-induzierte Hämatopoese, die z.B. nach Stimulation mit zytotoxischen Substanzen, wie 5-FU oder nach Applikation ionisierender Strahlung, zum Tragen kommt, stellt andere Anforderungen an die hämatopoetischen Stammzellen. Innerhalb kürzester Zeit muss ein großer Teil der HSCs den Ruhezustand verlassen, um die Rekonstruktion des geschädigten Knochenmarks zu gewährleisten und das hämatopoetische System wiederherzustellen [32].

Unter Stressbedingungen führt der Verlust von *Cks1* zu einer eingeschränkten hämatopoetischen Regeneration, was bedeutet, dass die Repopulation des Knochenmarks durch die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) nicht in ausreichendem Maße gewährleistet ist. Die Proliferation und Differenzierung der HSCs, die für die Rekonstruktion der Hämatopoese von essentieller Bedeutung sind, scheint gestört zu sein. Im Stresstest zeigte sich sowohl die absolute als auch die relative Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen (LSKs) und hämatopoetischen Progenitoren (MPPs) im Knochenmark der *Cks1*^{-/-} Tiere stark vermindert, was dafür spricht, dass in Abwesenheit des Proteins *Cks1* das Repopulationspotential der Stammzellen vermindert und damit die Zytotoxizität des Hämatotoxins 5-FU gesteigert wird.

Die rasche Produktion von Blutzellen ist in zahlreichen Situationen, unter anderem nach akutem Blutverlust, Hämolyse oder Transplantationen notwendig und wird von einer Vielzahl an internen und externen Signalen, wie Wachstums-

faktoren, Transkriptionsfaktoren und weiteren Zellzyklusregulatoren, kontrolliert [122]. Möglicherweise ist *Cks1* an diesen komplexen Regulationsvorgängen beteiligt, was dazu führen könnte, dass in Abwesenheit von *Cks1* die HSCs nicht mehr in der Lage sind, auf bestimmte Proliferationsstimuli zu reagieren. Während *Cks1* in der Steady-State Hämatopoese nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, lässt sich dem Protein in der Stress-induzierten Hämatopoese eine potentiell protektive Funktion im Rahmen der Repopulation zuschreiben. Als klinisch relevant könnte sich dies bei Krankheitsbildern mit Knochenmarksversagen, wie z.B. der aplastischen Anämie, erweisen. Dabei handelt es sich um eine seltene heterogene Störung, die zu etwa 15-20 % hereditär und zu 70-80 % idiopathisch, also ohne erkennbare Ursache, auftritt, und durch eine starke Reduktion hämatopoetischer Zellen mit nachfolgender Panzytopenie charakterisiert ist [88]. Eine Untergruppe der Fälle lässt sich auf bestimmte Medikamente, Infektionen oder Bestrahlung, also im weitesten Sinne Stresssituationen, zurückführen, wobei ungeklärt bleibt, aus welchem Grunde manche Individuen anfälliger als andere sind [95]. In den von uns durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Cks1* zu einer vermehrten Empfindlichkeit gegenüber hämatotoxischem Stress führt. Unter Umständen könnte dies eine Erklärung für die Erschöpfung der HSCs verbunden mit dem Auftreten von Panzytopenien insbesondere im Rahmen einer aplastischen Anämie darstellen. Um diese These zu stützen, müssten allerdings ausgedehntere Anschlussexperimente und Langzeitversuche durchgeführt werden. Die Stress-induzierte Hämatopoese wird bereits in laufenden Transplantationsversuchen, in denen Knochenmark von *Cks1*^{-/-} Mäusen und Wildtyp Kontrollen kompetitiv in tödlich bestrahlte Empfänger-tiere injiziert wurde, untersucht [116].

5.12 *Cks1* wird vermehrt in LT-HSCs exprimiert

Die Analyse der mRNA-Level in hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und Progenitoren ergab ein deutlich erhöhtes *Cks1*-Transkript in den Langzeit hämatopoetischen Stammzellen (LT-HSCs) im Vergleich zu den anderen hämatopoetischen Stammzell- und Progenitorpopulationen (Kapitel 4.10). Da *Cks1* hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene reguliert wird, unterstützt dies die These, dass *Cks1* in hämatopoetischen Stammzellen und insbesondere in LT-HSCs spezielle Funktionen übernimmt, worauf auch die Ergebnisse unserer weiteren Versuche hindeuten. In den LT-HSCs wurden außerdem erhöhte Level von *p27^{Kip1}* mRNA

gefunden. Wie bereits erwähnt, wird dieses Protein allerdings hauptsächlich posttranskriptional reguliert und Experimente anderer Autoren haben gezeigt, dass die p27^{Kip1}-Proteinlevel nicht uneingeschränkt mit den mRNA-Leveln übereinstimmen [156]. Um genauere Angaben über p27^{Kip1} machen zu können, müssten die jeweiligen Proteinmengen in den verschiedenen hämatopoetischen Populationen quantitativ untersucht werden.

5.13 Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob das Protein Cks1, dessen Schlüsselrolle in Säugetierzellen bisher in seiner Beteiligung an der SCF^{Skp2} E3 Ubiquitin Ligase und somit unter anderem an der p27^{Kip1}-Ubiquitinierung gesehen wird, Einfluss auf die murine Hämatopoese hat, wobei es p27^{Kip1}-abhängige und -unabhängige Funktionen voneinander abzugrenzen galt. Der Verlust von *Cks1* führte zu einem charakteristischen Phänotyp, der sich dem p27^{Kip1}^{-/-} Phänotyp entgegengesetzt präsentierte. Die zusätzliche Deletion von *Cks1* in der p27^{Kip1}^{-/-} Maus veränderte wieder Erwartungen den p27^{Kip1}^{-/-} Phänotyp und gab so die ersten Hinweis auf das Vorhandensein von SCF^{Skp2} E3 Ubiquitin Ligase-unabhängigen Funktionen des Proteins Cks1.

Die untersuchten hämatopoetischen Organe der *Cks1*^{-/-} Mäuse zeigten eine verminderte Gesamtzellzahl, die mit ebenfalls reduzierten Zahlen an HSCs und hämatopoetischen Vorläufern einherging, wobei sich weder Unterschiede in der Zellularität noch der Struktur der Knochen gezeigt hatten. Cks1 ist somit ein potenter Regulator der Poolgröße von Stamm- und Progenitorzellen, wobei es Hinweise sowohl auf p27^{Kip1}-abhängige als auch -unabhängige Funktionen des Proteins gibt. Neben einem verstärkten Eintritt in die Apoptose käme auch ein Proliferationsblock als Erklärungsmodell in Frage. Des Weiteren zeigten die *Cks1*^{-/-} hämatopoetischen Progenitoren eine verminderte funktionelle Kapazität bei der Koloniebildung, die durch Kultivierung noch verstärkt wurde.

Ergänzende Untersuchungen ergaben, dass Cks1 für die Steady-State Hämatopoese und die terminale Differenzierung der Blutzellen entbehrlich ist, da trotz des geringeren Pools an Stamm- und Vorläuferzellen in Abwesenheit von *Cks1* weder die Erythrozytenvorläufer noch das periphere Blut Auffälligkeiten aufwiesen. Unter normalen homöostatischen Bedingungen kann der *Cks1*-Verlust folglich kompensiert werden, was möglicherweise mit einer beschleunigten Differenzierung

der HSCs einhergeht.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es in Abwesenheit von *Cks1* zu einer vermehrten Empfindlichkeit gegenüber hämatotoxischem Stress kommt und dass dem Protein im Rahmen der Stress-induzierten Hämatopoese eine potentiell protektive Rolle bei der Repopulation des Knochenmarks durch hämatopoetische Stammzellen (HSCs) zukommt. Interessant dabei ist, dass in deren CD34 negativen Fraktion (LT-HSCs) auch erhöhte *Cks1* Expressionslevel festgestellt wurden.

Es gab Hinweise darauf, dass Cks1, unabhängig von der p27^{Kip1}-Ubiquitinierung, möglicherweise an der Regulation bestimmter für die Hämatopoese wichtiger Transkriptionsfaktoren, beteiligt sein könnte und dass gegebenenfalls durch Deletion des Gens die CMP-MEP Transition erschwert ist. Bei den Untersuchungen wurde ebenfalls deutlich, dass die Aufgaben von Cks1 in der embryonalen Hämatopoese sich von denen in der adulten Hämatopoese unterscheiden und dass eventuell vorhandene Kompensationsmechanismen, die den Verlust von *Cks1* ausgleichen könnten, in der embryonalen Hämatopoese noch nicht ausreichend vorhanden sind.

Weitere Experimente müssen angeschlossen werden, um diese Ergebnisse zu bestätigen. Basierend auf den Stresstests kann davon ausgegangen werden, dass Cks1 eine Schlüsselrolle bei der Regeneration des Knochenmarks nach Myeloablation und Knochenmarkstransplantationen spielt und dass es folglich in Abwesenheit von *Cks1* zu einer weniger effektiven hämatopoetischen Regeneration kommt. Untersuchungen mit kompetitiven und nicht-kompetitiven sowie seriellen Transplantationen könnten sich als aufschlussreich erweisen. In ihrer Gesamtheit lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass Cks1 kritische sowohl SCF^{Skp2} E3 Ubiquitin Ligase- abhängige als auch -unabhängige Funktionen in der frühen Hämatopoese erfüllt, die deutlich über seine Rolle bei der p27^{Kip1}-Ubiquitinierung hinausgehen. Insbesondere ist das Protein an der Regulation der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und Progenitoren beteiligt.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Das hämatopoetische System der Maus	13
2.2	Zellzyklus	18
2.3	p27 ^{Kip1} -Ubiquitinierung	23
3.1	Colony Forming Assay aus murinem Knochenmark an Tag 12 . .	41
4.1	Die Phänotypen der Knockout-Mäuse	46
4.2	Zellzahlen der hämatopoetischen Organe	47
4.3	HE Färbung der langen Röhrenknochen von <i>Cks1</i> KO-Mäusen und Kontrolltieren	48
4.4	Blutbilder der Knockout-Mäuse und Kontrolltiere	49
4.5	Durchflusszytometrie der Lineage negativen Populationen aus dem Knochenmark von <i>Cks1</i> Knockout und Wildtyp.	50
4.6	Gating Strategie für die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der HSCs und Progenitorpopulationen.	51
4.7	HSCs und Progenitorpopulationen im Knochenmark der Knockout- und Kontrollmäuse	52
4.8	Relative Anteile der Stammzellfraktionen und Progenitorpopulationen im Knochenmark der Knockout- und Kontrollmäuse	53
4.9	Durchflusszytometrie der multipotenten Progenitoren (MPPs) aus dem Knochenmark von <i>Cks1</i> Knockout und Wildtyp.	54
4.10	Durchflusszytometrie der Lineage negativen Populationen aus fetaler Leber von <i>Cks1</i> Knockout und Wildtyp.	55
4.11	Durchflusszytometrie der multipotenten Progenitoren (MPPs) aus fetaler Leber von <i>Cks1</i> Knockout und Wildtyp.	55
4.12	HSCs und Progenitorpopulationen in fetaler Leber der <i>Cks1</i> KO- und Kontrollmäuse	56
4.13	Relative Anteile der Stammzellfraktionen und Progenitorpopulationen in der fetalen Leber der <i>Cks1</i> KO- und Kontrollmäuse . . .	57
4.14	Gating Strategie der Erythrozytenvorläufer	58
4.15	Erythrozytenvorläufer im Knochenmark der <i>Cks1</i> KO- und Kontrollmäuse	59
4.16	Colony Forming Assay (CFA) aus dem Knochenmark der Knockout- und Kontrollmäuse	60

4.17 Colony Forming Assay (CFA) aus fetaler Leber der <i>Cks1</i> Knockoutmäuse und der Kontrolltiere	61
4.18 Colony Forming Assay (CFA) aus fetaler Leber der <i>Cks1</i> KO- und Kontrollmäuse	61
4.19 Colony Forming Assay (CFA) aus dem Knochenmark der Knockout- und Kontrollmäuse nach 8 Tagen in Kultur	62
4.20 BrdU-Analyse aus dem Knochenmark der Knockout- und Kontrollmäuse	63
4.21 Hämatopoetische Progenitoren und Stammzellen von <i>Cks1</i> KO- und Kontrollmäusen nach 5-FU- Applikation	65
4.22 Proliferation der Knochenmarkszellen von <i>Cks1</i> KO- und Kontrollmäusen nach 5-FU- Applikation	65
4.23 BrdU-Analyse aus dem Knochenmark 6 Tage nach 5-FU-Injektion und 16 Stunden nach BrdU-Injektion	66
4.24 mRNA-Level von <i>Cks1</i> und <i>p27^{Kip1}</i> im Wildtyp-Knochenmark . .	67

Tabellenverzeichnis

3.1	Puffer für die Gewebelyse	37
3.2	Pipettierschema für die $p27^{Kip1}$ -Genotypisierung	37
3.3	PCR-Programm für die $p27^{Kip1}$ -Genotypisierung	38
3.4	Pipettierschema für die $Cks1$ -Genotypisierung	39
3.5	PCR-Programm für die $Cks1$ -Genotypisierung	39
3.6	RT-PCR Pippetierschema	44
3.7	RT-PCR Programm	44

Literaturverzeichnis

- [1] K. Akashi, D. Traver, T. Miyamoto, and I. L. Weissman. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774):193–197, 2000.
- [2] L. J. Appleman, I. Chernova, L. Q. Li, and V. A. Boussiotis. Cd28 costimulation mediates transcription of *skp2* and *cks1*, the substrate recognition components of *scfskp2* ubiquitin ligase that leads *p27(kip1)* to degradation. *Cell Cycle*, 5(18):2123–2129, 2006.
- [3] F. Arai, A. Hirao, M. Ohmura, H. Sato, S. Matsuoka, K. Takubo, K. Ito, G. Y. Koh, and T. Suda. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118(2):149–161, 2004.
- [4] J. E. BARKER. Development of mouse hematopoietic system .i. types of hemoglobin produced in embryonic yolk sac and liver. *Developmental Biology*, 18(1):14–&, 1968.
- [5] J. Bartek and J. Lukas. p27 destruction: Cks1 pulls the trigger. *Nature Cell Biology*, 3(4):E95–E98, 2001.
- [6] T. Bashir, N. V. Dorrello, V. Amador, D. Guardavaccaro, and M. Pagano. Control of the *scfskp2-cks1* ubiquitin ligase by the *apc/c-cdh1* ubiquitin ligase. *Nature*, 428(6979):190–193, 2004.
- [7] A. J. BECKER, J. E. TILL, and E. A. MCCULLOCH. Cytological demonstration of clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197(486):452–&, 1963.
- [8] J. J. Bell and A. Bhandoola. The earliest thymic progenitors for t cells possess myeloid lineage potential. *Nature*, 452(7188):764–U9, 2008.
- [9] A. Besson, M. Gurian-West, A. Schmidt, A. Hall, and J. M. Roberts. p27(kip1) modulates cell migration through the regulation of rhoa activation. *Genes & Development*, 18(8):862–876, 2004.
- [10] A. Besson, H. C. Hwang, S. Cicero, S. L. Donovan, M. Gurian-West, D. Johnson, B. E. Clurman, M. A. Dyer, and J. M. Roberts. Discovery

- of an oncogenic activity in p27(kip1) that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes & Development*, 21(14):1731–1746, 2007.
- [11] Mikhail V. Blagosklonny. Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell Cycle*, 1(6):391–3, 2002.
- [12] J. Bloom and M. Pagano. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Seminars In Cancer Biology*, 13(1):41–47, 2003.
- [13] M. Boehm, T. Yoshimoto, M. F. Crook, S. Nallamshetty, A. True, G. J. Nabel, and E. G. Nabel. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(kip1) and regulates cell cycle progression. *Embo Journal*, 21(13):3390–3401, 2002.
- [14] T. Bondar, A. Kalinina, L. Khair, D. Kopanja, A. Nag, S. Bagchi, and P. Raychaudhuri. Cu14a and ddb1 associate with skp2 to target p27(kip1) for proteolysis involving the cop9 signalosome. *Molecular and Cellular Biology*, 26(7):2531–2539, 2006.
- [15] G. Bornstein, J. Bloom, D. Sitry-Shevah, K. Nakayama, M. Pagano, and A. Hershko. Role of the scf/skp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21(cip1) in s phase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28):25752–25757, 2003.
- [16] A. Borriello, V. Cucciolla, A. Oliva, V. Zappia, and F. Della Ragione. p27kip1 metabolism - a fascinating labyrinth. *Cell Cycle*, 6:1053–1061, 2007.
- [17] P. Burda, P. Laslo, and T. Stopka. The role of pu.1 and gata-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia*, 24(7):1249–1257, 2010.
- [18] A. C. Carrano, E. Eytan, A. Hershko, and M. Pagano. Skp2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the cdk inhibitor p27. *Nature Cell Biology*, 1(4):193–199, 1999.
- [19] C. Catzavelos, N. Bhattacharya, Y. C. Ung, J. A. Wilson, L. Roncari, C. Sandhu, P. Shaw, H. Yeger, I. MoravaProtzner, L. Kapusta, E. Franssen, K. I. Pritchard, and J. M. Slingerland. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27(kip1) protein: Prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Medicine*, 3(2):227–230, 1997.
- [20] H. Chang, N. Jiang, H. Jiang, M. N. Saha, C. I. Qi, W. Xu, and D. Reece. Cks1b nuclear expression is inversely correlated with p27(kip1) expression and is predictive of an adverse survival in patients with multiple myeloma. *Haematologica-the Hematology Journal*, 95(9):1542–1547, 2010.

- [21] Pierre Charbord. Mediators involved in the control of hematopoiesis by the microenvironment. *Hematopoiesis, A Developmental Approach*, pages 702–717, 2001.
- [22] P. Chen and N. Segil. p27(kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of corti. *Development*, 126(8):1581–1590, 1999.
- [23] M. G. Cheng, P. Olivier, J. A. Diehl, M. Fero, M. F. Roussel, J. M. Roberts, and C. J. Sherr. The p21(cip1) and p27(kip1) cdk 'inhibitors' are essential activators of cyclin d-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo Journal*, 18(6):1571–1583, 1999.
- [24] T. Cheng, N. Rodrigues, D. Dombkowski, S. Stier, and D. T. Scadden. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nature Medicine*, 6(11):1235–1240, 2000.
- [25] T. Cheng, N. Rodrigues, H. M. Shen, Y. G. Yang, D. Dombkowski, M. Sykes, and D. T. Scadden. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21(cip1/waf1). *Science*, 287(5459):1804–1808, 2000.
- [26] K. Choi, M. Kennedy, A. Kazarov, J. C. Papadimitriou, and G. Keller. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 125(4):725–732, 1998.
- [27] S. T. Chou, E. Khandros, L. C. Bailey, K. E. Nichols, C. R. Vakoc, Y. Yao, Z. Huang, J. D. Crispino, R. C. Hardison, G. A. Blobel, and M. J. Weiss. Graded repression of pu.1/sfp1 gene transcription by gata factors regulates hematopoietic cell fate. *Blood*, 114(5):983–994, 2009.
- [28] I. Chu, J. Sun, A. Arnaout, H. Kahn, W. Hanna, S. Narod, P. Sun, C. K. Tan, L. Hengst, and J. Slingerland. p27 phosphorylation by src regulates inhibition of cyclin e-cdk2. *Cell*, 128:281–294, 2007.
- [29] I. M. Chu, L. Hengst, and J. M. Slingerland. The cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(4):253–267, 2008.
- [30] B. R. Clark and A. Keating. Biology of bone marrow stroma. *Bone Marrow Transplantation: Foundations For the 21st Century*, 770:70–78, 1995.
- [31] S. Coats, W. M. Flanagan, J. Nourse, and J. M. Roberts. Requirement of p27(kip1) for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*, 272(5263):877–880, 1996.
- [32] X. L. Cong, M. Yan, X. Y. Yin, and D. E. Zhang. Hematopoietic cells from ube1l-deficient mice exhibit an impaired proliferation defect under the stress of bone marrow transplantation. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 45(2):103–111, 2010.

- [33] A. Cumano, F. Dieterlen-Lievre, and I. Godin. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell*, 86(6):907–916, 1996.
- [34] A. Cumano and I. Godin. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annual Review of Immunology*, 25:745–785, 2007.
- [35] A. Dakic, D. Metcalf, L. Di Rago, S. Mifsud, L. Wu, and S. L. Nutt. Pu.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *Journal of Experimental Medicine*, 201(9):1487–1502, 2005.
- [36] X. B. Deng, S. E. Mercer, S. Shah, D. Z. Ewton, and E. Friedman. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1) is stabilized in G(0) by mirk/dyrk1b kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21):22498–22504, 2004.
- [37] G. Draetta, L. Brizuela, J. Potashkin, and D. Beach. Identification of p34 and p13, human homologs of the cell-cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell*, 50(2):319–325, 1987.
- [38] H. G. Drexler. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor ink4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia*, 12(6):845–859, 1998.
- [39] M. A. Dyer and C. L. Cepko. p27(kip1) and p57(kip2) regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *Journal of Neuroscience*, 21(12):4259–4271, 2001.
- [40] Armin Ehniger and Andreas Trumpp. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *Journal of Experimental Medicine*, 208(3):421–428, March 2011.
- [41] Marieke A. G. Essers, Sandra Offner, William E. Blanco-Bose, Zoe Waibler, Ulrich Kalinke, Michel A. Duchosal, and Andreas Trumpp. Ifn alpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*, 458(7240):904–U11, April 2009.
- [42] S. Ezoe, I. Matsumura, Y. Satoh, H. Tanaka, and Y. Kanakura. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Cycle*, 3(3):314–318, 2004.
- [43] M. L. Fero, M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C. E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L. H. Tsai, V. Broudy, R. M. Perlmutter, K. Kaushansky, and J. M. Roberts. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(kip1)-deficient mice. *Cell*, 85(5):733–744, 1996.

- [44] Y. Furukawa. Cell cycle control genes and hematopoietic cell differentiation. *Leukemia & Lymphoma*, 43(2):225–231, 2002.
- [45] A. GALY, M. TRAVIS, D. Z. CEN, and B. CHEN. Human t-cells, b-cells, natural-killer, and dendritic cells arise from a common bone-marrow progenitor-cell subset. *Immunity*, 3(4):459–473, 1995.
- [46] D. Ganoth, G. Bornstein, T. K. Ko, B. Larsen, M. Tyers, M. Pagano, and A. Hershko. The cell-cycle regulatory protein cks1 is required for scf/skp2-mediated ubiquitinylation of p27. *Nature Cell Biology*, 3(3):321–324, 2001.
- [47] Hui Gao, Xuesong Ouyang, Whitney Banach-Petrosky, Alexander D. Borowsky, Yong Lin, Minjung Kim, Hansol Lee, Weichung-Joseph Shih, Robert D. Cardiff, Michael M. Shen, and Cory Abate-Shen. A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49):17204–17209, 2004.
- [48] C. Gekas, F. Dieterlen-Lievre, S. H. Orkin, and H. K. A. Mikkola. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Developmental Cell*, 8(3):365–375, 2005.
- [49] J. M. Gimble, C. E. Robinson, X. Wu, and K. A. Kelly. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. *Bone*, 19(5):421–428, 1996.
- [50] I. Godin and A. Cumano. The hare and the tortoise: An embryonic hematopoietic race. *Nature Reviews Immunology*, 2(8):593–604, 2002.
- [51] S. Graf. Analysis of p27kip1- dependent and independent functions of cks1 in cell cycle regulation. Dissertation, Technische Universität München, Fakultät für Chemie, Lehrstuhl für Biochemie, 2010.
- [52] S. Graf and U. Platz. Unveröffentlichte Daten. 2006.
- [53] J. S. GREENBERGER. Sensitivity of corticosteroid-dependent insulin-resistant lipogenesis in marrow preadipocytes of obese diabetic (db-db) mice. *Nature*, 275(5682):752–754, 1978.
- [54] M. Grimmler, Y. F. Wang, T. Mund, Z. Cilensek, E. M. Keidel, M. B. Waddell, H. Jakel, M. Kullmann, R. W. Kriwacki, and L. Hengst. Cdk-inhibitory activity and stability of p27(kip1) are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell*, 128:269–280, 2007.
- [55] R. Halaban. Rb/e2f: A two-edged sword in the melanocytic system. *Cancer and Metastasis Reviews*, 24(2):339–356, June 2005.

- [56] G. J. HANNON and D. BEACH. P15(ink4b) is a potential effector of tgf-beta-induced cell-cycle arrest. *Nature*, 371(6494):257–261, 1994.
- [57] B. Hao, N. Zheng, B. A. Schulman, G. Wu, J. J. Miller, M. Pagano, and N. P. Pavletich. Structural basis of the cks1-dependent recognition of p27(kip1) by the scf/skp2 ubiquitin ligase. *Molecular Cell*, 20(1):9–19, 2005.
- [58] J. W. Harbour, R. X. Luo, A. D. Santi, A. A. Postigo, and D. C. Dean. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block rb functions as cells move through g1. *Cell*, 98(6):859–869, 1999.
- [59] J. W. Harper, J. L. Burton, and M. J. Solomon. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes & Development*, 16(17):2179–2206, 2002.
- [60] L. H. HARTWELL and T. A. WEINERT. Checkpoints - controls that ensure the order of cell-cycle events. *Science*, 246(4930):629–634, 1989.
- [61] T. Hattori, K. Kitagawa, C. Uchida, T. Oda, and M. Kitagawa. Cks1 is degraded via the ubiquitin-proteasome pathway in a cell cycle-dependent manner. *Genes To Cells*, 8(11):889–896, 2003.
- [62] L. Hengst and S. I. Reed. Translational control of p27(kip1) accumulation during the cell cycle. *Science*, 271(5257):1861–1864, 1996.
- [63] Dan D. Hershko. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase skp2 in cancer. *Cancer*, 112(7):1415–24, 2008.
- [64] H. HIRAI, M. F. ROUSSEL, J. Y. KATO, R. A. ASHMUN, and C. J. SHERR. Novel ink4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin d-dependent kinases cdk4 and cdk6. *Molecular and Cellular Biology*, 15(5):2672–2681, 1995.
- [65] M. L. Hixon, A. I. Flores, M. W. Wagner, and A. Gualberto. Ectopic expression of cdc2/cdc28 kinase subunit homo sapiens 1 uncouples cyclin b metabolism from the mitotic spindle cell cycle checkpoint. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11):6224–6237, 1998.
- [66] R. Holic, A. Kukalev, S. Lane, E. J. Andress, I. Lau, C. W. H. Yu, M. J. Edelman, B. M. Kessler, and V. P. C. C. Yu. Cks1 activates transcription by binding to the ubiquitylated proteasome. *Molecular and Cellular Biology*, 30(15):3894–3901, 2010.
- [67] Kentaro Hosokawa, Fumio Arai, Hiroki Yoshihara, Hiroko Iwasaki, Mark Hembree, Tong Yin, Yuka Nakamura, Yumiko Gomei, Keiyo Takubo, Haruko Shiama, Sahoko Matsuoka, Linheng Li, and Toshio Suda. Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect he-

- matopoietic stem cells in adult bone marrow. *Cell Stem Cell*, 6(3):194–198, March 2010.
- [68] X. Huang, S. Cho, and G. J. Spangrude. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death and Differentiation*, 14:1851–1859, 2007.
- [69] H. C. Hwang and B. E. Clurman. Cyclin e in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*, 24(17):2776–2786, 2005.
- [70] R. O. HYNES. Integrins - versatility, modulation, and signaling in cell-adhesion. *Cell*, 69(1):11–25, April 1992.
- [71] K. IKUTA and I. L. WEISSMAN. Evidence that hematopoietic stem-cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(4):1502–1506, 1992.
- [72] J. Ishizawa, S. Kuninaka, E. Sugihara, H. Naoe, Y. Kobayashi, T. Chiyoda, A. Ueki, K. Araki, K. Yamamura, Y. Matsuzaki, H. Nakajima, Y. Ikeda, S. Okamoto, and H. Saya. The cell cycle regulator *cdh1* controls the pool sizes of hematopoietic stem cells and mature lineage progenitors by protecting from genotoxic stress. *Cancer Science*, 102(5):967–974, 2011.
- [73] H. Iwasaki, C. Somoza, H. Shigematsu, E. A. Duprez, J. Iwasaki-Arai, S. Mizuno, Y. Arinobu, K. Geary, P. Zhang, T. Dayaram, M. L. Fenyus, S. Elf, S. Chan, P. Kastner, C. S. Huettner, R. Murray, D. G. Tenen, and K. Akashi. Distinctive and indispensable roles of *pu.1* in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood*, 106(5):1590–1600, 2005.
- [74] Viktor Janzen, Randolph Forkert, Heather E. Fleming, Yoriko Saito, Michael T. Waring, David M. Dombkowski, Tao Cheng, Ronald A. DePinho, Norman E. Sharpless, and David T. Scadden. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor *p16(ink4a)*. *Nature*, 443(7110):421–426, September 2006.
- [75] G. R. JOHNSON and M. A. S. MOORE. Role of stem-cell migration in initiation of mouse fetal liver hematopoiesis. *Nature*, 258(5537):726–728, 1975.
- [76] F. V. JOTEREAU and N. M. LEDOUARIN. Developmental relationship between osteocytes and osteoclasts - study using quail-chick nuclear marker in endochondral ossification. *Developmental Biology*, 63(2):253–265, 1978.
- [77] U. B. Keller, J. B. Old, F. C. Dorsey, J. A. Nilsson, L. Nilsson, K. H. MacLean, L. Chung, C. Y. Yang, C. Spruck, K. Boyd, S. I. Reed, and J. L. Cleveland. *Myc* targets *cks1* to provoke the suppression of *p27(kip1)*, proliferation and lymphomagenesis. *Embo Journal*, 26(10):2562–2574, 2007.

- [78] S. Kitajima, Y. Kudo, I. Ogawa, T. Bashir, M. Kitagawa, M. Miyauchi, M. Pagano, and T. Takata. Role of cks1 overexpression in oral squamous cell carcinomas - cooperation with skp2 in promoting p27 degradation. *American Journal of Pathology*, 165(6):2147–2155, 2004.
- [79] H. Kiyokawa, R. D. Kineman, K. O. ManovaTodorova, V. C. Soares, E. S. Hoffman, M. Ono, D. Khanam, A. C. Hayday, L. A. Frohman, and A. Koff. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(kip1). *Cell*, 85(5):721–732, 1996.
- [80] M. Kondo, I. L. Weissman, and K. Akashi. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91(5):661–672, 1997.
- [81] A. Krishnan, S. A. Nair, and M. R. Pillai. Loss of cks1 homeostasis deregulates cell division cycle. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(1-2):154–164, 2010.
- [82] H. Kurata, G. C. Mancini, G. Alespeiti, A. R. Migliaccio, and G. Migliaccio. Stem cell factor induces proliferation and differentiation of fetal progenitor cells in the mouse. *British Journal of Haematology*, 101(4):676–687, 1998.
- [83] A. Y. Lai and M. Kondo. T and b lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars In Immunology*, 20(4):207–212, 2008.
- [84] C. V. Laiosa, M. Stadtfeld, and T. Graf. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annual Review of Immunology*, 24:705–738, 2006.
- [85] Y. S. Lan, Y. Y. Zhang, J. H. Wang, C. H. Lin, M. M. Ittmann, and F. Wang. Aberrant expression of cks1 and cks2 contributes to prostate tumorigenesis by promoting proliferation and inhibiting programmed cell death. *International Journal of Cancer*, 123(3):543–551, 2008.
- [86] M. D. Larreaa, F. Hong, S. A. Wander, T. G. da Silva, D. Helfman, D. Lanigan, J. A. Smith, and J. M. Slingerland. Rsk1 drives p27(kip1) phosphorylation at t198 to promote rhoa inhibition and increase cell motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23):9268–9273, 2009.
- [87] Jinhwa Lee and Sung Soo Kim. The function of p27 kip1 during tumor development. *Exp Mol Med*, 41(11):765–71, 2009.
- [88] R. J. Leguit and J. G. van den Tweel. The pathology of bone marrow failure. *Histopathology*, 57(5):655–670, 2010.
- [89] E. M. Levine, J. Close, M. Fero, A. Ostrovsky, and T. A. Reh. p27(kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. *Developmental Biology*, 219(2):299–314, 2000.

- [90] M. Loda, B. Cukor, S. W. Tam, P. Lavin, M. Fiorentino, G. F. Draetta, J. M. Jessup, and M. Pagano. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Medicine*, 3(2):231–234, 1997.
- [91] M. J. LOHKA, M. K. HAYES, and J. L. MALLER. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(9):3009–3013, 1988.
- [92] N. P. Malek, H. Sundberg, S. McGrew, K. Nakayama, T. R. Kyriakidis, and J. M. Roberts. A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27(kip1) in g1 and s phase. *Nature*, 413(6853):323–327, 2001.
- [93] M. Malumbres and M. Barbacid. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(3):222–231, 2001.
- [94] M. Malumbres and M. Barbacid. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends In Biochemical Sciences*, 30(11):630–641, 2005.
- [95] J. C. W. Marsh, S. E. Ball, J. Cavenagh, P. Darbyshire, I. Dokal, E. C. Gordon-Smith, J. Keidan, A. Laurie, A. Martin, J. Mercieca, S. B. Killick, R. Stewart, J. A. L. Yin, and British Comm Stand Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *British Journal of Haematology*, 147(1):43–70, 2009.
- [96] H. S. Martinsson-Ahlzen, V. Liberal, B. Grunenfelder, S. R. Chaves, C. H. Spruck, and S. I. Reed. Cyclin-dependent kinase-associated proteins cks1 and cks2 are essential during early embryogenesis and for cell cycle progression in somatic cells. *Molecular and Cellular Biology*, 28(18):5698–5709, 2008.
- [97] T. Masuda, H. Inoue, K. Nishida, H. Sonoda, Y. Yoshikawa, Y. Kakeji, T. Utsunomiya, and M. Mori. Cyclin-dependent kinase 1 gene expression is associated with poor prognosis in gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 9(15):5693–5698, 2003.
- [98] Akinobu Matsumoto, Shoichiro Takeishi, Tomoharu Kanie, Etsuo Susaki, Ichiro Onoyama, Yuki Tateishi, Keiko Nakayama, and Keiichi I. Nakayama. p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 9(3):262–271, September 2011.
- [99] S. MATSUOKA, M. C. EDWARDS, C. BAI, S. PARKER, P. M. ZHANG, A. BALDINI, J. W. HARPER, and S. J. ELLEDGE. P57(kip2), a structurally distinct member of the p21(cip1) cdk inhibitor family, is a candidate tumor-suppressor gene. *Genes & Development*, 9(6):650–662, 1995.

- [100] P. Melotti and B. Calabretta. The transcription factors *c-myb* and *gata-2* act independently in the regulation of normal hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11):5313–5318, 1996.
- [101] M. D. Mendenhall and A. E. Hodge. Regulation of *cdc28* cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4):1191–+, 1998.
- [102] D. Metcalf. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: The case for extrinsic regulation. *Blood*, 92(2):345–348, 1998.
- [103] H. K. A. Mikkola and S. H. Orkin. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*, 133(19):3733–3744, 2006.
- [104] A. Mishra, S. K. Godavarthi, and N. R. Jana. *Ube3a/e6-ap* regulates cell proliferation by promoting proteasomal degradation of *p27*. *Neurobiology of Disease*, 36(1):26–34, 2009.
- [105] M. A. S. MOORE and D. METCALF. Ontogeny of haemopoietic system - yolk sac origin of in-vivo and in-vitro colony forming cells in developing mouse embryo. *British Journal of Haematology*, 18(3):279–&, 1970. Achtung: Kein Paper online, Staatsbibliothek!
- [106] M. C. Morris, P. Kaiser, S. Rudyak, C. Baskerville, M. H. Watson, and S. I. Reed. *Cks1*-dependent proteasome recruitment and activation of *cdc20* transcription in budding yeast. *Nature*, 423(6943):1009–1013, 2003.
- [107] S. J. Morrison, A. M. Wandycz, H. D. Hemmati, D. E. Wright, and I. L. Weissman. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*, 124(10):1929–1939, 1997.
- [108] C. E. Muller-Sieburg, R. H. Cho, M. Thoman, B. Adkins, and H. B. Sieburg. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood*, 100(4):1302–1309, 2002.
- [109] R. S. Muraoka, A. E. G. Lenferink, B. Law, E. Hamilton, D. M. Brantley, L. R. Roebuck, and C. L. Arteaga. *ErbB2/neu*-induced, cyclin *d1*-dependent transformation is accelerated in *p27*-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in *p27*-null cells. *Molecular and Cellular Biology*, 22(7):2204–2219, 2002.
- [110] K. Nakayama, N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Hori, D. Y. Loh, and K. Nakayama. Mice lacking *p27(kip1)* display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, 85(5):707–720, 1996.

- [111] K. Nakayama, H. Nagahama, Y. A. Minamishima, S. Miyake, N. Ishida, S. Hatakeyama, M. Kitagawa, S. Iemura, T. Natsume, and K. I. Nakayama. Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Developmental Cell*, 6(5):661–672, 2004.
- [112] K. I. Nakayama and K. Nakayama. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5):369–381, 2006.
- [113] C. Nerlov and T. Graf. Pu.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes & Development*, 12(15):2403–2412, 1998.
- [114] J. R. Nevins. Toward an understanding of the functional complexity of the e2f and retinoblastoma families. *Cell Growth & Differentiation*, 9(8):585–593, 1998.
- [115] Y. C. Nie, Y. C. Han, and Y. R. Zou. Cxcr4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 205(4):777–783, 2008.
- [116] V. Nikolova, S. Graf, E. Pietschmann, S. Kratzat, M. Kroger, L. Quintanilla-Fend, C. Peschel, R. Oostendorp, and U. Keller. Cks1 controls the hematopoietic stem/progenitor cell compartment by regulating proliferation and apoptosis. *Onkologie*, 33:218–218, 2010.
- [117] C. NORBURY and P. NURSE. Animal-cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry*, 61:441–470, 1992.
- [118] Makio Ogawa. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, Volume 81, Issue 11:pp. 2844–2853, 1993.
- [119] J. B. Old, S. Kratzat, A. Hoellein, S. Graf, J. A. Nilsson, L. Nilsson, K. I. Nakayama, C. Peschel, J. L. Cleveland, and U. B. Keller. Skp2 directs myc-mediated suppression of p27(kip1) yet has modest effects on myc-driven lymphomagenesis. *Molecular Cancer Research*, 8(3):353–362, 2010.
- [120] S. H. Orkin. Development of the hematopoietic system. *Current Opinion In Genetics & Development*, 6(5):597–602, 1996.
- [121] S. H. Orkin. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Reviews Genetics*, 1(1):57–64, 2000.
- [122] S. H. Orkin and L. I. Zon. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132(4):631–644, 2008.
- [123] M. Osawa, K. Nakamura, N. Nishi, N. Takahashi, Y. Tokuomoto, H. Inoue, and H. Nakauchi. In vivo self-renewal of c-kit(+) sca-1(+) lin(low/-) hemopoietic stem cells. *Journal Of Immunology*, 156(9):3207–3214, 1996.

- [124] M. PAGANO, S. W. TAM, A. M. THEODORAS, P. BEERROMERO, G. DELSAL, V. CHAU, P. R. YEW, G. F. DRAETTA, and M. ROLFE. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*, 269(5224):682–685, 1995.
- [125] A. B. PARDEE. G1 events and regulation of cell-proliferation. *Science*, 246(4930):603–608, 1989.
- [126] E. Passegue, A. J. Wagers, S. Giuriato, W. C. Anderson, and I. L. Weissman. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *Journal of Experimental Medicine*, 202(11):1599–1611, 2005.
- [127] M. Peters, A. M. Muller, and S. Rose-John. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: Direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood*, 92(10):3495–3504, 1998.
- [128] J. Pines. Cell cycle: Reaching for a role for the cks proteins. *Current Biology*, 6(11):1399–1402, 1996.
- [129] K. POLYAK, J. Y. KATO, M. J. SOLOMON, C. J. SHERR, J. MASSAGUE, J. M. ROBERTS, and A. KOFF. P27(kip1), a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth-factor-beta and contact inhibition to cell-cycle arrest. *Genes & Development*, 8(1):9–22, 1994.
- [130] K. POLYAK, M. H. LEE, H. ERDJUMENTBROMAGE, A. KOFF, J. M. ROBERTS, P. TEMPST, and J. MASSAGUE. Cloning of p27(kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78(1):59–66, 1994.
- [131] H. E. RICHARDSON, C. S. STUELAND, J. THOMAS, P. RUSSELL, and S. I. REED. Human cdnas encoding homologs of the small p34cdc28/cdc2-associated protein of *saccharomyces-cerevisiae* and *schizosaccharomyces-pombe*. *Genes & Development*, 4(8):1332–1344, 1990.
- [132] R. A. RIFKIND, D. CHUI, and H. EPLER. An ultrastructural study of early morphogenetic events during establishment of fetal hepatic erythropoiesis. *Journal of Cell Biology*, 40(2):343–&, 1969.
- [133] A. B. ROBERTS, M. A. ANZANO, L. M. WAKEFIELD, N. S. ROCHE, D. F. STERN, and M. B. SPORN. Type-beta transforming growth-factor - a bifunctional regulator of cellular growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(1):119–123, 1985.
- [134] Sonia Rodriguez, Lin Wang, Christen Mumaw, Edward F. Srour, Cristina Lo Celso, Kei-ichi Nakayama, and Nadia Carlesso. The *skp2* e3 ligase regulates basal homeostasis and stress-induced regeneration of hscs. *Blood*, 117(24):6509–6519, June 2011.

- [135] Michael Rosu-Myles, Barbara J. Taylor, and Linda Wolff. Loss of the tumor suppressor p15^{ink4b} enhances myeloid progenitor formation from common myeloid progenitors. *Experimental Hematology*, 35(3):394–406, March 2007.
- [136] K. Rother, Y. Y. Li, K. Tschop, R. Kirschner, G. A. Muller, J. Mossner, and K. Engeland. Expression of cyclin-dependent kinase subunit 1 (cks1) is regulated during the cell cycle by a cde/chr tandem element and is downregulated by p53 but not by p63 or p73. *Cell Cycle*, 6(7):853–862, 2007.
- [137] A. A. Russo, P. D. Jeffrey, A. K. Patten, J. Massague, and N. P. Pavletich. Crystal structure of the p27(kip1) cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin a cdk2 complex. *Nature*, 382(6589):325–331, 1996.
- [138] R. SCHOFIELD. Relationship between spleen colony-forming cell and hematopoietic stem-cell - hypothesis. *Blood Cells*, 4(1-2):7–25, 1978. Achtung, kein paper, Stabi!
- [139] M. SERRANO, G. J. HANNON, and D. BEACH. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific-inhibition of cyclin-d/cdk4. *Nature*, 366(6456):704–707, 1993.
- [140] F. Shalaby, J. Ho, W. L. Stanford, K. D. Fischer, A. C. Schuh, L. Schwartz, A. Bernstein, and J. Rossant. A requirement for flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*, 89(6):981–990, 1997.
- [141] M. Shapira, O. Ben-Izhak, S. Linn, B. Futerman, I. Minkov, and D. D. Hershko. The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits skp2 and cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer*, 103(7):1336–1346, 2005.
- [142] R. J. Sheaff, M. Groudine, M. Gordon, J. M. Roberts, and B. E. Clurman. Cyclin e-cdk2 is a regulator of p27(kip1). *Genes & Development*, 11(11):1464–1478, 1997.
- [143] C. J. SHERR. Mammalian g(1)-cyclins. *Cell*, 73(6):1059–1065, 1993.
- [144] C. J. Sherr. The pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Research*, 60(14):3689–3695, 2000.
- [145] C. J. Sherr and J. M. Roberts. Cdk inhibitors: positive and negative regulators of g(1)-phase progression. *Genes & Development*, 13(12):1501–1512, 1999.
- [146] C. J. Sherr and J. M. Roberts. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes & Development*, 18(22):2699–2711, 2004.
- [147] M. H. Shin, N. Mavila, W. H. Wang, S. V. Alvarez, M. C. Hall, and O. M. Andrisani. Time-dependent activation of phox2a by the cyclic amp pathway modulates onset and duration of p27(kip1) transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 29(18):4878–4890, 2009.

- [148] J. A. Shizuru, R. S. Negrin, and I. L. Weissman. Hematopoietic stem and progenitor cells: Clinical and preclinical regeneration of the hemato-lymphoid system. *Annual Review Of Medicine*, 56:509–538, 2005.
- [149] P. Sicinski, S. Zacharek, and C. Kim. Duality of p27(kip1) function in tumorigenesis. *Genes & Development*, 21(14):1703–1706, 2007.
- [150] J. W. SINGER, A. KEATING, J. CUTTNER, A. M. GOWN, R. JACOBSON, P. D. KILLEN, J. W. MOOHR, V. NAJFELD, J. POWELL, J. SANDERS, G. E. STRIKER, and P. J. FIALKOW. Evidence for a stem-cell common to hematopoiesis and its invitro microenvironment - studies of patients with clonal hematopoietic neoplasia. *Leukemia Research*, 8(4):535–545, 1984.
- [151] J. Slingerland and M. Pagano. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 183(1):10–17, 2000.
- [152] M. Slotky, M. Shapira, O. Ben-Izhak, S. Linn, B. Futerman, M. Tsalic, and D. D. Hershko. The expression of the ubiquitin ligase subunit cks1 in human breast cancer. *Breast Cancer Research*, 7(5):R737–R744, 2005.
- [153] Ines Soeiro, Azim Mohamedali, Hanna M. Romanska, Nicholas C. Lea, Emma S. Child, Janet Glassford, Stephen J. Orr, Claudia Roberts, Kikkeri N. Naresh, El-Nasir Lalani, David J. Mann, Roger J. Watson, N. Shaun B. Thomas, and Eric W. . F. Lam. p27(kip1) and p130 cooperate to regulate hematopoietic cell proliferation in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 26(16):6170–6184, August 2006.
- [154] G. J. SPANGRUDE, S. HEIMFELD, and I. L. WEISSMAN. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem-cells. *Science*, 241(4861):58–62, 1988.
- [155] C. Spruck, H. Strohmaier, M. Watson, A. P. L. Smith, A. Ryan, W. Krek, and S. I. Reed. A cdk-independent function of mammalian cks1: Targeting of scf/skp2 to the cdk inhibitor p27(kip1). *Molecular Cell*, 7(3):639–650, 2001.
- [156] T. Taniguchi, H. Endo, N. Chikatsu, K. Uchimaru, S. Asano, T. Fujita, T. Nakahata, and T. Motokura. Expression of p21(cip1/waf1/sdi1) and p27(kip1) cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood*, 93(12):4167–4178, 1999.
- [157] D. Tedesco, J. Lukas, and S. I. Reed. The prb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase scf/skp2. *Genes & Development*, 16(22):2946–2957, 2002.
- [158] D. G. Tenen. Disruption of differentiation in human cancer: Aml shows the way. *Nature Reviews Cancer*, 3(2):89–101, 2003.

- [159] Benjamin J. Thompson, Vladimir Jankovic, Jie Gao, Silvia Buonamici, Alan Vest, Jennifer May Lee, Jiri Zavadil, Stephen D. Nimer, and Iannis Aifantis. Control of hematopoietic stem cell quiescence by the e3 ubiquitin ligase fbw7. *Journal of Experimental Medicine*, 205(6):1395–1408, June 2008.
- [160] J. E. TILL and E. A. MCCULLOCH. Direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*, 14(2):213–&, 1961.
- [161] J. E. TILL, L. SIMINOVITCH, and E. A. MCCULLOCH. Stochastic model of stem cell proliferation based on growth of spleen colony-forming cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 51(1):29–&, 1964.
- [162] W. Tong, H. Kiyokawa, T. J. Soos, M. S. Park, V. C. Soares, K. Manova, J. W. Pollard, and A. Koff. The absence of p27kip1, an inhibitor of g1 cyclin-dependent kinases, uncouples differentiation and growth arrest during the granulosa-> luteal transition. *Cell Growth & Differentiation*, 9(9):787–794, 1998.
- [163] H. TOYOSHIMA and T. HUNTER. P27, a novel inhibitor of g1 cyclin-cdk protein-kinase activity, is related to p21. *Cell*, 78(1):67–74, 1994.
- [164] Y. H. S. Tsai, H. C. Chang, L. Y. Chuang, and W. C. Hung. Rna silencing of cks1 induced g2/m arrest and apoptosis in human lung cancer cells. *Iubmb Life*, 57(8):583–589, 2005.
- [165] J. Tsihlias, L. Kapusta, and J. Slingerland. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annual Review of Medicine*, 50:401–+, 1999.
- [166] N. UCHIDA and I. L. WEISSMAN. Searching for hematopoietic stem-cells - evidence that thy-1.1(lo) lin- sca-1+ cells are the only stem-cells in c57bl/ka-thy-1.1 bone-marrow. *Journal Of Experimental Medicine*, 175(1):175–184, 1992.
- [167] T. Ueda, K. Tsuji, H. Yoshino, Y. Ebihara, H. Yagasaki, H. Hisakawa, T. Mitsui, A. Manabe, R. Tanaka, K. Kobayashi, M. Ito, K. Yasukawa, and T. Nakahata. Expansion of human nod/scid-repopulating cells by stem cell factor, flk2/flt3 ligand, thrombopoietin, il-6, and soluble il-6 receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 105(7):1013–1021, 2000.
- [168] Ronald Van Os, Leonie M. Kamminga, Albertina Ausema, Leonid V. Bystrykh, Deanna P. Draijer, Kyrjon Van Pelt, Bert Dontje, and Gerald De Haan. A limited role for p21(cip1/waf1) in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning. *Stem Cells*, 25(4):836–843, 2007.

- [169] C. VERFAILLIE, R. HURLEY, R. BHATIA, and J. B. MCCARTHY. Role of bone-marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Critical Reviews In Oncology/hematology*, 16(3):201–224, 1994.
- [170] J. Vervoorts and B. Luscher. Post-translational regulation of the tumor suppressor p27(kip1). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(20):3255–3264, 2008.
- [171] Andrea Viale, Francesca De Franco, Annette Orleth, Valeria Cambiagli, Virginia Giuliani, Daniela Bossi, Chiara Ronchini, Simona Ronzoni, Ivan Muradore, Silvia Monestiroli, Alberto Gobbi, Myriam Alcalay, Saverio Minucci, and Pier Giuseppe Pelicci. Cell-cycle restriction limits dna damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature*, 457(7225):51–U52, January 2009.
- [172] H. Wada, K. Masuda, R. Satoh, K. Kakugawa, T. Ikawa, Y. Katsura, and H. Kawamoto. Adult t-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature*, 452(7188):768–U10, 2008.
- [173] C. R. Walkley, M. L. Fero, W. M. Chien, L. E. Purton, and G. A. McArthur. Negative cell-cycle regulators cooperatively control self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nature Cell Biology*, 7(2):172–U90, February 2005.
- [174] I. L. Weissman. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100(1):157–168, 2000.
- [175] I. L. Weissman, D. J. Anderson, and F. Gage. Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17:387–403, 2001.
- [176] L. Westbrook, M. Manuvakhova, F. G. Kern, N. R. Estes, H. N. Ramanaathan, and J. V. Thottassery. Cks1 regulates cdk1 expression: A novel role during mitotic entry in breast cancer cells. *Cancer Research*, 67(23):11393–11401, 2007.
- [177] A. Wilson, M. J. Murphy, T. Oskarsson, K. Kaloulis, M. D. Bettess, G. M. Oser, A. C. Pasche, C. Knabenhans, H. R. MacDonald, and A. Trumpp. c-myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & Development*, 18(22):2747–2763, November 2004.
- [178] A. Wilson and A. Trumpp. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 6(2):93–106, 2006.
- [179] R. Wolthuis, L. Clay-Farrace, W. van Zon, M. Yekezare, L. Koop, J. Ogink, R. Medema, and J. Pines. Cdc20 and cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of cyclin a. *Molecular Cell*, 30(3):290–302, 2008.

- [180] A. M. WU, J. E. TILL, SIMINOVI.L, and MCCULLOC.EA. Cytological study of capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *Journal Of Cellular Physiology*, 69(2):177–&, 1967.
- [181] Y. XIONG, G. J. HANNON, H. ZHANG, D. CASSO, R. KOBAYASHI, and D. BEACH. P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366(6456):701–704, 1993.
- [182] Satoshi Yamazaki, Atsushi Iwama, Shin-ihiko Takayanagi, Yohei Morita, Koji Eto, Hideo Ema, and Hiromitsu Nakauchi. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *Embo Journal*, 25(15):3515–3523, August 2006.
- [183] N. YANAI, Y. MATSUYA, and M. OBINATA. Spleen stromal cell-lines selectively support erythroid colony formation. *Blood*, 74(7):2391–2397, 1989.
- [184] Y. YOSHIDA. Hypothesis - apoptosis may be the mechanism responsible for the premature intramedullary cell-death in the myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 7(1):144–146, 1993.
- [185] Hiroki Yoshihara, Fumio Arai, Kentaro Hosokawa, Tetsuya Hagiwara, Keiyo Takubo, Yuka Nakamura, Yumiko Gomei, Hiroko Iwasaki, Sahoko Matsuo-ka, Kana Miyamoto, Hiroshi Miyazaki, Takao Takahashi, and Toshio Suda. Thrombopoietin/mpl signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*, 1(6):685–697, December 2007.
- [186] H. Yu, Y. Z. Yuan, H. M. Shen, and T. Cheng. Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18(ink4c) and p21(cip1/waf1) in opposite manners. *Blood*, 107(3):1200–1206, 2006.
- [187] V. P. C. C. Yu, C. Baskerville, B. Grunenfelder, and S. I. Reed. A kinase-independent function short article of cks1 and cdk1 in regulation of transcription. *Molecular Cell*, 17(1):145–151, 2005.
- [188] Y. Z. Yuan, H. M. Shen, D. S. Franklin, D. T. Scadden, and T. Cheng. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early g1-phase inhibitor, p18(ink4c). *Nature Cell Biology*, 6(5):436–442, 2004.
- [189] P. W. Zandstra, E. Conneally, J. M. Piret, and C. J. Eaves. Ontogeny-associated changes in the cytokine responses of primitive human haemopoietic cells. *British Journal of Haematology*, 101(4):770–778, 1998.
- [190] J. Zhang, M. Socolovsky, A. W. Gross, and H. F. Lodish. Role of ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis

- by a flow cytometry-based novel culture system. *Blood*, 102(12):3938–3946, 2003.
- [191] P. Zhang, G. Behre, J. Pan, A. Iwama, N. Wara-Aswapati, H. S. Radomska, P. E. Auron, D. G. Tenen, and Z. J. Sun. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: Gata proteins repress pu.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15):8705–8710, 1999.
- [192] P. Zhang, J. Iwasaki-Arai, H. Iwasaki, M. L. Fenyus, T. Dayaram, B. M. Owens, H. Shigematsu, E. Levantini, C. S. Huettner, J. A. Lekstrom-Himes, K. Akashi, and D. G. Tenen. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor c/ebp alpha. *Immunity*, 21(6):853–863, 2004.
- [193] P. Zhang, X. B. Zhang, A. Iwama, C. N. Yu, K. A. Smith, B. U. Mueller, S. Narravula, B. E. Torbett, S. H. Orkin, and D. G. Tenen. Pu.1 inhibits gata-1 function and erythroid differentiation by blocking gata-1 dna binding. *Blood*, 96(8):2641–2648, 2000.
- [194] J. Zhu and S. G. Emerson. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*, 21(21):3295–3313, 2002.
- [195] L. I. ZON. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood*, 86(8):2876–2891, 1995.
- [196] Peng Zou, Hiroki Yoshihara, Kentaro Hosokawa, Ikue Tai, Kaori Shinmyozu, Fujiko Tsukahara, Yoshiro Maru, Keiko Nakayama, Keiichi I. Nakayama, and Toshio Suda. p57(kip2) and p27(kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with hsc70. *Cell Stem Cell*, 9(3):247–261, September 2011.

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
AGM-Region	Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region
APC/C	Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome
ATP	Adenosintriphosphat
BFU-E	Erythroide Kolonie (Burst-Forming Unit Erythroid)
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
CAK	Cdk-aktivierende Kinase
Cdc	Cell Division Control Protein
Cdk	Cyklin-abhängige Kinase
CFC-Assay	Colony Forming Cell Assay
CFU-GM	Granulozyten/Makrophagen Kolonie (Granulocytic-Monocytic Colony-Forming Unit)
CFU-GEMM	Gemischte Kolonie (Granulocytic-Erythroid-Megakaryocytic/Monocytic Colony-Forming Unit)
CFU-S	Colony-Forming Unit Spleen
CKI	Cdk Inhibitor
Cks	Cyklin-dependend Kinase Subunit
CLP	Lymphatischer Vorläufer (Common Lymphoid Progenitor)
CMP	myeloischer Vorläufer (Common Myeloid Progenitor)
CUL4A	Cullin 4A
DDB1	Damaged-DNA Binding Protein
DKO	Doppelknockout
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
E	Embryonaltag
ECM	Extrazellulärmatrix

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
FACS	Fluorescence activated cell sorting Durchflusszytometrie
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszin Isozyanat
FL	Flt3-Ligand
FN	Fibronectin
GATA	GATA Binding Proteine
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor)
GMP	Granulozyten Makrophagen Vorläufer (Granulocyte Macrophage Progenitor)
HBSS	Hank's buffered salt solution
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethansulfonsäure
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KIS	Kinase-Interacting Stathmin
KO	Knockout
KPC	Kip1 Ubiquitination-Promoting Complexe
LSK	Lin ⁻ Sca1(Ly6A/E) ⁺ und c-Kit(CD117) ⁺
LT-HSC	Langzeit hämatopoetische Stammzelle (Long Term Hematopoietic Stem Cell)
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (Makrophage-Colony Stimulating Factor)
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MEP	Megakaryozyten Erythrozyten Vorläufer (Megakaryocyte Erythrocyte Progenitor)
MIRK	Minibrain-Related Kinase
MPF	Mitose-Promoting Factor
MPP	multipotenter Vorläufer(Multipotent Progenitor)
mSCF	Stem Cell Factor Mouse
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodide
Rb	Retinoblastom
RSK1	Ribosomale S6 Kinase 1
RT-PCR	Real Time PCR

SCF	Skp1-Cullin-F-Box
SCL	Stem Cell Leukemia hematopoietic transcription factor
SEM	Standard Error of the Mean
Skp	S-Phase Kinase-associated Protein
ST-HSC	Kurzzeit hämatopoetische Stammzelle (Short Term Hematopoietic Stem Cell)
TGF- β 1	Transforming Growth Factor Beta 1
Thr	Threonin
TPO	Thrombopoietin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

Publikationen

V. Nikolova, S. Graf, **E. Pietschmann**, S. Kratzat, M. Kroger, L. Quintanilla-Fend, C. Peschel, R. Oostendorp, & U. Keller. Cks1 controls the hematopoietic stem/progenitor cell compartment by regulating proliferation and apoptosis. *Onkologie*, 33:218-218, 2010.

S. Kratzat, V. Nikolova, C. Miething, A. Hoellein, S. Schoeffmann, O. Gorka, **E. Pietschmann**, A.-L. Illert, J. Ruland, C. Peschel, J. Nilsson, J. Duyster, & U. Keller. Cks1 is required for tumor cell proliferation but not sufficient to induce hematopoietic malignancies. *PloS one*, 2012.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die mir bei der Verwirklichung dieses Projekts zur Seite gestanden haben. Ein besonderer Dank geht natürlich an PD Dr. Ulrich Keller für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die Betreuung und Geduld bis zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Peschel, Direktor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar, für die Unterstützung meiner Dissertation bedanken. Nachfolgend möchte ich ein großes Dankeschön an das gesamte Team des Hämatologischen Labors in der Trogerstraße 32 aussprechen. Vor allem danke ich meinen betreuenden Biologinnen Dr. Steffi Graf und Dr. Monika Kröger, ohne deren Hilfsbereitschaft und Einsatz im Labor diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für die gute Zusammenarbeit danke ich allen Mitgliedern der AG Keller, insbesondere natürlich Viktoriya Nikolova sowie Christian Fritz, Dr. Jürgen Den Hollander und Sabine Stritzke. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei Susanne Kratzat, die mir über die letzten Jahre sehr wichtig geworden ist und die mich jederzeit mental und fachlich unterstützt hat.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. Robert Oostendorp für seine große Hilfe bei der Auswertung meiner Daten sowie die Einführung in das komplexe Thema der hämatopoetischen Stammzellen bedanken. An dieser Stelle bedanke ich mich bei der gesamten AG Oostendorp, insbesondere bei Dr. Jonas Renström und Dr. Rouzannna Istvanffy, für die jederzeit unkomplizierte und nette Hilfe bei der Laborarbeit.

Meinen Eltern, Elisabeth und Reinhard Pietschmann, danke ich für die Ermöglichung meiner Ausbildung, den verlässlichen Rückhalt und die uneingeschränkte Unterstützung bei der Verwirklichung all meiner Vorstellungen. Bei meinen Geschwistern Ute und Dagmar Pietschmann möchte ich mich vor allem für die vielen Gespräche bedanken, die meine Motivation häufig wieder aufgebaut haben. Ein

Dankeschön geht auch an Simone Tillo für die Hilfe bei der graphischen Darstellung. Zuletzt danke ich meinem Freund Moritz Hauf von ganzem Herzen für die Geduld, das Vertrauen und die zahllosen investierten Arbeitsstunden, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte fertigstellen können.