



Fakultät für Medizin
Hämatologische Forschung

Die Untersuchung von Kathepsin K (*Ctsk*) negativen Stammzellen in der Hämatopoese

Miriam Lena Kehr

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. dr R. A. J. Oostendorp
2. Prof. Dr. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am 25.05.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin der Technischen Universität München am 12.04.2017 angenommen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Literaturübersicht und Fragestellung | 1 |
| 1.1 Einführung..... | 1 |
| 1.2 Frühe Hämatopoese bei Mäusen | 2 |
| 1.3 Adulte Hämatopoese..... | 3 |
| 1.4 Die hämatopoetische Hierarchie | 4 |
| 1.5 Kathepsin K..... | 6 |
| 1.6 Die Knochenmarknische | 8 |
| 1.7 Osteoklasten (OCLs)..... | 9 |
| 1.8 Osteoblasten (OBLs) und Osteozyten..... | 10 |
| 1.9 Die Nischenhypothese | 10 |
| 1.10 Nischensignale..... | 12 |
| 1.11 Wnt-Signalwege und die Nische..... | 13 |
| 1.12 Der kanonische Wnt-Signalweg | 15 |
| 1.13 Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg..... | 15 |
| 1.14 Fragestellung und Aufbau der Doktorarbeit..... | 16 |
| | |
| 2. Material | 18 |
| 2.1 Allgemeines Material..... | 18 |
| 2.2 Technische Instrumente | 19 |
| 2.3 Biologische und chemische Reagenzien..... | 20 |
| 2.4 Medien und Puffer | 21 |
| 2.5 Fertigsätze für Laborstandardmethoden | 22 |
| 2.6 Antikörper..... | 22 |
| 2.7 Mausstämme..... | 25 |
| 2.8 Software | 26 |

3. Methoden 27

| | |
|--|----|
| 3.1 Mäuse | 27 |
| 3.2 Primäre Transplantation | 27 |
| 3.3 Sekundäre Transplantation | 30 |
| 3.4 Bestimmung von Zellzahlen | 31 |
| 3.5 Euthanasierung von Mäusen..... | 32 |
| 3.6 Mausgewebe | 32 |
| 3.7 Durchflusszytometrie..... | 33 |
| 3.8 Färbungen für die Durchflusszytometrie..... | 34 |
| 3.9 Lineagetrennung und Sort für Immunfluoreszenz..... | 35 |
| 3.10 Färbungen für die Immunfluoreszenz..... | 35 |
| 3.11 Auswertungen und Statistik..... | 36 |

4. Ergebnisse..... 38

| | |
|---|----|
| 4.1 Einführung in die Ergebnisse der primären Transplantation..... | 38 |
| 4.2 Analyse der Gesamtzahlen der primären Transplantation | 41 |
| 4.3 Analyse der Knochenmarkzellen der primären Transplantation | 42 |
| 4.3.1 Stammzellfärbung des Knochenmarks..... | 42 |
| 4.3.2 Reifezellfärbung des Knochenmarks..... | 45 |
| 4.4 Analyse der Milzzellen der primären Transplantation..... | 47 |
| 4.4.1 Stammzellfärbung der Milz..... | 47 |
| 4.4.2 Reifezellfärbung der Milz..... | 48 |
| 4.5 Analyse der peripheren Blutzellen der primären Transplantation..... | 48 |
| 4.6 Einführung in die Sortergebnisse | 50 |
| 4.7 Sortergebnisse der sekundären Transplantation..... | 50 |
| 4.8 Einführung in die Ergebnisse der sekundären Transplantation | 51 |
| 4.9 Analyse der Gesamtzahlen der sekundären Transplantation | 52 |
| 4.10 Analyse der Knochenmarkzellen der sekundären Transplantation..... | 53 |
| 4.10.1 Stammzellfärbung des Knochenmarks..... | 53 |
| 4.10.2 Reifezellfärbung des Knochenmarks..... | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 4.11 Analyse der Milzzellen der sekundären Transplantation | 55 |
| 4.11.1 Stammzellfärbung der Milz..... | 55 |
| 4.11.2 Reifezellfärbung der Milz..... | 56 |
| 4.12 Analyse der peripheren Blutzellen der sekundären Transplantation | 56 |
| 4.13 Einführung in die Blutabnahmen | 57 |
| 4.13.1 Blutabnahmen der primären Transplantation | 57 |
| 4.13.2 Blutabnahmen der sekundären Transplantation | 59 |
| 4.14 Sortergebnisse der Immunzytologiefärbung | 60 |
| 4.15 Einführung in die Ergebnisse der Immunzytologie | 62 |
| 5. Diskussion..... | 67 |
| 5.1 Diskussion zur primären Transplantation | 67 |
| 5.2 Diskussion zur sekundären Transplantation..... | 69 |
| 5.3 Diskussion zur Immunzytologie | 70 |
| 5.3.1 Einleitung zur Immunzytologie | 70 |
| 5.3.2 Diskussion der signifikanten Immunzytologieergebnisse | 71 |
| 5.4 Schlussfolgerung und Ausblick..... | 75 |
| 6. Zusammenfassung | 77 |
| 7. Summary..... | 78 |
| 8. Quellen..... | 79 |
| 8.1 Papers..... | 79 |
| 8.2 Dissertationen | 93 |

| | |
|---------------------------------|-----------|
| 9. Anhang..... | 94 |
| 9.1 Abbildungsverzeichnis..... | 94 |
| 9.2 Tabellenverzeichnis..... | 95 |
| 9.3 Abkürzungsverzeichnis | 96 |
| | |
| 10. Danksagung | 99 |

1. Literaturübersicht und Fragestellung

1.1 Einführung

Hämatopoetische Erkrankungen kommen bei Menschen in allen Altersgruppen vor. Die Erkrankungen sind vielfältig und reichen von einfacher Mangelernährung über myeloproliferative und myelodysplastische Erkrankungen bis hin zu Leukämien. Im Jahr 2012 erkrankten laut Robert-Koch-Institut in Deutschland etwa 13.500 Menschen neu an Leukämie. Es werden vereinfacht vier Leukämieformen unterschieden: CLL, CML, ALL und AML. Bei Erwachsenen sind die häufigsten Leukämien die CLL und die AML; bei Kindern findet man vor allem die ALL und die AML. Während Leukämien bei Erwachsenen auf Platz 10 (Frauen) und 11 (Männer) der häufigsten Krebsarten zu finden sind (RKI 2011), sind Leukämien bei Kindern die häufigsten malignen Erkrankungen (RKI 2004-2013).

Die aktuelle Forschung der Hämatologie und Onkologie beschäftigt sich mit der Frage der Krebsentstehung und mit Therapieansätzen. Dafür werden Gene, Proteine und Signalkaskaden identifiziert, von denen man annimmt, dass sie für eine balancierte Hämatopoese wichtig sind. Um zu untersuchen, ob die vermuteten Proteine tatsächlich eine Rolle in der Hämatopoese spielen, ist es ein gängiges Verfahren, ihre Gene auszuschalten, um deren Funktion an Hand von Knockoutmäusen (KO-Mäusen) zu untersuchen. Wird hierbei eine veränderte Hämatopoese in KO-Mäusen festgestellt, kann dies potentiell die Grundlage weiterer Forschung sein. Durch die gezielte Modulierung des entsprechenden Gens erhofft man sich auf lange Sicht, dass Krankheiten positiv beeinflusst und neue medikamentöse Therapieansätze etabliert werden können.

Aus den oben genannten Gründen beschäftige ich mich in meiner Doktorarbeit mit dem Kathespin K (*Ctsk*)-Knockoutmausmodell.

1.2 Frühe Hämatopoese bei Mäusen

Während der embryonalen und fetalen Entwicklung der Mäuse gibt es unterschiedliche Orte der Blutzellentstehung. Die ersten hämatopoetischen Zellen sind am Tag 7,5 der Embryogenese (E7,5) im Dottersack zu finden (Miura Y und Wilt FH. 1970; Palis J et al. 2001). Hier sind die Zellen in Blutinseln organisiert, in denen auch schon Blutgefäße zu finden sind. Die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs=hematopoietic stem cells), die Zellen, die in der Lage sind, das ganze Blutsystem zu regenerieren, gibt es zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht. Die sogenannte „definitive HSC“ existiert erst nach dem Anfang der Zirkulation (E8.0) in dem embryonalen Körper. Sie ist in Zellklustern der dorsalen Aorta der Aorto-Gonado-Mesonephron (AGM)-Region am E10,5 zu finden (Smith RA und Glomski CA. 1982; Medvinsky A et al. 1996). Diese Zellen sind schon in der Lage sich in alle Blutzellen weiterzuentwickeln. Man findet aber auch noch HSC-Aktivität in den Umbilikalarterien und der Plazenta (Gekas C et al. 2005). Nach E11,5 wird die Leber zum Ort der Hämatopoese (Morrison SJ et al. 1995). In dieser Zeit werden viele Vorläuferzellen gebildet, um möglichst schnell eine ausreichende Zahl an Blutzellen vorrätig zu haben (Kumaravelu P et al. 2002; Mikkola HK et al. 2006). Nach Tag 16,5 (E16,5) wird die Hämatopoese vom Knochenmark (BM) übernommen (Coşkun S et al. 2014), in dem bei adulten Tieren zeitlebens die Blutzellentwicklung stattfindet. Einige Wochen nach der Geburt ändert sich das Verhalten der HSCs nochmal. Bis dahin war ihre Aufgabe vor allem ihre rasche Vermehrung und jetzt ändert sich ihr proliferatives Programm. Sie gehen in eine ruhigere, nur bedingt proliferative Phase über (Bowie MB et al. 2007; Kim I et al. 2007). Fortan haben diese adulten hämatopoetischen Stammzellen die Aufgabe, die Blutzellen konstant zu halten und auf stressbedingte Veränderungen, wie etwa Blutungen und Entzündungen, reagieren zu können (Wilson A et al. 2008). Im folgenden Abschnitt wird nun näher auf die adulte Hämatopoese eingegangen.

1.3 Adulte Hämatopoese

Im adulten Knochenmark sind es die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, aus denen sich alle Blutzelltypen entwickeln. Diese Stammzellen sind zur Selbsterneuerung fähig und können so ein Leben lang die Blutzellen bereitstellen. Aus den pluripotenten Stammzellen entstehen auf der einen Seite die lymphatische Zellreihe und auf der anderen die myeloische (Luc S et al. 2008; Woolthuis CM und Park CJ. 2016). In der klassischen Hierarchie gehen aus der lymphatischen Reihe die B-Zellen und die T-Zellen hervor, die den spezifischen, oder auch erworbenen Teil der Immunabwehr bilden. Eine Besonderheit der lymphozytären Reihe sind die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Man geht heute davon aus, dass sie und die T-Lymphozyten eine gemeinsame Vorläuferzelle haben (Moretta L et al. 2002). Sie sind die Schnittstelle des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Moretta A et al. 2008). Eine ihrer Aufgaben ist es, Virus befallene Zellen und Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren (Moretta A et al. 2008). Sie produzieren Zytokine und zytotoxische Stoffe. Was nun bevorzugt produziert wird, hängt vom Aufenthaltsort dieser Zellen ab (Moretta A et al. 2008). B-Zellen können sich zu Antikörper produzierenden Plasmazellen differenzieren und stellen auf diese Weise die humorale Immunantwort dar. T-Zellen hingegen bilden den zellulären Anteil der Immunabwehr. Die Entstehung der lymphozytären Reihe beginnt im Knochenmark. Die B-Vorläuferzellen wandern anschließend in die sekundären lymphatischen Organe wie Milz, Tonsillen und Lymphknoten aus, um sich zu differenzieren und aktiviert zu werden. T-Vorläuferzellen kommen auch aus den Stammzellen des Knochenmarks, wandern aber früh aus dem Knochenmark in den Thymus aus. T-Lymphozyten reifen im Thymus und differenzieren sich dort zu Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen oder Suppressorzellen.

Aus der myeloischen Reihe gehen unter anderem die basophilen und die eosinophilen Granulozyten hervor. Die neutrophilen Granulozyten und Monozyten haben noch eine gemeinsame Vorläuferzelle, teilen sich dann aber in ihrem Entwicklungsweg. Die Granulozyten und Monozyten sind Teil der unspezifischen, angeborenen zellulären Immunantwort. Die humorale unspezifische Immunantwort besteht aus Interleukinen, dem Komplementsystem und anderen Zytokinen.

Außerdem gehen aus der myeloischen Reihe noch die Erythrozyten und die Thrombozyten hervor. Erythrozyten sind der Blutbestandteil, der für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich ist. Erythrozyten sind mit Hämoglobin gefüllt, dem roten Blutfarbstoff, der durch seine vier Hämgruppen pro Hämoglobin vier Sauerstoffmoleküle transportieren kann. Außerdem ist das Hämoglobin in der Lage Protonen und Kohlenstoffdioxid zu binden. Thrombozyten sind wichtig für die primäre Hämostase.

Neuerdings hat man feststellen können, dass sich HSCs unter Stressbedingungen auch ohne Zellteilung in Thrombozyten bildende Megakaryozyten differenzieren können (Notta F et al. 2016). Es stellt sich somit die Frage, ob Megakaryozyten, die klassisch der myeloischen Zellreihe zugerechnet werden, vielleicht eine eigenständige Zellreihe darstellen.

1.4 Die hämatopoetische Hierarchie

Der hämatopoetische Stammbaum hat eine streng hierarchische Struktur (siehe S. 5, Abb. 1). Experimentell werden die unterschiedlichen Zelltypen in dieser Hierarchie durch Oberflächenantigene, die sie entweder besitzen oder nicht besitzen, charakterisiert (siehe S. 6, Abb. 2). Am Anfang stehen die pluripotenten Stammzellen, die zur unlimitierten Selbsterneuerung fähig sind. Aus ihnen entwickeln sich Zellen, die in ihrer Selbsterneuerung eingeschränkt sind. Allgemein fehlen Stammzellen die Oberflächenmoleküle, die für reife Zellen spezifisch sind: GR-1, CD11b, CD3, TER-119 und B220. Sie werden als Lineage negativ (Lin^-) bezeichnet. Die frühen Stammzellen sind außer Lin^- auch noch SCA1^+ und KIT^+ , sogenannte LSKs. LSKs unterteilt man in Langzeit repopulierende Stammzellen (LRSZ), die außer den LSK-Eigenschaften auch noch CD34^- und CD150^+ sind und in Kurzzeit repopulierende Stammzellen (KRSZ), die CD34^+ sind. Letztere zeigen keine Selbsterneuerung mehr und teilen sich häufig, wohingegen erstere lange ruhen und sich selten teilen. Aus den Kurzzeit repopulierenden Zellen entwickeln sich die multipotenten Progenitorzellen (MPPs), aus welchen die CLPs (common lymphoid progenitors) und die MPs (mean myeloid progenitors)

hervorgehen (siehe S. 6, Abb. 2). Die LRSZ können die Hämatopoese ein ganzes Leben lang aufrecht erhalten, während die KRSZ dies nur für einige Wochen können (Weissman IL und Anderson DJ et al. 2001).

Eine Besonderheit des hämopoetischen Systems ist, dass Erkenntnisse über Oberflächenantigene es ermöglichen, einzelne repopulierende HSCs zu isolieren. Einzelzelltransplantationen haben daraufhin gezeigt, dass die Gesamtpopulation der HSCs in unterschiedlichen Klassen aufgebaut sein könnte, in denen die HSCs mit der Fähigkeit zur uneingeschränkten Selbsterneuerung eher die Regeneration der myeloischen Reihe bevorzugen (Kent DG et al. 2009; Wilson NK et al. 2015). Außerdem konnte man in solchen Einzelzelltransplantationen feststellen, dass ältere HSCs langsam die Fähigkeit zur Regeneration der lymphatischen Reihe verlieren (Benz C et al. 2012).

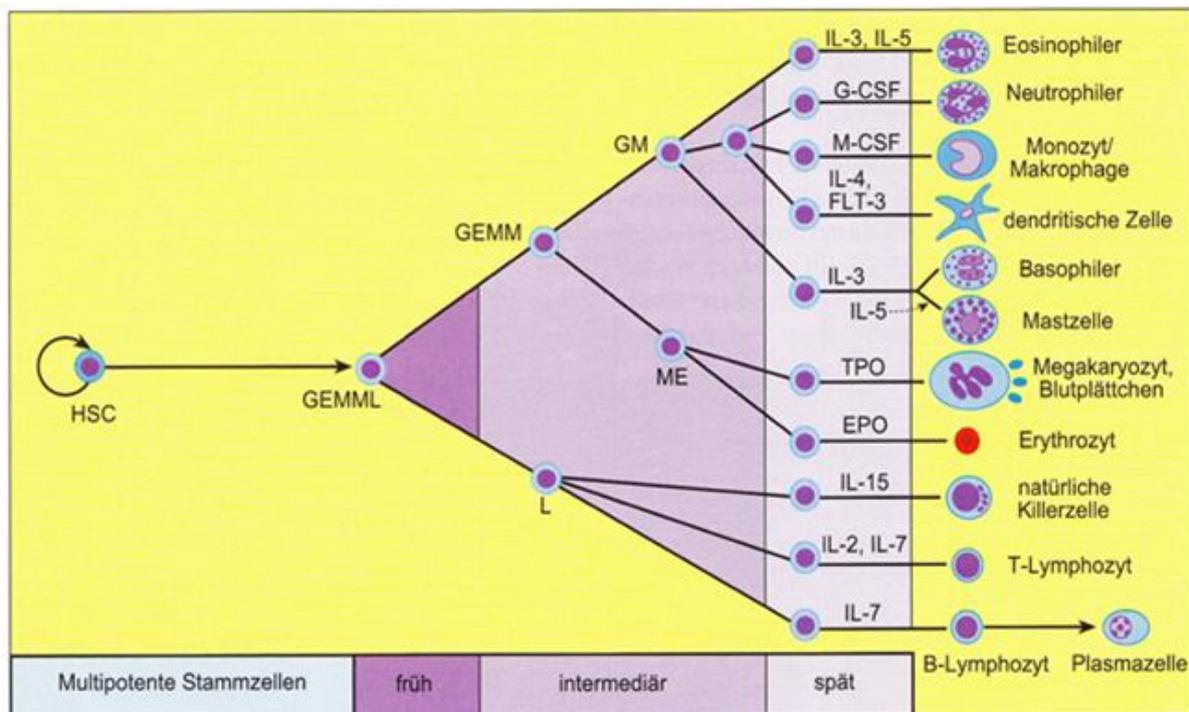


Abbildung 1: Hämatopoese. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch.

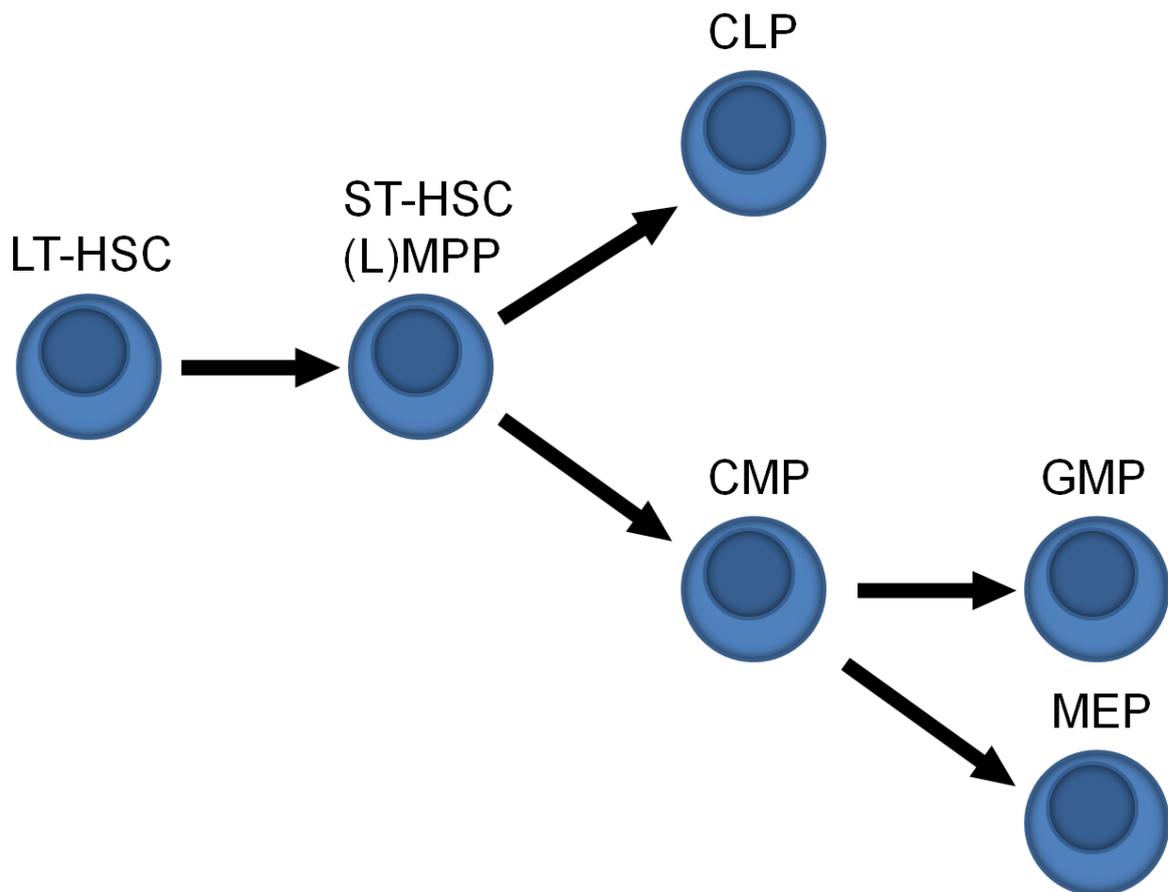


Abbildung 2: Hierarchie der HSCs (hematopoietic stem cells). LT: long-term. ST: short-term. MPP: multipotent progenitor. LMPP: lympho-myeloid potential progenitor. CMP: common myeloid progenitor. CLP: common lymphoid progenitor. GMP: granulocyte-monocyte progenitor. MEP: megakaryocyte-erythrocyte progenitor. Modell entsprechend Renström (Renström et al. 2010).

1.5 Kathepsin K

Kathepsin K ist eine lysosomale Cysteinprotease, die Kollagen, Elastin und Gelatine spalten kann (Bossard MJ et al. 1996). Sie zeigt eine knochenspezifische Abbaureaktion (Garnero P et al. 1998), denn sie wird sowohl von Osteoklasten (OCLs) als auch von Osteoblasten (OBLs) exprimiert (Mandelin J et al. 2006). Bei den Osteoklasten, die der myeloischen Reihe der Hämatopoese zugehören, ist diese Protease an der zerrauten Seite (Faltensaum) in der aktiv knochenresorbierenden Zone zu finden (Littlewood-Evans A et al. 1997). Die Zellen des Knochens sind jedoch nicht die einzigen, die dieses Enzym exprimieren. Es

wurde unter anderem in Fibroblasten der Dermis gefunden (Quintanilla-Dieck MJ et al. 2009). Außerdem wird es im Lungengewebe exprimiert und für die Atemwegsentwicklung gebraucht (Zhang D et al. 2011). Kathepsin K trägt zu dem Erhalt einer strukturellen Integrität der Atemwege bei (Zhang D et al. 2011). Auch in Adenokarzinomen der Lunge konnte eine Kathepsin K-Expression gezeigt werden (Rapa I et al. 2006).

Kathepsin K hat ein relativ breites Substratspektrum, kann aber besonders effektiv Leu-Arg- und Phe-Arg-Motive spalten (Bossard MJ et al. 1996). Diese sind in Kollagen I, dem Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix, enthalten (Duong LT et al. 2015). Es aktiviert die Matrixmetalloprotease 9 (Christensen J et al. 2015), die auch als Gelatinase B bekannt ist. Dieses Enzym baut bevorzugt Kollagen IV und V ab, ist aber auch am Abbau anderer Bestandteile der Extrazellulärmatrix beteiligt (Niyibizi C et al. 1994). Weiterhin ist interessant, dass Kathepsin K das Chemokin CXCL 12 verdaut, das wesentlich daran beteiligt ist, hämatopoetische Stammzellen in der Knochenmarknische zu halten (Staudt ND et al. 2012).

Das Gen für das Enzym CTSK liegt bei Mäusen auf Chromosom 3 (Rantakokko J et al. 1999) und besteht aus 8 Exons (Arman A et al. 2014). Es kodiert für ein 46kDa großes Protein. Schaltet man das *Ctsk*-Gen bei Mäusen aus, so spricht man von *Ctsk*^{-/-}-Mäusen. Sie zeigen einen osteopetrotischen Phänotyp (Li CY et al. 2006; Saftig P et al. 1998). Die Osteopetrose beschreibt ein Krankheitsbild, bei dem Knochengewebe ungerichtet angehäuft wird, die Mikroarchitektur des Knochens gestört und die Stabilität der Knochen herabgesetzt ist. Die Folge ist ein stark gesteigertes Frakturrisiko (Li CY et al. 2006). Betroffene Mäuse zeigen eine erhöhte Osteoklastenzahl (Jacome-Galarza C et al. 2014). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass bei *Ctsk*^{-/-}-Mäusen die Zahl der HSCs in der Milz erhöht ist, bei gleichzeitiger Verringerung im Knochenmark (Jacome-Galarza C et al. 2014).

Bei Menschen ist das *CTSK*-Gen auf Chromosom 1 zu finden, welches, wenn defekt, zur sogenannten Pycnodysostosis führt (Gelb BD et al. 1996). Hierbei sehen die Osteoklasten phänotypisch normal aus, sind aber nicht in der Lage, entstehendes Kollagen abzubauen, welches folglich kumuliert. Bei diesen Menschen ist, wie auch bei entsprechenden Mäusen, eine erhöhte Osteoklastenzahl zu finden.

Es konnte herausgefunden werden, dass eine erhöhte Kathepsin K-Aktivität bei Erkrankungen wie Arthritis, Atherosklerose und Tumormetastasierung vorliegen kann (Novinec M und Lenarčič B. 2013). Außerdem wurde dieses Enzym als möglicher parakriner Faktor der Brusttumorgenese beschrieben (Kleer CG et al. 2008).

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich mit neuen Behandlungsmethoden der Osteoporose. Hier zeigen Kathepsin K-Antagonisten, wie Odanacatib großes Potential (Duong LT. 2015). Außerdem könnten CTSK-Inhibitoren möglicherweise eine Rolle bei der Verhinderung der Tumorprogression bei Brustkrebs spielen (Kleer CG et al. 2008). Des Weiteren verspricht Odanacatib einen wichtigen und neuen Ansatz für die Therapie von Knochenmetastasen darzustellen (Jensen AB et al. 2010).

Eine Übersicht der Aktivierungs- und Inhibierungswege von Kathepsin K (zusammengefasst von Verbovsek U et al. 2015) lässt erkennen: RANKL, der Receptor Activator of NFκB Ligand, ist ein Tumornekrosefaktor, dessen Bindung an den RANK-Rezeptor zu einer erhöhten Expression von CTSK, durch Stimulation des *CTSK*-Promotors über AP-1, das activator Protein 1, führt (Pang M et al. 2007). Er ist wesentlich am Knochenumsatz beteiligt und ist wichtig für dessen Regulierung. RANKL wird von Osteoblasten sezerniert und bindet auf den monozytären Osteoklastenvorläufern an RANK. Auf diese Weise führt er zur Zelldifferenzierung der Osteoklasten. Das RANK/RANKL-System ist für ein gesundes Gleichgewicht im Knochen mitverantwortlich. Auch Östrogene supprimieren RANKL (Nirupama K et al. 2000). RANK/RANKL-Signalisierung wird durch Osteoprotegerin antagonisiert, welches ein löslicher RANKL-Rezeptor ist (Boyce BF et al. 2007). Die Regulation der RANK/RANKL/OPG-Achse und deren pharmakologische Beeinflussung ist ein wichtiger Weg in der Therapie von Krebsarten mit Knochenbefall.

1.6 Die Knochenmarknische

Das Knochenmark besteht aus retikulärem Bindegewebe, kapillarähnlichen Sinusoiden und retikulären Fibroblasten, auch Stromazellen genannt, aber auch aus Nerven- und Gliazellen (s. u. Abb. 3). Ist das Knochenmark hämatopoetisch aktiv,

spricht man vom roten Knochenmark. Dieses wird durch die Einlagerung von Fett in Stromazellen zu gelbem Knochenmark, in dem keine Hämatopoese mehr stattfindet. Neben hämatopoetischen Stammzellen sind im Knochenmark außerdem mesenchymale Stammzellen (MSCs) zu finden. Weiterhin ist auch der Aufbau der Blutversorgung interessant. Die Knochenmarksinus sind dünnwandige Gefäße mit unregelmäßig perforiertem Endothel, damit reife Blutzellen gut in den Blutkreislauf gelangen können.

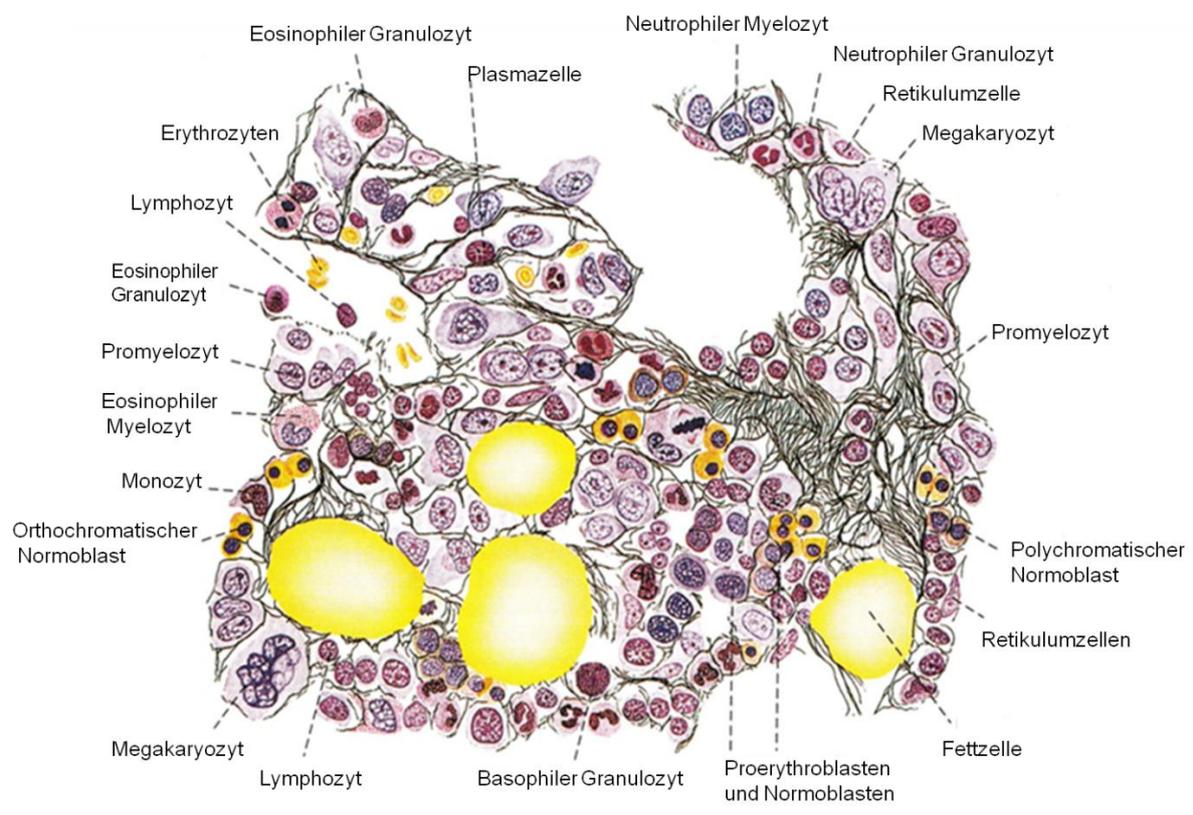


Abbildung 3: Schemadarstellung des roten Knochenmarks. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch.

1.7 Osteoklasten (OCLs)

Osteoklasten stammen aus der myeloischen Reihe von hämatopoetischen Stammzellen (Jacome-Galazar C et al. 2014). OCLs differenzieren sich zu Knochenmarkmakrophagen über Pre-OCLs und reife OCLs durch PDGF- und

RANKL-Stimulation (Suda T et al. 1999). Die Aufgabe ausgereifter, aktiver Osteoklasten ist die Resorption verkalkter Knochenmatrix, weshalb sie wichtig für das Knochenremodelling sind. Osteoklasten sezernieren Protonen, um die Knochenmatrix abzubauen. Das saure Milieu unterstützt auch die Arbeit lysosomaler Enzyme, wie zum Beispiel das von ihnen sezernierte Kathepsin K (Duong LT et al. 2015).

1.8 Osteoblasten (OBLs) und Osteozyten

Osteoblasten sind die knochenbildenden Zellen. Sie produzieren das initial nicht verkalkte Osteoid, welches im Wesentlichen aus Kollagenen und Proteoglykanen besteht. Weiterhin sezernieren sie Osteopontin, PDGF und RANKL. Letzteres wurde oben bereits als Kathepsin K-Aktivator beschrieben (siehe S. 8, Kapitel 1.5). Im Gegensatz zu Osteoklasten haben Osteoblasten ihren Ursprung nicht in hämatopoetischen, sondern in mesenchymalen Zellen, sezernieren aber ebenfalls Kathepsin K.

Osteozyten sind terminal ausdifferenzierte Osteoblasten, die sich in der Knochenmatrix eingemauert haben. Sie stehen über Fortsätze mit anderen Osteozyten in Kontakt. Ihre wesentliche Aufgabe ist es, als Mechanosensoren zu fungieren. Osteozyten sind die zahlreichsten Zellen (>90%) im Knochen (Bonewald LF et al. 2011).

1.9 Die Nischenhypothese

Nach jahrelanger Forschung an milzkoloniebildenden Zellen (CFU-S) prägte Schofield den Begriff der Nische als anatomische Struktur, in der hämatopoetische Stammzellen zu finden sind (Schofield R. 1978). Die endochondrale Ossifikation führt zum Erscheinen der HSCs im Knochenmark und wird für die Nischenentstehung benötigt (Chan CK et al. 2009). In Adulten prägt die Nische als Mikroumgebung die

Verhaltensweisen der hämatopoetischen Stammzellen. Sie ist wichtig für den Erhalt der HSCs, kontrolliert aber gleichzeitig auch deren Antwort auf Stresssituationen, Selbsterneuerung, Differenzierung und Proliferation (Morrison SJ et al. 2008).

Es werden in der aktuellen Forschung verschiedene Arten der hämatopoetischen Stammzellnische unterschieden. Zum einen gibt es die endostale Nische, in der HSCs an der Schnittstelle zwischen Knochen und Knochenmark zu finden sind, dort also, wo aktiver Knochenumbau stattfindet (Kollet O et al. 2007). Interessant ist, dass die hämatopoetischen Stammzellen Kalziumsensoren haben, die dazu beitragen, sie an der endostalen Oberfläche zu halten, wo die Ca^{2+} -Konzentration wegen der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität hoch ist (Adams GB et al. 2006). Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Knochenauf- und -umbau an der Regulierung und Bildung der hämatopoetischen Stammzellnische beteiligt ist (Mansour A et al. 2012). Zum anderen gibt es auch die vaskuläre Nische, in der HSCs nahe der Sinusoidalgefäße lokalisiert sind (Nilsson SK et al. 2001; Calvi LM et al. 2003; Visnjic D et al. 2004). Dort sind sie einer Reihe von Faktoren und Signalen ausgesetzt, die den Erhalt der hämatopoetischen Stammzellen in der Nische fördern (Ding L et al. 2012). Im Moment ist noch unklar, ob die beiden anatomischen Strukturen tatsächlich räumlich getrennt sind und somit wirklich zwei unterschiedliche Nischen bilden.

Osteoklasten spielen eine kritische Rolle in der Entstehung der Knochenmarknische (Mansour A et al. 2012). Auch die Osteoblasten haben eine regulatorische Komponente in der hämatopoetischen Stammzellnische inne (Calvi LM et al. 2003). Wenn die Osteoklastenaktivität herabgesetzt ist, ist auch die Stammzellnische beeinflusst und die Mesenchymzellen haben eine verminderte Kapazität hämatopoetische Progenitorzellen anzulocken. Dadurch wird das Homing der Stammzellen beeinträchtigt. Des Weiteren stehen Osteoklasten in Verbindung mit der Stammzellmobilisation (Lévesque JP et al. 2010).

1.10 Nischensignale

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen sind in ihrer Nische zahlreichen Signalen und Faktoren ausgesetzt, die allesamt die Hämatopoese in einer gesunden Balance halten (siehe S. 13, Abb. 4). Von Interesse, weil Kathepsin K es abbaut, ist das sezernierte Chemokin CXCL 12, auch stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) genannt. Er wird von Stromazellen ausgeschüttet und leitet die hämatopoetischen Stammzellen in ihre Nische (Tzeng YS et al. 2011). CXCL 12 und sein Rezeptor CXCR 4 garantieren den Erhalt eines ruhenden HSC-Pools (Sugiyama T et al. 2006). Außerdem ist dieser Faktor der wichtigste Anlockungsstoff für viele hämatopoetische Vorläuferzellen, die HSCs eingeschlossen (Dar A et al. 2006). Mesenchymale Zellen sezernieren des Weiteren Pleiotrophin (Istvanffy R et al. 2011). Letzteres sorgt für den Erhalt der hämatopoetischen Stammzellen und spielt eine Rolle in der Homöostase der Blutzellentstehung. Außerdem ist es wichtig für die Balance zwischen myeloischer und lymphatischer Blutzellregeneration (Istvanffy R et al. 2011). Auch der kanonische und nicht-kanonische Wnt-Signalweg sind für eine normale Hämatopoese vonnöten (Kirstetter P et al. 2006). Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg sorgt dafür, dass ruhende HSCs in der Nische bleiben (Sugimura R et al. 2012). Ein weiterer wichtiger Faktor für die Homöostase der Blutzellregulation ist das von Osteoblasten produzierte Osteopontin, welches ein Negativregulator für die HSC-Proliferation ist (Nilsson SK et al. 2005). Neueste Erkenntnisse auf dem Gebiet zeigen, dass auch das sympathische Nervensystem einen durch TGF-vermittelten regulatorischen Einfluss auf die hämatopoetische Stammzellnische hat (Katayama Y et al. 2006).

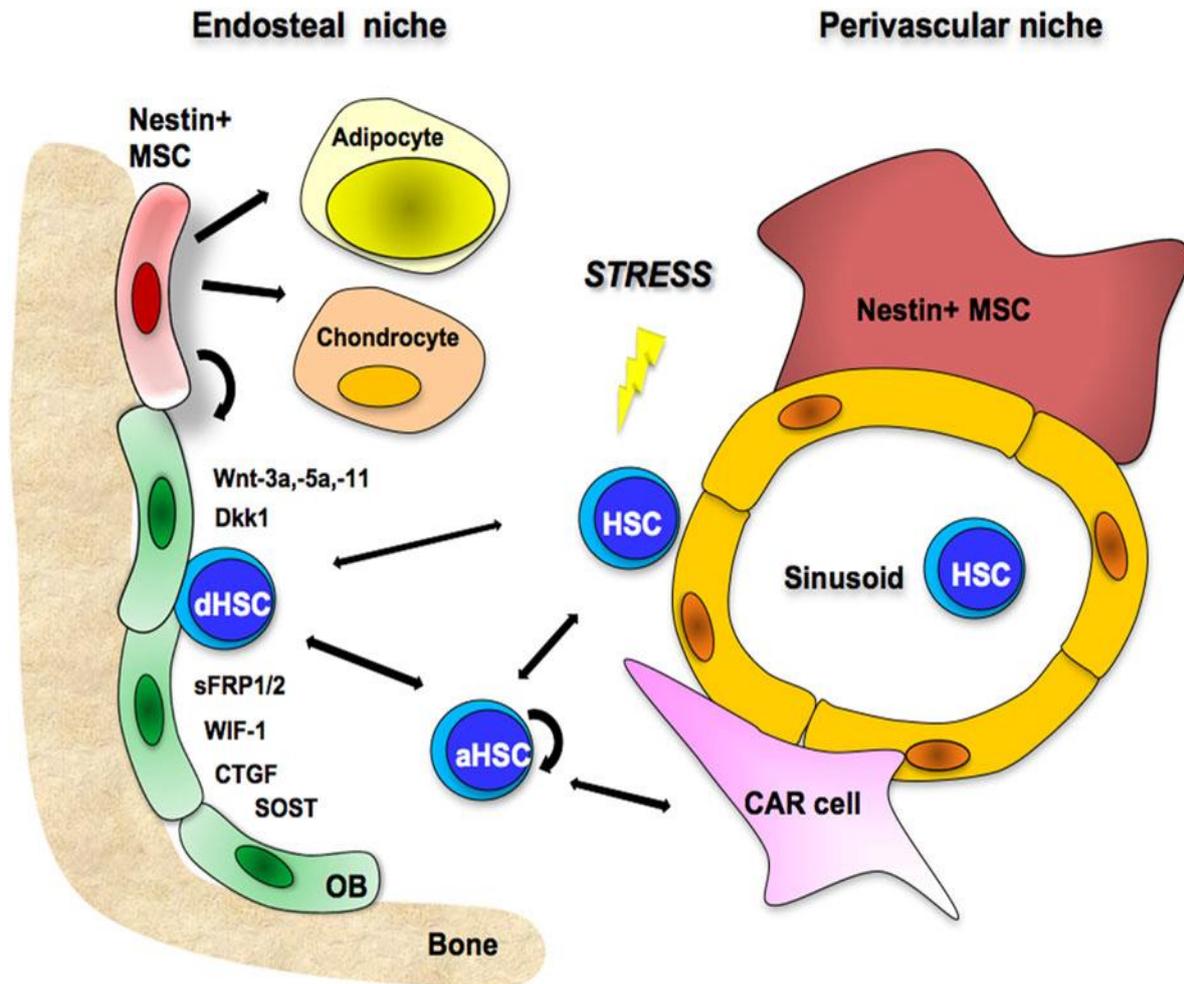


Abbildung 4: Modell der endostalen und vaskulären Nische (Schreck C et al. 2014).

Viele Signalwege und Faktoren, die für den Erhalt der hämatopoetischen Stammzellen wichtig sind, müssen noch erforscht werden. Man kann sich leicht vorstellen, dass, wenn Signalwege oder Faktoren falsch exprimiert werden, das Gleichgewicht in diesem System gestört ist und es folglich zu malignen Entartungen kommen kann.

1.11 Wnt-Signalwege und die Nische

WNTs sind eine große Molekülfamilie, die in einer Bandbreite von unterschiedlichsten Prozessen involviert sind. Bereits in der Embryonalentwicklung spielen sie eine essentielle Rolle. Über einen Rezeptorenkomplex aus Frizzled und Dishevelled an Zielzellen leiten sie Signale nach intrazellulär weiter (Wodarz A und

Nusse R. 1998). In Anbetracht der Tatsache, dass sie außerdem die Funktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren verkörpern (Van Den Berg DJ et al. 1998), ist es nicht verwunderlich, dass ihre Dysregulation zu einer malignen Entartung führen kann.

Wie bereits oben erwähnt (S.13), teilt man den Wnt-Signalweg in einen kanonischen und einen nicht-kanonischen Teil (s. u. Abb. 5). Zentrales Molekül des kanonischen Signalwegs ist Beta-Catenin, von dessen Konzentration die Transkription der Wnt-Zielgene abhängt. Der nicht-kanonische Signalweg ist vielseitiger und kann beispielsweise kalziumabhängig oder -unabhängig verlaufen. Des Weiteren können RHO-GTPasen, MAP-Kinasen oder NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) involviert sein.

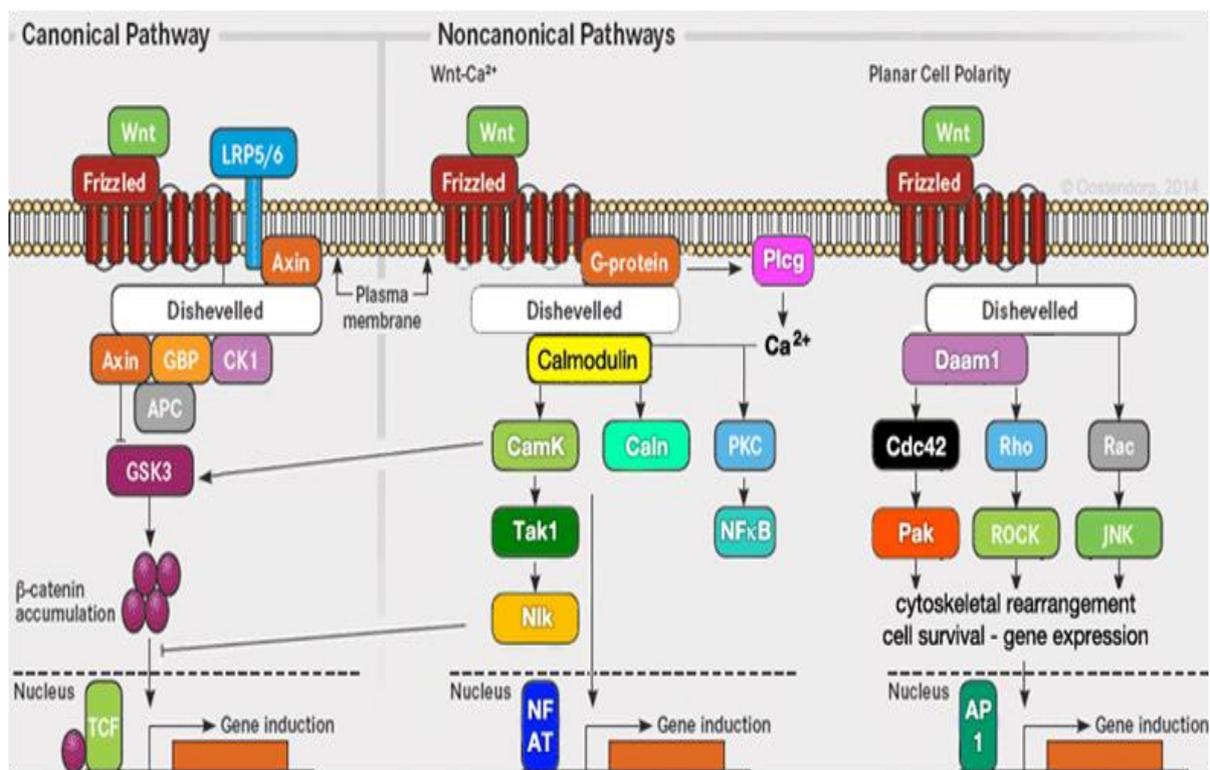


Abbildung 5: Schemadarstellung der Wnt-Signalwege mit bereits bekannten Interaktionspartnern.

1.12 Der kanonische Wnt-Signalweg

WNT 1 und WNT 3A sind die bekanntesten Stimulatoren des kanonischen Signalwegs (Many AM et al. 2014). Im Knochenmark werden beide Moleküle hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen sezerniert. In Abwesenheit von WNTs liegt Beta-Catenin in einem Komplex mit Axin und APC vor. Außerdem ist in diesem Komplex auch noch die GSK-3 beta zu finden, ein Enzym, das, wenn aktiv, Beta-Catenin ständig phosphoryliert, um es für Ubiquitinylierung kenntlich zu machen. Somit sorgt es über Ubiquitin für dessen proteasomalen Abbau (Orford K et al. 1997; Aberle H et al. 1997). Wenn nun WNTs an ihren Rezeptor Frizzled und dessen Korezeptor LRP-5 und LRP-6 binden, wird Dishevelled phosphoryliert. Das zieht nach sich, dass der oben genannte Komplex zerfällt und Beta-Catenin nicht mehr abgebaut wird. Somit steigt die Beta-Catenin-Konzentration in der Zelle. Es gelangt in den Kern und bindet an die TCF/LEF-1-Transkriptionsfaktoren (Eastman Q. 1999). So werden mehrere Wnt-Zielgene, wie beispielweise *MYC* und *Zyklin D1*, vermehrt transkribiert. Diese Moleküle sind positiv an der Zell-Zyklus-Progression von der G1- zu der S-Phase beteiligt, so dass eine der Hauptfunktionen des kanonischen Wnt-Signalwegs das Vorantreiben der Proliferation ist. Zyklin D1 ist ein Protein des Zellzyklus-Kontrollsystems (Sherr CJ et al. 2004). Es bindet an Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) und sorgt, wenn an CDKs gebunden, für einen Eintritt in die S-Phase und damit für Zellteilung.

1.13 Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg

Die Hauptaktivatoren des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs sind WNT 4, WNT 5A und WNT 11. Diese Mitglieder der Wnt-Familie werden hauptsächlich von Osteoblasten und aktivierten hämatopoetischen Zellen exprimiert. Auch sie binden an Frizzled und setzen eine Signalkaskade über das Protein Dishevelled in Gang. Dieser Signalweg ist auch wichtig in der Embryogenese sowie bei Zellteilungen (Veeman MT et al. 2003). Die planare Zellpolarität ist ein Teil des nicht-kanonischen Signalwegs. Sie regelt die asymmetrische Teilung von Zellen sowie die ungleiche

Verteilung von Proteinen in der Zelle (Veeman MT et al. 2003). Ein weiterer Teil des nicht-kanonischen Signalwegs geht über die Phospholipase C, die von G-Proteinen aktiviert wird. Sie sorgt für eine erhöhte Kalziumkonzentration in der Zelle, die zusammen mit Calmodulin die CaMKII aktiviert. Hier teilt sich diese Signalkaskade und aktiviert entweder den NFAT- oder den TAK1/NLK-Weg. Beide Wege führen zu einer Transkriptionsaktivierung. NLK konnte als Negativregulator von Beta-Catenin identifiziert werden (Ishitani T et al. 1999; 2003). Durch Phosphorylierung von TCF/LEF-1 wird Beta-Catenin daran gehindert, eben diese Transkriptionsfaktoren zu binden, wodurch die Transkriptionsrate der zugehörigen Zielgene herabgesetzt wird (Yamada M et al. 2006).

C/EBP α ist ein Transkriptionsfaktor. Er hemmt die CDK2 und CDK4 und sorgt so für einen Wachstumsstopp (Wang H et al. 2001). Auch ist bekannt, dass C/EBP α beispielsweise die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen koordiniert. In diesem Rahmen führt es zu einer vermehrten Differenzierung von MPs zu Granulozyten/Monozyten-Progenitors (GMPs) (Zhang P et al. 2004).

1.14 Fragestellung und Aufbau der Doktorarbeit

Das Labor Oostendorp hat bereits herausgefunden, dass sich eine *Ctsk*-Knockout-Mikroumgebung auf die Hämatopoese auswirkt. Wenn das *Ctsk*-Gen fehlt, verringert sich die Zahl funktionsfähiger HSCs, was mit einer verringerten Repopulation der T- und B-Lymphozyten assoziiert ist.

Da aber CTSK vor allem von myeloischen Osteoklasten exprimiert wird, ist die Frage, die sich also zwangsläufig ergibt, ob die CTSK-Expression der hämatopoetischen Zellen in der Mikroumgebung eine führende Rolle bei der regenerativen Hämatopoese spielen könnte.

Zu diesem Zweck wurde in dieser Doktorarbeit das intrinsische *Ctsk*^{-/-}-Transplantationsmodell untersucht. Das heißt, CTSK wurde hier nicht in den hämatopoetischen Zellen exprimiert. Wie schon erwähnt, hatten vorherige, bisher nicht publizierte, Untersuchungen im Labor Oostendorp bereits das extrinsische

System von *Ctsk*^{-/-}-Empfängermäusen analysiert. Bei letzteren hatte die Empfängerumgebung CTSK nicht exprimiert. Deswegen werde ich in meiner Arbeit vor allem die Regeneration von WT- und *Ctsk*^{-/-}-HSCs untersuchen.

Für eine mechanistische Vertiefung der gewonnenen Erkenntnisse wurden außerdem Proteine des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs untersucht. Meine Arbeit konzentrierte sich auf diesen Signalweg, da schon beobachtet wurde, dass die regenerierten LSKs aus dem extrinsischen *Ctsk*^{-/-}-Transplantationsmodell eine erhöhte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs zeigten. Folglich wurde Gegenstand dieser Arbeit, ob es grundlegende Unterschiede in der Proteinexpression wichtiger Mediatoren des Wnt-Signalwegs zwischen WT- und *Ctsk*^{-/-}-Mäusen gab. Der Aufbau meiner Arbeit wird im Folgenden kurz erläutert.

Für die Untersuchung des intrinsischen *Ctsk*^{-/-}-Modells wurde dreimal primär transplantiert. Das Anwachsen (Engraftment) der transplantierten Zellen wurde durch zweimaliges Bluten der Mäuse beobachtet. Nach 16 - 20 Wochen sind die primär transplantierten Tiere euthanasiert und ihre LSK-Zellen gesortet worden. Diese wurden zusammen mit Knochenmark- und Milzhelferzellen sekundär weitertransplantiert. Hier wurde ebenfalls das Engraftment der transplantierten Zellen durch Bluten beobachtet. Die endgültige Analyse der Mäuse fand nach 16 - 20 Wochen statt.

Zur weiteren Vertiefung meiner Erkenntnisse wurde ferner die Proteinexpression von *Ctsk*^{-/-}- und Wildtypmäusen untersucht. Hierfür wurden ihre Knochenmarkzellen gewonnen und aus diesen LSKs, CLPs und MPs gesortet. Sie wurden im Anschluss mit immunfluoreszierenden Antikörpern angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2. Material

2.1 Allgemeines Material

Tabelle 1: Allgemeines Material

| Produkte | Hersteller |
|--|--|
| Blutlanzetten Supra | Megro, Wesel, DE |
| Einfrierflakon 2ml | Corning, Corning, USA |
| Filter 0,45/30/70/100 µm | BD Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, DE |
| Filterspitzen TipOne® 10/100/200/1000 | Starlab, Hamburg, DE |
| Glasaufsatzfilter, vakuumbetrieben zum Einmalgebrauch, Steritop™ | Millipore, Billerica, USA |
| MACS LS Zellseparationssäulen | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE |
| Monoject®, stumpfe Nadeln | Kendall, Healthcare, Mansfield, USA |
| Nadeln, 100 Sterican®, 27 Gauge | B. Braun Melsungen, Melsungen, DE |
| Pipettierhilfe (Pipetboy) | Integra Biosciences, Fernwald, DE |
| Poly-L-Lysin-beschichtete Glasplättchen | Thermo Fisher Scientific., Waltham, USA |
| Polypropylen Zentrifugenröhrchen 15/50 ml | Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE |
| Röhrchen mit Sicherheitsverschluss für Mikrozentrifuge | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Serologiepipetten 1,5/5/10/25/50 ml | BD Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, DE |
| S-Monovette® | Sarstedt, Nümbrecht, DE |
| Spritzen, U-40 Insulin Omnifix®, 1 ml | B. Braun Melsungen, Melsungen, DE |
| Spritzen mit Nadel, Sub-Q, 1 ml | BD, Franklin Lakes, USA |
| Spritzen Omnifix® zum Einmalgebrauch 3/5/10/20/30 ml | B. Braun Melsungen, Melsungen, DE |

2.2 Technische Instrumente

Tabelle 2: Technische Instrumente

| Instrumente | Namen | Hersteller |
|--|---|---|
| Arbeitsbank (steril) mit Luftabzugshaube | ANTAES 48/72 | BIOHIT, DE |
| Bestrahlungseinheit | Gulmay | Gulmay, Suwanee, USA |
| Blutmessgerät | Counter Scil Vet Abc™ (Animal Blood Counter) | Scil vet academy, Viernheim, DE |
| Durchflusszytometer | CyAn™ ADP LxP8, CyAn™ ADP P9C | Beckman Coulter, Krefeld DE |
| Eismaschine | Seriennummer: 061244 | Ziegra Eismaschinen Isernhagen, DE |
| Fluoreszenzmikroskop | Leica DM RBE | Leica, Wetzlar, DE |
| Linearbeschleuniger | Mevatron KD2 | Siemens, Erlangen, DE |
| Mikroskop | Axiovert 25 | Carl Zeiss, Jena, DE |
| Präzisionswaage | PLJ 2100-2M | Kern & Sohn, Balingen, DE |
| Vortex | IKA® MS1 minishaker | IKA Werke, Staufen im Breisgau, DE |
| Wasserbad | SUB | Grant Instruments, Cambridgeshire, UK |
| Zählkammer | Neubauer-improved | Paul Marienfeld, Lauda Königshofen, DE |
| Zellseparator | QuadroMACS | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE |
| Zellsorter | MoFlo High Speed | Beckman Coulter, Krefeld DE |
| Zentrifuge | Megafuge™ 3.0 RS, Multifuge™ 3S | Heraeus™ Instruments, Hanau, DE |

2.3 Biologische und chemische Reagenzien

Tabelle 3: Biologische und chemische Reagenzien

| Reagenzien | Hersteller |
|---------------------------------------|--|
| Albumin Fraktion V, ≥98%, bovin (BSA) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Borgal® Lösung 24% | Virbac, Bad Oldesloe, DE |
| Ciprofloxacin | Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE |
| DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | SERVA Electrophoresis, Heidelberg, DE |
| Ethanol 99,8% | AppliChem, Darmstadt, DE |
| Fetales Kalbsserum (FCS) | PAA, Cölbe, DE |
| Formalin Lösung 10% | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE |
| HBSS | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| HEPES | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| Isofluran, Forene® 100% | Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE |
| Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) | Life Technologies™, Darmstadt, v |
| Propidium-Iodid (PI) | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| Triton X-100 | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Trypanblau | BD Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, DE |
| TÜRK'sche Lösung | Merck KGaA, Darmstadt, DE |

2.4 Medien und Puffer

Tabelle 4: Handelsübliche Medien und Puffer

| Name | Hersteller |
|----------------------|-----------------------------------|
| ACK Lysepuffer | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| Dulbeccos PBS (DPBS) | PAA, Cölbe, DE |

Tabelle 5: Selbstgemachte Lösungen, Medien und Puffer

| Name | Inhaltsstoffe |
|----------------------------------|---|
| Blockierungspuffer, 30 ml | 27 ml DPBS 3 ml FCS 30 µl Triton-X |
| Einfriermedium (DMSO 11%), 50 ml | 44,5 ml FCS 5,5 ml DMSO |
| FACS Puffer, 500 ml | 500 ml DPBS 2.5 g BSA |
| HF2+ Puffer , 1000 ml | 860 ml deionisiertes Wasser 100 ml HBSS (10x) 20 ml FCS 10 ml HEPES 10 ml Pen/Strep |

2.5 Fertigsätze für Laborstandardmethoden

Tabelle 6: Fertigsätze für Labormethoden

| Name | Hersteller |
|----------------------------|--|
| Lineage cell depletion kit | Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, DE |

2.6 Antikörper

Tabelle 7: Primäre Antikörper für Durchflusszytometrie und Sort

| Antigen | Klon | Fluoreszenzstoff | Volumen/ 1x10 ⁶ Zellen | Hersteller |
|--|----------|------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Biotingebundene Anti-Maus B220 | RA3-6B2 | | 0,2 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| Biotingebundene Anti-Maus CD3e | 145-2C11 | | 0,2 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| Biotingebundene Anti-Maus CD11b | M1/70 | | 0,2 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| Biotingebundene Anti-Maus GR-1 (Ly-6G) | RB6-8C5 | | 0,2 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| Biotingebundene Anti-Maus TER- 119 | TER-119 | | 0,2 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD4 | GK1.5 | PE-Cy5 | 1 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD8a | 53-6.7 | PE-Cy5 | 1 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD11b | M1/70 | APC-eFluor®780 | 1 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |

| | | | | |
|---------------|---------|--|------|---------------------------------------|
| CD34 | RAM34 | FITC | 2 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD45 | 30-F11 | APC-eFluor®780, eFluor®450, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7 | 1 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD45.1 | A20 | PE, FITC, eFluor®450 | 1 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD45.2 | 104 | FITC, PE | 1 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD45r (B220) | RA3-6B2 | PE-Cy7 | 1 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD117 (KIT) | 2B8 | APC-eFluor®780, PE | 3 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| CD127 (IL7-R) | A7R34 | APC | 1 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| GR-1 (Ly-6G) | RB6-8C5 | eFluor®450 | 1 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |
| SCA-1 | D7 | PE-Cy7 | 3 µl | ebioscience, San Diego, CA, USA |

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper für Durchflusszytometrie und Sort

| Produkt | Fluoreszenzstoff | Volumen/ Zellen | 1x10 ⁶ | Hersteller |
|--------------|-------------------------|--------------------|-------------------|---|
| Streptavidin | eFluor®450, PE-Cy5.5 | 0,5 µl | | Life Technologies™, Darmstadt, DE |

Tabelle 9: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz

| Produkt | Spezies | Verdünnung | Hersteller |
|-----------------------------------|---------|------------|---|
| Anti-Beta-Catenin | Hase | 1:50 | Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA |
| Anti-CaMK-II | Hase | 1:100 | Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA |
| Anti-C/EBPα | Hase | 1:50 | Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA |
| Anti-Cyclin-D1 | Hase | 1:25 | Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA |
| Anti-NF-ATc1 | Maus | 1:50 | Santa Cruz, biotechnology Inc., USA |
| Anti-NLK | Hase | 1:50 | Santa Cruz, biotechnology Inc., USA |
| Anti-Phospho- CaMK-II (Thr286) | Hase | 1:100 | Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA |

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

| Produkt | Spezies | Hersteller |
|-----------------------------------|---------|--------------------------------------|
| AlexaFluor®488 | Ziege | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| Anti- AlexaFluor®488 | Hase | Life Technologies™, Darmstadt, DE |
| FITC labeled goat anti rabbit IgG | Ziege | Life Technologies™, Darmstadt, DE |

2.7 Mausstämme

Tabelle 11: Mausstämme

| Name | Hersteller |
|---|--|
| 129 x Ly5.1 (129S2/SvHsd x BL/6/SJL (Ly5.1)) | Zucht im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) |
| BL/6/SJL (Ly5.1) | Taconic Europe, Ry, Denmark |
| C57BL/6.J | Harlan Laboratories, Rossdorf, DE |
| <i>Ctsk</i> ^{-/-} -C57BL/6.J | Zucht im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) |

2.8 Software

Tabelle 12: Software

| Name | Hersteller |
|------------------------------|--------------------------------------|
| Adobe Reader | Adobe Systems, Lehi, UT, USA |
| FlowJo, Version 8.8.3 | FloJo, Ashland, OR, USA |
| Graphpad Prism, Version 5.01 | GraphPad Software, La Jollo, CA, USA |
| ImageJ | Gemeinfreiheit (public domain) |
| Microsoft Office 2007 | Microsoft, Redmond, WA, USA |
| Microsoft Paint | Microsoft, Redmond, WA, USA |

3. Methoden

3.1 Mäuse

Alle Mäuse wurden in Isolierkäfigen im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) unter apathogenen Bedingungen (specific-pathogen-free=SPF) gezüchtet. Die gesamte Mäusezucht richtete sich nach den FELASA-Empfehlungen: <http://www.felasa.eu/recommendations/guidelines/felasa-guidelines-and-recommendations/>.

In diesem Projekt wurde mit dem *Ctsk*^{-/-}-Knockoutstamm (KO-Mäuse) gearbeitet, der auf einem C57BL/6 (Ly 5.2; CD45.2) Hintergrund basiert. Als Kontrollen dienten Wildtypmäuse, C57BL/6 (Ly 5.2). Außerdem wurde mit Ly 5.1 (CD45.1) Mäusen gearbeitet, die entweder bestellt oder selbstgezüchtet waren. Bestellte Tiere wurden im Alter von sechs Wochen geliefert, damit sie noch zwei Wochen Adaptationszeit hatten, bevor sie mit acht Wochen das richtige Alter für Transplantationsversuche erreichten. Die Kontrollmäuse wurden bestmöglich in Alter und Geschlecht mit ihrer Vergleichsgruppe abgestimmt. Zu einem Teil wurden die Mäuse in Isolierboxen mit eigenem Belüftungssystem (individually ventilated cages=IVC) gehalten, zu einem anderen Teil nicht.

Ein weiterer Mausstamm, mit dem in diesem Projekt gearbeitet wurde, war der selbstgezüchtete 129xLy 5.1 Mausstamm, der einen 129S2/SvHsdxB6.SJL Ly 5.1- und Ly 5.2-Hintergrund hatte. Dieser wurde für eine sekundäre Transplantation verwendet.

3.2 Primäre Transplantation

Die primäre Transplantation bestand aus vier Versuchsansätzen. Dafür wurden jeweils Ly 5.2-Spenderzellen von acht bis zehn Wochen alten *Ctsk*^{-/-}- und WT-Mäusen entnommen. Diese Mäuse wurden geopfert und das Knochenmark aus

ihren Tibiae und Femores ausgespült. Anschließend wurden die Zellen gezählt und entweder am selben Tag transplantiert oder eingefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt transplantieren zu können. Des Weiteren konnte man die gewonnenen Zellen auch für den Sort für die Immunfluoreszenzfärbung benutzen.

Bei der primären Transplantation erfolgte die Bestrahlung der Ly 5.1-Empfängermäuse mit einer letalen Dosis von 8,5 Gray in einer Sitzung 24h vor der Transplantation. Als Bestrahlungsgerät wurde das Mevatron KD2 von Siemens verwendet, mit dem auch Menschen bestrahlt werden.

Damit Spender- und Empfängerzellen unterschieden werden konnten, wurde in meiner Arbeit auf das Ly 5.1- und Ly 5.2-Blutzellsystem zurückgegriffen. Wie schon erwähnt, exprimieren die *Ctsk*^{-/-}- und Wildtypspendermäuse den Ly 5.2-Isotyp des CD45-Antigens (CD45.2). Die Empfängermäuse dagegen exprimierten den Ly 5.1-Isotyp des CD45-Antigens (CD45.1). Da alle Mäuse auf dem C57BL/6.J-Hintergrund gezüchtet wurden, sind kongene Transplantationsversuche ohne die Gefahr von Abstoßungs- oder „Graft versus Host“-Reaktionen möglich. Alle Mäuse wurden im Alter von acht bis zehn Wochen transplantiert. Bei dem ersten und dritten Versuchsansatz der primären Transplantation sind aus Standardisierungsgründen ausschließlich Männchen als Empfänger verwendet worden. Bei der zweiten primären Transplantation sind Ly 5.1-Mäuse aus der eigenen Zucht verwendet worden, worunter auch acht Weibchen waren. Am Tag nach der Bestrahlung wurden Empfängermäuse mit je $2,5 \times 10^5$ Knochenmarkzellen von *Ctsk*^{-/-}- oder Wildtypmäusen primär transplantiert (siehe S. 30, Abb. 7). Die Transplantation der Zellen erfolgte über die Schwanzvene, V. caudalis mediana (siehe S. 29, Abb. 6). Die Knochenmarkzellen waren in HF2+-Puffer suspendiert und wurden in einem Volumen von 250µl pro Maus gespritzt. Um Infektionen vorzubeugen, wurde den transplantierten Mäusen für fünf Wochen 1 mg/ml Borgal®, ein Breitbandantibiotikum, bestehend aus einer Mischung aus Sulfadoxin 200 mg/ml und Trimethoprim 40 mg/ml, über das Trinkwasser zugegeben. Bei der ersten primären Transplantation wurde noch Ciprofloxacin 20µg/ml zum Trinkwasser zugegeben, aber mit Borgal® sollte die Rate an Infektionen gesenkt werden.

Um die Wiederherstellung des Blutzellsystems beurteilen zu können, wurde den Mäusen nach fünf und zehn Wochen Blut abgenommen, welches mittels

Durchflusszytometrie analysiert wurde. Das Bluten erfolgte aus dem Venengeflecht (V.facialis) der Wange. Die genaue Blutzellzahl wurde durch das Blutmessgerät ermittelt.

Nach 16 Wochen wurden die Mäuse geopfert und außer peripherem Blut auch noch Knochenmark und Milz untersucht. Ein positives Anwachsen der transplantierten Zellen wurde wie folgt definiert: wenn die Empfängermaus $\geq 1\%$ myeloische oder lymphatische Spenderzellen in ihrem peripheren Blut aufwies, galt sie als positiv.

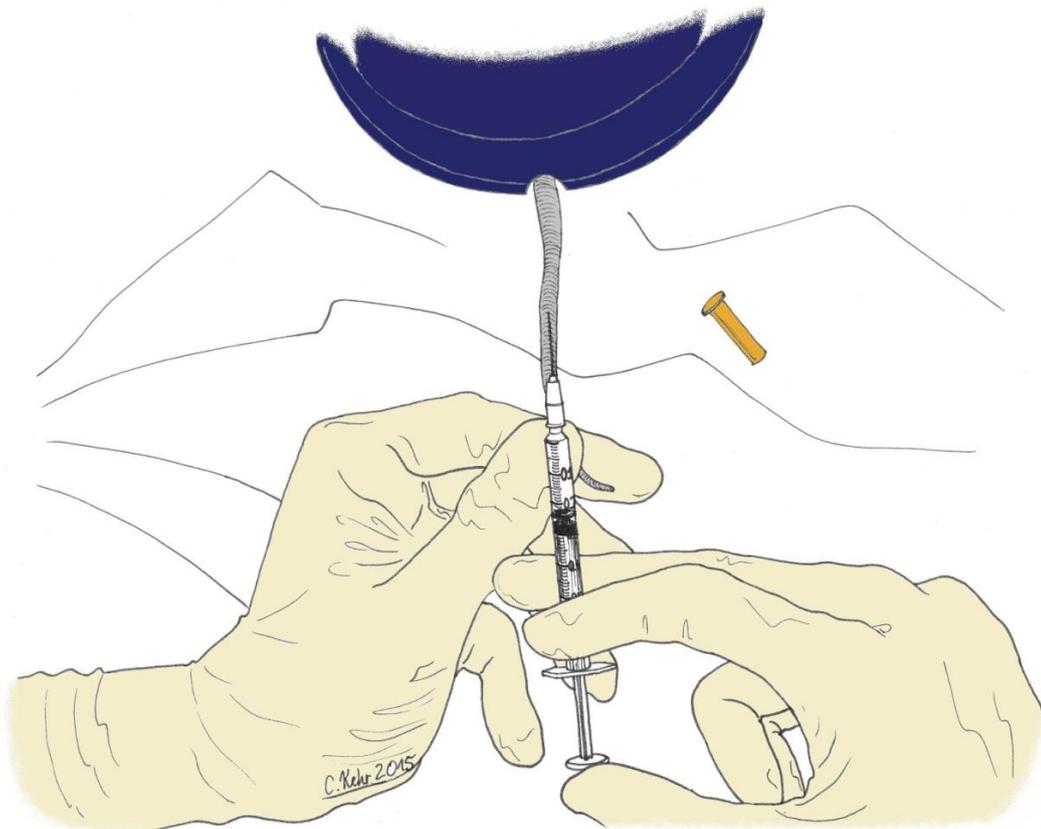
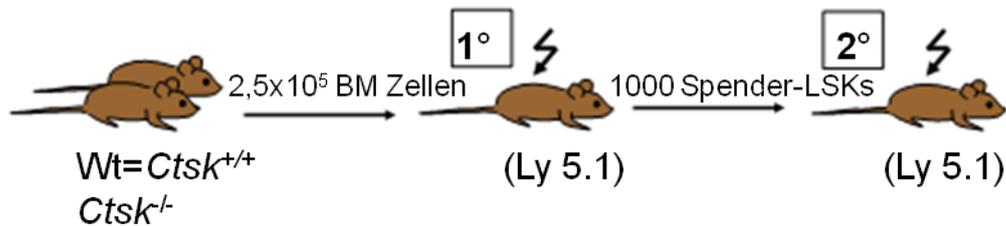


Abbildung 6: Schemadarstellung einer Transplantation in die Schwanzvene einer adulten Maus. Maus mit Körper unter abgedunkeltem Gefäß. Mit freundlicher Genehmigung von Christian Kehr.

Transplantationen

HSC intrinsisch



Mikroumgebung extrinsisch

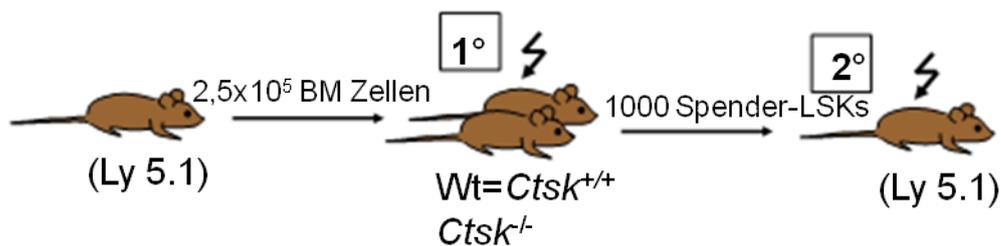


Abbildung 7: Transplantationsmodelle intrinsisch versus extrinsisch.

3.3 Sekundäre Transplantation

Bei der sekundären Transplantation sind LSK-Zellen aus dem Knochenmark von 16 - 20 Wochen alten, primär transplantierten Mäusen weitergespritzt worden. Neben Ly 5.1-Empfängermäusen dienten auch 129xLy 5.1-Mäuse als Empfänger, welche sowohl das Ly 5.1- als auch das Ly 5.2-Antigen aufwiesen. Im Gegensatz zu vorher beschriebenen primären Transplantation wurde in zwei Sitzungen (4,5 Gray und 4 Gray) im Abstand von 3h bestrahlt. Hierfür wurde das Bestrahlungsgerät Gulmay verwendet.

Jede sekundär transplantierte Maus erhielt entweder 10³ gesortete Wildtyp- oder Ctsk^{-/-}-LSK-Zellen von primär transplantierten Mäusen (siehe S. 30, Abb. 7). Da es sich bei LSK-Zellen um hämatopoetische Stammzellen handelte, welche eine gewisse Zeit brauchten, um eine ausreichende Menge an radioprotektiven und immunfähigen Nachkommen zu produzieren, wurden den bestrahlten Mäusen

immunkompetente Helferzellen mitinjiziert. Dazu wurden Helfermäuse euthanasiert, ihre Knochenmark- und Milzzellen aufgereinigt und die Zellen in HF2+-Puffer suspendiert. Die Helfermäuse waren ebenfalls Ly 5.1-Mäuse, so dass sich ihre Zellen von den sekundär transplantierten *Ctsk*^{-/-} und WT-Ly 5.2-LSK-Zellen unterscheiden.

Pro transplantierte Maus wurden 10^5 Knochenmark- und 5×10^5 Milzhelferzellen gespritzt. Wie bei der primären Transplantation wurde das zu transplantierte Zellgemisch in einem Volumen von 250 μ l pro Maus verabreicht.

Bei der sekundären Transplantation sind Männchen und Weibchen als Empfänger verwendet worden, um eine möglichst große Anzahl an Tieren zu erhalten.

3.4 Bestimmung von Zellzahlen

Da für die meisten Versuche eine bestimmte Anzahl an Zellen benötigt wurde, wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauerzählkammer (Neubauer-improved, Paul Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen, Deutschland) und Trypan Blau (BD Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) oder der Türk'schen Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) ermittelt. Trypan Blau färbt tote Zellen, so dass man in der Zählkammer zwischen ungefärbten, vitalen und gefärbten, toten Zellen differenzieren konnte. Frischem, erythrozytenreichem Knochenmark- und Milzgewebe wurde zur Erythrozytenlyse Türk'sche Lösung zugefügt, um die Zellzahl ohne Verfälschung bestimmen zu können. Jedoch konnten mit dieser Methode lebende nicht von toten Zellen unterschieden werden.

Zur Bestimmung der totalen Blutzellzahl des peripheren Bluts wurden die Zellen mit dem Counter Scil Vet Abc™ (Animal Blood Counter, Scil vet academy, Viernheim, Deutschland) gezählt.

3.5 Euthanasierung von Mäusen

Während meiner Laborarbeit wurde sich stets bei der Art und Durchführung der Mausopferung an die Tierschutzgesetze gehalten. Die Mäuse wurden außerhalb des ZPFs im Labor euthanasiert. Dazu wurden sie zunächst mit Isofluran, einem starken, volatilen Anästhetikum, eingeschläfert, um sie anschließend schmerz- und bewusstlos einer zervikalen Dislokation zu unterziehen.

3.6 Mausgewebe

In diesem Projekt wurde mit drei Arten von Mausgeweben gearbeitet; mit Mausknochenmark (BM), Mausmilz (SP) und Mausblut (PB). Diese drei Gewebe sind mittels Durchflusszytometrie (CyAn™ ADP LxP8 oder CyAn™ ADP P9C von Beckman Coulter Inc., USA) analysiert worden. Zusätzlich wurde das Knochenmark bei einigen Versuchen mit Hilfe des Sorts (MoFlo) untersucht.

Es gab zwei Möglichkeiten Mausblut zu gewinnen. Während die Experimente liefen, wurden die Mäusen nach fünf und zehn Wochen post transplantationem geblutet. Am Ende der Versuche wurde bei der Opferung der Mäuse Blut aus den Herzhöhlen oder den Hohlvenen (Vv. cavae superior und inferior) entnommen. Das Blut wurde jeweils in einem mit EDTA beschichteten Röhrchen (S-Monovette® von Sarstedt AG&Co) aufgefangen. Anschließend wurde dem Blut zur Erythrozytenlyse 5ml ACK Lysepuffer (Life Technologies™, Darmstadt, Deutschland) zugegeben und die Proben für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Röhrchen bei 500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und Zellen mit HF2+-Puffer resuspendiert.

Zur Milzgewinnung wurde die Milz seziert und durch einen 100µm Filter (BD Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gepresst. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10ml HF2+-Puffer homogenisiert und nochmals durch einen 30µm Filter (BD Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gefiltert.

Für die Knochenmarkanalyse wurden von jeder Maus je zwei Tibiae und Femores entnommen. Den Knochen wurden an beiden Enden die Epiphysen abgeschnitten, so dass man Röhrenknochen hatte, die an beiden Seiten offen waren. Die eine Seite wurde über ein Falcon gehalten, auf die andere eine Spritze mit 10ml HF2+-Puffer aufgesetzt und das Knochenmark ausgespült. Auch hier wurden die Zellen anschließend homogenisiert und durch einen 30µm Filter gefiltert.

3.7 Durchflusszytometrie

Ein wesentlicher Bestandteil dieses Projektes war die Untersuchung einzelner Zellpopulationen und deren Zellzahlen. Mit dem Durchflusszytometer (FACS) konnten eben diese ermittelt werden. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden bei dieser Methode Oberflächenmoleküle von Zellen sichtbar gemacht. Jede in diesem Projekt untersuchte Zellpopulation besaß ihre ganz eigene, spezifische Zusammensetzung von Antigenen. Diese wurde sich durch den gezielten Einsatz von fluoreszierenden Antikörpern zu Nutze gemacht, um Größe und Art der Zellpopulationen aufzuzeigen. Das Durchflusszytometer war außerdem in der Lage, die Größe und die Granularität einzelner Zellen darzustellen. In dieser Arbeit kamen zwei Färbemethoden zum Einsatz, eine Färbung I für Stammzellen, die sogenannte Stammzellfärbung, und eine Färbung II für reife Zellen.

Bei der Stammzellfärbung wurde wie folgt vorgegangen. Zunächst wurden tote Zellen ausgegattet und danach die Größe und Granularität der Zellen eingegrenzt. Da in diesem Projekt Ly 5.1-Wildtypmäuse mit Ly 5.2-Knochenmark (*Ctsk*^{-/-} oder Wildtyp) transplantiert wurden, konnten so in einem weiteren Schritt Spenderzellen von Empfängerzellen abgegrenzt werden. Zur genaueren Beurteilung von Spenderstammzellen (HSCs) wurde zwischen LSKs (Lineage negativ, SCA1 positiv und KIT positiv), CLPs (common lymphoid progenitors) und MPs (myeloid progenitors) unterschieden (siehe S. 34, Abb. 8A).

Bei der Färbung reifer Zellen liefen die ersten Schritte identisch mit der Stammzellfärbung ab. Anschließend wurden hier aus den Spenderzellen B- und T-Zellen, sowie Granulozyten und Monozyten bestimmt (siehe Abb. 8B).

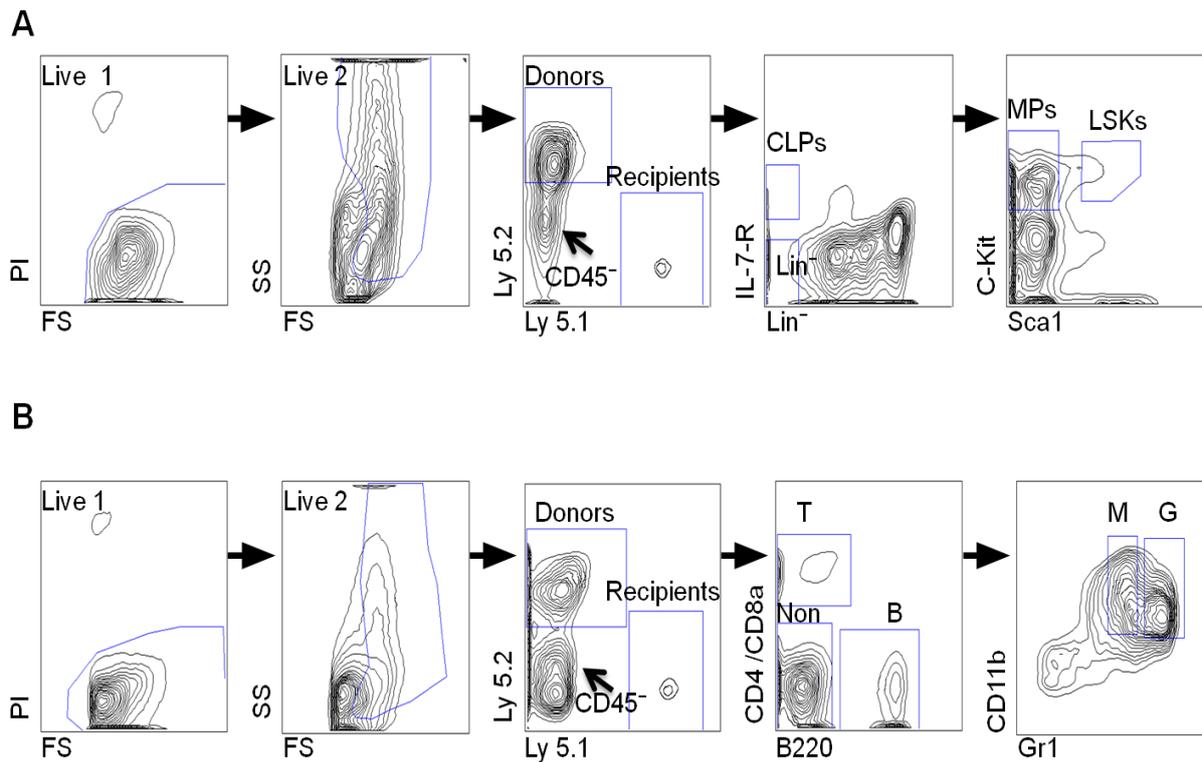


Abbildung 8: FACS-Darstellung Knochenmark. A) Stammzellfärbung. B) Reifezellefärbung.

3.8 Färbungen für die Durchflusszytometrie

Es wurden, wie bereits oben erwähnt, zwei Oberflächenfärbungen unterschieden (siehe S. 34, Kapitel 3.7). Bei der Stammzellfärbung wurden 6×10^6 (BM, SP) Zellen, bei der Färbung reifer Zellen 3×10^6 (BM, SP und PB) Zellen gefärbt. Die benutzten Antikörper sind in Tabelle 7 und 8 zu finden (siehe S. 22, 24). Die Zellen wurden in 100 μ l FACS-Puffer mit dem primären Antikörper gefärbt und bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Antikörper mit FACS-Puffer ausgewaschen. Bei der Benutzung eines sekundären Antikörpers wurden die Zellen nach Auswaschung des primären wieder in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und dann sekundär gefärbt. Auch dabei wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4°C inkubiert und der Antikörper anschließend ausgewaschen. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen erneut in FACS-Puffer resuspendiert, zu dem jetzt 1 μ g/ml Propidium Iodid (PI) (Life Technologies™, Darmstadt, Deutschland) zugegeben wurde, um tote Zellen auszugaten. Danach wurden sie mit dem CyAn ADP LxP8 oder CyAn ADP 9C

analysiert und mit Hilfe der FlowJo 8.8.3- Software (Tree Star, Inc. Ashland, OR, USA) ausgewertet.

Für das Sorten von Zellpopulationen wurde derselbe Färbevorgang benutzt. Der Sort wurde mit dem MoFlo-Zellsorter durchgeführt.

3.9 Lineagetrennung und Sort für Immunfluoreszenz

Um bei der Immunfluoreszenzfärbung LSKs, MPs und CLPs anzufärben, mussten diese zunächst gewonnen werden. Nach der Opferung der Wildtyp- und *Ctsk*^{-/-}-Mäuse wurde ihr Knochenmark aufbereitet und die reifen Zellen durch Lineagetrennung aussortiert. Dieser Vorgang lief wie folgt ab. Das gesamte Knochenmark wurde gezählt und abhängig von der Zellzahl wurden an Biotin gebundene Antikörper zugegeben (CD3, B220, CD11b, GR-1 und TER-119). Nach kurzer Inkubationszeit wurden sekundäre Antikörper, an Streptavidin gebundene, kleine Magnete, zugegeben. Anschließend ließ man die Zellen durch eine Magnetsäule laufen. Fast alle Lineage positiven Zellen hatten nun einen Magneten gebunden und hefteten sich an die Säule. Die Zellen, die die Magnetsäule passierten, waren somit fast ausschließlich Lineage negativ. Im Anschluss wurden diese Zellen gefärbt und gesortet. Auch hier wurden die toten Zellen, wie oben beschrieben, ausgegattet (Kapitel 3.7, S. 34). Danach wurden aus den Lineage negativen Zellen die LSKs, CLPs und MPs bestimmt und letztere in drei separaten Gefäßen gesammelt.

3.10 Färbungen für die Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden, wie oben beschrieben, Knochenmarkzellen von *Ctsk*^{-/-}- und Wildtypmäusen gesortet (siehe Kapitel 3.9). Es wurden jeweils 500 - 1000 gesortete LSK-, MP- und CLP-Zellen auf einen mit Poly-L-Lysin-beschichteten Glasobjektträger aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit

von 30 Minuten bei 4°C wurden die Zellen mit 4% PFA (Paraformaldehyd) für weitere 5 Minuten fixiert. Im Anschluss wurden sie mit Blockierungspuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Dieser wurde wieder abgenommen und die Zellen mit den primären Antikörpern gefärbt (siehe S. 24, 25, Tabelle 9, 10), welche ebenfalls in Blockierungspuffer gelöst waren. Auf diese Weise wurden die Zellen über Nacht in trockener Umgebung bei 4°C gefärbt. Am Folgetag wurden die primären Antikörper mit Blockierungspuffer ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen wieder bei 4°C für 30 Minuten mit diesem Puffer inkubiert. Nach erneutem Auswaschen wurden die Zellen mit den sekundären Antikörpern gefärbt, welche ebenfalls in Blockierungspuffer gelöst waren. Die Zellen wurden wieder über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie dreimal mit Blockierungspuffer und einmal mit DPBS ausgewaschen. Darauffolgend wurden sie mit slow-fade DAPI eingedeckelt und für ein bis zwei Wochen bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen.

Bei dem Protein Zyklin D1 reichte die zweifache Färbung nicht aus, weil das Signal zu schwach war. Hier wurde die oben beschriebene, zweifache Färbung mit Alexa Fluor 488 und Anti-Alexa Fluor 488 ergänzt, so dass das Signal deutlich verstärkt wurde und auch dieses Protein ausgewertet werden konnte.

Die Auswertung der Zellen erfolgte an einem bestimmten Fluoreszenzmikroskop (Leica DM RBE) mit der Axio Vision Software. Pro Antikörperfärbung wurden 20 - 30 Bilder von Zellen in 100-facher Vergrößerung erstellt. Diese Bilder wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet, welches die Helligkeit oder Pixelintensität der Zellen beurteilen kann.

3.11 Auswertungen und Statistik

Sämtliche Daten wurden mit Hilfe von Excel ausgewertet. Diagramme und Graphiken wurden sowohl mit Excel als auch mit Graphpad Prism präsentiert.

Als statistische Verfahren wurden der Mittelwert mit Standardfehler, der T-Test, der Mann-Whitney-U-Test und die Standardabweichung herangezogen. Der

Standardfehler, mit dem in dieser Arbeit gearbeitet wird, ist ein statistischer Wert, der die Populationsgröße bei der Abweichung vom Mittelwert mit einschließt. Der T-Test sagt etwas darüber aus, ob Ergebnisse signifikant sind oder nicht, ebenso wie der Mann-Whitney-U-Test, wobei letzterer die Signifikanzen in nicht normalverteilten Populationen angibt. Signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0,05$) wurden in Abbildungen stets mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Die FACS-Daten wurden mit Hilfe der FlowJo-Software 8.8.3 ausgewertet; die Immunhistochemie mit dem Programm ImageJ.

4. Ergebnisse

4.1 Einführung in die Ergebnisse der primären Transplantation

Bei meiner Arbeit interessierte mich vor allem die Rolle von Kathepsin K (CTSK) in der Regulation der Hämatopoese. Es wird im Allgemeinen zwischen einem extrinsischen und einem intrinsischen Transplantationsmodell unterschieden. Zusammengefasst ist das extrinsische System die Mikroumgebung im Knochenmark mit allen Zellen und Signalen, die zu einer balancierten Knochenmarknische und Hämatopoese führen. Das intrinsische System hingegen beschreibt die Eigenschaften und Veränderungen der hämatopoetischen Stammzellen.

Vorherige Untersuchungen im Oostendorp-Labor hatten sich im Wesentlichen mit der extrinsischen Regulation der HSCs befasst. Allerdings wird CTSK auch von hämatopoetischen Zellen selbst exprimiert. Aus diesem Grund bearbeitete ich zwei Fragestellungen.

1. Zum einen sollte die Rolle der CTSK-Expression in hämatopoetischen Stammzellen untersucht werden, indem man $2,5 \times 10^5$ *Ctsk*^{-/-}- oder $2,5 \times 10^5$ Wildtypknochenmarkzellen, jeweils mit Ly 5.2-Hintergrund, in Ly 5.1-Wildtypmäuse injizierte (siehe S. 39, Abb. 9).
2. Zum anderen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob es CTSK abhängige Unterschiede in der Expression spezifischer Proteine in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zwischen *Ctsk*^{-/-}- und Wildtypmäusen gab.

Zunächst wird näher auf die erste Fragestellung und die damit verbundenen Transplantationen eingegangen. Insgesamt wurde viermal primär transplantiert. Die Transplantationen 2 und 3 hatten nur eine Woche Abstand und sind deswegen zu einer Transplantation (Nr.2) mit dem Transplantationsdatum (TX vom 09.11.2012) zusammengefasst worden (siehe S. 40, Tabelle 13). Somit hatte man am Ende der Versuchsreihe neun Wildtypmäuse, denen *Ctsk*^{-/-}-Knochenmark transplantiert worden war, und sieben Wildtypkontrolltiere (siehe S. 40, Tabelle 13).

Bei der zweiten primären Transplantation sind von neun Tieren acht weiblich gewesen. Diese Besonderheit wird hier erwähnt, da später festgestellt wurde, dass es in der Regeneration einzelner Zelltypen Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Empfängertieren im jeweiligen Spendergenotyp gab. Auch innerhalb eines Geschlechts unterschieden sich die Genotypen (siehe S. 44, Abb. 11). Aus diesem Grund wurden bei den meisten Untersuchungen nur männliche Empfängertiere benutzt. Wenn dem nicht so war, wird es im Folgenden ausdrücklich erwähnt.

Die Mäuse sind 24h vor der Transplantation mit 8,5 Gray letal bestrahlt worden. Am Folgetag wurden ihnen die Knochenmarkzellen transplantiert und eine fünfwöchige Antibiotikaprophylaxe mit Borgal® (eine Mischung aus Sulfadoxin 200 mg/ml und Trimethoprim 40 mg/ml) eingeleitet. Nach fünf und zehn Wochen wurde den Mäusen Blut abgenommen, das mit dem Durchflusszytometer und dem Zellzähler analysiert wurde. So konnte man das Anwachsen der transplantierten Zellen verfolgen. Im Anschluss sind die Mäuse zwischen der 16. – 20. Woche nach Transplantation euthanasiert worden. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die endgültige Analyse, bei der außer Blut auch Milz- und Knochenmarkgewebe untersucht wurde.

Transplantationen

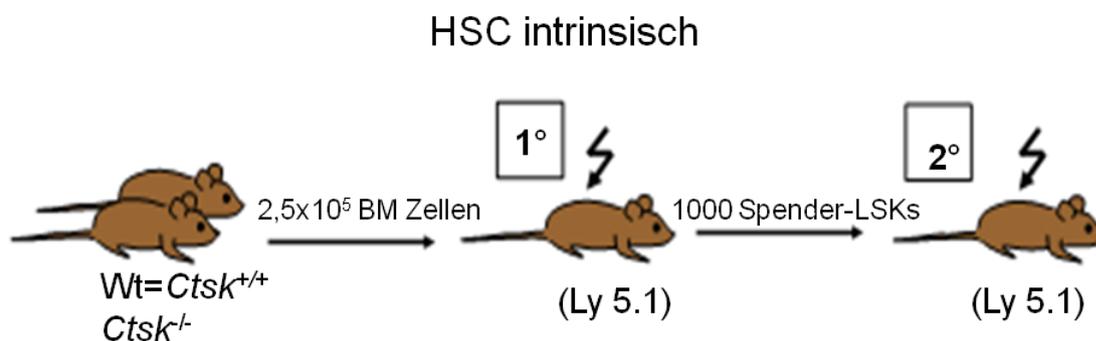


Abbildung 9: Versuchsaufbau der Transplantationen.

Tabelle 13: Mausdaten der primären Transplantation. KO=Knockout, Alter in Wochen (W), m=männlich, w=weiblich, WBC=white blood cells, RBC=red blood cells, PLT=platelets.

| WT/KO | Maus | Alter | TX-Datum | m/w | WBC | RBC | PLT |
|-------|------|-------|----------|-----|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| WT | #50 | 18W | 9.11.12 | w | 3,7x10 ³ /μl | 8,7x10 ⁶ /μl | 1088x10 ³ /μl |
| WT | #60 | 18W | 9.11.12 | w | 4,7x10 ³ /μl | 6,0x10 ⁶ /μl | 1140x10 ³ /μl |
| WT | #70 | 18W | 9.11.12 | w | 3,4x10 ³ /μl | 9,7x10 ⁶ /μl | 1286x10 ³ /μl |
| WT | #90 | 18W | 9.11.12 | w | 4,7x10 ³ /μl | 10,6x10 ⁶ /μl | 1052x10 ³ /μl |
| WT | #2 | 20W | 3.7.12 | m | 2,5x10 ³ /μl | 9,8x10 ⁶ /μl | 944x10 ³ /μl |
| WT | #10 | 19W | 5.12.12 | m | 3,2x10 ³ /μl | 10,4x10 ⁶ /μl | 1292x10 ³ /μl |
| WT | #30 | 19W | 5.12.12 | m | 6,9x10 ³ /μl | 8,4x10 ⁶ /μl | 333x10 ³ /μl |
| KO | #1 | 18W | 9.11.12 | w | 4,9x10 ³ /μl | 9,0x10 ⁶ /μl | 752x10 ³ /μl |
| KO | #3 | 18W | 9.11.12 | w | 5,6x10 ³ /μl | 10,2x10 ⁶ /μl | 1098x10 ³ /μl |
| KO | #6 | 18W | 9.11.12 | w | 3,0x10 ³ /μl | 9,4x10 ⁶ /μl | 1178x10 ³ /μl |
| KO | #7 | 18W | 9.11.12 | w | 2,5x10 ³ /μl | 6,3x10 ⁶ /μl | 816x10 ³ /μl |
| KO | #5 | 20W | 3.7.12 | m | 4,7x10 ³ /μl | 10,5x10 ⁶ /μl | 1399x10 ³ /μl |
| KO | #8 | 18W | 9.11.12 | m | 3,4x10 ³ /μl | 9,4x10 ⁶ /μl | 1371x10 ³ /μl |
| KO | #1 | 19W | 5.12.12 | m | 5,1x10 ³ /μl | 10,3x10 ⁶ /μl | 1297x10 ³ /μl |
| KO | #3 | 19W | 5.12.12 | m | 5,9x10 ³ /μl | 9,4x10 ⁶ /μl | 540x10 ³ /μl |
| KO | #4 | 19W | 5.12.12 | m | 6,3x10 ³ /μl | 11,0x10 ⁶ /μl | 1014x10 ³ /μl |

Tabelle 14: Mausdaten der primären Transplantation. Mittelwerte mit SEM für WBC, RBC und PLT aus Tabelle 13.

| WT/KO | WBC | RBC | PLT |
|-------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| WT | 4,1±0,5x10 ³ /μl | 9,1±0,6x10 ⁶ /μl | 1019±124x10 ³ /μl |
| KO | 10,5±6,1x10 ³ /μl | 9,5±0,5x10 ⁶ /μl | 1052±99x10 ³ /μl |

4.2 Analyse der Gesamtzahlen der primären Transplantation

Bei der Analyse der Gesamtzellzahlen (s. u. Abb. 10 A+B) zeigte sich, dass die mit *Ctsk*^{-/-}-Knochenmark transplantierten Mäuse eine Gesamtzellzahl von im Mittel $54 \pm 5 \times 10^6$ Zellen pro zwei Femores+Tibiae (F+T) im Knochenmark aufwiesen. Die Gesamtzellzahl in der Milz war im Durchschnitt $133 \pm 45 \times 10^6$ Zellen pro Milz. Der Mittelwert der Kontrollgruppe lag bei den Knochenmarkzellen bei $69 \pm 6 \times 10^6$ BM-Zellen pro zwei Femores+Tibiae, die Milzzellen lagen im Schnitt bei $93 \pm 22 \times 10^6$ pro Organ. Die Leukozytenzahl im peripheren Blut war in beiden Gruppen ähnlich (s. u. Abb. 10 B). Die Kontrollgruppe hatte im Schnitt $4,1 \pm 0,5 \times 10^3$ Zellen. In der mit Knockout-BM transplantierten Gruppe waren es im Durchschnitt $4,6 \pm 0,4 \times 10^3$ Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beide Gruppen (WT (*Ctsk*^{+/+})-BM und *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierte Empfängertiere) in Bezug auf die Gesamtzellzahlen von Knochenmark, Milz und peripherem Blut ähnlich waren (s. u. Abb. 10 A+B).

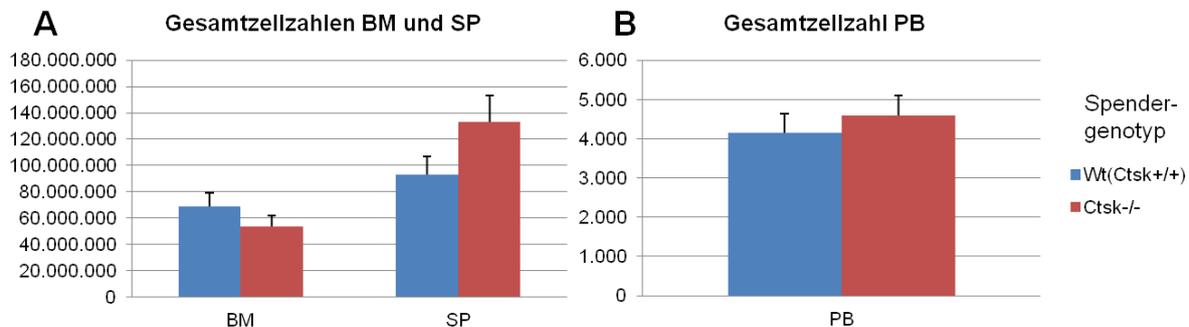


Abbildung 10: Primäre Transplantation Gesamtzellzahlen. A) Knochenmark (BM) als Zahl pro F+T und Milz (SP) als Gesamtorganzahl. **B)** Peripheres Blut (PB) als Zahl/μl.

Die einzelnen Mausgewebe sind mittels Durchflusszytometrie analysiert worden. Wie bereits im Methodenteil erwähnt (Kapitel 3.8), wurden das Knochenmark und die Milz mit je einer Reifezellfärbung und einer Stammzellfärbung gefärbt. Im peripheren Blut der Mäuse sind jedoch nur die reifen Zellen gefärbt worden.

4.3 Analyse der Knochenmarkzellen der primären Transplantation

4.3.1 Stammzellfärbung des Knochenmarks

Durchflusszytometriedaten einzelner Populationen im Knochenmark der transplantierten Empfängermäuse wurden mit Hilfe der FlowJo-Software ausgewertet. Es wird in der folgenden Beschreibung vor allem auf die regenerierten Spenderzellpopulationen und ihre Unterpopulationen eingegangen. Insgesamt sind 16 Mäuse (siehe S. 40, Tabelle 13) bei der primären Transplantation untersucht worden. Wie die Stammzellpopulationen und die reifen Zellen mit Hilfe der FlowJo-Software ausgewertet wurden, zeigt die Abbildung 8 im Methodenteil (siehe S. 34, Kapitel 3.7). Für Abbildung 8 bleibt zu erwähnen, dass bei der Teilabbildung, auf der die Spender- und Empfängerzellen zu sehen sind, noch eine weitere Population auffällt, die CD45⁻-Zellpopulation. Diese wird hier jedoch nicht bewertet, da es sich um keine hämatopoetische Zellpopulation handelt.

Bei der Untersuchung der Knochenmarkzellpopulationen der primären Transplantation zeigte sich weder bei den Prozentzahlen noch bei den Absolutzahlen ein signifikanter Unterschied in den Zellpopulationen (siehe S. 44, Abb. 11 A-G). Die Größe der einzelnen Zellpopulationen variierte zwar, aber nicht in einem Maße, in dem statistisch relevante Unterschiede zu sehen gewesen wären.

Man sah ein gutes Anwachsen der Spenderzellen in beiden Genotypen. Die Kontrollgruppe hatte 85% Spenderzellen; die mit Knockoutknochenmark transplantierte Gruppe 75%. Bei den absoluten Zahlen sah man in der mit WT-BM transplantierten Gruppe im Schnitt mit Standardfehler $31,8 \pm 5,3 \times 10^6$ Spenderzellen pro F+T (N=7); in der mit KO-BM transplantierten Gruppe waren es $19,8 \pm 3,1 \times 10^6$ Donorzellen pro F+T (N=9) (siehe S. 44, Abb. 11 A).

Bei den Prozentzahlen fällt noch ein großer Standardfehler (Standard Error of the Mean=SEM) bei den LSKs der mit *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierten Gruppe mit einem Wert von $11\% \pm 10\%$ auf. Die Wildtypspendergruppe zeigte einen Standardfehler von $0,9\% \pm 0,2\%$. Die meisten Mäuse aus beiden Gruppen zeigten, bis auf einen

Ausreißer aus der *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierten Gruppe (Dean Dixon Ausreißertest), ungefähr einen Anteil von 1% LSK-Zellen (siehe S. 44, Abb. 11 D+F). Dennoch blieb der T-Test auch ohne diesen Ausreißer nicht signifikant.

Wie bereits oben erwähnt, gab es bei der primären Transplantation insgesamt acht weibliche Tiere. Beide Genotypen hatten jeweils vier Weibchen (siehe S. 40, Tabelle 13). Es wurden nun im jeweiligen Genotyp Männchen und Weibchen gegenübergestellt. Dabei wurde kein Unterschied gefunden. Vergleich man aber WT-BM transplantierte Wildtypmännchen mit mit KO-BM transplantierten Wildtypmännchen, zeigten sich bei den Knochenmarkprozentzahlen signifikant mehr CLPs ($p < 0,05$ im T-Test) bei den *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierten Männchen als bei ihren Kontrollen (siehe S. 44, Abb. 11 I). In Abbildung 11 J (S.44) sieht man, dass bei den weiblichen mit *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierten Empfängermäusen weniger Spenderzellen (absolut) als bei den weiblichen mit WT-BM transplantierten Empfängermäusen gefunden wurden ($p = 0,03$ im Student's t-Test).

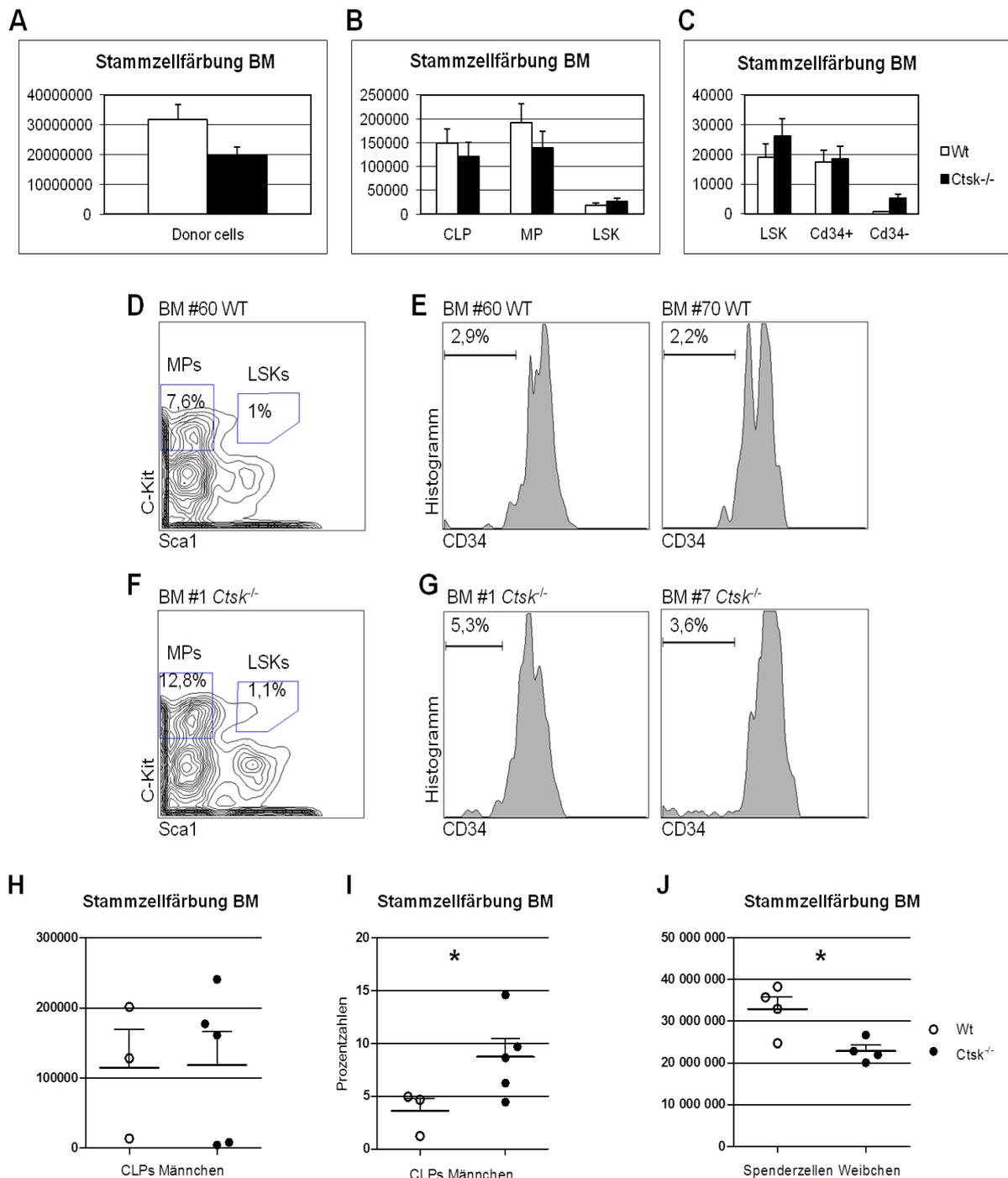


Abbildung 11: Primäre Transplantation Stammzellfärbung Knochenmark. **A)** Absolute Spenderzahlen. **B)** Absolutzahlen LSKs, CLPs und MPs. **C)** Absolutzahlen LSKs mit CD34⁺- und CD34⁻-Unterpopulation. **D)** Prozentanteil der LSKs und MPs der WT-Spenderzellen am Beispiel von Maus #60. **E)** Anteil der CD34⁻-Zellen an LSKs der regenerierten WT-Spenderzellen an Hand von zwei Beispielen (Maus #60, #70). **F)** Prozentanteil der LSKs und MPs der *Ctsk*^{-/-}-Spenderzellen am Beispiel von Maus #1. **G)** Anteil der CD34⁻-Zellen an LSKs der regenerierten *Ctsk*^{-/-}-Spenderzellen an Hand von zwei Beispielen (Maus #1, #7). **H)** Absolute CLPs, Vergleich WT- versus *Ctsk*^{-/-}-Männchen. **I)** Prozentuale CLPs bei Männchen. **J)** Absolute Spenderzellen, Vergleich WT- gegen *Ctsk*^{-/-}-Weibchen.

4.3.2 Reifezellfärbung des Knochenmarks

Im Knochenmark wurden auch die reifen T- und B-Zellen, sowie die Granulozyten und Monozyten angefärbt. Da sowohl die lymphatische als auch die myeloische Reihe analysiert wurden, konnte sogenanntes „multilineage engraftment“ festgestellt werden (siehe S. 46, Abb. 12).

Hier fiel auf, dass bei den Prozentzahlen weniger Granulozyten in der Knockoutspendergruppe als in der WT-Spendergruppe zu finden waren. Die Wildtypspendergruppe hatte im Mittel 25% Granulozyten, wohingegen die KO-Spendergruppe nur 15% zeigte ($p=0,04$, Student's t-Test; siehe S. 46, Abb. 12 C). Dieser Unterschied war auch wieder klar bei den Absolutzahlen der Granulozyten zu erkennen (Student's t-Test: $p=0,03$, Mann-Whitney-Test: $U=10$). Die sieben Kontrolltiere hatten pro F+T im Schnitt mit Standardfehler $9,2 \pm 1,5 \times 10^6$ Granulozyten im Knochenmark; von diesem Granulozytenwert wies die mit *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierte Gruppe lediglich 46% auf (siehe S. 46, Abb. 12 D).

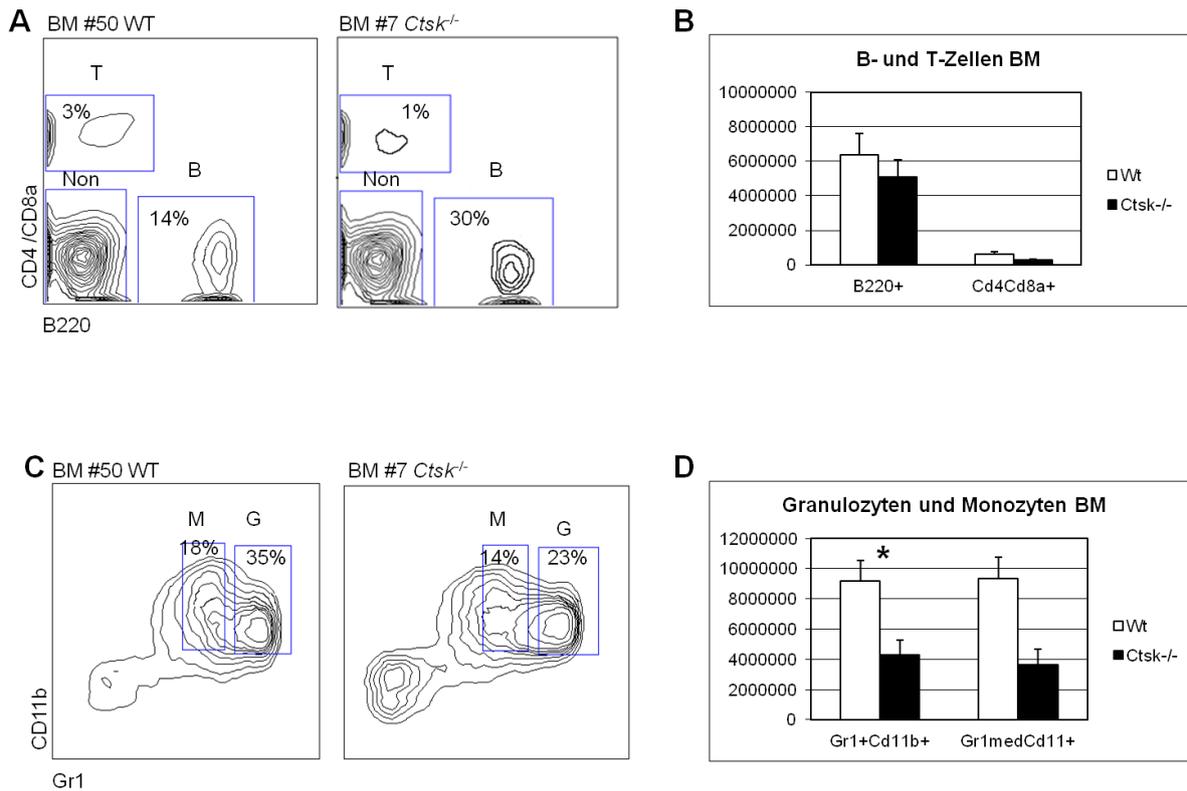


Abbildung 12: Primäre Transplantation Reifezellfärbung Knochenmark. Darstellung der reifen Blutzellpopulationen im Knochenmark der Empfängermause, gewachsen aus WT- oder *Ctsk*^{-/-}-Spender-BM. **A)** Flusszytometrische Darstellung der B- und T-Zellen an Hand von einer WT- und einer *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierten Maus. **B)** B- und T-Zellen in Absolutzahlen. **C)** Flusszytometrische Darstellung der Mono- (GR-1^{med}) und Granulozyten (GR-1⁺). **D)** Mono- und Granulozyten in Absolutzahlen. T=T-Zellen, B=B-Zellen, M=Monozyten und G=Granulozyten.

Wie auch bei der Stammzellfärbung war hier ein gutes Engraftment zu finden. Die Kontrollgruppe zeigte ein Anwachsen von 90%, die *Ctsk*^{-/-}-Spendergruppe eines von 77%.

Auch hier wurden wieder Männchen und Weibchen innerhalb eines Genotyps verglichen. Während bei der Stammzellfärbung keine Unterschiede zu sehen waren, regenerierten die weiblichen WT-Stammzellen hier signifikant mehr B-Zellen als die männlichen WT-Stammzellen (9% zu 28%, p: 0,03; Whitney U, U=0).

4.4 Analyse der Milzzellen der primären Transplantation

4.4.1 Stammzellfärbung der Milz

Bei den Milzzellen wurden auf der einen Seite die Stammzellen und auf der anderen Seite die reifen Zellen aufgezeigt.

Trotz klarer Repopulation der Spenderzellen (WT-BM-Gruppe 89%, *Ctsk*^{-/-}-BM-Gruppe 77%) zeigten sich bei der Analyse der Lineage negativen Fraktion bei den Prozent- und Absolutzahlen so geringe Werte, dass ein Vergleich der mit WT- und *Ctsk*^{-/-}-Knochenmark transplantierten Gruppen nicht sinnvoll erschien.

Anders war es mit den CLPs, die zwar gut detektiert werden konnten (s. u. Abb. 13 A+B), jedoch keinen Unterschied aufwiesen. In der Kontrollgruppe waren im Mittel mit SEM $149 \times 10^3 \pm 105 \times 10^3$ Milzzellen bei sieben Mäusen; in der mit KO-BM transplantierten Gruppe waren es bei neun Tieren $188 \times 10^3 \pm 58 \times 10^3$ Zellen pro Milz.

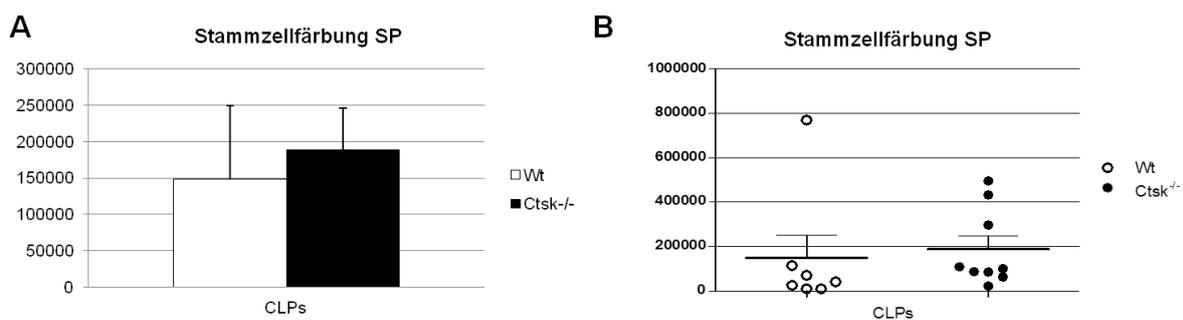


Abbildung 13: Primäre Transplantation Stammzellfärbung Milz. A) CLPs Balkendiagramm. B) CLPs Dotplot.

4.4.2 Reifezellfärbung der Milz

Was bei dieser Färbung auffällt, ist der geringe Anteil von Monozyten und Granulozyten in beiden Gruppen. Der Prozentsatz lag in der Kontrollgruppe bei 3% Granulozyten und 1% Monozyten; in der mit *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierten Gruppe bei 1% Granulozyten und Monozyten.

Interessanterweise waren in den Populationen der Empfängerzellen in beiden Gruppen bei manchen Mäusen keine Zellen der myeloischen Reihe zu sehen. In der Wildtypkontrollgruppe hatten zwei von sieben Mäusen weder Monozyten noch Granulozyten; in der mit *Ctsk*^{-/-}-Knochenmark transplantierten Gruppe besaßen vier von neun Mäusen diese beiden Zellreihen nicht.

Hier wurden auch wieder die Weibchen untereinander verglichen. Die mit Knockout-BM transplantierten Weibchen hatten sowohl prozentual als auch absolut weniger T-Zellen. Bei den Prozentzahlen lagen der p-Wert bei 0,001 und der U-Wert bei 0. Bei den Absolutzahlen war der p-Wert <0,001 und auch der U-Wert lag bei 0.

4.5 Analyse der peripheren Blutzellen der primären Transplantation

Das periphere Blut wurde ausschließlich mit der Färbung reifer Zellen analysiert. Die Aufschlüsselung der einzelnen Zellpopulationen erfolgte wie bereits oben erwähnt (siehe S. 34 Kapitel 3.7). Auch hier standen die von den Spenderzellen hervorgebrachten Populationen im Vordergrund. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen der mit Wildtypknochenmark- und der mit *Ctsk*^{-/-}-Knochenmark transplantierten Gruppe zu detektieren.

Das Anwachsen zeigte sich auch hier wieder gut (siehe S. 49, Abb. 14 B). Die Kontrollgruppe hatte 90% Spenderzellen, ihr *Ctsk*^{-/-}-Vergleich 79%. In der FACS-Abbildung weichen die Prozentwerte ab (siehe S. 49, Abb. 14 A). Das liegt daran, dass auf der FACS-Abbildung noch eine CD45⁻-Population zu sehen ist, welche aber nicht bewertet wurde. Darum sind Spender- und

Empfängerzellpopulationen jeweils größer, weil die CD45⁻-Population nicht berücksichtigt wurde.

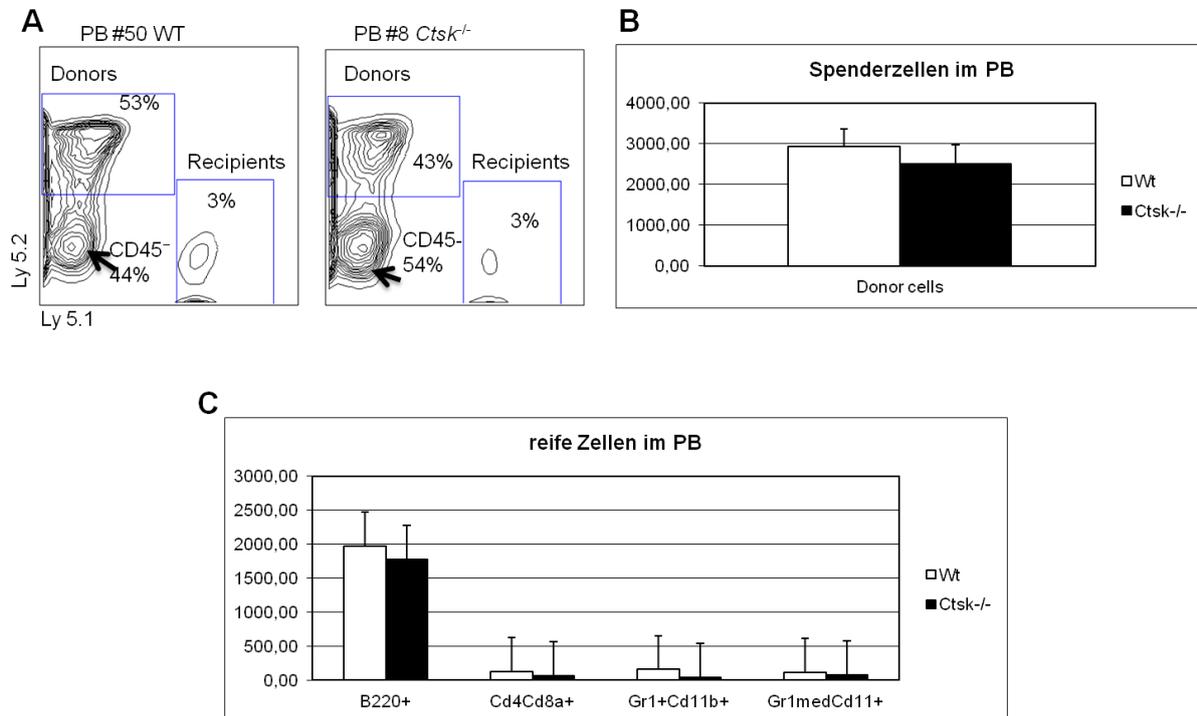


Abbildung 14: Primäre Transplantation Peripheres Blut. Darstellung der Spenderzellen und reifen Zellen im peripheren Blut. **A)** Flusszytometrische Darstellung der Spender- (Donors) und Empfängerzellen (Recipients) am Beispiel von einer WT- und *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierten Maus (#50 und #8). **B)** Darstellung der Spenderabsolutzahlen. **C)** Darstellung der reifen Zellen als Absolutzahlen. B-Zellen=B220⁺, T-Zellen=CD4CD8a⁺, Granulozyten=GR-1⁺CD11b⁺ und Monozyten=GR-1^{med}CD11b⁺.

Prozentual waren beide untersuchten Gruppen in Hinblick auf B- und T-Zellen, Granulozyten und Monozyten nahezu identisch. Auffallend ist der große Anteil, den die aus den Spenderstammzellen gewachsenen B-Zellen 16 Wochen nach der Transplantation in beiden Gruppen einnehmen; 67% in der WT-BM-Gruppe und 66% in der *Ctsk*^{-/-}-BM-Gruppe. Er ist auch bei den Absolutzahlen zu sehen (s. o. Abb. 14 C). Der Anteil der Granulozyten und Monozyten liegt in beiden Gruppen bei circa 3% und ist damit insgesamt niedrig.

Im peripheren Blut ist innerhalb der mit Wildtypknochenmark transplantierten Gruppe ein relevanter Unterschied bei den B-Zellprozentzahlen aufgefallen. Die Weibchen zeigten, wie auch schon bei der Reifezellfärbung des Knochenmarks, mehr B-Zellen (p: 0,04 und U-Wert: 0).

4.6 Einführung in die Sortergebnisse

Ein weiterer Analyseteil beschäftigt sich mit den Sortergebnissen. Es wurde insgesamt viermal gesortet, zweimal für die immunzytologischen Färbungen und zweimal für die sekundären Transplantationen. Da sich die gesorteten Zellen in beiden Versuchen unterschieden, sind die Ergebnisse separat zu betrachten. Zunächst wird auf die Sorts für die Transplantationen eingegangen, im Kapitel 4.14, dann auf die für die Immunzytologie.

4.7 Sortergebnisse der sekundären Transplantation

Beim dritten und vierten Sort ging es darum, die LSK-Zellen für die sekundären Transplantationen zu gewinnen. Hierfür wurden die Mäuse der primären Transplantation geopfert, ihr Knochenmark aufbereitet und dann Lineage getrennt. Es wurde gefärbt und anschließend wurden die LSK-Zellen gesortet. Dies lief wie folgt ab. Nach dem Aussortieren der toten Zellen wurden die Spenderzellen (Ly 5.2) bestimmt, daraus die Lineage negativen Zellen und aus letzteren die LSK-Population (siehe S. 51, Abb. 15 A).

Aus der primären Transplantation wurden für den dritten Sort vier primär mit WT-BM transplantierte Mäuse und fünf primär mit *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierte Mäuse verwendet. Für den vierten Sort wurden zwei primär mit Wildtyp-BM und drei primär mit *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierte Mäuse verwendet. Insgesamt lag die absolute Gesamtzellzahl im Mittel bei der primär mit Wildtypknochenmark transplantierten Gruppe nach der Lineagetrennung bei $1,7 \times 10^6$, bei den primär mit *Ctsk*^{-/-}-Knochenmark transplantierten Mäusen bei $1,9 \times 10^6$ Zellen. Im Schnitt waren die Spenderzellen bei den Kontrollmäusen mit 84% vertreten, bei den mit *Ctsk*^{-/-}-BM transplantierten Mäusen mit 74%.

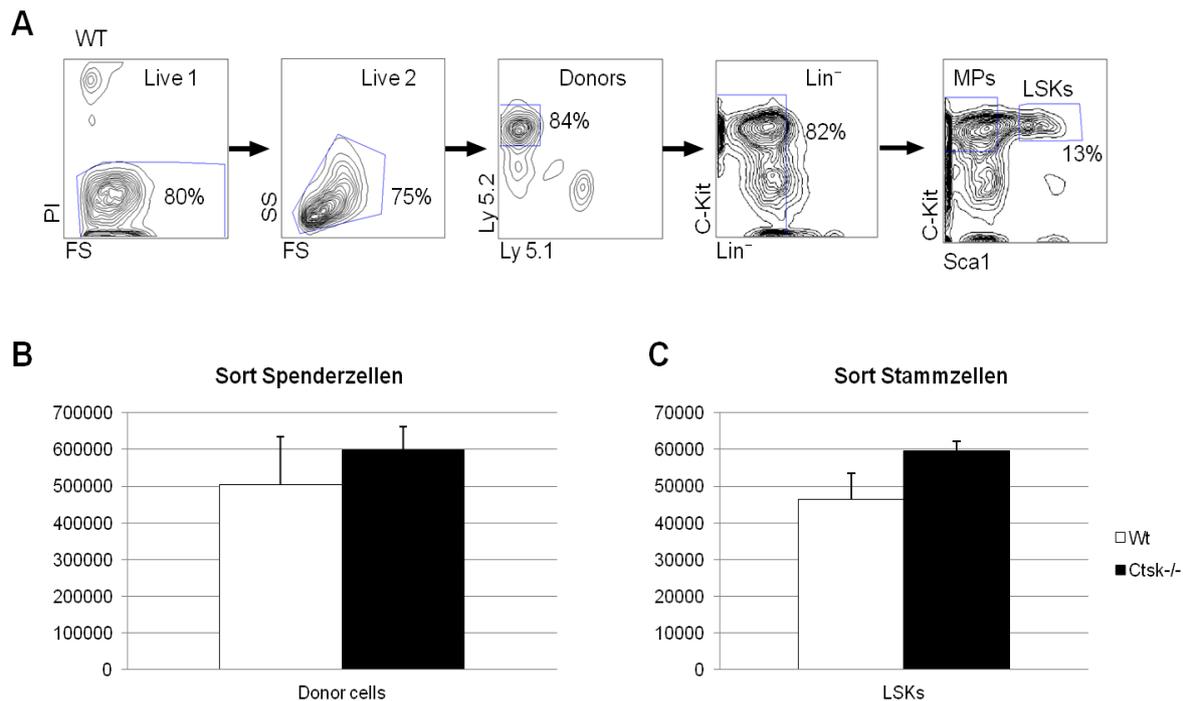


Abbildung 15: Sort 3 und 4 für sekundäre Transplantation. A) Reihenfolge der Populationsbestimmung beim Sort am WT-Beispiel. **B)** Spenderzellen in Absolutzahlen. **C)** LSKs in Absolutzahlen.

Die LSK-Populationen beider Gruppen waren mit 12% und 11% fast identisch.

4.8 Einführung in die Ergebnisse der sekundären Transplantation

Um die Regenerationsqualität primär transplanteder Stammzellen zu überprüfen, werden diese in der Regel in sekundäre Empfängertiere weiter transplantiert.

In dieser Arbeit wurde die sekundäre Transplantation zweimal durchgeführt, war aber leider nur einmal auswertbar. Die Daten der einen sekundären Transplantation wurden verworfen, da zu viele Mäuse gestorben waren. Es sollte noch erwähnt werden, dass die Mäuse der sekundären Transplantation abweichend von dem normalen Strahlenprotokoll bestrahlt wurden (siehe Kapitel 3.3).

Für die sekundäre Transplantation wurden pro Maus 1000 LSK-Zellen, von den primär mit Wildtyp- oder *Ctsk*^{-/-}-Knochenmark transplantierten Mäusen i.v. weiter

transplantiert. So hatte man wieder zwei zu vergleichende Gruppen. Beide erhielten außerdem noch Ly 5.1-Knochenmark- und -Milzzellen als Helferzellen (siehe Kapitel 3.3). Als Empfängermause wurden dieses Mal sowohl drei männliche Ly 5.1 als auch fünf 129xLy 5.1-Mäuse verwendet. Unter letzteren waren auch zwei Weibchen. Bei den 129xLy 5.1-Mäusen finden sich im Blutzellsystem sowohl das Ly 5.1- als auch das Ly 5.2-Antigen. Bei den sekundär transplantierten LSK-Zellen handelt es sich um Ly 5.2-Zellen; somit konnten Spender- und Empfängerzellen in allen Mäusen unterschieden werden. Insgesamt gab es drei Mäuse, die mit primären WT-LSK-Zellen transplantiert wurden und fünf Mäuse, die primäre *Ctsk*^{-/-}-LSK-Zellen erhielten.

Die Mäuse sind wieder nach fünf und zehn Wochen geblutet und nach 16 Wochen für die endgültige Analyse geopfert worden.

Sowohl die Wildtypgruppe als auch die Knockoutgruppe bestand aus Ly 5.1- und 129xLy 5.1-Empfängermäusen. Da in den Ergebnissen keine Unterschiede zwischen den Ly 5.1- und den 129xLy 5.1-Mäusen zu erkennen waren, werden diese Empfängermause nicht weiter unterschieden. Auch männliche und weibliche Empfängertiere wurden hier nicht weiter aufgetrennt.

Die Ergebnisse der sekundären Transplantation zeigten einige Auffälligkeiten im Vergleich zu der primären Transplantation.

4.9 Analyse der Gesamtzahlen der sekundären Transplantation

Bei den absoluten Gesamtzahlen von Knochenmark, Milz und peripherem Blut fallen keine signifikanten Unterschiede auf (siehe S. 53, Abb. 16).

Im Mittel hatten die drei Kontrolltiere mit Standardfehler $92 \times 10^6 \pm 29 \times 10^6$ Knochenmarkzellen pro Femur+Tibia, $70 \times 10^6 \pm 17 \times 10^6$ Zellen pro Milz und $3,5 \times 10^3 \pm 186$ Zellen im peripheren Blut pro μl (siehe S.53, Abb. 16 A+B). Die *Ctsk*^{-/-}-LSK-Spendergruppe zeigte im Mittel mit SEM $56 \times 10^6 \pm 8 \times 10^6$ BM-Zellen pro Femur+Tibia, $83 \times 10^6 \pm 10 \times 10^6$ Milzzellen pro Organ und im peripherem Blut $3,5 \times 10^3 \pm 923$ Zellen pro μl bei fünf Mäusen (siehe S. 53, Abb. 16 A+B). Während in

der mit WT-LSKs transplantierten Gruppe die Spannweite der Blutzellen pro μl nicht ausgeprägt war, $3,3 \times 10^3$ bis $3,9 \times 10^3$, war sie in der mit *Ctsk*^{-/-}-LSKs transplantierten Gruppe größer und ging von 700 Zellen/ μl bis $6,3 \times 10^3$ Zellen/ μl (s. u. Abb. 16 B).

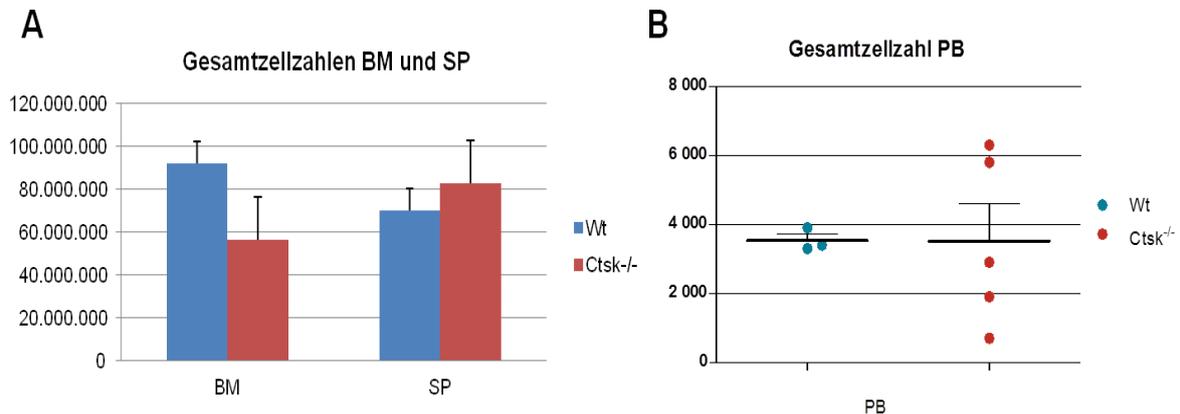


Abbildung 16: Sekundäre Transplantation Gesamtzellzahlen. A) Knochenmark (BM) und Milz (SP) als Balken. **B)** Peripheres Blut (PB) als Dotplot.

4.10 Analyse der Knochenmarkzellen der sekundären Transplantation

4.10.1 Stammzellfärbung des Knochenmarks

In den sekundären Empfängertieren fällt der niedrige Spenderzellanteil im Knochenmark beider Gruppen auf (Wildtyp:17% zu *Ctsk*^{-/-}:23%).

Die Zahl der Spender-LSKs war wohl limitierend, da bei einer mit WT-LSKs transplantierten Empfängermaus keine Regeneration der Spender-LSKs und -CLPs detektiert werden konnte und in zwei *Ctsk*^{-/-}-LSK-Empfängermäusen ebenfalls keine Spender-LSKs gefunden werden konnten.

Die Absolutzahlen der Spenderzellen variierten (siehe S. 54, Abb. 17 B). Im Mittel hatte die Kontrollgruppe $5,1 \times 10^6 \pm 3,8 \times 10^6$ Spenderzellen pro Femur+Tibia bei drei

Versuchstieren, während die mit KO-LSKs transplantierte Gruppe $9,1 \times 10^6 \pm 5,6 \times 10^6$ Spenderzellen (N=5) aufwies (s. u. Abb. 17 A).

Bei den regenerierten Lineage negativen Spenderzellen ist bei den Prozentzahlen ein signifikanter Unterschied aufzuzeigen. Die *Ctsk*^{-/-}-LSK-Gruppe hatte $3,7 \pm 0,6\%$ Lin⁻-Zellen, während die Wildtyp-LSK-Gruppe $1,6 \pm 0,4\%$ aufwies (p: 0,03).

In der weiteren Analyse der Unterpopulationen der LSK-Zellen fällt auf, dass keine CD34⁻-Population bei den Kontrolltieren beobachtet wurde (s. u. Abb. 17 D). In der Knockout-LSK-Spendergruppe waren im Schnitt 138 ± 88 CD34⁻-Zellen zu finden. Beide zu vergleichenden Gruppen zeigten aber eine CD34⁺-Population, welche aber keinen signifikanten Unterschied im statistischen Vergleich aufwies (s. u. Abb. 17 D).

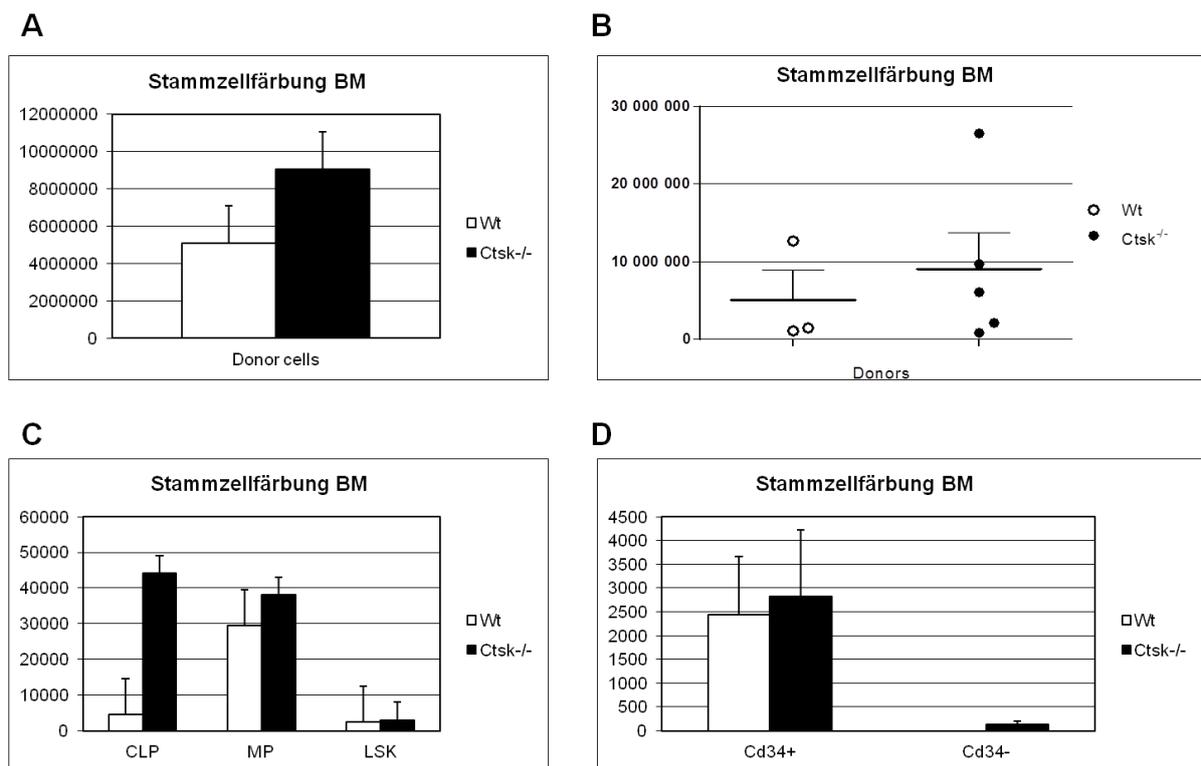


Abbildung 17: Sekundäre Transplantation Stammzellfärbung Knochenmark (BM) in Absolutzahlen. A) Spenderzellen als Balken. B) Spenderzellen als Dotplot. C) LSKs, MPs und CLPs. D) CD34-Unterpopulationen.

4.10.2 Reifezellfärbung des Knochenmarks

Es folgt die Beschreibung der Reifezellfärbung des Knochenmarks. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede, weder bei den Absolutzahlen (siehe S. 57, Abb. 18 A) noch bei den Prozentzahlen, zwischen den Gruppen gesehen werden. Wie bereits bei der Stammzellfärbung erwähnt, sah man auch bei der Untersuchung dieser Zellen, dass deutlich weniger Spenderzellen angenommen worden waren, als bei der primären Transplantation. Die Kontrollmäuse hatten im Schnitt 18% Spenderzellen, die mit *Ctsk*^{-/-}-LSKs transplantierte Gruppe hatte 23%.

Prozentual war die Verteilung der B- und T-Zellen sowie der Granulozyten und Monozyten annähernd normal. Die einzige Population, die etwas herausfiel, waren die B-Zellen. Sie waren bei den mit WT-LSKs transplantierten Mäusen mit 16% vertreten, bei der KO-LSK-Gruppe mit 9%, womit ihr Anteil in beiden Gruppen insgesamt klein war.

4.11 Analyse der Milzzellen der sekundären Transplantation

4.11.1 Stammzellfärbung der Milz

Bei der Auswertung der Milzzellen wurden auch hier beide Färbungen angewandt. Wie schon beim Knochenmark zeigte auch hier die Stammzellfärbung eine sehr niedrige Spenderzellzahl. Prozentual waren nur 2% Spenderzellen bei den Kontrollmäusen und 11% bei den mit *Ctsk*^{-/-}-LSKs transplantierten Mäusen zu finden.

Bei den Prozentzahlen der Lineage negativen Zellen fiel ein signifikanter Unterschied auf. Die *Ctsk*^{-/-}-LSK-Gruppe hatte mit 29% mehr Lineage negative Zellen als ihre Kontrollgruppe mit 5%. Der p-Wert lag bei 0,007, der U-Wert bei 0 und war damit ebenfalls signifikant.

Ansonsten muss erwähnt werden, dass zwei Kontrollmäuse und zwei mit KO-LSKs transplantierte Mäuse keine LSKs aufzeigten. Die komplette Kontrollgruppe hatte, wie in der Stammzellfärbung des Knochenmarks bereits beschrieben, auch hier keine CD34 negative Population.

4.11.2 Reifezellfärbung der Milz

Im Milzgewebe wurden auch die reifen Zellen untersucht (siehe S. 57, Abb. 18 B). Bei den reifen Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den T-Zellprozentzahlen (p-Wert=0,002), welche in der mit *Ctsk*^{-/-}-LSKs transplantierten Gruppe deutlich höher waren (43% zu 7%). Ansonsten sind Granulozyten und Monozyten mit nur 3% in der KO-LSK-Gruppe vertreten.

4.12 Analyse der peripheren Blutzellen der sekundären Transplantation

Bei der Untersuchung der reifen Zellen im peripheren Blut fällt genau wie bei der Analyse des Knochenmarks auf, dass wenig Spenderzellen zu finden sind (WT: 5% und *Ctsk*^{-/-}: 12%). Eine Kontrollmaus zeigte keine Donorzellen, eine andere hatte nur eine einzige Spenderzelle im peripheren Blut (siehe S. 57, Abb. 18 D). Insgesamt waren wenig reife Zellen bei den Spenderzellen zu finden (siehe S. 57, Abb. 18 C).

Man sieht bei den Prozentzahlen einen relevanten Unterschied bei den B-Zellen. Im Schnitt zeigte die WT-LSK-Gruppe 1%, die KO-LSK-Gruppe 15% (p: 0,02). Die T-Zellabsolutzahlen wiesen ebenfalls einen Unterschied auf (siehe S. 57, Abb. 18 C). Hier sah man signifikant mehr T-Zellen in der *Ctsk*^{-/-}-LSK-Gruppe als in der WT-LSK-Gruppe (p: 0,04).

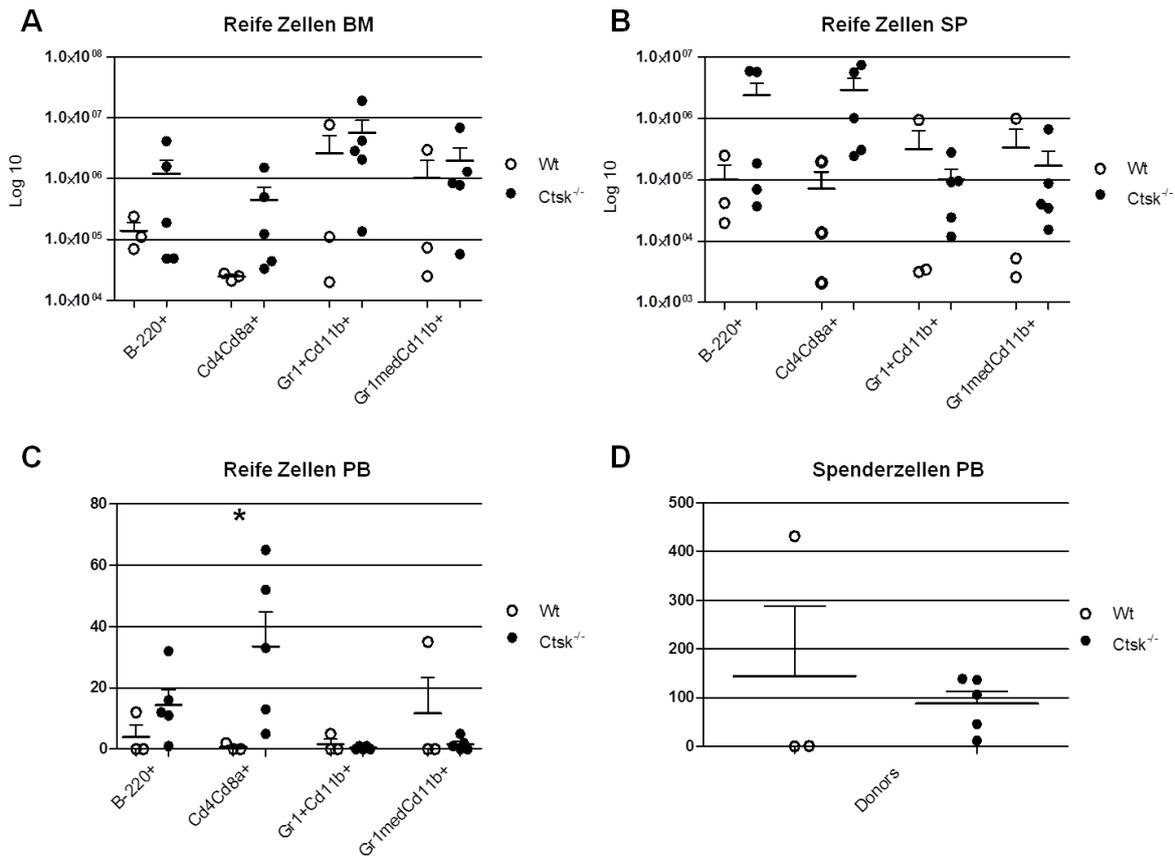


Abbildung 18: Sekundäre Transplantation Reifezellfärbung BM, SP und PB als Absolutzahlen in Dotplotform. A) Reife Zellen BM (Log₁₀ Darstellung). B) Reife Zellen SP (Log₁₀ Darstellung). C) Reife Zellen PB. D) Spenderzellen PB.

4.13 Einführung in die Blutabnahmen

Bei der Analyse der Mausdaten müssen auch die Blutabnahmen nach fünf und zehn Wochen berücksichtigt werden, die sowohl bei den primären als auch bei der sekundären Transplantation durchgeführt wurden.

4.13.1 Blutabnahmen der primären Transplantation

Es erfolgt zunächst die Beschreibung des Blutes nach fünf und zehn Wochen bei der primären Transplantation. Vorweg ist wichtig zu erklären, dass es Absolutzahlen nur

bei der ersten Blutung der zweiten primären Transplantation gab, weil hier das Blut außer mit der Durchflusszytometrie auch noch mit dem Blutzählmessgerät analysiert wurde. Alle anderen Zahlen sind Prozentzahlen. Die Mäuse der ersten primären Transplantation sind nicht geblutet worden.

Fünf Wochen nach der zweiten und dritten primären Transplantation ist den Mäusen zum ersten Mal Blut abgenommen worden. Im Kapitel 3.7 in der Abbildung 8 B (siehe S. 34) ist zu sehen wie die Zellen gegatet wurden. Der prozentuale Anteil an Spenderzellen war in beiden Gruppen größer als der der Empfängerzellen. Die Kontrollgruppe hatte 75% Spenderzellen, die mit *Ctsk*^{-/-}-KM transplantierte Gruppe 80%. Die reifen Zellpopulationen variierten zwischen den Gruppen nicht nennenswert (s. u. Abb. 19 B). In beiden Gruppen waren prozentual wenige Granulozyten zu finden (5-6%). Bei den Absolutzahlen gab es in beiden Gruppen so wenige Zellen in der myeloischen Reihe, dass man sie nicht in einem Diagramm darstellen konnte.

Bei der zweiten Blutabnahme nach zehn Wochen konnten nur prozentuale Anteile bestimmt werden. Dieses Mal sah der Anteil der Spenderzellen so aus, dass die WT-KM-Gruppe 92% Spenderzellen zeigte, die *Ctsk*^{-/-}-KM-Gruppe 88%. Prozentual waren in der myeloischen Reihe in beiden Gruppen nach wie vor wenige Zellen zu finden.

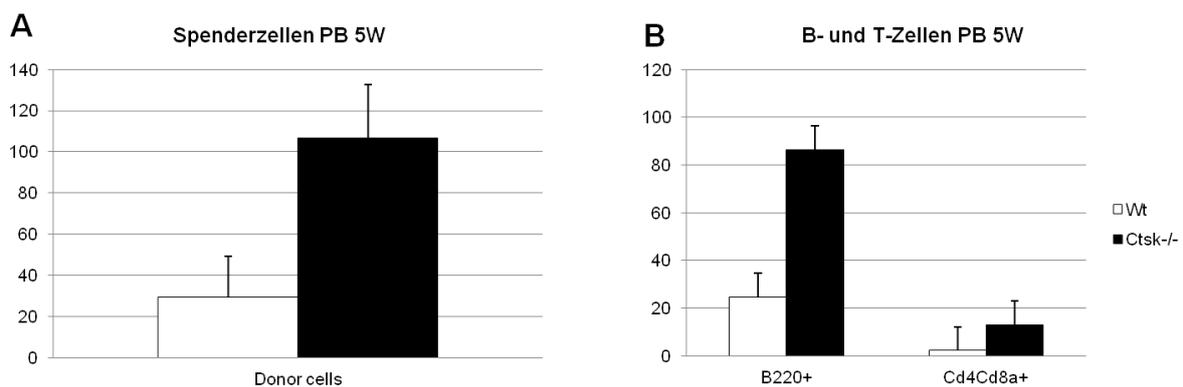


Abbildung 19: Primäre Transplantation geblutet 5. W. Absolutzahlen. A) Spenderzellen. B) B- und T-Zellen.

4.13.2 Blutabnahmen der sekundären Transplantation

Auch die sekundär transplantierten Mäuse wurden nach fünf und zehn Wochen geblutet. Hier gab es ebenfalls keine absoluten Zahlen. Es erfolgt zuerst die Beschreibung der Blutabnahme nach fünf Wochen.

Das Auffällige hier ist der geringe Anteil an Spenderzellen in beiden Gruppen (siehe S. 60, Abb. 20 A). In der mit *Ctsk*^{-/-}-LSKs transplantierten Gruppe waren es mit 6% signifikant mehr Spender als in der mit WT-LSKs transplantierten Gruppe mit 1% Spenderzellen (p-Wert: 0,03, U=0). Alle Mäuse zeigten mehr Empfänger- als Spenderzellen. Man sah im peripheren Blut nach fünf Wochen einen relevanten Unterschied bei den Granulozyten (p-Wert: 0,01, U=0). Die KO-LSK-Gruppe hatte 54% Granulozyten; ihre Kontrollen nur 13% (siehe S. 60, Abb. 20 C).

Bei der zweiten Blutabnahme der sekundären Transplantation soll vor allem auf die zwei Populationen der Spender- und Empfängerzellen geschaut werden. Der Anteil an Spenderzellen war in beiden Gruppen etwas größer als nach fünf Wochen. Die Kontrollgruppe hatte statt 1% nun 6%, während der Anteil in der *Ctsk*^{-/-}-Gruppe sich von 6% auf 21% steigerte (siehe S. 60, Abb. 20 A+B). Der Anteil an Empfängerzellen war dementsprechend niedriger.

Hier war außerdem ein signifikanter Unterschied bei den Spender-T-Zellen zu sehen (siehe S. 60, Abb. 20 D). Die KO-LSK-Gruppe hatte mehr T-Zellen (13% zu 3%). Der p-Wert lag bei 0,03.

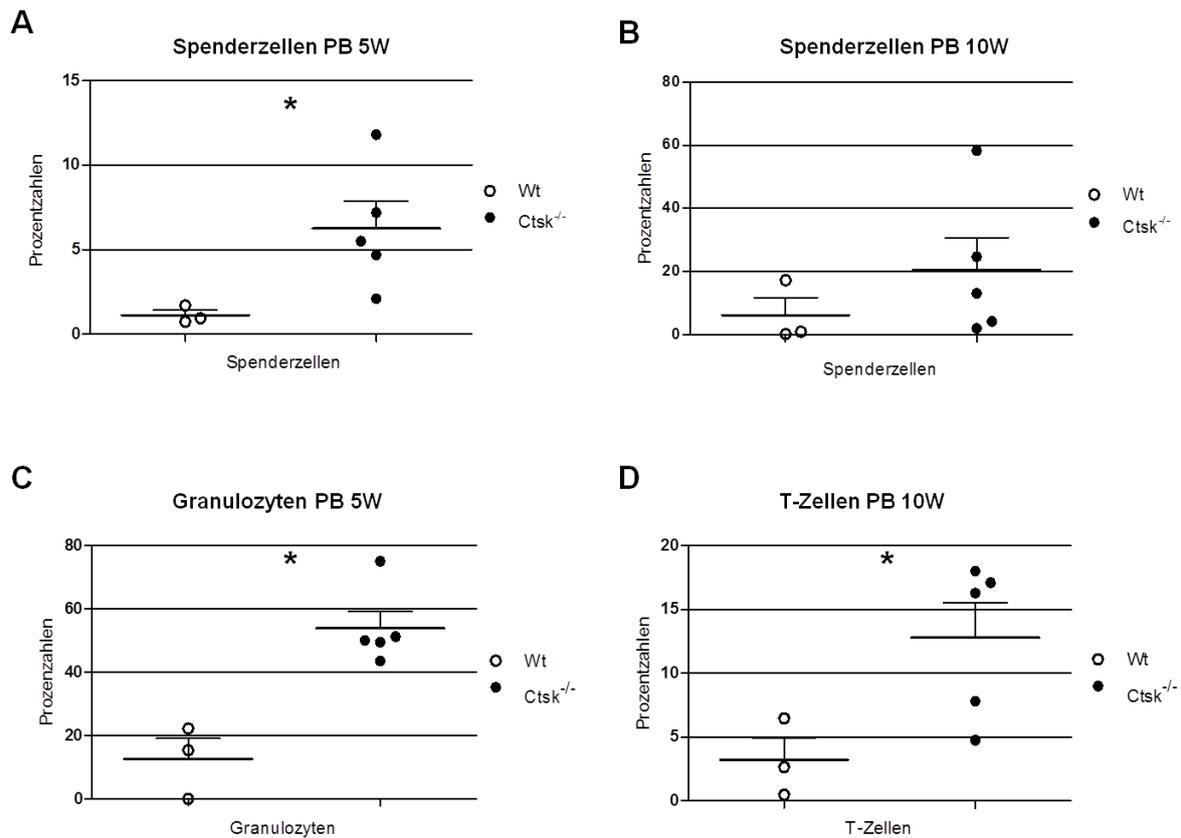


Abbildung 20: Sekundäre Transplantation geblutet 5. W. und 10. W. Prozentzahlen.
A) Spenderzellen nach 5. W. **B)** Spenderzellen nach 10. W. **C)** Granulozyten nach 5. W.
D) T-Zellen nach 10. W.

4.14 Sortergebnisse der Immunzytologiefärbung

Vorherige, noch nicht publizierte, Untersuchungen im Labor Oostendorp hatten gezeigt, dass es bei der Charakterisierung von *Ctsk*^{-/-}-Mäusen Unterschiede im Vergleich zu Wildtypmäusen gab. Bei den Knockouts fiel bei der Analyse der Stamm- und Progenitorzellen eine signifikante Verringerung der GMPs auf. Da bei der beobachteten Veränderung der Zellzahlen auch eine veränderte Proteinexpression nicht auszuschließen ist, analysiere ich in dieser Arbeit die Proteinexpression in *Ctsk*^{-/-}- und Wildtypmäusen. Ich möchte aufzeigen, ob Unterschiede auch auf Proteinebene zu erkennen sind.

Es wird nun auf die beiden Sorts für die Immunfluoreszenzfärbungen eingegangen. Die von mehreren Mäusen gewonnenen Zellen wurden ihrem Genotyp entsprechend

zusammengeführt. Hierbei ging es also nicht um die Betrachtung einzelner Mäuse, sondern um die Analyse der Wildtyp- und *Ctsk*^{-/-}-Gruppe im Ganzen.

Im ersten Sortversuch hatte man fünf Wildtypmäuse und acht *Ctsk*^{-/-}-Mäuse zur Verfügung. Die *Ctsk*^{-/-}-Gruppe zeigte im Knochenmark doppelt so viele Zellen wie ihre Kontrollgruppe. Im zweiten Versuch hatte man je Gruppe fünf Tiere. Hier war die Gesamtzellzahl des Knochenmarks in beiden Gruppen gleich. Im Sort sind zunächst tote Zellen aussortiert und dann Lineage negative aus den lebenden Zellen bestimmt worden. Da vor jedem Sort eine Lineagetrennung (Kapitel 3.9) durchgeführt wurde, war dieser Zellanteil sehr hoch. Daraus sind anschließend die CLPs, MPs und LSKs bestimmt worden (siehe S. 62, Abb. 21 A).

Bei den Prozentzahlen ist ein signifikanter Unterschied aufgefallen. Die *Ctsk*^{-/-}-Mäuse wiesen mit 19% versus 23% weniger MPs auf. Der p-Wert lag bei 0,03. Ansonsten waren die Prozentzahlen für die anderen beiden Zelltypen nahezu identisch.

Die Mittelwerte, in absoluten Zahlen ausgedrückt, sind in der Wildtypgruppe kleiner, da auch insgesamt weniger Zellen in dieser Gruppe waren (siehe S. 62, Abb. 21 B). In absoluten Zahlen hatte die Kontrollgruppe ungefähr etwa die Hälfte der Zellzahlen. Es gab in dieser Gruppe im Mittel mit Standardfehler $12 \times 10^3 \pm 5 \times 10^3$ CLPs, $19 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$ LSKs und $43 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$ MPs. Die Knockout-Mäuse hatten im Schnitt $24 \times 10^3 \pm 17 \times 10^3$ CLPs, $56 \times 10^3 \pm 13 \times 10^3$ LSKs und $75 \times 10^3 \pm 15 \times 10^3$ MPs.

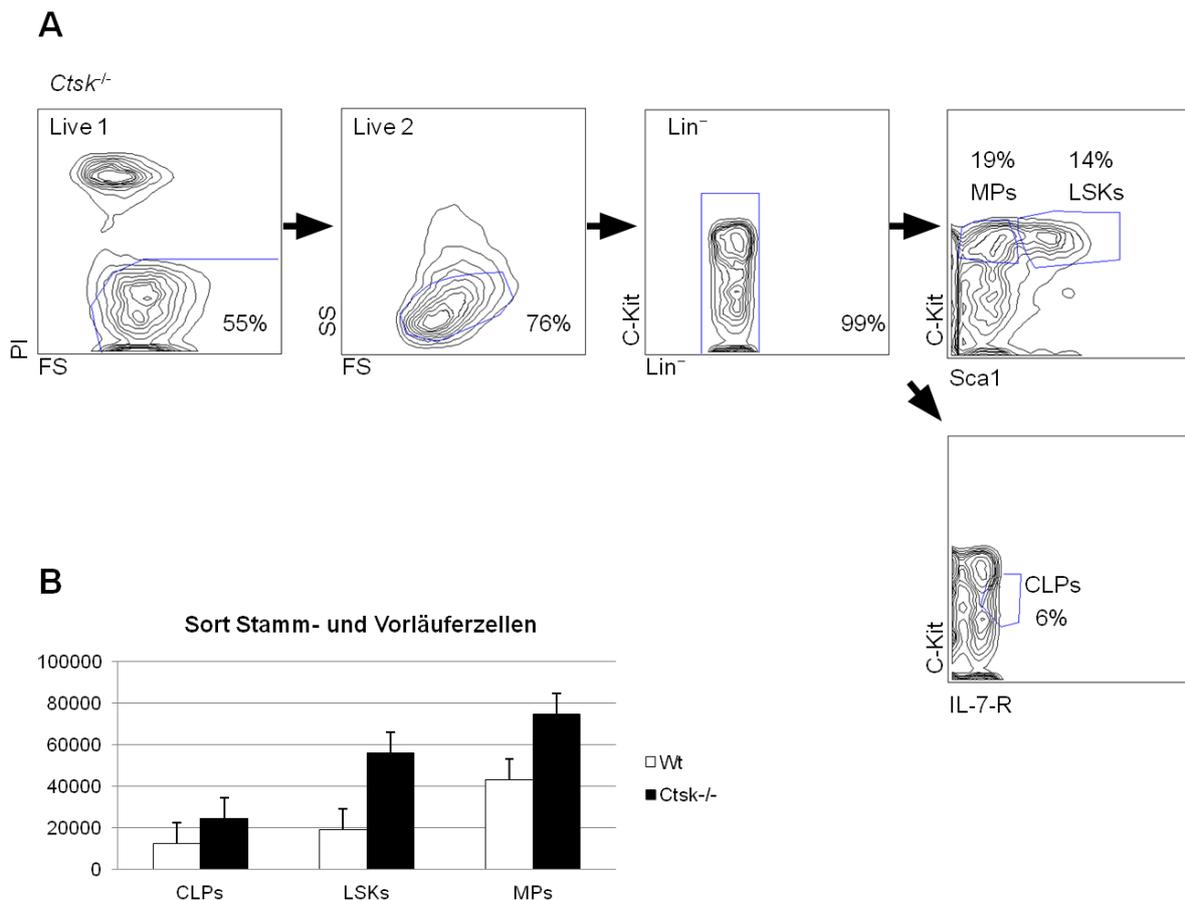


Abbildung 21: Sort 1 und 2 für Immunfluoreszenzfärbung. A) Darstellung der Sortreihenfolge am Beispiel von *Ctsk*^{-/-} mit Prozentzahlen von LSKs, MPs und CLPs. **B)** CLPs, LSKs und MPs in Absolutzahlen.

4.15 Einführung in die Ergebnisse der Immunzytologie

Bei der Immunzytologieauswertung wurden abermals die *Ctsk*^{-/-} mit der Wildtypgruppe (*Ctsk*^{+/+}) verglichen. Aus beiden Gruppen sind vorher, wie oben beschrieben, die LSKs, MPs und CLPs gesortet worden (siehe S. 36, Kapitel 3.9). Die Zellen wurden auf Objektträger aufgetragen, mit einem primären und anschließend mit einem sekundären Antikörper gefärbt (siehe Kapitel 3.10). Ziel war es, zu untersuchen, ob es Unterschiede bei der Proteinexpression gab. Bei den Proteinen, die untersucht wurden, handelte es sich um Proteine der Wnt-Signalwege. Ein Überblick über die Wnt-Signalwege und die Interaktion der beteiligten Proteine bietet Abbildung 5 aus Kapitel 1.11 (siehe S. 14). Abbildung 22 (siehe S. 63) hebt die für die Immunfluoreszenz wichtigen Proteine hervor.

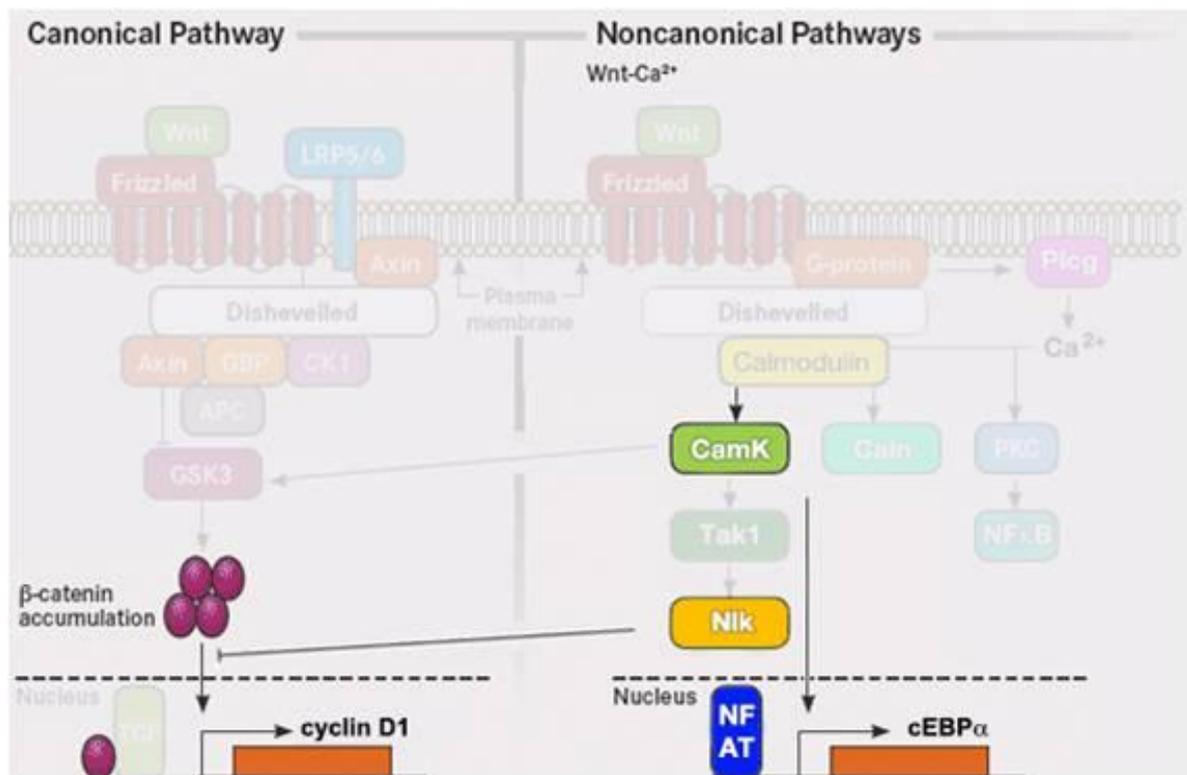


Abbildung 22: Schemadarstellung der Wnt-Signalwege (kanonisch und nicht-kanonisch) mit Hervorhebung der für die Immunfluoreszenz wichtigen Proteine. Vergleiche hierzu auch Abbildung 5.

Es konnten signifikante Unterschiede gesehen werden (siehe S. 65, 66, Abb. 23). Zunächst wird auf die aufgefallenen Signifikanzen beim kanonischen Wnt-Signalweg eingegangen.

In der Knockoutgruppe zeigte die LSK-Population eine deutlich erhöhte Expression von Beta-Catenin (p-Wert: 0,001). In Abbildung 23 A und B ist der Unterschied der Beta-Catenin-Expression dargestellt. Des Weiteren zeigten die MPs eine erhöhte Expression von Zyklin D1 (siehe S.65, Abb. 23 E+F). Sonst sind im kanonischen Signalweg keine Unterschiede mehr zu erkennen (siehe S. 65, 66, Abb. 23 A+E+I).

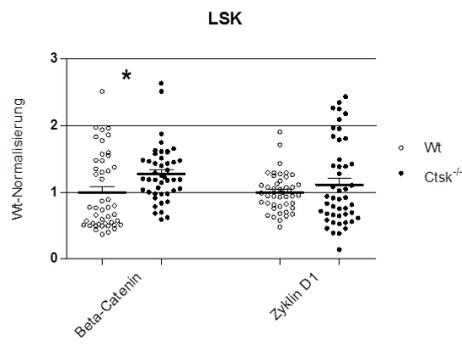
Auch beim nicht-kanonischen Wnt-Signalweg waren Unterschiede zu sehen (siehe S. 65, 66, Abb. 23 C+G+J). Die LSKs der *Ctsk*^{-/-}-Gruppe zeigten deutlich mehr CaMKII (Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II), was in Abbildung 23 C und D dargestellt ist. Hier lag der p-Wert bei 0,001. Bei den MPs sah man keine Signifikanz und die CLPs hatten nicht gefärbt (siehe S. 65, 66, Abb. 23 G+J).

Beim Protein Phospho-CaMKII zeigte keine Zellpopulation einen aussagekräftigen Unterschied (siehe S. 65, 66, Abb. 23 C+G+J). Auch bei den beiden Proteinen NLK und NFAT war keine Signifikanz festzustellen. Die Werte zwischen den Gruppen waren fast identisch.

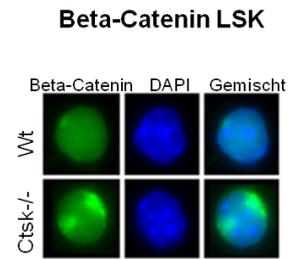
Das nächste Protein, das angeschaut wurde, war das CEBP α . Bei der MP- und CLP-Population gab es einen sehr aussagekräftigen Unterschied (siehe S. 65, 66, Abb. 23 G+J). Auch hier exprimierten die Knockoutzellen das Protein deutlich stärker (p-Wert: 0,001).

Vier signifikante Proteine wurden noch als Immunfluoreszenzbild dargestellt, die in den Abbildungen 23 B, D, F und H zu erkennen sind.

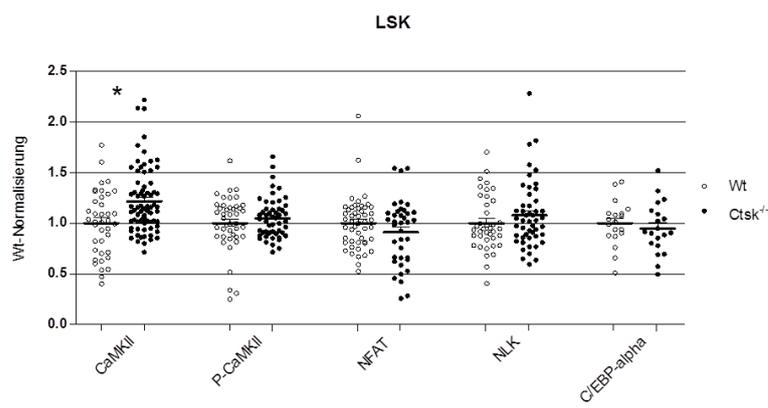
A



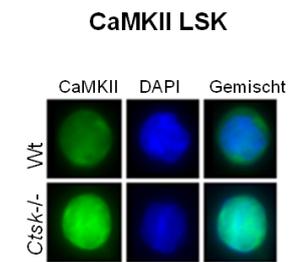
B



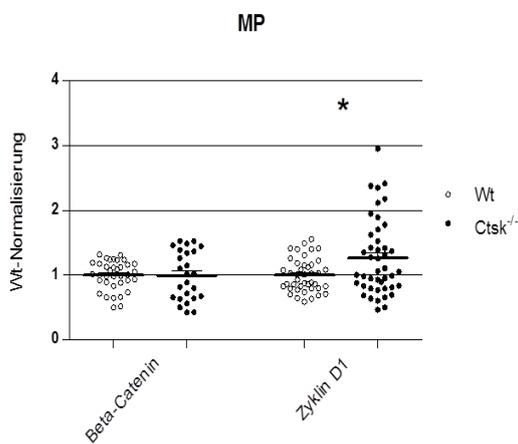
C



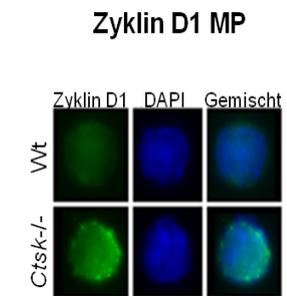
D



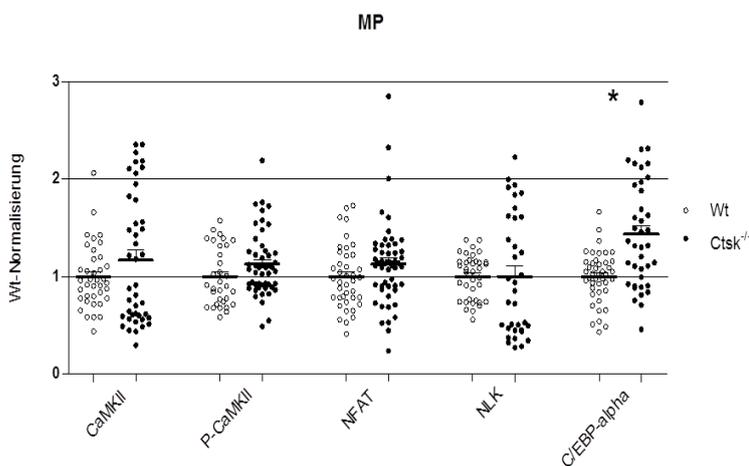
E



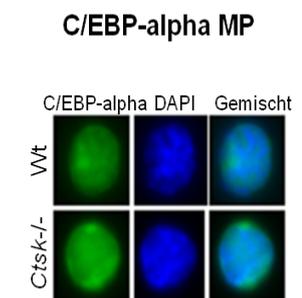
F



G



H



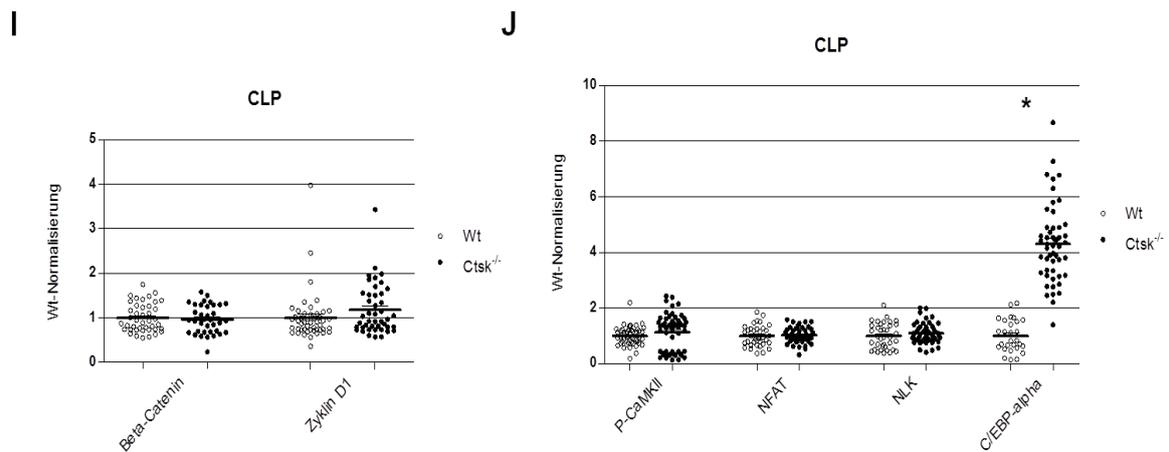


Abbildung 23: Immunzytologie Darstellung der Proteine als Dotplot (A, C, E, G, I, J) und Fluoreszenzbilder (B, D, F, H). Dotplots sind auf WT normalisiert. A) LSKs kanonischer Wnt-Signalweg. B) LSKs Beta-Catenin. C) LSKs nicht-kanonischer Wnt-Signalweg. D) LSKs CaMKII. E) MPs kanonischer Wnt-Signalweg. F) MPs Zyclin D1. G) MPs nicht-kanonischer Wnt-Signalweg. H) MPs C/EBP alpha. I) CLPs kanonischer Wnt-Signalweg. J) CLPs nicht-kanonischer Wnt-Signalweg.

5. Diskussion

5.1 Diskussion zur primären Transplantation

In meiner Arbeit wurde folgende Hypothese verfolgt: „Von hämatopoetischen Zellen exprimiertes Kathepsin K (CTSK) leistet einen entscheidenden Beitrag zur Stammzellregeneration nach Transplantationen.“ Vorherige Untersuchungen im Oostendorp-Labor hatten sich vor allem mit dem Beitrag der Mikroumgebung befasst. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass sich die *Ctsk*-Knockout-Mikroumgebung auf die Hämatopoese auswirkt. Dabei wurden in mit Wildtypstammzellen transplantierten *Ctsk*^{-/-}-Mäusen weniger funktionsfähige HSCs gefunden, was mit einer verringerten Repopulation der lymphatischen Reihe assoziiert war. Da CTSK aber ein Enzym ist, das besonders stark von hämatopoetischen Zellen, wie zum Beispiel Osteoklasten, exprimiert wird und diese Teil der myeloischen Reihe sind, ist es gut möglich, dass es zwischen WT- und KO-HSCs Unterschiede gibt, die sich auf die Mikroumgebung und letztendlich auch auf die Regeneration der Hämatopoese auswirken.

Als Gegenhypothese kann angeführt werden, dass bei meinen Wildtypempfängermäusen zum Transplantationszeitpunkt eine intakte Nische vorlag, da die Nischenentwicklung bis dahin ungestört verlaufen konnte. Möglicherweise ist nun der Effekt von den Kathepsin K defizienten hämatopoetischen Zellen für den Erhalt der Nische nicht von so großer Bedeutung, dass man Unterschiede in der Hämatopoese sehen könnte. So ist für Osteoklasten beispielsweise bekannt, dass sie für die Nischenentstehung benötigt werden (Mansour A et al. 2012); ihre Rolle im Nischenerhalt bleibt allerdings weiterhin umstritten. Die Arbeitsgruppe um Blin-Wakkach unterstellte Osteoklasten eine wichtige Rolle im Erhalt der hämatopoetischen Stammzellnische (Blin-Wakkach C et al. 2014); wohingegen die Arbeitsgruppe um Flores erläuterte, dass Osteoklasten für den Erhalt der hämatopoetischen Stammzellnische in adulten Mäusen keine entscheidende Rolle spielten (Flores C et al. 2013).

Die Ergebnisse der primären Transplantationsversuche mit WT- und *Ctsk*^{-/-}-Spenderzellen zeigten bei gutem Anwachsen der Spenderzellen fünf und zehn Wochen nach Transplantation keine großen Unterschiede. Bei der Endanalyse nach 16 Wochen wurde ein signifikanter Unterschied bei den reifen Granulozyten beobachtet. Die mit *Ctsk*^{-/-}-Knochenmark transplantierte Gruppe hatte prozentual und absolut weniger Granulozyten im Knochenmark als ihre Vergleichsgruppe. Interessanterweise wurden weder in der Milz noch im peripheren Blut Unterschiede bei den Granulozytenwerten gesehen. Die sich anschließende Frage war, warum sich Unterschiede in den Granulozytenwerten im Knochenmark zeigten, nicht aber in der Milz und im peripheren Blut. Ein Erklärungsansatz wird im Folgenden gegeben. Obwohl keine spezifische Erklärung aus den beschriebenen Daten gewonnen werden konnte, wäre eine mögliche Erklärung für die oben beschriebene Beobachtung, dass kompensatorisch mehr Granulozyten ins periphere Blut entlassen worden waren. Wenn grundsätzlich die Bildung der granulozytären Reihe eingeschränkt ist, könnte die Nische versuchen die Anzahl der Granulozyten im Blut möglichst konstant zu halten. Das Knochenmark ist für solche Kompensationsmechanismen bekannt. Es kann auf Stress reagieren und versucht die Zahl hämatopoetischer Zellen im Blut konstant zu halten (Wilson A et al. 2008; Essers MA et al. 2009; Baldrige MT et al. 2010).

Das Anwachsen der Wildtyp- und *Ctsk*^{-/-}-Spenderzellen funktionierte in beiden Gruppen insgesamt gleich gut, weil zu allen drei Zeitpunkten der Überwachung, nämlich nach 5, 10 und 16 Wochen, im peripheren Blut und nach 16 Wochen auch im Knochenmark und in der Milz ähnliche Spenderzellanzahlen vorlagen. Daraus lässt sich schließen, dass sich Knockout-HSCs genauso gut in der Nische einfanden wie ihre Kontrollen. Eine weitere interessante Beobachtung sollte noch diskutiert werden; beide Gruppen wiesen bei der Endanalyse im peripheren Blut wenig Granulozyten und Monozyten auf. Der B-Zellanteil hingegen lag in beiden Gruppen bei etwa 66% und war damit hoch. Da Kurzzeit repopulierende Zellen (ST-HSCs) eher die lymphatische Reihe bevorzugt herstellen, könnte das heißen, dass sich hier wahrscheinlich eher diese ST-HSCs durchgesetzt haben.

Zusammenfassend kann man für die primäre Transplantation sagen, dass bei den Granulozyten ein signifikanter Unterschied auffiel. Möglicherweise war also die myeloische Entwicklung der mit *Ctsk*^{-/-}-Knochenmark transplantierten Mäuse

eingeschränkt. Ansonsten scheinen Nische und Hämatopoese zwischen den mit *Ctsk*^{-/-}- und WT-Knochenmark transplantierten Mäusen weitestgehend ähnlich. Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kathepsin K defiziente hämatopoetische Zellen, die sich aus *Ctsk*^{-/-}-HSCs entwickeln, keinen entscheidenden Einfluss auf Erhalt und Funktion der Nische haben. Man könnte also schlussfolgern, dass Osteoklasten, die ja vorrangig Kathepsin K exprimieren, in diesen Versuchen entweder keinen Funktionsverlust aufwiesen oder dass der Empfänger das Osteoklasten-Kompartiment komplett versorgte. Die Hämatopoese verlief in den Vergleichsgruppen also weitestgehend normal; das heißt, meine oben formulierte Arbeitshypothese, dass Kathepsin K einen entscheidenden Einfluss auf die Regeneration der Blutzellentstehung nach Transplantationen habe, konnte nur teilweise bestätigt werden.

5.2 Diskussion zur sekundären Transplantation

Ein sekundäres Anwachsen von Spenderstammzellen ist ein Hinweis auf eine gute Stammzellqualität und ein gutes Selbsterneuerungspotential. 1000 LSK-Zellen aus primär transplantierten Mäusen wurden in sekundäre Empfängermäuse weitertransplantiert und wuchsen hier im Knochenmark nur zu 20%, in der Milz nur zu 5% an. Im peripheren Blut zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die angewachsene Spenderzellzahl ist damit im Vergleich zur primären Transplantation, bei der circa 250 LSK-Zellen transplantiert wurden, eher klein. Es ist aber durchaus bekannt, dass die Regenerationsfähigkeit von HSCs bei sekundären Transplantationen abnimmt (Siminovitch L et al. 1964).

Bei Betrachtung der Blutabnahmen nach fünf Wochen wurden in der Gruppe der *Ctsk*^{-/-}-Spenderstammzellen prozentual mehr Spenderzellen beobachtet (WT-Gruppe 1%, KO-Gruppe 6%). Anscheinend entwickelten sich die transplantierten KO-HSCs bis zur Woche fünf schneller. Relativiert wird diese Aussage von der Tatsache, dass es insgesamt nur drei Wildtypkontrolltiere gab, von denen sogar zwei kein erfolgreiches Engraftment zeigten. Selbst nach 10 und 16 Wochen hatten diese beiden Mäuse immer noch unter 1% Spenderzellen und galten als nicht

angewachsen. Somit hatte man nur eine Kontrollmaus mit erfolgreichem Engraftment, womit Aussagen über mögliche Ursachen für Unterschiede zu vage waren. Generell sollte die Frage gestellt werden, ob überhaupt von einer erfolgreichen sekundären Transplantation gesprochen werden kann, wenn zwei Drittel der Wildtypmäuse kein Engraftment zeigten. Meiner Meinung nach ist eine Versuchswiederholung mit einer größeren Mausanzahl sinnvoll, um fundiertere Aussagen tätigen zu können.

5.3 Diskussion zur Immunzytologie

5.3.1 Einleitung zur Immunzytologie

In meiner Arbeit untersuchte ich die Rolle von Kathepsin K (CTSK) in der Hämatopoese. Vorherige Untersuchungen zu diesem Thema aus dem Oostendorp-Labor hatten sich unter anderem auch mit der hämatologischen Charakterisierung von *Ctsk*^{-/-}-Mäusen beschäftigt. Hierbei ist aufgefallen, dass Untersuchungen der einzelnen Stamm- und Progenitorzellpopulationen einen Unterschied zeigten. Die Population der Granulozyten/Makrophagen Vorläuferzellen (GMPs) war in den Knockouttieren signifikant kleiner als bei ihren Wildtypvergleichstieren. Wieso hier ein Unterschied zu sehen war, blieb noch ungeklärt. Auf Grund früherer Ergebnisse, dass CTSK sowohl von Stroma- als auch von Blutzellen exprimiert wird, ist die Hypothese meiner Arbeit, dass sich die beiden untersuchten Gruppen in der Proteinexpression unterscheiden.

In der aktuellen Forschung wird sich intensiv mit der hämatopoetischen Stammzellnische und deren Signalen auseinandergesetzt. Verschiedene Signalwege, wie auch Wnt-Signale und Wnt-Inhibitoren, wie WNT5A (Buckley SM et al. 2011), SFRP-1 (Renström J et al. 2009) und CTGF (Istvanffy R et al. 2015), spielen in der Nischenentstehung und im Nischenerhalt eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund habe ich in meiner Doktorarbeit Proteine des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

untersucht. Meine Versuche hatten unter anderem zum Ziel, herauszufinden, ob Unterschiede in der Proteinexpression hämatopoetischer Zellen möglicherweise eine Erklärung für die kleinere GMP-Population in *Ctsk*^{-/-}-Mäusen darstellten.

Vier von sieben Proteinen zeigten einen signifikanten Unterschied in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen: Beta-Catenin und CaMKII waren in LSK-Zellen von *Ctsk*^{-/-}-Mäusen erhöht, Zyklin D1 in MPs der *Ctsk*^{-/-}-Mäuse und C/EBP alpha in MPs und CLPs der *Ctsk*^{-/-}-Tiere (siehe S. 65, 66, Kapitel 4.15, Abbildung 23).

5.3.2 Diskussion der signifikanten Immunzytologieergebnisse

Eine signifikant erhöhte Expression des Proteins Beta-Catenin, das die Signalkaskade des kanonischen Wnt-Signalwegs prägt (Kimelman D und Xu W. 2006), fördert das Zellwachstum durch vermehrte Transkription von *Zyklin D1* und *MYC* (He TC et al. 1998). *MYC* ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Lymphomforschung schon lange bekannt ist, da seine Dysregulation zum Burkitt-Lymphom führen kann (Cory S. 1986). Er ist ein Protoonkogen und fördert Wachstum (Roussel MF. 1998). Außerdem konnte meine Arbeit zeigen, dass *Ctsk*^{-/-}-LSKs vermehrt CaMKII exprimieren. Dieses Protein ist Teil des Kalzium abhängigen nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs (siehe S. 14, Abb. 5). Die CaMKII aktiviert unter anderem die nachgeordneten Proteine NLK und NFAT. Letzteres sorgt unter anderem für eine erhöhte Expression von transkriptionellen Zielgenen, wie zum Beispiel dem *Cebpa*.

In diesem Zusammenhang ist noch interessant, dass es Interaktionen zwischen dem kanonischen und dem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg gibt (Flentke GR et al. 2014). Die CaMKII phosphoryliert im aktivierten Zustand im Kern vorhandenes Beta-Catenin. Durch diese Phosphorylierung verliert das Beta-Catenin seine Affinität zu Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-1-Familie. Dadurch werden auch seine Zielgene, wie *MYC* und *Zyklin D1*, vermindert transkribiert. Indirekt werden also das Wachstum und die Proteinexpression des kanonischen Wnt-Signalwegs über diesen Kalzium abhängigen Signalweg gehemmt. Man muss außerdem erwähnen, dass die

CaMKII Beta-Catenin an einer anderen Stelle als die GSK3 beta phosphoryliert. Letztere phosphoryliert Beta-Catenin an folgenden Serin- und Threoninresten: Thr41, Ser37, und Ser33; die CaMKII am Thr332, Thr472 und Ser552 (Flentke GR et al. 2014). Durch die Phosphorylierung der GSK3 beta wird das intrazelluläre Beta-Catenin niedrig gehalten, da dieser Prozess zu dessen Abbau im Proteasom führt. Dem gegenüber führt die Phosphorylierung des Beta-Catenins durch CaMKII zu einer Affinitätsabnahme und auf diesem Weg zu einer Herunterregulierung des kanonischen Signalwegs. Eine weitere Verknüpfung zwischen kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg besteht über NLK (Ishitani T et al. 1999, 2003). Dieses Protein phosphoryliert die TCF/LEF-1 Transkriptionsfaktoren. Auf diese Weise wird die Affinität von Beta-Catenin zu diesen Faktoren ebenfalls herabgesetzt. Zusammenfassend werden hier also zwei Interaktionen zwischen kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg beschrieben, die beide zu einer verminderten Transkription Beta-Catenin abhängiger Proteine führen.

In meiner Arbeit zeigte sich eine signifikant erhöhte Beta-Catenin-Expression; ob es sich hierbei um nicht phosphoryliertes oder von der CaMKII phosphoryliertes Beta-Catenin handelte, konnte jedoch nicht geklärt werden. Für diese Unterscheidung hätte es einen speziellen Antikörper bedurft, der das Phospho-Beta-Catenin der CaMKII erkennt. Fest steht, dass es sich nicht um klassisches Phospho-Beta-Catenin handelte, das von der GSK3 beta phosphoryliert wurde, weil der in dieser Arbeit verwendete Anti-Beta-Catenin-Antikörper dieses nicht färbt. Auch sind weitere noch nicht erforschte Verknüpfungen zwischen den zwei Wnt-Signalwegen nicht auszuschließen. In einer Arbeit von Song et al. aus dem Jahr 2010 wurde beispielsweise gezeigt, dass die CaMKII auch die GSK3 beta phosphorylieren und somit hemmen kann. Diese Erkenntnisse könnten auch für meine Arbeit relevant sein, da die Hemmung der GSK3 beta durch CaMKII das beobachtete, erhöhte Beta-Catenin-Level erklären könnte. Da beide Proteine, Beta-Catenin und CaMKII, erhöht vorliegen, könnte man annehmen, dass CaMKII in *Ctsk*^{-/-}-Zellen eher die GSK3 beta, als das Beta-Catenin phosphoryliert.

Beta-Catenin und CaMKII sind Proteine, die Proliferation und Wachstum beeinflussen. Durch die Komplexität ihrer Signale und ihrer unterschiedlichen Proteininteraktionen war in meiner Arbeit jedoch schwer abschätzbar, ob insgesamt eine positive oder negative Wachstumsbeeinflussung stattfand. Für zukünftige

Experimente halte ich zur Untersuchung eines erhöhten Zellwachstums daher die Bestimmung der Proliferationsmarker Ki-67 und BrdU für sinnvoll. Ersteres ist ein Protein, das in Zellkernen von sich teilenden Zellen gefunden wurde. Es stellt einen guten Zellproliferationsmarker dar, weil es ausschließlich in den aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird; in der G1-, S-, G2- und M-Phase, nicht jedoch in der G0-Phase (Gerdes J et al. 1984; Scholzen G und Werdes J. 2000). Heute wird es vor allem in der Diagnostik von Mammakarzinomen eingesetzt, da es dort einen prognostischen Wert besitzt (Inwald EC et al. 2013). Zweiteres ist ein synthetisches Nukleosid, das ebenfalls als Proliferationsmarker fungiert. Genau genommen ist BrdU ein Replikationsmarker, der anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird, um diese als neu synthetisiert kenntlich zu machen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Unterschiede in der Proteinexpression in der Stammzell angereicherten LSK-Population zwischen WT- und *Ctsk*^{-/-}-Mäusen vorlagen. Daher lässt sich vermuten, dass die veränderte Proteinexpression in letzter Konsequenz auch zu einem veränderten Wachstum führen kann. Wenn das so wäre, dann sollte dies in den Vorläufer angereicherten MPs nachvollziehbar sein.

In den MPs fiel eine signifikant erhöhte Expression von C/EBP alpha auf. C/EBP alpha hemmt die Zyklin-abhängigen Kinasen 2 und 4 (CDK 2 und 4) und kann so das Zellwachstum einschränken oder sogar stoppen (Wang H et al. 2001). Es ist weiterhin unabdingbar für die Granulozytenformation (Zhang DE et al. 1997) und ein Schlüsselfaktor für die frühe Granulopoese (Radomska HS et al. 1998). Bekannt ist auch, dass C/EPB alpha für die Differenzierung von MPs zu GMPs benötigt wird (Zhang P et al. 2004).

Auf Grund der beobachteten Proteinexpression von C/EBP alpha in meinen Versuchen scheint es zunächst so, als hätten Knockoutmäuse ein erhöhtes Differenzierungspotential zu myeloischen Zellen. Werden nun die Prozentzahlen der Sortauswertung hinzugezogen, zeigte sich wider Erwarten, dass Wildtypmäuse mit 23% signifikant mehr MPs aufwiesen als die Knockoutmäuse mit nur 19%. Die Frage, die sich folglich anschließt, ist, warum es ein erhöhtes, myeloisches Differenzierungspotential in den *Ctsk*^{-/-}-Mäusen gab, die MP-Population aber trotzdem kleiner war, als in den Wildtypkontrollen. Eine Hypothese dazu ist, dass, um eine annähernd vergleichbare Zahl myeloischer Zellen produzieren zu können, das

myeloische Differenzierungspotential des Knockoutstamms überproportional größer sein müsste als das des Wildtypstamms. Eine andere Erklärung wäre, dass CTSK am Überleben der MPs beteiligt ist, und dass die aus Knockout-Stammzellen gewachsenen, myeloiden Zellen öfter absterben als die des Wildtypstamms.

Zu der ersten Hypothese passt auch, dass die Knockout-CLPs ebenfalls eine signifikant erhöhte C/EBP alpha-Konzentration zeigten. In der Regel ist dieses Protein in lymphatischen Zellen herabreguliert (Miyamoto T et al. 2002). Obwohl C/EBP alpha als Protein für die myeloide Differenzierung schon seit geraumer Zeit bekannt war, zeigten neuere, wissenschaftliche Studien ein erweitertes Bild dieses Proteins. Bereits 2004 wurde erläutert, dass sich CD19⁺-B-Lymphozyten durch Erhöhung der C/EBP alpha-Konzentration zu Makrophagen differenzieren können (Xie H et al. 2004). Ähnliche Erkenntnisse hatte auch die Forschungsgruppe um Fukuchi, die zeigen konnte, dass aus CLPs und MEPs durch kurzzeitige Erhöhung der C/EBP alpha-Konzentration Makrophagen wurden (Fukuchi Y et al. 2006). Möglicherweise ist also die erhöhte C/EBP alpha-Konzentration nicht nur in KO-MPs, sondern auch in KO-CLPs als ein Mechanismus zu verstehen, der die eingeschränkte myeloische Differenzierung stärken soll. Das zusätzliche myeloide Differenzierungspotential von CLPs kann durch deren C/EBP alpha-Hochregulierung also unterstützend zur myeloischen Entwicklung beitragen.

Zyklin D1 gehört mit Zyklin D2 und 3 zur Zyklin D-Familie. Diese drei Zykline sind funktionell homolog. Zyklin D1 wird vorrangig in der G1-Phase des Zellzyklus exprimiert. Es aktiviert die CDK 4 und 6 und führt so zu einem Übergang von der G1- in die S-Phase (Baldin V et al. 1993). Zusammen mit den CDKs phosphoryliert es das Retinoblastomprotein (RB), wodurch E2F-Transkriptionsfaktoren besser abgelesen werden können. Das wiederum führt zu einem Fortschreiten des Zellzyklus und zur DNA-Synthese (Sherr CJ et al. 2004). In der S-Phase selbst wird es Ubiquitin abhängig wieder abgebaut; dafür wird es am Th286 phosphoryliert (Hui R et al. 2002). Zyklin D1 wird also für den Zellzyklus sowie für den Eintritt in die Wachstumsphase benötigt und mündet in einem erhöhten Zellwachstum. Es könnte daher durch die Erhöhung des Zyklin D1-Anteils in den Knockout-MPs ein erhöhtes Wachstum vorliegen. Außerdem hat Zyklin D1 eine antiapoptotische Funktion in hämatopoetischen Zellen. Es reguliert Fas (CD95) und FasL (CD95 Ligand) herunter und hemmt somit einen wichtigen proapoptotischen Weg (Choi YJ et al. 2014).

Interessanterweise wird es auch in ruhenden Stamm- und Progenitorzellen exprimiert, die dadurch ihre Apoptose verhindern (Choi YJ et al. 2014). Es könnte also gemutmaßt werden, dass die *Ctsk*^{-/-}-MPs ein erhöhtes antiapoptotisches Potential aufweisen.

Die Beobachtung, dass die scheinbar gegensätzlich wirkenden Proteine Zyklin D1 und C/EBP alpha beide erhöht sind, mag zunächst verwundern. Ersteres aktiviert die CDK 4 und 6, zweiteres hemmt die CDK 2 und 4. Welcher Effekt nun ausgeprägter ist und wie letztendlich das Zellwachstum beeinflusst wird, müsste in weiteren Untersuchungen, zum Beispiel mit Hilfe von den oben genannten Proliferationsmarkern, Ki-67 und BrdU, noch geklärt werden.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Anwachsen von WT- und *Ctsk*^{-/-}-Spenderstammzellen in Wildtypempfängermäusen unterscheidet sich lediglich in der Granulozytenpopulation im Knochenmark. Ansonsten verlief die Hämatopoese der mit *Ctsk*^{-/-}-Stammzellen transplantierten Mäuse weitestgehend wie die der Wildtypkontrollstammzellen. Es scheint also so, als ob das Fehlen von Kathepsin K in hämatopoetischen Zellen keinen allzu großen Einfluss auf eine balancierte Hämatopoese hat. Um die oben erwähnte veränderte Granulozytenpopulation näher zu analysieren, wäre die zusätzliche Untersuchung von myeloischen Vorläuferpopulationen, wie den GMPs, sinnvoll. Auch sollten Proteine, die für die Granulopoese unabdingbar sind, im intrinsischen System näher betrachtet werden. Vielleicht zeigen schon frühe myeloische Populationen eine veränderte Proteinexpression, die die niedrigen Granulozytenwerte erklären könnten. Hier sollten neben C/EBP alpha auch noch die Proteine PU.1 und GATA-2 betrachtet werden, von denen man weiß, dass sie für die Granulopoese von Bedeutung sind. Mit meinen bisherigen Erkenntnissen kann ich jedoch die oben formulierte Arbeitshypothese, dass von hämatopoetischen Zellen exprimiertes Kathepsin K einen entscheidenden Beitrag zur Blutzellregeneration nach Transplantation leistet, nicht bestätigen.

Bei der immunzytologischen Analyse von *Ctsk*^{-/-}- und Wildtypmäusen fielen trotz vergleichbaren Anwachsens signifikante Unterschiede auf. Da aber die Hämatopoese weitestgehend intakt verlief, ist anzunehmen, dass diese Unterschiede weitestgehend von der *Ctsk*^{-/-}-Mikroumgebung geprägt wurden und diese Unterschiede in einer Wildtypmikroumgebung reversibel sind.

Vorherige Untersuchungen aus dem Labor Oostendorp zeigten, dass eine Kathepsin K defiziente Mikroumgebung im Knochenmark mit einer eingeschränkten Hämatopoese einhergeht. Dies zeigte sich in einer schlechteren Regeneration der lymphatischen Reihe. Außerdem fiel bei der Charakterisierung von *Ctsk*^{-/-}-Mäusen eine verringerte GMP-Population auf. Unter Einbeziehung meiner Erkenntnisse legen diese Untersuchungen nahe, dass Kathepsin K exprimiert in Nischenzellen zwar für eine ausgeglichene Hämatopoese benötigt wird, aber die Expression im hämatopoetischen System eher eine untergeordnete Rolle spielt.

Abschließend kann gesagt werden, dass das Zusammenspiel zwischen hämatopoetischen Stammzellen und ihrer Nische essentiell für eine balancierte Hämatopoese ist. Die Grundlagenforschung erhofft sich durch ein immer tiefer greifendes Verständnis von Zellen, Signalen und Signalkaskaden, Angriffspunkte für Medikamente zu finden, die die Balance der Hämatopoese wiederherstellen. Bis zu diesem Punkt ist es jedoch ein weiter Weg. Mit dem bisherigen Wissen zu CTSK ist es zum jetzigen Zeitpunkt allerdings unwahrscheinlich, dass es zukünftig als Medikamentenangriffspunkt für eine ausgeglichene Hämatopoese dienen wird.

So fügen sich in der Grundlagenforschung viele kleine Erkenntnisse allmählich zu einem Gesamtbild zusammen. Mit meiner Arbeit habe ich versucht, einen kleinen Beitrag zum besseren Verständnis der Hämatopoese zu leisten. Um die ganze Komplexität und alle Interaktionen der hämatopoetischen Stammzellnische zu erkennen und zu verstehen, wird allerdings noch viel Grundlagenforschung notwendig sein.

6. Zusammenfassung

Diese Doktorarbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung von Kathepsin K (CTSK) negativen Stammzellen in der Hämatopoese. Hierfür wurde das Kathepsin K-Knockoutmausmodell verwendet. Zwei Fragestellungen sollten geklärt werden; zum einen, ob das Fehlen von Kathepsin K in hämatopoetischen Zellen zu einer veränderten Blutbildung führte und zum anderen, ob die Proteinexpression zwischen *Ctsk*^{-/-}- und Wildtypmäusen variierte.

Da schon in früheren Untersuchungen im Oostendorp-Labor gezeigt werden konnte, dass das Fehlen von Kathepsin K in der Mikroumgebung des Knochenmarks einen extrinsischen Einfluss auf die Hämatopoese zeigte, sollte in dieser Doktorarbeit noch ein Schritt weitergegangen werden. Es ist bekannt, dass Kathepsin K von Zellen der Mikroumgebung exprimiert wird, aber auch von hämatopoetischen Zellen. Diejenigen Zellen, die Kathepsin K vorrangig exprimieren, sind Osteoklasten. Unter Berücksichtigung, dass auch Osteoklasten Teil des hämatopoetischen Systems sind, war ein Ziel dieser Arbeit, die intrinsischen Effekte von Kathepsin K in Serientransplantationen zu untersuchen, um dessen Rolle in der Hämatopoese noch besser zu verstehen. Hierbei fiel auf, dass das Fehlen von Kathepsin K in hämatopoetischen Zellen die empfindliche Balance der Blutzellentstehung störte, mit der Folge, dass weniger Granulozyten im Knochenmark zu finden waren.

Bei der Untersuchung der *Ctsk*^{-/-}-Mäuse zeigte sich, dass die Proteinexpression des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs verändert war. Es kann also von einer Interaktion zwischen CTSK und dem Wnt-Signalweg ausgegangen werden. Insgesamt konnte hier ein erhöhtes myeloisches Differenzierungspotential gesehen werden. Die veränderte Proteinexpression schien aber auf Grund der nur marginal gestörten Hämatopoese eher von der veränderten Mikroumgebung auszugehen.

Die Zusammenschau aller Ergebnisse zeigte jedoch, dass die beobachteten Effekte eher klein ausfielen, so dass geschlussfolgert werden kann, dass der intrinsische Einfluss von Kathepsin K auf die Hämatopoese wohl eher eine untergeordnete Rolle spielt.

7. Summary

This doctoral thesis was engaged in the investigation of Cathepsin K negative stem cells in hematopoiesis. For this purpose the Cathepsin K knockout mouse model was used. Two main questions were to be answered; firstly, whether the absence of Cathepsin K in hematopoietic cells would lead to an altered hematopoiesis, and secondly, whether the expression of proteins differentiated between wild type mice and *Ctsk*^{-/-}-mice.

Since previous studies of the Oostendorp laboratory have already shown that the absence of Cathepsin K in the bone marrow micro-environment had an extrinsic influence on hematopoiesis, this dissertation went one step further. It is known that Cathepsin K is expressed by cells of the micro-environment, but also by hematopoietic cells. The cells that primarily express Cathepsin K are osteoclasts. Considering osteoclasts are also part of the hematopoietic system this thesis aimed to investigate the intrinsic effects of Cathepsin K in serial transplantations to understand its role in hematopoiesis even better. Here it could be demonstrated that the absence of Cathepsin K disturbed the highly sensitive balance of hematopoiesis, which ultimately resulted in lower granulocyte numbers within the bone marrow.

The investigation of *Ctsk*^{-/-}-mice displayed an altered protein expression both in the canonical as well as in the non-canonical Wnt pathway. Thus, an interaction between CTSK and Wnt signaling can be assumed. Altogether there was a higher differentiation potential for myeloid lineages. Because of the only marginally disturbed hematopoiesis, the altered protein expression seemed to derive from the altered micro-environment.

Taking all results into account only minor effects could be detected, which leads to the conclusion that the intrinsic influence of Cathepsin K on hematopoiesis plays only a subordinate role.

8. Quellen

8.1 Papers

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997; 16(13):3797-804.

Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, Kos CH, Pollak MR, Brown EM, Scadden DT. 2006. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature.* 2006; 439:599-603.

Adams GB und Scadden DT. 2006. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol.* 2006; 7(4):333-7.

Ahmet Arman, Abdullah Bereket, Ajda Coker, Pelin Özlem Şimşek Kiper, Tülay Güran, Behzat Özkan, Zeynep Atay, Teoman Akçay, Belma Haliloglu, Koray Boduroglu, Yasemin Alanay, and Serap Turan. 2014. Cathepsin K analysis in a pycnodysostosis cohort: demographic, genotypic and phenotypic features. *Orphanet J Rare Dis.* 2014; 9:60.

Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G.1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 1993; 7(5):812-21.

Baldrige MT, King KY, Boles NC, Weksberg DC, Goodell MA. 2010. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature.* 2010; 465(7299):793-7.

Benz C, Copley MR, Kent DG, Wohrer S, Cortes A, Aghaepour N, Ma E, Mader H, Rowe K, Day C, Treloar D, Brinkman RR, Eaves CJ. 2012. Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell.* 2012; 10(3):273-83.

Blin-Wakkach C, Rouleau M, Wakkach A. 2014. Roles of osteoclasts in the control of medullary hematopoietic niches. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 561:29-37.

Bonewald, L.F. 2011. The amazing osteocyte. *J.Bone Miner Res.* 2011, 26(2):229-238.

Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA. 1996. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem.* 1996; 271(21):12517-12524.

Bowie MB, Kent DG, Dykstra B, McKnight KD, McCaffrey L, Hoodless PA, Eaves CJ. 2007. Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(14):5878-82.

Boyce BF, Xing L. 2007. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep.* 2007; 5(3):98-104.

Buckley SM, Ulloa-Montoya F, Abts D, Oostendorp RA, Dzierzak E, Ekker SC, Verfaillie CM. 2011. Maintenance of HSC by Wnt5a secreting AGM-derived stromal cell line. *Exp Hematol.* 2011; 39(1):114-123.

Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003, 425(6960):841-846.

Chan CK, Chen CC, Luppen CA, Kim JB, DeBoer AT, Wei K, Helms JA, Kuo CJ, Kraft DL, Weissman IL. 2009. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature.* 2009; 457(7228):490-4.

Choi YJ, Saez B, Anders L, Hydrbring P, Stefano J, Bacon NA, Cook C, Kalaszczynska I, Signoretti S, Young RA, Scadden DT, Sicinski P. 2014. D-cyclins repress apoptosis in hematopoietic cells by controlling death receptor Fas and its ligand FasL. *Dev Cell.* 2014; 30(3):255-67.

Christensen J, Shastri VP. 2015. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K. *BMC Res Notes.* 2015; 8:322.

Cory S. 1986. Activation of cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosome translocation. *Adv Cancer Res.* 1986; 47:189-234.

Coşkun S, Chao H, Vasavada H, Heydari K, Gonzales N, Zhou X, de Crombrughe B, Hirschi KK. 2014. Development of the fetal bone marrow niche and regulation of HSC quiescence and homing ability by emerging osteolineage cells. *Cell Rep.* 2014; 9(2):581-90.

Dar A, Kollet O, Lapidot T. 2006. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol.* 2006; 34(8):967-975.

Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. 2012. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature.* 2012; 481(7382):457-62.

Duong LT, Leung AT, Langdahl B. 2015. Cathepsin K Inhibition: A New Mechanism for the Treatment of Osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2015.

Eastman Q, Grosschedl R. 1999. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11(2):233-40.

Essers MA, Offner S, Blanco-Bose WE, Waibler Z, Kalinke U, Duchosal MA, Trumpp A. 2009. IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*. 2009; 458(7240):904-8.

Flentke GR, Garic A, Hernandez M, Smith SM. 2014. CaMKII represses transcriptionally active β -catenin to mediate acute ethanol neurodegeneration and can phosphorylate β -catenin. *J Neurochem*. 2014; 128(4):523-35.

Flores C, Moscatelli I, Thudium CS, Gudmann NS, Thomsen JS, Brüel A, Karsdal MA, Henriksen K, Richter J. 2013. Osteoclasts are not crucial for hematopoietic stem cell maintenance in adult mice. *Haematologica*. 2013; 98(12):1848-55.

Fukuchi Y, Shibata F, Ito M, Goto-Koshino Y, Sotomaru Y, Ito M, Kitamura T, Nakajima H. 2006. Comprehensive analysis of myeloid lineage conversion using mice expressing an inducible form of C/EBP α . *EMBO J*. 2006; 25(14):3398-410.

Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, Foged NT, Delmas PD, Delaissé JM. 1998. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem*. 1998; 273(48):32347-52.

Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, Desnick RJ. 1996. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*. 1996; 273(5279):1236-8.

Gekas C, Dieterlen-Lièvre F, Orkin SH, Mikkola HK. 2005. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell*. 2005; 8(3):365-75.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984; 133(4):1710-5.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998; 281(5382):1509-12.

Hui R, Finney GL, Carroll JS, Lee CS, Musgrove EA, Sutherland RL. 2002. Constitutive overexpression of cyclin D1 but not cyclin E confers acute resistance to antiestrogens in T-47D breast cancer cells. *Cancer Res*. 2002; 62(23):6916-23.

Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, Ortmann O. 2013. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 139(2):539-52.

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K. 1999. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. 1999; 399(6738):798-802.

Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, Shibuya H, Moon RT, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. 2003. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(1):131-9.

Istvanffy R, Kröger M, Eckl C, Gitzelmann S, Vilne B, Bock F, Graf S, Schiemann M, Keller UB, Peschel C, Oostendorp RA. 2011. Stromal pleiotrophin regulates repopulation behavior of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011; 118(10):2712-22.

Istvanffy R, Vilne B, Schreck C, Ruf F, Pagel C, Grziwok S, Henkel L, Prazeres da Costa O, Berndt J, Stümpflen V, Götz KS, Schiemann M, Peschel C, Mewes HW, Oostendorp RA. 2015. Stroma-Derived Connective Tissue Growth Factor Maintains Cell Cycle Progression and Repopulation Activity of Hematopoietic Stem Cells In Vitro. *Stem Cell Reports*. 2015; 5(5):702-15.

Jacome-Galarza C, Soung do Y, Adapala NS, Pickarski M, Sanjay A, Duong LT, Lorenzo JA, Drissi H. 2014. Altered hematopoietic stem cell and osteoclast precursor frequency in cathepsin K null mice. *J Cell Biochem.* 2014; 115(8):1449-57.

Jensen AB, Wynne C, Ramirez G, He W, Song Y, Berd Y, Wang H, Mehta A, Lombardi A. 2010. The cathepsin K inhibitor odanacatib suppresses bone resorption in women with breast cancer and established bone metastases: results of a 4-week, double-blind, randomized, controlled trial. *Clin Breast Cancer.* 2010; 10:452-8

Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS 2006. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell.* 2006; 124(2):407-21.

Kent DG, Copley MR, Benz C, Wöhrer S, Dykstra BJ, Ma E, Cheyne J, Zhao Y, Bowie MB, Zhao Y, Gasparetto M, Delaney A, Smith C, Marra M, Eaves CJ. 2009. Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential. *Blood.* 2009; 113(25):6342-50.

Kim I, Saunders TL, Morrison SJ. 2007. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell.* 2007; 130(3):470-83.

Kimelman D, Xu W. 2006. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene.* 2006; 25(57):7482-91.

Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. 2006. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol.* 2006; 7(10):1048-56.

Kleer CG, Bloushtain-Qimron N, Chen YH, Carrasco D, Hu M, Yao J, Kraeft SK, Collins LC, Sabel MS, Argani P, Gelman R, Schnitt SJ, Krop IE, Polyak K. 2008. Epithelial and stromal cathepsin K and CXCL14 expression in breast tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:5357-5367.

Kollet O, Dar A, Lapidot T. 2007. The multiple roles of osteoclasts in host defense: bone remodeling and hematopoietic stem cell mobilization. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:51-69.

Kumaravelu P, Hook L, Morrison AM, Ure J, Zhao S, Zuyev S, Ansell J, Medvinsky A. 2002. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development.* 2002; 129(21):4891-9.

Lévesque JP, Helwani FM, Winkler IG. 2010. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia.* 2010; 24(12):1979-92.

Li CY, Jepsen KJ, Majeska RJ, Zhang J, Ni R, Gelb BD, Schaffler MB. 2006. Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(6):865-75.

Littlewood-Evans A, Kokubo T, Ishibashi O, Inaoka T, Wlodarski B, Gallagher JA, Bilbe G. 1997. Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone.* 1997; 20(2):81-6.

Luc S, Buza-Vidas N, Jacobsen SE. 2008. Delineating the cellular pathways of hematopoietic lineage commitment. *Semin Immunol.* 2008; 20(4):213-20.

Mandelin J, Hukkanen M, Li TF, Korhonen M, Liljeström M, Sillat T, Hanemaaijer R, Salo J, Santavirta S, Konttinen YT. 2006. Human osteoblasts produce cathepsin K. *Bone.* 2006; 38(6):769-77.

Mansour A, Grazia Abou-Ezzi, Ewa Sitnicka, Sten Eirik W. Jacobsen, Abdelilah Wakkach, and Claudine Blin-Wakkach. 2012. Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *J Exp. Med.* 2012; 209(3):537-549.

Many AM, Brown AM. 2014. Both Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling Independently Promote Stem Cell Growth in Mammospheres. *PLoS One*. 2014; 9(7).

Medvinsky A, Dzierzak E. 1996. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*. 1996; 86(6):897-906.

Mikkola HK, Orkin SH. 2006. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*. 2006; 133(19):3733-44.

Miura Y, Wilt FH. 1970. The formations of blood islands in dissociated-reaggregated chick embryo yolk sac cells. *Exp Cell Res*. 1970, 59(2):217-26.

Miyamoto T, Iwasaki H, Reizis B, Ye M, Graf T, Weissman IL, Akashi K. 2002. Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell*. 2002; 3(1):137-47.

Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. 2008. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ*. 2008; 15(2), 226-33.

Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. 2002. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol*. 2002; 32(5):1205-11.

Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL. 1995. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(22):10302-6.

Morrison SJ and Spradling AC. 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008; 132(4):598-611.

Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. 2001. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001; 97(8):2293-9.

Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, Bertoncetto I, Bendall LJ, Simmons PJ, Haylock DN. 2005. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2005; 106(4):1232-9.

Nirupama K. Shevde, Amy C. Bendixen, Krista M. Dienger, and J. Wesley Pike. 2000. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(14):7829–7834.

Niyibizi C, Chan R, Wu JJ, Eyre D. 1994. A 92 kDa gelatinase (MMP-9) cleavage site in native type V collagen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 202(1):328-33.

Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, Kaufmann KB, McLeod J, Laurenti E, Dunant CF, McPherson JD, Stein LD, Dror Y, Dick JE. 2016. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*. 2016; 351(6269):aab2116.

Novinec M, Lenarčič B. 2013. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biol Chem*. 2013; 394(9):1163-79.

Palis J, Yoder MC. 2001. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol*. 2001; 29(8):927-36.

Pang M, Martinez AF, Fernandez I, Balkan W, Troen BR. 2007. AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells. *Gene*. 2007; 403(1-2):151-8.

- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. 1997.** Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem.* 1997; 272(40):24735-8.
- Quintanilla-Dieck MJ, Codriansky K, Keady M, Bhawan J, Runger TM. 2009.** Expression and regulation of cathepsin K in skin fibroblasts. *Exp Dermatol.* 2009; 18(7):596-602.
- Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. 1998.** CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(7):4301-14.
- Rantakokko J, Kiviranta R, Eerola R, Aro HT, Vuorio E. 1999.** Complete genomic structure of the mouse cathepsin K gene (Ctsk) and its localization next to the Arnt gene on mouse chromosome 3. *Matrix Biol.* 1999; 18(2):155-61.
- Rapa I, Volante M, Cappia S, Rosas R, Scagliotti GV, Papotti M. 2006.** Cathepsin K is selectively expressed in the stroma of lung adenocarcinoma but not in bronchioloalveolar carcinoma. A useful marker of invasive growth. *Am J Clin Pathol.* 2006; 125(6):847-54.
- Renstrom J, Istvanffy R, Gauthier K, Shimono A, Mages J, Jardon-Alvarez A, Kroger M, Schiemann M, Busch DH, Esposito I, Lang R, Peschel C, Oostendorp RA. 2009.** Secreted frizzled-related protein 1 extrinsically regulates cycling activity and maintenance of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009; 5(2):157-67.
- Renstrom J, Kroger M, Peschel C, Oostendorp RA. 2010.** How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chem Biol Interact.* 2010; 184(1-2):7-15.
- Roussel MF. 1998.** Key effectors of signal transduction and G1 progression. *Adv Cancer Res.* 1998; 74:1-24.

Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. 1998. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:13453-13458.

Schofield R, Blood Cells. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978; 4(1-2):7-25.

Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3):311-22.

Schreck C, Bock F, Grziwok S, Oostendorp RA, Istvánffy R. 2014. Regulation of hematopoiesis by activators and inhibitors of Wnt signaling from the niche. *Ann N Y Acad Sci.* 2014; 1310:32-43.

Sherr CJ, Roberts JM. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 2004; 18(22):2699-711.

Siminovitch L, Till JE, McCulloch EA. 1964. Decline in Colony-forming ability of marrow cells subjected to serial transplantation into irradiated mice. *J Cell Physiol.* 1964; 64:23-31.

Smith RA, Glomski CA. 1982. "Hemogenic endothelium" of the embryonic aorta: Does it exist? *Dev Comp Immunol.* 1982; 6(2):359-68.

Song B, Lai B, Zheng Z, Zhang Y, Luo J, Wang C, Chen Y, Woodgett JR, Li M. 2010. Inhibitory phosphorylation of GSK-3 by CaMKII couples depolarization to neuronal survival. *J Biol Chem.* 2010; 285(52):41122-34.

Staudt ND, Maurer A, Spring B, Kalbacher H, Aicher WK, Klein G. 2012. Processing of CXCL12 by different osteoblast-secreted cathepsins. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(11):1924-35.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. 1999.

Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999; 20(3):345-57.

Sugimura R, He XC, Venkatraman A, Arai F, Box A, Semerad C, Haug JS, Peng L, Zhong XB, Suda T, Li L. 2012.

Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell.* 2012; 150(2):351-65.

Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. 2006.

Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 2006; 25(6):977-988.

Tzeng YS, Li H, Kang YL, Chen WC, Cheng WC, Lai DM. 2011.

Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood.* 2011; 117(2): 429-39.

Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R. 1998.

Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood.* 1998; 92(9):3189-202.

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. 2003.

A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell,* 2003; 5(3):367-77.

Verbovšek U, Van Noorden CJ, Lah TT. 2015.

Complexity of cancer protease biology: Cathepsin K expression and function in cancer progression. *Semin Cancer Biol.* 2015; 35:71-84.

Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. 2004.

Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood.* 2004; 103(9):3258-64.

Wang H, Iakova P, Wilde M, Welm A, Goode T, Roesler WJ, Timchenko NA. 2001. C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell*. 2001;8(4):817-28.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17:387-403.

Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A. 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008; 135(6):1118-29.

Wilson NK, Kent DG, Buettner F, Shehata M, Macaulay IC, Calero-Nieto FJ, Sánchez Castillo M, Oedekoven CA, Diamanti E, Schulte R, Ponting CP, Voet T, Caldas C, Stingl J, Green AR, Theis FJ, Göttgens B. 2015. Combined Single-Cell Functional and Gene Expression Analysis Resolves Heterogeneity within Stem Cell Populations. *Cell Stem Cell*. 2015; 16(6):712-24.

Wodarz A. and Nusse R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998; 14:59-88.

Woolthuis CM, Park CY. 2015. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood*. 2016.

Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell*. 2004 May 28; 117(5):663-76.

Xie Y, Yin T, Wiegraebe W, He XC, Miller D, Stark D, Perko K, Alexander R, Schwartz J, Grindley JC, Park J, Haug JS, Wunderlich JP, Li H, Zhang S, Johnson T, Feldman RA, Li L. 2009. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature*. 2009; 457(7225):97-101.

Yamada M, Ohnishi J, Ohkawara B, Iemura S, Satoh K, Hyodo-Miura J, Kawachi K, Natsume T, Shibuya H. 2006. NARF, an nemo-like kinase (NLK)-associated ring finger protein regulates the ubiquitylation and degradation of T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF). *J Biol Chem.* 2006; 281(30):20749-60.

Zhang D, Leung N, Weber E, Saftig P, Brömme D. 2011. The effect of cathepsin K deficiency on airway development and TGF- β 1 degradation. *Respir Res.* 2011; 12:72

Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. 1997. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(2):569-74.

Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, Shigematsu H, Levantini E, Huettner CS, Lekstrom-Himes JA, Akashi K, Tenen DG. 2004. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity.*2004; 21(6):853-63.

8.2 Dissertationen

Gitzelmann Sylke. 2011. Etablierung der intrahepatischen Stammzelltransplantation bei neugeborenen Mäusen. *Technische Universität München. 2011.*

Vilne Baiba. 2013. Regulatory networks of hematopoietic stem cells and their micro-environment. *Technische Universität München. 2013.*

Schreck Christina. 2014. The role of Wnt5a in hematopoiesis and leukemia. *Technische Universität München. 2014.*

Bock Franziska. 2014. The role of Secreted frizzled-related protein 2 (Sfrp2) in haematopoiesis. *Technische Universität München. 2014.*

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Hämatopoese | 5 |
| Abbildung 2: Hierarchie der HSCs..... | 6 |
| Abbildung 3: Schemadarstellung des roten Knochenmarks | 9 |
| Abbildung 4: Modell der endostalen und vaskulären Nische | 13 |
| Abbildung 5: Schemadarstellung der Wnt-Signalwege | 14 |
| Abbildung 6: Schemadarstellung einer Transplantation in die Schwanzvene..... | 29 |
| Abbildung 7: Transplantationsmodelle intrinsisch versus extrinsisch | 30 |
| Abbildung 8: FACS-Darstellung Knochenmark..... | 34 |
| Abbildung 9: Versuchsaufbau der Transplantationen | 39 |
| Abbildung 10: Primäre Transplantation Gesamtzellzahlen | 41 |
| Abbildung 11: Primäre Transplantation Stammzellfärbung Knochenmark..... | 44 |
| Abbildung 12: Primäre Transplantation Reifezellfärbung Knochenmark..... | 46 |
| Abbildung 13: Primäre Transplantation Stammzellfärbung Milz | 47 |
| Abbildung 14: Primäre Transplantation Peripheres Blut | 49 |
| Abbildung 15: Sort 3 und 4 für sekundäre Transplantation..... | 51 |
| Abbildung 16: Sekundäre Transplantation Gesamtzellzahlen | 53 |
| Abbildung 17: Sekundäre Transplantation Stammzellfärbung Knochenmark..... | 54 |
| Abbildung 18: Sekundäre Transplantation Reifezellfärbung BM, SP und PB. | 57 |
| Abbildung 19: Primäre Transplantation geblutet 5. W | 58 |
| Abbildung 20: Sekundäre Transplantation geblutet 5. W. und 10 W. | 60 |
| Abbildung 21: Sort 1 und 2 für Immunfluoreszenzfärbung..... | 62 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 22: Schemadarstellung der Wnt-Signalwege..... | 63 |
| Abbildung 23: Immunzytologie Darstellung der Proteine | 65 |

9.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Allgemeines Material..... | 18 |
| Tabelle 2: Technische Instrumente..... | 19 |
| Tabelle 3: Biologische und chemische Reagenzien..... | 20 |
| Tabelle 4: Handelsübliche Medien und Puffer | 21 |
| Tabelle 5: Selbstgemachte Lösungen, Medien und Puffer | 21 |
| Tabelle 6: Fertigsätze für Labormethoden | 22 |
| Tabelle 7: Primäre Antikörper für Durchflusszytometrie und Sort | 22 |
| Tabelle 8: Sekundäre Antikörper für Durchflusszytometrie und Sort | 24 |
| Tabelle 9: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz..... | 24 |
| Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz | 25 |
| Tabelle 11: Mausstämme..... | 25 |
| Tabelle 12: Software..... | 26 |
| Tabelle 13: Mausdaten der primären Transplantation. | 40 |
| Tabelle 14: Mausdaten der primären Transplantation. Mittelwerte mit SEM..... | 40 |

9.3 Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|------------------|---|--|
| ACK | = | Ammonium-Chlorid-Kalium |
| AGM | = | Aorto-gonado-mesonephron |
| ALL | = | Akute lymphatische Leukämie |
| AML | = | Akute myeloische Leukämie |
| AP1 | = | activator Protein 1 |
| APC | = | Adenomatosis Polyposis Coli-Protein |
| BM | = | bone marrow |
| CaMKII | = | Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent Kinase II |
| CD | = | cluster of differentiation |
| CDK | = | cyclin-dependent kinase |
| C/EBP alpha | = | CCAAT/enhancer binding protein alpha |
| CFU-S | = | colony forming unit-spleen |
| CLL | = | Chronisch lymphatische Leukämie |
| CLP | = | common lymphoid progenitor |
| CML | = | Chronisch myeloische Leukämie |
| CMP= MP | = | common myeloid progenitor=mean myeloid progenitor |
| CTSK | = | Kathepsin K Protein |
| <i>Cstk/CTSK</i> | = | Kathepsin K Gen |
| DNA | = | deoxyribonucleic acid |
| E | = | Embryonaltag |
| EDTA | = | ethylene diamine tetraacetic acid |
| F+T | = | zwei Femores und zwei Tibiae |
| FACS | = | fluorescence-activated-cell-sorting |
| FELASA | = | Federation of Laboratory Animal Science Associations |
| GMP | = | granulocyte-monocyte progenitor |

| | | |
|------------------|---|---|
| GSK3 beta | = | Glykogensynthase-Kinase 3 beta |
| GTPase | = | Guanosintriphosphatase |
| HSC | = | hematopoietic stem cell |
| i.v. | = | intravenös |
| IVC | = | individually ventilated cages |
| KO | = | Knockout |
| KZRS | = | Kurzzeit repopulierende Stammzelle |
| LEF-1 | = | lymphoid enhancing factor-1 |
| Lin ⁻ | = | Lineage negative |
| LMPP | = | lympho-myeloid potential progenitor |
| LRP | = | Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein |
| LSK | = | Lin ⁻ , SCA1 ⁺ , KIT ⁺ |
| LT | = | long term |
| LZRS | = | Langzeit repopulierende Stammzelle |
| MAP | = | mitogen-activated protein |
| MEP | = | megakaryocyte-erythrocyte progenitor |
| MPP | = | multipotent progenitor |
| MSC | = | mesenchymal stem cell |
| N | = | Versuchstieranzahl |
| NFAT | = | nuclear factor of activated T-cells |
| NK-Zellen | = | Natürliche Killerzellen |
| NLK | = | Nemo-like Kinase |
| OBL | = | Osteoblast |
| OCL | = | Osteoklast |
| PB | = | peripher blood |
| PCP | = | planar cell polarity |
| PDGF | = | Platelet-derived growth factor |

| | | |
|----------------|---|---|
| PFA | = | Paraformaldehyd |
| Phospho-CaMKII | = | Phospho- Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent Kinase II |
| PI | = | Propidium-Iodid |
| PLT | = | platelets |
| RANK | = | Receptor Activator of NFκB |
| RANKL | = | Receptor Activator of NFκB Ligand |
| RBC | = | red blood cells |
| RT | = | Raumtemperatur |
| s.c. | = | subcutan |
| SDF-1 | = | stromal cell-derived factor 1 |
| SEM | = | Standard Error of the Mean |
| SP | = | spleen |
| SPF | = | specific-pathogen-free |
| ST | = | short term |
| TAK1 | = | Transforming growth factor beta-activated kinase 1 |
| TCF | = | T-cell factor |
| TGF | = | transforming growth factor |
| TX | = | Transplantation |
| V. | = | Vena |
| WBC | = | white blood cell |
| WNT | = | wingless und int-1 |
| WT | = | Wildtyp |
| ZPF | = | Zentrum für präklinische Forschung |

10.Danksagung

Ich möchte mich als erstes bei allen bedanken, die einen Beitrag zu dieser Doktorarbeit geleistet haben.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Christian Peschel für das Ermöglichen einer so interessanten Doktorarbeit in der Hämatologie und Onkologie bedanken.

Ebenso ein großes Dankeschön an meinen Betreuer, Herrn Prof. dr Robert Oostendorp vom Labor für Stammzellphysiologie der III. med. Klinik für Hämatologie und Onkologie für seine Unterstützung und zahlreichen Gespräche, die mir immer weitergeholfen haben.

Des Weiteren möchte ich mich noch bei meinen Kolleginnen aus meiner Arbeitsgruppe für die große Unterstützung bedanken. Mein besonderer Dank geht hier vor allem an Dr. Rouzanna Istvánffy, Dr. Christina Schreck und Dr. Franziska Ruf, die mir immer mit einem guten Rat zur Seite standen. Vielen Dank auch an das ganze Team aus der Trogerstraße 32, Raum 1.11.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinen beiden Familien und meinen Freunden bedanken. Der größte Dank aber gebührt meinem Mann, Christian, der mich unzählige Male motivierte diese Arbeit zu Ende zu bringen. Ohne diese ganze Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.