

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom- Biologin Isabelle Hellwig
aus: Konstanz

Tag der mündlichen Prüfung:

**Differentielle DNA-Methylierung
und Analysen zum Transkriptionsfaktor *hoxA9*
in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen**

Gutachter: Prof. Dr. Frank Lyko

Prof. Dr. Anthony D. Ho

Zusammenfassung

Stammzellen definieren sich durch die duale Fähigkeit, sich einerseits selbst zu erneuern (Self-renewal) und andererseits verschiedene spezialisierte Zelltypen hervorbringen zu können (Differenzierung). Im Organismus sind vor allem adulte Stammzellen für die lebenslange Regeneration der verschiedensten Gewebe verantwortlich. Doch auch sie unterliegen, wie alle somatischen Zellen, dem Prozess der Alterung. Im Laufe der Zeit verlieren sie ihre Pluripotenz und die Fähigkeit zum Selbsterhalt. Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HPC) stellen die bis jetzt am besten charakterisierten und untersuchten adulten Stammzellen dar. Sie sind verantwortlich für die lebenslange Erneuerung des hämatopoetischen Systems und befinden sich in spezialisierten Nischen im Knochenmark.

In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, dass Gene, welche für die Selbsterneuerung von humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPC) notwendig sind, mit zunehmendem Alter und ihm Rahmen der Differenzierung durch DNA-Methylierung dauerhaft epigenetisch stillgelegt werden.

Dazu wurden zunächst humane CD34⁺ HPC von Spendern verschiedener Altersgruppen (0 Jahre und 35 Jahre) und zudem differenzierte Granulozyten und Monozyten mittels spezifischer Oberflächenantigene isoliert. Von allen Proben wurde anschließend genomweit der Methylierungsstatus von 27.578 CpG Dinukleotiden aus den Promotorregionen von über 14.000 Genen per Infinium Human Methylation Bead Chip²⁷ bestimmt und analysiert. Eine Validierung der Daten erfolgte mittels 454 Pyrosequenzierung.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen in den HPCs deutliche altersassoziierte Methylierungsunterschiede, die auch zu funktionellen Veränderungen führen können. Bei einer minimalen Methylierungsdifferenz von 15% weisen 192 CpG Dinukleotide eine deutliche Hypermethylierung, 350 CpG-Dinukleotide dagegen eine Hypomethylierung bei Erwachsenen im Vergleich zu Neugeborenen auf. Auch das Methylierungsmuster der myeloiden Differenzierungen, also der Vergleich von CD34⁺ HPCs zu Granulozyten und Monozyten, zeigt eine deutlich gerichtete Hypomethylierung im Vergleich zu undifferenzierten Stammzellen. Diese konnte durch Signalweganalysen auch in einen funktionellen Zusammenhang gestellt

werden, was zeigt, dass myeloid assoziierte Gene im Laufe der Differenzierung demethyliert und dadurch aktiviert werden. Interessanterweise lassen sich zwischen den altersassoziierten Hypomethylierungen in den HPCs und der Hypomethylierung der myeloiden Differenzierung signifikante Übereinstimmungen finden, was darauf hinweist, dass die in der Literatur beschriebene myeloide Restriktion im Verlauf der Stammzellalterung auch auf dem Methylierungsmuster basiert. Dies wird zudem noch durch *de novo* Methylierungen im Vergleich der „jungen“ und „alten“ CD34⁺ Zellen untermauert.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden einzelne Gene auf ihre Funktion und Regulation in hämatopoetischen Vorläuferzellen untersucht. Für den homeobox Transkriptionsfaktor und Onkogen *hoxA9*, der eine wichtige Rolle bei der Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen und der Leukemogenese spielt, konnte eine sehr hohe Promotormethylierung in der leukämischen Zelllinie HL60 nachgewiesen werden. Diese korreliert mit einer sehr geringen *hoxA9* Genexpression, wobei die Promotormethylierung durch demethylierende Agenzien herabgesetzt und die Expression reaktiviert werden kann. In primären Zellen konnten große Expressionsunterschiede von *hoxA9* im Verlauf der hämatopoetischen Differenzierung gemessen werden, wobei die mRNA Menge des Transkriptionsfaktors im Laufe der myeloiden und lymphoiden Differenzierung kontinuierlich abnimmt. Funktionelle Effekte dieser Veränderungen auf das Selbsterneuerungsprofil der humanen HPCs wurden mittels Koloniebildenden Assays und siRNA Transfektionen untersucht. Diese zeigen deutlich, dass das Stammzellpotential der HPC durch eine reprimierte *hoxA9* Genexpression reduziert wird. Dabei konnte allerdings kein Zusammenhang zu Alterung und Methylierung in gesunden primären Zellen hergestellt werden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass HPCs im Rahmen der Alterung und Differenzierung molekularen und funktionellen Veränderungen unterliegen, welche zum Teil auf einer differentiellen DNA-Methylierung basieren. Ein genaueres Verständnis dieser molekularen Mechanismen der Alterung und der Genexpression in hämatopoetischen Stammzellen könnte zur Identifikation eventueller Risikofaktoren für Erkrankungen des Knochenmarks und zu innovativen Therapieansätzen, auch im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation, führen.

Summary

Stem cells are defined by their dual ability to self-renew and to differentiate in various specialized cell types. Adult stem cells assure lifelong regeneration of adult tissues but just as all other cell types they underlie aging processes. Their capacity to proliferate and to self-renew diminishes. Hematopoietic stem and progenitor cells (HPC) are the best analyzed and characterized adult stem cells so far. They give rise to all blood cells for the entire lifespan and reside in specialized stem cell niches.

In this context we hypothesized that genes required for self-renewal become silenced by DNA methylation with aging and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells.

Therefore we isolated human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells of different donor ages (0 years, 35 years) and in addition we isolated differentiated Granulocytes and Monocytes. DNA-Methylation of all cells was measured by Infinium Human Methylation Bead Chip²⁷ targeting 27.578 CpG sites located in promoter region of more than 14.000 genes. Data were validated by 454 pyrosequencing.

Analyses of the HPC data show considerable age-associated methylation changes, which could induce functional alterations. By narrow methylation difference of 15% 192 CpG dinucleotides showed a significantly increased methylation a loss of methylation was measured at 350 CpG sites in older compared to young hematopoietic progenitor cells. During myeloid differentiation of HPC to granulocytes and monocytes a directed genomewide DNA-hypomethylation is detectable. By pathway analysis we could show the functional context of the adjusted methylation changes.

Interestingly, the age-related hypomethylation showed high analogy with hypomethylation of myeloid differentiation-associated genes. These findings and also the *de novo* methylation events in “older” CD34⁺ cells suggest that epigenetic changes contribute to myeloid lineage restriction mentioned in hematopoietic stem cell aging.

Furthermore we investigated the role of single genes in the hematopoietic system. The homeobox transcription factor and oncogene *hoxA9* is mentioned to be important for self renewal of hematopoietic stem cells but also for the process of leukemogenesis. In the leukemic cell line HL60 we could detect a high level of *hoxA9* promotor methylation which is correlated with low gene expression. This methylation level was reduced by treatment with demethylation-drugs and *hoxA9* expression could be reactivated. In myeloid and lymphoid differentiation of healthy CD34⁺ hematopoietic progenitor cells we could detect a continuous decrease of *hoxA9* expression. The functional importance of *hoxA9* in self-renewal and differentiation could be pointed out by siRNA transfection and colony forming assays showing a decreased stemness for hematopoietic stem and progenitor cells by *hoxA9* repression. However no connection to aging and methylation could be detected in healthy primary cells.

In summary we could show that molecular and functional age- and differentiation-associated changes in HPC are based on differential DNA-methylation. Further understanding of the molecular mechanisms of aging and gene expression in hematopoietic stem cells will be important to identify epigenetic changes that confer a risk for development of bone marrow disease warranting therapeutic intervention.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Stammzellen	1
1.1.1 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen.....	2
1.1.2 Alterung von Stammzellen	4
1.2 Epigenetik	6
1.2.1 Epigenetische Regulation durch DNA-Methylierung	7
1.2.2 DNA-Methyltransferasen.....	8
1.2.3 DNA-Methylierung in Entwicklung, Alterung und Krebsentstehung .	9
1.2.4 Beeinflussung der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2'-deoxycytidin	10
1.2.5 Polycomb-Proteinkomplex	12
1.3 Homeobox Gene.....	13
1.4 Ziel der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Primärmaterial	16
2.1.1 Knochenmark.....	16
2.1.2 Mobilisiertes Peripherblut.....	16
2.1.3 Nabelschnurblut.....	16
2.1.4 Isolation der hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen.....	17
2.1.5 Isolation von Granulozyten aus Nabelschnurblut.....	18
2.1.6 Isolation von Monozyten, T- und B-Zellen aus Nabelschnurblut....	19
2.1.7 Durchflußzytometrie.....	19
2.2 Zellkultur	21
2.2.1 Zelllinien.....	21

2.2.2	Kryokonservierung von Zellen	22
2.2.3	Kultur primärer hämatopoetischer CD34 ⁺ Zellen	22
2.2.4	Koloniebildende-Wachstumsversuche	24
2.2.5	Proliferationsmessungen mittels 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester-Färbung (CFSE-Färbung)	24
2.2.6	<i>In vitro</i> Behandlung mit 5 Aza-2'-deoxycytidin	25
2.3	Molekularbiologische Standardmethoden	25
2.3.1	DNA Isolation	25
2.3.2	Fällung von DNA	25
2.3.3	Bisulfit-Konversion der DNA	26
2.3.4	RNA Isolation	26
2.3.5	Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren	27
2.3.6	cDNA Synthese	28
2.3.7	Primer	28
2.3.8	Polymerasekettenreaktion	29
2.3.9	Methylierungsspezifische PCR	29
2.3.10	Aufreinigung der PCR-Produkte	30
2.3.11	Semi-quantitative real time PCR	30
2.3.12	Agarosegelelektrophorese	32
2.3.13	Bisulfitsequenzierung	32
2.3.14	Analyse der DNA-Sequenzen	32
2.3.15	siRNA Transfektion	33
2.4	Infinium HumanMethylation27 BeadChip	33
2.4.1	Signalweganalysen	35
2.4.2	Bioinformatische Analyse und Auswertung	35
2.4.3	Validierung der Daten durch Pyrosequenzierung	35

3. Ergebnisse	36
3.1 Infinium Human Methylation Bead Chip27.....	36
3.2 DNA-Methylierung in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen	38
3.2.1 Differenzielle Methylierung in CD34 ⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen.....	41
3.2.2 Vergleich mit Polycombtargets	48
3.2.3 Signalweganalysen.....	49
3.2.4 Validierung der Methylierungsdaten aus hämatopoetischen Progenitorzellen.....	51
3.3 Differenzielle Methylierung in der myeloiden Differenzierung	53
3.3.1 Signalweganalysen.....	56
3.3.2 Validierung der Differenzierungsspezifischen Methylierung mittels Pyrosequenzierung.....	57
3.4 Untersuchungen zum homeobox Transkriptionsfaktor <i>hoxA9</i>.....	58
3.4.1 Expressionsuntersuchungen.....	58
3.4.1.1 <i>hoxA9</i> Expression in leukämischen Zelllinien	58
3.4.1.2 <i>hoxA9</i> Expression in hämatopoetischen Zellen	59
3.4.2 Funktionelle Untersuchungen zu <i>hoxA9</i>	65
3.4.2.1 siRNA Transfektion.....	65
3.4.2.2 siRNA Transfektion und CD34-Expression	66
3.4.2.3 Koloniebildende-Assays.....	67
3.4.3 <i>hoxA9</i> und DNA-Methylierung; methylierungsspezifische PCR	70
3.4.3.1 <i>hoxA9</i> MSP-PCR in leukämischen Zelllinien	70
3.4.3.2 <i>hoxA9</i> MSP-PCR in primären Zellen	71
3.4.3.3 Behandlung von HL60 Zellen mit 5-Aza-2'-deoxycytidin	72
3.4.3.4 Bisulfit-Sequenzierung.....	74
3.4.3.5 Methylierungs-Sequenzierung	77

3.4.4	HumanMethylation Bead Chip und <i>hoxA9</i>	80
3.4.5	Regulation von <i>hoxA9</i> in primärem Zellmaterial	82
4.	Diskussion	85
4.1	DNA-Methylierung in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen	85
4.1.1	DNA-Methylierung in CD34 ⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen in der myeloiden Differenzierung	85
4.1.2	DNA-Methylierung in CD34 ⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen im Bezug auf Alterung und Leukämie	87
4.1.3	CD34 ⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen in der klinischen Anwendung	93
4.2	Homeobox Transkriptionsfaktoren <i>hoxA9</i>	96
4.2.1	Expression und Funktion von <i>hoxA9</i>	96
4.2.2	Regulation von <i>hoxA9</i>	98
4.2.2.1	Notch signalling	100
5.	Anhang	102
6.	Literaturverzeichnis	108
7.	Danksagung	118
8.	Erklärung	119

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Schema der symmetrischen und asymmetrischen Zellteilung	1
Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Hämatopoese.....	3
Abbildung 1-3 Cytosinmethylierung	7
Abbildung 1-4 Methylierung im regulatorischen Promotorbereich und Transkription..	8
Abbildung 1-5 Strukturformel von Cytidin und dem Analogon 5-Aza-2'-deoxycytidin	11
Abbildung 1-6 Demethylierung eines CpG-Dinukleotids, während der Zellteilung bei Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin	11
Abbildung 1-7 Schematische Darstellung der chromosomalen Anordnung der Homeobox Gene	13
Abbildung 2-1 Phasentrennung von Blut nach einer Dichtegradientenzentrifugation	17
Abbildung 2-2 Population der Aufreinigung von Granulozyten im Dotplot	18
Abbildung 2-3 Population der Aufreinigung von Monozyten im Dotplot	19
Abbildung 2-4: Prinzip einer durchflusszytometrischen Zellsortierung.....	20
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Bisulfite-Reaktion	26
Abbildung 2-6 Prinzip des HumanMethylation 27 Bead Chip	34
Abbildung 3-1 Schematische Darstellung der Probenaufreinigung.....	37
Abbildung 3-2 Exemplarische Darstellung der Reinheit von Granulozyten, Monozyten und CD34 ⁺ HPCs.....	38
Abbildung 3-3 CpG abhängige Methylierungsverteilung in CD34 ⁺ Zellen aus CB und mPB.....	39
Abbildung 3-4 linearer Zusammenhang der Methylierung von CD34 ⁺ Zellen aus CB und mPB (DotPlot).....	40
Abbildung 3-5 Venn-Diagramm $\geq 70\%$ methylierter CpGs.....	41
Abbildung 3-6 HeatMap des Methylierungsprofils aller CD34 ⁺ Proben.....	43
Abbildung 3-7 Anzahl der mehr als 15% differentiell methylierten CpGs vom CB zu mPB.....	44

Abbildung 3-8 Anzahl der differenziell methylierten CpGs in Abhängigkeit der prozentualen Methylierungsdifferenz.....	44
Abbildung 3-9 Vergleich Gene Humanmethylation BeadChip27 mit Polycombzielgenen	48
Abbildung 3-10 Signalweg-Analyse aller zu mind. 70% methylierten CpGs aus allen CD34 ⁺ Zellen	49
Abbildung 3-11 Signalweganalyse der um mindestens 15% demethylierten CpGs (CB zu mPB).....	50
Abbildung 3-12 Validierung der Unterschiede zwischen HPCs aus CB und mPB....	51
Abbildung 3-13 linearer Zusammenhang der Methylierung von CD34 ⁺ -Zellen aus CB und Granulozyten bzw. Monozyten ebenfalls aus CB	53
Abbildung 3-14 Anzahl differenziell Methylierter CpG-Sites im Vergleich von HPCs zu Monozyten	54
Abbildung 3-15 Verteilung der Methylierungsunterschiede	54
Abbildung 3-16 Differenziell Methylierter CpG Dinukleotide zwischen HPCs und Granulozyten	55
Abbildung 3-17 Verteilung der Methylierungsunterschiede	55
Abbildung 3-18 Signalweganalyse Demethylierter Gene in Monozyten und Granulozyten	56
Abbildung 3-19 Bestätigung der Infinium Daten für die Differenzierung	57
Abbildung 3-20 relative <i>hoxA9</i> Expression in den leukämischen Zelllinien	58
Abbildung 3-21 relative <i>hoxA9</i> Expression in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen.....	59
Abbildung 3-22 relative <i>hoxA9</i> Expression in Zelllinien und CB CD34 ⁺ Zellen	60
Abbildung 3-23 relative <i>hoxA9</i> Expression in hämatopoetischen Progenitoren und differenzierten Zellen	61
Abbildung 3-24 relative <i>hoxA9</i> Expression in CD34 ⁺ hämatopoetischen Vorläufern verschiedener Altersgruppen.....	62

Abbildung 3-25 Histogramm; DotPlot einer CFSE-Färbung von CD34 ⁺ nach 7d Kultur	63
Abbildung 3-26 relative <i>hoxA9</i> Expression in den Teilungen CFSE-gefärbter.....	64
Abbildung 3-27 MapK mRNA Expression 24h nach siRNA Transfektion	65
Abbildung 3-28 Differenzielle CD34 Expression; Kontrolle – <i>hoxA9</i> siRNA behandelte Zellen.....	66
Abbildung 3-29 Koloniebildung in einem CFU-GEMM.....	68
Abbildung 3-30 Auswertung CFU-GEMM Assays mit siRNA.....	69
Abbildung 3-31 Lage der MSP-Primer.....	70
Abbildung 3-32 Gelelektrophorese einer methylierungsspezifischen PCR für <i>hoxA9</i> in verschiedenen leukämischen Zelllinien	71
Abbildung 3-33 Gelelektrophorese von <i>hoxA9</i> MSP-PCR in CD34 ⁺ -Zellen.....	72
Abbildung 3-34 relative Expression der 5-Aza-2'deoxyctidin behandelten HL60 Zellen.....	73
Abbildung 3-35 Gelelektrophorese einer <i>hoxA9</i> MSP-PCR in HL60	73
Abbildung 3-36 Lage der Primer für die Sequenzierung.....	74
Abbildung 3-37 Differenz der Methylierung im Promotorbereich von <i>hoxA9</i>	76
Abbildung 3-38 <i>hoxA9</i> Promotormethylierung in CD34 ⁺ Zellen	78
Abbildung 3-39 <i>hoxA9</i> Promotormethylierung in HPCs im Vergleich zu Granulozyten, Monozyten, B-Zellen und T-Zellen.....	79
Abbildung 3-40 DotPlot der HPC-Mittelwerte aller homeobox Gene	80
Abbildung 3-41 semiquantitative real time PCR für <i>hoxA9</i> nach 72 Stunden Inkubation mit Jagged.....	83
Abbildung 3-42 Auswertung CFU-GEMM Assays mit 2µg/ml Jagged	84
Abbildung 4-1 Alterungsmodell im hämatopoetischen System.....	89
Abbildung 4-2 VennDiagramm der Demethylierung aus den Differenzierungsversuchen und den CD34 ⁺ Zellen.....	91

Abbildung 4-3 Anzahl der differenziell methylierten CpGs in Alterung und Differenzierung in Abhängigkeit der prozentualen Methylierungsdifferenz in der Alterung	91
Abbildung 4-4 relative Lage der Primer und Infinium CpG-Sites	99
Abbildung 4-5 schematische Darstellung des Notch-Signalwegs	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammensetzung des Stammzellmediums LTBMCM	22
Tabelle 2 Zusammensetzung für 100ml des Stammzellmediums Stemline II	23
Tabelle 3 Versuchsansatz der semi-quantitativen real time PCR	31
Tabelle 4 Reaktionsablauf einer semi-quantitativen real time PCR	31
Tabelle 5 20 Gene, welche die höchste Methylierungszunahme von CB zu mPB aufweisen	46
Tabelle 6 20 Gene, welche die stärkste Methylierungsabnahme von CB zu mPB aufweisen	47
Tabelle 7 Werte der relativen Expression von <i>hoxA9</i> in leukämischen Zelllinien HL60, Kasumi, K562 und KG1A	59
Tabelle 8 Ergebnisse des HumanMethylation BeadChip27 für <i>hoxA9</i> der HPCs Granulozyten und Monozyten	81
Tabelle 9 Methylierungslevel der CD34 ⁺ Zellen aller HLA-Gene	95
Tabelle 10 Ergebnisse der Bisulfitsequenzierungen in der Zelllinie HL60 behandelt und unbehandelt	103
Tabelle 11 Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung von HPCs aus CB, BM und mPB und differenzierten Zellen	104
Tabelle 12 Liste und die Methylierungslevel der 63 Gene, welche in Alterung und Differenzierung eine Demethylierung von mind 15% aufweisen	106

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloide Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
AvB	Average beta value (Durchschnittlicher Wert; bei Methylierungsanalysen)
bp	Basenpaar
BFU-E	burst forming unit erythrocyte
BM	Knochenmark (bonemarrow)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CB	Nabelschnurblut (umbilical cord blood)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CFSE	5 (6)-Carboxyfluorescein-diacetate N-succinimidyl Ester
CFU-GM	colony forming unit granulocyte/macrophage
CFU-GEMM	colony forming unit Granulocyte-Erythrocyte-Monocyte-Megakaryocyte
CLP	lymphoide Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor)
CMP	myeloide Vorläuferzelle (common myeloid progenitor)
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	CpG-Dinukleotid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	fötales Rinderserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSC	Maß für die Zellgröße bei FACS-Analysen (Forward Scatter)
g	Maßeinheit der Erdbeschleunigung (1 g ~ 9,81 m/s ²)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	Granulozyten-Monozyten Vorläuferzelle (granulocyte-monocyte progenitor)
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde
HCl	Hypochlorid
HLA-DR	Humanes Leukozyten-Antigen DR
HPC	hämatopoetische Vorläuferzelle
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LTBMC	Long Term Bone Marrow Culture
M	Molar
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzelle (megakaryocyte-erythrocyte progenitor)
mg	Milligramm
MHSZ	multipotente hämatopoetische Stammzelle
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MNCs	mononukleäre Zellen (mononuclear cells)
mPB	mobilisiertes Peripherblut
MPP	multipotente Progenitorzelle
mRNA	messenger RNA
MSP-PCR	methylierungsspezifische Polymeraseketten Reaktion
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin and Streptomycin
PHSZ	pluripotente hämatopoetische Stammzelle
Pi	Propidium Jodid

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal Cell Derived Factor 1
sec	Sekunde
SSC	Maß für Dichte und Granularität einer Zelle bei FACS-Analysen (Side Scatter)
TPO	Thrombopoetin
UV	ultraviolett
V	Volt
WBC	White Blood Cell
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Stammzellen

Stammzellen definieren sich durch die duale Fähigkeit sich einerseits selbst zu erneuern (Self-renewal) und andererseits verschiedene spezialisierte Zelltypen hervorbringen zu können (Differenzierung) (Siminovitch, McCulloch et al. 1963). Bei dem Prinzip der Selbsterneuerung von Stammzellen gibt es zwei Möglichkeiten der Zellteilung, die asymmetrische und die symmetrische Teilung. Wie in Abbildung 1-1 dargestellt, werden bei einer symmetrischen Zellteilung zwei identische Tochterzellen, zum Beispiel mit Stammzellcharakter gebildet. Hingegen entstehen bei einer asymmetrischen Teilung eine Stammzelle und eine differenzierte Tochterzelle (Ho 2005; Morrison und Kimble 2006).

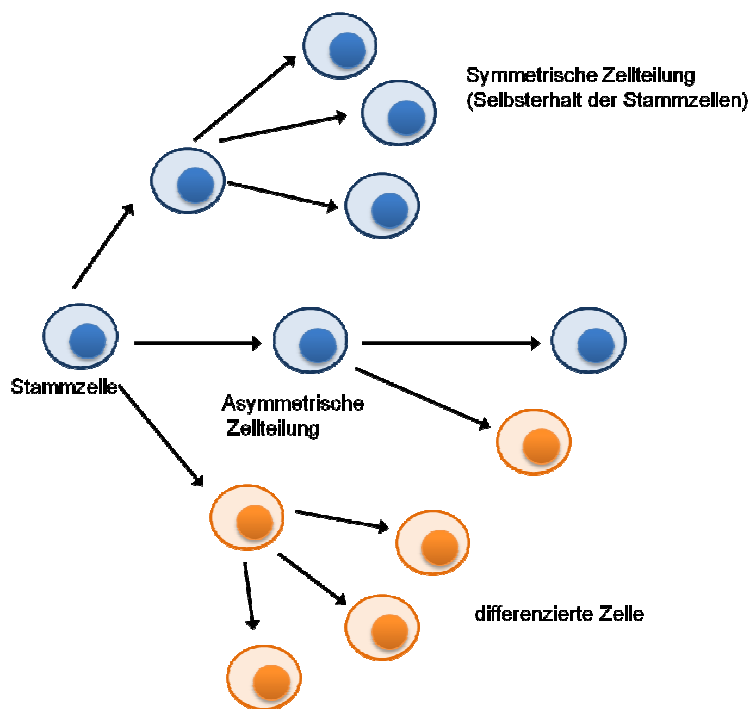


Abbildung 1-1 Schema der symmetrischen und asymmetrischen Zellteilung

Bei der asymmetrischen Zellteilung teilt sich die Stammzelle in eine Stammzelle und eine differenzierte Zelle, bei der symmetrischen Zellteilung werden zwei Tochterzellen mit gleichem Charakter gebildet (nach Ho 2005).

Die als omni-/ bzw. totipotent bezeichnete befruchtete Eizelle kann in alle Gewebetypen eines Organismus differenzieren (Tarnowski und Sieron 2006). Diese Fähigkeit geht in der befruchteten Eizelle nach dem Acht-Zell-Stadium verloren und

die pluripotenten, embryonalen Stammzellen liegen vor (Pesce, Anastassiadis et al. 1999; Pan, Chang et al. 2002).

Auch im adulten Organismus sind Stammzellen vorhanden. Sie haben ein multipotentes Differenzierungspotential und können in alle Zelltypen differenzieren, welche einen verwandten Gewebetyp aufweisen. So findet man Stammzellen in vielen adulten Geweben, unter anderem in der Haut (Alonso und Fuchs 2003), dem Dünndarm (Marshman, Booth et al. 2002; Brittan und Wright 2004) dem Knochenmark, der Leber (Nakauchi 2004; Song, Witek et al. 2004), der Lunge (Otto 2002; Neuringer und Randell 2004) und der Herzmuskulatur (Messina, De Angelis et al. 2004; Oh, Chi et al. 2004; Penn, Zhang et al. 2004).

Bei der Untersuchung von adulten Stammzellen spielt die Zugänglichkeit und die Möglichkeit der Anreicherung eine wichtige Rolle. Hämatopoetische Stammzellen sind bis jetzt die am besten charakterisierten und untersuchten adulten Stammzellen. Sie können anhand bestimmter Oberflächenmerkmale aus Nabelschnurblut, mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark isoliert und untersucht werden. Sie besitzen die Fähigkeit alle Bestandteile des hämatopoetischen Systems zu regenerieren (siehe auch Abbildung 1-2) (Majeti, Park et al. 2007).

1.1.1 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen

Blut ist eines der Gewebe mit der höchsten Proliferation und Regeneration im adulten Organismus. Alle zellulären Blutbestandteile unterliegen ständiger Erneuerung. Die Hämatopoese im adulten Organismus findet vor allem im Knochenmark statt. Die dort befindlichen hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) besitzen die Fähigkeit in alle Bestandteile des Blutes (Abbildung 1-2) zu differenzieren und sich selbst zu erneuern. Somit gewährleisten sie, während des gesamten Lebens eines Individuums, die Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Systems. Das erste Mal werden hämatopoetische Stammzellen 1909 von Maximov erwähnt. In seiner Arbeit beschreibt er einen Lymphozyten, der als Wanderzelle durch den Körper zirkuliert und dort differenziert (Maximov 1909). Hämatopoetische Stammzellen können, neben der schon erwähnten Selbsterneuerung, zunächst myeloide und lymphoide Vorläuferzellen bilden. In der myeloiden Reihe werden dann Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten gebildet. In der lymphatischen

Differenzierungsreihe werden neben T- und B-Lymphozyten Natürliche Killerzellen, die NK-Zellen gebildet, Abbildung 1-2 (Till 1961; Till und Mc 1961).

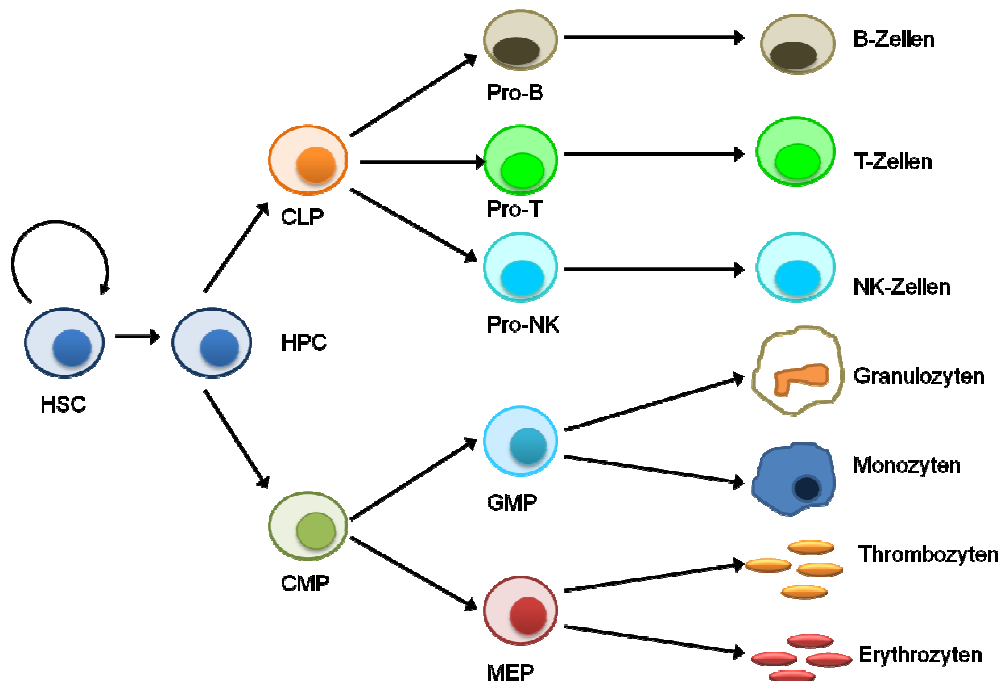


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Hämatopoese

Die pluripotente hämatopoetische Stammzelle (HSC) kann sich selbsterneuern und alle Bestandteile des Blutes bilden; HPC: Hämatopoetische Progenitorzelle; CLP: lymphoide Vorläuferzelle; CMP: myeloide Vorläuferzelle; Pro-B: B-Vorläuferzelle; Pro-T: T-Vorläuferzelle; Pro-NK: Natürliche Killer-Vorläuferzelle; GMP: Granulozyten-Monozyten Vorläuferzelle; MEP: Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzelle

Neben einer funktionellen Charakterisierung können Expressionsmuster bestimmter Oberflächenantigenen, sogenannter „Cluster of Differentiation“ (CD-Antigene), zur Identifikation hämatopoetische Stammzellen herangezogen werden. Der erste beschriebene „Stammzellmarker“ für ist das CD34 (Civin, Strauss et al. 1984). Obwohl das Antigen auch auf anderen Vorläuferzellen, wie zum Beispiel Endothelzellen zu finden ist (Civin, Strauss et al. 1984; Fina, Molgaard et al. 1990), kann es durch die Art der Aufarbeitung zur Anreicherung von hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen angewendet werden. Ebenso verhält es sich mit dem Oberflächenmarker CD133. In der Literatur werden $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ beschrieben. Diese Marker beschreiben sehr frühe Stammzellen des hämatopoetischen Systems (Majeti, Park et al. 2007).

Das Oberflächenantigen CD34 geht mit der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle verloren. Dafür weisen linien-determinierte Zellen die Expression von spezifischen Oberflächenmarkern wie CD3, CD20, CD33, CD71, CD41, CD61 oder CD117 auf (Civin und Gore 1993; Huang und Terstappen 1994).

1.1.2 Alterung von Stammzellen

Somatische Zellen in Säugetieren haben ein begrenztes Proliferationspotential, sie altern. So nimmt zum Beispiel die Regenerationsfähigkeit eines Organismus mit zunehmendem Alter ab. Dies schließt adulte Stammzellen wie die hier beschriebenen und untersuchten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ein (Hayflick 1965; Reincke, Hannon et al. 1982; Wagner, Horn et al. 2008).

Nicht nur das Genexpressionsmuster ändert sich im Laufe der Alterung von Stammzellen, auch die Anzahl der im alten Knochenmark nimmt deutlich zu (Morrison, Wandycz et al. 1996; Rossi, Bryder et al. 2005; Wagner, Bork et al. 2009). Die Stammzellen alter Mäuse zeigen eine deutlich höhere Proliferationsfrequenz, wohingegen die jungen Stammzellen quiescent sind. Die Zahl dieser sogenannten long-term-repopulating (LTR-HSC) nimmt mit dem Alter deutlich ab. (Morrison, Wandycz et al. 1996; Roobrouck, Ulloa-Montoya et al. 2008). Dies führt zur Annahme, dass durch erhöhte, „unkontrollierte“ Proliferation die Gefahr von Leukämien deutlich steigt. Die im Alter veränderte Hämatopoese und homöostatische Kontrolle gehen einher mit einem deutlichen Anstieg hämatopoetischer Erkrankungen des Knochenmarks, wie Anämien und myeloide Leukämien (Rossi, Jamieson et al. 2008).

Es gibt viele verschiedene Aspekte der zellulären Alterung. Abgesehen von der Akkumulation von DNA-Schäden, geht man von einem kontinuierlichen Alterungsprozeß aus (Kirkwood und Austad 2000; de Magalhaes und Church 2005).

Telomere stehen in engem Zusammenhang mit der Alterung. In einem kontinuierlichen Prozess werden sie mit jedem Zellzyklus kürzer. Stammzellen sind Telomerase-positiv, d.h. sie haben die Fähigkeit die Telomerlänge aufrechtzuerhalten. Im Alter zeigt sich zwar eine verkürzte Telomerlänge, diese trägt aber kaum zum Alterungsprozess bei (Weng 2001; Wagner, Bork et al. 2009). Ein

weiterer Gesichtspunkt des Alterns ist der oxidative Stress. Doch da in ihrer natürlichen Umgebung, dem Knochenmark unter hypoxischen Bedingungen vorkommen kann dies bei der Betrachtung von Alterung hämatopoetischer Stammzellen vernachlässigt werden.

Eine weiterer wichtiger Aspekt der Zellalterung sind Veränderungen in der epigenetischen Regulation, wie die hier untersuchte DNA Methylierung (Wilson und Jones 1983). Verschiedene Studien zeigen, dass extrinsische Signale durch das natürliche Microenvironment, die Nische, zur Alterung der Stammzellen beitragen (Mauch, Botnick et al. 1982; Gazit, Weissman et al. 2008; Wagner, Bork et al. 2009). Die Theorie dieser Arbeit besagt nun, dass es Signale aus der Stammzellnische gibt, welche das epigenetische Muster der DNA-Methylierung in hämatopoetischen Stammzellen beeinflussen. So kann die Expression einzelner Gene beeinflusst, bzw. die Alterung beobachtet werden.

1.2 Epigenetik

Die erste Definition der Epigenetik formulierte C.H. Waddington schon im Jahre 1939 als „the causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being” (Waddington 1939). Die Epigenetik beschreibt also vererbare Veränderungen in der Genexpression, ohne die DNA-Sequenz zu verändern. Im Gegensatz dazu, stehen zum Beispiel Mutationen.

Man kann epigenetische Modifikationen in der Zelle in vier Gruppen unterteilen. Die DNA-Methylierung, auf welcher der Focus dieser Arbeit liegt (siehe 1.2.1), ist der am besten untersuchte epigenetische Regulationsmechanismus.

Außerdem kann es am N-Terminus von Histonen durch Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und Phosphorylierung zu einer kovalenten Modifikation bestimmter Zielstrukturen kommen. Dadurch kann die Zugänglichkeit des Chromatins verändert und die Transkription eines Gens beeinflusst werden (Kouzarides 2007). Dieser Mechanismus beeinflusst auch oft die DNA-Methylierung. Histonmethyltransferasen steuern so die DNA-Methylierung (Lehnertz, Ueda et al. 2003; Tachibana, Matsumura et al. 2008). Weitere Mechanismen sind nicht-kovalente Mechanismen, wie das Ersetzen von Histonen durch Varianten, welche ebenfalls zu einer Chromosomenveränderung führen (Kouzarides 2007) und sogenannte non-coding RNAs. Zu diesen nicht kodierenden RNAs gehören zum Beispiel miRNAs. Mikro RNAs mit einer Länge von ~22bp, beeinflussen die Genexpression posttranskriptionell. Sie binden messenger RNAs und führen zu einem Abbau des Komplexes, wodurch die Translation nicht mehr stattfindet (Bork, Horn et al. 2010). Auch dieser Prozess ist ebenso wie alle epigenetischen Mechanismen essentiell für die Entwicklung und die Differenzierung von Zellen.

Diese verschiedenen z.T. auch interagierenden Mechanismen zeigen die Komplexität der epigenetischen Regulation in einer Zelle.

In dieser Arbeit wird die Dynamik der DNA-Methylierung von hämatopoetischen Stammzellen im Hinblick auf Alterung und myeloider Differenzierung untersucht.

1.2.1 Epigenetische Regulation durch DNA-Methylierung

Durch die DNA-Methylierung kommt es zu einem stabilen Genesilencing über Zellteilungen hinaus. Klassische Beispiele für diesen Regulationsmechanismus sind das genetische Imprinting und die Inaktivierung des X-Chromosoms im Laufe der Entwicklung (Bird 2002; Jaenisch und Bird 2003).

Dabei wird eine Methylgruppe auf ein Cytosin, welches sich 5′upstream vor einem Guanin befindet übertragen (Abbildung 1-3). Da die Methylierung innerhalb eines CG-Dinukleotids stattfindet, wird eine symmetrische Methylierung auf beiden Strängen der DNA gewährleistet (Richardson 2003).

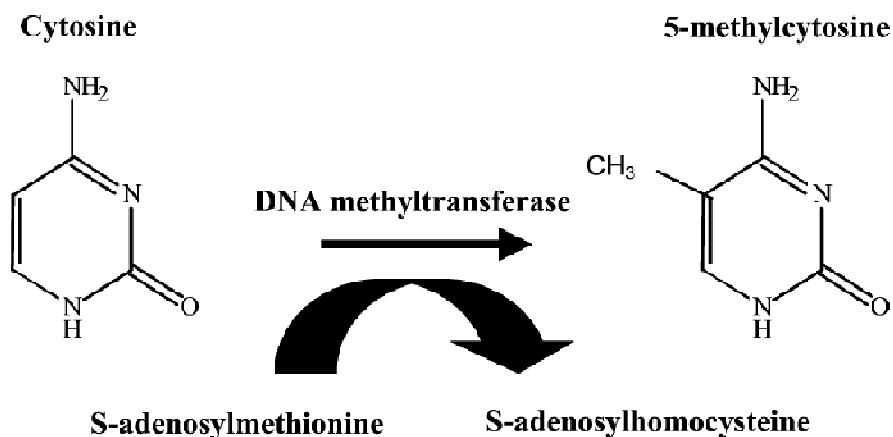


Abbildung 1-3 Cytosinmethylierung

Durch die DNA Methyltransferase wird eine Methylgruppe von S-adenosylmethionine auf das 5′C-Atoms von Cytosin übertragen. Es entsteht 5-Methylcytosin und S-adenosylhomocystein (Richardson 2003).

70-80% aller Cytosine innerhalb eines CG-Dinukleotids sind methyliert, bezogen auf das Gesamtgenom allerdings nur 4% aller Cytosine. Dabei befindet sich der Großteil der methylierten CG-Dinukleotide in der nichtkodierenden DNA (Attwood, Yung et al. 2002). Deutliche Methylierungsunterschiede findet man in den regulierenden Bereichen von Genen innerhalb von CpG-Dinukleotiden. Diese zeigen eine höhere Frequenz im 5′-Bereich verglichen zum 3′-Bereich von Genen (Razin und Riggs 1980; Ehrlich und Wang 1981; McClelland und Ivarie 1982; Attwood, Yung et al. 2002), so bestehen ca. 60% der Promotoren aus CpG-Inseln (Wang und Leung 2004).

Die durch die Methylierung hervorgerufene Strukturänderung bewirkt nun, dass die Transkriptionsmaschinerie nicht an die DNA binden kann und so die Expression beeinflusst wird. So können durch Methylierung die Bindestellen von transkriptionsfördernden Faktoren blockiert werden und das Gen wird dadurch reprimiert, siehe zum Beispiel (Watt und Molloy 1988; Prendergast und Ziff 1991).

Alternativ können durch CpG-Methylierung Bindestellen für Methylierungs-Binde-Proteine bereitgestellt werden und begünstigen so die Interaktion mit weiteren Proteinen wie Histondeacetylasen und Transkriptionsrepressoren. Durch diese Bindung kommt es zu einer Änderung in der Chromosomenstruktur, was letztendlich zu einer Inaktivierung des entsprechenden Chromatinbereichs führt, siehe zum Beispiel (Jones, Veenstra et al. 1998).

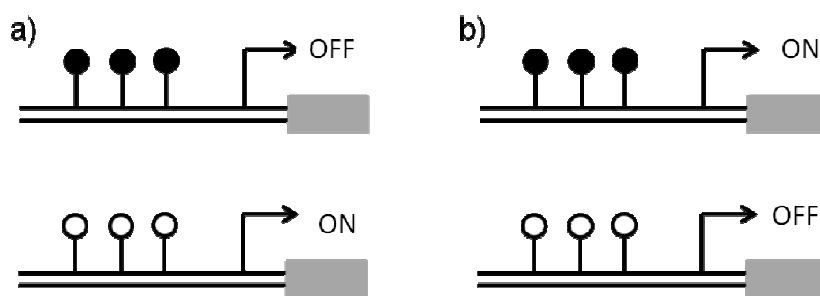


Abbildung 1-4 Methylierung im regulatorischen Promotorbereich und Transkription

Die schwarzen Punkte stellen methylierte, die weißen unmethylierte CpG-Dinukleotide dar. Eine Hypermethylierung des Promotorbereichs kann zu einem Stopp der Transkription führen (a), aber in seltenen Fällen auch zu einer verstärkten Transkription (b).

Kommt es zu einer Methylierung in der Silencer Region im Promotorbereich, können hier keine hemmenden Proteine binden und es findet eine Transkription statt (Riggs 1975; Jones und Takai 2001).

1.2.2 DNA-Methyltransferasen

Heutzutage sind vier humane DNA-Methyltransferasen bekannt (Lyko, Stach et al. 2004). DNMT1, die DNA Methyltransferase 1 (DNMT1), wurde das erste Mal 1988 kloniert und war für lange Zeit die einzige bekannte Säugetier-Methyltransferase. Sie katalysiert die Übertragung von Methylgruppen von S-adenosylmethionine auf die

5'Position von Cytosinen während der Zellteilung, siehe auch Abbildung 1-5 (Eckhardt, Lewin et al.). DNMT1 überträgt hierbei das Methylierungsmusters auf die Tochterzellen, ist aber nicht in der Lage DNA ohne Muster neu zu methylieren. Bei der semikonservativen Replikation befindet sich in der Tochterzelle ein hemimethylierter DNA-Doppelstrang und DNMT1 führt spiegelbildliche Cytosin-Methylierung auf dem unmethylierten DNA-Strang durch. DNMT1 scheint auch beim genomischen Imprinting und bei der X-chromosomalen Inaktivierung eine wichtige Rolle zu spielen (Bird 2002).

Inzwischen sind drei weitere Methyltransferasen entdeckt worden. DNMT2 und die *de novo* Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B (Okano, Bell et al. 1999). Dabei sind DNMT3a und DNMT3b dafür verantwortlich durch gezielte Signale bestimmte Gene zu methylieren und so ihre Expression zu beeinflussen. Es konnte auch gezeigt werden, dass sowohl die steady state Methylierung als auch die *de novo* Methylierung zumindest in gewissem Maße durch die Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b erfüllt werden kann (Okano, Bell et al. 1999).

DNMT2 zeigt keine katalytische Aktivität an der DNA. Es handelt sich hier um eine RNA Methyltransferase. Bei dieser Reaktion wird eine Methylgruppe auf das Cytosin 38 der Asparaginsäure in der tRNA übertragen (Goll, Kirpekar et al. 2006).

1.2.3 DNA-Methylierung in Entwicklung, Alterung und Krebsentstehung

Wie wichtig die DNA-Methylierung für die Entwicklung ist, zeigt die Letalität von DNMT-defizienten Mäuseembryonen, so sterben zum Beispiel DNMT3a^{-/-} Mäuse im Alter von 4 Wochen (Li, Bestor et al. 1992; Richardson 2003).

Im Verlauf der Alterung gibt es nun verschiedene Theorien, was die Veränderungen im Methylierungsmuster angeht. So behaupten Fraga et al, dass eineiige Zwillinge im Laufe ihres Lebens Unterschiede im Methylierungsmuster ausbilden. Nach ihnen bilden eineiige Zwillinge Unterschiede im Methylierungsmuster mit zunehmendem Alter aus. Es gibt also individuelle Unterschiede in der Methylierung von Zellen, welche sich im Laufe der Zeit ausbilden (Fraga, Ballestar et al. 2005).

Doch nicht der zeitliche Verlauf oder das Geschlecht sind ausschlaggebend, sondern verschiedene Gewebe zeigen deutliche Unterschiede in ihren Methylierungsmustern.

Der individuelle Unterschied innerhalb eines Gewebetyps ist sehr gering. Das Alter hat durchaus Einfluss auf das Methylierungsmuster, doch sind diese innerhalb eines Zelltyps und einer Altersgruppe konstant (Eckhardt, Lewin et al. 2006). So zeigen Feinberg et al., dass die abnehmende Plastizität alternder Zellen durch epigenetische Prozesse untermauert wird (Feinberg 2007).

Bei der Differenzierung von Zellen ändert sich das Methylierungsmuster. So nimmt die Methylierung von embryonalen Stammzellen mit ihrer Spezialisierung zu. Embryonale Stammzellen, welche eine Defizienz für Dnmt3a und Dnmt3b aufzeigen, sind über mehrere Zellzyklen vital, doch verlieren sie ihre Differenzierungspotential. Es kann keine *de novo* Methylierung stattfinden und dadurch kann keine epigenetische Regulation der Differenzierung erfolgen (Jackson, Krassowska et al. 2004).

Heutzutage rückt die Rolle der DNA-Methylierung auch immer mehr in den Fokus der Krebsforschung. Seit über 20 Jahren wird eine abberante Methylierung mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht (Lyko, Stach et al. 2004). Eine Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen oder Wachstumsregulatoren kann zur Tumorbildung, also zur Krebsentstehung führen. In Krebszellen sind die Promotoren vieler Tumorsuppressorgene hypermethyliert und deren Expression dadurch reprimiert, wohingegen der Methylierungsstatus der Zelle deutlich reduziert ist, was zu einer Destabilisierung des Genoms führt.

1.2.4 Beeinflussung der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2'-deoxycytidin

Durch verschiedene Inhibitoren der DNA-Methyltransferaseaktivität kann die epigenetische Regulation in der Zelle beeinflusst werden. Das Cytidin-Analogon 5-Aza-2'-deoxycytidin (Abbildung 1-5) wird in die Zelle aufgenommen und während der Synthesephase des Zellzyklus statt eines Cytosins in die DNA eingebaut.

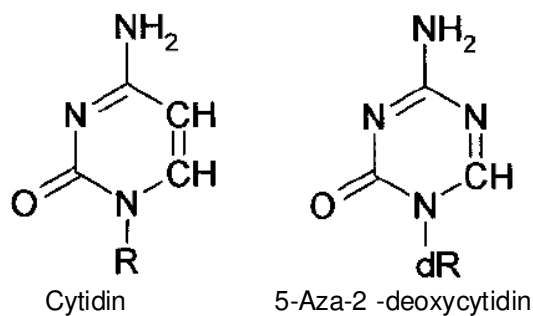


Abbildung 1-5 Strukturformel von Cytidin und dem Analogon 5-Aza-2'-deoxycytidin

Nach der DNA-Synthese kommt es zur Methylierungsreaktion. Dabei wird das ursprüngliche Methylierungsmuster den Neusynthetisierten DNA-Strang übertragen. Es kommt zur Bindung der Methyltransferase an das vermeintliche Substrat und so zur Inaktivierung der Enzymaktivität und schließlich zu einer Degradation des Enzyms. Das Methylierungsmuster kann nicht mehr vollständig auf die Tochterzelle übertragen werden und es kommt zu einer passiven Demethylierung (Creusot, Acs et al. 1982).

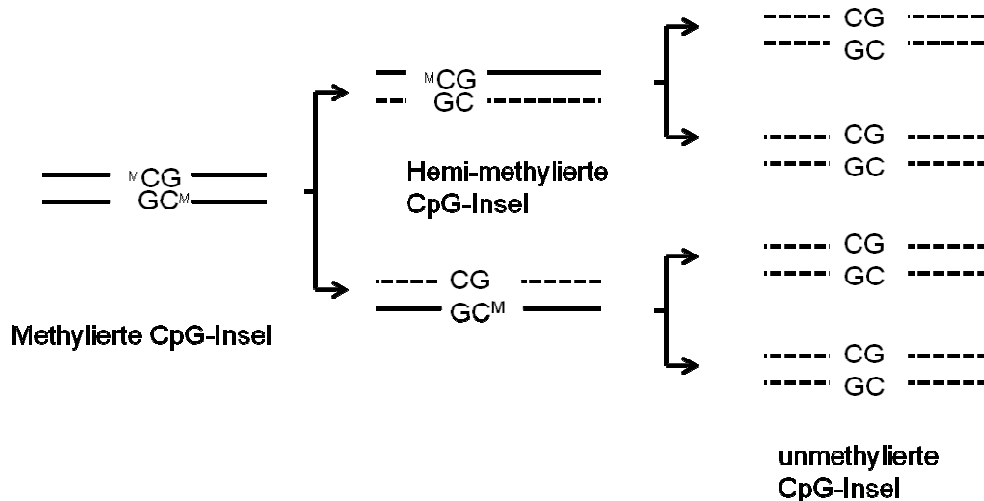


Abbildung 1-6 Demethylierung eines CpG-Dinukleotids, während der Zellteilung bei Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

Bei der ersten Zellteilung entstehen durch DNMT1 Hemmung hemimethylierte CpG-Dinukleotid. Wird die Hemmung bei einer weiteren Zellteilung noch aufrechterhalten, kommt es zu einer kompletten Demethylierung (nach (Christman, Schneiderman et al. 1985)).

1.2.5 Polycomb-Proteinkomplex

Polycomb-Proteine (PcG) können die Chromatinstruktur kontrollieren und regulieren. Es handelt sich um epigenetische Regulatoren, welche als Repressorkomplexe fungieren und spezifisch Gene reprimieren können. Der PcG-Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, dem Initiationskomplex, PRC2 bestehend aus drei Kernkomponenten (EZH2, EED und SUZ12) und dem Erhaltungskomplex PRC1 (bestehend aus sieben Komponenten).

Durch Bindung an spezifische Zielgene an der DNA kommt es zu einer Histonmethylierung und einer Änderung der Chromatinstruktur, wodurch die Expression reprimiert wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EZH2 DNMTs zu Zielgenen rekrutiert und diese durch zusätzliche DNA-Methylierung dauerhaft stillgelegt werden (Jones und Baylin 2002; Gil, Bernard et al. 2005). Insgesamt sind 1039 Zielgene für Suz12, 909 für EED und 1007 Zielgene für die Untereinheit EZH2 bekannt (Lee, Jenner et al. 2006). Diese Gene können durch den PRC-Komplex gebunden und ihre Expression reprimiert werden.

Eine Polycomb Regulation scheint ebenfalls wichtig, um HSCs im Stammzellkompartiment zu halten. So führt eine erhöhte Expression der PRC-Komplexgene Ezh2 und Bmi1 zu einem verstärkten Selbsterhalt von HSCs (Lessard, Schumacher et al. 1999; Kamminga, Bystrykh et al. 2006).

1.3 Homeobox Gene

Homeobox-Gene sind hochkonservierte DNA-Bindeproteine, Transkriptionsfaktoren, welche 1978 in *Drosophila* entdeckt wurden. Dort sind sie verantwortlich für eine korrekte Entwicklung der Segmente (McGinnis, Levine et al. 1984).

Alle Proteine aus dieser Familie besitzen eine hochkonservierte DNA-Sequenz von 183 bp, welche für eine 63 Aminosäure lange Bindedomäne mit einem Helix-Loop-Helix Motiv kodieren. Im Weiteren wurde diese Genfamilie in fast allen eukaryotischen Organismen gefunden (Gehring, Affolter et al. 1994).

Die größte Gruppe der Homeobox Gene bildet die Klasse-1-Homeobox Gene. Sie beinhalten neben ihrer Homeodomäne eine Konsensussequenz, die Hexapeptidsequenz. Dadurch ist eine Interaktion mit anderen Homeoboxproteinen möglich.

Sie sind in vier *hox*-Genclustern organisiert, auf vier verschiedenen Chromosomen, welche durch Vervielfachung eines ursprünglichen Loci entstanden sind. Des Weiteren können die 4 Loci (*HoxA-D*) in 13 Subklassen, beruhend auf ihrer Primärsequenz, unterteilt werden, Abbildung 1-7 (Magli, Largman et al. 1997).

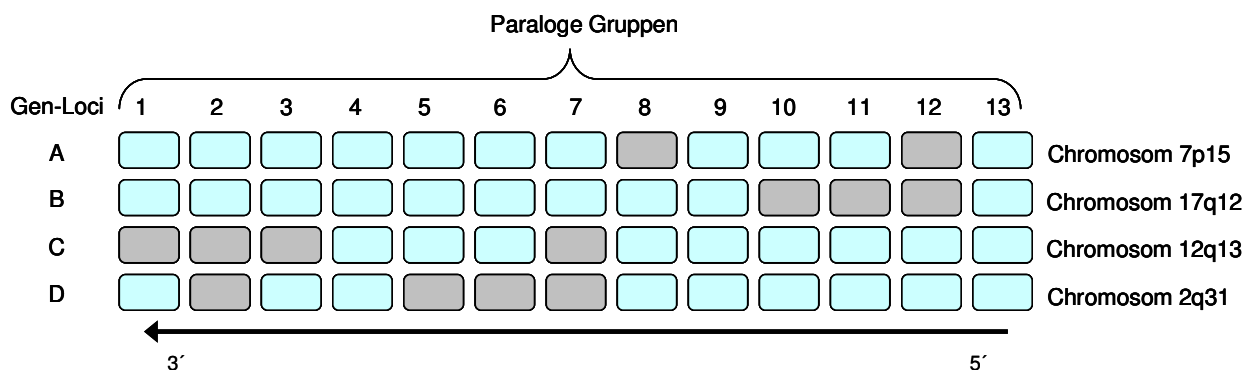


Abbildung 1-7 Schematische Darstellung der chromosomalen Anordnung der Homeobox Gene

Übereinanderstehende hellblaue Rechtecke stehen hier für maximale Sequenzhomologien zwischen den Loci. (grau: kein paraloges Gen in diesem Loci bekannt (Magli, Largman et al. 1997).

Nicht nur während der Embryogenese spielen *hox* Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle. Auch im adulten Organismus kann in verschiedenen Geweben eine *hox*-Expression gemessen werden (Gaunt, Krumlauf et al. 1989; Barba, Magli et al.

1993; Watrin und Wolgemuth 1993; Davis, Witte et al. 1995; Horan, Ramirez-Solis et al. 1995).

Das in dieser Arbeit untersuchte *hoxA9* wird in primitiven hämatopoetischen Stammzellen stark exprimiert, was auf eine Rolle in der frühen Hämatopoese deutet (Pineault, Helgason et al. 2002; Ferrell, Dorsam et al. 2005). So zeigen *hoxA9* defiziente Mäuse deutliche lymphoide und myeloide Defekte und abnorme hämatopoetische Stammzellen (Lawrence, Helgason et al. 1997). Des Weiteren ist *hoxA9* ein schwaches Onkoprotein, welches in akuten Leukämien oft dereguliert vorliegt (Thorsteinsdottir, Mamo et al. 2002).

1.4 Ziel der Arbeit

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) stellen die bis jetzt am besten charakterisierten und untersuchten adulten Stammzellen dar. Sie sind für die lebenslange Regeneration und den Erhalt des hämatopoetischen Systems verantwortlich. In dieser Arbeit sollte nun die Alterung hämatopoetischer Stammzellalterung untersucht werden. So ist zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen Alterung und Risiken degenerativer Krankheiten, wie Leukämien bekannt, auch die Regenerationsfähigkeit und die Größe des hämatopoetischen Stammzellpools nimmt ab. Allerdings konnten die genauen Regulationsmechanismen auf diesem Gebiet bisher noch nicht endgültig geklärt werden. Eine mögliche molekulare Basis für das Phänomen des Alterns stellen unter Anderem epigenetische Veränderungen dar. Diese beschreiben vererbare Änderungen in der Genexpression, welche nicht durch die DNA-Sequenz codiert werden, aber essentiell für viele physiologische und pathologische Prozesse sind. Der dabei am besten untersuchte epigenetische Mechanismus ist die DNA-Methylierung. Altersspezifische Methylierungsuntersuchungen in HSCs wurden bisher hauptsächlich in Mäusen durchgeführt, humane Daten stehen hingegen noch aus.

In diesem Zusammenhang sollte die Hypothese, dass Gene, welche für die Selbsterneuerung von humanen hämatopoetischen Stammzellen (HSC) notwendig sind, mit zunehmendem Alter und ihm Rahmen der Differenzierung durch DNA-Methylierung dauerhaft epigenetisch stillgelegt werden untersucht werden.

Dies soll durch eine globale DNA-Methylierungsanalyse mit Hilfe des HumanMethylation Bead 27 erfolgen. Des Weiteren sollen einzelne Kandidatengene auf ihre Funktion und ihre epigenetische Regulation untersucht werden. Dabei sollte das Hauptaugenmerk auf den Transkriptionsfaktor *hoxA9* gelegt werden, da dieser eine bedeutende Rolle in der hämatopoetischen Entwicklung und dem Selbsterhalt von hämatopoetischen Stammzellen spielt.

Ein genaueres Verständnis der molekularen Mechanismen der Alterung in hämatopoetischen Stammzellen könnte somit zur Identifikation eventueller Risikofaktoren für Erkrankungen des Knochenmarks und zu innovativen Therapieansätzen führen.

2. Material und Methoden

2.1 Primärmaterial

Hämatopoetische Vorläuferzellen wurden aus Nabelschnurblut, mobilisiertem Peripherblut oder Knochenmark isoliert. Es liegt in allen Fällen ein positives Ethikvotum der Universität Heidelberg vor. Die Probenentnahme findet nur nach schriftlicher Zustimmung der Patienten statt.

2.1.1 Knochenmark

Das Knochenmark (BM) wurde gesunden freiwilligen Spendern durch Punktion des Beckenkamms (Crista iliaca) unter Lokalanästhesie entnommen. Es wurden zweimal 20ml in einer Spritze (Becton Dickinson; Heidelberg; Deutschland) aufgenommen, welche bereits 10'000 IE Heparin (Braun AG; Melsungen; Deutschland) zur Antikoagulation enthält.

2.1.2 Mobilisiertes Peripherblut

Durch Gabe von 10µg/kg Körpergewicht rekombinantes G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor; Neupogen®) der Firma Amgen (Thousand Oaks, USA) werden die Spender mobilisiert. Dabei werden durch das Medikament Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut ausgeschwemmt. Das mobilisierte Peripherblut (mPB) wird durch Leukapherese in eine Natrium-Heparin haltige Spritze aufgenommen.

2.1.3 Nabelschnurblut

Das Nabelschnurblut (CB) wird durch eine enge Kooperation mit den Kliniken des St.Elisabethkrankenhauses, der Universitätsfrauenklinik Heidelberg und der Universitätsklinik Mannheim bereitgestellt. Durch Kompression der Vena umbilicalis, der nach der Geburt abgetrennten Nabelschnur können 10-50ml Blut gewonnen werden. Dieses wird in einem 50ml Reaktionsgefäß aufgenommen, in welchem zur Antikoagulation 10ml PBS, 10% Heparin/Natrium2500 (2500 IE Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) vorgelegt.

2.1.4 Isolation der hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen

30ml der mit PBS 1:1 verdünnten Blutproben werden auf 20 ml Ficollische Lösung geschichtet und bei 2000rpm mit 20 °C für 25 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Bei dieser von English entwickelten Methode (English und Andersen 1974) handelt es sich um eine Dichtegradientenzentrifugation, bei der sich mononukleäre Zellen in einem Interphasering anordnen. Die Ficollische Lösung, hat mit 1077 eine höhere Dichte als die Lymphozyten und Monozyten. Sie sammelt sich unterhalb der Interphase. Erythrozyten und Granulozyten befinden sich als Pellet am Boden des Tubes. Dieses wird ggf. für die Aufreinigung für Granulozyten verwendet. Über den Interphasering befindet sich das Blutserum, Abbildung 2-1.

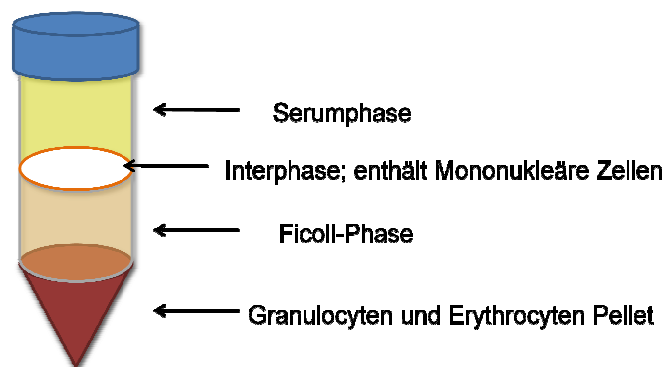


Abbildung 2-1 Phasentrennung von Blut nach einer Dichtegradientenzentrifugation

Nach vorsichtiger Abnahme der mononukleären Zellen, werden diese in 50ml PBS gelöst und bei 1800rpm für 7 Minuten herunterzentrifugiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal gewaschen. Dafür werden sie in 50ml MACS-Puffer gelöst und pelletiert (1800 rpm, 7 Minuten).

Die weitere Zellanreicherung der CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen erfolgte mittels magnetisch assoziierter Zellsortierung (MACS; magnetic associated cell sorting) der Firma MiltenyiBiotec (Bergisch Gladbach, Deutschland. Dafür werden die mononukleären Zellen mit magnetobead markierten Antikörpern (100µl/1*10⁸ Zellen) gegen das Oberflächenantigen CD-34 (CD34 MicroBead Kit, MiltenyiBiotec) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Um überschüssige Antikörper aus der Suspension zu entfernen, wird nach der Inkubation erneut mit MACS-Puffer gewaschen. Die Anreicherung der Zellen wird mit dem AutoMACS TM Separator (Firma MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach) durchgeführt. Die Zellen werden mit den

Programmen Possel_d und Possel_s zweimal hintereinander über die Magnetsäulen angereichert. Der Negativdurchlauf, welcher alle CD34⁻ Zellen enthält, wurde ggf. für die weitere Anreicherung von Monozyten, siehe auch 2.1.6, aufbewahrt.

Die Reinheit der Zellen wird mittels Durchflußzytometrie gemessen. Es wurden nur Zellen mit einer Reinheit von mehr als 90% für weitere Versuche verwendet.

2.1.5 Isolation von Granulozyten aus Nabelschnurblut

Zur Anreicherung von Granulozyten werden 5ml aus dem Pellet der Dichtegradientenzentrifugation aus 2.1.4 mit 45ml 1x Lyse-Puffer (Lysing Buffer, BD Bioscience Becton Dickenson, Heidelberg) versetzt und durch vortexen gemischt. Durch eine Inkubation für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur kommt es zur Lyse der in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten. Die Zellsuspension wird bei 1800 rpm für 7 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wird in MACS-Puffer gelöst und wieder zentrifugiert (1800rpm; 7 Minuten). Dieser Waschvorgang wird zweimal wiederholt. Danach werden 1×10^7 Zellen mit einem fluoreszenzmarkiertem Antikörper gegen CD16 gefärbt (30 Minuten bei 4°C) und nach einem weiteren Waschschrift mittels Durchflußzytometrie sortiert. In Abbildung 2-2 ist die Population der sortierten Granulozyten dargestellt.

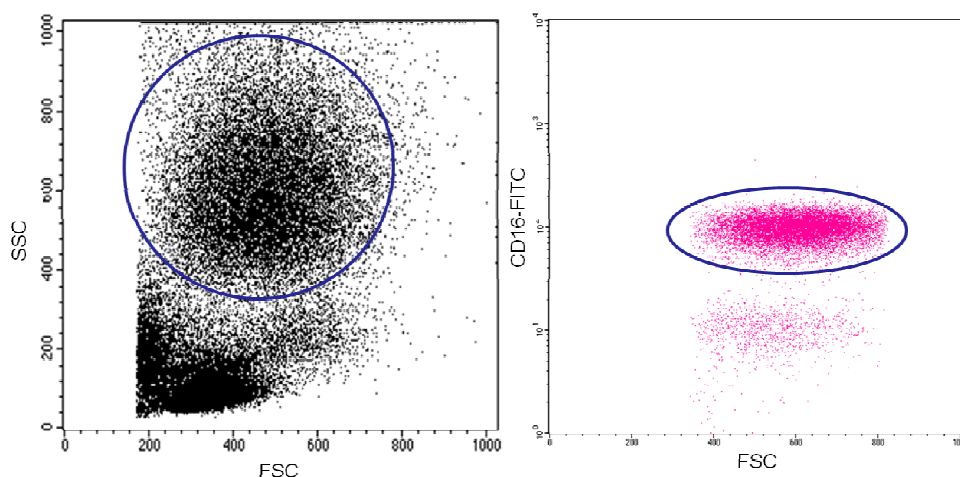


Abbildung 2-2 Population der Aufreinigung von Granulozyten im Dotplot

Im linken Dotplot ist der Forwardscatter gegen den Sidescatter aufgetragen. Die durch den blauen Kreis hervorgehobene Population stellt die Population der Granulozyten dar. Nur Zellen welche in diesem „Gate“ liegen und zusätzlich CD16 positiv sind, wurden als Granulozyten gesortet. Die CD16⁺ Population ist im rechten Dotplot dargestellt.

2.1.6 Isolation von Monozyten, T- und B-Zellen aus Nabelschnurblut

Aus dem Negativdurchlauf der CD34⁺ Anreicherung, 2.1.4 können Monozyten und die lymphoiden T- und B-Zellen, siehe auch Abbildung 1-2, angereichert werden. Dafür werden die Zellen gezählt und je nach gewünschtem Zelltyp mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Dabei werden Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD3 für T-Zellen und CD19 für B-Zellen eingesetzt. Die Monozyten werden gegen CD14 gefärbt und ebenso wie Granulozyten anhand Forward und Side Scatter und ihrer Fluoreszenz gefärbt. Die Population der Monozyten ist in Abbildung 2-3 dargestellt.

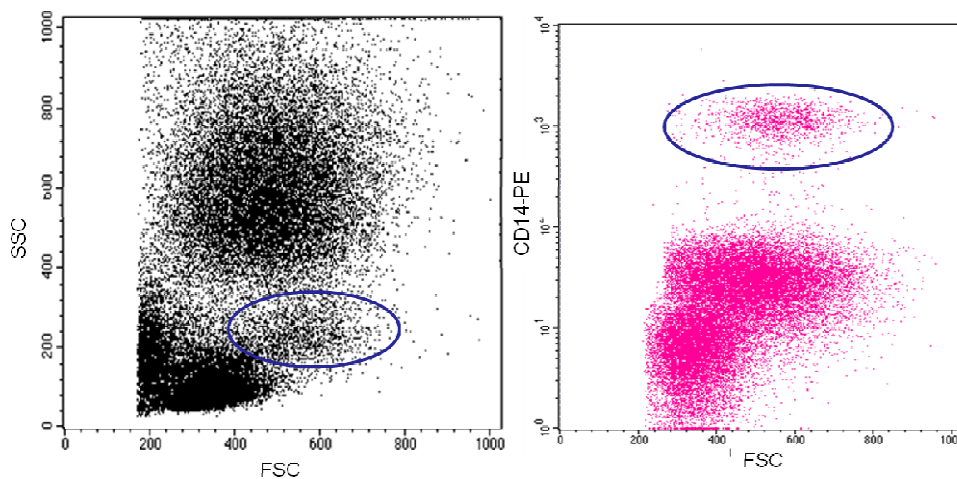


Abbildung 2-3 Population der Aufreinigung von Monozyten im Dotplot

Im linken Dotplot ist der Forwardscatter gegen den Sidescatter aufgetragen. Hervorgehoben ist die Population der Monozyten dargestellt. Nur Zellen, welche in dieser Population liegen und zusätzlich CD14 positiv sind, wurden als Monozyten gesortet. Die CD14 Fluoreszenzfärbung ist im rechten Dotplot dargestellt.

2.1.7 Durchflußzytometrie

Durch durchflußzytometrische Untersuchungen können einzelne Zellen aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften und Oberflächenantigene analysiert und angereichert werden. Die Grundlagen für dieses Verfahren wurden 1949 von Wallace Coulter (Coulter und Pappenheimer 1949) entwickelt.

Das Prinzip dieser Analyse liegt darin, dass Zellen in einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette aufgereiht an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden (Van Dilla, Trujillo et al. 1969).

Dabei wird für jede Zelle das absorbierte Licht gemessen, Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC). Dies ergibt dann die relative Größe der Zellen. Die Menge des reflektierten Lichtes, das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) entspricht der relativen optischen Dichte der Zelle. Durch Größe und Granularität kann eine grobe Analyse der Zellen stattfinden. Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung ist das Fluoreszenzsignal. Das Prinzip der Durchflußzytometrie ist in Abbildung 2-4 dargestellt. Hierbei wird die mit PBS gewaschene Zellsuspension mit einem fluoreszenzmarkiertem Antikörper für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Menge des Antikörpers wird je nach Zellzahl und gekoppeltem Flurochrom angepasst. Nach der Inkubation werden überschüssige Antikörper durch Waschen mit MACS-Puffer entfernt und die Zellen an einem FACS-Scan, bzw. einem FACS-Calibur (BD Bioscience Becton Dickenson, Heidelberg) analysiert. Die Auswertung erfolgt mit der Software CellQuest 3.3.

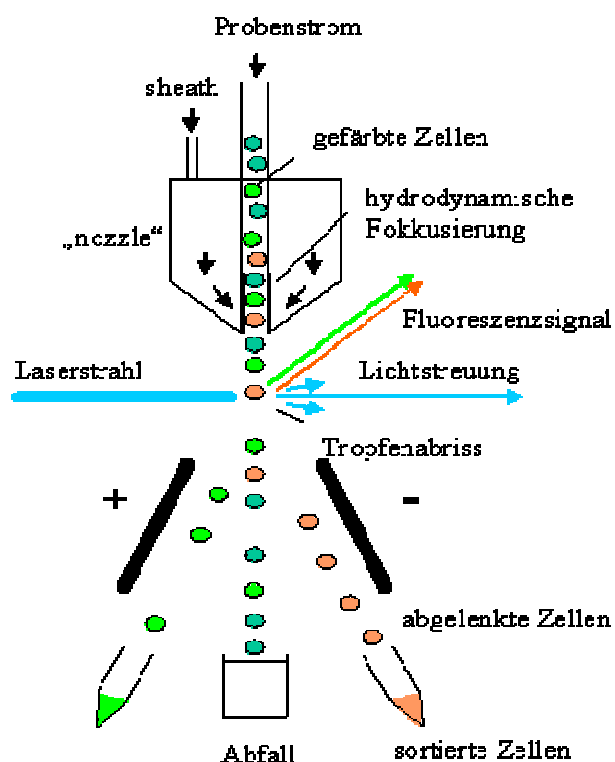


Abbildung 2-4: Prinzip einer durchflußzytometrischen Zellsortierung

Homepage <http://www.toxikologie.uni-mainz.de/FACS/Sorting.gif>

Sollten die Zellen z.B. für eine weitere CD34⁺ Anreicherung sortiert werden, wird dies durch die Core Facility mit Hilfe eines FACS-Vantage SE® (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

Wenn nicht anders beschrieben werden die Zellen in RPMI 1640 Medium, mit 1% Penicillin (10.000 U/ml) und Streptomycin (10mg/ml), 1% L-Glutamine (200nM) und 10% FCS-Gold versetzt kultiviert und passagiert. Das Medium und alle weiteren Bestandteile sind von der Firma PAA Labratories GmbH (Pasching, Österreich). Beim Passagieren der Zellen werden je nach Dichte der Kultur 1-2ml entnommen und mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Durch Zentrifugation (1800rpm; 7min.) werden die Zellen gewaschen. Das Pellet wird dann in 10 ml angesetzttem Zellkulturmedium (s.o.) aufgenommen und in 75cm² Zellkulturflaschen der Firma Nunc (Langenselbold, Germany) überführt. Die Zellen werden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Alle Zelllinien wurden von der Firma ATCC (Wesel, Deutschland) bezogen.

KG1A:

Ursprünglich wurden die Zellen aus dem Knochenmark eines 59 jährigen Patienten mit erytoider Leukämie welche, sich in eine akute myeloide Leukämie (Stamler, Stamler et al.) entwickelte, isoliert und immortalisiert. KG-1A ist ein Subklon der AML Zelllinie KG-1, welche als „undifferenzierte Variante“ beschrieben ist. Die Zellen werden alle 3-4 Tage mit PBS gewaschen und ausgesät mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ ml.

HL60:

HL60 Zellen wurden 1976 aus dem peripheren Blut einer 35 jährigen Frau isoliert. Die AML-Zelllinie wird wie KG-1A Zellen alle 3-4 Tage auf ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt.

K562:

Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie aus einer chronisch myeloiden Leukämie (CML) in einer Blastenkrise. Sie wurden aus dem Pleuralerguss einer 53 jährigen Frau isoliert. Die Passagierung erfolgt alle 3-4 Tage auf eine Verdünnung mit Kulturmedium von ca. $0,3-0,5 \times 10^6$ Zellen /ml.

Kasumi:

Isoliert aus dem Peripherblut eines 7 jährigen Jungen mit AML wird die Zelllinie alle 3-4 Tage mit Zellkulturmedium auf eine Dichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml verdünnt.

2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung werden 5×10^5 – 1×10^6 Zellen in 800µl FCS und 200µl DMSO (dimethyl sulfoxide, minimum 99,5% GC, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) in Kryotubes (Cryo tube TM vials 3,6ml, nuncTM, Roskilde, Dänemark) überführt. In einem Kryo-Behälter zur kontrollierten Abkühlung (Abkühlrate in Isopropanol ca. 1 °C/min), von der Firma (Thermo Fisher Scientific (Nalgene), Roskilde, Dänemark) werden die Zellen für mind. 24 Stunden bei einer Temperatur von -80 °C gefroren (Abkühlrate in Isopropanol ca. 1 °C / min). Zur dauerhaften Lagerung erfolgt eine Überführung in flüssigen Stickstoff (-269 °C).

2.2.3 Kultur primärer hämatopoetischer CD34⁺ Zellen

Die isolierten CD34⁺ Zellen, werden je nach Versuch, in zwei verschiedenen Medien kultiviert.

Für die CFSE-Färbung, 2.2.5, und die Kolonie-Versuche, 2.2.4, werden die Zellen in sogenanntem long-term bone marrow culture Medium (LTBMC) kultiviert. Es werden 200'000-400'000 Zellen/ml Medium eingesetzt. Die Zusammensetzung kann der folgenden Tabelle entnommen werden:

Tabelle 1 Zusammensetzung des Stammzellmediums LTBMC

Iscoves Medium (IMDM)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich	75%
FCS	Stemcell technology, Vancouver, Kanada	12,50%
Horse Serum	Stem cell technology	12,50%
Penicillin	PAA Laboratories	1000U/ml
Streptomycin	PAA Laboratories	100U/ml

Hydrocortison 100	Rotexmedica GmbH, Trittau	500ul
L-Glutamin	PAA Laboratories	2mmol/l
Flt-3L	R&D Systems, Minneapolis, USA	10ng/ml
TPO	R&D Systems	10ng/ml

Für alle weiteren Versuche wird das serumfreie Stemline II eingesetzt. Das Stammzellexpansionsmedium soll durch seine Zusammensetzung zum Erhalt und zur Vermehrung der CD34⁺ Zellen dienen. Auch in diesem Medium differenzieren die innerhalb weniger Tage aus. Es werden 200'000-400'000 Zellen in 1ml Medium kultiviert. Die Inhaltsstoffe des Mediums können Tabelle 2 entnommen werden:

Tabelle 2 Zusammensetzung für 100ml des Stammzellmediums Stemline II

Stemline II Medium	Sigma-Aldrich	95,5ml
TPO (10µg/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA	1ml
GCSF (10µg/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA	1ml
SCF (10µg/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA	1ml
FLT3c (100µg/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA	0,5ml
Penicillin (1000U/ml)	PAA Laboratories	1ml
Streptomycin (100U/ml)	PAA Laboratories	1ml
L-Glutamin (2µM)	PAA Laboratories	1ml

2.2.4 Koloniebildende-Wachstumsversuche

Um das Differenzierungspotential und den Stammzellcharakter von ggf. vorbehandelten zu analysieren, werden sogenannte Colony forming assays (CFU-GEMM; Koloniebildende Versuche) durchgeführt.

Dabei werden 200 Zellen in 200µl LTBMCM auf genommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wird langsam mit 500µl der zähflüssigen Methylcellulose (HSC-CFUlite with Epo, Milteny) durch Resuspendierung gemischt. Das Gemisch wird möglichst luftblasenfrei in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben.

Die Methylcellulose enthält die Zytokine EPO, SCF, GM-CSF und IL3 wodurch die Stammzellen zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden. Durch die Viskosität des Mediums können die Zellen sich aber nicht im Well verteilen und bilden abgegrenzte Kolonien. Die Auswertung des Versuchs erfolgt nach 14 Tagen durch die mikroskopische Analyse, anhand der Größe und Morphologie der Kolonien.

2.2.5 Proliferationsmessungen mittels 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester-Färbung (CFSE-Färbung)

Um das Proliferationsverhalten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen genauer untersuchen zu können, wird eine Färbung mit 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl Ester (CFSE, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) durchgeführt. Die CD34⁺ angereicherten Zellen werden zunächst in 750µl PBS mit 0,1% hitzeinaktiviertem FCS aufgenommen und mit 250µl einer 10µM CFSE-Lösung gemischt. Nach einer Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 10 Minuten wird die Färbereaktion durch Zugabe von 7ml eiskaltem RPMI-Zellkulturmedium (siehe 2.2) und einer weiteren Inkubation für 5 Minuten auf Eis gestoppt. Danach werden die Zellen pelletiert (1800rpm; 7min) und in PBS resuspendiert. Mit einer erneuten Zentrifugation (1800rpm; 7min) wird überschüssiger Farbstoff entfernt. Dieser Waschvorgang wird insgesamt dreimal wiederholt.

CFSE ist ein zytoplasmatische Farbstoff. Er ist für die Zelle nicht toxisch und wird bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen übertragen. Dadurch verdünnt sich der Farbstoff und die Teilungen können durchflußcytometrisch gemessen und

bestimmt werden. Je stärker die CFSE-Konzentration in den Zellen ist, desto weniger Teilungen hat sie durchlaufen.

2.2.6 *In vitro* Behandlung mit 5 Aza-2'-deoxycytidin

Nach einigen Kulturoptimierungsversuchen wurden alle Versuche wie folgt durchgeführt. Es werden 500'000 HL60 Zellen in 5ml 1640 RPMI-Medium (10% FCS; 1% Pen/Strep; 1% L-Glutamin) aufgenommen und kultiviert. Die Zellen werden drei Tage lang alle 24 Stunden mit 200nM 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt. Nach weiteren drei Tagen Kultur werden die Zellen für weitere Versuche abzentrifugiert. Das Prinzip der Wirkungsweise ist in Kapitel 1.2.4 dargestellt.

2.3 Molekularbiologische Standardmethoden

2.3.1 DNA Isolation

Die Isolation der DNA erfolgt bei Zellzahlen <400'000 mit dem QIAamp DNA Micro Kit, dieses Kit ist für geringe Zellmengen optimiert. Bei mehr als 400'000 Zellen wird die DNA mit QIAamp DNA Blood Mini Kit isoliert.

2.3.2 Fällung von DNA

Zur Reinigung der Nukleinsäuren wird eine Fällung durchgeführt, um überschüssige Salze oder Proteinreste zu entfernen.

Die DNA wurde mit 0,1 Vol. 10x Natriumacetat, 4,5M, pH5,2 und 2,5 Vol. Ethanol absolut versetzt und bei -20°C für mindestens eine Stunde gefällt. Der Alkohol entzieht der Nukleinsäure die Hydrathülle, die freien negativ geladenen Phosphate der DNA werden durch die Kationen abgesättigt, die DNA fällt aus. Die durch Zentrifugation (4°C, 30 Minuten, 14000 Upm) pelletierte Nukleinsäure wurde anschließend mit 70% Ethanol gewaschen (4°C, 20 Minuten, 14000 Upm), um Salze zu entfernen. Das getrocknete Pellet wurde je nach der Menge der eingesetzten DNA in 10-300µl HPLC-H₂O gelöst.

2.3.3 Bisulfit-Konversion der DNA

Bei der Untersuchung des DNA-Methylierungsstatus macht man sich die chemische Eigenschaft der DNA zunutze. Durch die Behandlung mit Natriumbisulfit werden unmethylierte Cytosine in Uracil konvertiert und können so von methylierten, welche nach dieser Reaktion unverändert als Cytosine vorliegen unterschieden werden. Diese Behandlung, von Clark et. al (Clark, Harrison et al. 1994) eingeführt, verläuft in drei Schritten (siehe Abbildung 2-5), (1) die Addition von Bisulfit an die 5-6 Doppelbindung des Cytosin; (2) das entstandene Cytosinsulphonat wird durch hydrolytische Deamination zu einem Uracilsulphonat; (3) und bei einer anschließenden Entfernung der Sulphonat-Gruppe durch Alkalibehandlung entsteht die Base Uracil.

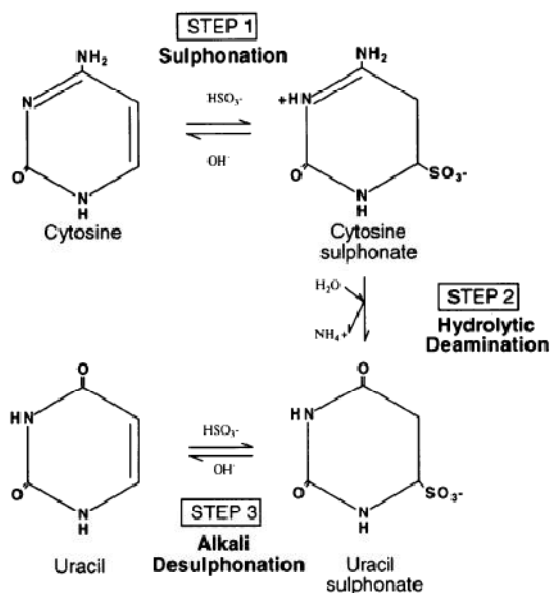


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Bisulfit-Reaktion

Cytosin wird durch Inkubation mit Natriumbisulfit über die Zwischenstufen von Cytosinesulphonat und Uracilsulphonat zu Uracil umgewandelt (Clark, Harrison et al. 1994).

Die Behandlung wurde mit Hilfe des EpiTect Bisulfite Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

2.3.4 RNA Isolation

Durch diese von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987) entwickelte Methode können aus Zellen DNA, RNA und Proteine getrennt isoliert

werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode nur für die Isolation von RNA eingesetzt.

Zur Isolation der RNA wird das Zellpellet zunächst in 1ml TRIzol Reagent der Firma Invitrogen gelöst und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Falls die weitere Isolation nicht direkt erfolgte, wurde die Trizol-Probe bei -80 °C gelagert.

Durch Zugabe von 200µl Chloroform, dem Mischen der Probe durch Inversion und einer Inkubation bei 15-30 °C für 2-3 Minuten, wird der Nukleo-Proteinkomplex komplett aufgespaltet. Nach Zentrifugation (4 °C, 12000g, 15min) des Gemisches kommt es zu einer Phasentrennung. Die obere aquatische Phase enthält die hier gewünschte RNA, die Interphase, die genomische DNA enthält und der unteren Phenol-Chloroform-Phase, welche die Proteine enthält. Die RNA-Phase wird in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wird durch mischen der Lösung mit 500µl Isopropanol gefällt (10min bei RT) und bei einer anschließenden Zentrifugation (4 °C, 12000g, 10min) pelletiert. Das Waschen der RNA erfolgt durch Lösung in 1ml 75% Ethanol und erneuter Zentrifugation (4 °C, 10000g, 10min). Der Überstand wird verworfen und die anschließend luftgetrocknete RNA in 10µl RNase freiem Wasser gelöst.

2.3.5 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Um die Reinheit und die Konzentration der DNA festzustellen, wurde eine Messung mit dem NanoDrop-Gerät1000 Spectrometer der Firma peqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Hier wird die optische Dichte im relativen Vergleich zu einer Referenzprobe bestimmt. Es werden Messungen im Bereich von 220nm bis 350nm vorgenommen. Über das Lambert-Beer-Gesetz kann nun die Konzentration bestimmt werden ($c = OD_{260} \cdot V \cdot \epsilon$).

Durch die Bestimmung des Quotienten aus den Absorptionen $\lambda = 260\text{nm}$ und $\lambda = 280\text{nm}$ kann außerdem der Reinheitsgrad der Nukleinsäure bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum der RNA/DNA liegt bei 260nm, das aromatischer Aminosäuren bei 280nm. Liegt dieser Quotient bei 1,8, kann davon ausgegangen werden, dass keine Proteinkontaminationen vorliegen.

Die Messung wurde mit 1 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung durchgeführt. Als Referenzprobe wurde das jeweilige Lösungsmittel der DNA herangezogen.

2.3.6 cDNA Synthese

Zur Synthese von cDNA aus der isolierten RNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems (FosterCity, USA) eingesetzt. Pro Reaktion wurde 500ng bzw. 1 µg RNA umgeschrieben.

2.3.7 Primer

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) und auch für die Sequenzierung wurden spezifische Primer konstruiert. Mit Hilfe des Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) wird darauf geachtet, dass die Oligonucleotide (18-25mere) einen GC-Gehalt von 40-60% haben, keine internen „Repeats“ beinhalten und keine Selbstkomplementarität vorliegt. Zusätzlich sollte das 3'-Ende aus einem Guanin oder einem Cytosin bestehen, wodurch eine bessere Elongation gewährleistet wird.

Bei Primern für die Bisulfitsequenzierung wurde darauf geachtet, dass keine CpG-Dinukleotid in den Primern enthalten ist.

Für die methylierungsspezifische PCR wurden die Primer mit dem Onlinetool MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>), hier werden die Primer über eine CpG-Dinukleotid gelegt. Man erhält jeweils ein Primer-Paar für die methylierte CpG-Dinukleotid und ein Paar für die unmethylierte Sequenz.

Die Primer wurden mit dem Onlineprogramm „Oligonucleotide Properties Calculator“ (<http://www.basIc.northwestern.edu/biotools/oligocalC.html>) überprüft. Die Herstellung erfolgte durch die Firma biomers.net GmbH (Nash, Kurzrock et al.).

Im Anhang befinden sich die Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten Primer.

2.3.8 Polymerasekettenreaktion

Das von K.B. Mullis (1983) entwickelte Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Abschnitte (Saiki, Scharf et al. 1985).

Die Reaktion wird in einem Volumen von 25µl durchgeführt, dabei wird jeweils 1µl der jeweiligen Primer (10pmol/µl), 1µl eines dNTP-Mixes, wobei jedes der 4 dNTPs in einer Konzentration von 10mM vorlag, 2,5µl 10x Puffer (Qiagen, Hilden) sowie 0,5 µl einer Hot Star *Taq*-Polymerase (5Units/µl) aus *Thermus aquaticus* der Firma Qiagen eingesetzt. Es werden ca. 200-250ng Matrizen-DNA zugegeben, wobei deren Konzentration mittels NanoDrop bestimmt wird.

Die Reaktionen werden mit dem DNA Engine Peltier Thermal Cycler (PTC-200), der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt.

Einer Aktivierung der Hot Star *Taq*-Polymerase (95°C für 5 Minuten) und einem initialen Denaturierungsschritt (94°C für 30 Sekunden) folgt ein Zyklus bestehend aus 3 Schritten: Primerbindung (spezifische Temperatur, 30 Sekunden), DNA-Synthese (72°C, 90 Sekunden) und erneute Denaturierung (94°C, 30 Sekunden). Dieser Zyklus wurde 35-40x wiederholt, es folgte eine finale Elongation (72°C, 10 Minuten). Die Primerbindung, bzw. Annealingtemperatur, richtet sich nach der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

2.3.9 Methylierungsspezifische PCR

Bei der Methylierungsspezifischen PCR (MSP-PCR), entwickelt von S. Baylin und J. Herman (1996), wird die Technik der Polymerasekettenreaktion verwandt um den Methylierungsstatus einzelner CpG-Dinukleotide in der genomischen DNA zu untersuchen. Dafür wird die DNA zunächst Bisulfit-behandelt (siehe 2.3.3). In einem weiteren Schritt werden nun zwei Polymerasekettenreaktionen durchgeführt. Dabei werden die Primer so gewählt, dass sie im Promotorbereich eines Gens liegen und ein CpG-Dinukleotid beinhalten. An diesen Stellen bindet ein Primerpaar an die methylierte DNA, also an die Cytosinbase. Ein weiteres Primerpaar, welches an der gleichen Stelle im Genom liegt bindet an das unmethylierte CpG-Dinukleotid, also an

die umgewandelte Uracilbase, welche als Thymin vom Primer gebunden wird. Die Reaktion an sich verläuft als normale PCR in zwei verschiedenen Ansätzen, wobei sich die Annealingtemperatur der Primer unterscheiden kann. Auch hier wurde zur Überprüfung der Ergebnisse eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

2.3.10 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt mit dem NucleoSpin Extract II Kit der Firma Macherey und Nagel (Düren, Deutschland).

2.3.11 Semi-quantitative real time PCR

Durch die semiquantitative real time PCR, kann die Expression von Genen relativ zu einem Referenzgen bestimmt werden. Dazu werden genspezifische TaqMan Sonden, der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) eingesetzt. Hier befinden sich am 5' Ende ein Reporter und am 3' Ende der Quencher. Bei dieser Methode macht man sich den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, FRET, zu nutze. Dabei wird ein Reporter-Fluorchrom durch Licht einer bestimmten Wellenlänge (hier 5-Carboxyfluorescein; FAM; 518nm) angeregt und die Emission wird auf einen Quencher (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA)) übertragen, welcher dann ein Emissionssignal einer bestimmten Wellenlänge abgibt. Dieses Signal kann durch das Step OnePlus® Gerät der Firma Applied Biosystems detektiert werden.

Zunächst binden die genspezifischen Primer und die TaqMan Sonde an den Matrizenstrang. Während der Amplifikation wird die Sonde in 5'-3'Richtung gespalten und es kommt zur FRET-Reaktion. Die Spaltung kann nur an gebundenen Sonden stattfinden, daher ist die Fluoreszenz direkt proportional zur amplifizierten Sequenz. Die Amplifikation verläuft zunächst in einer exponentiellen Phase, welche dann in eine lineare Wachstumsphase übergeht und ein abschließendes Plateau erreicht. Zur Quantifizierung wird die Zyklenzahl aus der exponentiellen Phase verwendet. Diese wird in Relation des CT-Wertes eines Genes, welches in allen Zellen stark exprimiert wird gesetzt. Hier in dieser Arbeit wurde GapdH, als Referenzgen verwendet.

Die Formel zur Quantifizierung lautet:

$$\frac{2^{(\Delta CT \text{ Testgen})}}{2^{(\Delta CT \text{ Kontrollgen})}} = \text{Relative Expression des Testgens}$$

Der Versuchsansatz und den Reaktionsverlauf können Tabelle 3 und Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 3 Versuchsansatz der semi-quantitativen real time PCR

qPCR MasterMix 2x (eurogentec; Seraing, Belgien)	10µl
genspezifische TaqMan Sonde 10x	1µl
Wasser	7µl
cDNA Template (10ng/µl)	2µl

Tabelle 4 Reaktionsablauf einer semi-quantitativen real time PCR

Holding Stage	
2 Minuten	50 °C
10 Minuten	95 °C
Zyklen (40mal wiederholt)	
15 Sekunden	95 °C
1 Minute	60 °C

2.3.12 Agarosegelelektrophorese

Eine Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung der DNA entsprechend ihrem Molekulargewicht.

Analytische Gele:

Für die Durchführung einer analytischen Gelelektrophorese wurden horizontale Elektrophoresekammern der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) eingesetzt. Es wurden Agarosekonzentrationen (Roth MEE0 Ultra-Qualität; Karlsruhe, Deutschland) von 1,5% in 0,5xTBE eingesetzt. TBE diene hierbei als Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 bis 120 mA für 30-45 Minuten.

Die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese wurden unter UV-Licht betrachtet. Zur Auswertung und Dokumentation wurde das Gerät BioDocAnalyze der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) eingesetzt.

2.3.13 Bisulfitsequenzierung

Die Bisulfitsequenzierung wurde an aufgereinigten PCR-Produkten, durch die Firma Qiagen durchgeführt. Die genomische DNA wird zunächst einer Bisulfitkonversion unterzogen. Danach wird eine Polymerasekettenreaktion mit speziellen Primern durchgeführt, diese enthalten keine CpG-Dinukleotide und können sowohl methylierte als auch unmethylierte template DNA binden. Durch eine Sequenzierungsreaktion kann nun innerhalb des Amplikons zwischen methylierten und unmethylierten CpG-Dinukleotiden unterschieden werden, bzw. kann das Methylierungslevel bestimmt werden.

2.3.14 Analyse der DNA-Sequenzen

Das Softwarepaket DNASTar der Firma Lasergene Inc. (Madison, USA) diene der Bearbeitung und Analyse der Sequenzen. Das Programm EditSeq stellt Sequenzen als Textdateien dar, in dem dargestellten FASTA-Format können die Sequenzen von nahezu jedem Programm, bzw. von allen Datenbanken eingelesen und analysiert werden. Weitere Computerprogramme dieses Programmpakets sind SeqMan, damit

können verschiedene DNA-Sequenzen miteinander verglichen und genaue Übereinstimmungen herausgearbeitet werden.

2.3.15 siRNA Transfektion

Bei den siRNAs der Firma Qiagen werden zunächst 200'000 Zellen in 100µl Stem II Medium in einem Well, einer 24-Well-Platte, aufgenommen. Es werden 9µl siRNA (20µM), 18µl HiPerfect Transfection Reagent und 91µl Stem II Medium in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert, dadurch ergibt sich eine Endkonzentration der siRNA von 100nM. In dieser Zeit bilden sich Transfektionskomplexe, welche aktiv in die Zelle aufgenommen werden können. Nach 10 Minuten Inkubation wird das Transfektionsgemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben und bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Nach 6 Stunden werden 400µl Medium zugegeben und die Zellen weiter wie gewohnt kultiviert.

Die Accel siRNA der Firma Thermo Sciectific wird in einer finalen Konzentration von 1µM eingesetzt. Es werden 100'000 Zellen in 250µl Accel siRNA-Medium aufgenommen und 3,5µl siRNA zugegeben. Die durch resuspendieren gemischte Zellsuspension wird auf eine 96-Well-Platte gegeben. Dabei werden 25'000 Zellen pro Well eingesetzt und bei 37°C im Inkubator kultiviert.

Bei beiden siRNA Transfektionen werden nach 72 Stunden Kultur die Zellen für weitere Versuche eingesetzt.

2.4 Infinium HumanMehtylation27 BeadChip

Mit Hilfe dieses Arrays kann der Methylierungsstatus von insgesamt 27578 CpG-Dinukleotide, welche in den regulierenden Bereichen von mehr als 14'000 Genen liegen, bestimmen (Bibikova, Lin et al. 2006).

Zunächst wird die Qualität der isolierten DNA, welche untersucht werden soll, kontrolliert. Hierbei wird eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.12) durchgeführt. So können die Konzentration (für den Chip werden 500ng DNA benötigt) und das Molekulargewicht der DNA bestimmt werden. Danach wird die DNA Bisulfit-

behandelt und eine „whole genome amplification“ wird durchgeführt. Die Durchführung erfolgte durch die Core Facility des DKFZ.

Pro CpG-Dinukleotid sind zwei Beads auf der Oberfläche des Chips gecooated. Diese Chips tragen eine linker-DNA, eine für eine methylierte CpG-Site (M-Bead-Typ) und einen für eine unmethylierte CpG-Site (U-Bead-Typ), anhand welcher die genomische DNA erkannt und gebunden wird. Nur durch perfekte Übereinstimmung der gebundenen DNA kommt es zu einer Einzelbasenverlängerung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs, siehe auch Abbildung 2-6. So kann die Menge der Methylierung bzw. der unmethylierten DNA quantifiziert werden. Gelesen wird die Platte durch einen sogenannten Bead Array Reader. Dabei wird das Signal der methylierten Beads durch die Summe aller Signale dividiert, das Ergebnis liegt dann zwischen Null und Eins. Wobei Null unmethyliert und Eins komplett methyliert bedeutet. Die weitere Auswertung erfolgt mit der speziellen Software BeadStudio bzw. MicrosoftExcel.

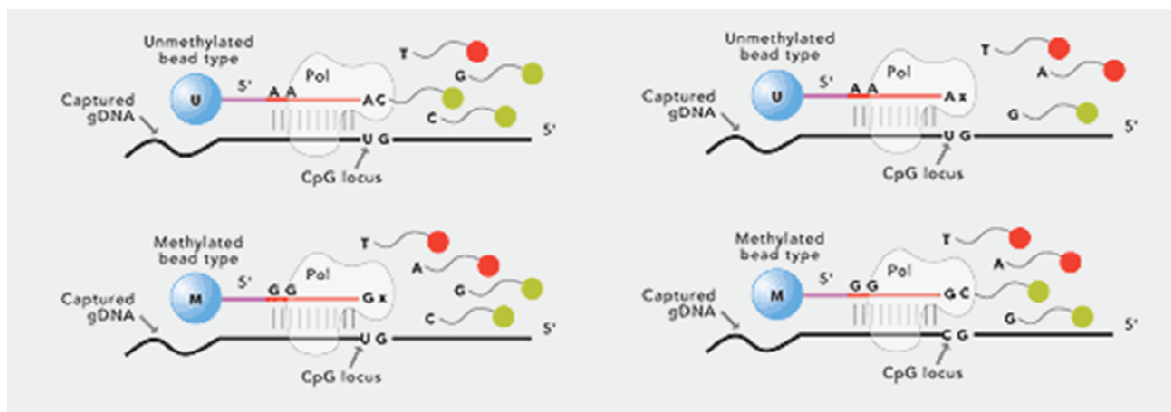


Abbildung 2-6 Prinzip des HumanMethylation 27 Bead Chip

http://www.illumina.com/technology/infinium_methylation_assay.ilmn Der Infinium Methylierungs Assay benutzt 2 unterschiedliche Beadtypen. Der eine bindet die unmethylierte DNA einer CpG-Site, der andere bindet die methylierte DNA der Selben CpG-Site. Durch eine Einzelbasenverlängerung mit markierten ddNTPs können Methylierungsunterschiede in ein detektierbares Fluoreszenzsignal übersetzt werden.

2.4.1 Signalweganalysen

Analysen der Signalwege wurden mit dem Onlinetool, Ingenuity Pathway Analysis der Firma Ingenuity Systems (Redwood City, USA) durchgeführt.

2.4.2 Bioinformatische Analyse und Auswertung

Die Daten des HumanMethylation 27 BeadChip wurden zunächst Quantilnormalisiert. Die p-Werte für die Vergleiche der Datensätze wurde mittels Benjamini-Hochberg Korrektur statistisch angepasst (Gronniger, Weber et al. 2010). Die bioinformatischen Berechnungen wurden in der bioinformatischen Core Facility des DKFZ.

2.4.3 Validierung der Daten durch Pyrosequenzierung

Die Validierung der Chip Daten wurde mittels 454-Pyrosequenzierung durchgeführt. Dabei wurden einzelne Kandidatengene aufgrund ihrer differentiellen Methylierung und biologischen Relevanz ausgewählt und eine 454-Deep DNA bisulfite Sequenzierung durchgeführt. Die Durchführung der Experimente erfolgte hier durch Michael Bocker im DKFZ. Bei der Pyrosequenzierung wird durch ein Luziferase-System in Echtzeit beobachtet, wie einzelne Nukleotide an einen neusynthetisierten DNA-Strang angehängt werden. Dabei entsteht bei jedem Einbau ein Lichtblitz, welcher detektiert werden kann.

3. Ergebnisse

3.1 Infinium Human Methylation Bead Chip27

Durch den Infinium Human Methylation Bead Chip27 werden 27'578 CpG-Dinukleotide auf ihren Methylierungsstatus untersucht. Diese liegen in den Promotorbereichen von 14'475 Genen, es werden also durchschnittlich zwei CpG-Dinukleotide pro Gen untersucht. Die Versuche wurden in enger Kooperation mit Michael Bocker aus dem deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg durchgeführt und zum Teil in (Hellwig*, Bocker* et al. 2011) publiziert. Alle Messwerte wurden durch die bioinformatische Core-Facility des DKFZ normalisiert und statistisch korrigiert.

Um das nahezu genomweite Methylierungsmuster von HPCs zu untersuchen, wurden insgesamt sieben Proben genomischer DNA von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut und fünf DNA-Proben CD34⁺-Zellen aus mobilisiertem Peripherblut auf den Infinium Human Methylation Bead Chip27 gegeben und analysiert. Das Alter der freiwilligen, gesunden Peripherblutspender beträgt 28, 32, 37, 39 und 41 Jahre, im Mittel also 35 Jahre. Das Nabelschnurblut hat hingegen ein Alter von null. Durch den Vergleich beider Gruppen kann somit ein Zusammenhang zwischen dem DNA-Methylierungsmuster und bekannter Veränderungen von Stammzeleigenschaften während des Alterungsprozesses hergestellt werden.

Um Veränderungen des Methylierungsmusters im Rahmen der myeloiden Differenzierung zu erfassen und abzugrenzen wurden von Nabelschnurproben zusätzlich jeweils drei DNA-Proben aus Granulozyten und Monozyten auf dem Chip analysiert. Dafür wurden aus Nabelschnurblutproben die jeweiligen Zelltypen zusätzlich zu den CD34⁺ HPCs isoliert. In Abbildung 3-1 ist ein Diagramm der Isolationsstrategie dargestellt.

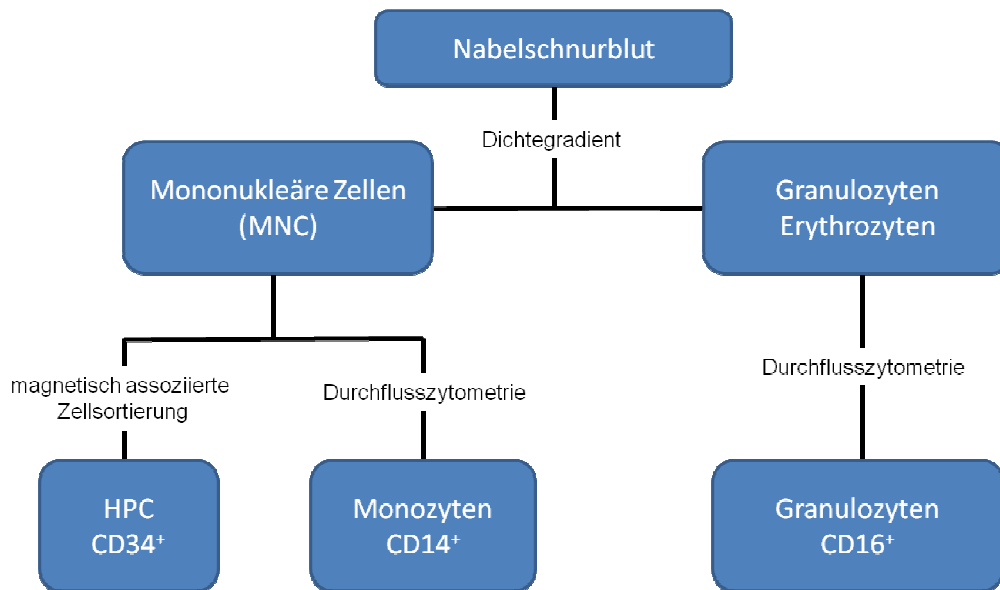


Abbildung 3-1 Schematische Darstellung der Probenaufreinigung

Die differenzierten Zellen wurden parallel zu den hämatopoetischen Progenitorzellen aus einer Nabelschnurblutprobe aufgereinigt. Die Isolation der mPB HPCs erfolgte nach dem gleichen Schema.

Die Reinheit der Proben wurde in Stichproben mittels Durchflußzytometrie bestimmt, siehe auch Abbildung 3-2. Die Reinheit lag bei allen getesteten Proben bei mindestens 93%. In a) sind dabei die Granulozyten (links) und Monozyten (rechts) dargestellt. Dabei ist in der oberen Reihe der Sidescatter gegen den Forwardscatter und unten die Fluoreszenz des jeweiligen differenzierungsspezifischen, gefärbten Oberflächenantigens gegen den Forwardscatter aufgetragen. Die Reinheit der exemplarisch dargestellten Granulozyten beträgt 96,18% die der Monozyten 98,06%. In b) ist die Reinheit zweier HPC-Proben dargestellt. Die obere Probe aus mobilisiertem Peripherblut zeigt eine Population mit einer Reinheit von 99,9%, die untere Nabelschnurblutprobe hat eine Reinheit von 98,29%.

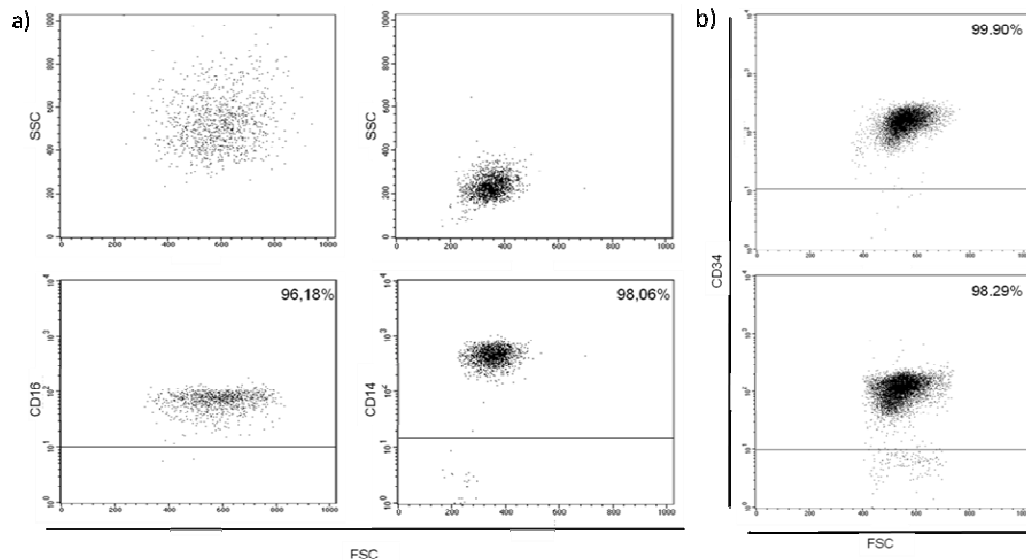


Abbildung 3-2 Exemplarische Darstellung der Reinheit von Granulozyten, Monozyten und CD34⁺ HPCs

In a) ist die Reinheit von Granulozyten und Monozyten dargestellt. Dabei zeigt die obere Zeile die Population im FSC und SSC, unten sind dieselbe Population und die Reinheit der Fluoreszenz für CD16 (Granulozyten) und CD14 (Monozyten) aufgeführt. b) zeigt die Reinheit der HPCs, wobei der obere Plot eine Probe aus mobilisiertem Peripherblut, der untere eine Probe aus Nabelschnurblut darstellt.

3.2 DNA-Methylierung in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen

Zunächst wurden die Ergebnisse der CD34⁺ DNA-Proben analysiert. Da das Geschlecht der Nabelschnurblutspender unbekannt ist, wurden gonosomale Gene aus allen Analysen entfernt, es wurden so insgesamt 26'485 CpG-Sites untersucht. Um die HPCs aus Nabelschnurblut und Peripherblut miteinander vergleichen zu können, wurden innerhalb der Gruppen Mittelwerte gebildet. So können individuelle Schwankungen innerhalb einer Spendergruppe vernachlässigt werden.

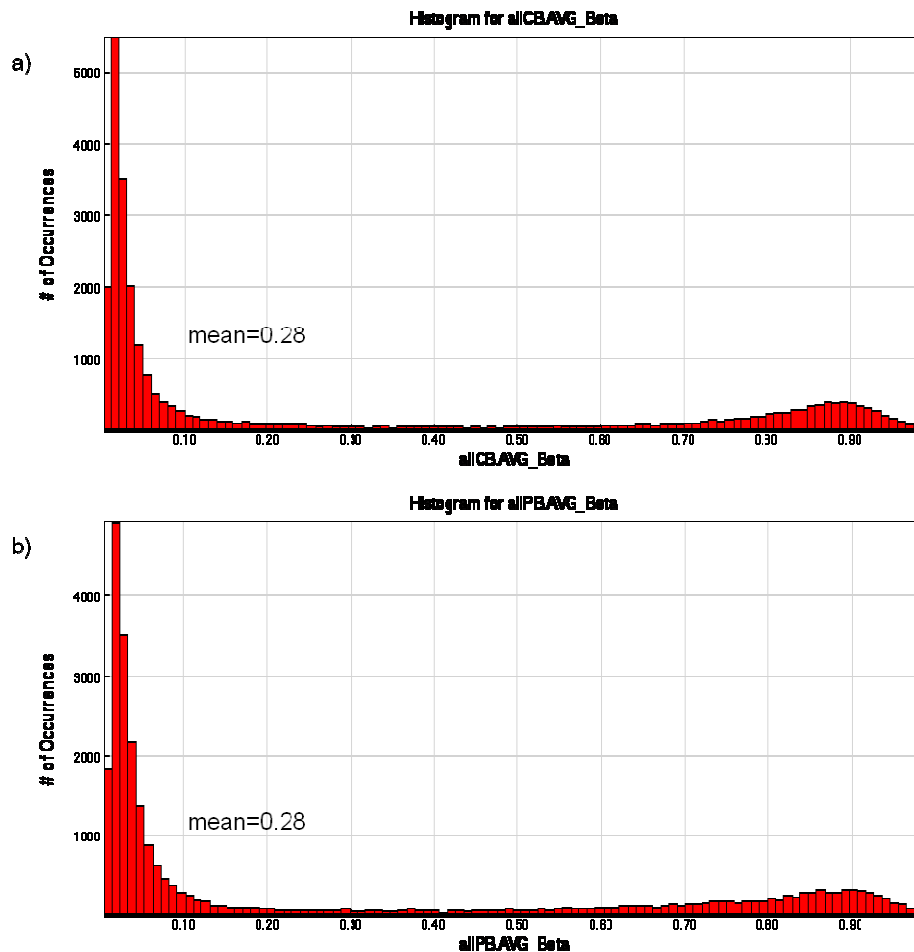


Abbildung 3-3 CpG abhängige Methylierungsverteilung in CD34⁺ Zellen aus CB und mPB

Der durchschnittliche Grad der Methylierung (X-Achse) ist der Anzahl der CpG-Sites (Y-Achse) gegenübergestellt. In a) sind die Mittelwerte der HPCs aus 7 CB-Proben in b) die aus 5 mPB-Proben dargestellt.

In Abbildung 3-3 ist ein Histogramm der Mittelwerte der HPCs aus Nabelschnurblut (a) und mobilisiertem Peripherblut (b) dargestellt. Dabei ist auf der X-Achse der durchschnittliche Methylierungsgrad, wobei 0.0 nicht methyliert und 1.0 zu 100% methyliert bedeutet, gezeigt. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der CpG-Dinukleotide aufgetragen. So wird die Menge der CpG-Dinukleotide pro entsprechenden Methylierungsgrad abgebildet. Die meisten CpGs sind sowohl in den HPCs der Neugeborenen als auch in denen der älteren HPCs aus mobilisiertem Peripherblut nicht bzw. nur sehr schwach methyliert. Die geringste Zahl der CpG-Sites weist eine mittlere Methylierung von 20-60% auf. Erst im Bereich der höheren Methylierung kann wieder ein Anstieg der CpG-Zahl gemessen werden. Hier ist auch eine leichte Verschiebung zwischen den Diagrammen zu sehen. Im mPB-Histogramm, Abbildung 3-3 b), ist ein stärkerer Anstieg der CpG-Sites ab 60% zu sehen, im CB-Histogramm

ist diese Zunahme erst ab 70% ersichtlich. Im Mittel sind die untersuchten CpGs aus Peripherblut ebenso wie die aus Nabelschnurblut zu 28% methyliert.

In Abbildung 3-4 ist ein ScatterPlot dieser Werte abgebildet, jeder Datenpunkt steht hierbei für ein untersuchtes CpG-Dinukleotid. Auf der X-Achse ist dabei die Mittelwerte der HPCs aus 7 Nabelschnurblutproben (jung) aufgetragen, auf der Y-Achse die aus 5 mobilisiertem Peripherblutproben (alt). Der im Diagramm angegebene Determinationskoeffizient ($R^2 = 0,9826$) zeigt den linearen Zusammenhang der beiden Proben. Je näher dieser an eins liegt, desto größer sind die Übereinstimmungen. Da es sich bei beiden Proben um denselben Zelltypus handelt, wurde hier ein R^2 -Wert nahe eins erwartet.

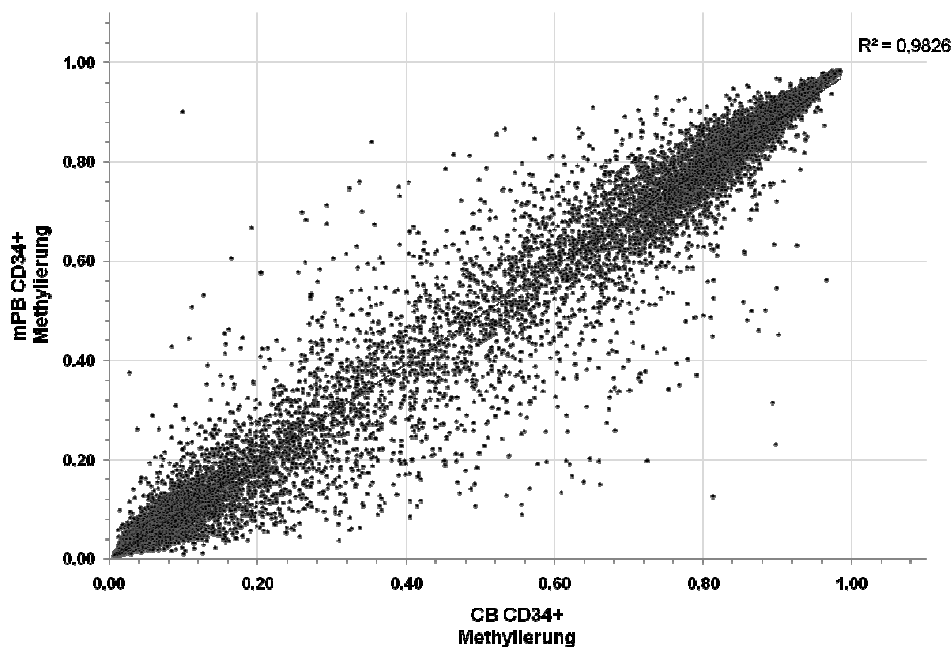


Abbildung 3-4 linearer Zusammenhang der Methylierung von CD34⁺ Zellen aus CB und mPB (DotPlot)

Es wurden die Methylierungsmittelwerte aus sieben CB und fünf mPB Proben ermittelt und gegeneinander dargestellt, wobei 0.0 keine und 1.0 100% Methylierung bedeutet. Auf der X-Achse sind die Werte aus CB auf der Y-Achse aus mPB aufgetragen.

Im mPB sind 6225 Marker zu mindestens 70% methyliert, im CB noch mehr, nämlich 6414 CpG-Sites. Insgesamt zeigen die beiden HPC-Gruppen große Übereinstimmungen, 6004 CpGs stimmen in beiden Gruppen überein. Dies ist zur Übersicht in einem Venn-Diagramm in Abbildung 3-5 dargestellt.



Abbildung 3-5 Venn-Diagramm $\geq 70\%$ methylierter CpGs

Blau sind die CpG-Dinukleotide der CB HPCs dargestellt, in rot die aus mPB. 6414 CpGs sind im CB, im mPB 6225 CpGs mehr als 70% methyliert. In diesen beiden Gruppen stimmen 6004 CpGs überein. 410 CpGs bzw. 221 CpGs liegen nur im CB bzw. nur im mPB hochmethyliert vor.

Diese Ergebnisse zeigen die erwarteten Übereinstimmungen, die bestätigen, dass es sich um den identischen Zelltyp handelt.

Zur genaueren Analyse wurden unter anderem die hier identischen CpG-Dinukleotide in eine Signalweganalyse eingesetzt, siehe Kapitel 3.2.3.

3.2.1 Differenzielle Methylierung in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen

Um nun die Stammzellalterung zu betrachten wurde der Focus auf CpG-Dinukleotide gelegt, welche zwischen den Durchschnitten der CB und der mPB-Proben eine differenzielle Methylierung aufweisen. Dabei wurde ein Unterschied von größer bzw. gleich 15% festgesetzt. Dieser ergibt sich nach Bibikova et al. (Bibikova und Fan 2010). Durch die Analyse dieser Daten können evtl. Marker identifiziert werden, welche im Verlauf der Alterung epigenetisch reguliert werden.

Um Zufalls- oder Technik-bedingte Methylierungsunterschiede auszuschließen wurde eine HeatMap aller HPC Proben dargestellt, welche in der Übersichtsgrafik Abbildung 3-6 gezeigt ist. Dabei wurden die 542 CpG-Dinukleotide, welche im Gruppenmittel (CB bzw. mPB) eine Differenz von mehr als 15% aufweisen zur Analyse eingesetzt. Man kann im Dendrogramm der Proben zwei verschiedene Äste

sehen. Die CB-Proben bzw. die mPB-Proben bilden jeweils ein Cluster, was die Verwendung von Mittelwerten der Proben einer Gruppe validiert. Die Proben derselben Herkunft und derselben Altersgruppe; also das junge Nabelschnurblut und das durchschnittlich 35-jährige mobilisierte Peripherblut, zeigen eine sehr homogene Methylierung. Rot sind dabei methylierte, grün unmethylierte CpGs dargestellt. Ist der Balken einer Probe grau dargestellt, konnte hier kein statistisch signifikantes Ergebnis gemessen werden. Diese Werte wurden aus der Analyse entfernt.

Die Grafik und die Berechnung der „Distanzen“ wurde mit dem Programm Experiment viewer v 4.4. und dem Algorithmus Euclidean Distance durchgeführt.

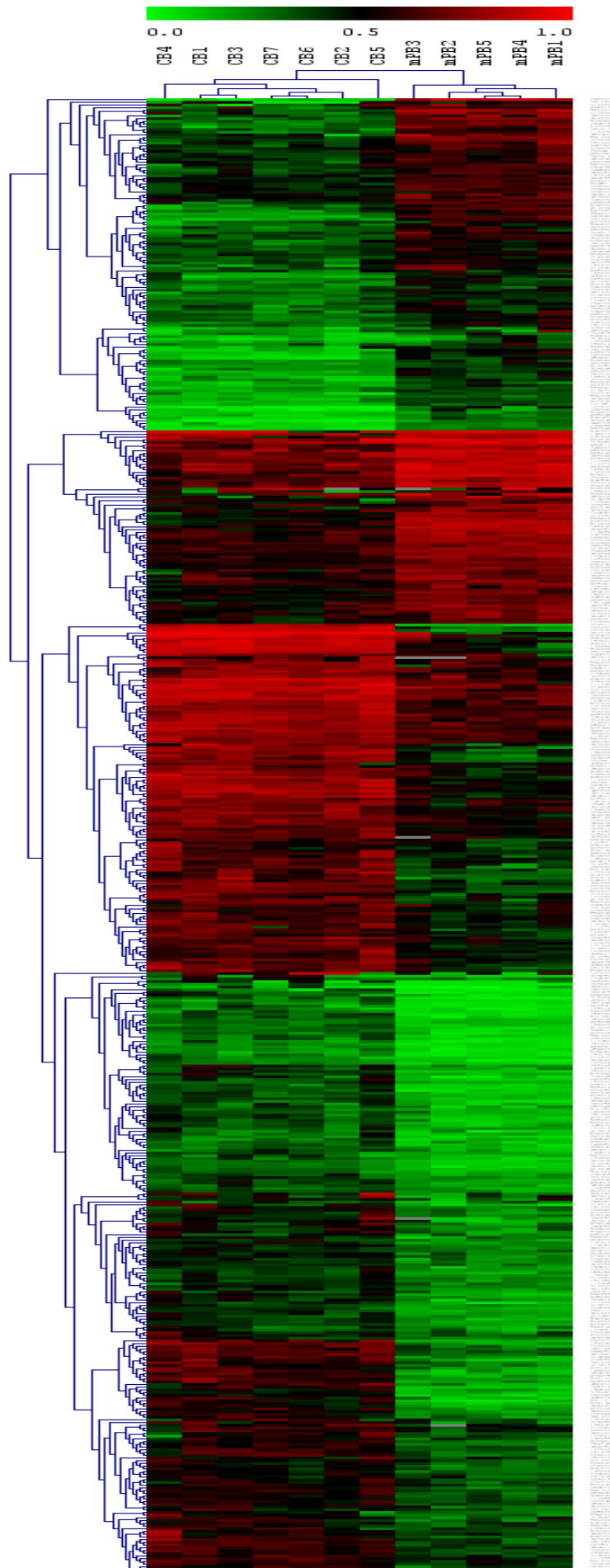


Abbildung 3-6 HeatMap des Methylierungsprofils aller CD34⁺ Proben

Es wurden nur CpGs mit einem Unterschied von $\geq 15\%$ zur Analyse eingesetzt. Grün unterlegt sind nur schwach methylierte Proben, rot bedeutet eine hohe Methylierung. Insgesamt zeigen 542 CpG-Dinukleotide eine Methylierungsdifferenz von $\geq 15\%$. Das Clustering der Proben zeigt, dass alle CB und alle mPB Proben zusammen passen. Innerhalb der Gruppen kann ein homogenes Methylierungsmuster festgestellt werden. Das Clustering wurde mit der Euclidean Distance Metrik des Programms Multiple Experiment viewer v 4.4. berechnet.

Im Weiteren wurden die Methylierungsunterschiede der 542 Marker genauer untersucht. Abbildung 3-7 ist grafisch dargestellt, dass fast zweidrittel aller differenziell methylierten CpGs bei mPB-Proben im Vergleich zum Nabelschnurblut weniger methyliert sind, nur 192 CpGs sind stärker methyliert.

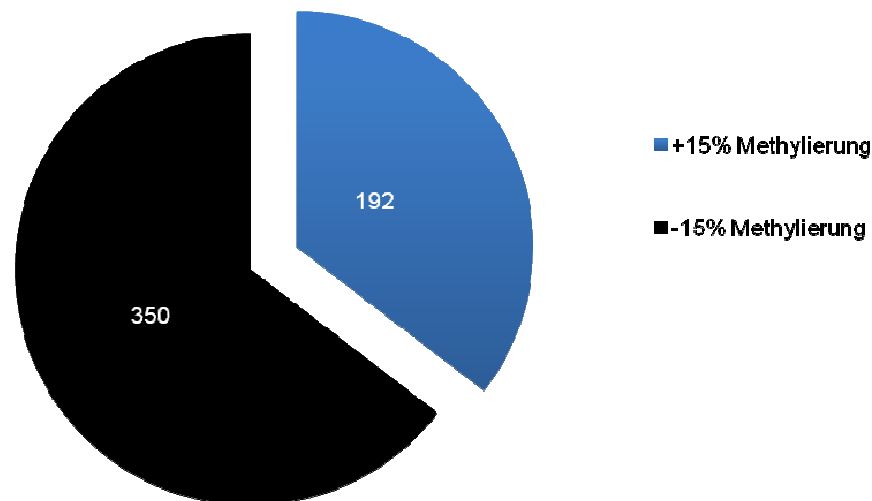


Abbildung 3-7 Anzahl der mehr als 15% differenziell methylierten CpGs vom CB zu mPB

Tortendiagramm der differenziell methylierten CpG-Dinukleotide. 350 CpGs weisen eine Abnahme der Methylierung um $\geq 15\%$ von jungen CB Proben zu älteren mPB-Proben auf, nur 192 CpGs eine Zunahme.

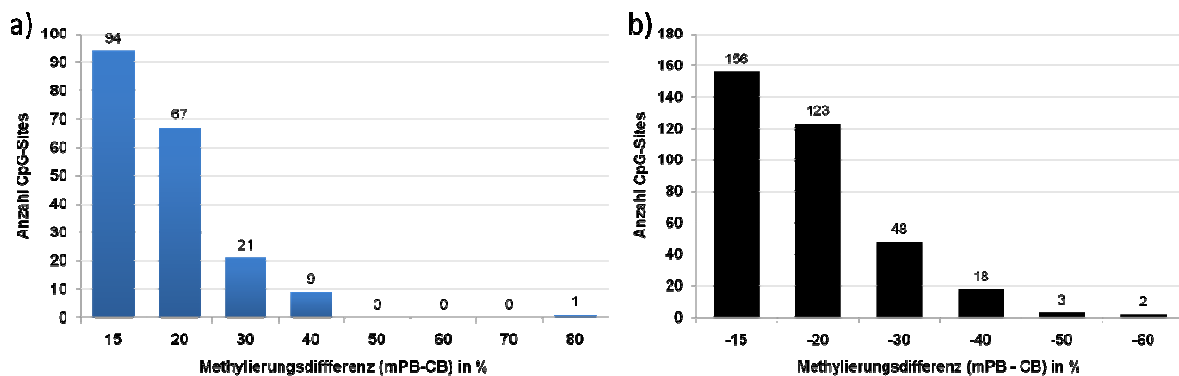


Abbildung 3-8 Anzahl der differenziell methylierten CpGs in Abhängigkeit der prozentualen Methylierungsdifferenz

Die meisten der 542 CpGs aus Abbildung 3-7 zeigen nur eine Differenz von 15 bzw. 20%. Je größer die Unterschiede zwischen CB und mPB desto geringer ist die Anzahl der CpG-Dinukleotide. In a) ist die Verteilung der 192 CpGs mit zunehmender in b) die 350 CpGs mit abnehmender Methylierung dargestellt.

Betrachtet man nun die beiden Gruppen genauer, wird deutlich, dass die meisten Unterschiede im Bereich von 15-20% liegen (Abbildung 3-8). 156 CpGs weisen eine Abnahme von 15%, 123 CpGs von 20% auf, dies entspricht ungefähr 80% der weniger methylierten CpGs. 71 zeigen eine Demethylierung von mehr als 30% bis hin zu 60%. Bei der Zunahme sieht die Verteilung ähnlich aus, fast die Hälfte der CpGs hat nur einen Methylierungsunterschied von 15%, nur noch 67 einen von 20%. Den größten Unterschied sieht man bei dem Gen *kcnab3*, welches in CD34⁺ Zellen aus mPB etwa 80% höher methyliert ist als in CD34⁺ Zellen von CB, die genauen Werte können auch Tabelle 5 entnommen werden.

In Tabelle 5 und Tabelle 6 sind exemplarisch die 20 Gene, welche die größten Unterschiede in der Methylierung zeigen, aufgeführt. In der Tabelle sind alle untersuchten CB- und mPB-Proben dargestellt, um nochmals die Homogenität innerhalb der Probengruppe zu verdeutlichen. Die Methylierung der untersuchten CpG-Site von *kcnab3* beträgt im „jungen“ CB 10% und im „alten“ mPB 90% (in den Tabellen als „young“ bzw. „old“ bezeichnet). Es liegt hier also eine Zunahme von 80% vor, durch welche die Expression des spannungsabhängigen Kaliumkanals höchstwahrscheinlich reguliert wird. Die höchste Demethylierung zeigt ein CpG-Dinukleotid des Gens *gbp1* (CB 80%, mPB 10%; siehe Tabelle 6). Das interferon-induzierbare guanylate binding protein 1, GBP1 ist ebenfalls in der Membran verankert und bindet dort die Guanine Nukleotide (GMP, GDP und GTP) mit 2 Bindungsmotiven im Gegensatz zu GTP-Bindungsproteinen welche 3 Bindungsmotive aufweisen. Alle weiteren Gene ihre Chromosomenlokalisierung, die Accessionnummer, die Methylierung der Proben und die Methylierungsdifferenz sind den untenstehenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 5 20 Gene, welche die höchste Methylierungszunahme von CB zu mPB aufweisen

CD34_young ist der Mittelwert der Proben CB1-CB7 (beide gelb unterlegt), CD34_old ist der Mittelwert der mPB-Proben 1-5 (blau unterlegt).

Symbol	CHR	ACCESSION	TargetID	cd34_young.beta	cd34_old.beta	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	mPB1	mPB2	mPB3	mPB4	mPB5	old - young
KCNAB3	17	NM_004732	cg14918082	0,099	0,902	0,105	0,116	0,039	0,053	0,078	0,176	0,128	0,858	0,933	0,784	0,941	0,884	0,802
TRIM50C	7	NM_198853	cg03882305	0,353	0,84	0,359	0,356	0,461	0,409	0,363	0,3	0,275	0,876	0,874	0,853	0,747	0,835	0,487
MAMDC2	9	NM_153267	cg13870494	0,191	0,668	0,219	0,13	0,205	0,19	0,277	0,135	0,193	0,738	0,656	0,66	0,652	0,644	0,476
STRA6	15	NM_022369	cg111787522	0,164	0,605	0,096	0,262	0,112	0,165	0,161	0,191	0,162	0,676	0,602	0,536	0,575	0,649	0,441
GPR92	12	NM_020400	cg25655096	0,26	0,699	0,115	0,335	0,24	0,314	0,31	0,251	0,259	0,74	0,701	0,786	0,587	0,637	0,440
SLC22A18	11	NT_009237	cg04726200	0,323	0,746	0,318	0,246	0,211	0,423	0,301	0,403	0,31	0,729	0,775	0,677	0,758	0,773	0,423
ECEL1	2	NM_004826	cg25431974	0,337	0,76	0,276	0,213	0,529	0,637	0,41	0,28	0,278	0,781	0,819	0,784	0,759	0,676	0,423
EXTL1	1	NM_004455	cg04629204	0,293	0,712	0,205	0,353	0,289	0,332	0,34	0,213	0,249	0,722	0,686	0,673	0,725	0,766	0,419
SOCs1	16	NT_010393	cg10784813	0,265	0,683	0,229	0,296	0,272	0,124	0,472	0,389	0,242	0,715	0,691	0,621	0,698	0,654	0,419
NAV1	1	NM_020443	cg14920846	0,127	0,532	0,129	0,091	0,119	0,128	0,24	0,133	0,088	0,638	0,403	0,513	0,548	0,508	0,404
ZNF710	15	NM_198526	cg01195080	0,112	0,507	0,084	0,104	0,093	0,087	0,121	0,151	0,183	0,562	0,465	0,502	0,49	0,51	0,395
ACTN3	11	NM_001104	cg08012287	0,294	0,675	0,298	0,266	0,367	0,24	0,351	0,246	0,221	0,642	0,644	0,676	0,697	0,702	0,382
KLHDC7B	22	NM_138433	cg18633225	0,204	0,577	0,178	0,238	0,191	0,153	0,292	0,213	0,164	0,626	0,648	0,542	0,576	0,465	0,372
ATP10A	15	NM_024490	cg08828036	0,39	0,75	0,421	0,337	0,468	0,302	0,497	0,388	0,377	0,802	0,778	0,74	0,672	0,689	0,360
RHOJ	14	NM_020663	cg18771300	0,341	0,7	0,331	0,31	0,389	0,185	0,347	0,308	0,444	0,832	0,599	0,661	0,539	0,815	0,359
ECEL1	2	NM_004826	cg02932167	0,404	0,759	0,361	0,306	0,416	0,366	0,46	0,443	0,449	0,739	0,781	0,771	0,773	0,732	0,356
MYL4	17	NM_002476	cg05294455	0,464	0,815	0,462	0,468	0,434	0,428	0,495	0,466	0,431	0,749	0,839	0,858	0,805	0,802	0,351
HKR1	19	NM_181786	cg12024906	0,027	0,375	0,016	0,018	0,06	0,044	0,022	0,021	0,017	0,475	0,416	0,251	0,158	0,526	0,348
POU3F1	1	NM_002699	cg17791651	0,084	0,428	0,074	0,04	0,061	0,137	0,173	0,052	0,075	0,461	0,344	0,502	0,518	0,326	0,344
SUSD1	9	NM_022486	cg04230060	0,391	0,732	0,405	0,098	0,502	0,406	0,332	0,548	0,433	0,728	0,63	0,858	0,666	0,75	0,341

Tabelle 6 20 Gene, welche die stärkste Methylierungsabnahme von CB zu mPB aufweisen

CD34_young ist der Mittelwert der Proben CB1-CB7 (beide gelb unterlegt), CD34_old ist der Mittelwert der mPB-Proben 1-5 (blau unterlegt).

Symbol	CHR	ACCESSION	TargetID	cd34_young.beta	cd34_old.beta	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	mPB1	mPB2	mPB3	mPB4	mPB5	old - young
GBP1	1	NM_002053	cg13406950	0,813	0,126	0,857	0,764	0,816	0,781	0,816	0,827	0,847	0,109	0,139	0,124	0,109	0,154	-0,687
PRKG2	4	NM_006259	cg16744741	0,898	0,23	0,925	0,866	0,894	0,913	0,905	0,885	0,898	0,162	0,159	0,306	0,268	0,235	-0,667
ICAM2	17	NM_000873	cg07918509	0,894	0,314	0,923	0,864	0,903	0,891	0,932	0,841	0,89	0,231	0,294	0,468	0,32	0,234	-0,579
MGP	12	NM_000900	cg13302154	0,725	0,198	0,782	0,717	0,696	0,82	0,719	0,643	0,688	0,234	0,233	0,29	0,154	0,159	-0,527
ELN	7	NM_000501	cg05822532	0,661	0,149	0,562	0,444	0,713	0,757	0,783	0,718	0,56	0,141	0,153	0,163	0,176	0,141	-0,512
SNTB1	8	NM_021021	cg08598221	0,639	0,155	0,632	0,607	0,684	0,743	0,471	0,593	0,644	0,115	0,097	0,191	0,135	0,257	-0,484
KIAA0020	9	NM_014878	cg24471894	0,609	0,134	0,699	0,589	0,72	0,58	0,591	0,57	0,572	0,122	0,096	0,149	0,164	0,17	-0,475
CD59	11	NM_203331	cg24453664	0,556	0,089	0,598	0,45	0,541	0,618	0,632	0,432	0,609	0,167	0,065	0,128	0,058	0,046	-0,467
IFI44L	1	NM_006820	cg17980508	0,66	0,197	0,786	0,544	0,682	0,708	0,539	0,578	0,628	0,159	0,205	0,208	0,189	0,209	-0,463
GUCY1B2	13	NM_004129	cg24821554	0,624	0,168	0,802	0,566	0,531	0,581	0,704	0,612	0,584	0,139	0,174	0,281	0,102	0,113	-0,456
OLFM12A	9	NM_182487	cg20789824	0,902	0,452	0,908	0,886	0,935	0,896	0,889	0,882	0,904	0,242	0,576	0,489	0,438	0,436	-0,450
F2RL2	5	NM_004101	cg00415993	0,647	0,202	0,668	0,581	0,584	0,625	0,716	0,658	0,707	0,147	0,296	0,185	0,206	0,221	-0,445
AKR1C3	10	NM_003739	cg19118077	0,555	0,11	0,597	0,61	0,679	0,398	0,59	0,518	0,543	0,094	0,108	0,118	0,133	0,108	-0,445
MGC39497	12	NM_152436	cg02789485	0,621	0,19	0,695	0,637	0,619	0,653	0,62	0,565	0,555	0,216	0,149	0,249	0,247	0,123	-0,431
NFE2	12	NM_006163	cg09303642	0,566	0,142	0,667	0,4	0,674	0,58	0,611	0,548	0,447	0,085	0,091	0,307	0,172	0,16	-0,425
GSTP1	11	NM_000852	cg25025243	0,681	0,259	0,721	0,729	0,646	0,67	0,724	0,593	0,636	0,153	0,245	0,42	0,2	0,357	-0,422
PGLYRP2	19	NM_052890	cg07408456	0,791	0,37	0,736	0,772	0,806	0,86	0,838	0,748	0,746	0,509	0,458	0,403	0,272	0,244	-0,421
SPTA1	1	NM_003126	cg22730004	0,615	0,198	0,764	0,574	0,61	0,568	0,558	0,599	0,644	0,189	0,186	0,141	0,269	0,187	-0,418
CHST13	3	NM_152889	cg22919728	0,768	0,35	0,714	0,815	0,789	0,847	0,76	0,663	0,779	0,451	0,304	0,526	0,211	0,272	-0,417
EDARADD	1	NM_080738	cg09809672	0,875	0,462	0,866	0,87	0,912	0,903	0,836	0,878	0,867	0,314	0,58	0,581	0,351	0,529	-0,413

3.2.2 Vergleich mit Polycombtargets

In einem weiteren Analyseschritt wurden die differenziell methylierten Gene, also jene, welche von CB zu mPB um mindestens 15% hochmethyliert bzw. runtermethyliert werden, mit Polycombtargets verglichen. Die epigenetische Regulation über diesen Komplex führt zur dauerhaften Stilllegung von Genexpression im Rahmen der Differenzierung und trägt möglicherweise auch zur Alterung bei, wobei der Polycomb-Komplex und DNA-Methylierung miteinander „kommunizieren“. Abbildung 3-9 zeigt ein Balkendiagramm der Übereinstimmungen mit den Zielgenen Polycomb Untereinheiten Suz1, Eed und dem gesamten Polycombkomplex Prc2 (Lee, Jenner et al. 2006).

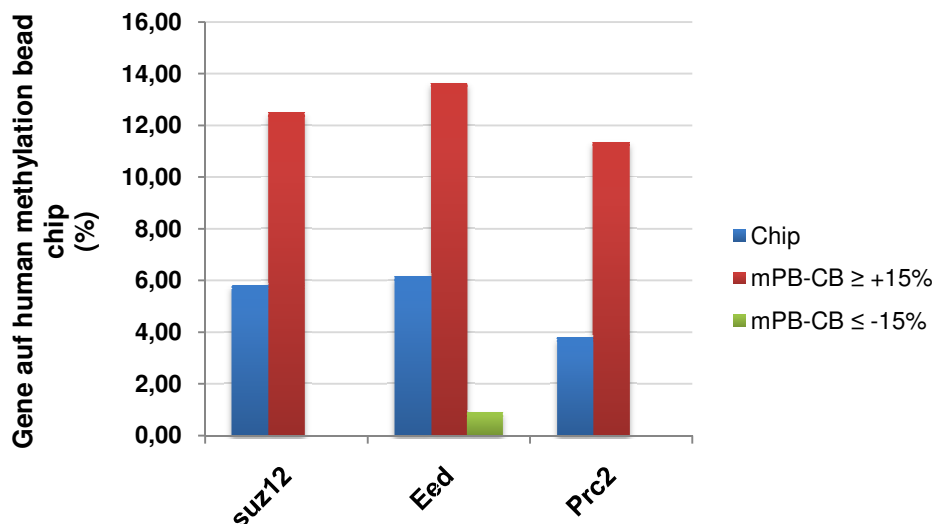


Abbildung 3-9 Vergleich Gene Humanmethylation BeadChip27 mit Polycombzielgenen

Die blauen Balken zeigen Übereinstimmungen mit dem gesamten Methylierungschip, rote mit den hochmethylierten Genen grüne mit demethylierten Genen.

Die Suz12 Zielgene entsprechen 5,82% des Chips, unter den Genen, welche von CB zu mPB in ihrer Methylierung sogar 12,5% zunehmen. Bei den Untereinheiten Eed und EzH2 verhält es sich ähnlich. 6,26% bzw. 6,52% der Chipgene entsprechen den jeweiligen Targets. Bei den hochmethylierten Genen liegt hier die Übereinstimmung bei 13,64% bzw. sogar 15,34%. Der Initiationskomplex, Prc2, welcher sich aus den drei Untereinheiten zusammensetzt, hat 655 Zielgene, von denen sich 3,8% auf dem Methylierungschip befinden. Im Vergleich mit den hochmethylierten Genen stimmen 11,36% mit den Prc2-Genen überein. Man kann also wie erwartet eine Akkumulation der Polycombtargets in

den Genen sehen, die in CD34⁺ mPB Zellen, im Vergleich zu CD34⁺ CB Zellen, stärker methyliert sind, während in mPB weniger methylierte Gene nicht Ziele des PRC2 darstellen. Dies suggeriert, dass stillgelegte Gene zum Teil im Rahmen von differenzierungsbedingtem Plastizitätsverlust methyliert werden, während aktivierte Gene ausschließlich über andere Mechanismen reguliert werden.

3.2.3 Signalweganalysen

Um einen funktionellen Einblick der Methylierungsdaten zu bekommen, wurden Signalweganalysen durchgeführt. Es wurde das Online Tool Pathway Analysis (IPA) von Ingenuity (www.ingenuity.com) verwendet. Dabei werden die Genidentifikationsnummern und die Werte der durchschnittlichen Methylierung zur Analyse angegeben. Unter Berücksichtigung der Zahl der eingegebenen Moleküle, deren Funktion, der Signalwege und der angegebenen Referenzliste (humane Spezies) wird ein p-Value für die Beteiligung an Signalwegen berechnet. Anhand dieser Werte wird ein Diagramm erstellt, welches eine Liste der signifikantesten biologischen Funktionen wieder gibt. Die Analysen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Michael Bocker, (Hellwig*, Bocker* et al. 2011).

Zunächst wurden die CpGs, welche sowohl in den HPCs aus Nabelschnurblut sowie als auch HPCs aus mobilisiertem Peripherblut zu mindestens 70% methyliert vorliegen, untersucht. In Abbildung 3-10 ist ein Balkendiagramm der ersten vier Treffer der IPA-Analyse dargestellt.

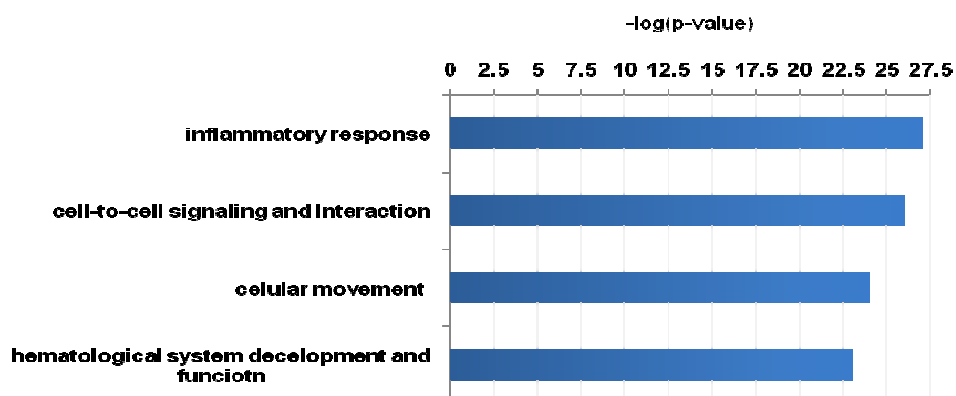


Abbildung 3-10 Signalweg-Analyse aller zu mind. 70% methylierten CpGs aus allen CD34⁺ Zellen

6004 CpGs wurden zur Analyse eingesetzt. Als erste Funktion, also mit kleinstem p-Wert, wurde die Entzündungsreaktion gefunden, weitere sind die Zell-Zellinteraktion, die zelluläre Bewegung und die Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems.

Der erste funktionelle Bereich der gefunden wurde ist die Entzündungsreaktion (inflammatory response). 485 Moleküle, welche in die Immunantwort, die Aktivierung des Immunsystems, Entzündungsreaktion und die Chemotaxis involviert sind, sind hier zusammengefasst. Als zweite und dritte Funktion wurden die Zell-Zell-Signalisierung und Interaktion bzw. die Zelluläre Bewegung gefunden. Ein weiterer interessanter Treffer sind die Methylierung im hämatologischen System, Entwicklung und Funktion (vierter Balken von oben in Abbildung 3-10). Eine mögliche Interpretation ist, dass in hämatopoetischen Vorläufern differenzierungsnotwendige Gene stark methyliert vorliegen und ein extrinsisches Signal benötigen, welches eine Demethylierung hervorruft und die Differenzierung in Zellen des Immunsystems bzw. des hämatopoetischen Systems möglich macht.

Auch die differenziell methylierten Gene wurden mit Hilfe der IPA-Analysen untersucht. Es wurden alle Gene, welche einen Methylierungsunterschied von mindestens 15% zwischen HPCs aus CB und mPB aufweisen analysiert.

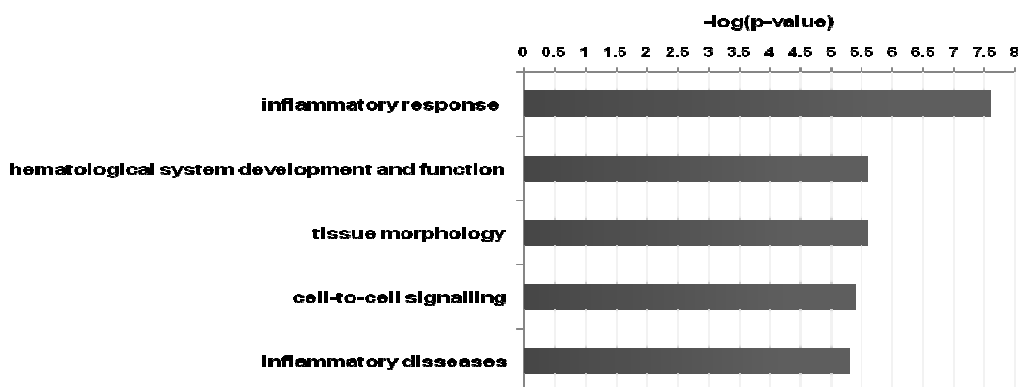


Abbildung 3-11 Signalweganalyse der um mindestens 15% demethylierten CpGs (CB zu mPB)

Es wurden 350 CpGs zur Analyse eingesetzt. Es sind die ersten 5 Funktionen aufgeführt. Als signifikanteste Funktion ist die Antwort auf Entzündungsreaktionen aufgeführt. Zusätzlich konnten die Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems die Gewebemorphologie und die Zell-Zell-Interaktion gefunden werden.

Abbildung 3-11 zeigt die Ergebnisse der Signalweganalyse jener Marker, welche von jungen $CD34^+$ Zellen im Vergleich zu alten $CD34^+$ Zellen, aus mPB, eine Demethylierung von mindestens 15% aufweisen. Die 350 untersuchten CpGs zeigen ebenfalls eine Anreicherung in der Entzündungsreaktion und somit in Veränderungen des Immunsystems. Als zweites ist die biologische Relevanz im Bereich des Hämatologischen Systems aufgeführt. Weitere gefundene Funktionen können dem Diagramm entnommen

werden. Die Signifikanz dieser Analyse ist relativ niedrig, was auf die geringe Zahl der in die Analyse gegebenen Moleküle zurückzuführen ist, doch kann diese Analyse zumindest ein Hinweis auf wichtige Funktionen geben, welche im Laufe der Alterung demethyliert und somit evtl. auch aktiviert werden.

3.2.4 Validierung der Methylierungsdaten aus hämatopoetischen Progenitorzellen

Die Validierung der Daten des Human Methylation Bead Chip²⁷ erfolgte mittels 454 Pyrosequenzierung. Die Versuche und die Analyse wurden von Michael Bocker durchgeführt. Es wurden die Promotoren von vier Genen analysiert, die in den vorgehenden Untersuchungen eine starke Demethylierung bzw. Hypermethylierung von jungen zu alten HPCs zeigten und deren biologische Funktion von Interesse erschien.

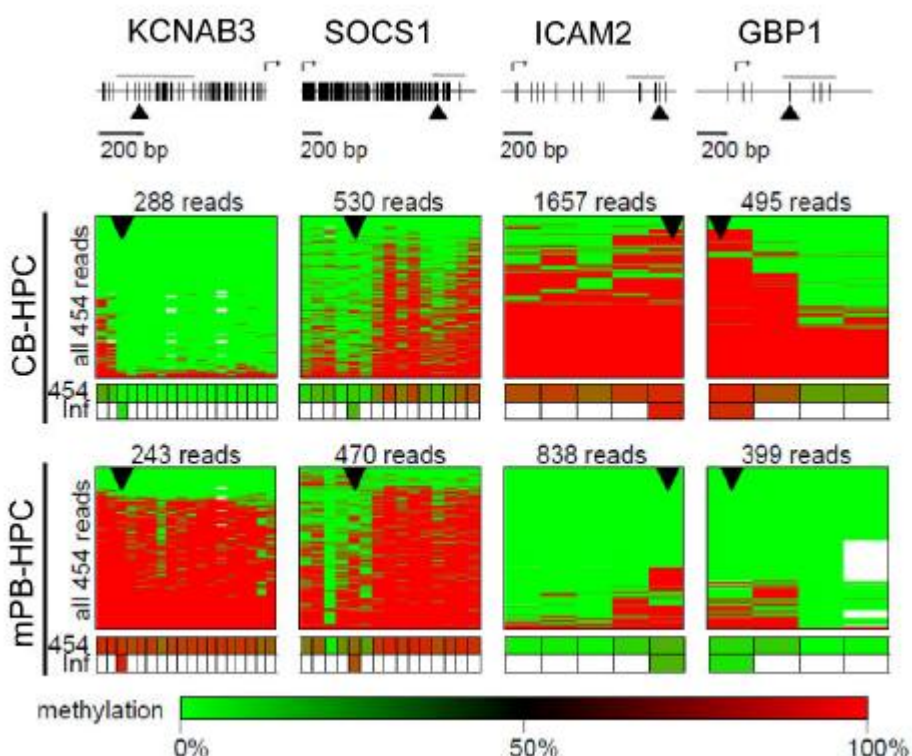


Abbildung 3-12 Validierung der Unterschiede zwischen HPCs aus CB und mPB

Die Daten wurden mittels 454 deep bisulfite sequencing bestätigt. Die HeatMap zeigt dabei in jeder Reihe einen Sequenzierungsread, also ein untersuchtes CpG-Dinukleotid. Rot sind methylierte, grün unmethylierte CpGs dargestellt (Hellwig*, Bocker* et al. 2011).

Die mit dem Methylierungschip untersuchten CpGs der Gene *kcnab3* und *socs1* zeigen in der „Alterung“ eine Hypermethylierung von +80% und +42%. Des Weiteren wurden die Gene *icam2* und *gbp1*, welche eine Demethylierung von 58% bzw. 69% aufweisen zur Validierung herangezogen. Die Methylierungsdaten des Infinium Versuchs konnten bestätigt werden, die Ergebnisse sind in Abbildung 3-12 in HeatMaps dargestellt. Die schwarzen Pfeile zeigen die auf dem Chip analysierten CpG-Dinukleotide.

3.3 Differenzielle Methylierung in der myeloiden Differenzierung

Die Veränderungen im Methylierungsmuster im Laufe der myeloiden Differenzierung wurden anhand von drei Proben genomischer DNA aus Granulozyten und Monozyten im Vergleich zu hämatopoetischen Progenitoren ebenfalls mit dem Infinium Human Methylation Bead Chip27 untersucht. In Abbildung 3-13 a) ist ein Scatterplot von CD34⁺ Zellen gegen Granulozyten von Neugeborenen dargestellt. Abbildung 3-13 b) zeigt einen Plot von Monozyten gegenüber HPCs.

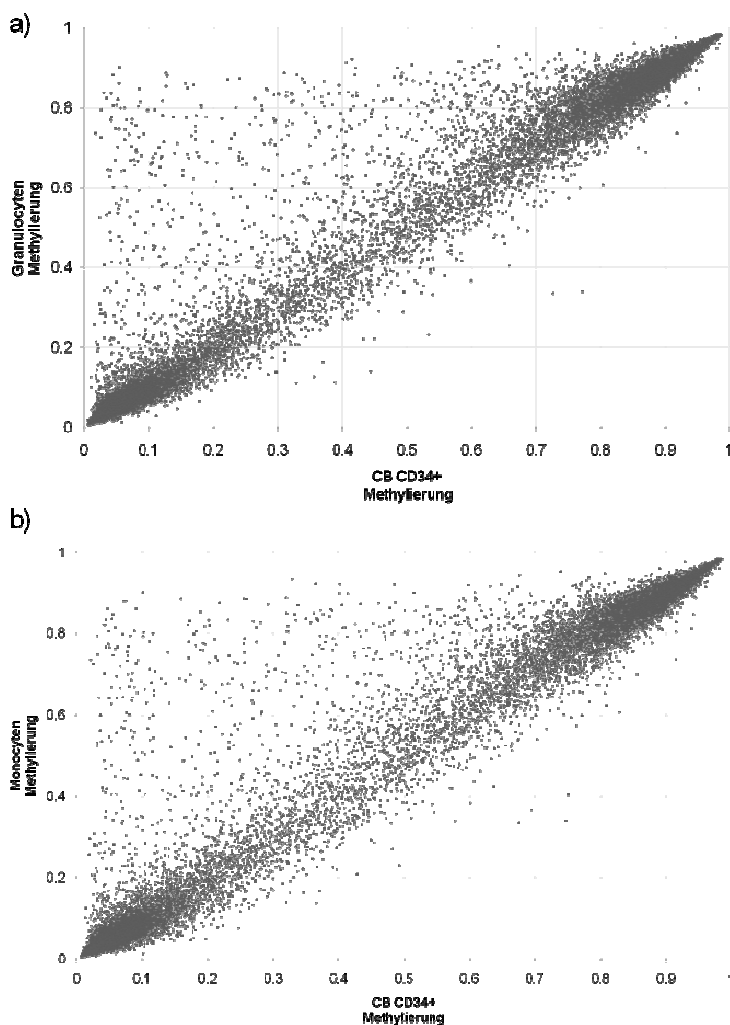


Abbildung 3-13 linearer Zusammenhang der Methylierung von CD34⁺-Zellen aus CB und Granulozyten bzw. Monozyten ebenfalls aus CB

Es wurden die Methylierungsmittelwerte aus sieben CB und drei Granulozyten (a) und Monozyten (b) einander gegenübergestellt. Auf der X-Achse sind dabei die Werte aus CB und auf der Y-Achse die der differenzierten Zellen (Granulozyten und Monozyten) aufgetragen. Dabei kann in beiden Proben eine demethylierende Verschiebung des Methylierungsmusters mit der Differenzierung der Zellen beobachtet werden.

Beide Diagramme zeigen eine deutliche Demethylierung der differenzierten Zellen im Vergleich zu den HPCs. In Monozyten werden 636 CpG-Sites demethyliert und nur 38 zeigen eine Zunahme der Methylierung (Abbildung 3-14). Die Verteilung der Abnahme in Prozent ist in Abbildung 3-15 dargestellt und zeigt, dass die Hälfte aller Demethylierungen in einem Bereich von 15-30% liegen. Darüberhinaus verteilen sich die restlichen CpGs von 30 – 80%, wobei eine kontinuierliche Abnahme der CpG-Zahl zu sehen ist.

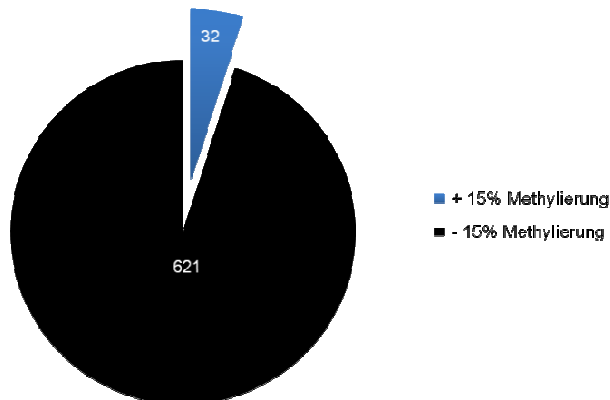


Abbildung 3-14 Anzahl differenziell Methylierter CpG-Sites im Vergleich von HPCs zu Monozyten

Dargestellt ist ein Tortendiagramm der CpGs, welche einen Methylierungsunterschied von mindestens 15% aufweisen. 621 Dinukleotide zeigen eine Demethylierung im Vergleich zu Progenitoren lediglich 32 weisen eine Zunahme der Methylierung auf.

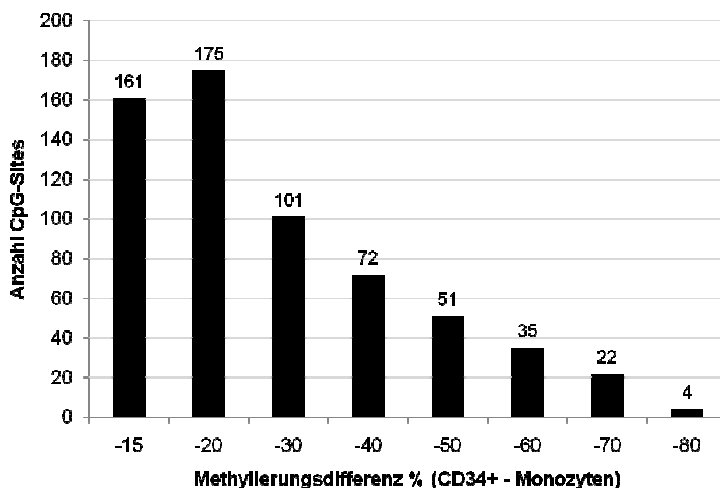


Abbildung 3-15 Verteilung der Methylierungsunterschiede

Dargestellt sind die tatsächlichen Unterschiede in der differenzierungsabhängigen Demethylierung in Granulozyten. 336 von 621 Dinukleotiden werden um 15-30% demethyliert. Bei höheren Differenzen zeigt sich eine stetige Abnahme.

Ähnlich verhält sich das Methylierungsmuster in der Differenzierung zu Granulozyten. In diesen Zellen weisen 639 CpGs eine Demethylierung von mindestens 15% im Vergleich

zu HPCs auf. Diese verteilt sich ebenso wie in den Monozyten, mehr als 50% der analysierten CpGs demethylieren um 15-30% und es zeigt sich eine weitere Verteilung von 30 – 80%, dies ist in Abbildung 3-17 dargestellt.

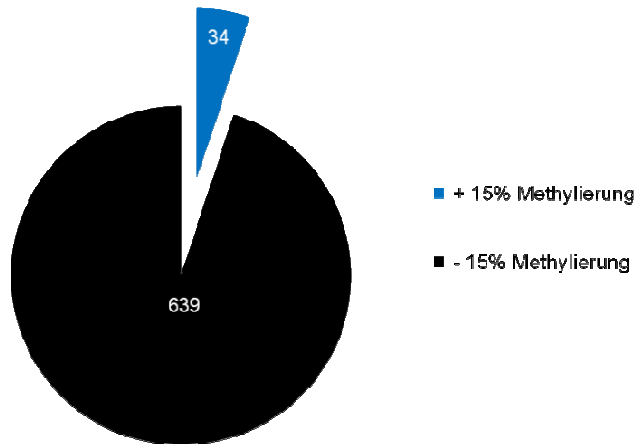


Abbildung 3-16 Differenziell Methylierter CpG Dinukleotide zwischen HPCs und Granulozyten

Dargestellt ist ein Tortendiagramm der CpGs, welche einen Methylierungsunterschied von mindestens 15% aufweisen. 639 Dinukleotide zeigen eine Demethylierung in Granulozyten im Vergleich zu Progenitoren nur 34 weisen eine Zunahme der Methylierung auf.

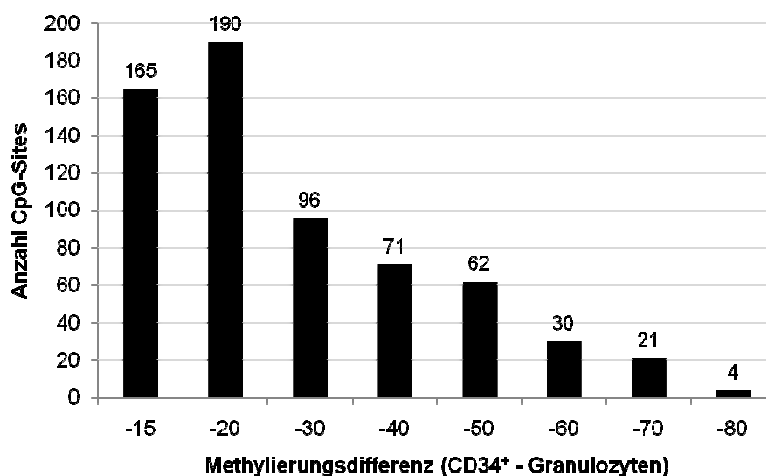


Abbildung 3-17 Verteilung der Methylierungsunterschiede

Dargestellt sind die Methylierungsunterschiede in Prozent, der differenzierungsabhängigen Demethylierung in Monozyten. 56%, nämlich 355 der 639 Dinukleotide weisen eine Demethylierung zwischen 15-30% auf. Insgesamt ist ebenfalls eine kontinuierliche Abnahme der CpG-Anzahl mit steigender Differenz zu beobachten.

Diese Werte zeigen, dass eine Demethylierung in den Genen der hämatopoetischen Vorläuferzellen für eine myeloide Differenzierung notwendig ist. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde hier ebenfalls eine Signalweganalyse mit dem Onlinetool ingenuity pathway analysis durchgeführt.

3.3.1 Signalweganalysen

Im Weiteren wurde hier ebenfalls nach einer Anreicherung in biologischen Funktionen gesucht. Die Analyse, der demethylierten Gene erfolgte mit dem Online tool Ingenuity pathway analysis (www.Ingenuity.com) und wurde zusammen mit Michael Bocker durchgeführt. Die von ihm erstellte Abbildung 3-18 zeigt die vier biologischen Funktionen, welche die größte Übereinstimmung mit den zur Analyse eingesetzten Marker aufweisen.



Abbildung 3-18 Signalweganalyse Demethylierter Gene in Monozyten und Granulozyten

Zur Analyse wurden alle demethylierten ($\leq -15\%$) Marker eingesetzt, 639 im Falle der Granulozyten und 621 bei der Analyse der Monozyten. Die Zellen zeigen dieselbe Anreicherung in den gefundenen Funktionen. Dargestellt sind die vier höchstsignifikanten Treffer.

Beide differenzierten Zelltypen, Monozyten (a) und Granulozyten (b) zeigen identische Funktionen. Wie erwartet weisen beide eine Anreicherung in immunologischen und hämatopoetischen Funktionen, wie zum Beispiel der Entzündungsreaktion auf. Diese war durch die Funktion der untersuchten Zellen im Immunsystem zu erwarten.

Es wurden, wie durch die Methylierungsergebnisse erwartet, funktionell wichtige Gene in differenzierten Zellen demethyliert. Schlussfolgernd konnte hier gezeigt werden, dass eine myeloide Differenzierung durch eine Demethylierung reguliert wird.

3.3.2 Validierung der Differenzierungsspezifischen Methylierung mittels Pyrosequenzierung

Auch die Infinium Daten der Differenzierung konnten durch die Versuche von Michael Bocker bestätigt werden.

Dabei wurden die vier Kandidaten für die 454 deep bisulfite sequencing ausgewählt. In diesen konnten sowohl in der Differenzierung zu Monozyten, als auch zu Granulozyten eine starke Demethylierung gemessen werden und sie zeigen in der Literatur eine wichtige Rolle in den differenzierten Zellen, bzw. im Verlauf der Differenzierung (Koeffler, Ranyard et al. 1985; Hashimoto, Suzuki et al. 1999; Liu, Yuan et al. 2007).

Bei dem Gen *S100A8* werden auf dem Infinium Chip zwei CpG-Dinukleotide analysiert. Beide weisen eine deutliche Demethylierung von 53 und 66% bei der Analyse der Granulozyten 61 und 65% bei Monozyten im Vergleich mit hämatopoetischen Progenitoren von Neugeborenen. Die Ergebnisse der 454 Pyrosequenzierung ist in Abbildung 3-19 dargestellt.

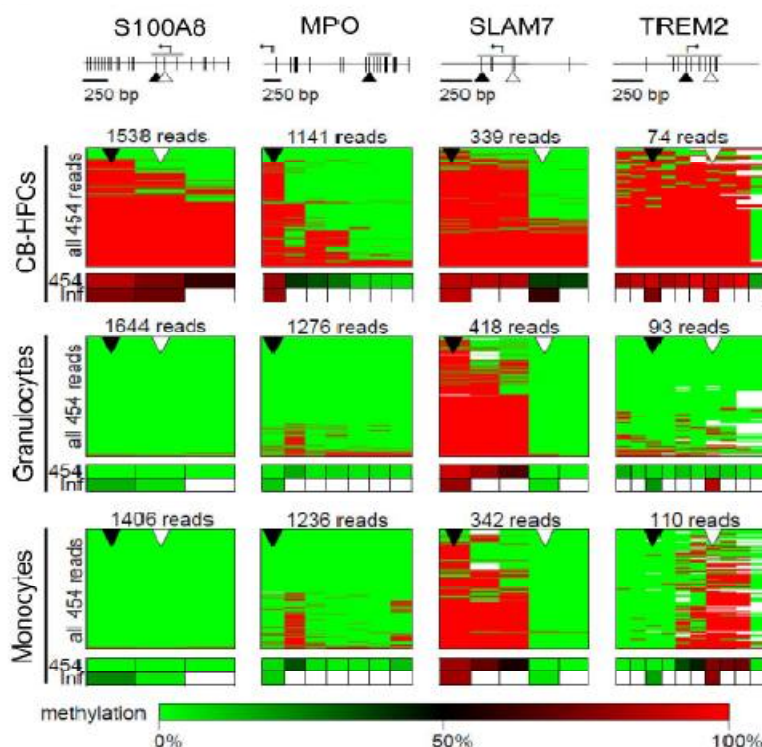


Abbildung 3-19 Bestätigung der Infinium Daten für die Differenzierung

Die Daten wurden mittels 454 deep bisulfite sequencing bestätigt. Die HeatMap zeigt dabei in jeder Reihe einen Sequenzierungsread eines CpG-Dinukleotids. Rot sind methylierte, grün unmethylierte CpGs dargestellt. Die schwarzen Pfeile heben die auf dem Chip untersuchten CpGs hervor (Hellwig*, Bocker* et al. 2011).

3.4 Untersuchungen zum homeobox Transkriptionsfaktor *hoxA9*

In einem unabhängigen Teil der Arbeit wurde der Focus auf das homeobox Gen *hoxA9* gelegt. Der Transkriptionsfaktor spielt eine wichtige Rolle bei der frühen Hämatopoese und ist bei maligner Entartung von hämatopoetischen Vorläuferzellen, der akuten myeloischen Leukämie, vor allem im Zusammenhang mit einer MLL Translokation, epigenetisch dereguliert, was eine erhöhte Expression zur Folge hat.

3.4.1 Expressionsuntersuchungen

3.4.1.1 *hoxA9* Expression in leukämischen Zelllinien

Um den Transkriptionsfaktor *hoxA9* zu untersuchen wurden zunächst einige Versuche in leukämischen Zelllinien durchgeführt. Dazu wurden anfangs die Zelllinien HL60, Kasumi, K562 und KG1A auf ihre *hoxA9* Expression untersucht. Dabei zeigte die „primitivste“ Zelllinie KG1A die signifikant höchste Expression des Transkriptionsfaktors. Die Zelllinien Kasumi und K562 zeigen wie HL60 nur eine sehr schwache bis kaum detektierbare mRNA Expression. In Abbildung 3-20 sind die Ergebnisse der semiquantitativen real time RT-PCR von drei unabhängigen Ergebnissen im Doppelansatz dargestellt, die genauen Werte können Tabelle 7 entnommen werden.

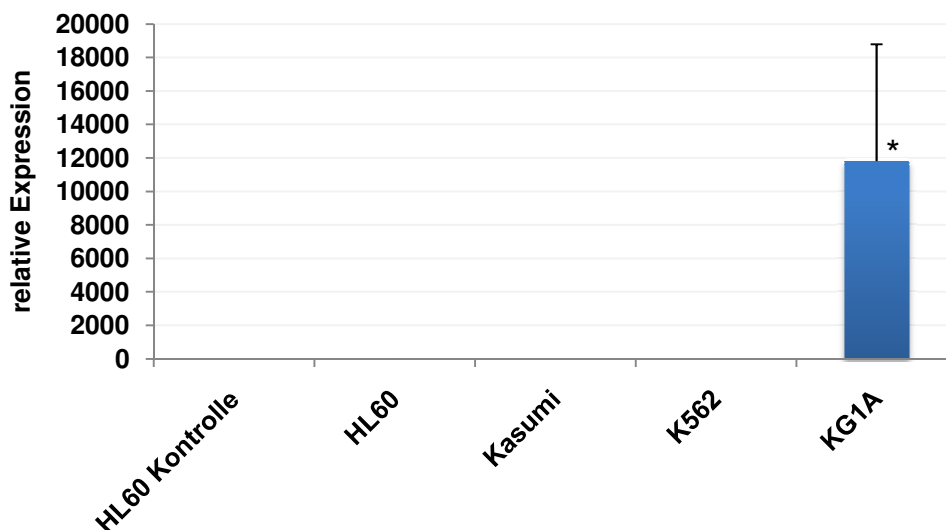


Abbildung 3-20 relative *hoxA9* Expression in den leukämischen Zelllinien

Semiquantitative real time PCR Ergebnisse, bezogen auf ein HL60 Experiment. Neben HL60 wurden auch die Zelllinien Kasumi, K562 und KG1A untersucht. Die genauen Werte können der Tabelle entnommen werden. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's T-Test für drei unabhängige Versuche bestimmt * $p < 0,05$.

Tabelle 7 Werte der relativen Expression von *hoxA9* in leukämischen Zelllinien HL60, Kasumi, K562 und KG1A

Die Werte einer HL60 Probe wurden eins gesetzt und die anderen Ergebnisse in Bezug gesetzt.

	relative Expression
HL60 Kontrolle	1
HL60	2,19
Kasumi	0,01
K562	1,32
KG1A	14283,35

3.4.1.2 *hoxA9* Expression in hämatopoetischen Zellen

Nach den Untersuchungen zu *hoxA9* in leukämischen Zelllinien wurden weitere Untersuchungen in primären Zellen durchgeführt. Zunächst wurde die relative Expression in hämatopoetischen Stammzellen mit semiquantitativer real time PCR bestimmt. Es wurden Zellen aus Knochenmark (BM); mobilisiertem Peripherblut (mPB) und Nabelschnurblut (CB) auf das Oberflächenantigen CD34 angereichert. Aus weiteren Nabelschnurblutproben wurden des Weiteren die HSC-Subpopulationen CD34⁺CD38⁺ und CD34⁺CD38⁻ Zellen untersucht.

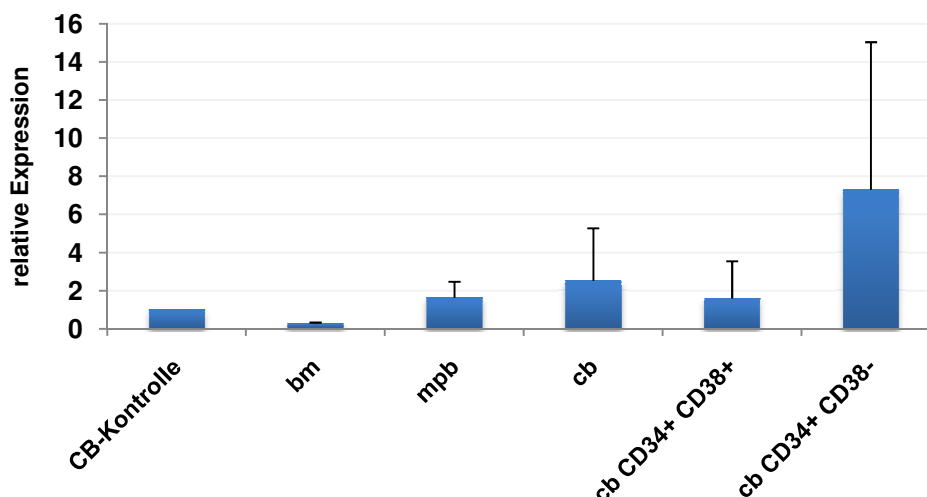


Abbildung 3-21 relative *hoxA9* Expression in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

bm: Knochenmark (~30 Jahre); mpb mobilisiertes Peripherblut (~35 Jahre); cb: Nabelschnurblut; die ersten 3 Balken zeigen die relative Expression in CD34⁺ Zellen. Aus Nabelschnurblut wurden weitere Proben nach CD38 sortiert. Die Expression wurde mit semiquantitativer real time PCR bestimmt, die Ergebnisse wurde auf eine Nabelschnurblutprobe; CB-Kontrolle, diese wurde 1 gesetzt. bm n=3; bei den restlichen Proben wurden 5 Experimente durchgeführt.

Wie in Abbildung 3-21 dargestellt zeigt die primitiveren $CD34^{+}38^{-}$ Zellen die höchste *hoxA9* Expression (7,3fach). Die $CD34^{+}$ Zellen aus Knochenmark zeigen mit 0,31facher Expression die niedrigste, die Zellen aus mobilisiertem Peripherblut weisen eine leicht geringere Expression (1,64fach). Die Expression in Nabelschnurblut liegt bei 2,91. Alle Messwerte wurden auf eine Nabelschnurblutprobe $CD34^{+}$ bezogen, diese wurde zur Berechnung der Relationen eins gesetzt. Es konnte bis hier gezeigt werden, dass primitivere $CD34^{+}CD38^{-}$ Zellen zwar eine höhere Expression von *hoxA9* aufweisen, doch sind innerhalb der $CD34^{+}$ Zellen nur geringe Unterschiede zu beobachten.

Um die Ergebnisse der Expression der Zellen in Relation setzen zu können, wurden die Werte der CB- $CD34^{+}$ Zellen mit den Werten der Zelllinien HL60 und KG1A verglichen. In Abbildung 3-22 ist das Resultat des Vergleichs als Diagramm dargestellt. Die Expression von *hoxA9* ist in den primären hämatopoetischen Vorläuferzellen noch größer, als in der Zelllinie KG1A.

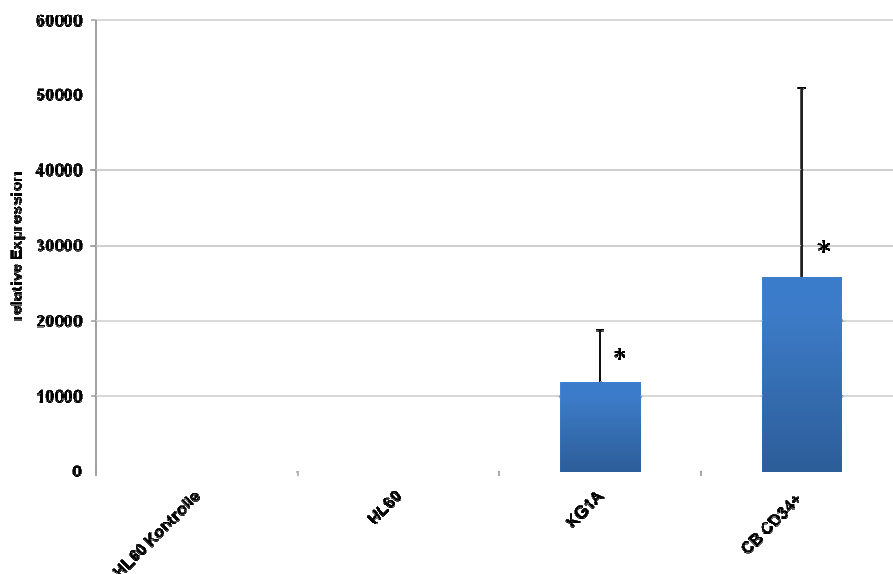


Abbildung 3-22 relative *hoxA9* Expression in Zelllinien und CB $CD34^{+}$ Zellen

Semiquantitative real time PCR Ergebnisse, bezogen auf ein HL60 Experiment. Es wurden die Ct Werte der Zelllinien HL60 und KG1A und den primären $CD34^{+}$ Zellen aus Nabelschnurblut in Relation gesetzt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's T-Test für drei unabhängige Versuche bestimmt * $p < 0,05$.

Aufbauend auf diese Ergebnisse sollten nun auch differenzierte Zellen untersucht werden. Dafür wurden die myeloiden Granulozyten und Monozyten und lymphoide B- und T-Zellen auf ihre *hoxA9* Expression untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-23 dargestellt, auch hier sind alle Ergebnisse auf eine $CD34^{+}$ Nabelschnurblutprobe bezogen. In

differenzierten Zellen ist fast keine Expression detektierbar. Bei Granulozyten konnte aus drei Versuchen mit Doppelansätzen keine Expression gemessen werden.

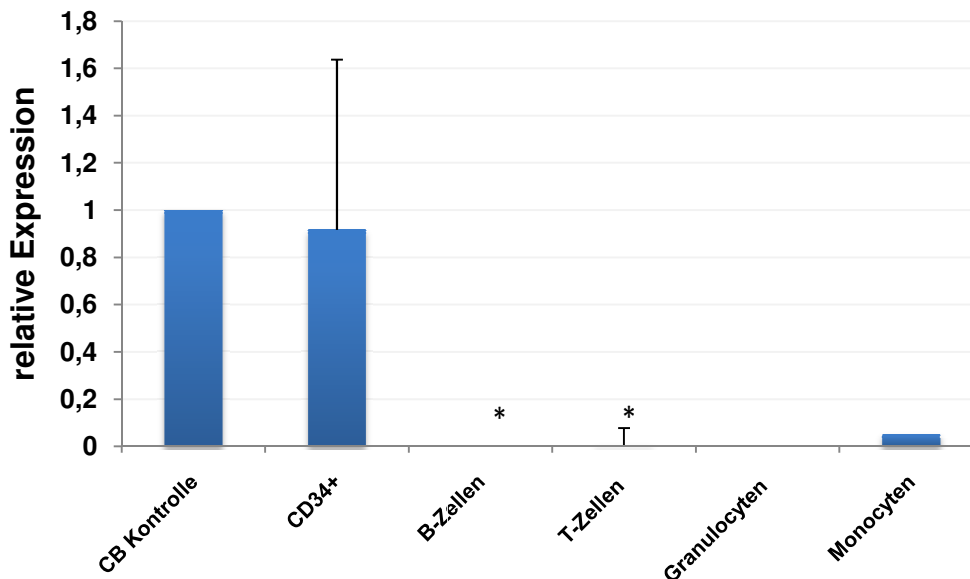


Abbildung 3-23 relative *hoxA9* Expression in hämatopoetischen Progenitoren und differenzierten Zellen

Semiquantitative real time PCR Ergebnisse, bezogen auf die CD34⁺ Zellen einer Nabelschnurblutprobe. Aus dem Nabelschnurblut wurden neben CD34⁺ Zellen, auch die Zellfraktionen der B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten und Monozyten isoliert und auf *hoxA9* Expression untersucht. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's T-Test für drei unabhängige Versuche bestimmt *p<0,05.

B- und T-Zellen zeigen mit einer 0,0002 und 0,01 fachen Expression im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine kaum messbare, aber signifikante Expression. Bei Monozyten konnte ein Wert von 0,05 berechnet werden. Bei den CD34⁺ Zellen handelt es sich ebenfalls um Nabelschnurblutproben, die Expression liegt hier mit einem Wert von 0,92 im Bereich der Kontrolle. Durch die Ergebnisse an differenzierten Zellen sollte in einem nächsten Schritt der Verlauf der Differenzierung beobachtet werden. Dafür wurde die *hoxA9* Expression im Bezug auf ihr Proliferationsverhalten untersucht.

3.4.1.2.1 *hoxA9* und Alterung

Um die *hoxA9* Expression weiter zu analysieren, wurde ein Bezug zur Alterung in Betracht gezogen. Dabei wurden CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen verschiedener Altersgruppen auf ihre *hoxA9* Expression untersucht. Die Proben der erwachsenen Spender stammen hierbei aus mobilisiertem Peripherblut. Jede Altersgruppe beinhaltet dabei fünf CB Proben für 0 Jahre und jeweils fünf Proben aus mPB.

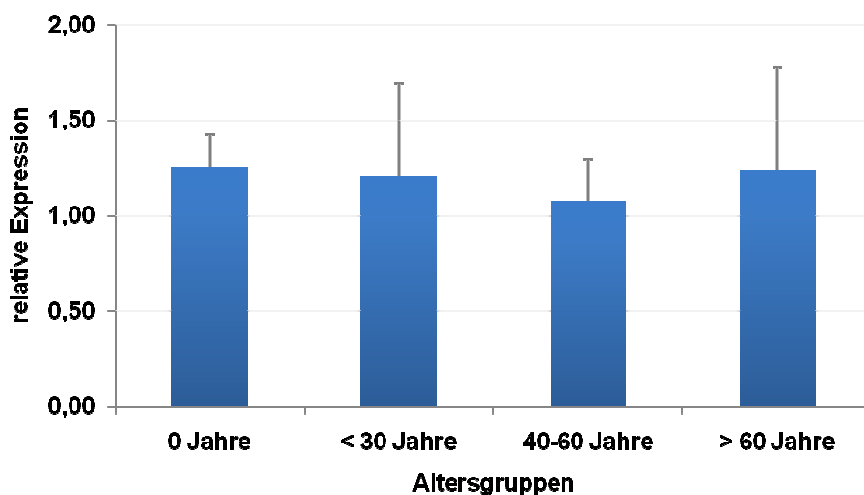


Abbildung 3-24 relative *hoxA9* Expression in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläufern verschiedener Altersgruppen

Die *hoxA9* Expression bezogen auf eine CB-Probe dargestellt. In jeder Altersgruppe befinden sich fünf Proben. Die Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen sind nur sehr gering.

In Abbildung 3-24 ist die relative Expression im Verlauf der Alterung dargestellt. Wie in dem Diagramm zu sehen ist, kann keine Verschiebung im Alterungsverlauf der hämatopoetischen Vorläuferzellen gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktors *hoxA9* nicht altersabhängig reguliert wird.

3.4.1.2.2 *hoxA9* und Differenzierung

Durch eine CFSE-Färbung kann das Proliferationsverhalten von Stammzellen untersucht werden. Dabei wird der Farbstoff einer Zelle in jedem Zellteilungszyklus homogen auf die Tochterzellen verteilt, welche im Durchflußzytometer gemessen werden kann. Exemplarisch ist ein sogenannter DotPlot und ein Histogramm in Abbildung 3-25 dargestellt. In Abbildung 3-25 a) deutet jeder Pfeil auf eine Teilung. Durch fluoreszenzbasierte Zellsortierung können einzelne Teilungen sortiert werden.

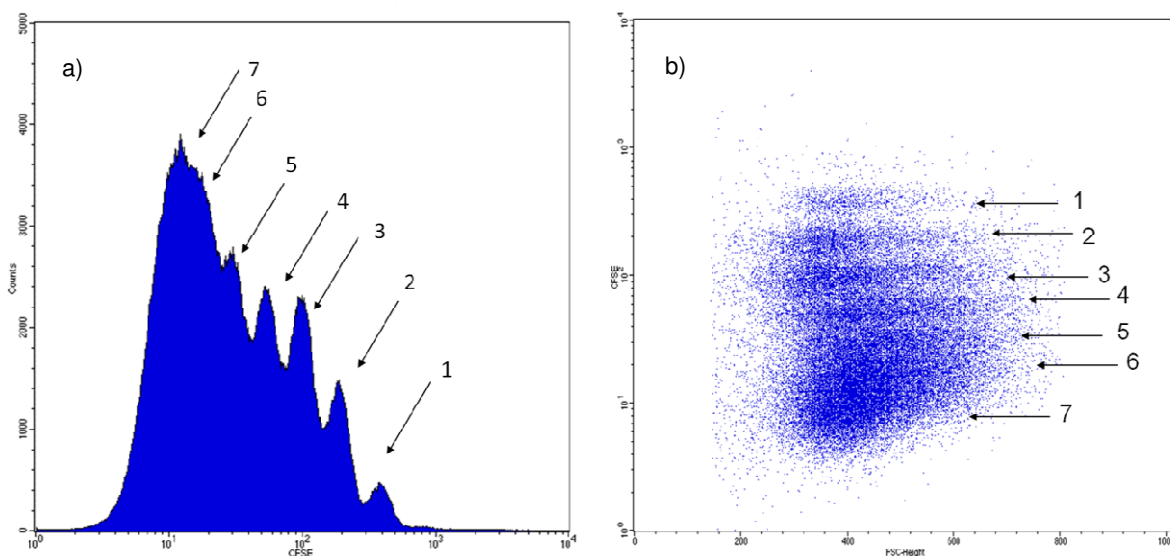


Abbildung 3-25 Histogramm; DotPlot einer CFSE-Färbung von CD34⁺ nach 7d Kultur

Mit jeder Teilung nimmt die Konzentration von CFSE ab, man kann am Durchflußzytometer die einzelnen Teilungen erkennen und die Zellen sortieren. In **a)** ist das Histogramm dargestellt, dabei ist auf der X-Achse die CFSE-Konzentration auf der Y-Achse die Zellzahl dargestellt. **b)** zeigt ein Dot-Plot der Zellgröße (X-Achse) gegen die CFSE-Konzentration (Y-Achse) aufgetragen. Die Pfeile zeigen auf die Teilungen, die Nummern zeigen die Anzahl der Zellzyklen.

Innerhalb der einzelnen Zellteilungen wurde mittels semiquantitativer real time PCR die Expression von *hoxA9* bestimmt. Bezogen wurden die Ergebnisse auf „Teilung 1“. Man geht hier davon aus, dass es sich hier um Zellen handelt, welche sich nur einmal oder gar nicht geteilt haben. Mit steigender Teilung nimmt die relative Expression von *hoxA9* wie im Diagramm in ABB dargestellt kontinuierlich ab, nach zwei Teilungen sind nur noch 54%, nach sieben Teilungen sogar nur noch 5% vorhanden. Die Abnahme der *hoxA9* mRNA-Konzentration ist in jeder Teilung, außer der letzten, mangels Daten, signifikant.

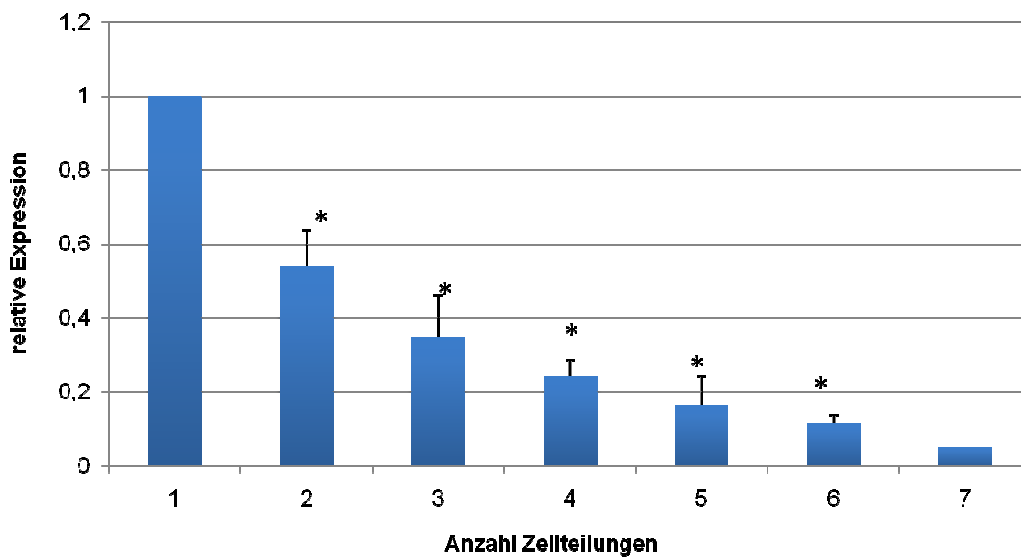


Abbildung 3-26 relative *hoxA9* Expression in den Teilungen CFSE-gefärbter

Die *hoxA9* Expression bezogen auf Teilung 1 dargestellt. Nach 2 Teilungen sind nur noch 54% exprimiert, nach 3 35%, 4 24%, 5 17%, 6 11% und nach 7 Teilungen nur noch 5%. Die statistische Signifikanz wurde im Bezug auf die Kontrolle mit dem Student's T-Test berechnet * $p < 0,05$.

3.4.2 Funktionelle Untersuchungen zu *hoxA9*

3.4.2.1 siRNA Transfektion

Durch eine siRNA Transfektion kann spezifisch die mRNA eines bestimmten Gens abgebaut werden. Dadurch sind funktionelle Untersuchungen möglich. Zunächst wurden durch verschiedene Transfektionsversuche die optimale siRNA Konzentration ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Transfektion von 100nM siRNA nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) die beste Repression der mRNA-Expression erzielt werden. In Abbildung 3-27 wurde die mRNA Expression von MapK 24 Stunden nach der Transfektion von 100nM der entsprechenden siRNA durch semiquantitative real time PCR bestimmt. Es konnten nur noch 35% der mRNA im Gegensatz zur Kontrolle detektiert werden. Diese wurde mit einer sogenannten „nontemplate“ siRNA transfiziert, sie hat kein Target in der Zelle und kann dadurch keine spezifischen Effekte erzielen.

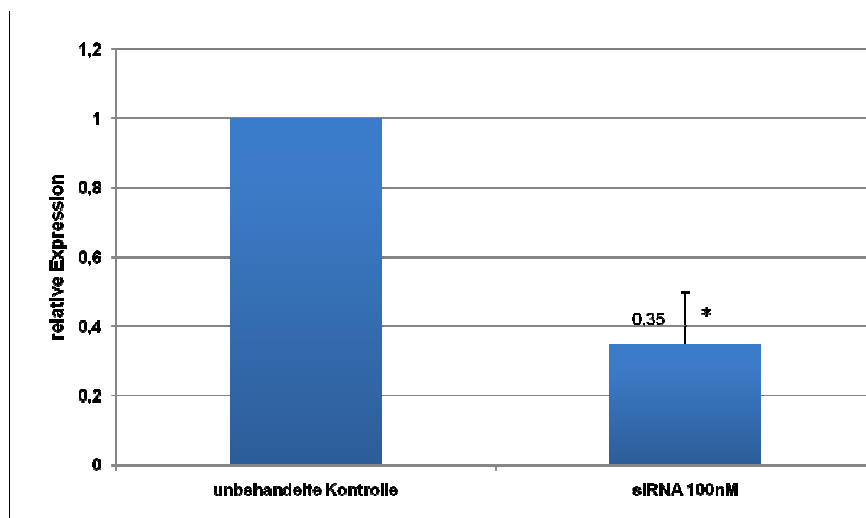


Abbildung 3-27 MapK mRNA Expression 24h nach siRNA Transfektion

Relative Expression wurde mittels semiquantitativer real time PCR bestimmt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, welcher mit nontemplate siRNA transfektioniert wurde. Die MapK Expression hat nach nur 24h um 75% abgenommen. Es sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels des Students T-Test durchgeführt $*=p<0,05$.

Alle weiteren Versuche mit siRNA wurden nach dem optimierten Protokoll durchgeführt.

3.4.2.2 siRNA Transfektion und CD34-Expression

Da das Oberflächenantigen CD34 als Stammzellmarker gilt, kann seine Expression auch als Richtlinie für den Stammzellcharakter unserer Zellen herangezogen werden. Dabei wird die Expression von *hoxA9* siRNA transfektionierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach 72 bzw. 96 Stunden am Durchflußzytometer gemessen. Man kann in Abbildung 3-28 die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Messungen sehen. Dabei wurden die Unterschiede der CD34-Expression Kontrolle – siRNA Transfektioniert dargestellt. Nach 72 Stunden sind 6,4% weniger Zellen CD34⁺ nach 96 Stunden sogar 11%. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von *hoxA9* während des Selbsterhaltes von hämatopoetischen Stammzellen. Fehlt diese Funktion sind nach vier Tagen deutlich weniger HPCs in der Kultur vorhanden.

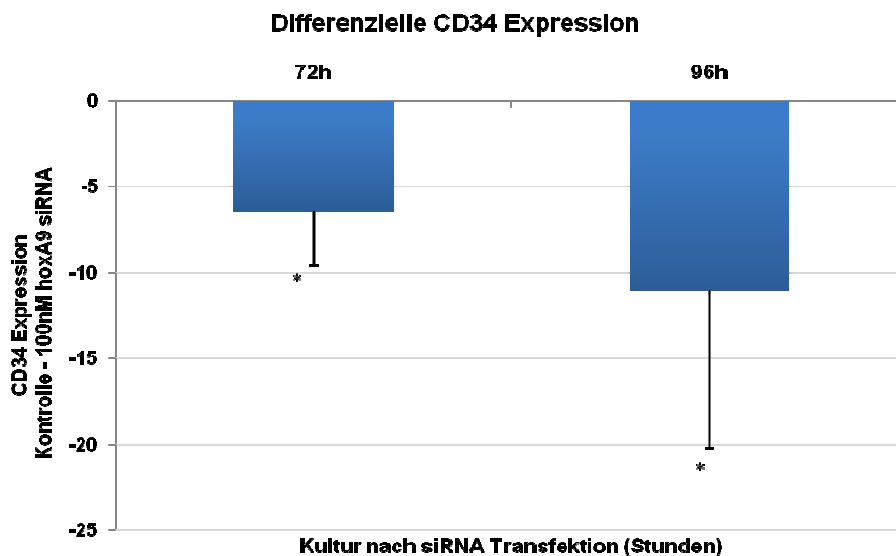
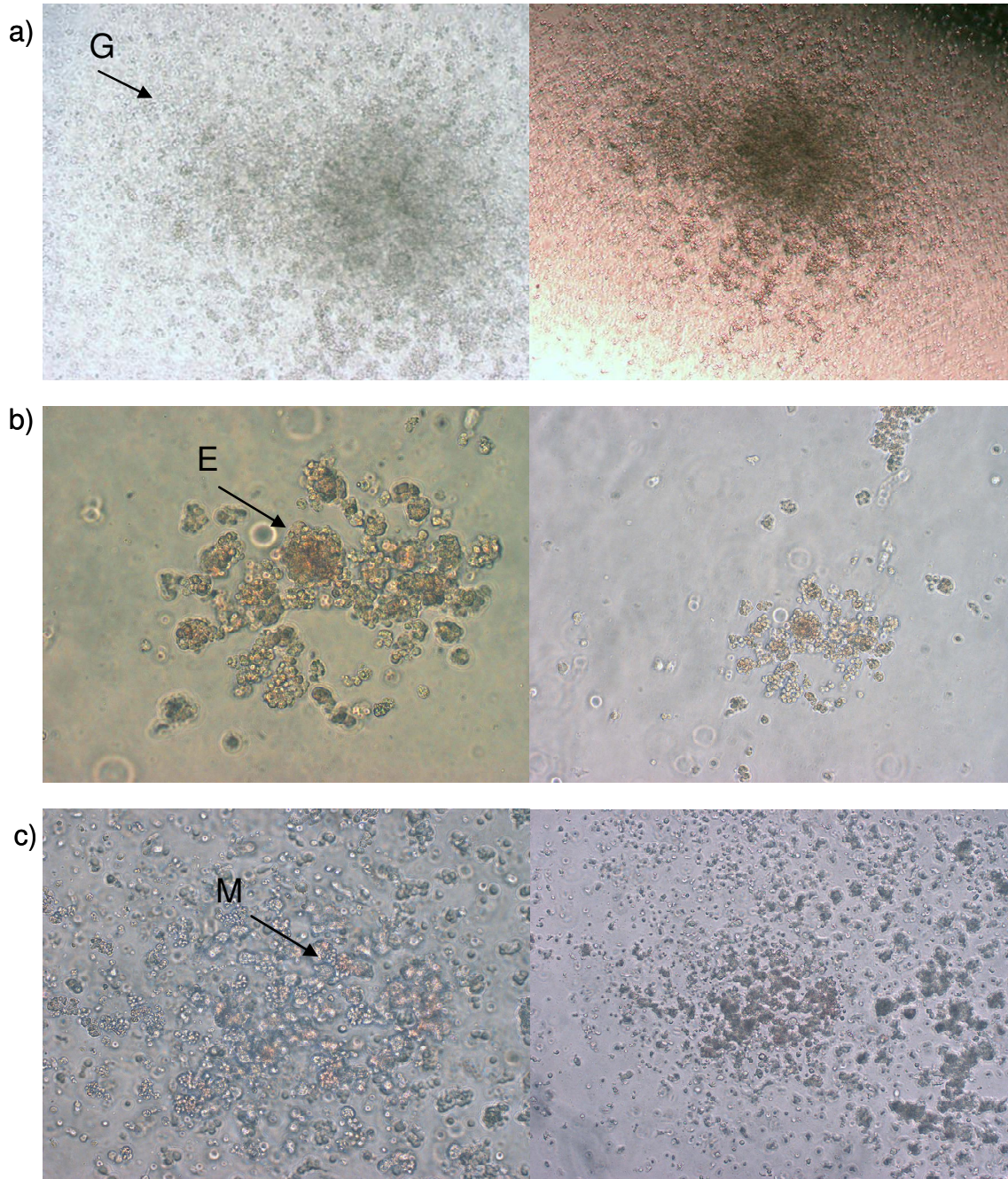


Abbildung 3-28 Differenzielle CD34 Expression; Kontrolle – *hoxA9* siRNA behandelte Zellen

Nach 72 bzw. 96 Stunden wurde der prozentuelle Anteil der CD34⁺ Zellen im Kontrollansatz und dem *hoxA9* siRNA behandelten Ansatz per Durchflußzytometrie bestimmt. Der Mittelwert der Differenz ist im Diagramm dargestellt. Pro Zeitpunkt wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit der Berechnung des p-Wertes mit dem Students T-Test ermittelt. *=p<0,05.

3.4.2.3 Koloniebildende-Assays

Bei diesem Versuch wurden 200 CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen eingesetzt. Je nach Versuchsansatz waren diese behandelt, als Kontrolle diente ein unbehandelter Ansatz.



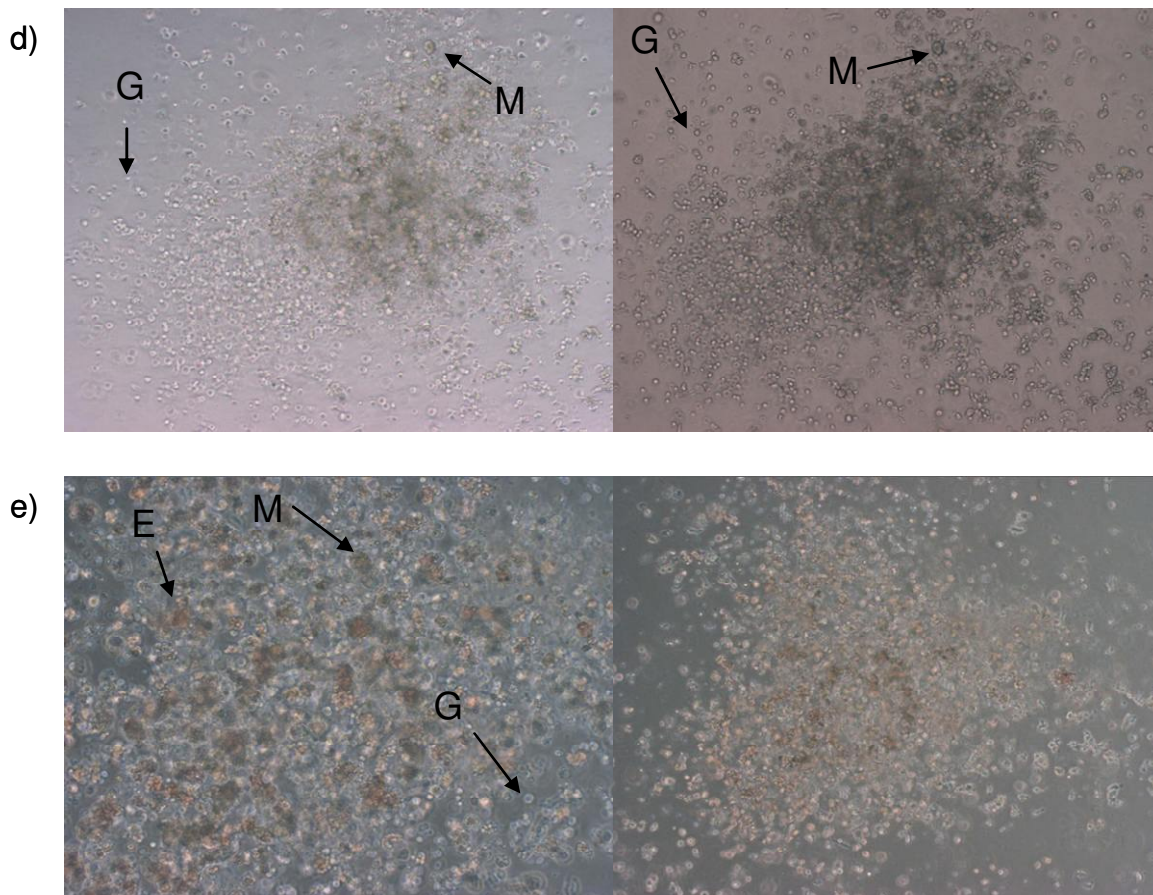


Abbildung 3-29 Koloniebildung in einem CFU-GEMM

Beispielhaftes Foto der Auswertung eines CFU-GEMM. E: Erythrozyten; M: Makrophagen; G: Granulozyten
 a) G-Kolonie, bestehend aus einer homogenen Granulozyten-Akkumulation b) CFU-E, Erythrocytenkolonie
 c) CFU-M; Makrophagen Kolonie d) GM-Kolonie. Sie besteht aus Granulozyten und Makrophagen e)
 Darstellung einer GEMM-Kolonie. Sie enthält Erythrozyten, Makrophagen und Granulozyten.

In Abbildung 3-29 sind Fotos von Kolonien dargestellt. Dabei werden drei Zelltypen unterschieden Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten. Die Zellen lassen sich anhand ihrer Größe, Farbe und Granularität auseinander halten. Am kleinsten sind die Erythrozyten, sie sind in den meisten Fällen hämoglobiniert und schimmern rötlich, in Kolonien von 8-200 Zellen (siehe Abbildung 3-29 b)) spricht man von CFU-E's (colony forming unit – Erythrozyten), sind die Kolonien größer und formen 3-8 dichte Cluster handelt es sich um BFU-E's (burst forming unit – erythrocyten). Granulozyten sind etwas größere transparente Zellen, alleine bilden sie die die CFU-G Kolonien (Abbildung 3-29 a)). Der dritte Zelltyp, die Makrophagen, sind am größten, sie weisen die höchste Granularität auf und schimmern leicht golden, sie sind in Abbildung 3-29 c) aufgeführt. Je primitiver die in den Versuch eingesetzten Zellen sind, desto mehr GEMM-Kolonien können gebildet werden. Hat eine Zelle nur noch ein geringeres Stammzellpotential,

werden „nur“ Kolonien mit einem Zelltyp gebildet. Die Kolonie-Versuche wurden nach 14 Tagen Inkubation ausgewertet, dabei werden die Kolonienzahlen und –typen ausgezählt.

In einem Versuch wurden siRNA transfektierte Zellen nach 72h Inkubation in den Kolonie-Assay eingesetzt. Hier sieht man nach der Transfektion mit 100nM *hoxA9* siRNA eine signifikante Abnahme im Gegensatz zu mit Kontroll-siRNA transfektierten Zellen. Die Differenz der Gesamtkolonienzahl liegt bei 32,25%. Die Zahl aller Kolonietypen nimmt ab, Abbildung 3-30. Die CFU-E Kolonien nehmen um 8,83% signifikant ab. Granulozyten und Granulozyten-Makrophagen Kolonien nehmen um 14,84% bzw. um 9,17% ab, doch ist die Differenz hier knapp nicht signifikant ($p = 0,07$ bzw. $p = 0,06$). Auch die relative Makrophagen (-4,51%) und die gemischte GEMM-Kolonienzahl (-1,72%) nehmen mit der siRNA Transfektion ab. Die fehlende Signifikanz kann hier durch eine geringe Kolonienzahl innerhalb der eigentlichen Gruppen erklärt werden.

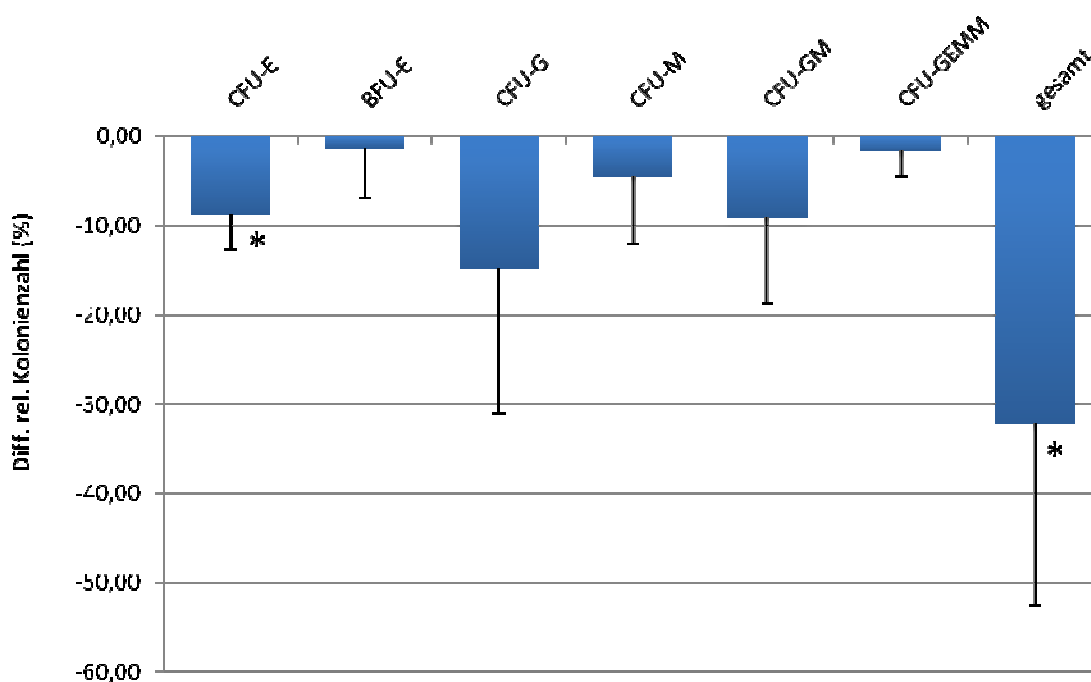


Abbildung 3-30 Auswertung CFU-GEMM Assays mit siRNA

Alle Kolonienzahlen nehmen im relativen Vergleich zur Kontrolle (non template control siRNA behandelt) ab. CFU-E -8,83%; BFU-E -1,28%; CFU-G -14,84%; CFU-M -4,51%; CFU-GM -9,17%; CFU-GEMM -1,72%; Gesamtzahl -32,25%. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's T-Test berechnet * $p < 0,05$. $n = 5$.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse sollte in einem weiteren Schritt die Regulation der *hoxA9* Expression untersucht werden. Als möglicher Mechanismus wurde die epigenetische DNA-Regulation betrachtet.

3.4.3 *hoxA9* und DNA-Methylierung; methylierungsspezifische PCR

Um den Bezug der Expression von *hoxA9* zur Methylierung herzustellen, wurde zunächst eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt. Mit dieser Methode, können einzelne CpG-Dinukleotide auf die Methylierung untersucht werden. Es wird eine PCR der bisulfitbehandelten DNA für die unmethylierte CpG-Site und eine für die methylierte CpG-Site durchgeführt. In Abbildung 3-31 ist die relative Lage der Primer zum Transkriptionsstartpunkt von *hoxA9* dargestellt. Sie wurden in den 5'Upstream Bereich rund 50bp vor den Transkriptionsstart gelegt. Dabei werden die Primer so gewählt, dass zumindest ein CpG Dinukleotid in jedem Primer enthalten ist.

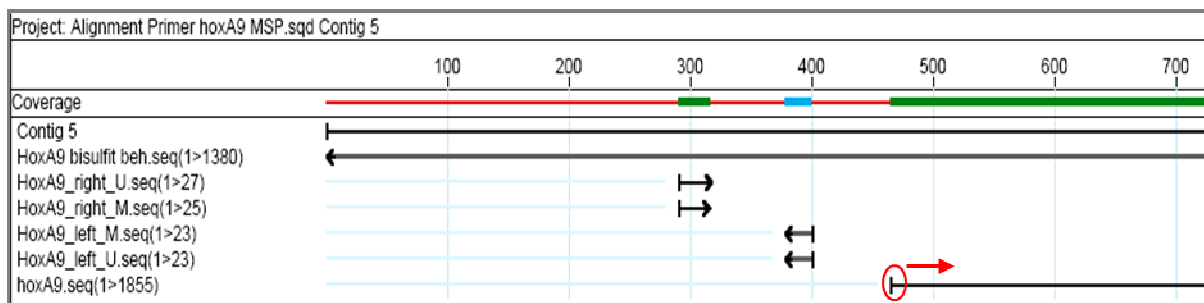


Abbildung 3-31 Lage der MSP-Primer

Die Primer liegen ca. 50bp von dem Transkriptionsstartpunkt von *hoxA9*. Ein Primerpaar amplifiziert dabei die unmethylierte, das andere die methylierte DNA. Der rote Kreis markiert den Transkriptionsstart des *hoxA9*-Gens, der Pfeil beschreibt die Richtung der Transkription. Das Alignment wurde mit dem Programm SeqMan II (DNASTAR Lasergen; Madison; USA) hergestellt.

3.4.3.1 *hoxA9* MSP-PCR in leukämischen Zelllinien

In Abbildung 3-32 ist die Gelelektrophorese der *hoxA9*-MSP in den leukämischen Zelllinien HL60, KG1A, Kasumi und K562 dargestellt. Es wurde in allen Fällen 200ng genomische DNA für die PCR eingesetzt und für 40 Zyklen amplifiziert. Die Größe des Amplikons beträgt 111bp. Nur bei der Zelllinie KG1A kann ein unmethyliertes PCR-Produkt detektiert werden, eine deutliche, starke Bande ist auf dem Gelbild zu sehen. Der methylierte Ansatz ist bei dieser Zelllinie deutlich schwächer. Bei den Zelllinien HL60 und Kasumi ist keine unmethylierte Bande zu sehen, nur eine deutliche im methylierten Ansatz. Die Zelllinie K562 weist eine zarte, schwache unmethylierte Bande und eine ebenfalls starke Methylierung auf.

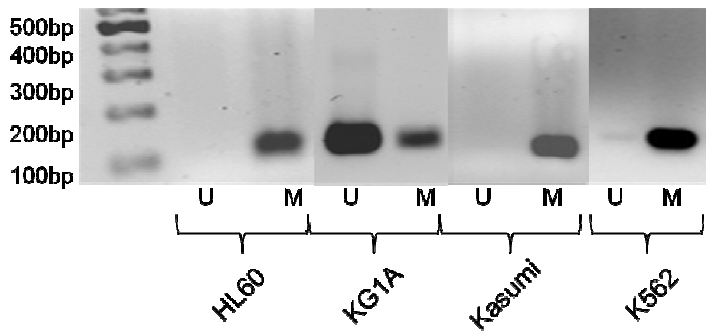


Abbildung 3-32 Gelelektrophorese einer methylierungsspezifischen PCR für *hoxA9* in verschiedenen leukämischen Zelllinien

Nur in KG1A Zellen ist ein unmethyliertes PCR Produkt deutlich zu erkennen. In K562 ist ein sehr schwaches unmethyliertes Amplifikat zu sehen. In allen Zellen kann eine deutliche methylierte Bande detektiert werden.

3.4.3.2 *hoxA9* MSP-PCR in primären Zellen

Zur ersten Beurteilung der Methylierung wurde in den hämatopoetischen Progenitorzellen ebenfalls eine MSP-PCR für das Gen *hoxA9* durchgeführt. Dabei wurden dieselben Primer wie in den leukämischen Zelllinien verwendet, siehe auch 3.4.3.1 und Abbildung 3-31.

In Abbildung 3-33 ist die Gelelektrophorese der *hoxA9* MSP-PCR in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, Knochenmark (Spenderalter: 27Jahre) und mobilisiertem Peripherblut (Spenderalter: 33Jahre) dargestellt. In allen drei Proben konnte unmethylierte DNA amplifiziert werden, wohingegen ein methyliertes Amplifikat nur in den Proben aus Knochenmark und mobilisiertem Peripherblut vorliegt. Wegen zu geringer Zellzahlen konnte keine MSP-PCR für CD34⁺-Subgruppen wie zum Beispiel CD34⁺ CD38⁻ HSCs aus Nabelschnurblut durchgeführt werden.

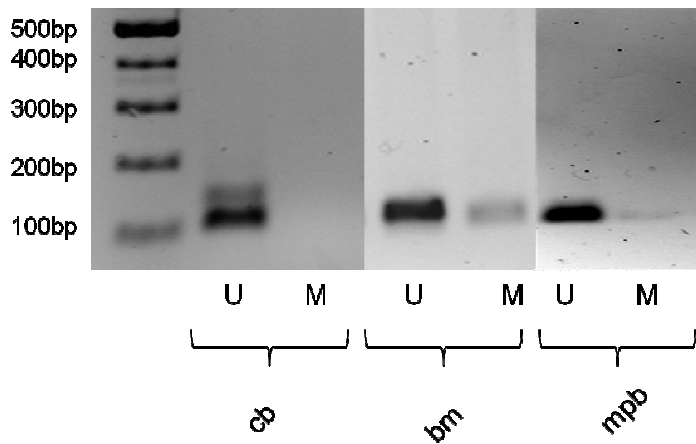


Abbildung 3-33 Gelelektrophorese von *hoxA9* MSP-PCR in CD34⁺-Zellen

cb: Nabelschnurblut; bm: Knochenmark; mpb: mobilisiertes Peripherblut als Quelle der CD34⁺ Zellen. In allen drei Ansätzen ist eine deutliche unmethylierte Bande zu sehen. Ein methyliertes Amplifikat kann in Knochenmark und mobilisiertem Peripherblut dargestellt werden.

Um die DNA-Methylierung als Regulationsmechanismus für die *hoxA9* Expression aufzuweisen, wurden weitere Untersuchungen an der HL60 Zelllinie durchgeführt.

3.4.3.3 Behandlung von HL60 Zellen mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

Für weitere Versuche wurde die Zelllinie HL60 verwendet. Die Zellen wurden mit dem DNMT1 Inhibitor 5'-Aza-2'-deoxycytidin (Decitabine), siehe auch 1.2.4 und 2.2.6, behandelt. Dabei kommt es durch Hemmung der Methyltransferase zur Demethylierung der DNA und zu einer eventuellen Reaktivierung der Expression. Zunächst wurde die relative Expression der behandelten Zellen im Vergleich von unbehandelten HL60 Zellen untersucht und ist in Abbildung 3-34 dargestellt. Die Expression konnte durch Behandlung mit Decitabine signifikant auf das 329-fache erhöht werden.

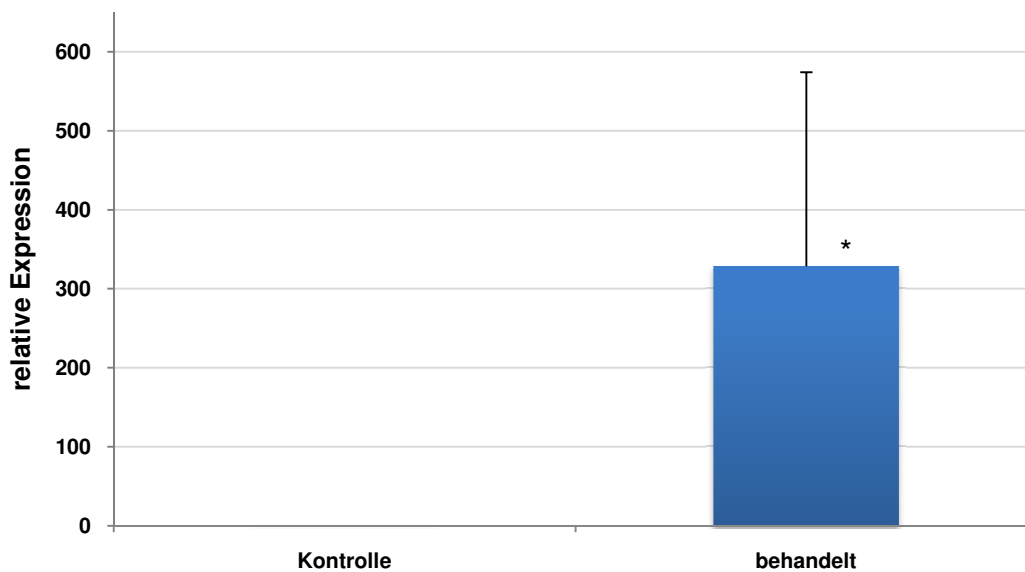


Abbildung 3-34 relative Expression der 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelten HL60 Zellen

Die Zellen wurden für drei Tage mit der täglichen Gabe von 200nM Decitabine behandelt. Nach weiteren drei Tagen Kultur wurden die Expression im Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle gemessen. Es wurden 4 unabhängige Versuche, mit Doppelbestimmung durchgeführt, die statistische Signifikanz wurde mit dem Students t-Test berechnet $*p < 0,05$.

Außerdem wurden aus den Decitabine behandelten Zellen die genomische DNA isoliert und Bisulfit-behandelt. Es wurde eine MSP-PCR durchgeführt. In Abbildung 3-35 ist exemplarisch das Ergebnis eines Versuchs dargestellt. Man kann in der behandelten Probe eine deutliche Bande im unmethylierten PCR-Ansatz sehen, in der Kontrolle ist nahezu kein PCR-Produkt zu sehen. Wie in 3.4.3.1 wurden ebenfalls ca. 200ng genomische DNA in die Reaktion eingesetzt. Es hat tatsächlich eine Demethylierung der DNA im Promotorbereich des *hoxA9*- Transkriptionsfaktors stattgefunden.

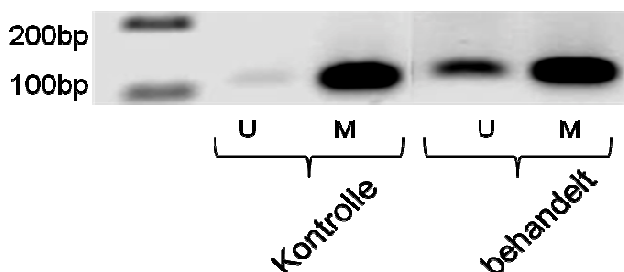


Abbildung 3-35 Gelelektrophorese einer *hoxA9* MSP-PCR in HL60

Als Kontrolle dient ein unbehandelter Ansatz. Die Zellen wurden mit 200nM Decitabine für drei Tage behandelt und nach weiteren drei Tagen geerntet. In der behandelten Probe ist eine deutliche unmethylierte Bande zu sehen, diese ist im Kontrollansatz nicht zu erkennen.

3.4.3.4 Bisulfit-Sequenzierung

Um die Methylierung im gesamten Promotorbereich genauer zu untersuchen, wurde eine Bisulfit-Sequenzierung durchgeführt. So können mehrere CpG-Dinukleotide untersucht werden und gleichzeitig die Ergebnisse der MSP-PCR validiert werden. Die Primer wurden so gewählt, dass sie keine CpG-Dinukleotide enthalten, aber das Amplikon auch die MSP-PCR umschließt. Die Lage der Primer ist in der untenstehenden Abbildung 3-36 in einem Alignment dargestellt. Das Amplifikat enthält 42 CpG-Dinukleotide, welche auf ihren Methylierungsstatus untersucht wurden.

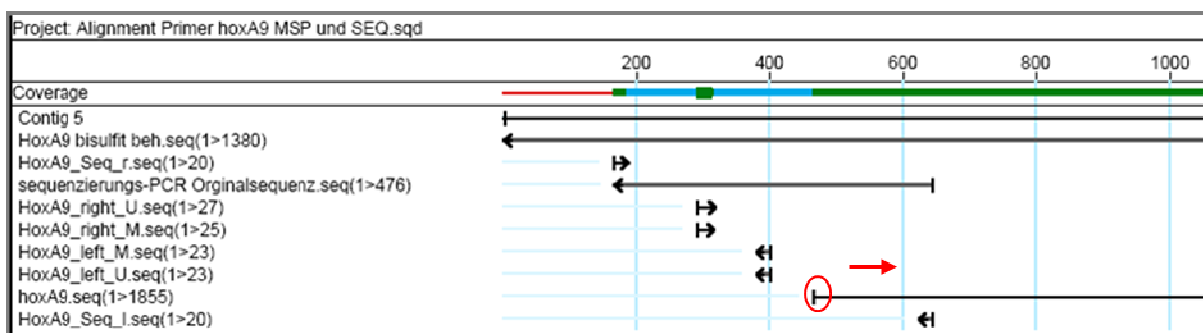


Abbildung 3-36 Lage der Primer für die Sequenzierung

Die Primer liegen um den Transkriptionsstartpunkt von *hoxA9*. Das Amplifikat hat eine Länge von 476bp und ist im Alignment neben den Primern für die MSP-PCR dargestellt. Der Transkriptionsstartpunkt und die Richtung ist rot markiert. Für das Alignment wurde das Programm SeqMan II (DNASTAR Lasergen; Madison; USA) verwendet.

Die Sequenzierungsreaktion wurde von der Firma Qiagen durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde von beiden Seiten ansequenziert.

3.4.3.4.1 Zelllinie HL60

Es wurden in drei unabhängigen Versuchen unbehandelte HL60 Zellen und mit Decitabine behandelte Zellen zur Sequenzierung eingesetzt. In Abbildung 3-37 sind die Mittelwerte der Methylierungsdifferenz der Kontrolle und dem behandelten Ansatz dargestellt. Die rot gekennzeichneten CpG's liegen innerhalb der Primer für die MSP-PCR.

Wie erwartet, sieht man insgesamt, eine deutliche Tendenz zur Demethylierung. Die genauen Werte der Demethylierung können der Tabelle im Anhang entnommen werden. Die CpG-Dinukleotide 8, 12, 13, 25, 26, 30 und 40 zeigen eine signifikante Demethylierung um 5-20%. Die ersten 20 CpG-Dinukleotide, welche sich unmittelbar vor und hinter dem

Transkriptionsstartpunkt befinden (siehe auch Abbildung 3-36), zeigen nur vereinzelt eine Demethylierung um mehr als 5%. Einzelne CpGs weisen sogar einen Anstieg der Methylierung auf, welche aber als Messartefakte vernachlässigt werden können. Die CpG-Dinukleotide welche weiter vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegen, 140bp 5'upstream, zeigen in diesem Versuch einen deutlicheren Trend der Demethylierung unter Decitabinebehandlung. Die CpG-Dinukleotide welche in der MSP-PCR getestet werden, d.h. sie befinden sich innerhalb der MSP-Primersequenz, sind in Abbildung 3-37 rot markiert. Die CpG-Dinukleotide 25 weist eine signifikante Methylierungsdifferenz von - 7,17%, Nummer 34 einen Unterschied von immerhin 2,3%. Diese Methylierungsdifferenz bestätigt die Ergebnisse der MSP-PCR. Wobei beachtet werden muss, dass die unbehandelte HL60 Zelllinie im Promotorbereich von *hoxA9* zu 96,2% methyliert ist, bei den behandelten Zelllinien liegt eine Promotormethylierung von 92,9% vor. Dies deutet darauf hin, dass nicht die komplette Methylierung für die Expressionsregulation wichtig ist, sondern die, einzelner CpG-Dinukleotide.

Die Ergebnisse der einzelnen Sequenzierungsreaktionen sind im Anhang der Arbeit aufgeführt.

Methylierungsdifferenz Kontrolle - Decitabinebehandelt

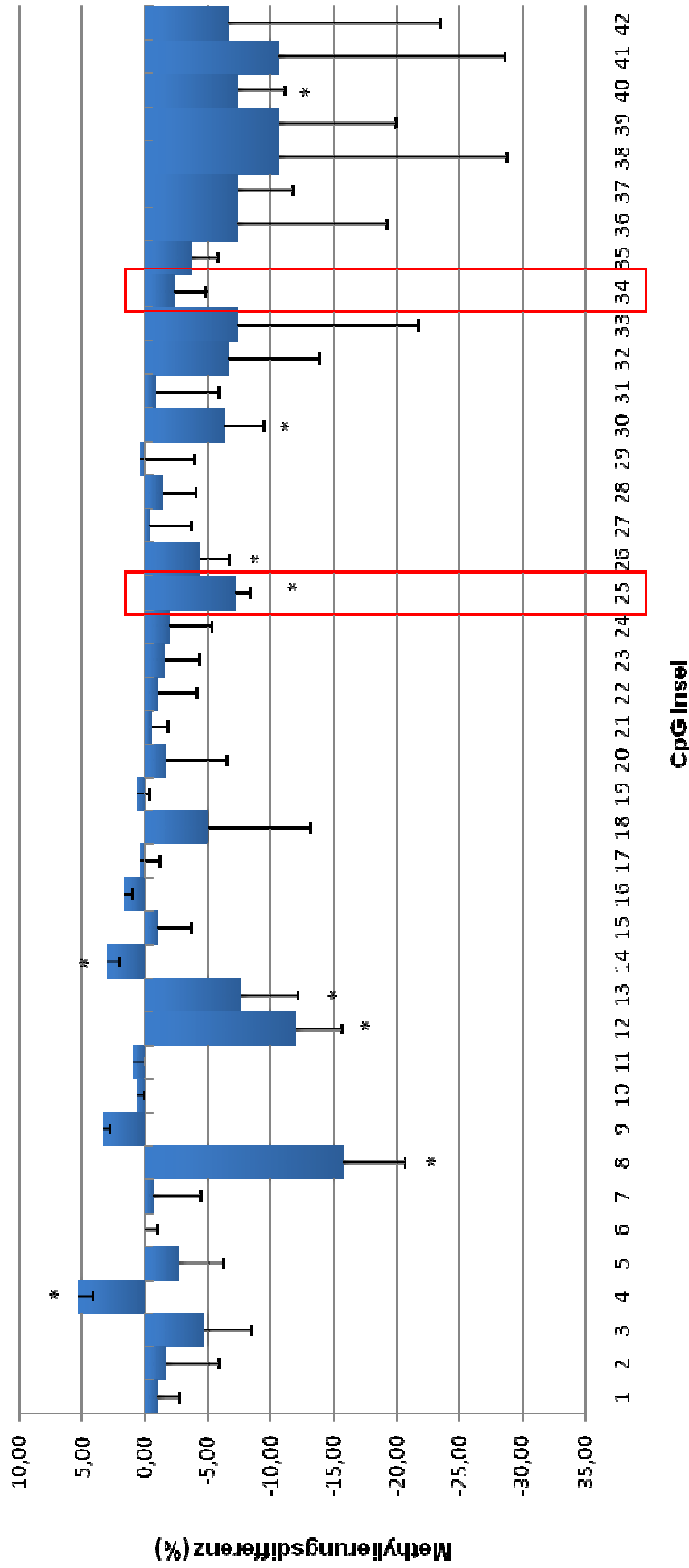


Abbildung 3-37 Differenz der Methylierung im Promotorbereich von *hoxA9*

Untersucht wurden 42 CpG-Dinukleotide im Promotorbereich von *hoxA9*. Dargestellt ist der Mittelwert der Differenz Kontrolle – behandelte Zellen von drei unabhängigen Versuchen. Rot markiert sind die CpG-Dinukleotide, welche durch die MSP-PCR getestet wurden. * = $p < 0,05$, Signifikanz wurde mit dem geeigneten Student's t-Test durchgeführt

3.4.3.4.2 primäre Zellen

3.4.3.5 Methylierungs-Sequenzierung

Auch im primären Zellmaterial wurde eine Bisulfitsequenzierung durchgeführt. Dabei wurden zunächst CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, Knochenmark und Peripherblut isoliert und eine Sequenzierungs-PCR für *hoxA9* durchgeführt, die Lokalisation der Primer und des PCR-Produkts ist in Abbildung 3-36 dargestellt. Die Signifikanz ist im Bezug auf Nabelschnurblut durch den Students t-Test berechnet worden, in Abbildung 3-38 ist die Methylierung im Promotorbereich von *hoxA9* in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, Knochenmark (28 Jahre) und mobilisiertem Peripherblut (32 Jahre) dargestellt.

Auf den ersten Blick erscheinen die CB weniger methyliert, als mPB oder BM. Berücksichtigt man aber die Skalierung der Y-Achse wird klar das es sich um sehr geringe Unterschiede handelt. Aber dennoch ist die Methylierung der CpG-Dinukleotide 1 und 3-6 in mobilisiertem Peripherblut signifikant höher, als in CD34⁺ Zellen. Im Weiteren weisen die CpG-Dinukleotide 7-29 zu große Abweichungen auf, um eine Zu- oder Abnahme der Methylierung zu beschreiben. Die hinteren CpG-Dinukleotide (30-40) zeigen wiederum eine leichte Erhöhung der Methylierung in den Proben des Peripherbluts und des Knochenmarks, die CpG Inseln 31 und 37 sind im Vergleich zu den CD34⁺ Zellen des Nabelschnurbluts im mobilisiertem Peripherblut signifikant stärker um 2% methyliert.

Es wurde ebenfalls die *hoxA9*-Promotormethylierung in ausdifferenzierten Blutzellen untersucht. Dafür wurden Granulocyten, Monocyten, B- und T-Zellen aus Nabelschnurblut isoliert und auf der bisulfitbehandelten DNA eine Sequenzierungs-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse können Abbildung 3-38 entnommen werden. Die CpG-Dinukleotide 1-28 sind in allen Zelltypen tendenziell stärker methyliert, als in den hämatopoetischen Vorläuferzellen. Der größte Unterschied beträgt zum Beispiel für Granulocyten +5,32% für die CpG-Site 12. Die vom Transkriptionsstartpunkt am weitesten entfernten CpG-Dinukleotide (28-42) zeigen ein ähnliches Methylierungslevel in allen Zelltypen.

Insgesamt kann man hier im gesamten Bereich von unmehtylierten bzw. nur sehr schwach methylierten CpG-Dinukleotiden gesprochen werden, die genauen Werte der Sequenzierungen können einer Tabelle im Anhang entnommen werden.

hoxA9 Promotormethylierung in CD34⁺ Zellen

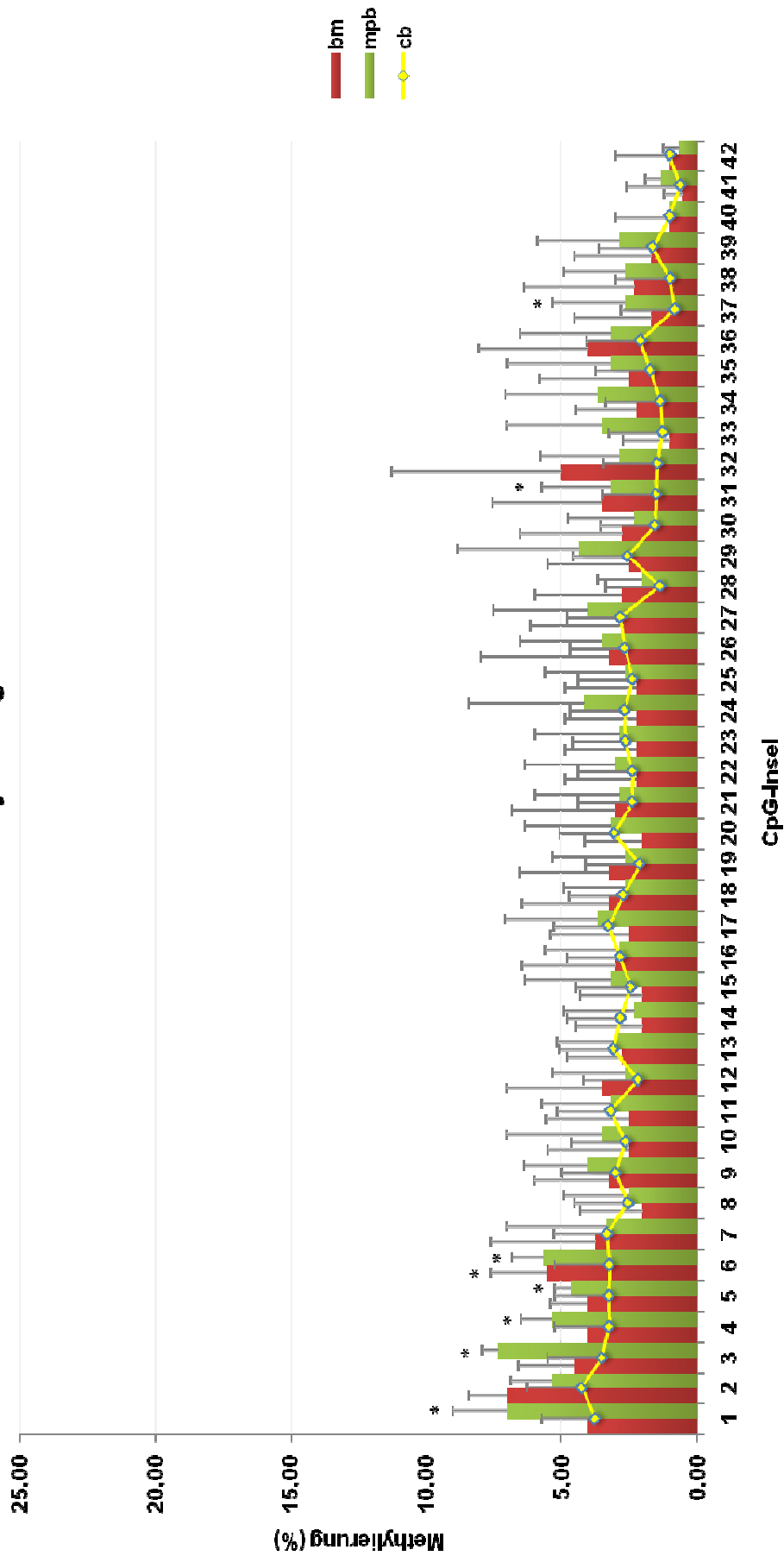


Abbildung 3-38 *hoxA9* Promotormethylierung in CD34⁺ Zellen

Untersucht wurden 42CpG-Dinukleotide im Promotorbereich von *hoxA9*. Dargestellt ist die mittlere Methylierung von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, Knochenmark und mobilisiertem Peripherblut. Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test berechnet, * = $p < 0,05$.

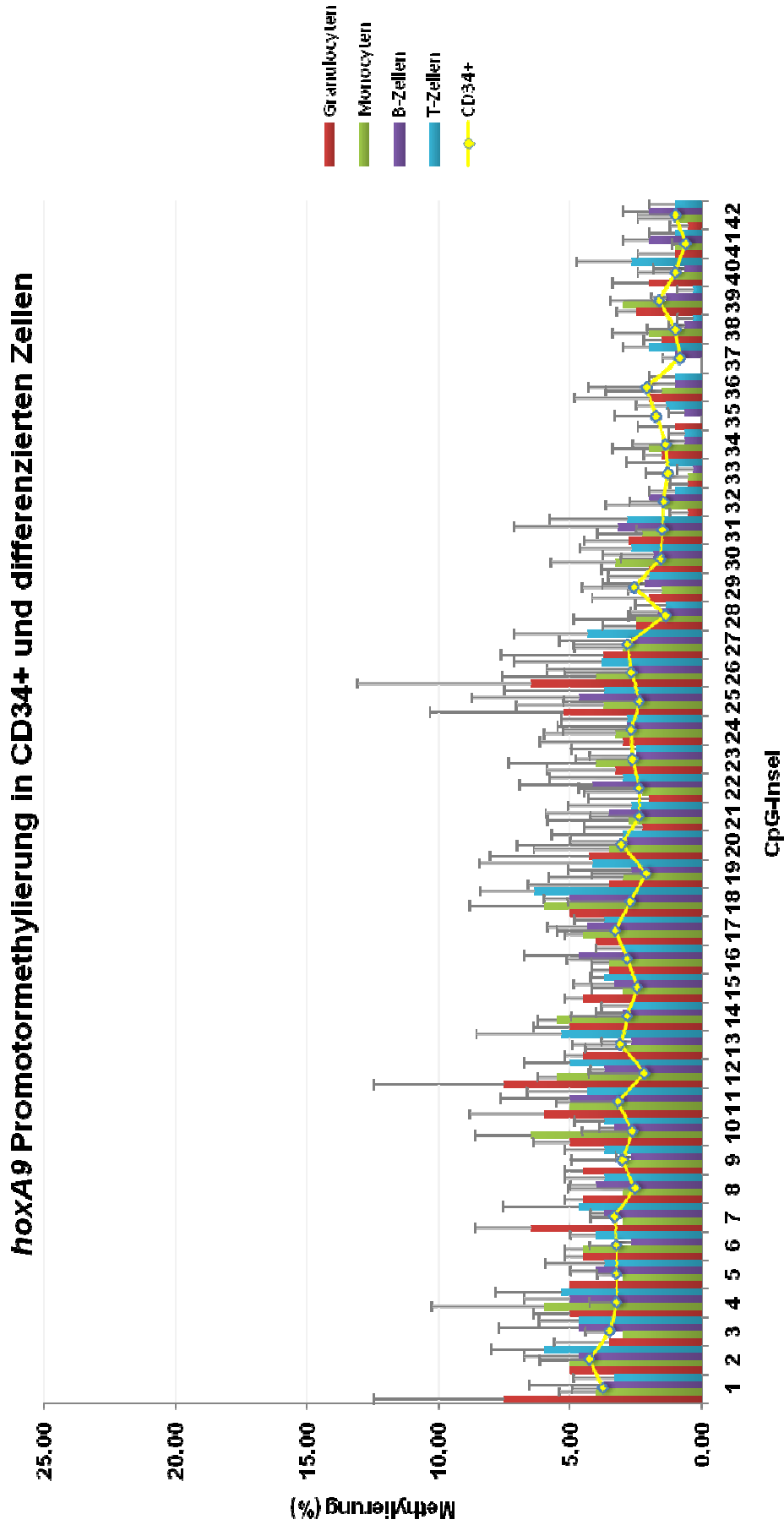


Abbildung 3-39 *hoxA9* Promotormethylierung in HPCs im Vergleich zu Granulozyten, Monozyten, B-Zellen und T-Zellen

Untersucht wurden 42 CpG-Dinukleotide im Promotorbereich von *hoxA9*. Dargestellt ist der Mittelwert der Methylierung aus drei unabhängigen Versuchen. Die gelbe Linie zeigt die Methylierung in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut.

3.4.4 HumanMethylation Bead Chip und *hoxA9*

Im Rahmen der Methylierungsstudien an gesunden CD34⁺ Zellen wurden ebenfalls homeobox Gene analysiert. In Abbildung 3-40 ist ein DotPlot aller homeobox Gene in CD34⁺ Zellen dargestellt. Dabei sind die CpGs von *hoxA9* rot unterlegt. Insgesamt wurden auf dem Chip 67 CpGs von 29 homeobox Genen analysiert. Die größten Unterschiede der Methylierung zwischen den jungen HPCs aus CB und den alten aus mPB zeigten sich dabei bei den Genen *hoxB5* (Abnahme von 26%; 47% CB zu 21% mPB) und *hoxB6* (Zunahme von 30%; 30% CB zu 60% mPB). Am höchsten methyliert liegt das Gen *hoxB1* vor. Beide CpG-Dinukleotide sind sowohl im CB als auch im mPB zu mindestens 90% methyliert. Die Gene *hoxB3* und *hoxA10*, von denen nur ein CpG-Dinukleotid auf dem Chip untersucht wurde, weisen ebenfalls eine starke Methylierung von 85% im CB und 84% im mPB für *hoxB3* und 82% bzw. 78% für *hoxA10* auf.

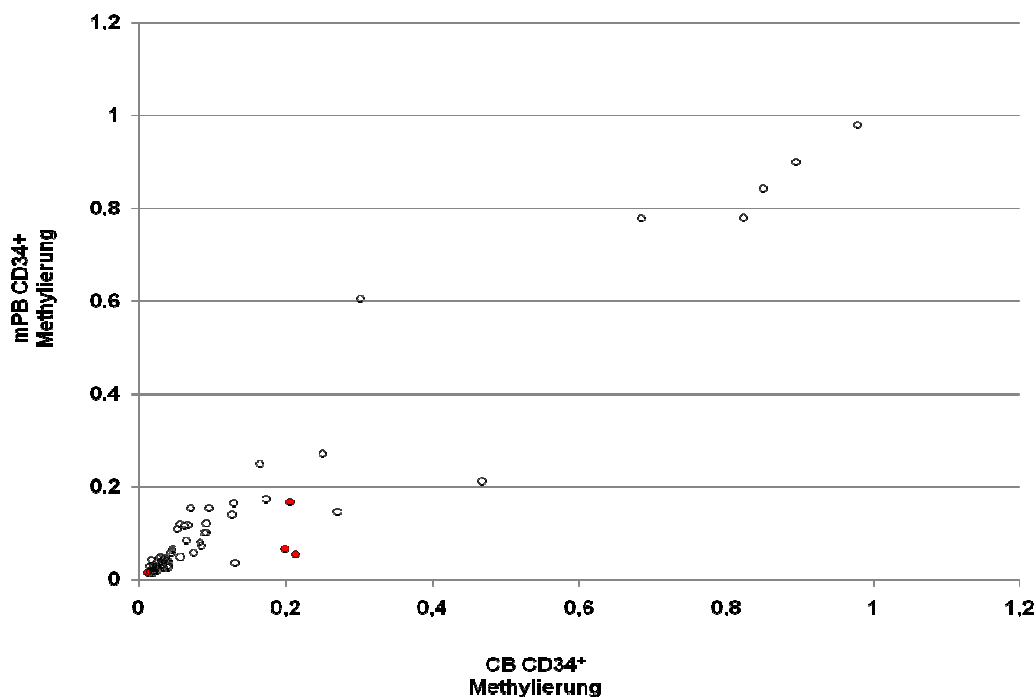


Abbildung 3-40 DotPlot der HPC-Mittelwerte aller homeobox Gene

Auf der X-Achse sind die Mittelwerte der Methylierung aus CB auf der Y-Achse aus mPB aufgetragen. Dargestellt sind lediglich die Transkriptionsfaktoren der homeobox Genfamilie. Rot sind die Werte des Gens *hoxA9* dargestellt.

Die meisten homeobox Gene liegen nur schwach methyliert (weniger als 20%) vor und weisen nur geringe Unterschiede zwischen den HPCs aus Nabelschnurblut und

dem mobilisiertem Peripherblut auf. Ebenso sind nur sehr geringe Unterschiede in differenzierten Zellen im Vergleich zu HPCs vorhanden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt wurden sechs CpG-Dinukleotide für das Gen *hoxA9* untersucht, die Ergebnisse der Methylierungsanalyse sind in Tabelle 8 zusammengefasst, dabei sind die Mittelwerte aller analysierten Zelltypen und die Differenz zu jungen HPCs dargestellt. Vier CpG-Dinukleotide weisen eine Demethylierung von CB zu mPB auf, wobei die größte Differenz 16% beträgt. Bei differenzierten Zellen beträgt der Unterschied in dieser CpG-Site sogar -19,5% für Granulozyten und -17,8% für Monozyten. Alle gemessenen Methylierungswerte liegen mit einem Maximum von 20% auf einem geringen Level. Somit besteht bei allen untersuchten Zellen wahrscheinlich keine starke Expressionssuppression durch DNA Methylierung. In der unten stehenden Tabelle sind alle Ergebnisse der Analyse erfasst.

Tabelle 8 Ergebnisse des HumanMethylation BeadChip27 für *hoxA9* der HPCs Granulozyten und Monozyten

SYMBOL	CHR	TargetID	CD34+ young	CD34+ old	Granulozyten	Monozyten	HPC old- HPC young	Granulozyten - HPC young	Monozyten - HPC young
HOXA9	7	cg27009703	0,214	0,055	0,019	0,035	-0,159	-0,195	-0,178
HOXA9	7	cg26521404	0,131	0,037	0,018	0,030	-0,094	-0,113	-0,101
HOXA9	7	cg01354473	0,199	0,066	0,061	0,091	-0,133	-0,138	-0,108
HOXA9	7	cg07778029	0,020	0,017	0,022	0,028	-0,003	0,002	0,008
HOXA9	7	cg25047280	0,032	0,040	0,039	0,043	0,008	0,007	0,011
HOXA9	7	cg01381846	0,205	0,168	0,146	0,220	-0,037	-0,060	0,015

3.4.5 Regulation von *hoxA9* in primärem Zellmaterial

Da die DNA-Methylierung zumindest in gesunden CD34⁺ Vorläuferzellen und auch in den daraus resultierenden B- und T- und auch Monozyten und Granulozyten als unwahrscheinlich erscheint wurde nach weiteren Regulationsmechanismen und Signalwegen, welche die Expression von *hoxA9* beeinflussen, gesucht. So wurden CD34⁺ Nabelschnurblutzellen mit dem rekombinanten Jagged Protein behandelt. In vivo bindet das Transmembranprotein Jagged an seinen spezifischen Rezeptor Notch. Dieser Signalweg ist während der Hämatopoese für die Regulation der Proliferation und Differenzierung verantwortlich (Milner, Kopan et al. 1994; Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999; Cordle, Johnson et al. 2008). So sind Notch-Rezeptor-Signale über Jagged Delta1 und Delta4 für die Differenzierung von CD34⁺ Zellen in natürliche Killerzellen (Beck, Padival et al. 2009).

Die CD34⁺ Zellen aus CB wurden für 72 Stunden mit 2µg/ml rekombinantem Jagged1 (RnDSystems, Minneapolis, USA) kann eine signifikante Reduktion der *hoxA9* Expression gemessen werden. Die Repression beträgt 45% im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle, siehe Abbildung 3-41. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf, kann erst nach drei Tagen ein Effekt des Jagged1 Proteins auf die Expression des homeobox Transkriptionsfaktors beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

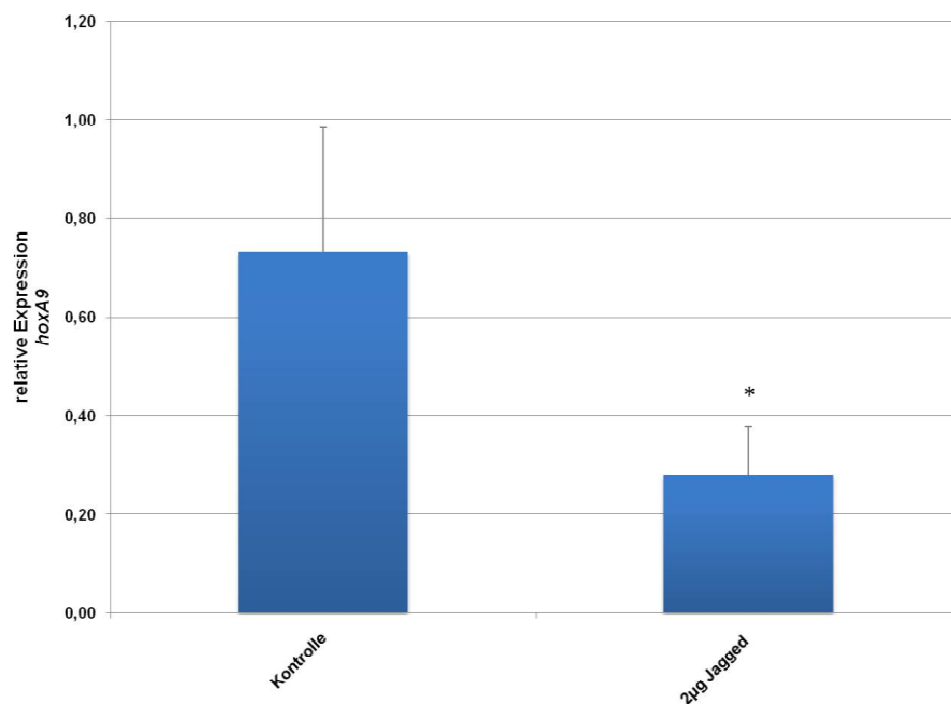


Abbildung 3-41 semiquantitative real time PCR für *hoxA9* nach 72 Stunden Inkubation mit Jagged

CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut wurden in Stem II Medium mit 2µg/ml Jagged für inkubiert. Als Kontrolle diente ein unbehandelter Ansatz. Man sieht eine signifikante Abnahme der *hoxA9* Expression durch die Behandlung mit Jagged. Es sind die Mittelwerte von drei Versuchen dargestellt, die statistische Signifikanz wurde mit dem Students t-Test berechnet, wobei *= $p < 0,05$.

Nach der Behandlung mit 2µg/ml rekombinantem Jagged wurden ebenfalls CFU-GEMM Versuche angesetzt. Außer in den Makrophagenkolonien (es konnte keine Kolonie gezählt werden), nimmt die durchschnittliche Anzahl in allen Arten von Kolonien ab. Die Gesamtzahl nimmt hier um 26,72% signifikant ab, ebenso wie die Anzahl der CFU-E (-6,55%). Auch die Anzahl der anderen Kolonietypen BFU-E (1,09%), CFU-G (14,89%); CFU-GM (-3,5%) und CFU-GEMM (-0,69%) nimmt mit der Behandlung von Jagged ab, doch konnte hier kein $p < 0,05$ berechnet werden. Die Ergebnisse sind im Diagramm der Abbildung 3-42 zusammengefasst und dargestellt. Auch in diesem Versuch ist die fehlende Signifikanz auf geringe Kolonienzahlen zurückzuführen, so konnte in keinem Ansatz eine Makrophagenkolonie gezählt werden.

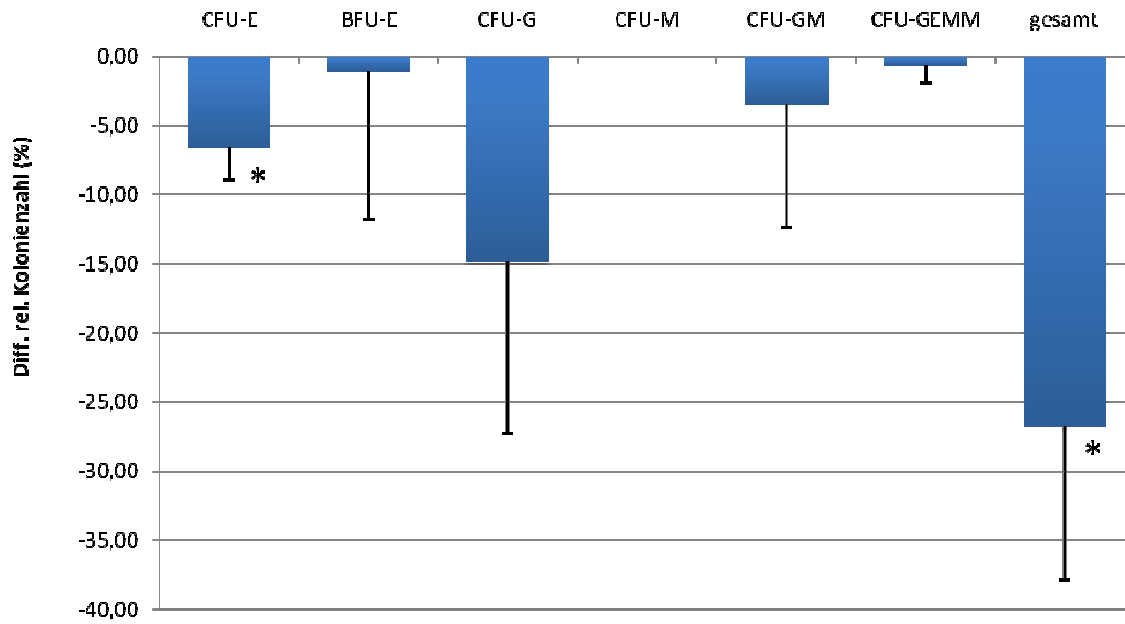


Abbildung 3-42 Auswertung CFU-GEMM Assays mit 2µg/ml Jagged

Die relative Kolonienzahl nimmt mit Behandlung des rekombinanten Jagged-Proteins ab. Als Kontrolle diente ein unbehandelter Ansatz. CFU-E -6,55%; BFU-E -1,09%; CFU-G -14,89%; CFU-GM -3,5%; CFU-GEMM -0,69%; Gesamtzahl -26,72%. * $p < 0,05$, berechnet mit dem Student's T-Test. N=3.

4. Diskussion

4.1 DNA-Methylierung in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen

Embryonale Stammzellen besitzen die Fähigkeit ihre Stammzellkapazität und ihre chromosomale Stabilität ohne die Methyltransferasen DNMT1, DNMT3a und DNMT3b zu erhalten. Sie können sozusagen eine genomweite Hypomethylierung tolerieren. Im Gegensatz zu adulten Stammzellen spielt hier die Methylierung eine wichtige Rolle im Selbsterhalt, der Differenzierung, dem Zellzyklus und der Stabilität des Genoms, so auch bei hämatopoetischen Stammzellen (Tsumura, Hayakawa et al. 2006).

4.1.1 DNA-Methylierung in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen in der myeloiden Differenzierung

Zunächst soll das Methylierungsmuster der hämatopoetischen Vorläufer im Vergleich zu differenzierten Zellen betrachtet werden. Bei der Differenzierung multipotenter hämatopoetischer Stammzellen werden über verschiedene Progenitoren, zum Beispiel lymphoide, myeloide und erythroide Vorläufer, immer spezialisiertere Zellen und schließlich ausdifferenzierte Effektorzellen, alle Blutzelltypen, hervorgebracht (siehe auch Abbildung 1-2).

In dieser Arbeit wurde das Methylierungsmuster zweier myeloider Zelltypen, Granulozyten und Monozyten, untersucht und mit dem hämatopoetischen Progenitoren, also CD34⁺ Zellen verglichen. Alle Zelltypen wurden aus Nabelschnurblut aufgereinigt, siehe auch Abbildung 3-1, Seite 37.

Insgesamt konnte eine globale Demethylierung in beiden Zelltypen, also Granulozyten und Monozyten im Vergleich zu den Progenitorzellen beobachtet werden. Den ScatterPlots aus Abbildung 3-13 ist eine deutliche Verschiebung in Richtung Demethylierung zu entnehmen. Diese Ergebnisse werden durch die Beobachtungen von Bröske et al. unterstützt. Dort wurde gezeigt, dass in hämatopoetischen Stammzellen eine myeloide Differenzierung keine DNMT1 Aktivität erfordert. In DNMT1 defizienten Maus-HSCs können nur noch myeloide Zellen gebildet werden, eine lymphoide Differenzierung ist nicht möglich (Broske,

Vockentanz et al. 2009). Die DNA-Methyltransferase1 ist dafür verantwortlich, bei der Zellteilung das Methylierungsmuster auf die Tochterzellen zu übertragen. Ist dies nicht möglich, kommt es zu einer Demethylierung der DNA. So ist die Lymphopoese Abhängig von einer Akquisition der Methylierung, wohingegen die Myelopoese von einer Hypomethylierung abhängt (Broske, Vockentanz et al. 2009). Durch den Verlust von DNMT1 kommt es sogar zu einer erhöhten Proliferation innerhalb der Stammzellpopulation und zu einer unverhältnismäßigen myeloiden Differenzierung (Trowbridge, Scott et al. 2006). Auch die DNA-Methyltransferasen 3a und 3b sind für die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen nicht essenziell (Tadokoro, Ema et al. 2007). Dies macht man sich auch in der Behandlung von myeloiden Erkrankungen zu nutze. Durch demethylierende Agenzien können in Erkrankungen wie zum Beispiel einer AML (akuten myeloiden Leukämie), kranke Vorläuferzellen zur Differenzierung gebracht werden. So sind sie zugänglicher für Chemotherapeutika und können besser bekämpft werden (Broske, Vockentanz et al. 2009; Gereige und Mikkola 2009).

In der Arbeit von Ji et al. wurde das Methylierungsmuster in murinen HSCs, verschiedenen Vorläufern und differenzierten Zellen mittels CHARM, comprehensive high-throughput array-based relative methylation, gemessen. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass eine myeloide Differenzierung keine DNMT1 Aktivität erfordert (Ji, Ehrlich et al. 2010).

Ebenso wurden einige Gene untersucht, deren Funktion und Expression in der Differenzierung bekannt ist. Wie das Gen der Myeloidperoxidase, *mpo*. Es konnte eine durchweg hohe Methylierung in Vorläufern und in lymphoiden Effektorzellen, wohingegen eine um 40-70% reduzierte Methylierung in Granulozyten/Macrophagen Vorläuferzellen gemessen wurde (Ji, Ehrlich et al. 2010). Dieses Gen, welches ein spezifisches Expressionsmuster für myeloide Zellen aufweist, hat eine wichtige mikrobizide Wirkung und wird erst im Laufe der Differenzierung synthetisiert (Koeffler, Ranyard et al. 1985). Hier wurde in CD34⁺ Zellen die Methylierung zweier CpG-Sites im Promotorbereich von *mpo* durch den Human Methylation Bead Chip²⁷ bestimmt. Sie liegt bei 81 bzw. 79%. In den differenzierten Zellen ist dagegen nur noch eine Methylierung von 38 bzw. 10% in Granulozyten und 44 und 10% in Monozyten zu detektieren. Diese Ergebnisse wurden durch die 454-

Pyrosequenzierung von Michael Bocker bestätigt, Abbildung 3-19, Seite 57 (Hellwig*, Bocker* et al. 2011).

Ein weiteres Gen, welches spezifisch in Granulozyten und Monozyten exprimiert wird, ist S100A8. Das Protein hat eine antimikrobielle Wirkung und ist so ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. (Hashimoto, Suzuki et al. 1999; Liu, Yuan et al. 2007). In dieser Arbeit wurde eine deutliche Demethylierung im Zuge Differenzierung im Promotorbereich des Gens *s100a8* gemessen. Es konnte mit dem Infinium Human Methylation Bead Chip 27 eine Abnahme der Methylierung von 65 bzw. 58% während der Spezialisierung zu Granulozyten und respektive 66 bzw. 49% im Laufe der Differenzierung zu Monozyten gemessen. Auch hier wurde eine 454 deep Pyrosequenzierung von Michael Bocker durchgeführt, Abbildung 3-19 auf Seite 57.

Die Differenzierung im hämatopoetischen System wird durch extrinsische Signale der Stammzellnische induziert (Ho 2005; Wagner, Horn et al. 2008). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die myeloide Differenzierung in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durch globale Demethylierung charakterisiert ist. Mit einigen Beispielen aus der Literatur konnten die Demethylierung mit einer erhöhten spezifischen Genexpression in Einklang gebracht werden.

4.1.2 DNA-Methylierung in CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen im Bezug auf Alterung und Leukämie

In einem weiteren Schritt soll nun das DNA-Methylierungsmuster der hämatopoetischen Vorläufer aus Nabelschnurblut mit denen aus mobilisiertem Peripherblut verglichen werden. Es wurden zwei verschiedene Altersgruppen von HPCs untersucht, sieben Proben aus Nabelschnurblut (0 Jahre) und fünf Proben aus mobilisiertem Peripherblut, mit einem durchschnittlichen Alter von 35 Jahren.

Vor diesem Hintergrund soll nun erforscht werden, ob die Unterschiede im Methylierungsmuster auf das Alter der Spender zurückzuführen sind. Natürlich kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass die Mobilisierung der Stammzellen mittels GCSF (siehe auch 2.1.2, Seite 16) einen Einfluss auf die Methylierung der „alten“ Stammzellen hat.

Die meisten funktionellen Untersuchungen zur Alterung von hämatopoetischen Stammzellen wurden in Mäusen durchgeführt. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Effektivität des Engraftments von Stammzellen aus älteren Mäusen nur noch 25% beträgt (Morrison, Wandycz et al. 1996). In alten Mäusen nimmt die Proliferation der HSCs deutlich zu, gleichzeitig kommt es zu einer allgemeinen Reduktion der hämatopoetischen Kompetenz (Ogawa, Kitagawa et al. 2000). Diese Abnahme des Stammzellpotentials wird auch durch eine erhöhte Expression von Differenzierungsgenen gezeigt (Wagner, Bork et al. 2009).

Als größtes demografisches Risiko für eine Krebserkrankung gilt das Alter. Interessanterweise steigt im Laufe des Alterungsprozesses das Risiko für myeloide Leukämien stärker, als für lymphoide Erkrankungen des hämatopoetischen Systems (Rossi, Bryder et al. 2005). Dies könnte durch die myeloide Restriktion erklärt werden. So nimmt die Zahl der myeloiden Effektorzellen im Alter deutlich zu (Morrison, Wandycz et al. 1996; Ogawa, Kitagawa et al. 2000; Linton und Dorshkind 2004; Rossi, Bryder et al. 2005; Roobrouck, Ulloa-Montoya et al. 2008; Beerman, Maloney et al. 2010). In Abbildung 4-1 von Beerman et al. ist ein Alterungsmodell von HSCs aus Mäusen dargestellt. Der Stammzellpool ist in alten Mäusen deutlich vergrößert, doch die Differenzierungskapazität nimmt ab, es kommt zu einer Verschiebung der Hämatopoese in Richtung myeloide Effektorzellen, wie Granulozyten und Monozyten. Es werden deutlich weniger lymphoide Vorläufer- und differenzierte Effektorzellen gebildet, es kommt zu einem geschwächten adaptiven Immunsystem.

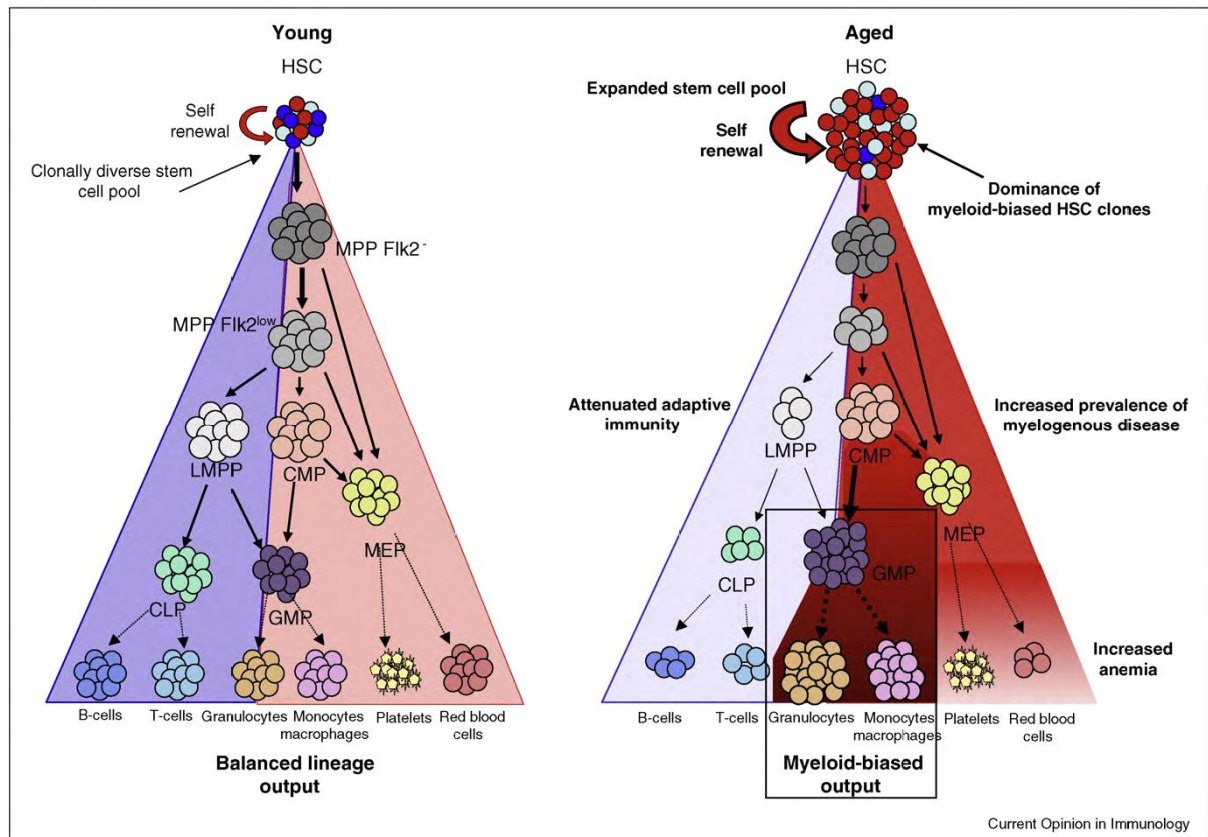


Abbildung 4-1 Alterungsmodell im hämatopoetischen System

Die Anzahl der proliferativen HSC nimmt im Alter deutlich zu. In dieser Zellpopulation liegen mehr myeloid-determinierte Stamm- und Vorläuferzellen vor. Es werden im Alter also weniger lymphoide Progenitoren gebildet, die Differenzierung verliert ihre ausgewogene Balance und es kommt zu einer Verschiebung in Richtung Granulozyten und Monozyten (Beerman, Maloney et al. 2010).

Es stellt sich nun die Frage ob diese Beobachtungen der Stammzellalterung sich auch im Methylierungsmuster der CD34⁺ Zellen widerspiegeln. Untersuchungen von altersabhängigen Methylierungsänderungen von Rakyan et al. und Teschendorff et al. zeigen eine Hypermethylierung in den Promotoren bestimmter Gene. Teschendorff et al. beschreiben 69 Polycomb Zielgene, welche geschlechts-, gewebs- und krankheitsunabhängig im Alter hypermethyliert werden (Teschendorff, Menon et al. 2010). Ebenso zeigen Rakyan et al. eine Hypermethylierung in 213 CpG Sites (Rakyan, Down et al. 2010). In unseren Untersuchungen ist tendenziell eher eine Demethylierung der CpG Sites im Alter zu beobachten. Nur 192 CpGs zeigen eine Zunahme der Methylierung um mindestens 15%, siehe auch Abbildung 3-7. Im Vergleich dieser Gene mit den von Rakyan und Teschendorff beschriebenen Hypermethylierungen zeigten sich jedoch keine Übereinstimmungen. Im Gegensatz zur Literatur wurden in dieser Arbeit Stamm- und Vorläuferzellen untersucht und

nicht differenzierte Effektorzellen. Hier liegt wahrscheinlich eine Erklärung für die unterschiedlichen Beobachtungen.

Um die myeloide Restriktion der Alterung mit der Methylierung in Zusammenhang zu bringen, wurden die Methylierungsveränderungen der Differenzierung mit den Unterschieden in CB und mPB HSCs verglichen. Da die myeloide Differenzierung mit einer globalen Demethylierung einhergeht, wurden für diese Gegenüberstellung die 350 CpGs der CD34⁺ Zellen, welche eine eventuelle altersbedingte Demethylierung aufweisen, herangezogen. In Abbildung 4-2 sind die Ergebnisse in einem VennDiagramm zusammengefasst. Es wurden 77 Übereinstimmungen, also 22%, in den CD34⁺ Zellen und der Differenzierung zu Granulozyten gefunden. Bei der Monozytenbildung liegt eine Deckung von 78 Genen, ebenfalls 22% vor. Zusammenfassend kann man also sagen, dass ein Viertel aller im Altersprozess demethylierten Gene ebenfalls bei der myeloiden Differenzierung demethyliert, also aktiviert werden. Eine Liste der 63 Gene, welche eine Übereinstimmung in Alterung und myeloider Differenzierung zeigen, befindet sich im Anhang. Funktionell konnte in den demethylierten Genen eine signifikante Akkumulation als Entzündungsantwort nachgewiesen werden, siehe auch Abbildung 3-11, auf Seite 50.

Abbildung 4-3 zeigt die Verteilung der altersbedingten Methylierungslevel der 63 übereinstimmenden CpG Dinukleotide aus Abbildung 4-2. Es ist deutlich zu sehen, diese Gene weisen zum größten Teil eine mittlere Methylierungsdifferenz von 20-30% auf. Hier wäre es durchaus sehr interessant diese Gene in einer weiteren Altersgruppe, evtl. über 60 Jahre, zu untersuchen. In älteren Vorläuferzellen würde man eine deutlichere Demethylierung dieser Gengruppe erwarten, somit könnte man einen kontinuierlichen Alterungsprozess aufzeigen. Da diese „alten“ Stammzellproben nicht einfach zu bekommen sind, konnte dies in dieser Arbeit leider nicht durchgeführt werden.

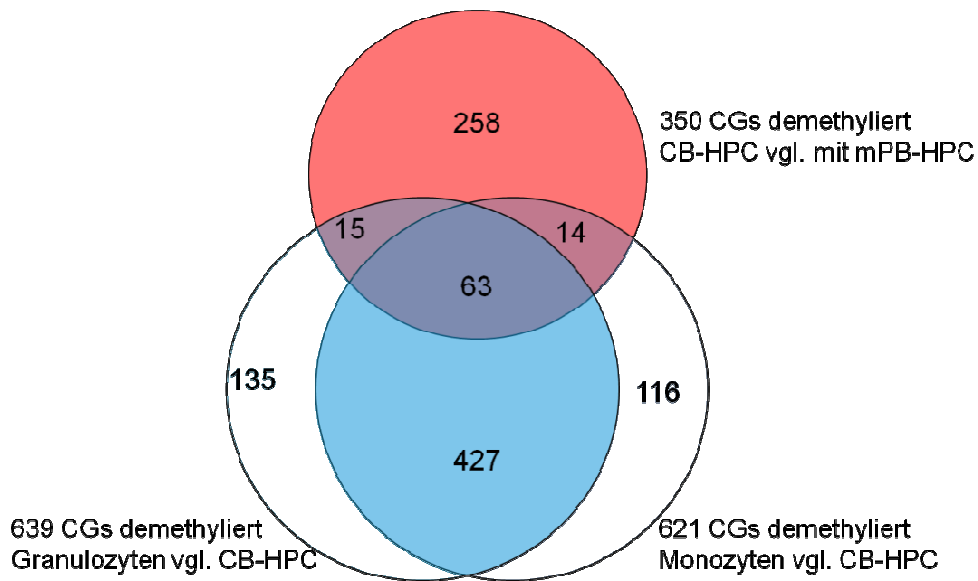


Abbildung 4-2 VennDiagramm der Demethylierung aus den Differenzierungsversuchen und den CD34⁺ Zellen

Im Vergleich zu CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut werden in Granulozyten 621 CpGs in Monozyten 639 und im mPB 350 CpGs um mindestens 15% demethyliert. Es zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung von 22% aller demethylierten CpGs aus mPB zu Granulozyten und 22% zu Monozyten. 63 CpGs, dies entspricht 18% der 350 mPB CpGs, stimmen in allen drei Gruppen überein, nach (Hellwig*, Bocker* et al. 2011).

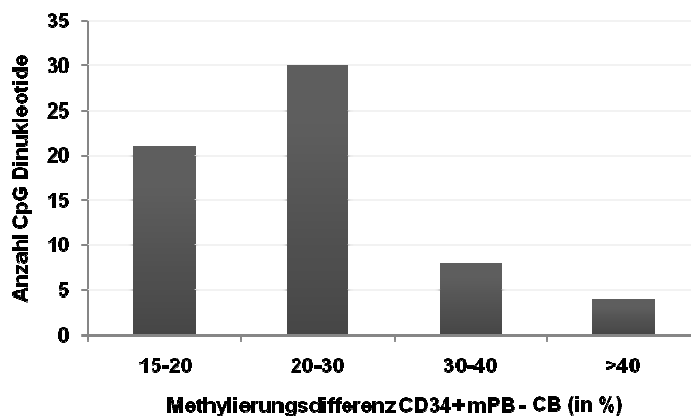


Abbildung 4-3 Anzahl der differenziell methylierten CpGs in Alterung und Differenzierung in Abhängigkeit der prozentualen Methylierungsdifferenz in der Alterung

Die altersabhängigen Differenzen der 63 CpG-Dinukleotide, welche übereinstimmen mit der myeloiden Differenzierung zeigen weisen zum größten Teil eine mittlere Differenz von 20-30% auf.

Socs-1 ein Mitglied der Familie der suppressor of cytokine signalling hemmt die Signaltransduktion über eine Vielzahl von Cytokinen, Interferonen, Wachstumshormonen etc. (Greenhalgh und Hilton 2001). Über Interleukine wie zum Beispiel IL-6, welches wichtig ist in der B-Zellentwicklung, spielt Socs-1 in der

Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten eine wichtige Rolle (Diehl, Anguita et al. 2000; Trop, De Sepulveda et al. 2001; Galm, Yoshikawa et al. 2003). Es konnte hier eine Hypermethylierung um 40% in einer CpG-Site von CB HPCs zu mPB HPCs gemessen werden. Dieses Ergebnis wird durch die 454 Pyrosequenzierung, von Michael Bocker, Abbildung 3-12 Seite 51, bestätigt werden. In dieser HeatMap sieht man eine deutliche Zunahme der Methylierung fast aller CpG-Dinukleotide. Durch eine erhöhte Methylierung kommt es zu einer reduzierten Expression des Gens (Wu, Yao et al. 2006). Eine weitere Funktion hat SOCS-1 in der Tumorsuppression. Eine Methylierung von *socs-1* ist korreliert mit Hochrisikosubtypen im Myelodysplastischen Syndrom (Wu, Yao et al. 2006).

Es gibt nun zwei mögliche Schlussfolgerungen der Ergebnisse. Die myeloide Restriktion der hämatopoetischen Stammzelldifferenzierung im Alter unterstützt die Methylierung von *socs-1* und die dadurch verbundene Störung in der Lymphopoese. Eine andere mögliche Aussage wäre das gesteigerte Risiko der Krebserkrankung im Alter durch die methylierungsspezifische Repression des Tumorsuppressors *socs-1*.

Diese Übereinstimmungen mit der Differenzierung und die funktionellen Analysen vor dem Hintergrund der myeloiden Restriktion deuten darauf hin, dass hier tatsächlich Alterung beobachtet werden konnte. Diese ging einher mit einer Veränderung im Methylierungsmuster der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Um einen kontinuierlichen Alterungsprozess zu bestätigen ist es hier eindeutig noch wichtig mindestens eine weitere Altersgruppe zu analysieren. Dies konnte aufgrund fehlender Spenderproben über 60 Jahre bis jetzt noch nicht durchgeführt werden. Ebenfalls konnte nicht geklärt werden, ob die Demethylierung eine Folge oder eine Ursache für die Alterung ist (Rakyan, Down et al. 2010; Teschendorff, Menon et al. 2010).

4.1.3 CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen in der klinischen Anwendung

Hämatopoetische Stammzellen sind von großer Bedeutung in der Medizin. Sie werden bei der Therapie vieler maligner und nicht maligner Krankheiten eingesetzt, welche einen Defekt in Blutzellen aufweisen.

Bis in die 1990er diente Knochenmark als einzige Quelle für hämatopoetische Stammzellen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung mit G-CSF eine Mobilisierung der Stammzellen erzielt wird, so ist es möglich HSCs aus peripherem Blut einfach und schmerzfrei durch eine Leukapherese zu gewinnen und zu isolieren (Craig, Anthony et al. 1993; McNiece, Briddell et al. 1993; Petit, Szyper-Kravitz et al. 2002)..

Im Knochenmark befinden sich die Stammzellen in einer spezialisierten Nische. Durch die Zellen der Mikroumgebung wird die Balance der Selbsterneuerung und der Differenzierung von HSCs gesteuert (Wilson und Trumpp 2006; Wagner, Horn et al. 2008). Bei der Mobilisierung durch G-CSF werden Proteasen aktiviert, welche Adhäsionsmolekülbindungen auflösen (Lapidot und Petit 2002; Flomenberg, Devine et al. 2005). Auch Bindungen zwischen Chemokinen und ihren Rezeptoren, wie zum Beispiel SDF-1 und dem Rezeptor CXCR4, werden gestört. Durch die Gabe von G-CSF nimmt die Konzentration des Chemokins SDF-1 im Knochenmark ab. Der für die chemotaktische Bewegung von sehr bedeutsame Faktor kann so die Stammzellen nicht mehr in ihrer Nische halten und spielt so neben weiteren Effekten eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen (Aiuti, Webb et al. 1997; Petit, Szyper-Kravitz et al. 2002).

Eine weitere immer beachtlichere Quelle für HSCs sind Nabelschnurblutproben. Die erste Transplantation fand schon im Jahr 1989 statt (Gluckman, Broxmeyer et al. 1989). Bis heute wurden über 20.000 Nabelschnurblutstammzelltransplantationen durchgeführt. Der große Vorteil hier liegt in der Möglichkeit des sofortigen Zugriffs durch Nabelschnurblutbanken, in denen Proben gesammelt und für eventuelle Transplantationen kryokonserviert werden können.

Es werden also HSCs aus drei verschiedenen Quellen in der Klinik eingesetzt. Es gibt viele Studien zu Vor- und Nachteilen der einzelnen Zellen. So liegt der größte

Vorteil von Stammzellen aus Nabelschnurblut neben der guten Zugriffsmöglichkeit und den nahezu endlosen Ressourcen in einer deutlich geringeren Graft versus Host disease (GVHD). Dies kann durch eine deutlich reduzierte Reaktivität der Immunzellen im Nabelschnurblut erklärt werden. Nachteile sind eine deutlich geringere Anzahl hämatopoetischer Stammzellen in der Probe eines Spenders und ein verlangsamtes Engraftment (Gluckman, Rocha et al. 2004; Broxmeyer 2010; Rocha und Broxmeyer 2010).

Es gibt kaum Untersuchungen, bzw. Erklärungen für diese Unterschiede. So wird zum Beispiel der Einfluss von G-CSF auf die GVHD-Reaktion in der Literatur kontrovers diskutiert. Es gibt sowohl Studien die eine verstärkte Reaktion nach Behandlung mit G-CSF beschreiben (Ringden, Remberger et al. 2006), doch ebenso konnte eine verminderte GVHD gezeigt werden (Ho, Mirza et al. 2003; Khoury, Loberiza et al. 2006).

Es liegt also nahe, Vergleiche zwischen G-CSF mobilisierten HPCs und Nabelschnurblut zu erstellen. In dieser Arbeit wurden nun die Methylierungsmuster CD34⁺ Zellen aus CB und mPB untersucht. Die Gene des Histokompatibilitätskomplexes, das humane Leukozytenantigen-Systems (HLA-System) spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer GVHD (Gratwohl, Brand et al. 2005). Von den 26 auf dem Array getesteten HLA-Genen, zeigen lediglich drei eine Methylierungsdifferenz von mehr als 15%. Die Gene HLA-DMA; HLA-DRA und HLA-DPA1 liegen im mPB um 18, 19 und 27% weniger methyliert vor, als im Nabelschnurblut, siehe auch Tabelle 9.

Tabelle 9 Methylierungslevel der CD34⁺ Zellen aller HLA-Gene

SYMBOL	CHR	ACCESSION	5 cd34_young vs old.beta	5.p.BH	cd34_young.beta	cd34_old.beta
HLA-B		6NM_005514	-0,02	0,00	0,02	0,04
HLA-DMA		6NM_006120	-0,01	0,00	0,02	0,03
HLA-DRA		6NM_019111	0,01	0,00	0,05	0,04
HLA-DMB		6NM_002118	0,01	0,00	0,05	0,04
HLA-E		6NM_005516	0,02	0,00	0,07	0,05
HLA-DOB		6NM_002120	0,02	0,00	0,77	0,75
HLA-A		6NM_002116	0,02	0,00	0,06	0,04
HLA-DPB1		6NM_002121	0,05	0,00	0,10	0,06
HLA-DMB		6NM_002118	0,06	0,00	0,09	0,03
HLA-DOB		6NM_002120	0,08	0,00	0,86	0,78
HLA-A		6NM_002116	0,09	0,00	0,51	0,42
HLA-DPB1		6NM_002121	0,14	0,00	0,21	0,07
HLA-DMA		6NM_006120	0,18	0,00	0,24	0,06
HLA-DRA		6NM_019111	0,19	0,00	0,62	0,43
HLA-DPA1		6NM_033554	0,27	0,00	0,47	0,20

Sowohl in den CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut als auch im mobilisierten Peripherblut zeigen im Median eine sehr schwache Methylierung von 5%.

Zusammenfassend kann man sagen, da die Unterschiede im Methylierungsmuster des Histokompatibilitätskomplex sehr gering sind, ist eine Erklärung der Unterschiede in der Stammzelltransplantation aus Nabelschnurblut und mobilisiertem Peripherblut nicht im Methylierungsmuster der HSCs zu finden.

4.2 Homeobox Transkriptionsfaktoren *hoxA9*

Die Familie der homeobox-Transkriptionsfaktoren ist hochkonserviert (siehe Einleitung) und spielt während der frühen Embryogenese eine wichtige Rolle. Doch auch im adulten Organismus wird ihnen im hämatopoetischen System eine bedeutende Funktion zugesprochen.

4.2.1 Expression und Funktion von *hoxA9*

Der homeobox Transkriptionsfaktor ist für eine funktionierende, komplette Hämatopoese essentiell (Sauvageau, Lansdorp et al. 1994; Lawrence, Helgason et al. 1997; Magli, Largman et al. 1997; Pineault, Helgason et al. 2002; Thorsteinsdottir, Mamo et al. 2002; Ferrell, Dorsam et al. 2005).

Zunächst wurde die Expression von *hoxA9* in leukämische Zelllinien untersucht. Nur die CD34⁺ Zelllinie KG1A zeigt eine signifikant erhöhte Expression von *hoxA9* im Vergleich zu den Zelllinien K562, HL60 und Kasumi (Abbildung 3-20). Im primären Zellmaterial aus Nabelschnurblut, Knochenmark und mobilisiertem Peripherblut wurde die relative Expression im hämatopoetischen Vorläuferzellkompartiment per semiquantitativer real-time PCR gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression in den CD34⁺ CD38⁻ Nabelschnurblut-HSCs am höchsten ist. In den CD34⁺ Vorläufern zeigt die Expression im Nabelschnurblut eine erhöhte Expression im Vergleich zum Knochenmark.

Durch die Versuche der CFSE-Färbung, in der die einzelne Zellkompartimente mit der Anzahl der Teilungen sortiert werden können, kann der Verlauf der Differenzierung von Vorläuferzellen verfolgt werden. Es konnte eine kontinuierliche und signifikante Abnahme der *hoxA9* Expression beobachtet werden. Da es sich aber hier um keine definierte Zellpopulation handelt wurden ebenfalls noch differenzierte myeloide (Granulozyten und Monozyten) und lymphoide (T- und B-Zellen) analysiert, es konnte kein *hoxA9* detektiert werden (Abbildung 3-23). Lawrence et al. analysierten einzelne Zellpopulationen aus dem Knochenmark von Mäusen und sie konnten ebenfalls zeigen, dass die *hoxA9* Expression runterreguliert wird, sobald Zellen das CD34⁺ Kompartiment verlassen, sie also Differenzieren (Lawrence, Helgason et al. 1997).

hoxA9 $-/-$ defiziente Mäuse zeigen eine Reduktion der Gesamtzahl aller Leukozyten und Lymphozyten um 30-40% (Lawrence, Helgason et al. 1997). Defekte sind sowohl in der myeloiden als auch in der lymphoiden Differenzierung zu entdecken (Ferrell, Dorsam et al. 2005). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung aller *hox*-Gene zu einer signifikanten Verminderung koloniebildender Zellen, sogenannter CFCs, führt. Doch durch die Reaktivierung des einzelnen *hoxA9* kann die hämatopoetische Koloniefrequenz „gerettet“ werden (Ernst, Mabon et al. 2004). In unseren Kolonieversuchen, wurden humanen CD34⁺ Nabelschnurblutzellen mit *hoxA9*-siRNA transduziert. So kommt es zu einer signifikanten Hemmung der Gesamtkoloniebildung. Dies entspricht den oben genannten Ergebnissen von Lawrence et al. Eine weitere hier gemachte Beobachtung, ist die Reduktion der Stammzellpopulation, der CD34 Expression nach Hemmung von *hoxA9* um 6% nach 72 Stunden und 11% nach 96 Stunden. Dies spricht weniger für eine ausschließliche Funktion in der hämatopoetischen Differenzierung als auch für den Selbsterhalt in HSCs. So sind *hoxA9* und *hoxA10* beispielsweise positive Regulatoren einzelner Gene des Wnt-Signalwegs, Wnt10B und die Rezeptoren Frizzled 1 und Frizzled 5, ein wichtiger Signalweg für die Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen (Ferrell, Dorsam et al. 2005).

Eine weitere Funktion von *hoxA9* wird in der Leukemogenese vermutet. So führt eine Überexpression von *hoxA9* im Mausknorpelmark zur Entwicklung einer AML (Thorsteinsdottir, Mamo et al.). Andreef et al. zeigen im humanen System einen deutlichen Zusammenhang der Deregulation von *hoxA9* und einer leukämischen Erkrankung. Es gibt akute myeloide Leukämien, welche eine Hochregulation von *hoxA9*, aber auch Erkrankungen, welche eine Repression von *hoxA9* aufweisen. Doch ist das *hoxA9*-Level umgekehrt korreliert mit dem Überleben und der Therapieantwort (Andreef, Ruvolo et al. 2008). Man kann *hoxA9* als prognostischen Marker für Akute myeloide Leukämien heranziehen (Golub, Slonim et al. 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass *hoxA9* eine wichtige regulierende Funktion im hämatopoetischen System hat, welche sowohl für die Differenzierung, als auch für den Selbsterhalt der hämatopoetischen Stammzellen wichtig ist. Doch ist es ein diffiziles Regulationssystem, welches durch Störungen auch schnell zu einer leukämischen Erkrankung führen kann.

4.2.2 Regulation von *hoxA9*

Darüberhinaus interessierte die Regulation von *hoxA9*. In der Literatur wird unter anderem eine Regulation der *hoxA9* Expression durch DNA-Methylierung erwähnt. In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass in der leukämischen Zelllinie HL60 die Promotorregion hypermethyliert vorliegt. Durch die Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin wird die Methylierung (Abbildung 3-35 und Abbildung 3-37) im Promotorbereich von *hoxA9* reduziert. Die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung sind hier nicht so eindeutig, doch kann durch eine medikamentös induzierte Demethylierung eine hochsignifikante Reaktivierung der Expression erzielt werden, Abbildung 3-34.

Das Gen *ml* (mixed lineage leukemia) ist ein positiver Regulator für *hoxA9*. Durch eine Störung in diesem System, kann es zu einer Leukämie kommen (Daser und Rabbits 2004; Ernst, Mabon et al. 2004). Eine Hypomethylierung kann in MLL-abhängigen Leukämien detektiert werden (Erfurth, Popovic et al. 2008), aber auch in ovarialen Karzinomen kann eine Hypomethylierung von *hoxA9* detektiert werden (Wu, Lothe et al. 2007). MLL ein CpG-bindende Protein kann ein Cluster im Promotorbereich von *hoxA9* binden und dadurch das Gen vor Hypermethylierung schützen (Erfurth, Popovic et al. 2008). In leukämischen Zellen wird *hoxA9* durch Methylierung reguliert, was zeigt, dass nicht nur Tumorsuppressorgene in einer Carcinogenese hypermethyliert werden. Ebenso werden schwache Onkogene wie das hier untersuchte *hoxA9*, innerhalb einer Erkrankung methyliert.

Die methylierungsabhängige Regulation von *hoxA9* konnte in primärem Zellmaterial nicht eindeutig geklärt werden. Hier wurde mittels methylierungsspezifischer PCR und Bisulfit-Sequenzierung die Methylierung in gesunden hämatopoetischen Vorläufern und differenzierten Zellen gemessen.

Auf dem Human Methylation Bead Chip²⁷ wurden sechs CpG-Dinukleotide im Promotorbereich von *hoxA9* auf Methylierung untersucht. Es konnte hier keine signifikanten Unterschiede sowohl in der Differenzierung als auch im Unterschied zwischen Nabelschnurblut und mobilisiertem Peripherblut gefunden werden. Es wurden hier noch weitere Analysen im Promotorbereich durchgeführt. Es wurden mittels methylierungsspezifische PCRs und Bisulfitsequenzierungen weitere CpG-Sites auf ihr Methylierungslevel hin untersucht. Nur zwei der auf dem Chip

analysierten CpGs liegen in dem Bereich der Bisulfitssequenzierung und der MSP-PCR. Die CpG-Sites 8 und 24 der Bisulfitssequenzierung wurde auf dem Array untersucht Abbildung 4-4.

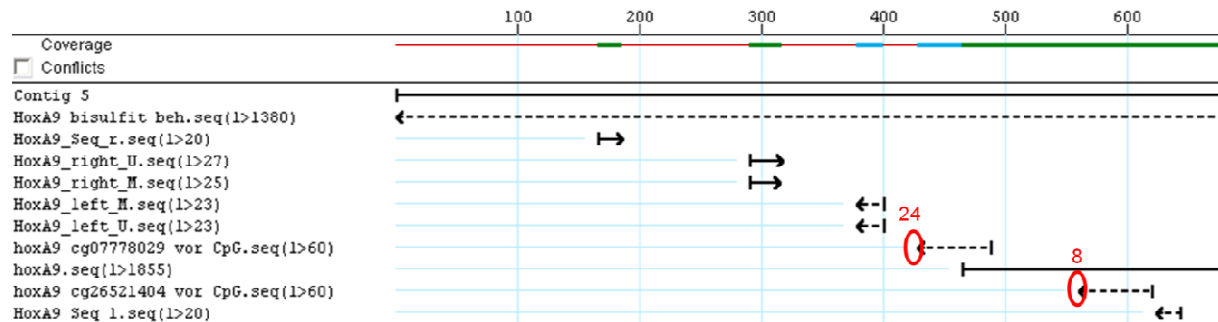


Abbildung 4-4 relative Lage der Primer und Infinium CpG-Sites

Dargestellt sind der Transkriptionsstartpunkt von *hoxA9*; die relative Lage der Primer und der auf dem Illumina Chip untersuchten CpG-Dinukleotide.

Die Ergebnisse der MSP-PCRs zeigen eine leichte Methylierung in CD34⁺-Zellen im Knochenmark (Abbildung 3-33, Seite 72). Bei der Bisulfitssequenzierung in CD34⁺-Zellen ist im Knochenmark und dem mobilisierten Peripherblut im Vergleich zum Nabelschnurblut zwar eine marginale, wenn auch signifikante Erhöhung im Bereich der ersten CpG-Dinukleotide zu sehen (Seite 76 und 77). Es ist also fraglich, ob diese Veränderungen reichen, eine Expressionsdifferenz hervorzurufen.

Bei der Betrachtung der Differenzierung konnte ebenfalls keine Veränderung in der Methylierung beobachtet werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Polycomb-target *hoxA9* im gesunden hämatopoetischen System höchstwahrscheinlich nicht durch DNA-Methylierung reguliert wird.

4.2.2.1 Notch signalling

Der hochkonservierte Delta-Jagged-Notch Signalweg ist eine wichtige Möglichkeit der Zell-Zellkommunikation in multizellulären Organismen. Er ist Teil der Regulation Proliferation, Differenzierung, Entwicklung und Apoptose (Allegrucci, Wu et al. 2007). Der Ablauf einer Signalübertragung ist in Abbildung 4-5 dargestellt. Es sind insgesamt vier Liganden; Delta1, Delta3, Jagged1 und Jagged; und drei Notch Rezeptoren bekannt. Nach der Ligandenbindung kommt es zu einer Spaltung und der intrazelluläre Teil des Transmembranrezeptors gibt ein Signal weiter, welches die Expression bestimmter Zielgene reguliert.

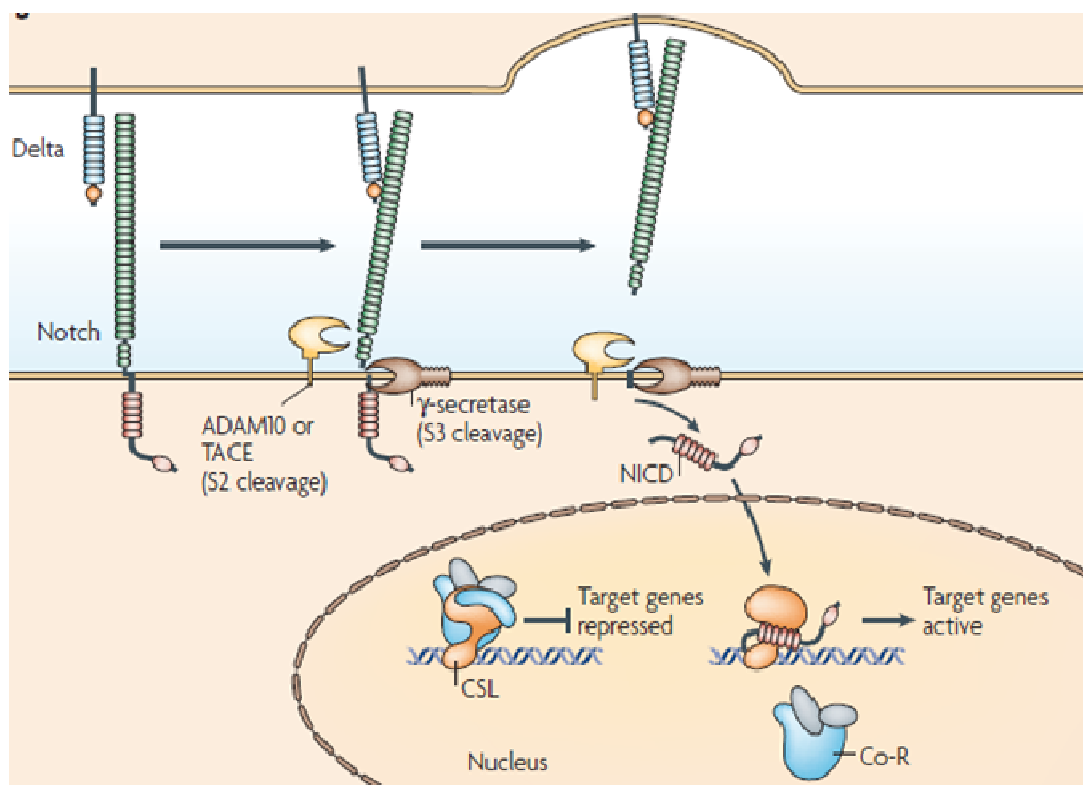


Abbildung 4-5 schematische Darstellung des Notch-Signalwegs

Nach Bindung an den Liganden kommt es zur Abspaltung des intrazellulären Rezeptorteils, welcher in den Zellkern wandert und dort die Transkription bestimmter Zielgene reguliert (Thurston, Noguer-Troise et al. 2007).

Dem Signalweg wird auch eine bedeutende Rolle in der frühen Hämatopoese zugesprochen. So finden sich in allen hämatopoetischen Vorläufern und zum Teil in differenzierten Zellen Notch Rezeptoren (Walker, Lynch et al. 1999). Ebenso konnte der Ligand Jagged1 in Stromazellen des humanen und murinen Knochenmarks

identifiziert werden (Jones, May et al. 1998; Li, Milner et al. 1998; Varnum-Finney, Purton et al. 1998; Walker, Lynch et al. 1999).

Wir konnten in dieser Arbeit eine Reduktion der CD34⁺ Population nach 72h Inkubation mit rekombinantem Jagged1 nachweisen. Auch eine signifikante Reduktion der *hoxA9* Expression wurde mit Jagged1 Behandlung gemessen. Ein weiterer Beleg für die Abnahme der hämatopoetischen Progenitoren zeigt sich in der Koloniebildung. Eine signifikante Abnahme der Kolonienzahl um 27% konnte gemessen werden. Eine Jagged1 Notch Interaktion führt zu einer Veränderung im Selbsterhalt und der Differenzierungskapazität. Das hier in dieser Arbeit verwendete Medium Stemline II induziert eine starke Proliferation und soll so die Stammzellpopulation vergrößern. Walker et al. konnten zeigen, dass in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wie G-CSF oder SCF die Stammzellerhaltende Protektion von CD34⁺ Zellen durch Jagged1-Notch überwunden wird (Walker, Lynch et al. 1999). Hier konnte sogar eine begünstigende Funktion nachgewiesen werden. Jagged-Notch kann also in verschiedenen Stadien der Hämatopoese eine regulierende Wirkung haben und hat eine regulierende Funktion in Expression von *hoxA9*. Hier konnte eine signifikante Hemmung des Transkriptionsfaktors detektiert werden. Durch die große zeitliche Spanne von 72 Stunden bis signifikante Ergebnisse erzielt werden können, ist nicht klar wie direkt der Einfluss des Notch-Signalwegs auf die *hoxA9* Expression ist. Hier müssen noch weitere Versuche klären, wie diese Regulation stattfindet.

5. Anhang

Sonden für die semiquantitative real time RT-PCR-PCR

Für diese Reaktion wurden sogenannte TaqMan Sonden eingesetzt. Alle Sonden für die wurden von der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, USA) bezogen.

Primersonde	Genname nach NCBI	Symbol
Hs99999903_m1	actin, beta	ACTB
Hs00365956_m1	homeo box A9	HOXA9
Hs00266705_g1	glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH

verwendete *hoxA9* Primer

für die MSP-PCR wurden jeweils zwei forward und zwei reverse Primer gewählt. Ein Primerpaar für die methylierte CpG-Site eines für die unmethylierte.

Des Weiteren sind die Primer für die Sequenzierungsreaktion aufgeführt.

Alle Primer sind in 5´-3´Richtung aufgelistet.

Name	Sequenz	Schmelztemperatur (T _m ; °C)
hoxA9 right M	cgcgttattattctactaaacgaac	60,9
hoxA9 left U	gtaataatttggtggtattgggg	59,2
hoxA9 left M	gtaataatttggtggtatcgggg	60,9
hoxA9 right U	cacattattattctactaaacaaacac	59.2
hoxA9 seq _r	ccccacaattaaaacaaacc	54,3
hoxA9 seq _l	gttttggttggaagtgta	52,3

Tabelle 10 Ergebnisse der Bisulfitsequenzierungen in der Zelllinie HL60 behandelt und unbehandelt

	Sequenzierungsansätze HL60 Zellen unbehandelt						Sequenzierungsansätze HL60 Zellen mit 5- Aza-2'deoxyctidin (DEC) behandelt					
CpG Insel	1HL60 hox_l1	1HL60 hox_r2	2HL60 hox_l1	2HL60 hox_r	3HL60 hox_l1	3HL60 hox_r	3HL60 DEC hox_l1	3HL60 DEC hox_r	1HL60 DEC hox_l1	1HL60 DEC hox_r2	2HL60 DEC hox_l1	2HL60 DEC hox_r
1	n.a.	97	n.a.	97	n.a.	97	n.a.	95	n.a.	95	n.a.	98
2	n.a.	96	n.a.	94	n.a.	96	n.a.	91	n.a.	93	n.a.	97
3	n.a.	96	n.a.	95	n.a.	95	n.a.	92	n.a.	87	n.a.	93
4	n.a.	94	n.a.	93	n.a.	96	n.a.	100	n.a.	100	n.a.	99
5	n.a.	97	n.a.	94	n.a.	95	n.a.	92	n.a.	91	n.a.	95
6	n.a.	98	n.a.	96	n.a.	97	n.a.	98	n.a.	97	n.a.	96
7	n.a.	96	n.a.	94	n.a.	95	n.a.	90	n.a.	98	n.a.	95
8	n.a.	95	n.a.	94	n.a.	94	n.a.	83	n.a.	74	n.a.	79
9	n.a.	96	n.a.	93	n.a.	95	n.a.	99	n.a.	99	n.a.	96
10	n.a.	98	n.a.	97	n.a.	98	n.a.	99	n.a.	99	n.a.	97
11	n.a.	98	n.a.	97	n.a.	97	n.a.	99	n.a.	99	n.a.	97
12	99	96	n.a.	95	n.a.	96	n.a.	88	n.a.	81	n.a.	82
13	95	96	n.a.	95	n.a.	96	n.a.	93	n.a.	84	n.a.	87
14	94	96	n.a.	93	n.a.	95	n.a.	99	n.a.	98	n.a.	96
15	98	97	n.a.	94	n.a.	95	n.a.	91	n.a.	97	n.a.	95
16	90	97	n.a.	95	n.a.	97	n.a.	98	n.a.	99	n.a.	97
17	98	97	n.a.	94	n.a.	95	n.a.	94	n.a.	97	n.a.	96
18	98	97	n.a.	96	n.a.	98	n.a.	98	81	94	n.a.	96
19	99	98	99	97	98	96	99	97	98	99	99	99
20	97	97	96	96	94	97	93	98	86	97	94	99
21	98	99	98	96	98	97	98	96	97	97	97	98
22	96	95	97	96	97	97	98	94	95	95	91	99
23	98	97	96	95	97	96	95	90	96	96	95	98
24	96	98	96	97	94	97	89	96	89	98	95	99
25	94	96	95	97	93	96	88	88	86	88	88	90
26	96	98	98	95	97	96	92	93	90	96	90	93
27	99	97	96	95	93	96	89	99	96	99	93	98
28	97	99	98	97	98	97	95	98	92	99	95	99
29	97	97	99	95	97	97	97	100	89	100	100	98
30	99	100	97	96	97	97	94	90	95	88	92	89
31	99	97	99	97	98	97	98	100	89	100	96	99
32	94	91	98	n.a.	97	n.a.	94	n.a.	79	n.a.	96	n.a.
33	98	94	97	n.a.	95	n.a.	96	n.a.	74	n.a.	98	n.a.
34	99	100	99	n.a.	98	n.a.	96	n.a.	94	n.a.	99	n.a.
35	94	98	96	n.a.	97	n.a.	95	n.a.	88	n.a.	93	n.a.
36	95	97	97	n.a.	98	n.a.	96	n.a.	74	n.a.	98	n.a.
37	94	95	98	n.a.	98	n.a.	91	n.a.	82	n.a.	95	n.a.
38	93	97	94	n.a.	94	n.a.	89	n.a.	62	n.a.	98	n.a.
39	95	n.a.	96	n.a.	96	n.a.	88	n.a.	74	n.a.	93	n.a.
40	94	n.a.	93	n.a.	94	n.a.	84	n.a.	85	n.a.	90	n.a.
41	95	n.a.	95	n.a.	98	n.a.	94	n.a.	64	n.a.	98	n.a.
42	90	n.a.	89	n.a.	90	n.a.	91	n.a.	64	n.a.	94	n.a.
Mean	96,1	96,8	96,5	95,3	96,1	96,2	93,3	94,8	84,8	94,6	94,9	95,1
Median	96	97	97	95	97	96	94	96	88	97	95	97

Tabelle 11 Ergebnisse der Bisulfitssequenzierung von HPCs aus CB, BM und mPB und differenzierten Zellen

CpG-Site	cb	bm	mpb	Granulo- zyten	Mono- zyten	B-Zellen	T-Zellen
1	3,75	4,00	7,00	7,50	4,00	3,67	3,33
2	4,25	7,00	5,33	5,00	5,00	4,67	6,00
3	3,50	4,50	7,33	3,50	3,00	4,67	4,67
4	3,25	4,00	5,33	5,00	6,00	5,00	5,33
5	3,25	4,00	4,67	5,00	3,00	4,00	3,67
6	3,25	5,50	5,67	4,50	4,50	2,67	4,00
7	3,30	3,75	3,33	6,50	3,00	3,67	4,67
8	2,55	2,00	2,50	4,50	3,00	4,00	3,67
9	3,00	3,25	4,00	4,50	3,00	2,67	3,67
10	2,64	2,50	3,50	5,00	6,50	3,33	3,67
11	3,18	2,50	3,17	6,00	5,00	5,00	4,33
12	2,18	3,50	2,67	7,50	5,50	3,67	5,00
13	3,09	2,75	3,00	4,50	3,00	2,67	5,33
14	2,82	2,00	2,33	5,00	5,50	3,00	2,67
15	2,45	2,00	3,17	4,50	3,00	3,33	3,67
16	2,82	3,00	2,83	3,50	3,50	4,67	3,00
17	3,27	2,50	3,67	4,00	4,50	4,33	3,67
18	2,73	3,25	2,67	5,00	6,00	5,00	6,33
19	2,13	3,25	2,67	3,50	3,00	2,67	4,17
20	3,06	2,00	3,17	4,25	3,50	2,83	3,00
21	2,38	3,00	2,83	2,25	2,75	3,50	2,67
22	2,38	2,25	3,00	2,00	2,25	4,17	3,00
23	2,63	2,25	2,83	3,25	4,00	2,50	2,50

CpG-Site	cb	bm	mpb	Granulo- zyten	Mono- zyten	B-Zellen	T-Zellen
24	2,69	2,25	4,17	3,00	3,25	2,83	2,83
25	2,38	2,25	2,67	5,25	3,75	4,67	3,67
26	2,69	3,25	3,50	6,50	4,00	2,67	3,83
27	2,81	2,75	4,00	3,75	3,00	2,67	4,33
28	1,38	2,75	2,00	2,50	2,50	1,67	1,33
29	2,56	2,50	4,33	2,00	1,50	2,17	2,00
30	1,56	2,75	2,33	2,00	3,25	1,83	2,67
31	1,50	3,50	3,17	2,75	2,25	3,17	2,83
32	1,45	5,00	2,83	0,50	1,50	2,00	1,00
33	1,27	1,00	3,50	0,50	0,50	0,33	1,33
34	1,36	2,25	3,67	1,50	2,00	0,67	0,67
35	1,73	2,50	3,17	1,00	0,00	0,67	1,33
36	2,09	4,00	3,17	2,00	1,50	1,00	1,00
37	0,82	1,67	2,67	0,00	0,00	1,00	2,00
38	1,00	2,33	2,67	1,50	2,00	0,67	0,33
39	1,64	1,67	2,83	2,50	3,00	1,33	0,33
40	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	0,67	2,67
41	0,63	0,50	1,33	1,00	1,00	2,00	1,00
42	1,00	1,00	0,67	0,50	1,00	2,00	1,00

Tabelle 12 Liste und die Methylierungslevel der 63 Gene, welche in Alterung und Differenzierung eine Demethylierung von mind 15% aufweisen

SYMBOL	CHR	ACCESSION	TargetID	CB CD34	MPB CD34	Monozyten	Granulozyten
KIAA0020	9	NM_014878	cg24471894	0,61	0,13	0,28	0,26
IFI44L	1	NM_006820	cg17980508	0,66	0,20	0,27	0,25
F2RL2	5	NM_004101	cg00415993	0,65	0,20	0,34	0,28
NFE2	12	NM_006163	cg09303642	0,57	0,14	0,11	0,12
PAQR4	16	NM_152341	cg02626929	0,59	0,20	0,39	0,40
NDUFS2	1	NM_004550	cg17166812	0,67	0,30	0,44	0,25
MARK2	11	NM_017490	cg06204948	0,49	0,14	0,16	0,10
PDCD1LG2	9	NM_025239	cg07211259	0,64	0,31	0,08	0,15
FUT7	9	NM_004479	cg02679745	0,75	0,42	0,05	0,05
CAPS2	12	NM_032606	cg20291222	0,47	0,15	0,18	0,22
FLJ46365	8	NM_207504	cg25538571	0,80	0,49	0,59	0,58
F2RL2	5	NM_004101	cg08241785	0,42	0,11	0,09	0,16
MGP	12	NM_000900	cg00431549	0,41	0,12	0,14	0,22
BLOC1S2	10	NM_173809	cg26610808	0,53	0,24	0,19	0,29
KRT17	17	NM_000422	cg27236973	0,71	0,44	0,31	0,30
LTC4S	5	NM_145867	cg16361890	0,37	0,10	0,18	0,14
KYNU	2	NM_003937	cg06131859	0,68	0,42	0,32	0,44
C3orf18	3	NM_016210	cg23320649	0,78	0,51	0,57	0,63
SYNC1	1	NM_030786	cg17339202	0,42	0,16	0,05	0,07
TCN1	11	NM_001062	cg00187686	0,39	0,13	0,07	0,07
PARVG	22	NM_022141	cg26861460	0,68	0,42	0,34	0,18
C1orf164	1	NM_018150	cg21578207	0,45	0,20	0,12	0,11
MLLT11	1	NM_006818	cg18660898	0,42	0,17	0,13	0,19
NFE2	12	NM_006163	cg23140706	0,61	0,36	0,41	0,34
LOC133619	5	NM_130809	cg04431054	0,58	0,34	0,36	0,36
HSPBP1	19	NM_012267	cg17749456	0,54	0,29	0,04	0,05
LGP1	17	NM_032484	cg13053608	0,55	0,31	0,22	0,11
CDH5	16	NM_001795	cg22319147	0,86	0,62	0,39	0,56
CAMKK1	17	NM_032294	cg23668631	0,68	0,44	0,22	0,11
GLTP	12	NM_016433	cg06236061	0,34	0,11	0,13	0,09
C10orf91	10	NM_173541	cg22045288	0,51	0,27	0,10	0,08
CARD15	16	NM_022162	cg26954174	0,63	0,39	0,05	0,04
PCGF6	10	NM_032154	cg27217148	0,52	0,29	0,14	0,14

SYMBOL	CHR	ACCESSION	TargetID	CB CD34	mPB CD34	Monozyten	Granulozyten
SYNC1	1	NM_030786	cg05342835	0,57	0,35	0,39	0,36
S100A9	1	NM_002965	cg16139316	0,52	0,30	0,03	0,02
TMEM44	3	NM_138399	cg27033479	0,31	0,09	0,12	0,09
CTSW	11	NM_001335	cg03887787	0,53	0,32	0,23	0,20
ALDH3B1	11	NM_000694	cg07730301	0,73	0,51	0,09	0,08
FLJ32569	1	NM_152491	cg14893161	0,61	0,40	0,38	0,46
PITPNM2	12	NM_020845	cg06415153	0,47	0,27	0,29	0,28
SLC43A3	11	NM_017611	cg23547429	0,35	0,15	0,10	0,09
ECRG4	2	NM_032411	cg11024597	0,39	0,19	0,14	0,20
SLC6A12	12	NM_003044	cg20938359	0,57	0,37	0,25	0,32
SEPT9	17	NM_006640	cg04452095	0,68	0,48	0,43	0,39
SLC22A18	11	NM_183233	cg19906550	0,29	0,09	0,04	0,06
HK2	2	NM_000189	cg18638581	0,25	0,06	0,04	0,06
LPXN	11	NM_004811	cg20654468	0,47	0,28	0,04	0,04
OSM	22	NM_020530	cg14519350	0,26	0,07	0,02	0,02
EVA1	11	NM_005797	cg15376097	0,43	0,24	0,25	0,22
NALP12	19	NM_033297	cg07042144	0,50	0,32	0,27	0,26
PLCB2	15	NM_004573	cg02240622	0,43	0,25	0,16	0,12
SCNN1A	12	NM_001038	cg26215727	0,55	0,37	0,31	0,25
P2RY2	11	NM_002564	cg10287137	0,86	0,69	0,48	0,34
RGS18	1	NM_130782	cg24133080	0,45	0,27	0,14	0,11
SLAMF7	1	NM_021181	cg07837085	0,64	0,47	0,05	0,06
SLAMF6	1	NM_052931	cg10671066	0,51	0,34	0,21	0,18
IL1R2	2	NM_004633	cg17142183	0,34	0,17	0,05	0,03
CTAGE5	14	NM_203357	cg13277939	0,32	0,15	0,10	0,07
HOXA9	7	NM_152739	cg27009703	0,21	0,05	0,03	0,02
GAL3ST4	7	NM_024637	cg17518962	0,27	0,11	0,05	0,06
SLC22A18	11	NM_183233	cg21019522	0,22	0,07	0,03	0,03
IL1R2	2	NM_004633	cg20340242	0,41	0,26	0,04	0,06
LRP3	19	NM_002333	cg08700306	0,71	0,56	0,29	0,28

6. Literaturverzeichnis

- Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T. and Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." J Exp Med **185**(1): 111-120.
- Allegretti, C., Wu, Y. Z., Thurston, A., Denning, C. N., Priddle, H., Mummery, C. L., Ward-van Oostwaard, D., Andrews, P. W., Stojkovic, M., Smith, N., Parkin, T., Jones, M. E., Warren, G., Yu, L., Brena, R. M., Plass, C. and Young, L. E. (2007). "Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome." Hum Mol Genet **16**(10): 1253-1268.
- Alonso, L. and Fuchs, E. (2003). "Stem cells of the skin epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **100 Suppl 1**: 11830-11835.
- Andreef, M., Ruvo, V., Gadgil, S., Zeng, C., Coombes, K., Chen, W., Kornblau, S., Baron, A. E. and Drabkin, H. A. (2008). "HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML." Leukemia **22**(11): 2041-2047.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-776.
- Attwood, J. T., Yung, R. L. and Richardson, B. C. (2002). "DNA methylation and the regulation of gene transcription." Cell Mol Life Sci **59**(2): 241-257.
- Barba, P., Magli, M. C., Tiberio, C. and Cillo, C. (1993). "HOX gene expression in human cancers." Adv Exp Med Biol **348**: 45-57.
- Beck, R. C., Padival, M., Yeh, D., Ralston, J., Cooke, K. R. and Lowe, J. B. (2009). "The Notch ligands Jagged2, Delta1, and Delta4 induce differentiation and expansion of functional human NK cells from CD34(+) cord blood hematopoietic progenitor cells." Biol Blood Marrow Transplant **15**(9): 1026-1037.
- Beerman, I., Maloney, W. J., Weissmann, I. L. and Rossi, D. J. (2010). "Stem cells and the aging hematopoietic system." Curr Opin Immunol **22**(4): 500-506.
- Bibikova, M. and Fan, J. B. (2010). "Genome-wide DNA methylation profiling." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **2**(2): 210-223.
- Bibikova, M., Lin, Z., Zhou, L., Chudin, E., Garcia, E. W., Wu, B., Doucet, D., Thomas, N. J., Wang, Y., Vollmer, E., Goldmann, T., Seifart, C., Jiang, W., Barker, D. L., Chee, M. S., Floros, J. and Fan, J. B. (2006). "High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays." Genome Res **16**(3): 383-393.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.
- Bork, S., Horn, P., Castoldi, M., Hellwig, I., Ho, A. D. and Wagner, W. (2010). "Adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells is down-regulated by microRNA-369-5p and up-regulated by microRNA-371." J Cell Physiol.
- Britten, M. and Wright, N. A. (2004). "Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development." Gut **53**(6): 899-910.
- Broske, A. M., Vockentanz, L., Kharazi, S., Huska, M. R., Mancini, E., Scheller, M., Kuhl, C., Enns, A., Prinz, M., Jaenisch, R., Nerlov, C., Leutz, A., Andrade-Navarro, M. A., Jacobsen, S. E. and Rosenbauer, F. (2009). "DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloid restriction." Nat Genet **41**(11): 1207-1215.

- Broxmeyer, H. E. (2010). "Umbilical cord transplantation: epilogue." Semin Hematol **47**(1): 97-103.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Christman, J. K., Schneiderman, N. and Acs, G. (1985). "Formation of highly stable complexes between 5-azacytosine-substituted DNA and specific non-histone nuclear proteins. Implications for 5-azacytidine-mediated effects on DNA methylation and gene expression." J Biol Chem **260**(7): 4059-4068.
- Civin, C. I. and Gore, S. D. (1993). "Antigenic analysis of hematopoiesis: a review." J Hematother **2**(2): 137-144.
- Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F. and Shaper, J. H. (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." J Immunol **133**(1): 157-165.
- Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L. and Frommer, M. (1994). "High sensitivity mapping of methylated cytosines." Nucleic Acids Res **22**(15): 2990-2997.
- Cordle, J., Johnson, S., Tay, J. Z., Roversi, P., Wilkin, M. B., de Madrid, B. H., Shimizu, H., Jensen, S., Whiteman, P., Jin, B., Redfield, C., Baron, M., Lea, S. M. and Handford, P. A. (2008). "A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition." Nat Struct Mol Biol **15**(8): 849-857.
- Coulter, N. A., Jr. and Pappenheimer, J. R. (1949). "Development of turbulence in flowing blood." Am J Physiol **159**(2): 401-408.
- Craig, J. I., Anthony, R. S., Stewart, A., Thompson, E. B., Gillon, J. and Parker, A. C. (1993). "Peripheral blood stem cell mobilization using high-dose cyclophosphamide and G-CSF in pretreated patients with lymphoma." Br J Haematol **85**(1): 210-212.
- Creusot, F., Acs, G. and Christman, J. K. (1982). "Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine." J Biol Chem **257**(4): 2041-2048.
- Daser, A. and Rabbitts, T. H. (2004). "Extending the repertoire of the mixed lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis." Genes Dev **18**(9): 965-974.
- Davis, A. P., Witte, D. P., Hsieh-Li, H. M., Potter, S. S. and Capecchi, M. R. (1995). "Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*." Nature **375**(6534): 791-795.
- de Magalhaes, J. P. and Church, G. M. (2005). "Genomes optimize reproduction: aging as a consequence of the developmental program." Physiology (Bethesda) **20**: 252-259.
- Diehl, S., Anguita, J., Hoffmeyer, A., Zapton, T., Ihle, J. N., Fikrig, E. and Rincon, M. (2000). "Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1." Immunity **13**(6): 805-815.
- Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V. K., Attwood, J., Burger, M., Burton, J., Cox, T. V., Davies, R., Down, T. A., Haefliger, C., Horton, R., Howe, K., Jackson, D. K., Kunde, J., Koenig, C., Liddle, J., Niblett, D., Otto, T., Pettett, R., Seemann, S., Thompson, C., West, T., Rogers, J., Olek, A., Berlin, K. and Beck, S. (2006). "DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22." Nat Genet **38**(12): 1378-1385.
- Ehrlich, M. and Wang, R. Y. (1981). "5-Methylcytosine in eukaryotic DNA." Science **212**(4501): 1350-1357.

- English, D. and Andersen, B. R. (1974). "Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque." J Immunol Methods **5**(3): 249-252.
- Erfurth, F. E., Popovic, R., Grembecka, J., Cierpicki, T., Theisler, C., Xia, Z. B., Stuart, T., Diaz, M. O., Bushweller, J. H. and Zeleznik-Le, N. J. (2008). "MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(21): 7517-7522.
- Ernst, P., Mamon, M., Davidson, A. J., Zon, L. I. and Korsmeyer, S. J. (2004). "An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion." Curr Biol **14**(22): 2063-2069.
- Feinberg, A. P. (2007). "Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease." Nature **447**(7143): 433-440.
- Ferrell, C. M., Dorsam, S. T., Ohta, H., Humphries, R. K., Derynck, M. K., Haqq, C., Largman, C. and Lawrence, H. J. (2005). "Activation of stem-cell specific genes by HOXA9 and HOXA10 homeodomain proteins in CD34+ human cord blood cells." Stem Cells **23**(5): 644-655.
- Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A. and Greaves, M. F. (1990). "Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells." Blood **75**(12): 2417-2426.
- Flomenberg, N., Devine, S. M., Dpersio, J. F., Liesveld, J. L., McCarty, J. M., Rowley, S. D., Vesole, D. H., Badel, K. and Calandra, G. (2005). "The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone." Blood **106**(5): 1867-1874.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y. Z., Plass, C. and Esteller, M. (2005). "Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(30): 10604-10609.
- Galm, O., Yoshikawa, H., Esteller, M., Osieka, R. and Herman, J. G. (2003). "SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma." Blood **101**(7): 2784-2788.
- Gaunt, S. J., Krumlauf, R. and Duboule, D. (1989). "Mouse homeo-genes within a subfamily, Hox-1.4, -2.6 and -5.1, display similar anteroposterior domains of expression in the embryo, but show stage- and tissue-dependent differences in their regulation." Development **107**(1): 131-141.
- Gazit, R., Weissman, I. L. and Rossi, D. J. (2008). "Hematopoietic stem cells and the aging hematopoietic system." Semin Hematol **45**(4): 218-224.
- Gehring, W. J., Affolter, M. and Burglin, T. (1994). "Homeodomain proteins." Annu Rev Biochem **63**: 487-526.
- Gereige, L. M. and Mikkola, H. K. (2009). "DNA methylation is a guardian of stem cell self-renewal and multipotency." Nat Genet **41**(11): 1164-1166.
- Gil, J., Bernard, D. and Peters, G. (2005). "Role of Polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer." DNA Cell Biology **24**(2): 117-125.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P. and et al. (1989). "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling." N Engl J Med **321**(17): 1174-1178.
- Gluckman, E., Rocha, V., Arcese, W., Michel, G., Sanz, G., Chan, K. W., Takahashi, T. A., Ortega, J., Filipovich, A., Locatelli, F., Asano, S., Fagioli, F., Vowels, M., Sirvent, A., Laporte, J. P., Tiedemann,

- K., Amadori, S., Abecassis, M., Bordigoni, P., Diez, B., Shaw, P. J., Vora, A., Caniglia, M., Garnier, F., Ionescu, I., Garcia, J., Koegler, G., Rebulla, P. and Chevret, S. (2004). "Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice." Exp Hematol **32**(4): 397-407.
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C. L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E. and Bestor, T. H. (2006). "Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2." Science **311**(5759): 395-398.
- Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D. and Lander, E. S. (1999). "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." Science **286**(5439): 531-537.
- Gratwohl, A., Brand, R., Frasson, F., Rocha, V., Niederwieser, D., Reusser, P., Einsele, H. and Cordonnier, C. (2005). "Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time." Bone Marrow Transplant **36**(9): 757-769.
- Greenhalgh, C. J. and Hilton, D. J. (2001). "Negative regulation of cytokine signaling." J Leukoc Biol **70**(3): 348-356.
- Groninger, E., Weber, B., Heil, O., Peters, N., Stab, F., Wenck, H., Korn, B., Winnefeld, M. and Lyko, F. (2010). "Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin." PLoS Genet **6**(5): e1000971.
- Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H. Y., Nagai, S., Yamazaki, N. and Matsushima, K. (1999). "Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells." Blood **94**(3): 845-852.
- Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H. Y., Yamazaki, N. and Matsushima, K. (1999). "Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages." Blood **94**(3): 837-844.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." Exp Cell Res **37**: 614-636.
- Hellwig*, I., Bocker*, M., Breiling, A., Eckstein, V., Ho, A. and Lyko, F. (2011). "Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging." Blood **submitted, under review; shared first authorship**.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D. and Baylin, S. B. (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9821-9826.
- Ho, A. D. (2005). "Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells." Exp Hematol **33**(1): 1-8.
- Ho, V. T., Mirza, N. Q., Junco Dd, D., Okamura, T. and Przepiorka, D. (2003). "The effect of hematopoietic growth factors on the risk of graft-vs-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis." Bone Marrow Transplant **32**(8): 771-775.
- Horan, G. S., Ramirez-Solis, R., Featherstone, M. S., Wolgemuth, D. J., Bradley, A. and Behringer, R. R. (1995). "Compound mutants for the paralogous hoxa-4, hoxb-4, and hoxd-4 genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed." Genes Dev **9**(13): 1667-1677.
- Huang, S. and Terstappen, L. W. (1994). "Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells." Blood **83**(6): 1515-1526.

Jackson, M., Krassowska, A., Gilbert, N., Chevassut, T., Forrester, L., Ansell, J. and Ramsahoye, B. (2004). "Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells." *Mol Cell Biol* **24**(20): 8862-8871.

Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nat Genet* **33 Suppl**: 245-254.

Ji, H., Ehrlich, L. I., Seita, J., Murakami, P., Doi, A., Lindau, P., Lee, H., Aryee, M. J., Irizarry, R. A., Kim, K., Rossi, D. J., Inlay, M. A., Serwold, T., Karsunky, H., Ho, L., Daley, G. Q., Weissman, I. L. and Feinberg, A. P. (2010). "Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors." *Nature* **467**(7313): 338-342.

Jones, P., May, G., Healy, L., Brown, J., Hoyne, G., Delassus, S. and Enver, T. (1998). "Stromal expression of Jagged1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells." *Blood* **92**(5): 1505-1511.

Jones, P. A. and Baylin, S. (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nature Review Genetics* **3**: 415-428.

Jones, P. A. and Takai, D. (2001). "The role of DNA methylation in mammalian epigenetics." *Science* **293**(5532): 1068-1070.

Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A. P. (1998). "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." *Nat Genet* **19**(2): 187-191.

Kamminga, L. M., Bystrykh, L. V., de Boer, A., Houwer, S., Douma, J., Weersing, E., Dontje, B. and de Haan, G. (2006). "The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion." *Blood* **107**(5): 2170-2179.

Khoury, H. J., Loberiza, F. R., Jr., Ringden, O., Barrett, A. J., Bolwell, B. J., Cahn, J. Y., Champlin, R. E., Gale, R. P., Hale, G. A., Urbano-Ispizua, A., Martino, R., McCarthy, P. L., Tiberghien, P., Verdonck, L. F. and Horowitz, M. M. (2006). "Impact of posttransplantation G-CSF on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Blood* **107**(4): 1712-1716.

Kirkwood, T. B. and Austad, S. N. (2000). "Why do we age?" *Nature* **408**(6809): 233-238.

Koeffler, H. P., Ranyard, J. and Pertcheck, M. (1985). "Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation." *Blood* **65**(2): 484-491.

Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* **128**(4): 693-705.

Lapidot, T. and Petit, I. (2002). "Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells." *Exp Hematol* **30**(9): 973-981.

Lawrence, H. J., Helgason, C. D., Sauvageau, G., Fong, S., Izon, D. J., Humphries, R. K. and Largman, C. (1997). "Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis." *Blood* **89**(6): 1922-1930.

Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H. L., Zucker, J. P., Yuan, B., Bell, G. W., Herbolzheimer, E., Hannett, N. M., Sun, K., Odom, D. T., Otte, A. P., Volkert, T. L., Bartel, D. P., Melton, D. A., Gifford, D. K., Jaenisch, R. and Young, R. A. (2006). "Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells." *Cell* **125**(2): 301-313.

Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A. A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T. and Peters, A. H. (2003). "Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs

DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin." *Curr Biol* **13**(14): 1192-1200.

Lessard, J., Schumacher, A., Thorsteinsdottir, U., van Lohuizen, M., Magnuson, T. and Sauvageau, G. (1999). "Functional antagonism of the Polycomb-Group genes *eed* and *Bmi1* in hemopoietic cell proliferation." *Genes Dev* **13**(20): 2691-2703.

Li, E., Bestor, T. H. and Jaenisch, R. (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." *Cell* **69**(6): 915-926.

Li, L., Milner, L. A., Deng, Y., Iwata, M., Banta, A., Graf, L., Marcovina, S., Friedman, C., Trask, B. J., Hood, L. and Torok-Storb, B. (1998). "The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1." *Immunity* **8**(1): 43-55.

Linton, P. J. and Dorshkind, K. (2004). "Age-related changes in lymphocyte development and function." *Nat Immunol* **5**(2): 133-139.

Liu, X. L., Yuan, J. Y., Zhang, J. W., Zhang, X. H. and Wang, R. X. (2007). "Differential gene expression in human hematopoietic stem cells specified toward erythroid, megakaryocytic, and granulocytic lineage." *J Leukoc Biol* **82**(4): 986-1002.

Lyko, F., Stach, D., Brenner, A., Stilgenbauer, S., Dohner, H., Wirtz, M., Wiessler, M. and Schmitz, O. J. (2004). "Quantitative analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia patients." *Electrophoresis* **25**(10-11): 1530-1535.

Magli, M. C., Largman, C. and Lawrence, H. J. (1997). "Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation." *J Cell Physiol* **173**(2): 168-177.

Majeti, R., Park, C. Y. and Weissman, I. L. (2007). "Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood." *Cell Stem Cell* **1**(6): 635-645.

Marshman, E., Booth, C. and Potten, C. S. (2002). "The intestinal epithelial stem cell." *Bioessays* **24**(1): 91-98.

Mauch, P., Botnick, L. E., Hannon, E. C., Obbagy, J. and Hellman, S. (1982). "Decline in bone marrow proliferative capacity as a function of age." *Blood* **60**(1): 245-252.

Maximov, A. (1909). "Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung im postfetalen Leben der Säugetiere." *Folia Hematologica*: 125-134.

McClelland, M. and Ivarie, R. (1982). "Asymmetrical distribution of CpG in an 'average' mammalian gene." *Nucleic Acids Res* **10**(23): 7865-7877.

McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A. and Gehring, W. J. (1984). "A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes." *Nature* **308**(5958): 428-433.

McNiece, I. K., Briddell, R. A., Hartley, C. A. and Andrews, R. G. (1993). "The role of stem cell factor mobilization of peripheral blood progenitor cells: synergy with G-CSF." *Stem Cells* **11 Suppl 3**: 83-88.

Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M. V., Coletta, M., Vivarelli, E., Frati, L., Cossu, G. and Giacomello, A. (2004). "Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart." *Circ Res* **95**(9): 911-921.

Milner, L. A., Kopan, R., Martin, D. I. and Bernstein, I. D. (1994). "A human homologue of the *Drosophila* developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors." *Blood* **83**(8): 2057-2062.

- Morrison, S. J. and Kimble, J. (2006). "Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer." Nature **441**(7097): 1068-1074.
- Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Akashi, K., Globerson, A. and Weissman, I. L. (1996). "The aging of hematopoietic stem cells." Nat Med **2**(9): 1011-1016.
- Nakauchi, H. (2004). "Isolation and clonal characterization of hematopoietic and liver stem cells." Cornea **23**(8 Suppl): S2-7.
- Nash, R. A., Kurzrock, R., DiPersio, J., Vose, J., Linker, C., Maharaj, D., Nademanee, A. P., Negrin, R., Nimer, S., Shulman, H., Ashby, M., Jones, D., Appelbaum, F. R. and Champlin, R. (2000). "A phase I trial of recombinant human thrombopoietin in patients with delayed platelet recovery after hematopoietic stem cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **6**(1): 25-34.
- Neuringer, I. P. and Randell, S. H. (2004). "Stem cells and repair of lung injuries." Respir Res **5**: 6.
- Ogawa, T., Kitagawa, M. and Hirokawa, K. (2000). "Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages." Mech Ageing Dev **117**(1-3): 57-68.
- Oh, H., Chi, X., Bradfute, S. B., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L. H., Behringer, R. R., Schwartz, R. J., Entman, M. L. and Schneider, M. D. (2004). "Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells." Ann N Y Acad Sci **1015**: 182-189.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. and Li, E. (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell **99**(3): 247-257.
- Otto, W. R. (2002). "Lung epithelial stem cells." J Pathol **197**(4): 527-535.
- Pan, G. J., Chang, Z. Y., Scholer, H. R. and Pei, D. (2002). "Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4." Cell Res **12**(5-6): 321-329.
- Penn, M. S., Zhang, M., Deglurkar, I. and Topol, E. J. (2004). "Role of stem cell homing in myocardial regeneration." Int J Cardiol **95 Suppl 1**: S23-25.
- Pesce, M., Anastasiadis, K. and Scholer, H. R. (1999). "Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells." Cells Tissues Organs **165**(3-4): 144-152.
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R. S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., Sandbank, J., Zipori, D. and Lapidot, T. (2002). "G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4." Nat Immunol **3**(7): 687-694.
- Pineault, N., Helgason, C. D., Lawrence, H. J. and Humphries, R. K. (2002). "Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny." Exp Hematol **30**(1): 49-57.
- Prendergast, G. C. and Ziff, E. B. (1991). "Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region." Science **251**(4990): 186-189.
- Rakyan, V. K., Down, T. A., Maslau, S., Andrew, T., Yang, T. P., Beyan, H., Whittaker, P., McCann, O. T., Finer, S., Valdes, A. M., Leslie, R. D., Deloukas, P. and Spector, T. D. (2010). "Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains." Genome Res **20**(4): 434-439.
- Razin, A. and Riggs, A. D. (1980). "DNA methylation and gene function." Science **210**(4470): 604-610.
- Reinke, U., Hannon, E. C., Rosenblatt, M. and Hellman, S. (1982). "Proliferative capacity of murine hematopoietic stem cells in vitro." Science **215**(4540): 1619-1622.

- Richardson, B. (2003). "Impact of aging on DNA methylation." Ageing Res Rev **2**(3): 245-261.
- Riggs, A. D. (1975). "X inactivation, differentiation, and DNA methylation." Cytogenet Cell Genet **14**(1): 9-25.
- Ringden, O., Remberger, M., Svahn, B. M., Barkholt, L., Mattsson, J., Aschan, J., Le Blanc, K., Gustafsson, B., Hassan, Z., Omazic, B., Svenberg, P., Solders, G., von Döbeln, U., Winiarski, J., Ljungman, P. and Malm, G. (2006). "Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for inherited disorders: experience in a single center." Transplantation **81**(5): 718-725.
- Rocha, V. and Broxmeyer, H. E. (2010). "New approaches for improving engraftment after cord blood transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **16**(1 Suppl): S126-132.
- Roobrouck, V. D., Ulloa-Montoya, F. and Verfaillie, C. M. (2008). "Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells." Exp Cell Res **314**(9): 1937-1944.
- Rossi, D. J., Bryder, D., Zahn, J. M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A. J. and Weissman, I. L. (2005). "Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9194-9199.
- Rossi, D. J., Jamieson, C. H. and Weissman, I. L. (2008). "Stem cells and the pathways to aging and cancer." Cell **132**(4): 681-696.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-1354.
- Sauvageau, G., Lansdorp, P. M., Eaves, C. J., Hogge, D. E., Dragowska, W. H., Reid, D. S., Largman, C., Lawrence, H. J. and Humphries, R. K. (1994). "Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 12223-12227.
- Siminovitch, L., McCulloch, E. A. and Till, J. E. (1963). "The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies." J Cell Physiol **62**: 327-336.
- Song, S., Witek, R. P., Lu, Y., Choi, Y. K., Zheng, D., Jorgensen, M., Li, C., Flotte, T. R. and Petersen, B. E. (2004). "Ex vivo transduced liver progenitor cells as a platform for gene therapy in mice." Hepatology **40**(4): 918-924.
- Stamler, R., Stamler, J., Grimm, R., Gosch, F., Dyer, A., Berman, R., Civinelli, J., Elmer, P., Fishman, J., Van Heel, N. and et al. (1984). "Trial on control of hypertension by nutritional means: three-year results." J Hypertens Suppl **2**(3): S167-170.
- Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H. and Shinkai, Y. (2008). "G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription." EMBO J **27**(20): 2681-2690.
- Tadokoro, Y., Ema, H., Okano, M., Li, E. and Nakauchi, H. (2007). "De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells." J Exp Med **204**(4): 715-722.
- Tarnowski, M. and Sieron, A. L. (2006). "Adult stem cells and their ability to differentiate." Med Sci Monit **12**(8): RA154-163.
- Teschendorff, A. E., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Ramus, S. J., Weisenberger, D. J., Shen, H., Campan, M., Noushmehr, H., Bell, C. G., Maxwell, A. P., Savage, D. A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Kocjan, G., Gayther, S. A., Jones, A., Beck, S., Wagner, W., Laird, P. W., Jacobs, I. J. and Widschwendter, M. (2010). "Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer." Genome Res **20**(4): 440-446.

- Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H. J., Humphries, K. and Sauvageau, G. (2002). "Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion." Blood **99**(1): 121-129.
- Thurston, G., Noguera-Troise, I. and Yancopoulos, G. D. (2007). "The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth." Nat Rev Cancer **7**(5): 327-331.
- Till, J. E. (1961). "Radiation effects on the division cycle of mammalian cells in vitro." Ann N Y Acad Sci **95**: 911-919.
- Till, J. E. and Mc, C. E. (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res **14**: 213-222.
- Trop, S., De Sepulveda, P., Zuniga-Pflucker, J. C. and Rottapel, R. (2001). "Overexpression of suppressor of cytokine signaling-1 impairs pre-T-cell receptor-induced proliferation but not differentiation of immature thymocytes." Blood **97**(8): 2269-2277.
- Trowbridge, J. J., Scott, M. P. and Bhatia, M. (2006). "Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 14134-14139.
- Tsumura, A., Hayakawa, T., Kumaki, Y., Takebayashi, S., Sakaue, M., Matsuoka, C., Shimotohno, K., Ishikawa, F., Li, E., Ueda, H. R., Nakayama, J. and Okano, M. (2006). "Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b." Genes Cells **11**(7): 805-814.
- Van Dilla, M. A., Trujillo, T. T., Mullaney, P. F. and Coulter, J. R. (1969). "Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement." Science **163**(872): 1213-1214.
- Varnum-Finney, B., Purton, L. E., Yu, M., Brashem-Stein, C., Flowers, D., Staats, S., Moore, K. A., Le Roux, I., Mann, R., Gray, G., Artavanis-Tsakonas, S. and Bernstein, I. D. (1998). "The Notch ligand, Jagged1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells." blood **91**(11): 4084-4091.
- Waddington, C. H. (1939). "Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of Drosophila." Proc Natl Acad Sci U S A **25**(7): 299-307.
- Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F. X., Eckstein, V., Boukamp, P. and Ho, A. D. (2009). "Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells." PLoS One **4**(6): e5846.
- Wagner, W., Horn, P., Bork, S. and Ho, A. D. (2008). "Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche." Exp Gerontol **43**(11): 974-980.
- Walker, L., Lynch, M., Silverman, S., Fraser, J., Boulter, J., Weinmaster, G. and Gasson, J. C. (1999). "The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro." Stem Cells **17**(3): 162-171.
- Wang, Y. and Leung, F. C. (2004). "An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers." Bioinformatics **20**(7): 1170-1177.
- Watrin, F. and Wolgemuth, D. J. (1993). "Conservation and divergence of patterns of expression and lineage-specific transcripts in orthologues and paralogues of the mouse Hox-1.4 gene." Dev Biol **156**(1): 136-145.
- Watt, F. and Molloy, P. L. (1988). "Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter." Genes Dev **2**(9): 1136-1143.

Weng, N. (2001). "Interplay between telomere length and telomerase in human leukocyte differentiation and aging." J Leukoc Biol **70**(6): 861-867.

Wilson, A. and Trumpp, A. (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." Nat Rev Immunol **6**(2): 93-106.

Wilson, V. L. and Jones, P. A. (1983). "DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells." Science **220**(4601): 1055-1057.

Wu, Q., Lothe, R. A., Ahlquist, T., Silins, I., Trope, C. G., Micci, F., Nesland, J. M., Suo, Z. and Lind, G. E. (2007). "DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their in vitro models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets." Mol Cancer **6**: 45.

Wu, S. J., Yao, M., Chou, W. C., Tang, J. L., Chen, C. Y., Ko, B. S., Huang, S. Y., Tsay, W., Chen, Y. C., Shen, M. C., Wang, C. H., Yeh, Y. C. and Tien, H. F. (2006). "Clinical implications of SOCS1 methylation in myelodysplastic syndrome." Br J Haematol **135**(3): 317-323.

7. Danksagung

Hier möchte ich all denen Danken die diese Arbeit möglich gemacht haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. A.D. Ho für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Inneren Med. V durchzuführen, für seine Unterstützung und Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Frank Lyko danke ich für die Übernahme des Gutachtens, der wissenschaftlichen Unterstützung und Betreuung bei meiner Arbeit.

Herrn Frederic Reu danke ich vielmals für die wissenschaftliche Betreuung und die Korrekturen der Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich danken für die freundliche Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft. Mein besonderer Dank gilt hierbei:

Angela Lenze, Katrin Barth, Kerstin Wörner, Van Hoang und Karina Borowski, danke für die Unterstützung bei meiner Arbeit, die aufmunternden Worte und das immer offene Ohr.

Meinen Mitstreitern Larissa Pietsch und Isabel Taubert danke ich für die wissenschaftlichen und auch für die nicht-wissenschaftlichen, freundschaftlichen Momente im Labor, in den Mittags- und Kaffeepausen. Ihr schafft das auch!

Mein ganz besonderer Dank gilt Patrick Horn und Simone Bork. Ihr seid richtig gute Freunde geworden.

Faina danke ich für ihre Korrekturen und für Sorge um mein leibliches Wohl in den letzten 3 Jahren.

Vielen Dank auch an Dirk für seine liebevolle Unterstützung, seine Geduld und dass mir auch manchmal in den Hintern trat.

Meinen Eltern danke ich für ihre für ihre liebevolle Unterstützung, ihre Motivation und das Vertrauen in mich und meine Arbeit.

8. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass bei der Anfertigung der Dissertation selbständig verfasst habe und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Heidelberg, im Februar 2011

Isabelle Hellwig