
**Die Rolle des Transkriptionsfaktors Zeb2/Sip1
in der Regulation von hämatopoetischen
Stammzellen**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrads (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

vorgelegt von

Tamara Riedt

aus

Tübingen

Bonn, im Januar 2014

**Angefertigt mit Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

Erster Gutachter: Professor Peter Brossart

Zweiter Gutachter: Professor Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 10.06.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Danksagung

Ich möchte mich bei meinen beiden Gutachtern Herr Professor Peter Brossart und Herrn Professor Waldemar Kolanus bedanken. Herrn Professor Brossart gebührt auch Dank dafür, dass ich die Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen durfte.

Desweiteren möchte ich mich insbesondere auch bei meinem Laborleiter und direkten Betreuer Herr Dr. Viktor Janzen und meinen Kollegen Carmen Carrillo-García, Jin Li, Manuela Dotten und Hichem Gallala für die langjährige, erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Außerdem möchte ich auch allen anderen Mitgliedern der Abteilung III der Medizinischen Klinik am Uniklinikum Bonn meinen herzlichen Dank aussprechen, die mich mit ihrem Know-how oder einfach mit einem offenen Ohr unterstützt haben.

<u>ABKÜRZUNGEN</u>	<u>1</u>
<u>1 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>2</u>
<u>2 EINLEITUNG</u>	<u>3</u>
2.1 BLUTBILDUNG UND HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN.....	3
2.2 <i>DIE ENTWICKLUNG DES HÄMATOPOETISCHEN SYSTEMS WÄHREND DER EMBRYOGENESE DER MAUS</i>	7
2.3 <i>DIE BEDEUTUNG VON ZEB2 ALS TRANSKRIPTIONSFAKTOR</i>	9
2.3.1 <i>DIE ENTDECKUNG VON ZEB2</i>	9
2.3.2 DIE ROLLE VON ZEB2 BEIM MOWAT-WILSON SYNDROM	10
2.3.3 DIE ROLLE VON ZEB2 IN TUMORENTSTEHUNG- UND PROGRESSION	12
2.3.4 ZEB2 IN DER EMBRYONALENTWICKLUNG.....	14
2.3.5 DER EINFLUSS VON ZEB2 AUF DIE EMBRYONALE HÄMATOPOESE	15
2.4 STAND DES PROJEKTS ZU BEGINN DER ARBEIT	17
2.5 MAUSMODELL	18
2.5.1 DIE CRE-LOXP-TECHNOLOGIE.....	18
2.5.2 KONKRETES MAUSMODELL	20
2.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
<u>3 MATERIALIEN.....</u>	<u>24</u>
3.1 BEZUGSQUELLEN FÜR DIE VERWENDETEN CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	24
3.2 HÄUFIG VERWENDETE PUFFER UND STAMMLÖSUNGEN	25
3.3 GERÄTE UND ANWENDUNGEN	25
3.3.1 GERÄTE	25
3.3.2 COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSE VON DNA- UND PROTEINSEQUENZEN	25
<u>4 METHODEN</u>	<u>27</u>
4.1 MÄUSE	27
4.1.1 <i>MAUSZUCHT UND HALTUNG</i>	27
4.1.2 VERWENDETE MAUSSTÄMME	27
4.1.3 <i>RÜCKKREUZUNG</i>	27
4.1.4 BLUTENTNAHME	29

4.1.5	GEWINNUNG VON KNOCHENMARK UND ANDEREN ORGANEN/GEWEBEN	29
4.1.6	KNOCHENMARKTRANSPLANTATIONEN	29
4.2	AUTOMATISIERTE BLUTANALYSE	30
4.3	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN.....	31
4.3.1	BLUT.....	31
4.3.2	KNOCHENMARK	32
4.3.2.1	Stamm-und Progenitorzellen.....	32
4.3.2.2	Apoptoseassay: AnnexinV/Dapi-Färbung.....	32
4.3.2.3	Proliferationsassay: BrdU-Inkorporation	33
4.3.2.4	Zellzyklus-Färbung: Ki-67/Dapi	33
4.4	ZELLSORTIERUNG.....	33
4.5	GENOTYPISIERUNG	34
4.5.1	QUALITATIVE PCR.....	34
4.5.2	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON DNA	36
4.6	RNA-EXTRAKTION, REVERSE TRANSKRIPTION UND SEMI-QUANTITATIVE REAL TIME PCR.....	36
4.6.1	REAGENZIEEN UND KITS	36
4.6.2	RNA-ISOLATION UND HERSTELLUNG DER CDNA	37
4.6.3	qPCR.....	38
4.7	MICROARRAYS.....	41
4.8	ZELLKULTUR.....	41
4.8.1	COLONY FORMING CELL ASSAY.....	41
4.8.2	COLONY-FORMING-UNIT-MEGAKARYOZYTEN (CFU-Mk) ASSAY	42
4.9	HISTOCHEMISCHE METHODEN.....	43
4.9.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN AND GEWEBESCHNITTEN	43
4.10	MIKROSKOPIE.....	44
4.10.1	LICHTMIKROSKOPIE	44
5	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>44</u>
5.1	ETABLIERUNG EINER MAUSKOLONIE MIT KONDITIONALER ZEB2-DELETION IN HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLEN UND UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON ZEB2 AUF DIE HÄMATOPOESE IN EINEM „LOSS-OF-FUNCTION“ MODELL.....	44
5.2	EXPRESSION VON ZEB2 IN BLUT UND KNOCHENMARK	45
5.3	DIE BLUTBILDUNG IM ZEB2-CHKO UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN	47
5.3.1	ZUSAMMENSETZUNG DES PERIPHEREN BLUTS.....	47
5.3.2	ZUSAMMENSETZUNG DES KNOCHENMARKS	50

5.3.3	APOPTOSE- UND PROLIFERATIONSVERHALTEN VON ZEB2-DEFIZIENTEN STAMM-UND PROGENITORZELLEN	55
5.3.4	EXTRAMEDULLÄRE HÄMATOPOESE BEI DEN ZEB2-DEFIZIENTEN TIEREN	57
5.4	LEBENSERWARTUNG DER ZEB2-DEFIZIENTEN TIERE.....	61
5.5	MYELOPROLIFERATIVE EIGENSCHAFTEN DES ZEB2-CHKO-PHÄNOTYPS.....	62
5.6	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON ZEB2 AUF DIE REPOPULATIONSFÄHIGKEIT, SELBSTERNEUERUNGS- UND DIFFERENZIERUNGSFÄHIGKEIT VON HÄMATOPOETISCHEN STAMM- UND PROGENITORZELLEN.....	69
5.6.1	NICHT-KOMPETITIVE TRANSPLANTATION	69
5.6.2	SERIELLE KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION.....	71
5.6.3	KOMPETITIVE TRANSPLANTATION.....	72
5.6.4	MÖGLICHE GRÜNDE FÜR DIE VERSCHIEBUNG DER PROGENITORENVERHÄLTNISSE	78
5.7	DER EINFLUSS DER DELETION VON ZEB2 AUF DIE STAMMZELLNISCHE.....	81
5.7.1	TRANSPLANTATION IN DIE ZEB2-DEFIZIENTE NISCHE	81
5.7.1.1	Erste, nicht kompetitive Runde	82
5.7.1.2	Zweite, kompetitive Runde	84
5.8	GENEXPRESSIONSANALYSEN.....	86
5.8.1	MICROARRAY-ANALYSEN AN HÄMATOPOETISCHEN STAMM- UND PROGENITORZELLEN ..	86
5.8.2	VALIDIERUNG DER KANDIDATENGENE DURCH QRT-PCR	88
5.9	CFC ASSAY MIT INHIBITOREN.....	89
6	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>93</u>
	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>102</u>

Abkürzungen

APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaare
chKO	Conditional hematopoietic Knockout
CLP	Common Lymphoid Progenitors
CMP	Common Myeloid Progenitors
CFC	Colony Forming Cell (Kolonie-bildende Zelle)
DC	Dendritische Zelle (D endritic C ell)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GMP	Granulozytäre-Monozytäre Progenitoren
HSC	Hämatopoetische Stammzellen (Hematopoietic Stem Cells)
HPC	Hämatopoetische Progenitorzellen (Hematopoietic Progenitor Cells)
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
H&E	Hämatoxylin und Eosin
KM	Knochenmark
LT-HSC	Langzeit-Stammzellen (L ong T erm HSC)
MEP	Megakaryozytäre-Erythroide-Progenitoren
MPP	Multi-potente Progenitoren
NK	Natural Killer-Zellen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-Protein
PBS	Phosphate buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
ST-HSC	Kurzzeit-Stammzellen (S hort T erm HSC)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
UTR	Untranslatierte Region
Zeb2	Zinc finger E-box binding homeobox 2
Zeb2-chKO	Zeb2-konditionaler-hämatopoetischer-Knock out

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors Zeb2 auf die Regulation adulter hämatopoetischer Stammzellen untersucht. Zu diesem Zwecke wurde ein konditionales, induzierbares Maus-Knockout-Modell unter Kontrolle des Mx1-Promotors verwendet. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass der Verlust von Zeb2 massive Auswirkungen auf die adulte murine Hämatopoese hat. Der Verlust von Zeb2 wirkt sich auf alle Stufen der hämatopoetischen Entwicklung aus, angefangen von den Stammzellen und Progenitoren im Knochenmark bis hin zu den reifen Zellen des Blutes. In Abwesenheit von Zeb2 ist eine normale Differenzierung und Ausreifung hämatopoetischer Zellen deutlich gestört. Im Knochenmark zeigen sich eine Vermehrung von hämatopoetischen Stammzellen und eine Verschiebung der Anteile von Progenitoren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Außerdem weisen Zeb2-defiziente Mäuse viele Eigenschaften einer myeloproliferativen Erkrankung auf. Transplantationen von Knochenmarkzellen zeigten, dass der Phänotyp intrinsisch über die Zeb2-defiziente hämatopoetische Stammzelle und nicht sekundär durch das umgebende Mikromilieu des Knochenmarks vermittelt wird. Auf der molekularen Ebene scheinen multiple Zielmoleküle von der Expression von Zeb2 abhängig zu sein. Eine stärkere Aktivierung des Wnt-Signalweges scheint zumindest für einige Aspekte des Phänotyps verantwortlich zu sein. Auch gibt es Anzeichen für eine Dysregulation des epigenetischen Silencing während der Differenzierung.

2 Einleitung

2.1 Blutbildung und Hämatopoetische Stammzellen

Durch den Körper eines erwachsenen Menschen fließen zwischen vier und sechs Liter Blut. Das Blut entspricht einem flüssigen Körperorgan, das zwischen 40 und 50 % zelluläre Bestandteile und dementsprechend 50 bis 60 % Blutplasma enthält. Es erfüllt wichtige Transport- und Versorgungsfunktionen im Organismus. Die zellulären Bestandteile des Blutes sind Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Thrombozyten (Blutplättchen) und Leukozyten (weiße Blutkörperchen). Sie sorgen für den Transport von Sauerstoff, für die Gerinnung des Blutes im Fall von Verletzungen und bilden das Immunsystem. Jeden Tag müssen Millionen dieser Zellen ersetzt und somit neu gebildet werden (Rieger und Schroeder, 2012). Dies ist die Aufgabe der blutbildenden Stammzellen. Sie müssen über die gesamte Lebensdauer eines Organismus frische Blutzellen zur Verfügung stellen. Dies geschieht bei Wirbeltieren durch Differenzierung der unreifen Stamm- und Progenitorzellen zu reifen Blutzellen. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen befinden sich im adulten Organismus hauptsächlich im Knochenmark (Rieger und Schroeder, 2012). Die Nachbildung reifer Blutzellen erfolgt in einem streng kontrollierten, hierarchischen Prozess, in dem sich die Zellen ausgehend von hämatopoetischen Langzeitrepopulierenden-Stammzellen, über Kurzzeitrepopulierende-Stammzellen zuerst multipotenten Progenitorzellen und dann immer weiter differenzierten Vorläuferzellen und letztendlich zu reifen, funktionsfähigen Blutzellen entwickeln (Rossi *et al.*, 2012). Abbildung 1 zeigt ein Schema

des allgemein anerkannten Differenzierungsweges zur Bildung reifer Blutzellen, ausgehend von den blutbildenden Stammzellen über zunehmend linienrestringierte Progenitorpopulationen. Dieser Differenzierungsweg wurde ursprünglich vorgeschlagen von Prof. Irving Weissman und Kollegen und erstmals 1992 veröffentlicht (Ikuta et al., 1992).

Um eine dauerhafte und bedarfsgerechte Produktion hochspezialisierter Blutzellen zu ermöglichen, unterliegen die Differenzierungs- und Selbsterneuerungsprozesse strikten Kontrollmechanismen. Gerät dieses Gleichgewicht außer Kontrolle, so kann es zur Erschöpfung der Stammzellreserve kommen (z.B. durch überwiegende Differenzierung oder verfrühte Seneszenz), was schließlich zur fehlenden Nachbildung von Blutzellen und zum Tod des Organismus führt. Oder aber das Gleichgewicht verschiebt sich hin zu gesteigerter Selbsterneuerung, verbunden mit einem Mangel an reifen Blutzellen und einer hohen Inzidenz von Leukämien bzw. Lymphomen. Die genauen molekularen Mechanismen dieser Abläufe sind trotz enormer wissenschaftlicher Fortschritte in den letzten Jahren weiterhin unzureichend bekannt. Zellintrinsische Mechanismen, wie eine Regulation der Proliferation durch Zykline, zyklinabhängige Kinasen deren Inhibitoren (CDKI), welche die Zellzyklusprogression hemmen (Cheng et al., 2000a; Cheng et al., 2000b; Janzen et al., 2006; Stier et al., 2003; Yuan et al., 2004), scheinen für die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung wichtig zu sein (Steinman, 2002).

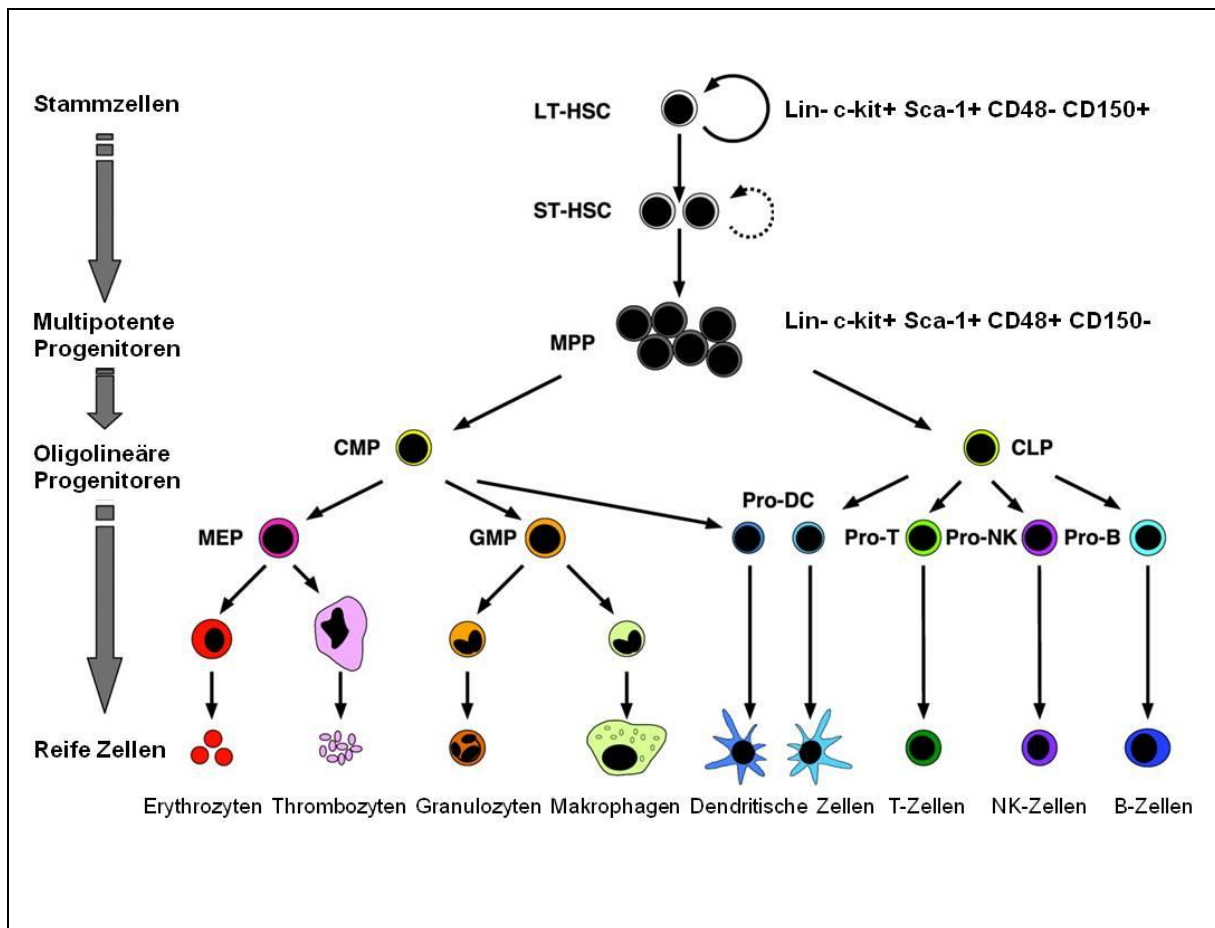


Abbildung 1 Übersicht über die Reifung von Blutzellen (adaptiert von Passegué E et al. PNAS 2003;100:11842-11849). Hämatopoetische Stammzellen können in Langzeitstammzellen (LT-HSC), Zellen mit einem sehr hohen Selbsterneuerungspotential, und Kurzzeitstammzellen (ST-HSC), die die Blutbildung nur für kurze Zeit aufrecht erhalten können, unterteilt werden. Die Kurzzeitstammzellen differenzieren sich zu Multipotenten Progenitoren (MPP) aus, die sich nicht oder nur kurz selbst erneuern und das Potential haben, sich in Obligo-potente Vorläuferzellen weiterentwickeln. Diese wiederum bringen letztendlich über funktionell irreversible Differenzierungsschritte die reifen Zellen des Blutes hervor. Common Lymphoid Progenitor (CLP) bringen T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen hervor. Common Myeloid Progenitor (CMP) bilden Granulozyten-Monozyten-Vorläufer (GMP), die dann Monozyten/Makrophagen und Granulozyten bilden. Außerdem bilden sie Megakaryozytäre-Erythroide Vorläufer (MEP), welche letztendlich Megakaryozyten/Plättchen und Erythrozyten hervorbringen. Sowohl CMP als auch CLP können dendritische Zellen bilden. Alle diese Zellpopulationen sind über ihre entsprechenden Kombinationen an spezifischen Oberflächenmarkern definierbar (Ikuta et al., 1992, Passegué et al., 2003).

Andererseits spielen auch exogene Einflüsse durch das die Stammzelle umgebende Mikromilieu (microenvironment), die so genannte „Stammzellnische“, eine Rolle. So können einerseits Änderungen der zellulären Zusammensetzung der Stammzellnische, andererseits auch eine Veränderung der extrazellulären Matrix die Größe des Stammzellpools oder die Funktionalität der Zellen beeinflussen (Adams et al., 2007; Calvi et al., 2003; Stier et al., 2000; Zhang et al., 2003). Die Kontrolle hämatopoetischer Stammzellen durch die Stammzellnische erfolgt sowohl über direkte Zell-Zellkontakte als auch über lösliche Faktoren, sogenannte Zytokine (Scadden, 2006). Um auf die extrazellulären Signale angemessen zu reagieren, ist eine präzise Regulation des Gleichgewichts aus aktivierenden und inhibierenden Substanzen während der kaskadenartigen Signalweiterleitung im Zytoplasma und bei der Einleitung der zellulären Antwort, der Transkription von Zielproteinen, notwendig (Sugiyama et al., 2006; Kiel et al., 2006). Die Regulation der Transkription erfolgt durch eine Balance zwischen transkriptionellen Aktivatoren und Repressoren. Die Bedeutung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren für die Regulation der Homöostase hämatopoetischer Stammzellen wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Rodrigues et al., 2005; Tothova et al., 2007; Hock et al., 2004; Molofsky et al., 2003). Dabei führt insbesondere eine veränderte Expression von Transkriptionsfaktoren in Stammzellen zu einem Verlust der Selbsterneuerung mit einer raschen Erschöpfung der Hämatopoese (Molofsky et al., 2003) oder zu einer Entstehung von Leukämien (Tothova et Gilliland, 2007). Die genaue Erforschung der Regulationsme-

chanismen von Stammzellen birgt daher nicht nur die Möglichkeit einer Ausweitung stammzellbasierter Therapien von malignen und immunologischen Erkrankungen, sondern kann auch neue Einblicke in die Entstehung von Erkrankungen ermöglichen. Somit kann die Erforschung der molekularen Grundlagen der Stammzellregulation entscheidende Hinweise zu neuen, effektiven Behandlungsmethoden von Erkrankungen des hämatopoetischen Systems erbringen.

2.2 Die Entwicklung des hämatopoetischen Systems während der Embryogenese der Maus

Während der Embryonalentwicklung der Maus treten die frühesten hämatopoetischen Zellen im Dottersack und der Plazenta um den Tag E7.5 auf. Diese Zellen sind sogenannte primitive hämatopoetische Zellen, die sich von den definitiven (endgültigen) hämatopoetischen Stammzellen unterscheiden und nicht bis zum adulten Stadium erhalten bleiben (Ottersbach et Dzierzak, 2010). Die ersten Zellen, die die funktionellen Eigenschaften von hämatopoetischen Stammzellen aufweisen, werden in der intraembryonalen Aorta-Gonado-Mesonephros-Region (AGM) gebildet (Rieger und Schröder, 2012). Dies geschieht um den Tag E9.5. Die Lokalisation der hämatopoetischen Zellen ändert sich mehrere Male während der Entwicklung des Embryos. Kurz nach ihrer Bildung in der AGM wandern die HSC in die Plazenta und fötale Leber, wo sie sich stark vermehren. Anschließend wandern sie in die fötale Milz und um den Zeitpunkt der Geburt ins

Knochenmark, wo sie ihre endgültige Bleibe finden (Sugiyama et al., 2011). Ein gewisses Maß an Hämatopoese findet bei der Maus aber auch im adulten Stadium noch in der Milz statt (Rieger und Schröder, 2012). Abbildung 2 gibt einen Überblick über die hämatopoetische Entwicklung im Embryo.

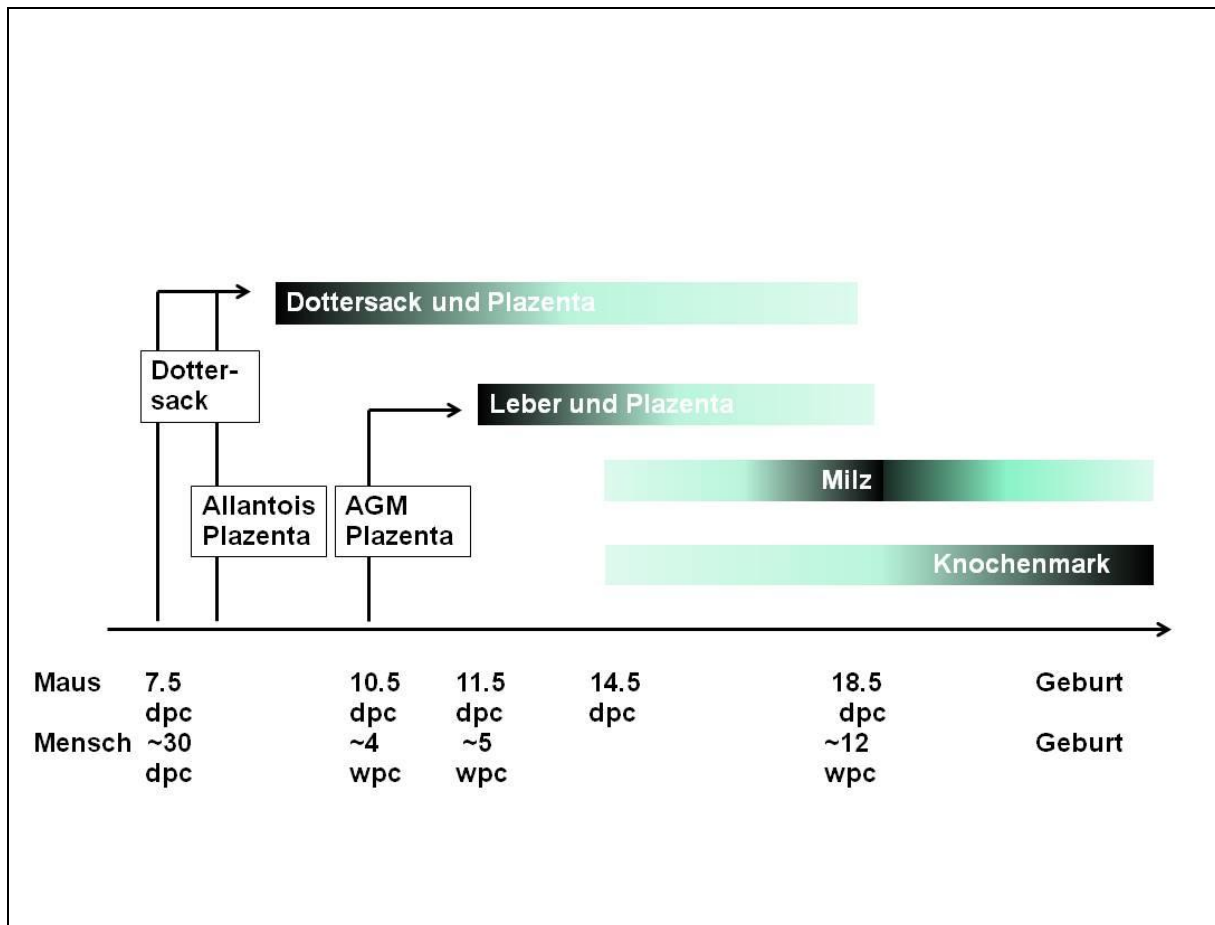


Abbildung 2 Die embryonale hämatopoetische Entwicklung (adaptiert von Rieger und Schröder, 2012). Anatomischer Ort und zeitlicher Verlauf der Entstehung hämatopoetischer Zellen, Erhaltung und Expansion während der embryonalen Entwicklung. Hämatopoetische Zellen werden *de novo* sowohl in extra- (Dottersack, Allantois, Plazenta) als auch in intraembryonalem (AGM-Region) Gewebe gebildet. Die Zellen wandern während der Entwicklung in weitere Gewebe/Organe zur Expansion und letztendlich ins Knochenmark zur Dauerhaften Erhaltung im adulten Organismus. dpc: Tage nach Empfängnis, wpc: Wochen nach Empfängnis.

2.3 Die Bedeutung von Zeb2 als Transkriptionsfaktor

2.3.1 Die Entdeckung von Zeb2

Zeb2 (Synonyme: SIP1, Zinc Finger E Box-Binding Homeobox 2; deltaEF2) gehört zur Familie der ZFH (Zinkfinger-Homeodomain) Transkriptionsfaktoren, dessen Prototyp Zeb1 (deltaEF1) ist (Nelles et al., 2003).

Zeb2 wurde ursprünglich als Interaktionspartner von Smad1 in Hefepilzen isoliert und daher zunächst als Smad-interacting Protein (SIP1 oder SMADIP1) bezeichnet (Verschuere et al., 1999). Insbesondere durch die Bindung an Smad-1, welches ein klassisches Signalprotein des BMP4-Smad-Signalwegs ist (Blank et al., 2008), wurde Zeb2 eine hemmende Wirkung auf die Transkription zugeschrieben. Es wurde jedoch auch eine Smad-unabhängige Bindung an den BMP4 Promotor festgestellt, die eine Suppression der BMP-4-Expression zur Folge hat (van Grunsven et al., 2007; Nitta et al., 2007). BMP-4 ist wiederum sowohl für die embryonale als auch für die adulte Hämatopoese essentiell (Bhatia et al., 1999; Bhardwaj et al., 2001). Außerdem ist eine Smad-unabhängige Repression der Transkription zahlreicher weiterer Proteine, wie E-Cadherin oder Leber-, Knochen- und Nierenalkalische- Phosphatase (LBK-ALP) durch Zeb2 nachgewiesen worden (Tylzanowski et al., 2001; Comijn et al., 2001). Die Suppression der E-Cadherin-Expression scheint dabei eines der primären und direkten Targets in der embryonalen Entwicklung zu sein (Comijn et al., 2001). Gleichzeitig spielt Zeb2 aber auch eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung. So ist eine gesteigerte Expression von Zeb2 mit einer erniedrigten E-Cadherin-

Expression in multiplen Tumorentitäten assoziiert und zudem mit Tumorprogression und -metastasierung in Verbindung gebracht worden (Elloul et al., 2005; Rosivatz et al., 2002, Brabletz und Brabletz, 2010). Die Expression von LBK-ALP in der embryonalen Entwicklung oder auch in Zelllinien *in-vitro* wird dabei mit der Induzierung der osteogenen Differenzierung in Zusammenhang gebracht. Die Suppression der LBK-ALP Expression durch Zeb2 verhindert eine vorzeitige osteogene Differenzierung während der Embryogenese. Die lokale Abwesenheit von Zeb2 in der frühen Extremitätenbildung führte zur Expression von LBK-ALP und konsekutiv zur Knorpelbildung (Tylzanowski et al., 2001). Die Gruppe um van Grunsven zeigte auch eine Suppression des Transkriptionsfaktors GATA-2 durch Zeb2 (van Grunsven et al., 2007). Die essentielle Rolle von GATA-2 für die Regulation der embryonalen und adulten Hämatopoese wurde bereits mehrfach gezeigt (Rodrigues et al., 2005; Tsai und Orkin, 1997; de Pooter et al., 2006; Ling et al., 2004). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass Zeb2 auch eine Funktion als transkriptioneller Aktivator ausüben kann (van Grunsven et al., 2006; Yoshimoto et al., 2005, Katoh und Katoh, 2009). Die vielfältigen beschriebenen Funktionen von Zeb2 weisen somit auf eine wichtige Rolle des Proteins in der Homöostase hin.

2.3.2 Die Rolle von Zeb2 beim Mowat-Wilson Syndrom

1998 wurde von der Gruppe um D.R. Mowat ein neues kongenitales Krankheitsbild beschrieben, welches durch einen charakteristischen Phänotyp

gekennzeichnet ist (Mowat et al., 1998). Das Krankheitsbild, benannt als Mowat-Wilson Syndrom, umfasst neben den typischen Gesichtszügen, mentale Retardierung, Epilepsie, Mikrozephalie, Hirschsprung-Erkrankung eine Reihe weiterer Organmanifestationen, inklusive kardialer Defekte (Cacheux et al., 2001; Dastot-Le et al., 2007). Als gemeinsame genetische Aberration, welche als ursächlich für die Genese des Syndroms identifiziert wurde, war eine Deletion auf dem Chromosom 2 q22 [del(2)(q22-q23)], der Region co-dierend für das Zeb2 Gen (Dastot-Le et al., 2007; Mowat et al., 1998), festgestellt worden. Das Auftreten der Mutation ist bislang als sporadisches Ereignis in über 180 Fällen beschrieben, in zwei Fällen wurde das Auftreten bei Geschwistern beobachtet, und sie liegt praktisch immer in einer heterozygoten Form vor (Dastot-Le et al., 2007; McGaughran et al., 2005; Zweier et al., 2005). Dabei sind unterschiedliche Mutationen festgestellt worden, die zum Stopp der Transkription führen (Verstappen et al., 2008). Der genaue molekulare Mechanismus für die Entwicklung der klinischen Symptome des Mowat-Wilson Syndroms ist noch weitestgehend ungeklärt. Ein möglicher verantwortlicher Pathomechanismus, zumindest bei einem Teil der Symptome, könnte in der Interaktion von Zeb2 mit dem Nukleosom-Remodeling und Histondeacetylase-Komplex NuRD begründet sein, denn bei bestimmten Mutationen des Zeb2 ist eine effektive Bindung des NuRD Komplexes nicht möglich (Verstappen et al., 2008). Aber auch Mutationen bei denen die Bindung des E-Cadherin-Promotors, und folglich eine Repression des

Gens, nicht mehr möglich ist, wurden bei einigen Patienten entdeckt (Ghoumid et al., 2013).

2.3.3 Die Rolle von Zeb2 in Tumorentstehung- und Progression

Eine maligne Entartung von Zellen ist häufig assoziiert mit einer Dysregulation von Differenzierungs- und Selbsterneuerungsprozessen von Gewebestammzellen. Eine Mutation/Deletion von Genen, die mit der Selbsterneuerung assoziiert sind, ist mehrfach dokumentiert worden (Reya et al., 2001). Die Expression und Funktion von Zeb2 wurde zunächst mit der epithelialen zu mesenchymalen Transition (EMT) während der embryonalen Entwicklung assoziiert. EMT ist ein physiologischer Prozess, bei dem sich polarisierte epitheliale Zellen in ihrer Form abrunden, Zell-Zell-Kontakte verlieren und schließlich die Eigenschaften beweglicher, wandernder mesenchymaler Zellen erlangen (Thiery et al., 2009). Während der Entstehung der Hämatopoese in der frühen embryonalen Entwicklung knospen in der AGM Region um den Tag E10.5 eine Gruppe von HSC aus der ventralen Wand der dorsalen Aorta in der Maus heraus. Die Veränderungen in der Zellform und der Verlust der Zell-Zell-Adhäsionen während der Stammzellknospung aus dem Endothel gleichen sehr stark den Veränderungen, welche während des EMT-Prozess beschrieben sind.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine Induktion des EMT-Prozesses in immortalisierten epithelialen Zelllinien zur Erlangung mesenchymaler Eigenschaften und schließlich zur Entstehung von Zellen mit Stammzeleigen-

schaften führt (Mani et al., 2008). Diese Zellen weisen im Folgenden Charakteristika von Tumorstammzellen auf. Die Expression von Zeb2 ist wiederum in den Tumorstammzellen im Vergleich zu den differenzierten Zellpopulationen deutlich hochreguliert (Mani et al., 2008). Auch ist, wie bereits unter erwähnt, eine erhöhte Expression von Zeb2 mit einer erniedrigten E-Cadherin-Expression in multiplen Tumorentitäten assoziiert und zudem mit Tumorprogression und -metastasierung in Verbindung gebracht worden (Elloul et al., 2005; Rosivatz et al., 2002, Brabletz und Brabletz, 2010). Doch nicht nur bei soliden Tumoren kann eine Fehlexpression von Zeb2 zur Entstehung bzw. Metastasierung einer Neoplasie beitragen. Es mehren sich die Hinweise, dass eine Überexpression des Gens auch an der Entstehung von Erkrankungen des blutbildenden Systems beteiligt sein kann. So konnte durch eine Untersuchung mittels retroviraler Insertionsmutagenese der Zeb2-Lokus als häufiger Insertionsort für retrovirale Genomsequenz identifiziert werden. Eine retrovirale Integration am Zeb2-Lokus führte zu einer Überexpression des Gens (Caudell et al., 2010) und die überwiegende Mehrzahl der Mäuse mit einer Insertion am Zeb2-Lokus entwickelte eine akute Lymphatische Leukämie (B-ALL). Eine Drosselung der Zeb2-Expression mittels siRNA in einer humanen leukämischen Zelllinie mit hoher Zeb2-Expression führte zu einem Wachstumsarrest in den Zellen (Caudell et al., 2010). Außerdem ist Zeb2 in t(4;11)-positiver ALL, in der das MLL-Gen durch eine Translokation das MLL-AF4-Fusionsprotein produziert, hoch exprimiert (Guenther et al., 2008, Stumpel et al., 2011). Die Behandlung der leukämischen Zellen mit dem

demethylierenden Agens Zebularin führte zumindest in Zellkultur zu einer Verringerung des wild-typischen MLL-Transkripts und auch zu einer Erniedrigung der Zeb2-Expression (Stumpel et al., 2011).

2.3.4 Zeb2 in der Embryonalentwicklung

Die Arbeitsgruppe um Prof. Huylebroeck (Leuven, Belgien) leistete einen entscheidenden Beitrag zur Identifizierung und Charakterisierung des Proteins Zeb2. Das Protein wurde dort ursprünglich in einem Screeningverfahren isoliert und seine Rolle als transkriptioneller Repressor insbesondere des BMP-4 Signalweges beschrieben. Von derselben Arbeitsgruppe wurde eine konventionelle Zeb2 KO Maus generiert. Diese zeigte aufgrund ausgeprägter Entwicklungsstörungen, insbesondere in der Entwicklung des zentralen Nervensystems durch ein Fehlen des Verschlusses des Neuralrohrs und dem kompletten Fehlen des ersten Kiemenbogens, eine frühe embryonale Letalität (Van de Putte et al., 2003). Um den Tag E8.5 p.c. manifestierte sich eine Wachstumsretardierung, die dann um den Tag E9.5 zum Tod des Embryos führte. Später stellte die gleiche Arbeitsgruppe eine konditionale Zeb2 KO Maus basierend auf dem Cre-LoxP-Prinzip (Higashi et al., 2002) her. Dadurch wurde zum einen die gezielte Untersuchung der neuronalen Entwicklung in Zeb2-defizienten Mäusen unter selektiver Deletion des Gens in der Neuralleiste ermöglicht, so dass ein Mausmodell der Mowat-Wilson Erkrankung zur Verfügung steht (Van de Putte et al., 2007). Zum anderen kann nun durch eine beliebige Kombination mit weiteren transgenen Cre-

Rekombinase-exprimierenden Mausstämmen eine gezielte Deletion des Gens in gewünschten Geweben erfolgen. Die Nutzung des Cre-Lox Systems unter der Kontrolle des Mx1-Promotors zur Induktion der Deletion in hämatopoetischen Stammzellen ermöglicht auch die Untersuchung der Bedeutung von Zeb2 in der adulten Hämatopoese.

2.3.5 Der Einfluss von Zeb2 auf die embryonale Hämatopoese

Eine genaue Beurteilung der Rolle von Zeb2 in der Hämatopoese war bis vor Kurzem nicht möglich, da es noch kaum Untersuchungen dazu gab. In Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern aus Belgien (Prof. Dany Huylebroeck, Leuven und Prof. Jody Haigh, Ghent) konnten wir erste Einblicke in die Rolle von Zeb2 in der embryonalen Hämatopoese gewinnen. Da eine konventionelle Deletion von Zeb2 zu einer sehr frühen Letalität der Embryonen noch vor der Entwicklung der Hämatopoese führt, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Haigh das System einer konditionalen Deletion von Zeb2 genutzt. Hierbei wurde ein Mausstamm, der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Tie2-Promoters (Angiopoetin-1-Rezeptor) exprimiert, mit der Zeb2^{flox(ex7)}-Linie gekreuzt. Die Expression von Tie2 wiederum ist beschränkt auf Endothelzellen und frühe hämatopoetische Stammzellen (Arai et al., 2004). Somit konnte eine gezielte Deletion von Zeb2 in hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen erfolgen ohne die ZNS bedingte Letalität zu induzieren. Auf diese Weise sollte der Einfluss der Zeb2-Deletion auf die Hämatopoese und Angiogenese untersucht werden. Interessanter-

weise führte auch die konditionale Deletion von Zeb2 in hämatopoetischen Stammzellen und Endothelzellen zum Tod der Embryonen, wenngleich zu einem etwas späteren Zeitpunkt, um den Tag E12.5. Als Todesursache zeigten sich bei allen Zeb2-KO Embryonen großflächige Hirnblutungen, insbesondere im Bereich der Ganglien (Goossens et al., 2011). Allerdings konnte keine offensichtliche Auffälligkeit in der Entwicklung der Blutgefäße als Blutungsursache festgestellt werden. Ein identischer Phänotyp wurde beobachtet als das stammzellspezifische Vav-iCre System (de Boer et al., 2003) benutzt wurde um Zeb2 in embryonalen hämatopoetischen Stammzellen zu eliminieren. Damit konnte zusätzlich die vaskuläre Genese der Blutungen ausgeschlossen werden. Hingegen wurden in Zeb2-mutanten Embryos deutliche Abnormalitäten in der Hämatopoese festgestellt. In Zeb2-KO Embryos zeigte sich bereits im Entwicklungsstadium E11.5 eine deutliche Reduktion hämatopoetischer Zellen (definiert als CD45-positive Zellen). Um die Ursache des Verlusts hämatopoetischer Zellen in Zeb2^{Tie2 fl/fl} Embryos weiter zu erforschen wurden in-vitro Differenzierungsversuche durchgeführt. Dabei zeigte sich eine ausgeprägte Reduktion der Fähigkeit der hämatopoetischen Vorläuferzellen sowohl aus der AGM als auch aus der fötalen Leber, hämatopoetische Kolonien in vitro (in Methylzellulose) zu bilden. Die genaue Ursache für den Mangel hämatopoetischer Zellen in den Zeb2-cKO Tieren ist noch ungeklärt und ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Es könnte sich hierbei sowohl um einen Block in der Differenzierung von primitiven Stammzellen zu Progenitor-Zellen als auch um einen

Zellzyklusarrest oder Zelltod durch Apoptose handeln (Goossens, Janzen et al., Blood, 2011).

Die physiologische Rolle von Zeb2 für die Regulation adulter hämatopoetischer Stammzellen war bis dato jedoch völlig unbekannt. Die Untersuchungsergebnisse aus der embryonalen Hämatopoese und der Rolle in der Leukämie-Entwicklung weisen jedoch auf eine wichtige regulatorische Bedeutung dieses Proteins in der Hämatopoese hin. Neue Erkenntnisse zur Regulation hämatopoetischer Stammzellen durch Zeb2 könnten sowohl ein besseres Verständnis der Stammzellbiologie als auch neue Aspekte in der Entstehung maligner Erkrankungen erbringen.

2.4 Stand des Projekts zu Beginn der Arbeit

Zur Charakterisierung von Genen, die das Wachstum und die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen beeinflussen, war ursprünglich eine subtraktive Hybridisierung zwischen humanen CD34-positiven Blutstammzellen, die mit differenzierungsinduzierenden Zytokinen (IL-1/IL-3/IL-6/G-CSF/GM-CSF/SCF) stimuliert wurden, und Zellen, die mit sog. „early acting“ Zytokinen (SCF/TPO/Flt-3) stimuliert wurden, durchgeführt worden (Methode beschrieben in Stier et al., 2000). Dabei konnten mehrere Gene identifiziert werden, die unter dieser Stimulation unterschiedlich exprimiert wurden. Eines der auf diese Weise detektierten Gene war Zeb2. Es zeigte sich dabei eine höhere Expression von Zeb2 in den Zellen, welche mit den „early acting“ Zytokinen stimuliert wurden im Vergleich zu den mit differenzie-

rungsinduzierenden Zytokinen stimulierten Zellen. Eine weitere Definition der Rolle von Zeb2 in vivo war zunächst nicht möglich, da die Entwicklung der definitiven Hämatopoese in der embryonalen Leber um den Tag E 10,5-12,5 stattfindet (Kim et al., 2006; Medvinsky and Dzierzak, 1998; Medvinsky and Dzierzak, 1996; Muller et al., 1994) eine konventionelle Deletion des Gens jedoch einen embryonal letalen Phänotyp mit deutlichen Abnormalitäten in der frühen embryonalen Entwicklung um Tag E8,5 und im Folgenden einer weiteren Wachstumsretardierung mit Tod um den Tag E9.5 zur Folge hatte (Van de Putte et al., 2003).

Um eine mögliche Rolle von Zeb2 in der Regulation adulter muriner hämatopoetischer Stammzellen überhaupt in Betracht zu ziehen und eine Rationale für weitere Untersuchungen zu schaffen, untersuchten wir die Expression von Zeb2 in primitiven hämatopoetischen Zellen und verglichen es mit dem von isolierten Progenitorpopulationen (CMP, GMP und MEP), dem Gesamtknochenmark und reifen Leukozyten aus dem peripheren Blut. Hierbei zeigte sich, dass in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen eine hohe Expression von Zeb2 vorliegt, die es sinnvoll erscheinen ließ, die Rolle von Zeb2 in der Hämatopoese eingehend zu untersuchen.

2.5 Mausmodell

2.5.1 Die Cre-LoxP-Technologie

Das Cre-LoxP System wurde Ende der achtziger Jahre von Brian Sauer (Sauer, 1987) in *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt und mittlerweile auf

eine Vielzahl von Modellorganismen übertragen. Es handelt sich dabei um ein Rekombinationssystem, das auf dem Enzym Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 basiert und ein gezieltes Ausschneiden bekannter DNA-Sequenzen ermöglicht. Die Cre-Rekombinase erkennt spezifische Stellen in der DNA, sogenannte LoxP-Sequenzen, und schneidet im Zuge der Rekombination den DNA-Abschnitt zwischen zwei flankierenden LoxP-Stellen heraus. Für einen konditionalen Knock out bringt man nun zuerst ein genetisches Konstrukt mit der DNA-Sequenz für die Cre-Rekombinase in Kombination mit dem gewünschten gewebespezifischen Promotor in seinen Zielorganismus ein. In einem zweiten Schritt flankiert man den DNA-Abschnitt für das Gen, das man eliminieren möchte, mit den besagten LoxP-Rekombinationsstellen. Folglich wird im Zielorganismus in allen Zellen, die den gewählten gewebespezifischen Promotor aktivieren, der flankierte DNA-Abschnitt des Zielgens herausgeschnitten und somit das Gen eliminiert (Kuehn et al., 1995). Auf dieser Technologie basieren heutzutage zahlreiche Systeme in der Maus, die die Cre-LoxP-Technologie nutzen, um Gene auszuschalten oder auch überzuexprimieren. Dasselbe System kann auch zur Überexpression eines Zielgens verwendet werden. In diesem Falle wird ein Konstrukt in das Genom der Maus eingebracht, welches einen Promotor (z.B. den ROSA26-Promotor), gefolgt von einer Stopp-Kassette und der DNA Sequenz für das überzuexprimierende Gen trägt. In diesem Konstrukt ist die Stopp-Kassette von LoxP-Sequenzen flankiert. Bei Aktivierung der Cre-Rekombinase wird dann die Stopp-Kassette zwischen dem Promotor und

dem zusätzlich eingebrachten Zielgen herausgeschnitten und die Sequenz zur Überexpression wird abgelesen (Mao et al., 2001).

2.5.2 Konkretes Mausmodell

Die für das vorliegende Projekt benötigten Tiere wurden durch die Kreuzung zweier bereits vorhandener Mausstämme gewonnen. Die konditionale *Zeb2^{flox(ex7)}*-Maus wurde im Labor von Prof. Danny Huylebroeck in Leuven hergestellt. Dafür wurde das Exon 7 des *Zeb2*-Gens, welches ungefähr die Hälfte der gesamten kodierenden Sequenz des *Zeb2* Proteins, einschließlich der meisten funktionalem Domänen (N-Terminus Zinkfinger Clusters (NZF), Smad Binding Domain (SBD) und C-terminal Binding Protein (CtBP)) beinhaltet, durch *Lox-P* Abschnitte flankiert (Abbildung 3) (Van de Putte et al., 2003).

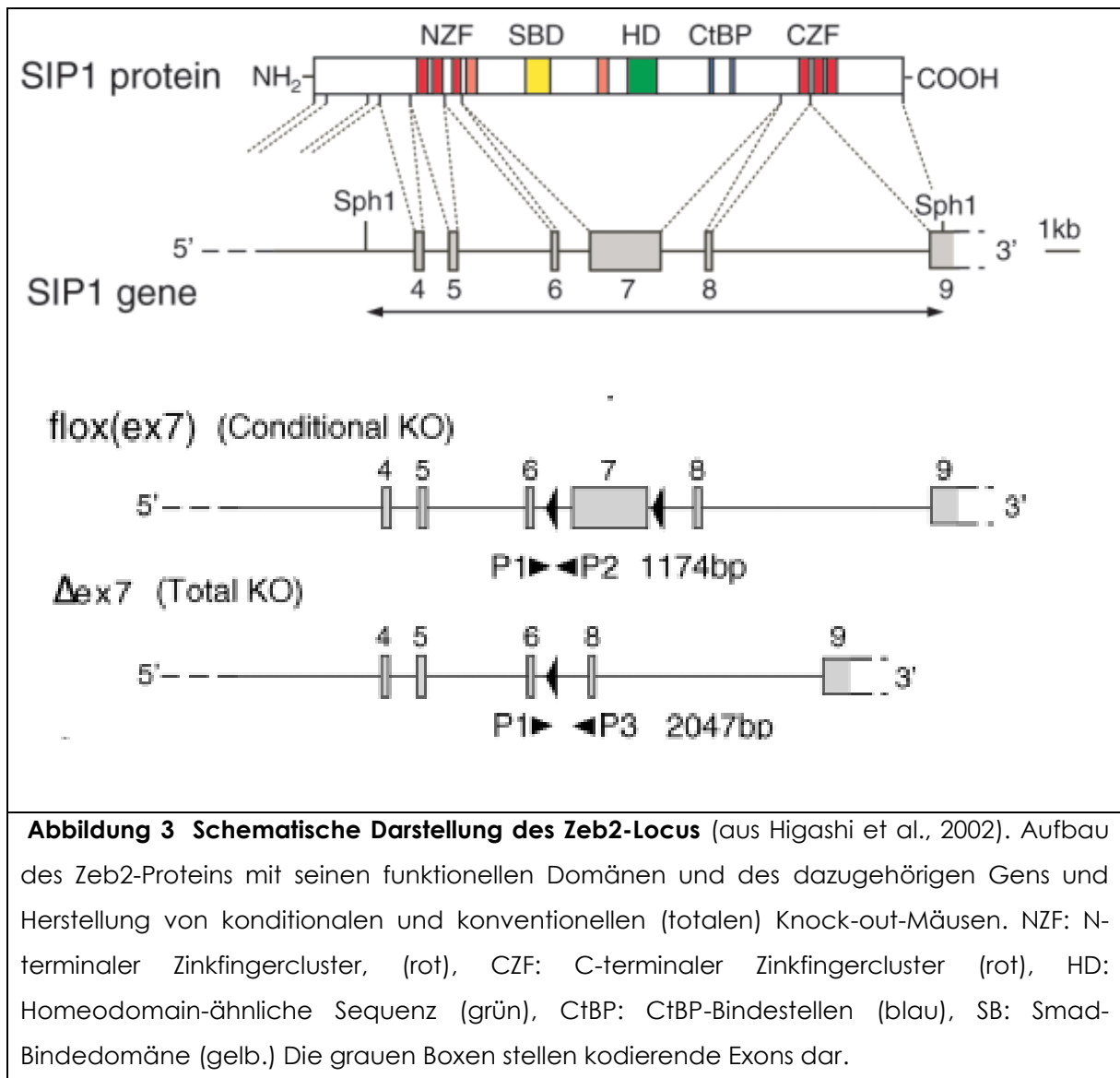


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Zeb2-Locus (aus Higashi et al., 2002). Aufbau des Zeb2-Proteins mit seinen funktionellen Domänen und des dazugehörigen Gens und Herstellung von konditionalen und konventionellen (totalen) Knock-out-Mäusen. NZF: N-terminaler Zinkfingercluster, (rot), CZF: C-terminaler Zinkfingercluster (rot), HD: Homeodomain-ähnliche Sequenz (grün), CtBP: CtBP-Bindestellen (blau), SB: Smad-Bindedomäne (gelb.) Die grauen Boxen stellen kodierende Exons dar.

Zur Untersuchung der Rolle von Zeb2 in hämatopoetischen Stammzellen soll das Gen im hämatopoetischen Kompartiment adulter Mäuse eliminiert werden. Der Mx1-Promotor ist in gesunden Mäusen inaktiv und kann durch Applikation von Interferon alpha, Interferon beta oder endogener Stimulation der Interferonexpression mittels Applikation synthetischer doppelsträngiger RNA (Poly(I:C)) aktiviert werden (Kuhn et al., 1995). Die Poly(I:C)-Behandlung führt zu einer endogenen Interferonausschüttung und somit zu einer Aktivierung des Mx1-Promotors in den behandelten Tieren.

Das in diesem Projekt benutzte Mausmodell mit induzierter konditionaler Zeb2-Deletion in der Hämatopoese wird nachfolgend als Zeb2-chKO bezeichnet.

Die Zeb2^{fl_{ox}(ex7)}-Mäuse wurden mit einer Mauslinie verpaart, in der die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Mx1-Promotors exprimiert wird, um eine gezielte Elimination des Exons 7 zu erzielen. Die Cre-Rekombinase erkennt die Lox-P Abschnitte in der DNA und eliminiert die entsprechende flankierte Stelle aus dem Genom (Abbildung 3 und Abbildung 4). Eine auf diese Weise erzeugte Deletion des Exon 7 durch Cre-Rekombinase führt zu einem kompletten Fehlen des Zeb2- Proteins (Higashi et al., 2002).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Nachdem Zeb2 in oben beschriebenen Hybridisierungsscreen identifiziert und die Expression des Genes in hämatopoetischen Stammzellen bestätigt worden war, war die Rationale zur Untersuchung der Rolle von Zeb2 in der Regulation hämatopoetischer Stammzellen gegeben. Die Rolle von Zeb2 in der adulten Hämatopoese war bisher nicht untersucht worden.

Da ein klassischer Knock out des Gens, wie bereits beschrieben, embryonal letal ist und auch ein konditionaler Knock out im hämatopoetischen System immer noch eine frühe embryonale Letalität aufweist, wurde diese Arbeit auf der Grundlage eine induzierbaren, konditionalen Knock out-Modells unter Kontrolle des Mx1-Cre-Promotors durchgeführt. So konnten die Mäuse ohne Einschränkung gezüchtet werden und zu einem adulten Tier heranwachsen. Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, die Rolle von Zeb2 in der

Regulation adulter hämatopoetischer Stammzellen zu definieren. Dabei sollte zunächst der Phänotyp des Knock outs von Zeb2 in der adulten Hämatopoese charakterisiert und im Folgenden der Wirkmechanismus des Gens bzw. Proteins durch molekulare Analysen entschlüsselt werden.

3 Materialien

3.1 Bezugsquellen für die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Roth
Acetylthiocholiniodid	AppliChem
Agarose, PeqGOLD	Peqlab
Borsäure	Merck
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Serva
BSA (Bovine serum albumin)	Roth
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Molecular Probes, Invitrogen
Dinatriumhydrogen-Phosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Ethylendiamidtetraacetat (EDTA)	Sigma
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll	Sigma
Fötales Kälberserum (FBS)	PAA
Formaldehyd, 4% und 10%	Merck
Glycerol	Merck
Harris Hämatoxylin-Lösung	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumdihydrogen-phosphat	Merck
Kaliumferricyanid	Merck
Kupfersulphat	Merck
Ly2157299	SelleckBio, über Biozol
Magnesiumchlorid	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Natriumcitrat	Roth
Penicillin-Streptavidin, 100x	Gibco, Life Technologies
Polyinositic-polycytidylic acid	Amersham Biosciences, NJ, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco, Life technologies
Ruxolitinib	SelleckChem, über Biozol
Salinomycin	Sigma Aldrich
Tris-Base	Sigma Aldrich

Tris-HCl	Sigma-Aldrich
XAV939	Stemgent, Miltenyi Biotech

Tabelle 1 Bezugsquellen für die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

3.2 Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen

Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung	Verwendung
Färbepuffer	PBS, 1% Fetal Calf Serum	Färbepuffer für FACS
TE-Puffer	10 mM Tris, pH 7,5 1 mM EDTA	Lösung von DNA
TBE-Puffer	90 mM Tris/HCl, pH 8.3 90 mM Borsäure 2.5 mM EDTA	Laufpuffer für die Agarosegel-Elektrophorese

Tabelle 2 Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen

3.3 Geräte und Anwendungen

3.3.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Lichtmikroskop und zugehörige Kamera	Nikon eclipse 50i
Geldokumentation	ChemiDoc XRS+, Biorad
Blutbild-Analyzer	Hemavet 950 von Drew Scientific
Durchflusszytometer	FACS Canto II von Becton Dickinson
PCR-Cycler	Mastercycler Pro, Eppendorf
qPCR-Cycler	Mastercycler Realplex ² , Eppendorf
Nano-Photometer	ND-1000 Spektrophotometer, NanoDrop Wilmington DE, USA

Tabelle 3 Geräte

3.3.2 Computergestützte Analyse von DNA- und Proteinsequenzen

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Software und Datenbanken.

Name des Programms Bzw. der Datenbank (Referenz oder Hersteller)	Verwendung, URL
BLAST Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1990)	BLAST findet Regionen von lokaler Sequenzähnlichkeit in Nukleotid- oder Aminosäure-Sequenzen. Die zu untersuchende Sequenz wird mit den Sequenzen, die in einer definierten Sequenz Datenbank (z.B. das Genom von <i>Mus musculus</i>) vorhanden sind, verglichen. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
Primer BLAST NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome Tool zum Primerdesign.
qBase Plus Biogazelle	Softwaretool zur Auswertung von qRT-PCR-Daten
FACS Diva Software BD Biosciences	Für FACS Canto II, Durchflusszytometer von BD Biosciences, Aufnahme von durchflusszytometrischen Daten.
FlowJo Treestar	Software zur Analyse von durchflusszytometrischen Daten
NCBI National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ Literaturdatenbanken, Molekulare Datenbanken, Sequenzdatenbanken und Software
Microsoft Office Mikrosoft	Word, Excel, PowerPoint
GraphPad Prism 5 GraphPad Software Inc.	Überlebenskurve nach Kaplan-Meier

Tabelle 4 Verwendete Software und Datenbanken

4 Methoden

4.1 Mäuse

4.1.1 Mauszucht und Haltung

Die Zucht und Haltung der Mäuse erfolgte im Haus für experimentelle Therapie (HET, Tierhaltung) der Universität Bonn. Verpaarung, Absetzen und Genotypisierung wurde von uns, die Haltung der Tiere vom Personal des HET durchgeführt. Alle Tierversuche wurden beim Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW in Recklinghausen angezeigt bzw. beantragt und bewilligt.

4.1.2 Verwendete Mausstämme

- $Zeb2^{flox(ex7)}$
- Mx1-Cre
- C57BL/6 Wildtypen (BL/6NCrl)

4.1.3 Rückkreuzung

Die Charakterisierung der hämatopoetischen Stammzell- und Progenitorpopulationen ist am besten im C57BL/6 Mausstamm definiert. Die $Zeb2^{flox(ex7)}$ Mäuse wurden allerdings ursprünglich im CD1-Mausstamm generiert. Daher war zunächst die Rückkreuzung der Mäuse in den C57BL/6 Mausstamm nötig. Dies hat zum Ziel, einen einheitlichen genetischen Hintergrund zu erzeugen, um Knochenmarktransplantationen im

congenen System durchführen zu können. Gleichzeitig sollen mögliche Schwankungen in der Genexpression zwischen verschiedenen Mausstämmen reduziert werden. Erfahrungsgemäß wird für das Erreichen eines genetischen Hintergrunds, der eine Transplantation erlaubt, eine Rückkreuzung über mindestens sechs Generationen benötigt. Auch der Mx1-Cre-Mausstamm war zunächst nicht im C57Bl/6-Hintergrund. Deshalb wurden die Tiere nach Kreuzung und Erhalt einer Maus, die sowohl ein gefloxtes Allel von Zeb2 als auch das Mx1-Cre-Transgen trug, über sechs Generationen immer unter Erhalt der genetischen Modifikationen zurückgekreuzt.

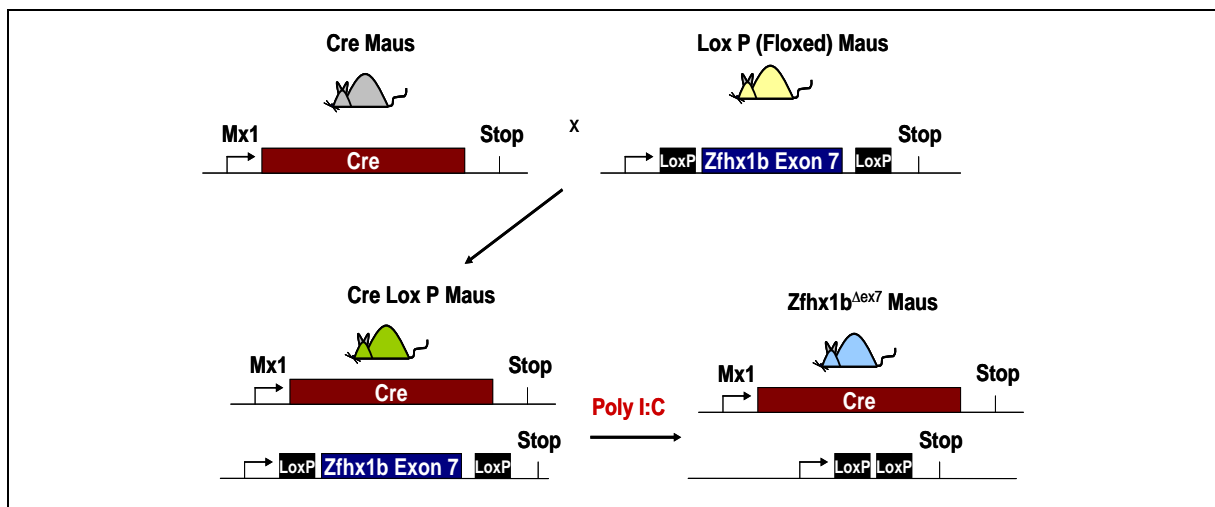


Abbildung 4 Zucht- und Induktionsschema und Induktion der Gendeletion durch Applikation von Poly(I:C).

Eine Mauslinie, die transgen den Mx1-Cre-Promotor trägt und eine transgene Mauslinie, bei der das Exon 7 des endogenen Zeb2-Gens mit LoxP-Stellen flankiert ist, wurden gekreuzt und über mehrere Generationen untereinander verpaart, so dass Tiere entstanden, die sowohl den Mx1-Cre-Promotor als auch beide Allele des Zeb2-Gens in gefloxter Form tragen. Diese Tiere konnten durch Behandlung mit Poly(I:C) in die hier verwendeten konditionalen Hämatopoese-spezifischen Zeb2-Knock-out-Mäuse verwandelt werden.

4.1.4 Blutentnahme

Die Gewinnung von peripherem Blut erfolgte mittels Punktion des Retrobulbärplexus mit einer heparinisierten Glaskapillare. Die Blutentnahme aus dem retrobulbären Plexus erfolgte in Narkose. Hierfür wurde vor dem Eingriff Ketamin 100 mg/kg Körpergewicht + Xylazin 16 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert.

4.1.5 Gewinnung von Knochenmark und anderen Organen/Geweben

Zur Gewinnung von Knochenmark oder Organentnahme (Milz) wurde das entsprechende durch CO₂-Inhalation Tier getötet. Für Untersuchungen des Knochenmarks wurden die Röhrenknochen der Hinterbeine der Maus heraus präpariert und mit einer feinen Kanüle an einem Ende angebohrt. Im Anschluss wurde das Knochenmark mit SB (Staining buffer) ausgespült, mit einer Pipette vorsichtig resuspendiert und durch einen 70 µm-Filter (BD) gegeben. Milz oder Leber wurden nach Öffnen des Bauchraums vorsichtig heraus präpariert und in SB gelagert.

4.1.6 Knochenmarktransplantationen

Für Knochenmarktransplantationen wurden 2×10^6 Zellen Gesamtknochenmark pro Maus von ca. 14 Wochen alten (8 Wochen nach der Induktion) Donoren (Zeb2-defiziente Mäuse bzw. dazugehörige Kontrollen, littermates, CD45.1/2-heterozygote Tiere) in letal bestrahlte (10 Gy, geteilte Dosis) Empfängermäuse injiziert. Pro Gruppe wurden jeweils

zehn weibliche BL/6-Mäuse (CD45.2) verwendet. Die Effizienz des Engraftments wurde am Durchflusszytometer als Beitrag der jeweiligen Donorzellen (CD45.1/2-heterozygote Zellen) zum Blut der Empfängertiere gemessen. Die Blutanalysen wurden 4, 8, 12 und 16 Wochen nach Transplantation durchgeführt. Im Falle einer seriellen Transplantation wurden die Empfänger nach zwölf Wochen als Donoren für die nächste Runde der Transplantation verwendet. Außerdem wurde ein Teil des Knochenmarks auf den Anteil der vom Donor abstammenden hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen hin untersucht. Die Transplantationen wurden nach der zweiten oder dritten Runde beendet, abhängig davon, wie hoch der Anteil der Testzellen im Vergleich zum Kompetitor noch war, und wie die Blutwerte der Empfängertiere aussahen. Für die kompetitive Transplantation wurden jeweils 1×10^6 Kontroll- oder Zeb2-defiziente Zellen (CD45.1/2) des Gesamtknochenmarks mit 1×10^6 Wildtyp-Kompetitorzellen (CD45.1) gemischt und nach letaler Bestrahlung in die Empfängermäuse (CD45.2) injiziert. Die anteilige Wiederherstellung des Bluts wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse des Blutes zu den oben genannten Zeitpunkten untersucht.

4.2 Automatisierte Blutanalyse

Peripheres Blut wurde wie oben beschrieben entnommen und in EDTA-beschichteten Gefäßen gesammelt. Anschließend wurde es maximal zwei

bis drei Stunden nach der Entnahme mit dem automatischen Blutanalyser Hemavet 950 der Firma Drew Scientific (Dallas, USA) gemessen. Hiermit wurden die Werte für die gesamten weißen Blutzellen, Erythrozyten, Hämoglobin, MCV (mean corpuscular volume) und Blutplättchen, inklusive MPV (mean platelet volume) bestimmt. Eine weitere Unterteilung der weißen Zellen in B- und T-Zellen, Granulozyten und Monozyten wurde mittels FACS-Färbung erreicht (siehe 4.3.1).

4.3 Durchflusszytometrische Analysen

4.3.1 Blut

Das gerinnungsgehemmte Blut wurde zunächst in einem Schritt einer Erythrozytenlyse unterzogen und fixiert (mittels BD FACS Lysing-Puffer, eingesetzt nach Protokoll des Herstellers) und anschließend mit SB (PBS mit 1% FBS) gewaschen. Anschließend wurden die Blutzellen mit Antikörpern gegen gängige Marker für die differenzierten Zellen des Blutes gefärbt. Standardmäßig wurden die Antikörper B220-PerCP, CD3e-PE-Cy7, Gr1-eF660, Mac1a-FITC oder ggf. Mac1a-eF450 verwendet. Zusätzlich wurde auch mit CD45-PE oder bei transplantierten Tieren mit CD45.1-PE and CD45.2-FITC gefärbt. Alle Antikörper wurden von eBioscience (San Diego, USA) gekauft und waren spezifisch für Maus, soweit nicht anders angegeben.

4.3.2 Knochenmark

4.3.2.1 Stamm-und Progenitorzellen

Für die Färbung von Stamm- und Progenitorzellen wurden die Knochenmarkzellen zum einen mit einem Cocktail von biotinylierten Antikörpern für Reifemarker gefärbt, der aus Mac-1a (CD11b), Gr-1 (Ly-6G und Ly-6C), Ter119 (Ly-76), and B220 (CD45R) besteht (Lineage-Cocktail). In einem zweiten Schritt wurden alle reifen Zellen mit eF450- oder PerCP-markierten-Streptavidin anfärbt. Zusätzlich wurden die Zellen mit den Antikörpern c-Kit-APC, Sca1-PE-Cy7 (Ly 6A/E), CD150-AF488 (Biolegend) and CD48-PE markiert. Bei transplantierten Mäusen wurden zusätzlich die Marker CD45.1 (PE) and anti-CD45.2 (FITC) mitgefärbt.

Wenn verschiedene Progenitorpopulationen näher analysiert werden sollten, wurde zusätzlich zum oben beschriebenen Lineage-Cocktail (PerCP) mit c-Kit-APC, Sca-1-PE-Cy7, CD34-FITC, CD16/32-PE und CD127-APC-eF780 gefärbt.

4.3.2.2 Apoptoseassay: AnnexinV/Dapi-Färbung

Für die AnnexinV-Dapi-Färbung zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in primitiven Knochenmarkskompartiment, wurde der AnnexinV-FITC-Kit von BD Biosciences and Dapi vom Molecular Probes/Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.3.2.3 Proliferationsassay: BrdU-Inkorporation

Für den BrdU-Inkorporationsassay wurde mit dem FITC BrdU Flow Kit (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Die Testmäuse bekamen 24 Stunden vor der Tötung/Präparation BrdU in einer Konzentration von 1 mg/ml über das Trinkwasser verabreicht. Die Oberflächenmarker für HSC wurden wie bereits oben beschrieben gefärbt.

4.3.2.4 Zellzyklus-Färbung: Ki-67/Dapi

Um den Zellzyklus in der primitiven Population des Knochenmarks zu untersuchen, wurden die Zellen wie oben beschrieben mit dem Lineage-Cocktail, cKit-APC Sca-1 PE-Cy-7 gefärbt. Zusätzlich wurde mit einem Antikörper gegen Ki-67 (FITC) and DAPI gefärbt. Da Ki-67 ein intranukleäres Protein ist, wird für diese Färbung eine effiziente Fixierung und Permeabilisierung der Zellen bis in den Kern hinein benötigt. Dafür wurden die Zellen gemäß Angaben des Herstellers mit den Reagenzien des BrdU-Flow-Kits von BD Biosciences behandelt.

4.4 Zellsortierung

Wenn eine qRT-PCR durchgeführt wurde, wurden dafür die verschiedenen Zellpopulationen aus Blut und Knochenmark aufgereinigt. Dafür ist bei Blut einer Lyse der Erythrozyten mit Ammoniumchlorid-Lösung erforderlich, für das Knochenmark war dies nicht notwendig, da der Anteil der Erythrozyten gering ist. Dafür fand beim Knochenmark vor der Färbung der Zellen noch

eine MACS-basierte Depletion aller Lineage-positiven Zellen statt, um unerwünschte Zellen bereits vor dem Sort zu entfernen und somit die Reinheit der erhaltenen Zellpopulationen im Sort zu erhöhen.

Nach Lyse der Erythrozyten bzw. Lineage-Depletion wurde die jeweilige Einzelzellsuspension von Blut oder Knochenmark mit den entsprechenden Markern gefärbt und anschließend bei der FACS-Core-Facility auf einem Aria II Zellsorter von BD sortiert. Die Sorts wurden vom Personal der FACS Core Facility durchgeführt. Wenn Zellpopulationen zur RNA-Isolation sortiert wurden, wurden diese gekühlt sortiert, auf Eis transportiert und nach dem Sort direkt schockgefroren und bei -80°C gelagert. Wenn Zellpopulationen in Kultur genommen wurden, wurden sie gekühlt sortiert und nach dem Sort gleich in Kultur genommen.

4.5 Genotypisierung

4.5.1 Qualitative PCR

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG/Operon (Ebersberg) bezogen. Falls die Primersequenzen nicht bereits bekannt waren (aus vorhandenen Unterlagen im Labor bzw. von unseren Kooperationspartnern), wurden sie mit Hilfe des Programms Primer Blast (NCBI homepage) designed, das die Überprüfung verschiedener Kriterien für Primer bzw. Primerpaare erlaubt (relativ hohe Spezifität für die zu amplifizierende Sequenz; keine zu stabilen "Haarnadelschleifen" mit sich selbst, keine "Duplexes" untereinander; GC-Gehalt von etwa $50 \pm 5\%$; hohe Stabilität der Bindung an die Ziel-

DNA im 5'-Bereich mit Abfall zum 3'-Ende; 1 oder 2 G bzw. C am 3'-Ende, da DNA-Polymerasen an einem fest sitzenden Ende leichter ansetzen).

Primer zur Genotypisierung (qualitative PCR)

Bezeichnung	Sequenz
Zeb2-Intron6F	GAACTAGTTGAATTGGTAGAATCAATGGGG
Zeb2-Intron6R	GTAAAGGCTCTCTACGCCTTTTTCAGTTAG
Zeb2-Intron7F	AAGCATGTCGGTAAGCTGACCAACTACTAG
MxCreF	CATGTGTCTTGGTGGGCTGAG
MxCreR	CGCATAACCAGTGAAACAGCAT

Tabelle 5 Primer zur Genotypisierung

Die Genotypisierungs-PCRs wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Substanz	Ausgangs-Konzentration	Eingesetztes Volumen	Endkonzentration
Bidestilliertes Wasser		10 µl	
10x Reaktionspuffer	10x	2,5 µl	1x
dNTPs	4 x 2,5 mM	5 µl	4 x 0,25 mM
Polymerase	Taq: 5 u/µl	0,5 µl	ca. 2,5 u
Primer (fw und rev)	10 pmol/µl	je 2 µl	0,4 pmol/µl
Template-DNA	ca. 0,01 µg/µl	1 µl	2 x 10 ⁻⁴ µg/µl (ca. 10 ng DNA)

Tabelle 6 Pipettierschema für PCR

Zyklen	Dauer	Temp	Vorgang
1x	60 Sekunden	94°C	Denaturierung
30x	30 Sekunden	94°C	Denaturierung
	30 Sekunden	60°C	Hybridisierung
	1 Minute	72°C	Elongation
1x	2 Minuten	72°C	Auffüllen unvollständiger Produkte

Tabelle 7 Standard-Programm für Genotypisierungs-PCRs

4.5.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Agarosegele erlauben die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 40 – 40000 bp. Zur Herstellung 1%iger Agarosegele wurde die Agarose (1 g pro 100 ml) in 1 x TBE Puffer unter Kochen in der Mikrowelle gelöst, mit Ethidiumbromid (0.5 µg/ml Endkonzentration) versetzt und in die Gelkammer gegossen. DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen eines 6 x DNA-Ladepuffer (0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol FF, 30% Glycerol, 100 mM EDTA pH 8.0) versehen und in die Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert während des Laufs in die DNA, wodurch die Auftrennung der DNA-Fragmente im UV-Licht (312 nm) betrachtet werden kann. Die Gele wurden mit dem ChemiDoc XRS+-System von Biorad fotografiert. Zur Längenbestimmung der Fragmente dienten Standards definierter Fragmentlängen, die 100 bp-DNA-Leiter von peqlab.

4.6 RNA-Extraktion, Reverse Transkription und semi-quantitative Real Time PCR

4.6.1 Reagenzien und Kits

Alle experimentellen Methoden bezüglich der qRT-PCR wurden in Übereinstimmung mit den MIQE-Richtlinien (**M**inimal **I**nformation for Publication of **Q**uantitative Real Time PCR **E**xperiments) etabliert und durchgeführt.

Die Gesamt RNA aus sortierten Zellpopulationen wurde mit dem Ambion PureLink RNA mini Kit extrahiert und die RNA-Konzentration mit einem Nanodrop Spektrophotometer (peqlab) gemessen. Anschließend wurde die reverse Transkription zu cDNA mit dem high capacity cDNA transcription kit von life technologies durchgeführt. Die qPCR wurde mit dem TaKaRa Syber Premix Ex Taq kit auf dem Eppendorf Mastercycler ep Realplex durchgeführt.

Die Primer-Sequenzen kamen entweder aus bereits veröffentlichten Arbeiten, aus der RTPimerDB-Datenbank oder wurden selbst designed. Alle Primer wurden geblasted um die Sequenzspezifität zu überprüfen. Die Bildung von Sekundärstrukturen wurde auch analysiert und unerwünschte Eigenschaften ausgeschlossen. Die Primer wurden so ausgesucht, dass sie bei einer Temperatur von 59 bis 61°C binden und ein Amplikon von 80 bis 120 Basen bilden. Synthetisiert wurden sie von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

4.6.2 RNA-Isolation und Herstellung der cDNA

Nachdem die RNA gemäß den Angaben des Herstellers isoliert worden war, wurde ihre Qualität und Quantität mittels Messung am Nanodrop ermittelt. Wenn die Proben mit DNA kontaminiert waren, wurden sie mit dem PureLink Amplification grade DNase I Kit von Ambion verdaut, gemäß dem Protokoll des Herstellers. Anschließend wurden Aliquots der Proben auf eine Arbeitskonzentration von 10 ng/µl verdünnt. Die unverdünnte RNA wurde

direkt nach der Isolation bei -80°C , die verdünnten Proben bei -20°C gelagert.

Für die reverse Transkription wurden $5\ \mu\text{l}$ verdünnte RNA pro Probe in einem Reaktionsvolumen von $20\ \mu\text{l}$ verwendet und die cDNA gemäß den Herstellerangaben synthetisiert. Die Reaktionen wurden in einem Eppendorf PCR-Cycler durchgeführt. Die cDNA wurde anschließend direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

4.6.3 qPCR

Die qPCR-Reaktionen wurden in 96 well twin tec-Platten pipettiert und mit einer selbstklebenden Masterclear *real-time* PCR-Folie verschlossen, beides hergestellt von Eppendorf. In jedes well wurden $2\ \mu\text{l}$ cDNA und $18\ \mu\text{l}$ Syber Premix Reaktionsgemisch mit dem entsprechenden forward und reverse Primer gegeben. Jede Probe wurde mindestens als Duplikat gemessen. Das Amplifikationsprogramm beinhaltete immer eine Schmelzkurve am Ende, um sicherzustellen, dass die Vervielfältigung auch spezifisch für die Zielsequenz war.

Für jeden neuen Probenotyp wurde ein Panel von 10 Referenzgenen analysiert und zwar mit der geNorm software, die Teil des Software-Pakets qBase Plus von Biogazelle (Ghent, Belgium) ist. Damit konnte die minimale erforderliche Anzahl an erforderlichen Referenzgenen bestimmt werden und auch gezeigt werden, welche Referenzgene die stabilsten waren. Außerdem wurde für jedes eingesetzte Primerpaar eine Verdünnungskurve als Triplikat gefahren, um die Amplifikationseffizienz der Primer zu bestimmen.

In Fällen, in denen nicht alle Proben auf der gleichen Platte laufen konnten, wurden

inter-run calibrators verwendet.

Die qPCR-Daten wurden mit dem qBase Plus Softwarepaket von Biogazelle (Ghent, Belgium) analysiert. Die Ergebnisse sind als ein Verhältnis des mittleren Expressionslevels des Knock outs zum Wildtyp dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde der zweiseitige Student's t-test verwendet.

Bezeichnung	Sequenz
Zeb2Intron6-7 F	GGCAAGGCCTTCAAGTACAA
Zeb2Intron6-7 R	AAGCGTTTCTTGCAGTTTGG
mGAPDH F	AGAACATCATCCCTGCATCC
mGAPDH R	CACATTGGGGGTAGGAACAC
mYWHAZ2 F1	AGACGGAAGGTGCTGAGAAA
mYWHAZ2 R1	TCAAGAACTTTTCCAAAAGAGACA
mTBP F	TCTATTTTGGGAAGAGCAACAAAGAC
mTBP R	GAGGCTGCTGCAGTTGCTA
mCxcr4 F	AGCCAGTGTTGCCATGGAACCG
mCxcr4 R	CCGGAAGCAGGGTTCCTTGTTGG
mSlug F1	CTGCACTGTGATGCCCAGTCT
mSlug R1	TGTGGGTTCGAATGTGCATCT
mZeb1_F	GAAGACCAGCGGCAGGGCAC
mZeb1_R	ACGGGCAGGTGAGCAACTGG
mSnail1_F2	CACACGCTGCCTTGTGTCT
mSnail1_R2	GGTCAGCAAAGCACGGTT
mTCF7_F	ATCCTTGATGCTGGGATTCTG
mTCF7_R	CTTCTCTGCCTTGGGTTCTG
mFzd7_F	GCTTCCTAGGTGAGCGTGAC
mFzd7_R	AACCCGACAGGAAGATGATG
mId2_F	GACCCGATGAGCCTGCTATAC
mId2_R	GGTGCTGCAGGATTCCATCT
mPpbp_F	CAGCTCAGCCTCACGTTGT
mPpbp_R	GCCCATAATGAAGAGCAGTGA
mB-Act_F2	AGTGTGACGTTGACATCCGTA
mB-Act_R2	GCCAGAGCAGTAATCTCCTTCT
mGAPDH_F2	AGGTTGTCTCCTGCGACTTCA

mGAPDH_R2	GGTGGTCCAGGGTTTCTTACTC
mRunx1_F	GCAGGCAACGATGAAACTACT
mRunx1_R	GCAACTTGTGGCGGATTTGTA
mGata1_F	ACTGGCCTACTACAGAGAAGC
mGata1_R	GTAGAGTGCCGTCTTGCCATA
mGata2_F	CACCCCGCCGTATTGAATG
mGata2_R	CCTGCGAGTCGAGATGGTTG
mCxcr4_F2	GAAGTGGGGTCTGGAGACTAT
mCxcr4_R2	TTGCCGACTATGCCAGTCAAG
mltgb1_F	ATGCCAAATCTTGCGGAGAAT
mltgb1_R	TTTGCTGCGATTGGTGACATT
LipG2_F	ATGGATGGACGATGAGTGGC
LipG2_R	AACCACCACGACGTTAGCAT
LipG3_F	CCCATGTTGAAGGGGTGGA
LipG3_R	CCAAAGGACAGCGTGTAGGT
LipG4_F	GGCTTAGGGAAGTTCAGCCA
LipG4_R	AACCTTGCTGGGTCCTTAGC
Fap2_F	AGCGGGAAGCAACTCATGTC
Fap2_R	GCTGATTCTCACTGCACAGC
eGFP_F	CAAGCAGAAGAACGGCATCA
eGFP_R	AGGTAGTGGTTGTCGGGCA
mCyclinD_F2	GAGCTGCTGCAAATGGAAGT
mCyclinD_R2	ATCCGCCTCTGGCATTITGG
mHES-1_F2	AGAGGCGAAGGGCAAGAATA
mHES-1_R2	GAATGCCGGGAGCTATCTTCT
mSurvivin1_F1	GAGCCAAGAACAATAATTGCAAAGG
mSurvivin1_R1	TGCTCAATTGACTGACGGGT
mSurvivin3_F1	AGGGTGCTTCAAAGGTGGTT
mSurvivin3_R1	GACAAGGGCTTCTGACAATGC
mSFRP4_F2	CACTGACCTCCAGAAGATGTGA
mSFRP4_R2	CCTTTTGCCTTGCACCGA
mMeis1_F	TCCCAAAGTAGCCACCAATATC
mMeis1_R	CTGTATCTGTGCCAACTGCTT
mHoxa9_F	TGGCCGAACACCCCG
mHoxa9_R	CACCAAACACCGCCGC
mPknx1_F	ATGTTGGATTCCAGCTGCTC
mPknx1_R	GACAGGGACTGAAGCCTGTC
mCreb1_F	GTGTTACGTGGGGGAGAGAA
mCreb1_R	GGGCTAATGTGGCAATCTGT
mAxin2_F	CGCCACCAAGACCTACATACG
mAxin2_R	ACATGACCGAGCCGATCTGT

Tabelle 8 **Primer für qPCR**

Die qRT-PCRs und vorbereitende Arbeiten (RNA-Isolation und reverse Transkription) wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Hichem Gallala, Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Viktor Janzen an der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Bonn, durchgeführt.

4.7 Microarrays

Für die Microarrays wurden die entsprechenden Zellpopulationen mittels FACS-Sort gekühlt aufgereinigt und anschließend direkt schockgefroren. Sie wurden bis zum Versand bei -80°C gelagert und auf Trockeneis versandt. Isolation der RNA, reverse Transkription und Hybridisierung auf dem Genchip (Affymetrix) wurde von der Firma MFT Services, Tübingen ausgeführt. Die von MFT Services übermittelten Rohdaten wurden von Prof. Holger Fröhlich vom Bonn-Aachen International Center for Information Technology (B-IT, Universität Bonn) bioinformatisch analysiert.

4.8 Zellkultur

4.8.1 Colony Forming Cell Assay

Für die Kultur von CFCs (Colony Forming Cells) aus Mausknorpelmark wurde, falls nicht anders deklariert, das Medium MethoCult™ GF M3434 von Stem Cell Technologies verwendet. Dieses Methylcellulose-Medium ist mit verschiedenen Cytokinen versetzt und ermöglicht das optimale Wachstum von erythroiden Progenitoren (BFU-E), Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren (CFU-GM, CFU-M, CFU-G) und multipotenten granulozytären,

erythroiden, Makrophagen-, und megakaryozytären Progenitoren (CFU-GEMM). Das Medium wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. In Kürze wurden pro Vertiefung einer 6-well-Platte 10.000 Zellen Gesamtknochenmark in 125 µl IMDM-Medium aufgenommen und mit 1 125 µl M3434 vermischt und direkt ausplattiert. Von jeder 6-well-Platte wurden die äußeren vier Wells für CFCs und die mittleren zwei wells mit jeweils 3 ml PBS befüllt, um die notwendige Feuchtigkeit aufrechtzuerhalten. Die Kulturplatten wurden für 8 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend die Kolonien ausgezählt.

Für die Assays mit Inhibitoren wurden die in DMSO gelösten Stocks mit IMDM vorverdünnt und in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

Salinomycin: 500 nM; XAV939: 4 µM, Ruxolitinib: 800 nM, Ly2157299: 400 nM.

4.8.2 Colony-Forming-Unit-Megakaryozyten (CFU-Mk) Assay

Der CFU-MK Assay wurde mit Gesamtknochenmark nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Kit mit allen Lösungen und Instruktionen von Stem Cell Technologies. Pro Objektträger (mit jeweils zwei Kulturkammern) wurden insgesamt 1×10^5 Zellen in IMDM gemischt mit dem MegaCult-C Medium, Kollagen –Lösung und den Zytokinen TPO (Endkonzentration 50 ng/ml), IL-6 (Endkonzentration 20 ng/ml) und IL-3 (Endkonzentration 50 ng/ml) und auf die Kulturkammern aufgeteilt. Die Kulturen wurden anschließend sieben bis acht Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kulturen nach Angaben des Herstellers mit Hilfe einer Spacermembran und Filterpapier dehydriert und in

eisgekühltem Aceton fixiert. Zum Nachweis der Aktivität des Enzyms Acetylcholinesterase in den Megakaryozyten wurden die fixierten Kulturen mit einer Lösung aus Acetylthiocholiniodid, Natriumcitrat, Kupfersulphat und Kaliumferricyanid für 5 h inkubiert. Anschließend wurden sie mit 95% Ethanol refixiert und gewaschen. Zum Schluss wurde noch mit Harris Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt und mikroskopiert.

4.9 Histochemische Methoden

4.9.1 Immunhistochemische Färbungen and Gewebeschnitten

Immunhistochemische Färbungen wurden an Knochenmark, Milz und Leber durchgeführt. Dafür wurden die Entsprechenden Organe frisch entnommen und direkt in 4% Formaldehyd-haltiger Lösung über Nacht und bei 4°C fixiert. Milz und Leber konnten dann direkt zur Einbettung weiterverwendet werden, die Knochen mussten zuerst in einer mehrtägigen Prozedur schonend dekalzifiziert werden. Nach Fixierung und ggf. Dekalzifizierung wurden die Gewebe dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte und immunhistochemischen Färbungen (Giemsa, Hämatoxylin-Eosin (H&E) und Retikulinversilberung nach Gordon und Sweets) wurden am Institut für Pathologie der Universität Bonn (Leitung Prof. Dr. Christiansen) angefertigt und mit Frau Priv. Doz. Dr. Ines Gütgemann zusammen befundet.

Mehrere verstorbene Zeb2-chKO-Tiere und Kontrolle wurden komplett fixiert und zur Nekropsie zu Herrn Dr. Enrico Radaelli nach Mailand geschickt (zum

Zeitpunkt der Analysen tätig im Mouse & Animal Pathology Lab, Fondazione Filarete, Mailand, Italien).

4.10 Mikroskopie

4.10.1 Lichtmikroskopie

Zum Abfotographieren der immunhistochemischen Präparate wurde ein Eclipse 50i-Mikroskop von Nikon samt zugehöriger Kamera verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung einer Mauskolonie mit konditionaler Zeb2-Deletion in hämatopoetischen Stammzellen und Untersuchung des Einflusses von Zeb2 auf die Hämatopoese in einem „loss-of-function“ Modell

Wie zuvor bereits beschrieben, entwickelte die Arbeitsgruppe um Prof. Huylebroeck eine konditionale Zeb2-Knockout-Maus ($Zeb2^{lox(ex7)}$). Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Huylebroeck bekamen wir diese Maus und stellten sie in die Tierhaltung der Universität und des Uniklinikums Bonn ein. Des Weiteren wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Genetik der Universität Köln der Mausstamm mit Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Mx1-Promotors (Mx^{Cre}) in die Tierhaltung der Uniklinik Bonn eingebracht. Durch eine Kreuzung von $Zeb2^{lox(ex7)}$ -Mäusen mit dem Mx^{Cre} -Mausstamm wurde die Möglichkeit geschaffen, durch eine Aktivierung der Cre-Rekombinase im adulten hämatopoeti-

schen System die Auswirkung der Zeb2-Deletion ($Zeb2^{\Delta ex7}$) in hämatopoetischen Zellen zu untersuchen. Nach den ersten Kreuzungen begann einerseits die Charakterisierung des loss-of-function-Phänotyps von Zeb2 in der Hämatopoese und parallel wurde die Rückkreuzung der Tiere zum genetischen Hintergrund des C57Bl/6-Mausstamms fortgesetzt. Denn um weiterführende funktionelle Untersuchungen der hämatopoetischen Stammzellen durchführen zu können (Transplantationsversuche), ist ein einheitlicher genetischer Hintergrund notwendig. $Zeb2^{flox(ex7)}$ Mäuse wurden jedoch in einem gemischtem Hintergrund erzeugt und mussten daher über mindestens sechs Generationen in C57Bl/6 Mausstamm zurückgekreuzt werden. Für die Experimente wurden als Zeb2-defiziente Tiere mit dem Genotyp Mx1-Cre+, $Zeb2^{\Delta ex7/\Delta ex7}$ und als Kontrollen mit dem Genotyp Mx1-Cre negativ, $Zeb2^{flox(ex7)/flox(ex7)}$ verwendet.

5.2 Expression von Zeb2 in Blut und Knochenmark

Zunächst wurde die Expression von Zeb2 in verschiedenen Subpopulationen von Blut und Knochenmark untersucht, um zu klären, ob für eine eingehendere Untersuchung des Gens in der Hämatopoese überhaupt eine Rationale besteht. Zu diesem Zwecke wurden hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark und reife Zellpopulationen (B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten und Monozyten) aus dem Blut von Wildtyp-BL/6-Mäusen isoliert. Nach der Isolation der Zellpopulationen mit Hilfe eines FACS-Sorters wurde die RNA aufgereinigt und mittels qPCR auf ihre Zeb2-Expression hin untersucht.

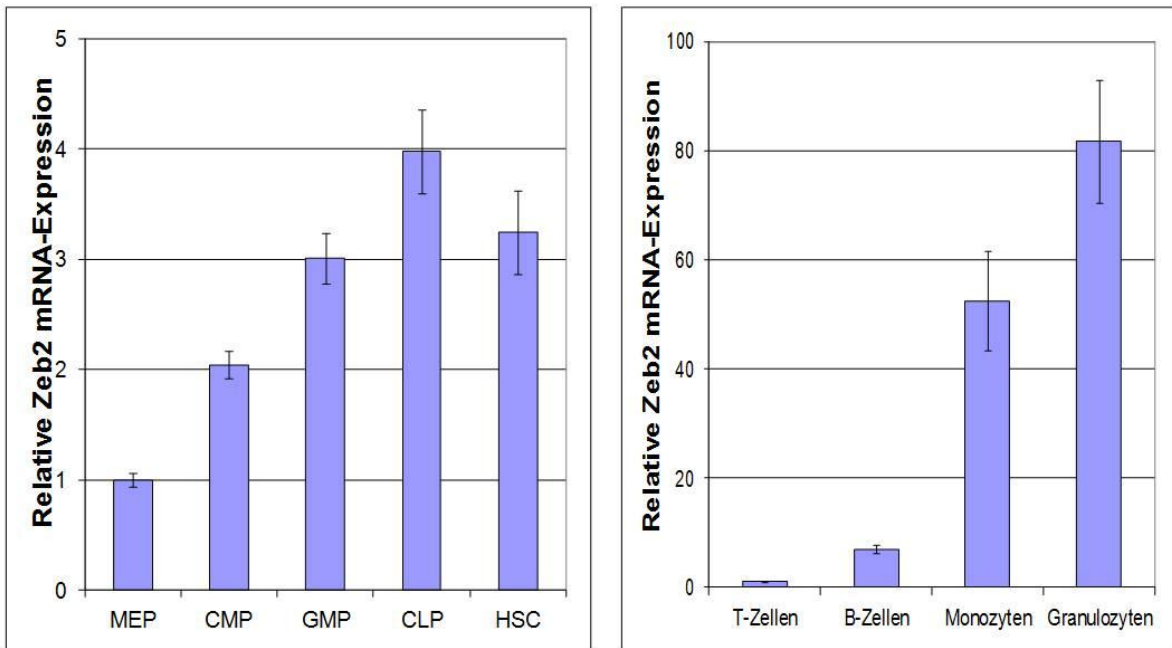


Abbildung 5 Zeb2-Expression in primitiven und reifen hämatopoetischen Subpopulationen von Wildtypmäusen. LT-HSC, ST-HSC, GMP, MEP, T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten und Monozyten. Die Daten wurden auf zwei Referenzgene normalisiert und auf den niedrigsten Wert (MEP bzw. T-Zellen) kalibriert.

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich, zeigen bei den primitiven Zellen im Knochenmark vor allem die Stammzellen und die unreiferen Progenitoren ein hohes Expressionsniveau (HSC und CLP), wohingegen bei den weiter differenzierten Vorläufern (MEP) ein niedrigeres Level an Zeb2 vorhanden ist. Bei Betrachtung der reifen Zellen im Blut zeigen sich große Unterschiede im Expressionsniveau. Während Granulozyten sehr viel Zeb2 exprimieren, ist das Niveau in B-Lymphozyten sehr niedrig und in T-Lymphozyten ist Zeb2 kaum nachweisbar. Da in verschiedenen hämatopoetischen Subpopulationen

und gerade auch in den Stammzellen ein hohes Zeb2-Expressionslevel nachgewiesen werden konnte, war somit die Grundvoraussetzung für eine weitere Untersuchung der Funktion von Zeb2 in der Hämatopoese geschaffen.

5.3 Die Blutbildung im Zeb2-chKO unter physiologischen Bedingungen

5.3.1 Zusammensetzung des peripheren Bluts

Nach Induktion der Zeb2-Deletion mittels Poly(I:C)-Injektionen konnten bereits zwei Wochen nach der Behandlung signifikant reduzierte Leukozyten- und Thrombozytenwerte im peripheren Blut gemessen werden. Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, hatte sich eine dreimalige intraperitoneale Applikation von 250µg Poly(I:C) pro Maus und Dosis über 5 Tage sich als sehr effizient erwiesen, um in nahezu 100% aller Stammzellen das geflochte Allel zu eliminieren (Kuhn et al., 1995; Larsson et al., 2008; Zhang et al., 2003). Es stellte sich heraus, dass Zeb2-deletierbaren Mäuse sehr sensitiv auf das Poly(I:C) reagierten und eine Induktion nach oben genannten Schema nicht immer überlebten. Deswegen wurde im Folgenden die Dosis auf 8,75 µg/g Körpergewicht der Maus (durchschnittlich 200 µg pro Maus und Dosis) reduziert. Mit dieser Dosis konnte immer noch eine vollständige Deletion von Zeb2 erreicht werden und das Überleben der Versuchstiere war gewährleistet.

Zu Beginn wurden die Mäuse nach der Induktion mit Poly(I:C) alle vier Wochen geblutet, um etwaige Veränderungen des peripheren Blutes festzu-

stellen. Es stellte sich heraus, dass der Phänotyp des Zeb2-chKO_s nach ca. 8 Wochen vollständig etabliert war.

Zusätzlich wurden auch mehrere Gruppen von Versuchstieren über einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren beobachtet und alle zwei Monate wurden Blutanalysen durchgeführt. Untersuchungen des Blutes zu späteren Zeitpunkten zeigten nur noch wenige Veränderungen. Daher wurden die weiteren Experimente mit Tieren zum Zeitpunkt acht Wochen nach der Induktion durchgeführt.

Abbildung 6A zeigt die Zusammensetzung des Bluts acht Wochen nach der Induktion. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion in allen drei Zellreihen. Leukozyten, B-Zellen und Monozyten waren stark erniedrigt, und auch die Plättchen zeigten massiv reduzierte Werte. Zusätzlich waren die Werte für die Erythrozytenanzahl und das Hämoglobin signifikant erniedrigt.

In Abbildung 6 B und C sind die Blutanalysen zum Zeitpunkt sechs und zwölf Monate dargestellt. Hier zeigt sich eine persistierende Erniedrigung der B-Lymphozyten und Monozyten, sowie der Erythrozyten und Thrombozyten. Auffällig ist aber ein signifikanter Anstieg der Granulozyten in den Zeb2 $\Delta(\text{ex}7)/\Delta(\text{ex}7)$ Mäusen. Im weiteren Verlauf konnte jedoch kein exorbitanter Anstieg der Granulozyten im Sinne einer Leukämie beobachtet werden.

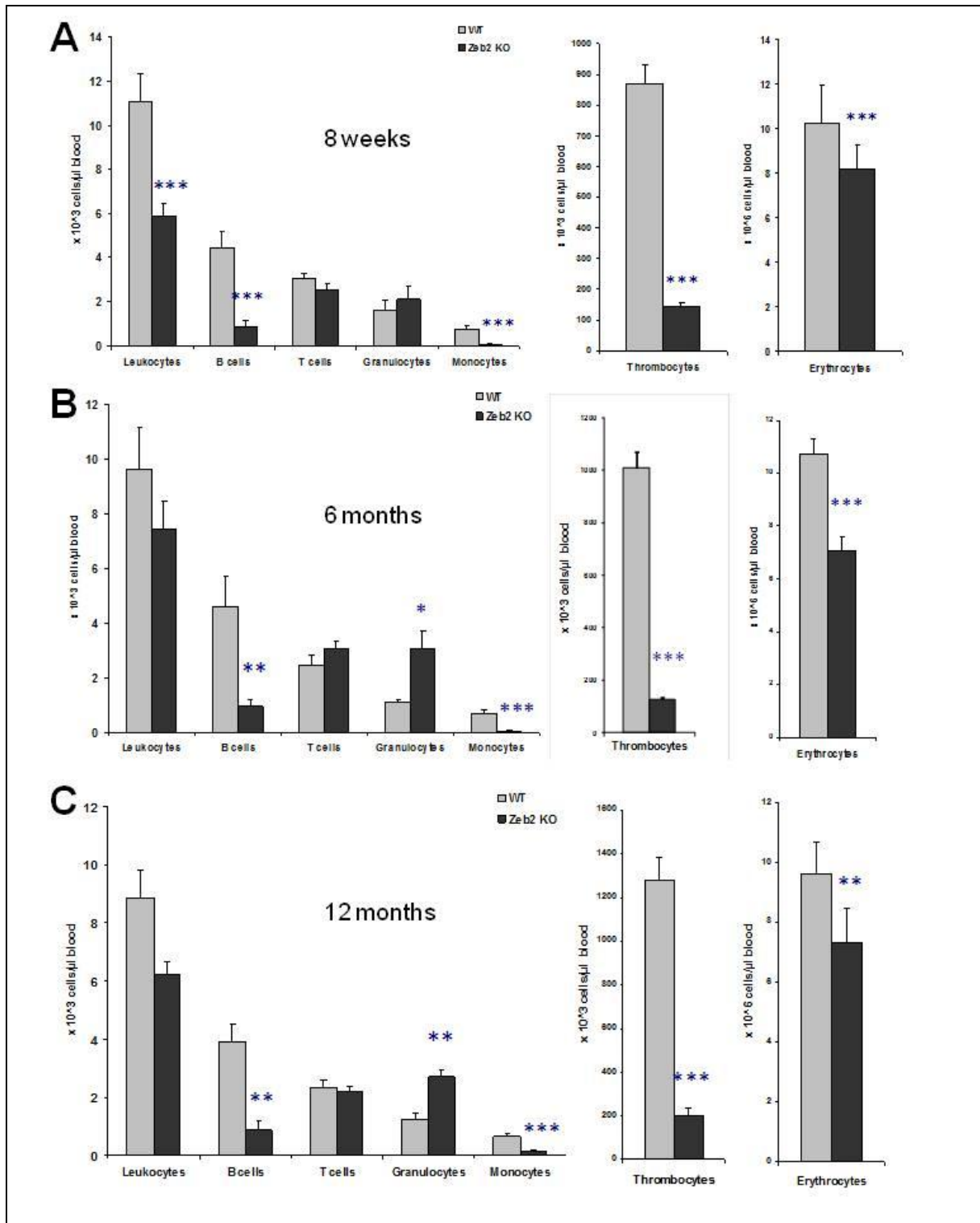
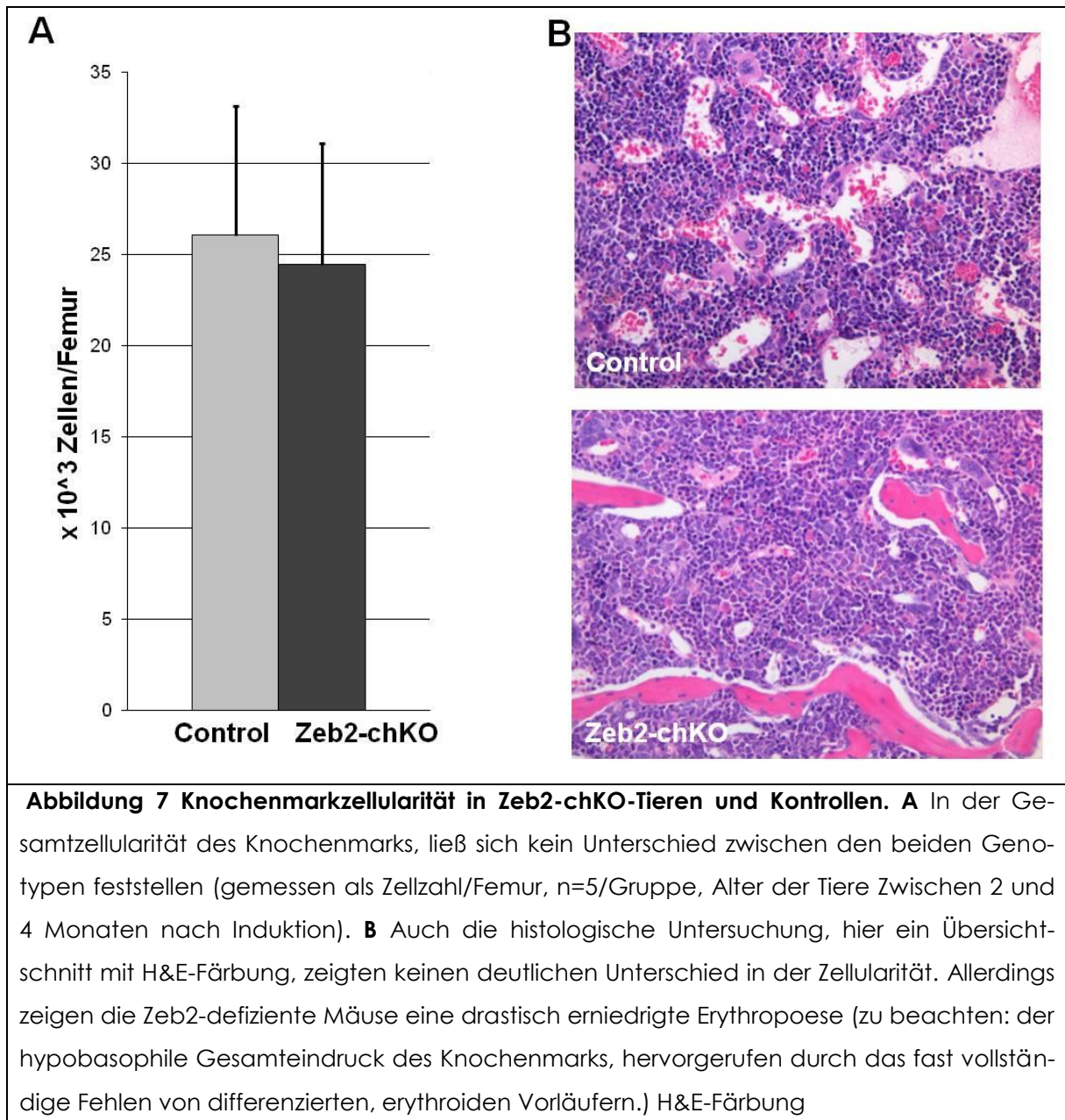


Abbildung 6 Entwicklung des Zeb2-defizienten Phänotyps im Blut bis zwölf Monate nach der Induktion. **A** Konditionale Deletion von Zeb2 im adulten Knochenmark führt zu einer signifikanten Erniedrigung von B-Zellen, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten in peripherem Blut. **B** Sechs Monate nach Induktion der Zeb2-Deletion sind die Granulozytenwerte signifikant erhöht und bleiben auch langfristig erhöht (**C**).

5.3.2 Zusammensetzung des Knochenmarks

Zunächst wurde das Knochenmark auf die zelluläre Zusammensetzung der unterschiedlichen Zelllinien hin untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Gesamtzellularität des Knochenmarks zwischen Zeb2-chKO-Tieren und Kontrollen nicht unterschiedlich war.



Untersucht wurde dies durch Bestimmung der Zellularität pro Femur (Abbildung 7A). Auch die histologischen Schnitte geben keinen Hinweis auf einen Unterschied in der Gesamtzellzahl des Knochenmarks (Abbildung 7B). Abbildung 8 zeigt die Zusammensetzung des Knochenmarks in Bezug auf die Zelllinienzugehörigkeit. Auch wenn sich in der Gesamtzellularität kein Unterschied zeigt, ergeben sich dennoch eindeutige Unterschiede in der Zusammensetzung des Knochenmarks an reifenden Zellen. In den Zeb2-chKO-Mäusen gibt es deutlich mehr Zellen der Granulopoese und dafür deutlich weniger B-Lymphozyten und auch erythroide Vorläuferzellen. Die Verschiebung der Zelllinien mit Verringerung lymphatischer und erythroider Vorläufer im Knochenmark der Zeb2-defizienten Tiere und Dominanz der granulozytärereren Zellen wird auch durch die H&E-Färbung des Knochenmarks sichtbar (Abbildung 7B). Auch der Anteil der T-Zellen ist leicht, aber dennoch signifikant erniedrigt im Knochenmark der Zeb2-defizienten Mäuse.

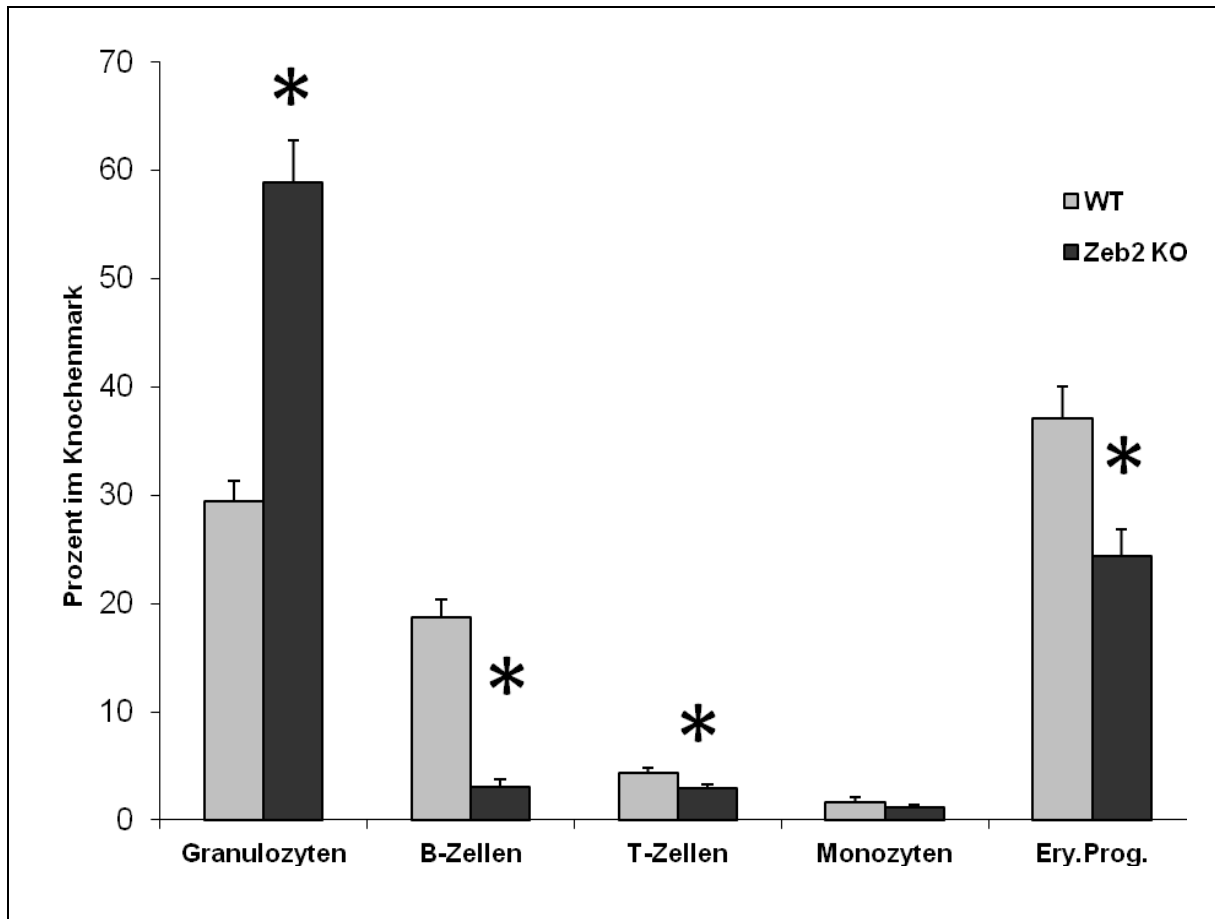


Abbildung 8 Verteilung der reifen Zellen im Knochenmark von Zeb2-chKO-Mäusen

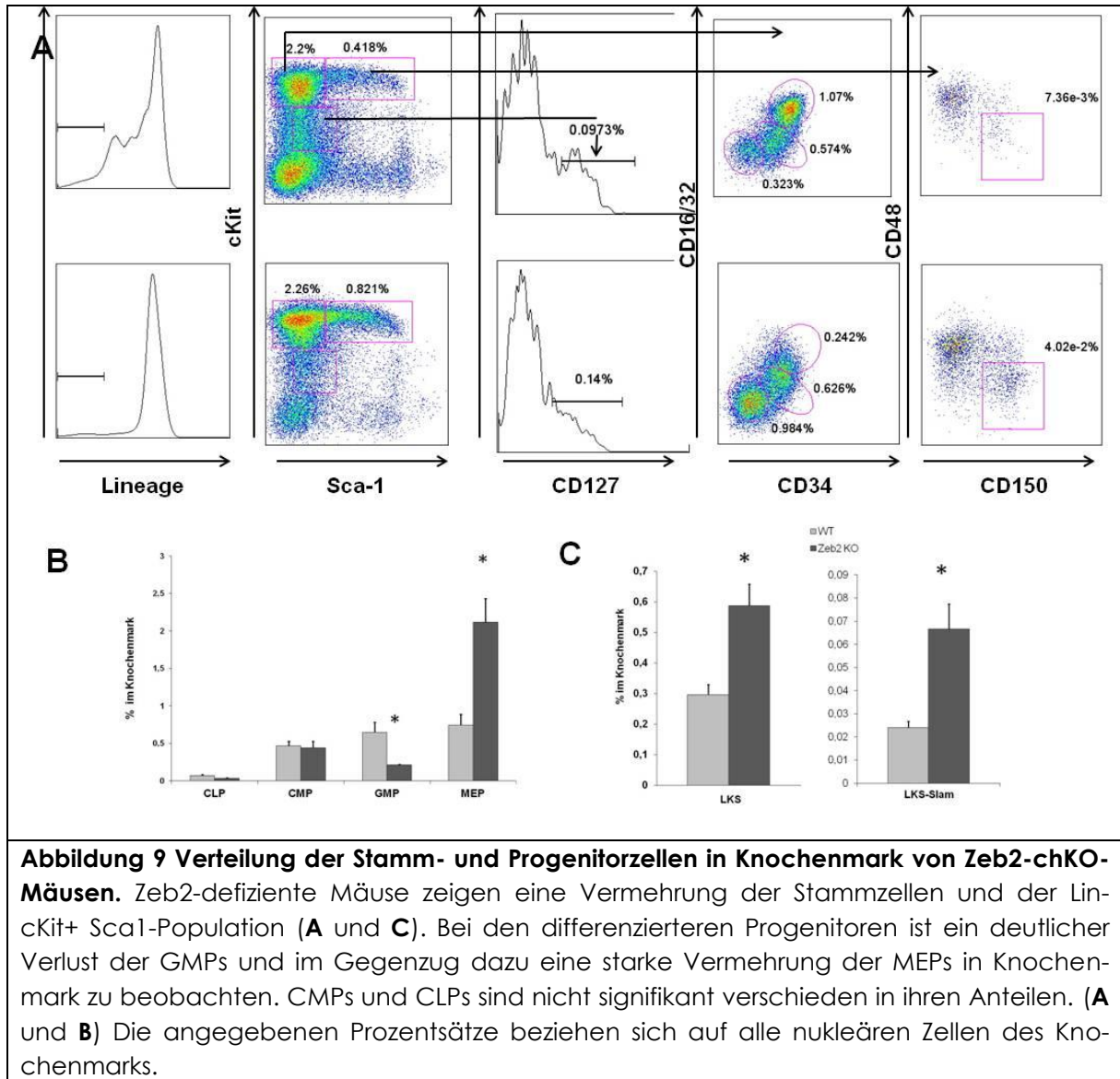
Im Knochenmark zeigt sich eine starke anteilige Vermehrung der granulozytären Reihe und eine deutliche Verminderung des Anteils der B-Lymphozyten und auch der erythroiden Vorläuferzellen (Ery. Prog.)

Als nächstes wurde das Knochenmark auf seinen Gehalt an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen untersucht. Dabei wurden die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellpopulationen basierend auf der Expression von Oberflächenantigenen detektiert und quantifiziert. Hämatopoetische Vorläuferzellen sind dabei negativ für die so genannten Lineagemarker, d.h. Oberflächenantigene, die auf reifen hämatopoetischen Zellen exprimiert sind (B220 auf B-Lymphozyten, CD3 auf T-Lymphozyten, Gr1 auf Granulozyten, Mac1 auf Monozyten, Ter119 auf Erythrozyten). Gleichzeitig exprimieren hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen den Stammzell-

rezeptor c-Kit (CD117) und Sca1. Langzeit-repopulierende Stammzellen können außerdem anhand der Expression von CD150 und fehlenden Expression für CD48, CD34 und Flk2 innerhalb der Lin-cKit+Sca1+ Population vermehrt nachgewiesen werden. Somit konnten Zellen mit dem Immunphänotyp Lin-cKit+Sca1+CD34-Flk2-CD48-CD150+ als Langzeitrepopulierende Stammzelle identifiziert werden (Kiel et al., 2005, Wilson et al, 2008). Wobei bereits eine Isolation der Zellpopulation alleinig basierend auf der Expression der SLAM-Marker CD150+CD48- (ca. 0,0084% im gesamten Knochenmark) zu einer sehr hohen Anreicherung an langzeitrepopulierenden Stammzellen führt. Bei Verwendung dieser beiden Marker trägt jede fünfte Zelle zur trilinearen Differenzierung bei. Dies entspricht in etwa der der Anreicherung der Stammzellen mit dem Phänotyp Lin-cKit+Sca1+CD34-Flk2- (Osawa et al., 1996). Eine Kombination der SLAM-Marker mit Lin-Sca1+cKit+ erbrachte eine noch höhere Anreicherung mit langzeitrepopulierenden Stammzellen auf 47 % (Kiel et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit werden zur immunphänotypischen Identifizierung hämatopoetischer Stammzellen der Immunphänotyp Lin-cKit+Sca1+CD48-CD150+ herangezogen. Diese Definition hat sich in der Literatur in den letzten Jahren gegenüber der Verwendung der Marker CD34 und Flk2 durchgesetzt.

Abbildung 9A und C zeigen, dass Zeb2-defiziente Mäuse mit den oben definierten Markern eine Vermehrung der hämatopoetischen Stammzellen um den Faktor 3-4 aufweisen. Die Lin-cKit+Sca1+ -Population ist auf etwa das

Doppelte erhöht. Interessanterweise zeigte sich die Population Lin-cKit+Sca1-, welche myeloisch restringierte Progenitorpopulationen beinhaltet, nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Genotypen.



Bei Betrachtung der hämatopoetischen Progenitoren im Knochenmark (Abbildung 9 A und B) zeigt sich, dass in den Zeb2-defizienten Mäusen die Verhältnisse der Progenitor-Subpopulationen untereinander verschoben sind. Die Zeb2-defizienten Tiere zeigen eine deutliche Reduktion der

Granulozytären-Monozytären Vorläufer (GMP, definiert als Lin-cKit+Sca1-CD34+CD16/32+), bei gleichzeitiger Vermehrung der Megakaryozytären-Erythroiden Vorläufer (MEP, definiert als Lin-cKit+Sca1-CD34-CD16/32-).

5.3.3 Apoptose- und Proliferationsverhalten von Zeb2-defizienten Stamm- und Progenitorzellen

Da sich in den Zeb2-defizienten Tieren eine deutliche Vermehrung der Stammzellen zeigte, wurde als nächstes das Apoptose- und Proliferationsverhalten der hämatopoetischen Stammzellen untersucht. Ein verringertes Absterben hämatopoetischer Zellen oder deren vermehrte Proliferation im Vergleich zur Kontrolle könnten zu der beobachteten Akkumulation führen. Abbildung 10 zeigt die Anteile apoptotischer Zellen in c-Kit-positiven Progenitoren (cKit+ Prog), multi-potenten-Progenitoren und hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Gemessen mit dem Annexin-DAPI-Assay konnten wir keinen Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen in den genannten Subpopulationen finden (Abbildung 10B). Die Apoptoserate wurde gemessen an frisch isolierten Knochenmarkzellen.

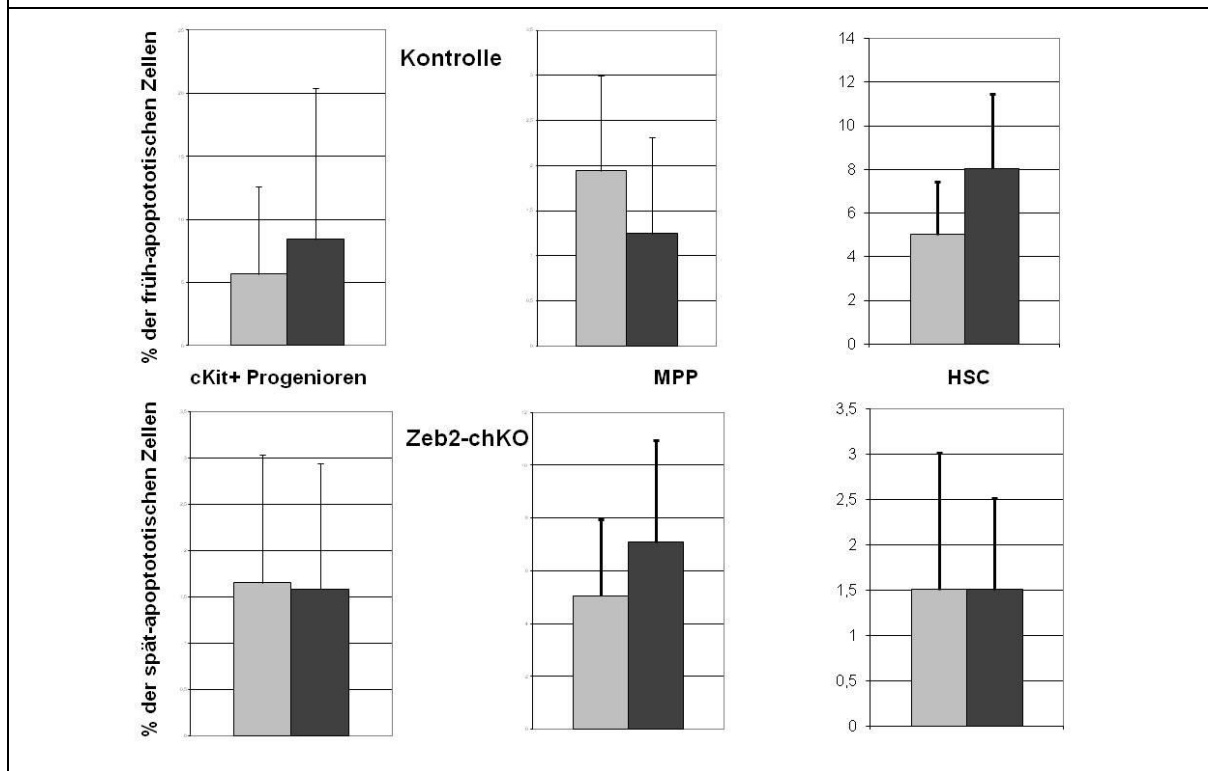
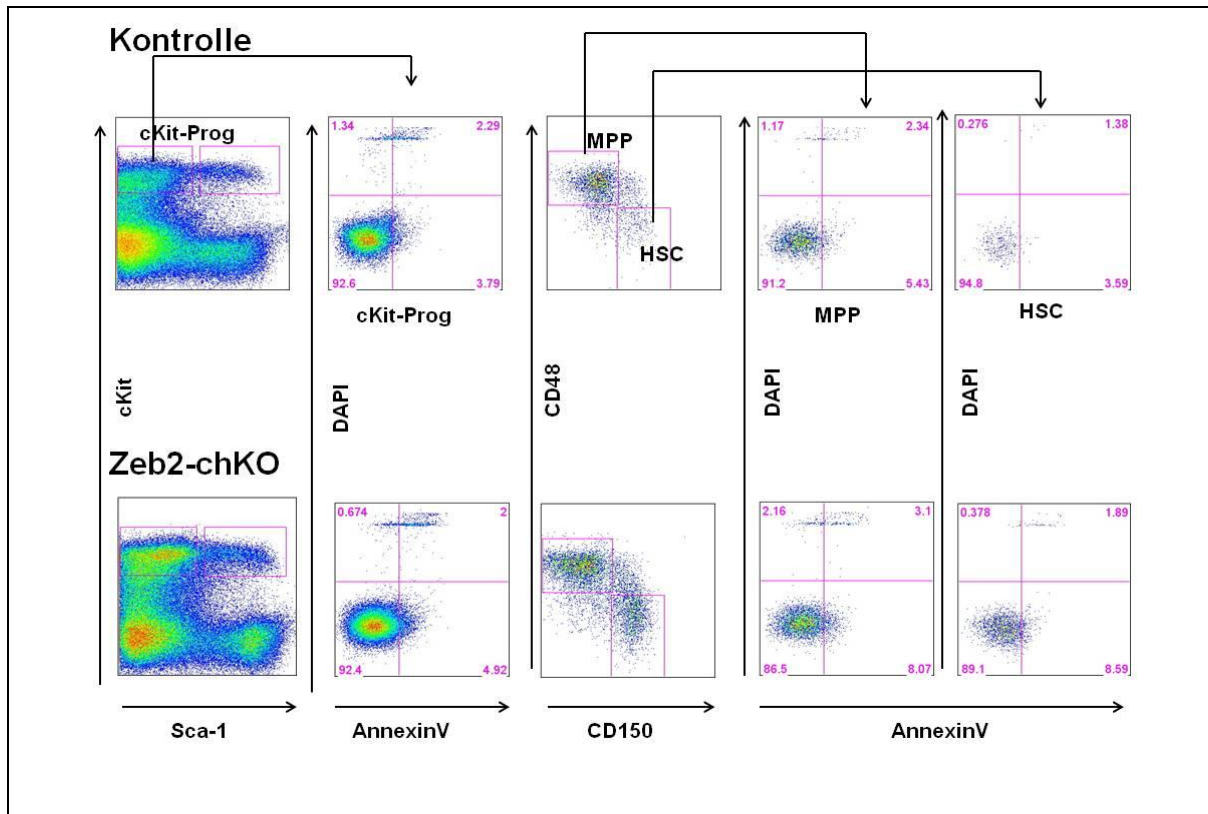
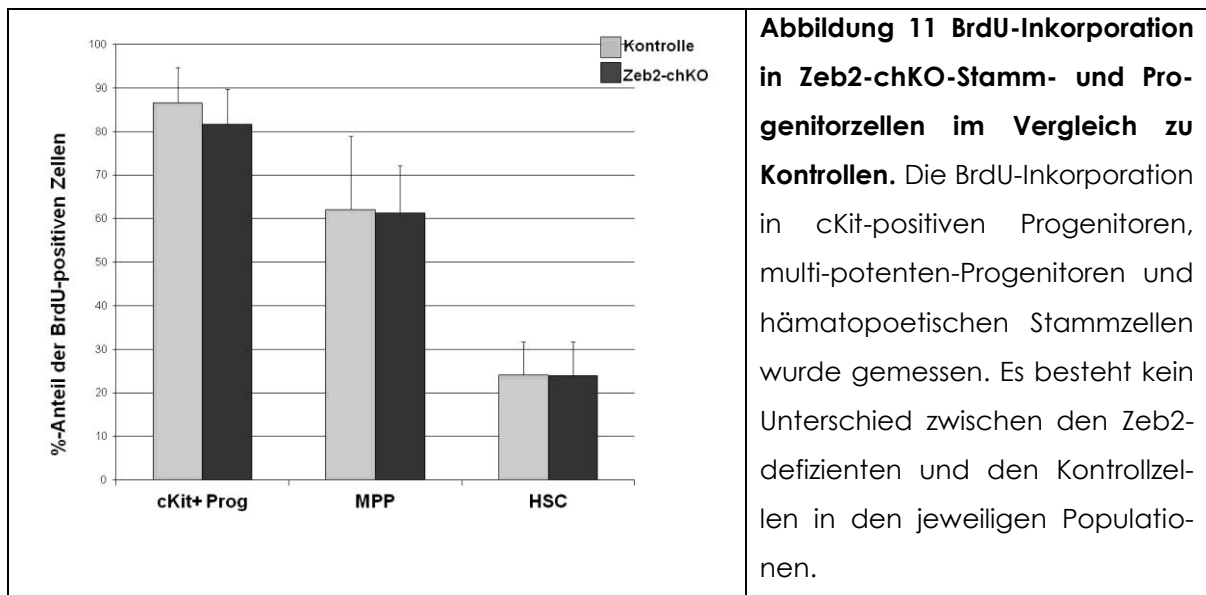


Abbildung 10 Anteil apoptotischer Zellen in Stamm- und Progenitorzellen in Zeb2-defizientem und Kontrollknochenmark. A Der Anteil apoptotischer Zellen wurde gemessen in c-Kit+ Progenitoren, multipotenten Progenitoren (MPP) und hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Gezeigt ist ein repräsentativer FACS-Plot. **B** Statistische Auswertung der in **A** gezeigten Anteile aus drei unabhängigen Experimenten..

Um den Anteil proliferierender Zellen in verschiedenen Subpopulationen des Knochenmarks zu ermitteln, wurde ein BrdU-Inkorporationsassay durchgeführt. Auch dieser ergab keinen Unterschied zwischen den Zeb2-chKO- und Kontrollzellen. Getestet wurden Progenitoren (cKit+ Prog), multipotente Progenitoren (MPP) und hämatopoetische Stammzellen (HSC).



Die erhöhte Anzahl an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Zeb2-defizienten Knochenmark ist also weder auf eine verminderte Apoptose, noch auf eine erhöhte Proliferation der Zeb2-ch-KO Zellen zurückzuführen.

5.3.4 Extramedulläre Hämatopoese bei den Zeb2-defizienten Tieren

In der murinen Hämatopoese findet physiologischerweise die Blutbildung nicht nur im Knochenmark, sondern auch zu einem geringen Teil in der Milz statt. Bei bestimmten Veränderungen in der Homöostase kann die Häma-

topoese in der Milz deutlich zunehmen und auch in andere extramedulläre Organe (z.B. Lymphknoten und Leber) wandern. Daher haben wir die Milz, Leber und Lymphknoten auf ihre zelluläre Zusammensetzung untersucht. Bei der Präparation der Maus fiel bereits makroskopisch auf, dass die $Zeb2^{Mx1Cre-\Delta ex7/\Delta ex7}$ -Mäuse bereits 8 Wochen nach der Poly (I:C) Behandlung eine etwa doppelt so große Milz im Vergleich zu den Kontrolltieren besitzen, während die Leber weder in der Größe noch in der Farbe unterschiedlich war. Bei längeren Beobachtungszeiten (10 und 16 Monate nach Induktion) waren die Milzen weiterhin in Ihrer Größe zunehmend (Abbildung 12). Zur Identifizierung der zellulären Zusammensetzung der Milz wurde eine Einzelsuspension hergestellt und immunphänotypisch sowohl der Gehalt unterschiedlicher reiferen hämatopoetischen Zelllinien als auch für Stamm- und Progenitorzellen bestimmt.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten, dass in der Milz der $Zeb2$ -chKO Mäuse alle hämatopoetischen Zellen von den Stamm- über die Progenitor- bis hin zu den reiferen Zellen aller Zelllinien vorhanden sind (Abbildung 12). In der Milz der $Zeb2$ -chKO-Tiere finden sich verminderte Zahlen an B-Lymphozyten und Monozyten und eine vermehrte Anzahl an Granulozyten und erythroiden Progenitoren (Abbildung 12 B).

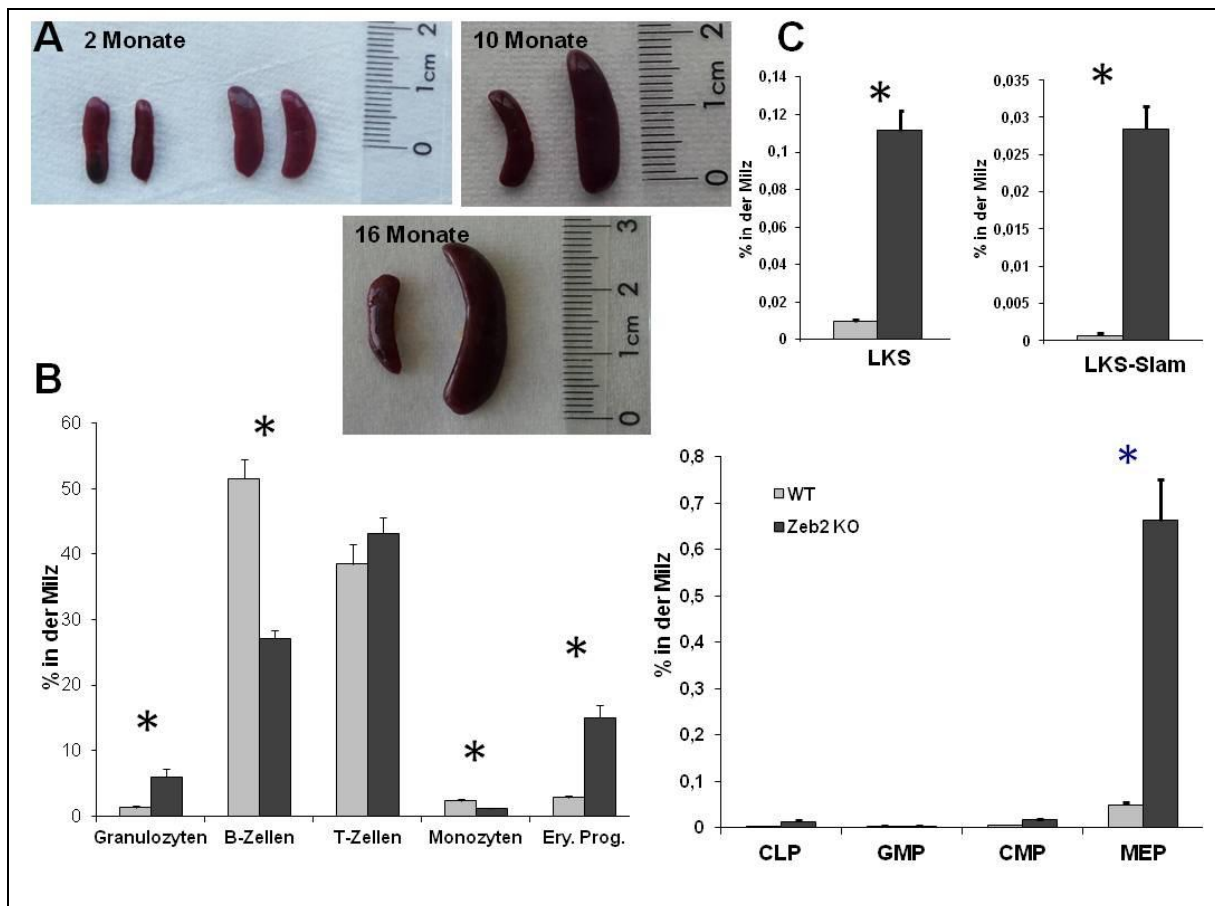


Abbildung 12 Extramedulläre Hämatopoese in der Milz von Zeb2-chKO-Mäusen

A Die Milzen der Zeb2-defizienten Tiere sind bereits nach zwei Monaten deutlich vergrößert und die Splenomegalie der Tiere zeigt einen progressiven Verlauf. **B** Analysen der zellulären Zusammensetzung der Milz zeigen, dass bei den Zeb2-defizienten Tieren vermehrt Granulozyten und erythroide Progenitoren vorhanden sind. Die Anzahl von B-Zellen und Monozyten dagegen ist reduziert. **C** Der Anteil der MEP, aber auch von Stamm- und Lin- cKit + Sca1+ Zellen ist deutlich erhöht.

Außerdem wurden histopathologische Untersuchungen der Milz, der Leber und der Lymphknoten durchgeführt. Abbildung 13 A zeigt einen histologischen Schnitt durch das Milzgewebe. Es ist deutlich sichtbar, dass in der Zeb2-defizienten Milz die Organisation in rote und weiße Pulpa, die für die Milz typisch ist, kaum noch zu erkennen ist. Stattdessen findet eine massive Infiltration durch die extramedulläre Hämatopoese statt, verbunden mit einer starken Vermehrung von dysplastischen Megakaryozyten (Abbildung

13B). Selbst in den Lymphknoten der Zeb2-defizienten Tiere kann extramedulläre Hämatopoese festgestellt werden (Abbildung 13 C).

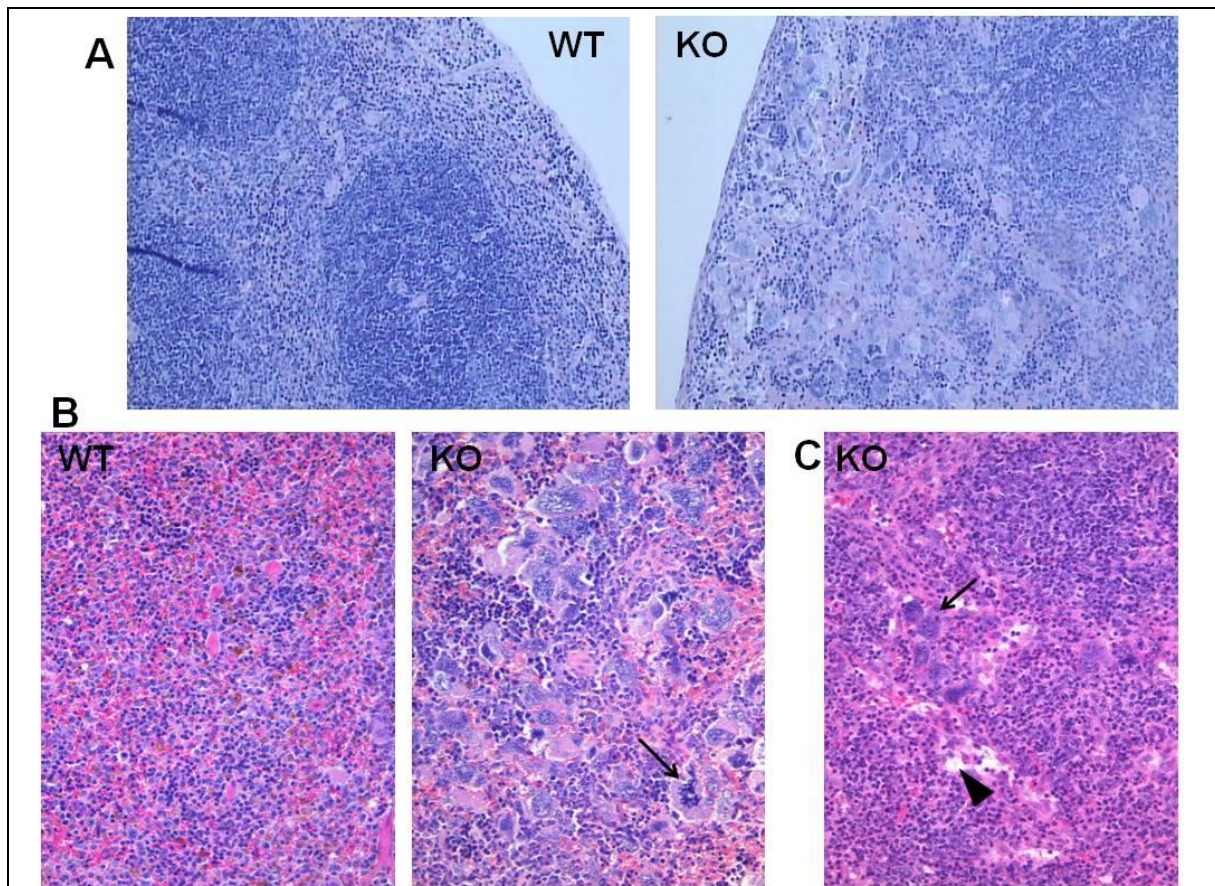


Abbildung 13 Gewebeorganisation und extramedulläre Hämatopoese in der Milz von Zeb2-chKO-Mäusen. **A** Ein Übersichtsschnitt der Milz zeigt beim Wildtyp deutlich die Unterscheidung zwischen roter und weißer Pulpa (Giemsa-Färbung). Beim Zeb2-chKO ist dieser Aufbau aufgrund der massiven extramedullären Hämatopoese komplett zerstört. **B** Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die rote Pulpa des Zeb2-defizienten Tiers verstärkte Hämatopoese, verbunden mit einer dominierenden Proliferation von dysplastischen Megakaryozyten, die eine asynchrone Reifung, große, irregulär gefaltete Kerne und bizarre endomitotische Figuren aufweisen (Pfeil). H&E-Färbung. **C** Pankreatischer Lymphknoten des Zeb2-chKO zeigt Foci extramedullärer Hämatopoese zusammen mit dysplastischer Vermehrung von Megakaryozyten (Pfeil) in den medullären Strängen. Auffällig sind die Ansammlung roter Blutzellen und die Erythrophagozytose in den Sinusoiden (Pfeilspitze). H&E-Färbung.

In der Leber dagegen gibt es keine Anzeichen für extramedulläre Hämatopoese oder sonstige morphologisch auffällige Gewebeveränderungen (Daten nicht gezeigt).

5.4 Lebenserwartung der Zeb2-defizienten Tiere

Die Überlebenszeit der Mäuse nach Induktion der Zeb2-Deletion ist im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erniedrigt (Abbildung 14). Um die Todesursache der gestorbenen Tiere zu untersuchen, wurden die Mäuse, welche unmittelbar nach dem Eintreten des Todes aufgefunden wurden oder wegen moribundem Zustand getötet worden waren, einer ausführlichen histo-pathologischen Untersuchung unterzogen. Bei keinem dieser Tiere konnten Hinweise auf eine Tumorerkrankung oder sonstige Organdysfunktion gefunden werden außer einer ausgeprägten Störung der Hämatopoese. Daher liegt die Ursache für die verkürzte Lebenserwartung am ehesten an den Komplikationen durch Versagen der Hämatopoese. Die Tiere werden mit zunehmendem Alter zum Einen immer anämischer (siehe Abschnitt 5.3.1 und Abbildung 6) und sind zum Anderen offensichtlich auch in ihrer Abwehrkraft eingeschränkt. Einige der Tiere zeigten chronische Entzündungen (ein Tier am Auge, ein Tier am Skrotum, mehrere Tiere hatten Hautausschlag) und mussten deshalb euthanasiert werden. Die meisten Zeb2-defizienten Tiere starben jedoch plötzlich und ohne äußerlich sichtbare Ursache. Einige in der Pathologie untersuchten Tiere zeigten auch Zeichen eines pulmonalen Infektes.

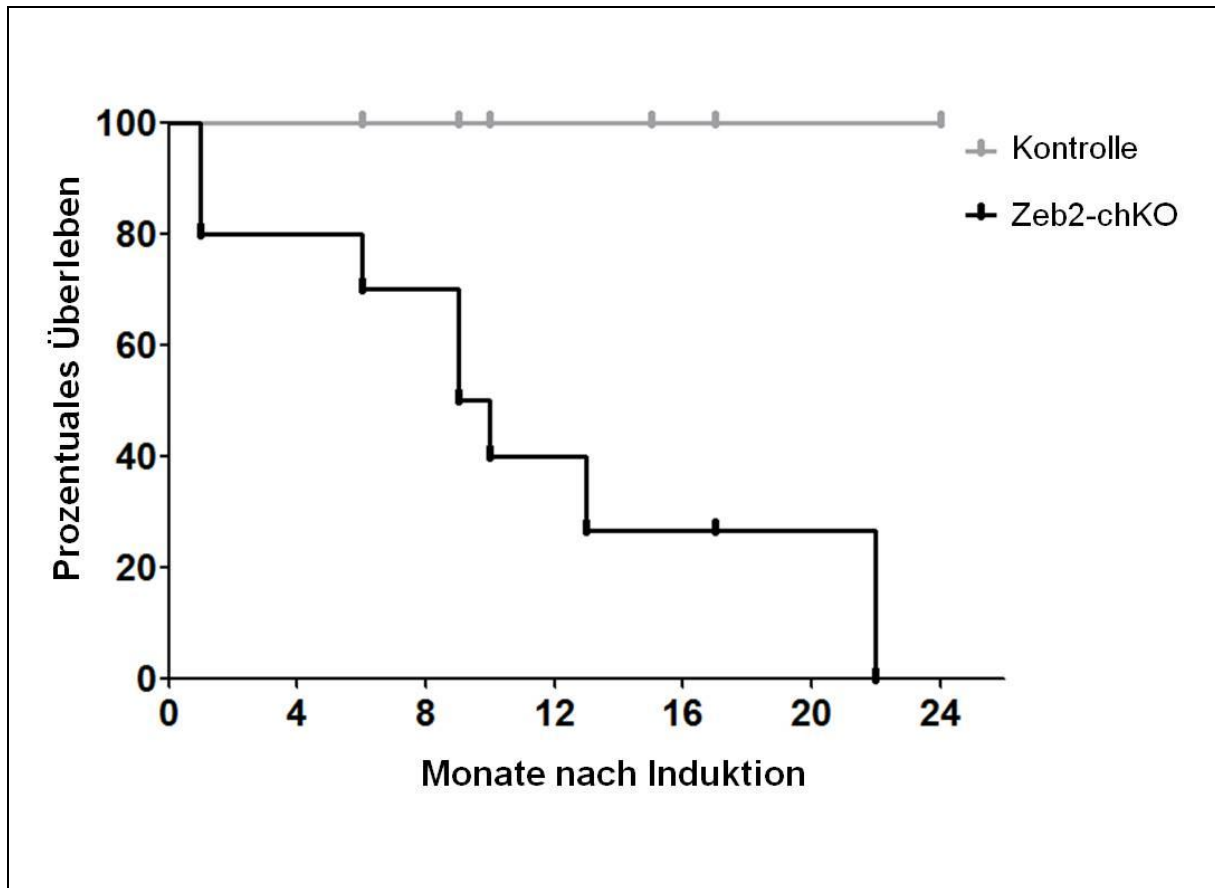


Abbildung 14 Überlebenskurve nach Kaplan-Meier

Die Lebensdauer der Zeb2-defizienten Mäuse ist gegenüber den Kontrolltieren deutlich erniedrigt. Von 14 beobachteten Zeb2-KO Tieren wurde nur ein einziges wirklich alt (Maximale Lebensdauer unserer Labormäusen liegt erfahrungsgemäß bei ca. 2 Jahren). Kontrollen n=12, Zeb2-chKO n=14.

5.5 Myeloproliferative Eigenschaften des Zeb2-chKO-Phänotyps

Viele der oben dargestellten Veränderungen der Hämatopoese im peripheren Blut und Knochenmark sowie die im Laufe der Zeit zunehmende extramedulläre Blutbildung in induzierten Zeb2-KO-Mäusen weisen deutliche Ähnlichkeiten mit einer Erkrankungsgruppe beim Menschen, den Myeloproliferativen Syndromen, auf. Myeloproliferative Neoplasien gehören zu chronischen klonalen Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzellen mit Nachweis der gesteigerten Proliferation aller myeloischen Zellreihen im

Knochenmark mit unterschiedlichen klinischen Ausprägungen bei Dominanz einer jeweiligen Zellreihe. So ist bei der Polyzythämia vera (PV) eine im Vordergrund stehende Vermehrung der roten Blutzellen zu beobachten, wobei auch die Granulozyten und Thrombozyten vermehrt sein können. Bei der Essentiellen Thrombozythämie (ET) sind die Blutplättchen deutlich erhöht bei jedoch weitgehend unveränderten Erythrozyten und Granulozyten im Blut. Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) steht eine ausgeprägte Vermehrung der Granulozyten im Vordergrund. Und schließlich ist bei der primären Myelofibrose (PMF) initial eine ausgeprägte Proliferation der myeloischen Zellreihen mit nachfolgender zunehmender Vermehrung von Bindegewebsfasern (Fibrose) im Knochenmark einhergehend mit Anämie, Thrombopenie und extramedullären Hämatopoese zu beobachten. Des Weiteren gibt es beim Menschen eine Erkrankungsgruppe, die neben myeloproliferativen Merkmalen auch Reifungsstörungen (Dysplasiezeichen) aufweisen. Diese Erkrankungsform wurde von der WHO als eigenständige Entität mit der Bezeichnung „MDS/MPN unclassifiable“ deklariert (Orazi et Germing, 2008; Vardiman et al, 2009). Die Veränderungen in der murinen Hämatopoese sind nicht immer mit denen beim Menschen identisch. Die Bethesda Empfehlungen zur Klassifikation myeloischer Erkrankungen bei der Maus sieht lediglich die Einteilung in myelodysplastische oder myeloproliferative Syndrome vor und empfiehlt die MDS/MPN überlappende Erkrankungen den myelodysplastischen Syndromen zuzuordnen (Morse et al, 2002).

Wir haben daher im Folgenden die Veränderungen in der Zeb2-defizienten Hämatopoese genauer analysiert und mit den oben genannten Klassifikationen verglichen.

Knochenmark und peripheres Blut

Wie bereits in Abbildung 6 gezeigt, weisen Zeb2-KO Mäuse eine Verschiebung der zellulären Zusammensetzung im Knochenmark auf. Diese Verschiebung ist nicht nur auf die fehlende B-lymphozytäre Differenzierung alleine zurückzuführen, denn auch das Verhältnis von erythrozytären zu granulozytären Zellen im Knochenmark ist zugunsten der Granulozyten verschoben, ein klassisches Zeichen einer myeloproliferativen Erkrankung. Außerdem ist im Knochenmark eine beginnende Vermehrung retikulärer Faser (vergleichbar mit einem Grad I Fibrose beim Menschen) auffällig, die bereits 8 Wochen nach Induktion auftritt (Abbildung 15 B). Allerdings ergab eine Überprüfung 10 Monate nach Induktion, dass der Fibrosegrad nicht fortschreitend ist. Die histologischen und zytologischen Untersuchungen des Knochenmarks zeigt außerdem morphologisch abnormale Megakaryozyten (Abbildung 15 B), die eine Reifungsstörung aufweisen. Die Megakaryozyten weisen eine Verschiebung des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses auf, wobei der Kern deutlich größer und weniger kondensiert erscheint als bei den Kontrolltieren.

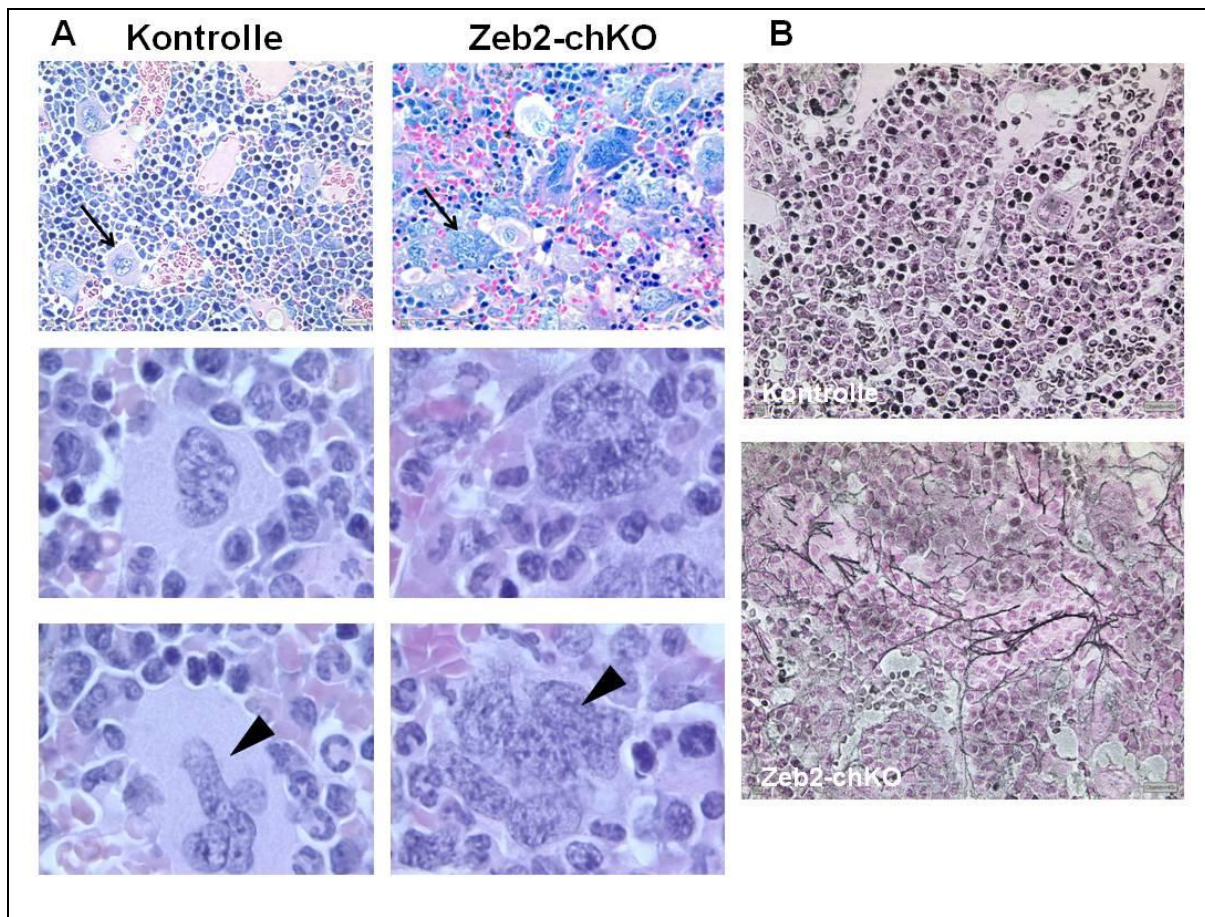
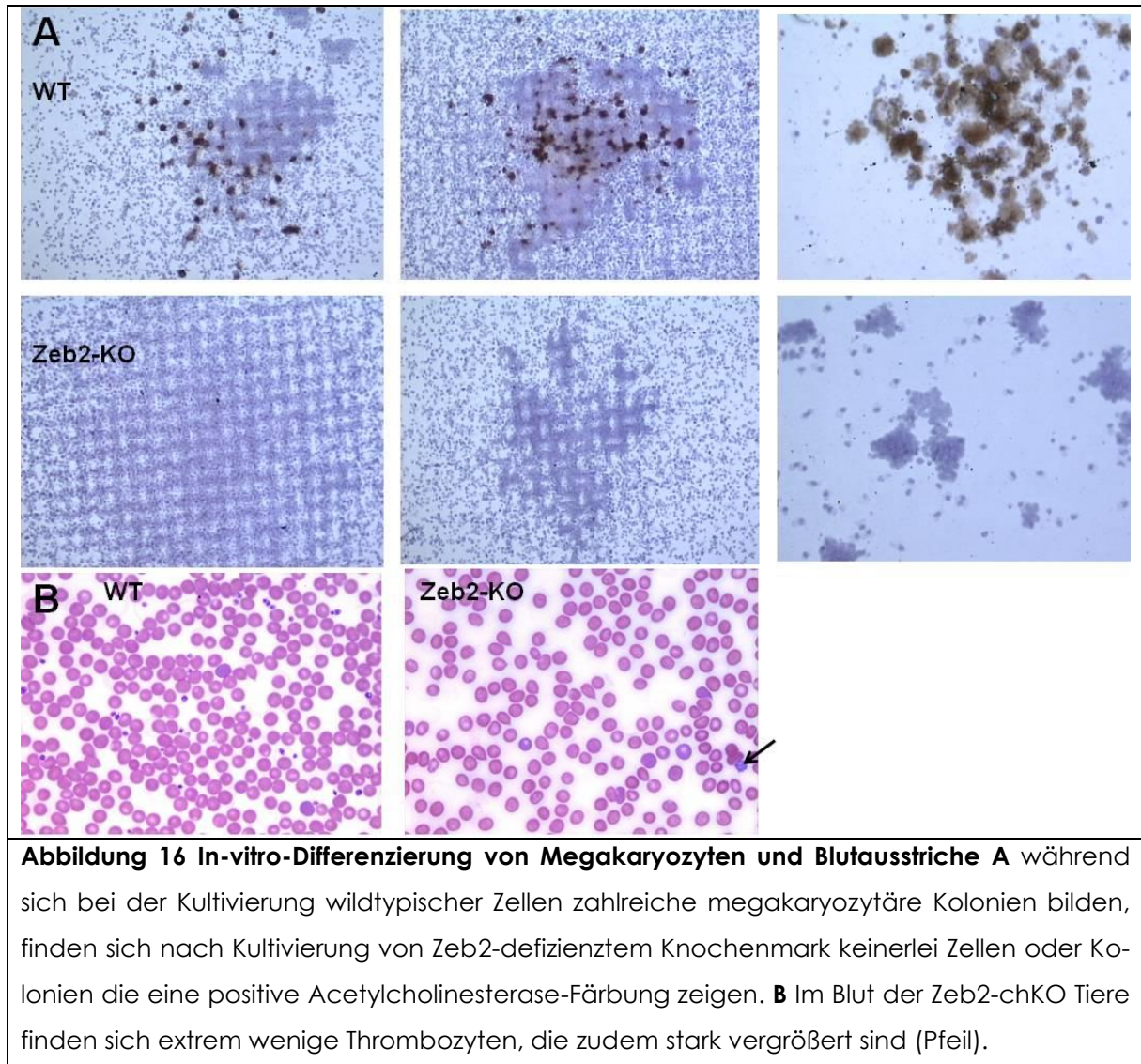


Abbildung 15 Zeb2-chKO-Mäuse zeigen abnormale Megakaryopoese und eine Grad I Fibrose im Knochenmark. **A** Die Zeb2-chKOs zeigen eine prominente Proliferation von morphologisch abnormalen Megakaryozyten (Pfeile), die gekennzeichnet sind durch asynchrone Reifung, große, irregulär-geformte Kerne (Pfeilspitzen). Giemsa-Färbung **B** Das Knochenmark der Zeb2-defizienten Tiere zeigt eine Grad I-Fibrose. Aufnahmen von acht Wochen nach Induktion. (Gordon-Färbung).

Um die Reifungsfähigkeit der Megakaryozyten funktionell zu testen führten wir einen in-vitro Differenzierungsversuch CFU-MK durch (Abbildung 16). Die in-vitro-Differenzierung der Megakaryozyten zeigte, dass die Zeb2-defizienten Knochenmarkszellen nicht in der Lage sind, Megakaryozyten zu bilden, die so weit ausgereift sind, dass sie Acetylcholinesterase bilden. Deswegen zeigen die Kulturen des Zeb2-chKO keine braun-gefärbten Zel-

len. Also bestätigt sich auch in-vitro, dass Zeb2-defiziente Megakaryozyten nicht richtig ausreifen (Abbildung 16 A).



Auch bilden die KO-Tiere deutlich verminderte Anzahl, jedoch im Volumen vergrößerte Plättchen, was sowohl durch mikroskopische Analyse im Blutausstrich (Abbildung 15), als auch am photometrisch kalkulierten Thrombozytenvolumen (MPV) widerspiegelte.

Zum von uns gewählten Zeitpunkt von 8 Wochen zeigte sich eine milde Anämie, jedoch auch hier bereits erhöhten Erythrozytenvolumen. Im weiteren Verlauf der Beobachtung (Zeitpunkte sechs und zwölf Monate) war eine zunehmende Anämie zu beobachten (Abbildung 6).

Auch die längerfristige Beobachtung der Granulozyten über mehrere Monate zeigte eine Progredienz der Granulozytose in Zeb2-chKO Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren, was ebenfalls zum myeloproliferativen oder MPN/MDS overlap Syndromen passt. Interessanterweise war die bereits zum Zeitpunkt 8 Wochen nach der KO-Induktion beobachtete Faservermehrung im Knochenmark nicht fortschreitend und verblieb bei Grad I Fibrose. Auch konnte bei keiner der Mäuse eine Progression zu einer akuten Leukämie festgestellt werden.

Milz und Lymphknoten

Die Milz zeigt mit fortschreitendem Alter der Zeb2-defizienten Tiere eine zunehmende Vergrößerung, verbunden mit einer markanten extramedullären Hämatopoese. Verglichen mit Kontrolltieren findet sich ein Vielfaches an Stamm- und Progenitorzellen in der Milz. Bei der Untersuchung der Zusammensetzung unterschiedlicher Zelllinien zeigt sich vor Allem die Erythropoese prominent und führt zusammen mit der übrigen, vermehrten Hämatopoese zu einer Zerstörung des normalen Gewebearchitektur der Milz (Unterteilung in rote und weiße Pulpa, (Abbildung 13A). Des Weiteren zeigt die Milz eine exorbitante Vermehrung von Megakaryozyten, welche ebenfalls die bereits im Knochenmark beobachteten Abnormitäten aufwies. Die Milzgröße

war im längeren Beobachtungszeitraum auch weiterhin an Größe zunehmend und zeigte schließlich in späterem Stadium eine komplette Auflösung der Architektur durch massive Infiltration myeloischer Zellen (Abbildung 13B). Ähnliche Veränderungen mit extramedullärer Hämatopoese konnten auch in Lymphknoten festgestellt werden (Abbildung 13 C).

Angesichts der hier geschilderten Veränderungen in der Hämatopoese bei Verlust von Zeb2 entspricht der beobachtete Phänotyp entweder den frühen Stadien einer primären Myelofibrose oder einem MDS/MPN overlap Syndrom. Geht man zunächst von dem Bild einer primären Myelofibrose aus so spiegelt sich jedoch im längerfristigen Verlauf nicht die sonst beim Menschen übliche Dynamik in Fibrose des Knochenmarks und Entwicklung einer akuten Myeloischen Leukämie wieder. Auch die Reifungsstörungen der unterschiedlichen Zelllinien passen nicht zum humanen Bild einer primären Myelofibrose. Daher könnte der hier beobachtete Phänotyp am ehesten einem bislang nicht beschriebenen Mausmodell für das MDS/MPN overlap Syndrom entsprechen. Eine fehlende Transformation in eine akute Leukämie, die beim Menschen bei beiden Erkrankungsgruppen relativ häufig zu beobachten sind, könnte darauf hinweisen, dass eine weitere driver-Mutation nötig ist um eine Neoplasie auszulösen. Weitere Untersuchungen mit p53-mutierten Mäusen sind geplant um diese Hypothese zu testen.

5.6 Untersuchung des Einflusses von Zeb2 auf die Repopulationsfähigkeit, Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Um die Bedeutung von Zeb2 auf die Fähigkeit der Stammzellen zur Repopulation des Knochenmarks und zur Multilineagerekonstitution des Bluts zu untersuchen wurden Knochenmarktransplantationen durchgeführt. Dabei wurde Knochenmark von Zeb2-defizienten bzw. Kontrolltieren in letal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert und die Wiederherstellung der Hämatopoese und der Beitrag der Testzellen zu den verschiedenen reifen Zelllinien im Blut der Empfänger überprüft. Nach 12 bzw. 16 Wochen wurden das periphere Blut und das Knochenmark der Empfänger auf die zelluläre Zusammensetzung dieser Organe und die Größe des Pools von Stamm- und Progenitorzellen überprüft.

5.6.1 Nicht-kompetitive Transplantation

Beim nicht kompetitiven Transplantationsansatz wurden 2×10^6 Gesamtknochenmarkzellen, in unserem Fall entweder Zeb2-chKO-Zellen oder Knochenmarkzellen von Kontrollmäusen, in eine Gruppe von jeweils 10 letal bestrahlten, congenen Empfängermäusen transplantiert. Nach der Transplantation wurde den Tieren alle vier Wochen ca. 100-200 μ l Blut entnommen und ein Differentialblutbild, sowie eine durchflusszytometrische Untersuchung des Bluts durchgeführt (Abbildung 17 A). Die Blutwerte 16 Wochen nach Transplantation sind in Abbildung 17 B gezeigt. Zu diesem Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass ein Langzeitengraftment der hämatopoetischen Zellen stattgefunden hat. Die nicht-kompetitive

Transplantation spiegelt wieder, was bereits im homöostatischen Zustand bei Zeb2-chKOs und Kontrollen zu beobachten war. Die Zeb2-chKO Zellen bilden insgesamt deutlich weniger Blutzellen als die Kontrollzellen. Im Blut der mit den Zeb2-defizienten Zellen transplantierten Tiere finden sich nahezu keine B-Lymphozyten und Monozyten.

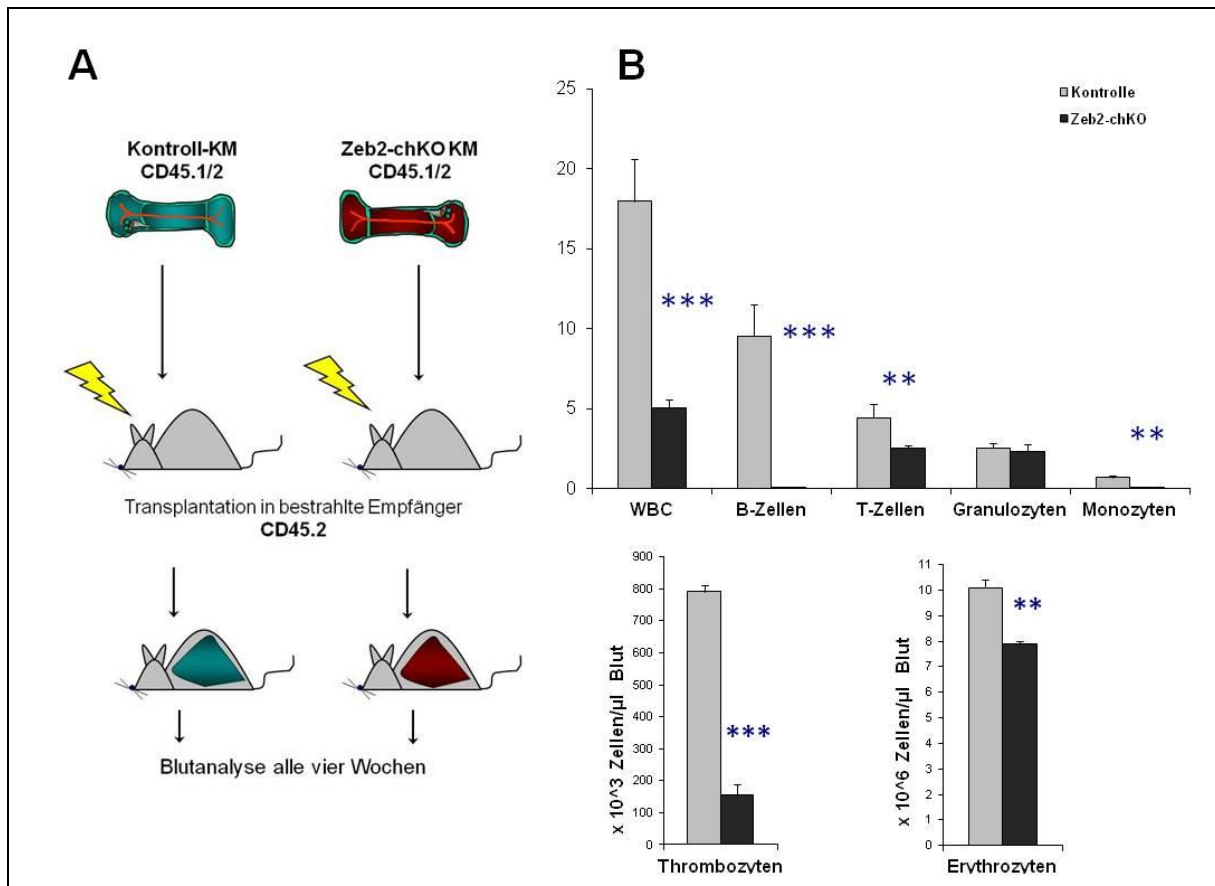


Abbildung 17 Schematische Darstellung eines nicht-kompetitiven Transplantationsassays und Blutwerte 16 Wochen nach Transplantation. **A** Bei einer nicht-kompetitiven Transplantation werden die Testzellen (Kontrolle und KO) in gleicher Anzahl, im Normalfall 2×10^6 Zellen Gesamtknochenmark in letal bestrahlte Empfängertiere gespritzt. **B** Die Blutwerte der Tiere, die die Zeb2-defizienten Zellen erhalten haben, sind deutlich reduziert in allen Zellreihen bis auf die Granulozyten. B-Zellen und Monozyten sind nahezu nicht nachweisbar. WBC: Gesamtleukozyten (White Blood Count).

Die einzige reife Zelltyp, der in normaler Anzahl vorhanden ist, sind die Granulozyten. Auch Thrombozyten und Erythrozyten sind stark reduziert. Auffällig ist die signifikante Reduktion der T-Lymphozyten, die im

homöostatischen Zustand bei den Zeb2-chKO-Tieren nicht zu beobachten ist.

5.6.2 Serielle Knochenmarktransplantation

Um das wirkliche Selbsterneuerungspotential einer blutbildenden Stammzelle auszuloten, ist eine serielle Transplantation erforderlich. Es ist bekannt, dass das Selbsterneuerungs- und Repopulationspotential einer hämatopoetischen Stammzelle für mehr als die einfache Lebensspanne einer Maus ausreicht. Eine gesunde Stammzelle kann normalerweise drei bis vier Runden in einer seriellen Transplantation durchlaufen bevor ihr Potential erschöpft ist und die Blutbildung nicht mehr gewährleistet werden kann (Warren and Rossi, 2009). Deshalb gibt eine einmalige Transplantation von Testzellen keinen ausreichenden Aufschluss über das volle Selbsterneuerungs- und Repopulationspotential des Testknochenmarks.

In der Abbildung 18 gezeigten zweiten Runde der seriellen Transplantation haben die Kontrolltiere insgesamt niedrige Zellzahlen an reifen Zellen im Blut und die Empfänger des Zeb2-defizienten Knochenmarks erreichen nur noch einen Wert von ca. 1000 Leukozyten pro Mikroliter Blut. Normal sind ca. 6000-8000 Zellen pro Mikroliter Blut. Es wurde von einer dritten Runde der Transplantation abgesehen, da die Empfängertiere des Zeb2-defizienten Knochenmarks vermutlich nicht überleben würden. Auch in der zweiten Runde der Transplantation zeigt sich, dass die Zeb2-defizienten Knochenmarkzellen kaum B-Lymphozyten und Monozyten bilden. Auch die Anzahl der T-Zellen ist reduziert. Außerdem zeigt sich in der zweiten Runde

der Transplantation erstmals auch eine reduzierte Anzahl an Granulozyten auch wenn die nicht ganz die Signifikanz erreicht.

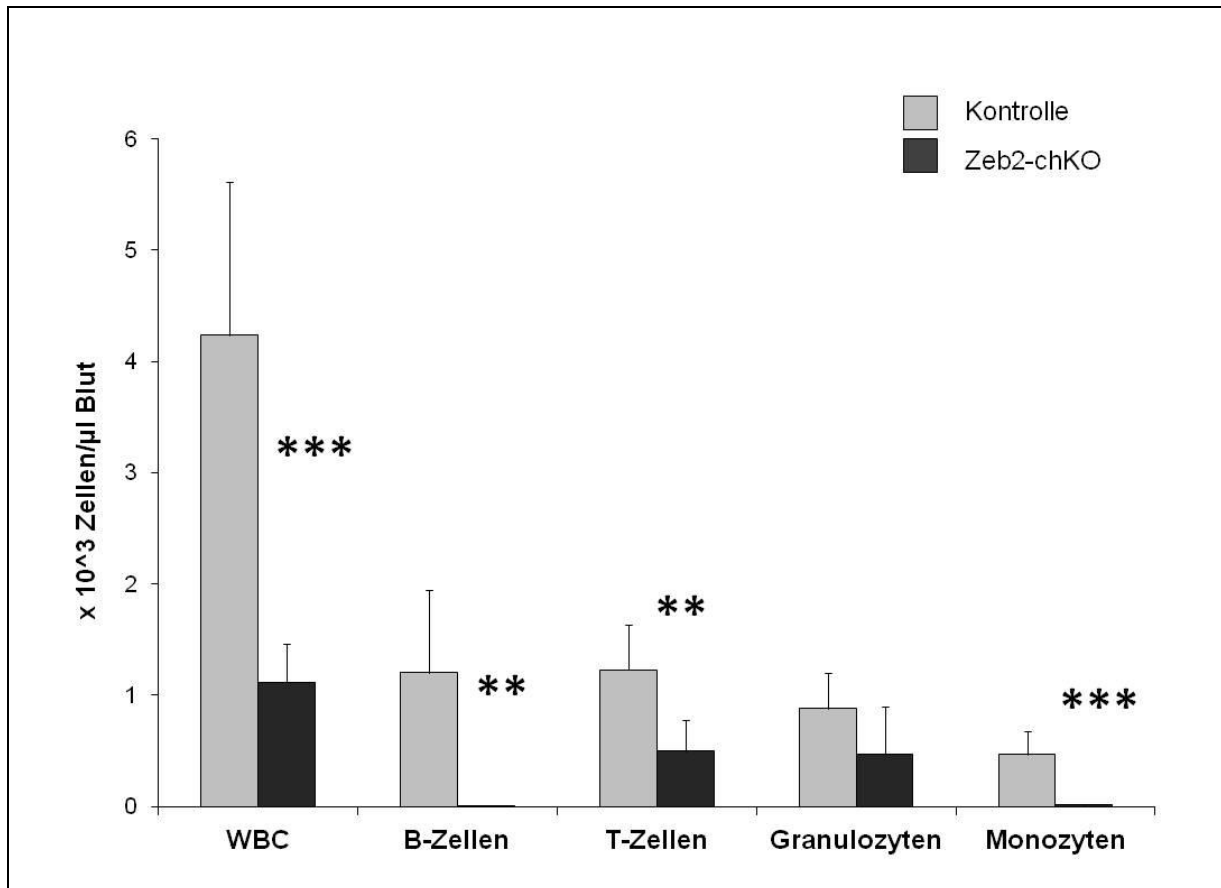
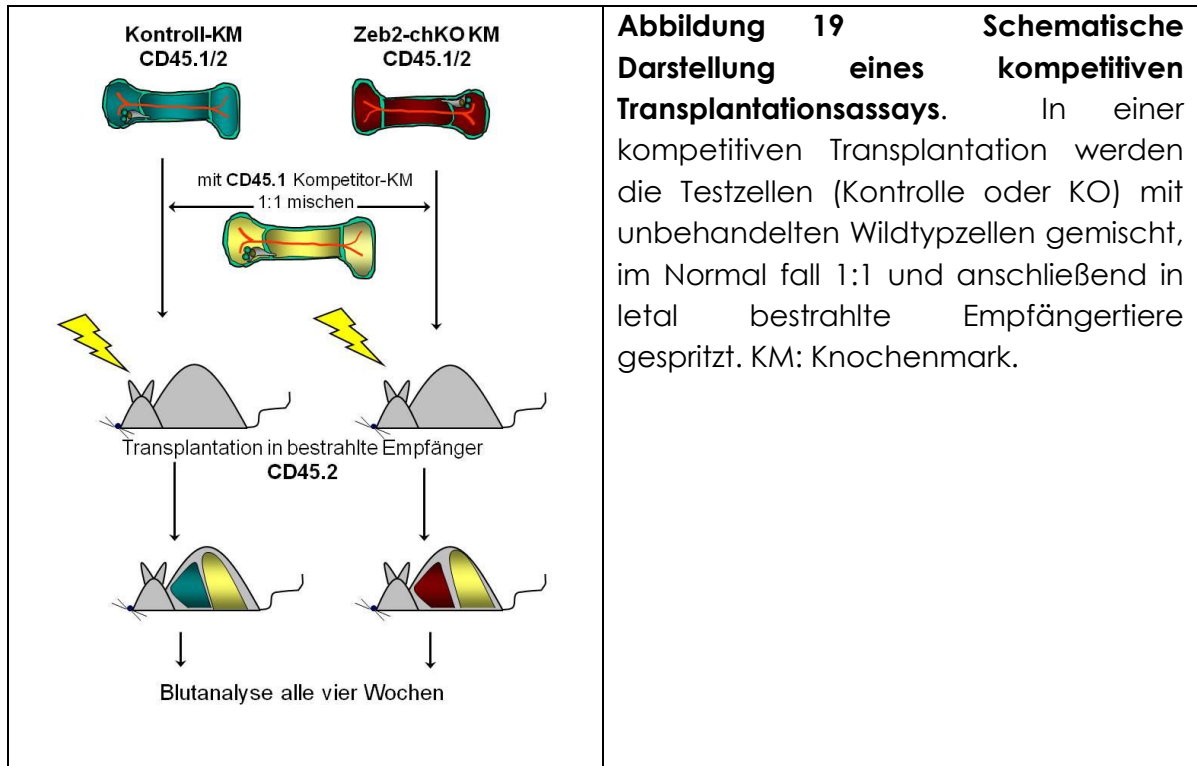


Abbildung 18 Wiederherstellung des peripheren Bluts in der zweiten Runde der nicht-kompetitiven Transplantation. Gezeigt sind absolute Zellzahlen, gemessen 16 Wochen nach Transplantation. Die Zeb2-defizienten Zellen tragen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich weniger an reifen Zellen zum Blut bei und zeigen die gleichen Einschränkungen, wie bei nicht-transplantierten Zeb2-chKO und Kontrollzellen, die Bildung von B-Zellen, T-Zellen und Monozyten ist deutlich erniedrigt.

5.6.3 Kompetitive Transplantation

Anschließend wurde in einer kompetitiven Transplantation überprüft, wie sich die Testzellen (Zeb2-defizient und Kontrollzellen) in direkter Konkurrenz zu gesunden Wildtypzellen verhalten. Dazu wurden die jeweiligen Testzellen (CD45.1/2) im Verhältnis 1:1 mit zuvor unbehandeltem

Wildtypknochenmark (CD45.1) in letal bestrahlte Empfängermäuse (CD45.2) transplantiert (Abbildung 19). Pro Empfänger wurden 2×10^6 Zellen Knochenmark transplantiert.



Auch bei der kompetitiven Transplantation zeigen sich die bereits im physiologischen Zustand beobachteten Defekte: Während die Kontrollzellen zu allen Lineages im Blut ca. 40% beitragen (60% der reifen Zellen im Blut werden vom Kompetitor-Knochenmark gebildet), zeigen die Zeb2-defizienten hämatopoetischen Zellen einen Mangel an reifen Blutzellen (Abbildung 20) im Vergleich zu den Kontrolltestzellen. Überdies treten die Defekte in einem kompetitiven Transplantationssetting noch deutlicher zum Vorschein: Die Zeb2-defizienten Zellen tragen in allen

Lineages außer der granulozytären Reihe weniger als 10% zu den reifen Zellen des Blutes bei, bei B-Zellen und Monozyten sogar nur ca. 2%. Die einzige Reihe, die merklich beiträgt, ist die der Granulozyten, in der knapp 30% der reifen Zellen von den Zeb2-defizienten Testzellen gebildet werden. Hiermit bestätigt sich der markante Differenzierungsdefekt, der alle Reihen des peripheren Blutes betrifft außer den Granulozyten. Plättchen- und Erythrozyten-/Hämoglobinwerte sind bei der kompetitiven Transplantation nicht aussagekräftig. Da auf den Thrombozyten und Erythrozyten keine CD 45-Expression vorhanden ist kann nicht unterschieden werden welcher Anteil der Plättchen und der roten Blutkörperchen von den Testzellen bzw. von den Kompetitorzellen gebildet wurde.

In der zweiten Runde sind die Defekte der Zeb2-defizienten Zellen im Vergleich zu den Poly(I:C)-behandelten Kontrollzellen immer noch erkennbar, allerdings tragen die Poly(I:C)-behandelten Zellen allgemein deutlich weniger reife Zellen zum Blut bei als die unbehandelten Kompetitorzellen. In der dritten Runde wird das periphere Blut fast ausschließlich vom Kompetitor und zum Teil sogar von übriggebliebenen hämatopoetischen Zellen (trotz letaler Bestrahlung!) der Empfängertiere gebildet. Dies liegt vermutlich daran, dass die Poly(I:C)-Behandlung durch die massive Immunreaktion, die im behandelten Tier ausgelöst wird, die hämatopoetischen Zellen sehr stresst und somit aktiviert mit nachfolgender Reduktion langzeitrepulierender Stammzellen. In einer seriellen Transplantation weisen diese Zellen nicht die gleiche Repopulations-

fähigkeit über mehrere Runden der seriellen Transplantation wie die unbehandelten, wildtypischen Zellen auf. Nichtsdestotrotz zeigt auch die zweite Runde der Transplantation, dass die Zeb2-defizienten Zellen kaum zur Bildung reifer B-Zellen und Monozyten beitragen, wohingegen sie sehr wohl Granulozyten bilden können. In der dritten Runde der Transplantation tragen sowohl Kontroll- als auch Zeb2-defiziente Zellen kaum noch zur Blutbildung bei. Außerdem wird ein beträchtlicher Teil des Blutes von hämatopoetischen Zellen, die vom Empfängertier stammen gebildet, was auf eine Erschöpfung der transplantierten Zellen hinweist. Auf eine vierte Runde der Transplantation wurde deshalb verzichtet.

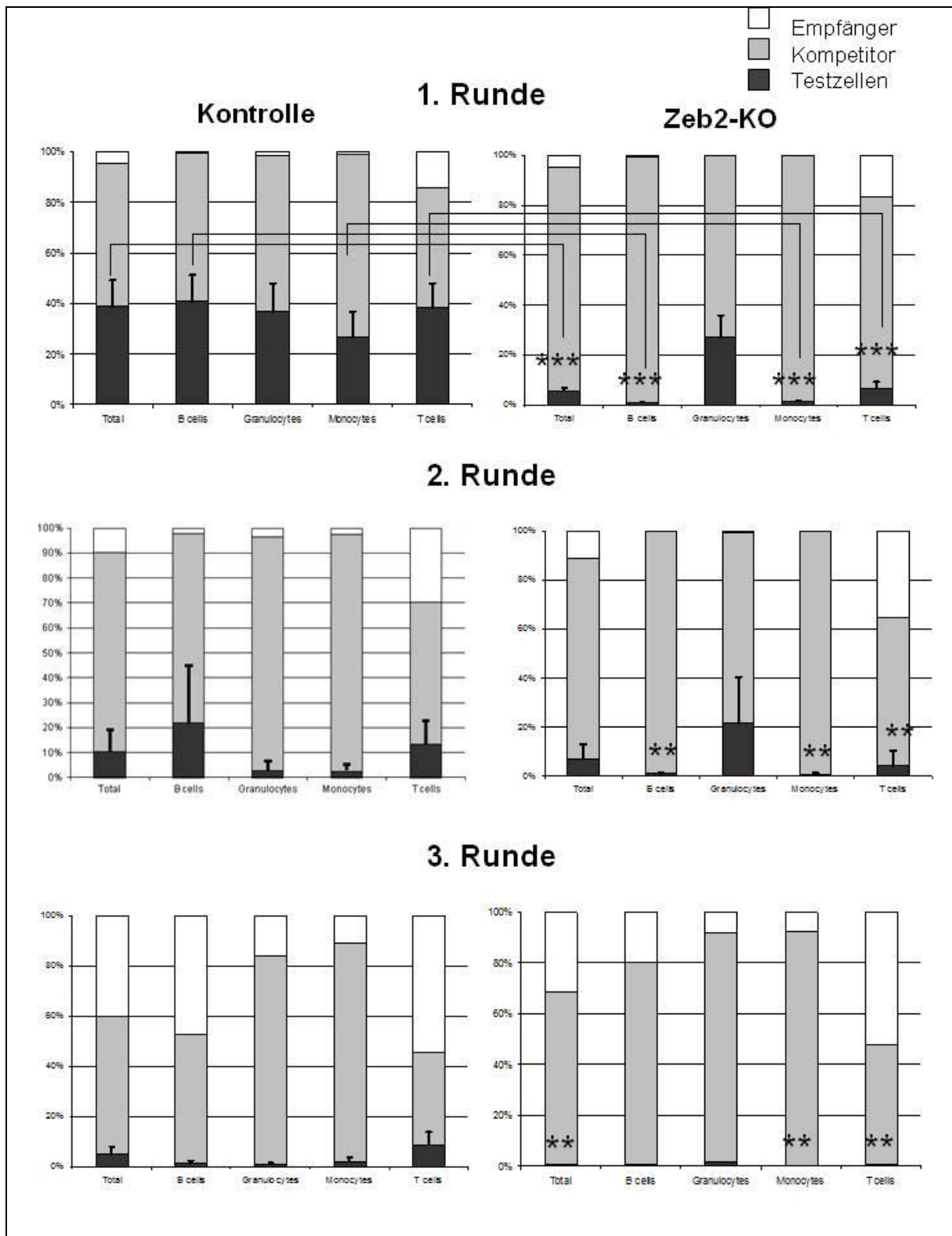


Abbildung 20 Beitrag von Zeb2-defizienten und Kontrollzellen zum peripheren Blut in einer seriellen, kompetitiven Transplantation. A Erste Runde Die Zeb2-defizienten Zellen tragen eindeutig weniger als 50% der reifen Zellen zum peripheren Blut bei, und das bei allen untersuchten Subpopulationen außer den Granulozyten. Die Kontrollzellen dagegen tragen insgesamt mit ca. 40% bei und sind in der ersten Runde noch nicht deutlich benachteiligt gegenüber dem Kompetitor. **B Zweite Runde** In der zweiten Runde dagegen sind alle

Poly(I:C)-behandelten Zellen deutlich benachteiligt gegenüber den Kompetitorzellen. Dennoch spiegelt sich das typische Rekonstitutionsmuster der KO-Zellen immer noch wieder. **C Dritte Runde** In der dritten Runde findet man kaum noch Testzellen, fast alle reifen Zellen im Blut werden von den Kompetitorzellen gebildet. Unterschiede zwischen Kontroll- und Zeb2-defizienten Zellen sind schwer zu beurteilen. - Alle Werte wurden 12 Wochen nach der Transplantation gemessen.

Betrachtet man das relative Engraftment oder den relativen Anteil der Teststammzellen im Vergleich zu den Stammzellen, die vom Kompetitor Knochenmark stammen, wird bereits in der ersten Runde der Transplantation deutlich, dass sich die Zeb2-defizienten Zellen nur zu einem geringeren Anteil zur Blutbildung beitragen als die Kontroll-Testzellen. Statistisch gesehen engrafteten die Testzellen zu jeweils gleichen Anteilen, sowohl relativ zum Kompetitor (Abbildung 21A) als auch in ihrer relativem Anteil aller mononukleären Zellen im Knochenmark (Abbildung 21 B). Allerdings ist im Zeb2-defizienten Knochenmark zumindest phänotypisch die Anzahl der Stammzellen um das drei- bis vierfache erhöht. Diese Erhöhung der Stammzellzahl spiegelt sich aber nach Transplantation nicht in einer erhöhten Anzahl der Zeb2-defizienten Testzellen wider. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass zumindest in Konkurrenz zu einem Kompetitor Zeb2-defiziente Zellen weniger effizient engrafteten. Wenn die Zeb2-chKO Stammzellen nicht in direkter Konkurrenz zu Wildtyp-Kompetitorzellen stehen (wie es bei der nicht-kompetitiven Transplantation der Fall ist), sieht man in der ersten Runde der Transplantation noch, dass es im Knochenmark der Zeb2-chKO-Empfänger signifikant mehr hämatopoetische Stammzellen gibt. In der zweiten Runde der nicht-kompetitiven Transplantation dagegen gibt es prozentual im Gesamtknochenmark nur noch gleich viele Stammzellen wie

bei den Kontroll-Empfängertieren. Relativ gesehen hat also das Knochenmark der Zeb2-chKO-Empfängertiere an Stammzellen verloren.

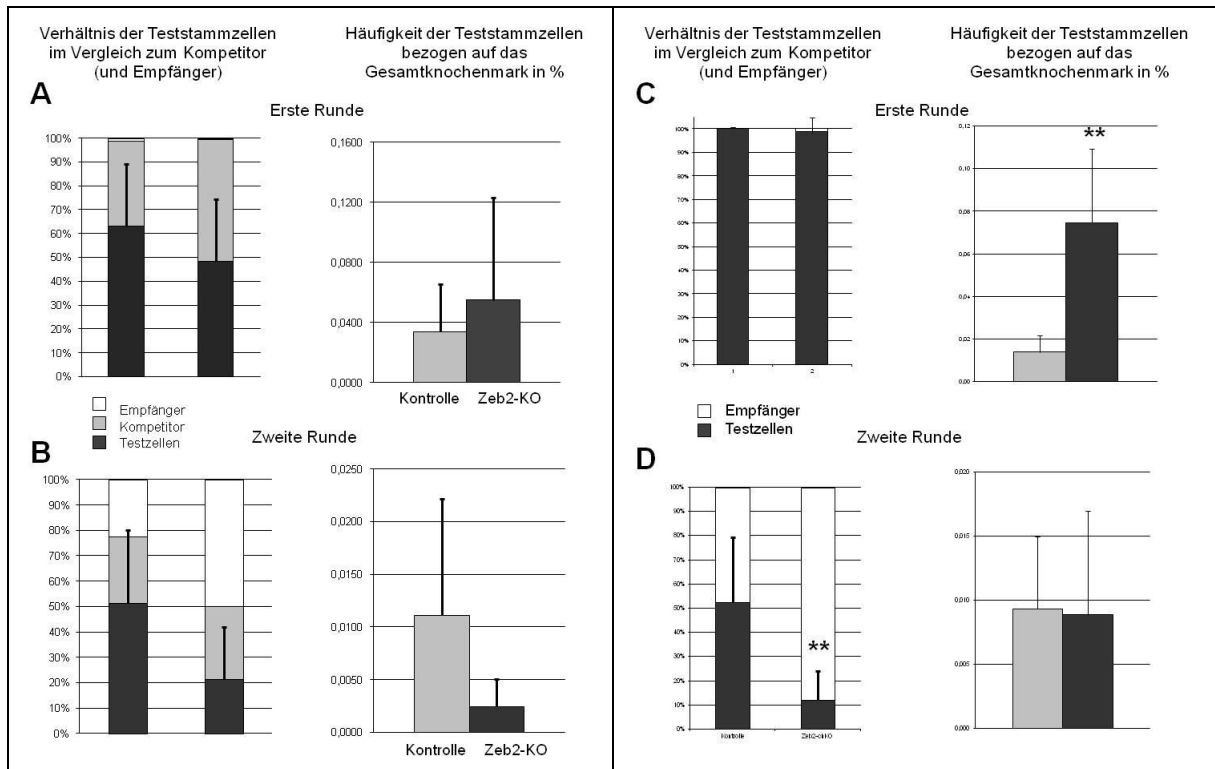


Abbildung 21 Relativer Beitrag von Zeb2-defizienten Stammzellen in nicht-kompetitiver und kompetitiver serieller Transplantation. **A** In der ersten Runde der kompetitiven Transplantation sind gleiche Anzahlen und Prozentsätze von Zeb2-defizienten und Kontrollstammzellen im Knochenmark zu finden. **B** In der zweiten Runde der Transplantation finden sich jedoch weniger Zeb2-defiziente Stammzellen im Knochenmark, wenngleich der Unterschied nicht signifikant ist. Das Knochenmark wurde im Verhältnis 1:1 von Wildtyp: Testzellen transplantiert. **C** In der nicht-kompetitiven Transplantation sind in der ersten Runde deutlich mehr Stammzellen im Zeb2-defizienten Knochenmark zu finden. In der zweiten Runde reduziert sich jedoch der Anteil auf das gleiche Maß wie bei den Kontrollzellen. **D** In der zweiten Runde der nicht-kompetitiven Transplantation tragen die Testzellen nur noch 50 (Kontrolle) bzw. ca. 10% (Zeb2chKO) der Zellen bei, die restlichen Zellen, sind Zellen der Empfängertiere, die die Bestrahlung überlebt haben.

5.6.4 Mögliche Gründe für die Verschiebung der Progenitorenverhältnisse

In Zeb2-chKO Mäusen sind sowohl unter physiologischen Konditionen als auch nach Transplantation ohne Kompetitorzellen sowohl eine Akkumulation von Stammzellen als auch eine Verschiebung unter den

Progenitorsubpopulationen zu beobachten. Ob es sich hierbei um eine stamm- und progenitorintrinsic Fehregulation handelt oder einen Versuch kompensatorisch für die fehlende periphere Blutzellen die Vorläuferzellen zu aktivieren, war zunächst nicht ersichtlich. Eine kompensatorische Reaktion des Organismus wäre zu erwarten, da deutliche Defekte in der Reifung der megakaryozytären-erythroiden Reihe vorliegen. Allerdings liegt auch ein Mangel an Monozyten/Makrophagen vor und deren Vorläufer, die GMPs werden nicht vermehrt gebildet. Um diese Frage zu klären, wurden die hämatopoetischen Vorläuferpopulationen im Rahmen der kompetitiven Transplantation genauer untersucht. Wenn vermehrte Nachfrage an reifen Zellen die Ursache für die Vermehrung der MEPs in Zeb2-defizienten Tieren sein sollte, dann dürfte sich diese Vermehrung der Zellen in einer kompetitiven Transplantation nicht zeigen, da in diesem Falle ja ausreichend gesunde Zellen mittransplantiert wurden und ein Mangel an reifen Zellen nicht auftritt.

In Abbildung 22 wird die Verteilung der Progenitoren in der kompetitiven Transplantation gezeigt, aufgeschlüsselt nach den Testzellen allein und den gesamten Progenitorzellen. Während bei allen Progenitorzellen gemeinsam keine auffälligen Abweichungen von den normalerweise im Wildtyp beobachteten Verhältnissen auftreten, zeigt sich ein anderes Bild, wenn nur die CD45.1/2 heterozygoten Testzellen betrachtet werden.

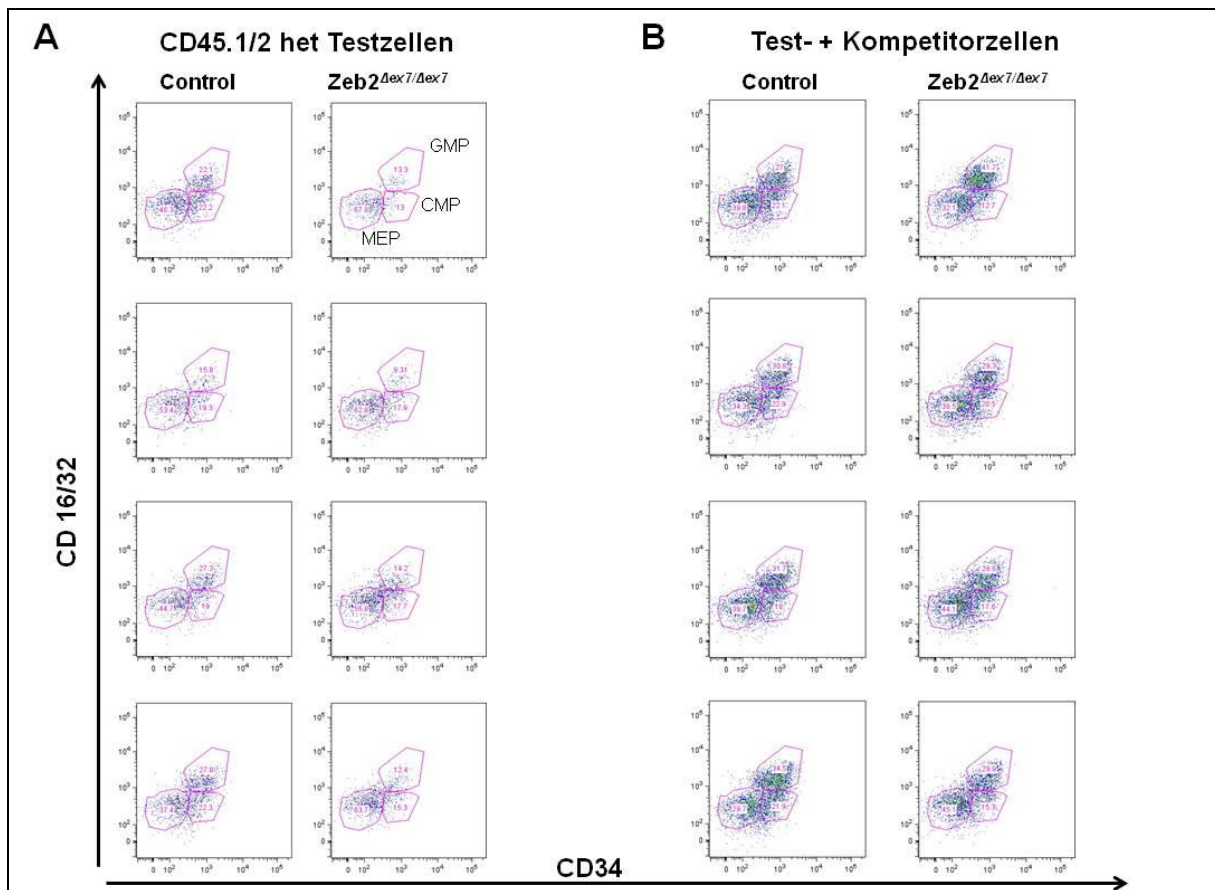


Abbildung 22 Verteilung der Progenitoren in der kompetitiven Transplantation (erste Runde). In **A** sind nur die Testzellen gezeigt, in **B** die kombinierten Anteile von Test und Kompetitorzellen. Die Verschiebung der Progenitorenverhältnisse mit weniger GMPs und mehr MEPS wird nur sichtbar, wenn man die Testzellen alleine (Kontrolle versus Zeb2-chKO) betrachtet.

Hier wird deutlich, dass die Zeb2-defizienten Testzellen deutlich weniger GMPs und dafür mehr MEPs beitragen, als dies bei den Kontrollzellen der Fall ist. Es zeigt sich also erneut die bereits im nicht-transplantierten, physiologischen Zustand beobachtete Verschiebung der Progenitorenverhältnisse, obwohl hier ausreichend wildtypische Zellen vorhanden sind, die insgesamt die Verhältnisse auf ein normales Level bringen. Die Verschiebung vom GMPs hin zu MEPs bei den Progenitoren in Zeb2-defizientem Knochenmark scheint also nicht durch einen Rückkoppelungseffekt aufgrund des Mangels an reifen Blutzellen verursacht

zu werden, sondern ist einer intrinsischen Veränderung der Zeb2-defizienten Progenitorzellen zuzuschreiben.

5.7 Der Einfluss der Deletion von Zeb2 auf die Stammzellnische

5.7.1 Transplantation in die Zeb2-defiziente Nische

Die Regulation hämatopoetischer Stammzellen erfolgt sowohl durch zellintrinsische Regulationsmechanismen als auch durch eine signalvermittelte extrinsische Komponente von nicht-hämatopoetischen Zellen, bekannt als die Stammzellnische, welche aus einer sehr komplexen Zusammensetzung aus zellulären (Osteoblasten, mesenchymalen Stromazellen, Fettzellen, Vaskulären Zellen und neuronalen Zellelementen) sowie extrazellulären Matrix besteht. Die in diesem Projekt angewandte konditionale Elimination von Zeb2 in hämatopoetischen Zellen mittels Poly(I:C)-Injektionen in $Mx1^{Cre}$ -Zeb2^{fl/fl} Mäusen ist eine Standardmethode zur Induktion von konditionalen Gendeletionen im hämatopoetischen System. Die Aktivierung der Cre-Rekombinase ist jedoch nicht auf hämatopoetische Zellen beschränkt, sondern resultiert auch in der Aktivierung der Cre-Rekombinase in den nicht-hämatopoetischen Knochenmarkzellen (Kuhn et al., 1995; Larsson et al., 2008; Zhang et al., 2003). Daher müssen auch die von uns beobachteten Änderungen des hämatopoetischen Stammzellphänotyps einer Zeb2-Deletion auf eine mögliche indirekte Beeinflussung durch die Änderung der Stammzellnische überprüft werden

und ggf. davon abgegrenzt werden. Um zu untersuchen inwieweit der beobachtete Phänotyp in der Hämatopoese durch eine Zeb-2-deletierte Stammzellnische beeinflusst bzw. hervorgerufen wird, wurden unbehandelte, Wildtyp Knochenmarkzellen im Vergleich in eine Zeb2-defiziente Nische und eine Kontrollnische (Poly (I:C)-behandelt, aber nicht Zeb2-defizient) transplantiert.

5.7.1.1 Erste, nicht kompetitive Runde

In einer ersten Runde der Transplantation wurden 2×10^6 unbehandelte, Knochenmarkzellen einer Wildtypmaus in jeweils sechs letal bestrahlte Kontroll- und sechs Zeb2-defiziente Empfängertiere transplantiert. Die Empfängergruppen waren 8 Wochen vor der Transplantation mit Poly (I:C) induziert worden. Den Tieren wurde nach gewohntem Schema 4, 8 12 und 16 Wochen nach der Transplantation Blut entnommen und sowohl ein Blutbild erstellt als auch durchflusszytometrisch analysiert. Es zeigten sich keinerlei Unterschiede in der Zusammensetzung des peripheren Blutes zwischen Blut, das in der Kontroll- und Blut das in der Zeb2-defizienten Nische produziert worden war (Abbildung 23 A).

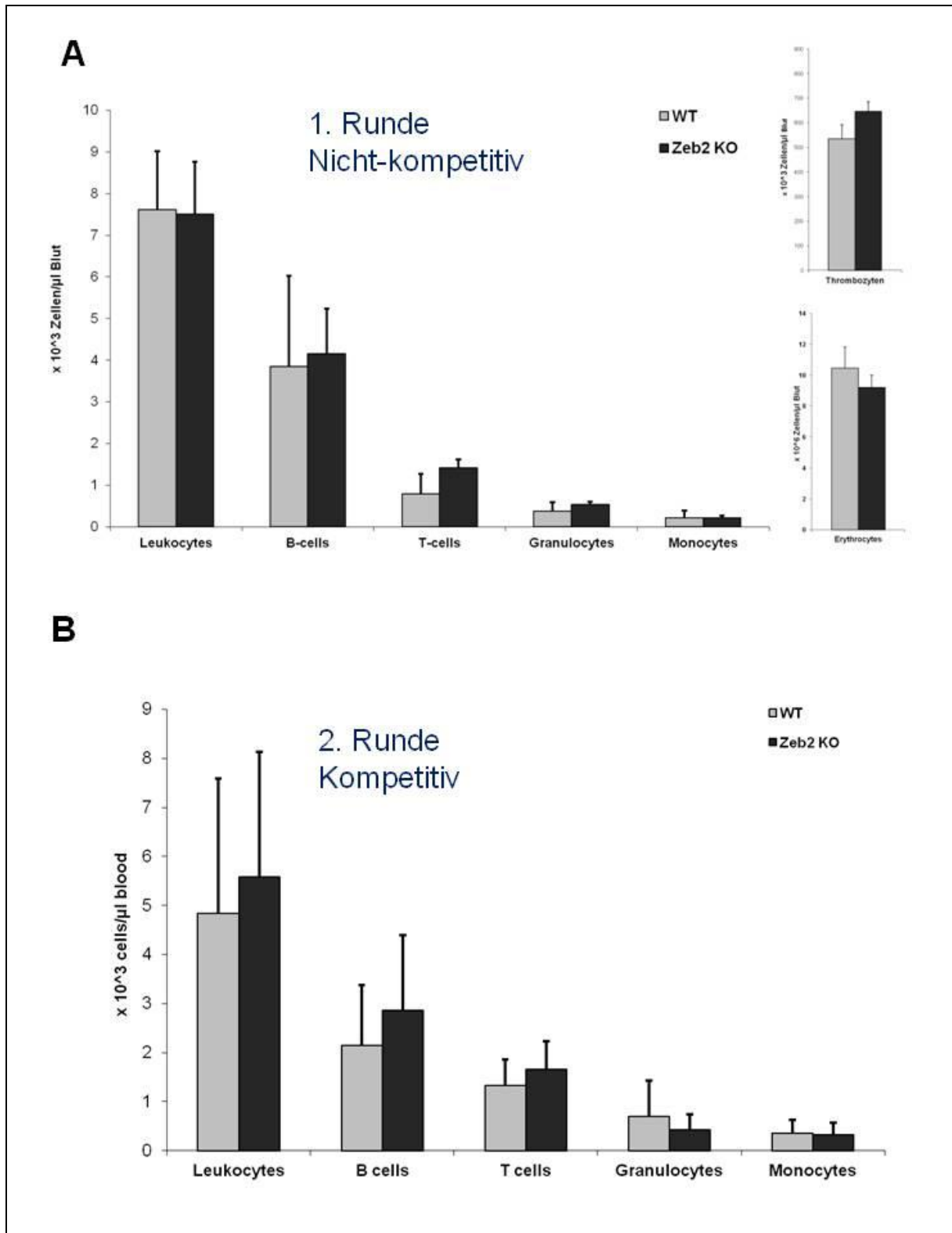


Abbildung 23 Blutwerte der Wildtypzellen aus Kontroll- und Zeb2-defizienter Nische. Es gibt keine Unterschiede im Beitrag zu den reifen Zellen des peripheren Bluts zwischen Knochenmarkszellen, die einer Zeb2-defizienten oder einer Kontrollnische ausgesetzt waren. Die Daten wurden 16 Wochen nach Transplantation aufgenommen.

5.7.1.2 *Zweite, kompetitive Runde*

16 Wochen nach der Transplantation wurde das Knochenmark der Empfängertiere der ersten Runde entnommen und im Verhältnis 2:1 (Knochenmark aus der ersten Runde: frischem Kompetitor-Knochenmark) in jeweils zehn neue Empfängertiere weiter transplantiert. Da bei dieser Transplantation die Kompetitorzellen erst in der zweiten Runde eingeführt wurden, und somit die Testzellen bereits eine Transplantationsrunde mehr durchlaufen hatten, wurde hier in einem Verhältnis von 2:1 von Testzellen zu Kompetitorzellen transplantiert.

Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen Knochenmark, das aus der Kontrollnische stammt im Vergleich zu Knochenmark, das der Zeb2-defizienten Nische ausgesetzt war. Beide Testknochenmärker trugen gleichviel zur Produktion des peripheren Blutes bei im Vergleich zum Kompetitor-Knochenmark (Abbildung 24). Dies bedeutet, dass die Zeb2-defiziente Nische keinen messbaren Einfluss auf den beobachteten Phänotyp mit verminderten reifen Zellen im Blut, einem vergrößerten Stammzellkompartiment und verschobenen Progenitorverhältnissen hat. Es ist davon auszugehen, dass der Zeb2-chKO-Phänotyp autonom durch die Zeb2-defiziente hämatopoetische Stammzelle hervorgerufen wird.

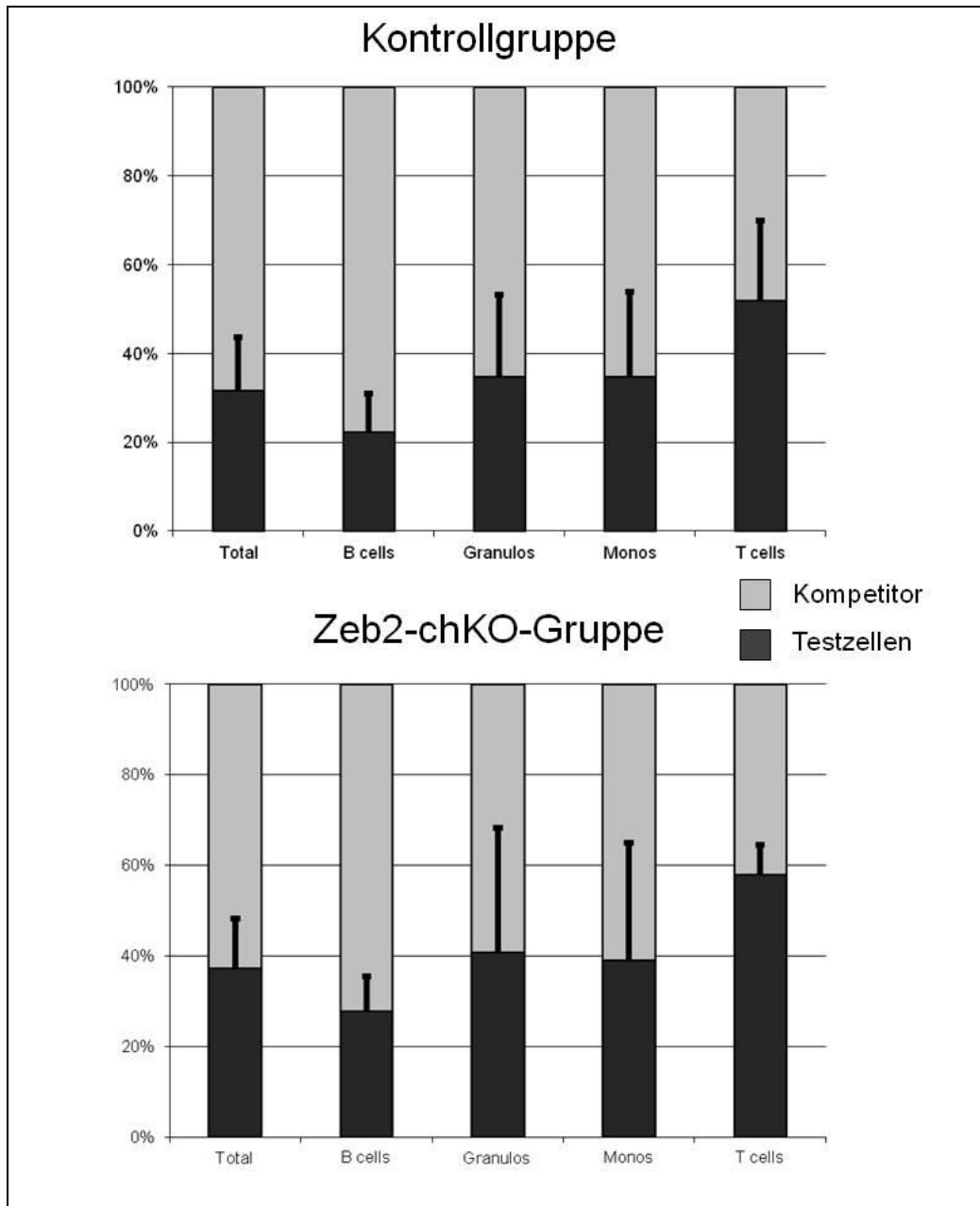


Abbildung 24 Beitrag der Testzellen in einer zweiten, kompetitiven Runde der Nischentransplantation. Nachdem die Testzellen jeweils einer Zeb2-defizienten und einer Kontrollnische für 16 Wochen ausgesetzt waren, wurden sie in einem kompetitiven Setting weitertransplantiert. Es zeigte sich kein Unterschied im Beitrag zum peripheren Blut der Knochenmarkszellen, die der Zeb2-KO-Nische ausgesetzt waren, im Vergleich zu den Kontrollzellen.

5.8 Genexpressionsanalysen

5.8.1 Microarray-Analysen an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Um zu untersuchen, welche Änderungen im Muster der Genexpression nach Wegfall von Zeb2 auftreten würden, wurden Microarray-Analysen an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen durchgeführt. Hierfür wurden LKS-Zellen, die 48 Stunden nach Poly(I:C)-Behandlung der Mäuse gewonnen wurden, verwendet. Das Ziel war, die möglichst frühen, direkten Änderungen in der Genexpression zu untersuchen und Hinweise auf mögliche Interaktionspartner von Zeb2 zu bekommen.

Für die Untersuchung der Genexpression wurde die Lin⁻ cKit⁺ Sca-1⁺ Population (LKS) aus dem Knochenmark isoliert. Diese enthält Stamm- und multipotente Progenitorzellen. Nach dem Sort erfolgte die RNA-Isolation aus den gewonnenen Stammzellen. Da der Anteil an LKS-Zellen im Gesamtknochenmark gering ist, war eine Amplifizierung der RNA mittels *in vitro* Transkription notwendig, um eine genomweite Genexpressionsanalysen durchführen zu können. Im Anschluss erfolgte eine reverse Transkription zu cDNA und die Hybridisierung auf einem Affymetrix GeneChip. RNA-Isolation, Amplifizierung und die Hybridisierung auf dem GeneChip wurden von der Firma MFT Services in Tübingen durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung der Rohdaten übernahm Professor Holger Fröhlich von der Universität Bonn.

Die Genexpressionsanalysen der hämatopoetischen Vorläuferzellen ergab eine deutlich erkennbare Signatur mit einer signifikanter Hochregulierung einer Vielzahl von Genen, übereinstimmend mit der bekannten Rolle von Zeb2 als transkriptionellem Repressor. Dies macht die in Abbildung 25 gezeigte Heatmap deutlich.

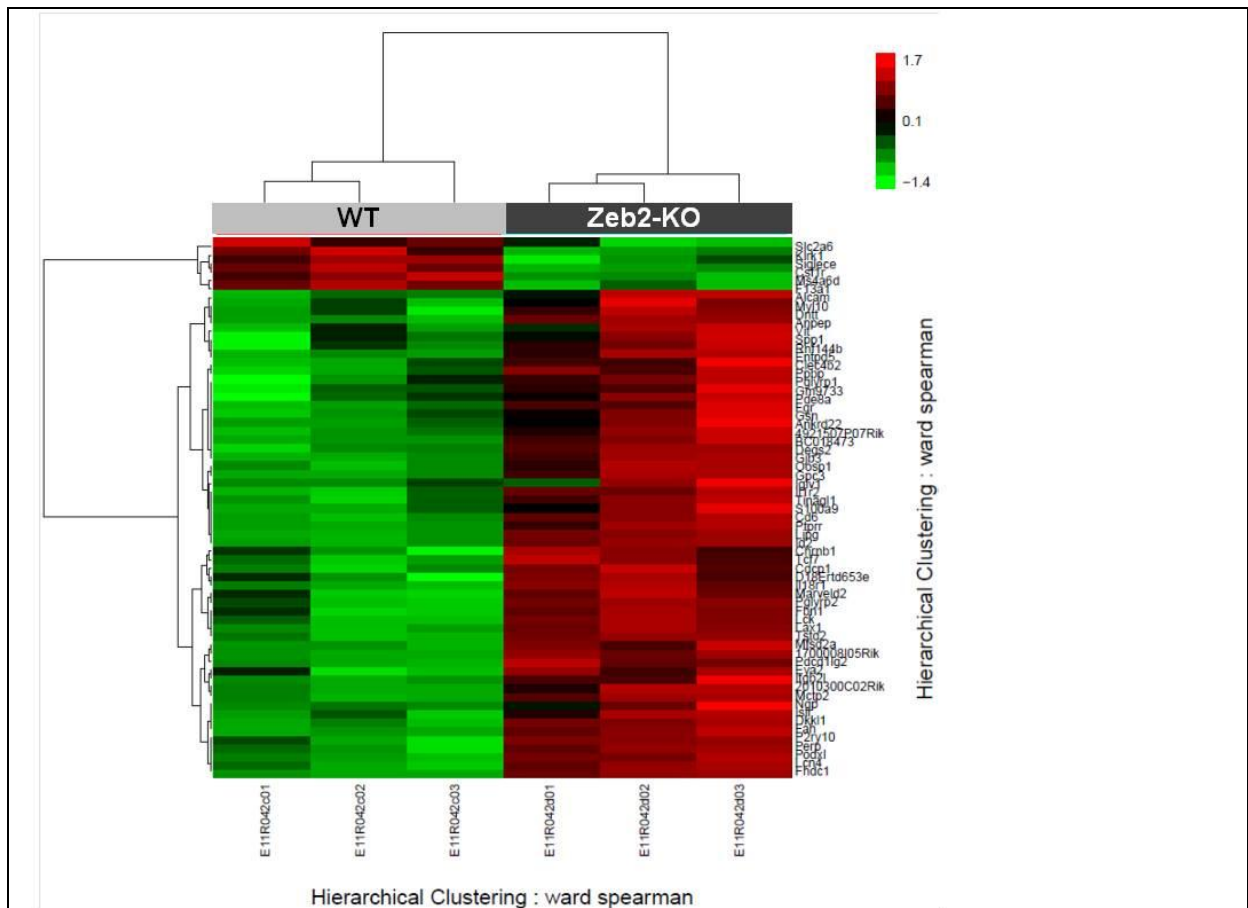


Abbildung 25 Heatmap von Zeb2-KO Stammzellen und Kontrollstammzellen

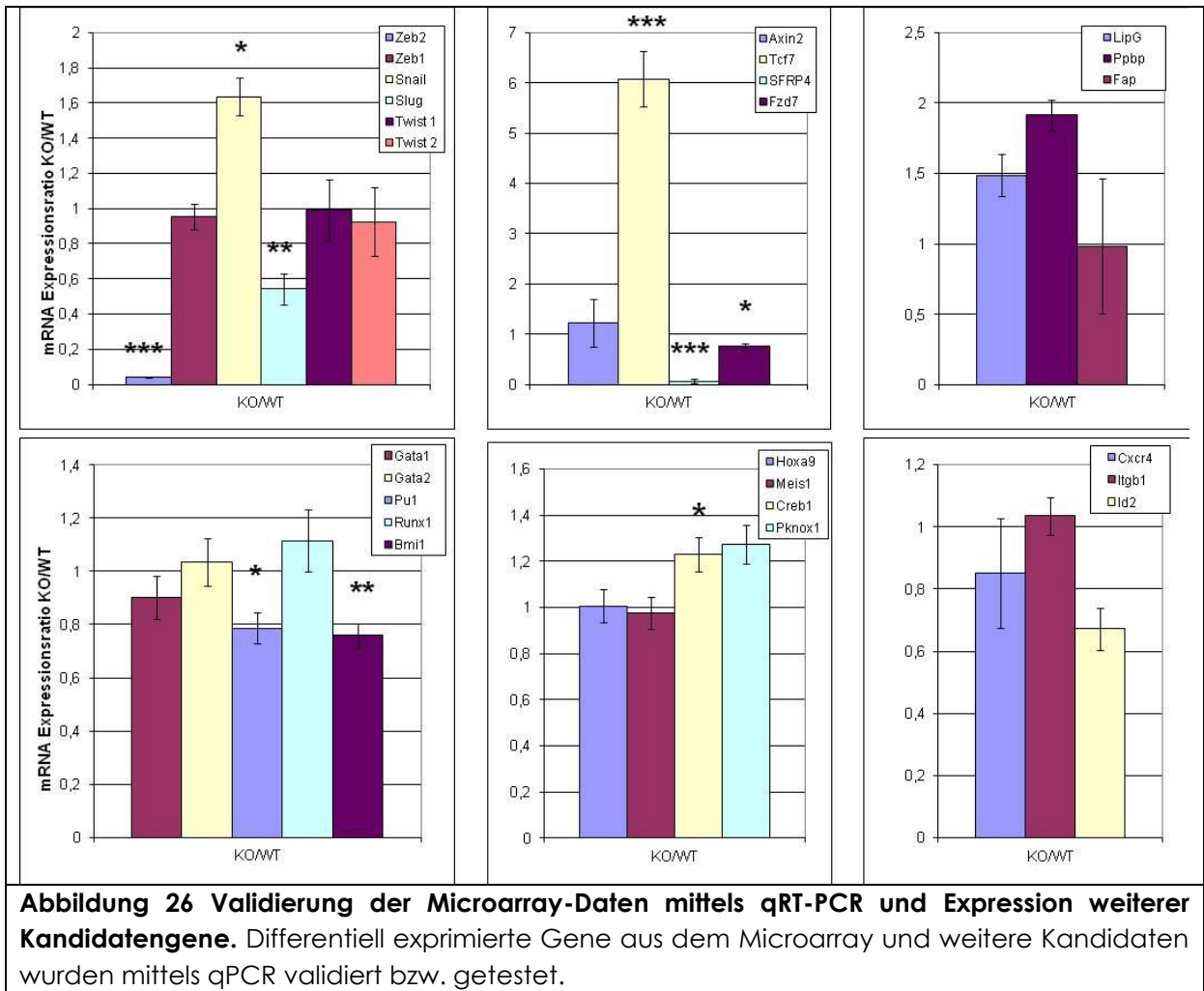
A Die Microarrayanalysen wurden mit Kontroll- und Zeb2-defizienten LKS-Zellen, 48h nach Induktion gesammelt wurden, durchgeführt. Die Heatmap zeigt, dass der Verlust von Zeb2 sich hauptsächlich in der Hochregulation vieler Gene auswirkt.

An der Farbverteilung zeigt sich deutlich, dass der Wegfall von Zeb2 in den meisten Fällen zu einer Hochregulation von Genen führt (rot). Es konnte jedoch auch eine kleinere Gruppe von Genen identifiziert werden, die in Abwesenheit von Zeb2 niedrigeres Expressionsniveau aufwies (grün), in

Übereinstimmung mit der beschriebenen Rolle als teilweise auch transkriptioneller Aktivators.

5.8.2 Validierung der Kandidatengene durch qRT-PCR

Abbildung 26 zeigt die Validierung der aus den Microarray –Daten gewonnen Target-Genen mittels qRT-PCR und die Testung einiger weiterer Gene, die aufgrund bereits veröffentlichter Daten interessant schienen. Insbesondere wurde die Untersuchung der Expression weiterer Mitglieder der bekannten EMT Modulatoren (Zeb1, Snail, Slug und Twist1 & Twist2) für sinnvoll erachtet um mögliche kompensatorische Gegenregulationen zu erkennen. In der Gruppe der EMT-Inducer zeigte sich Snail mit einer Hoch- und Slug mit einer Herunter-Regulation in Abwesenheit von Zeb2. Ob diese Veränderungen in der Expression von Snail und Slug eine Rolle in dem beobachteten Phänotyp haben wird in Nachfolgestudien mit der gleichzeitigen Deletion von Zeb2 und Snail untersucht. Die Expression von Zeb1, Twist1 und Twist2 blieben unverändert in Zeb2-chKO LKS Zellen. Die stärksten und signifikantesten Veränderungen ergaben sich bei einigen Genen, die im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg stehen. TCF-7 war ca. 6-fach hochreguliert, während SFRP4 und Fzd7 herunter reguliert waren. Axin2 zeigte hingegen keine Veränderung im Expressionslevel. Des Weiteren zeigte sich geringe, aber dennoch signifikante Reduktionen im Expressionslevel der beiden Selbsterneuerungsgene PU.1 und Bmi1. Deren Level war auf ca. 80 % des Niveaus bei Kontrolltieren reduziert.



Ob dies eine biologische Relevanz hat, ist schwer zu beurteilen. Der Rückgang der prozentualen Stammzellzahlen im Zeb2-chKO-Knochenmark in serieller Transplantation könnte auf eine Einschränkung der Selbsterneuerungsfähigkeit der Zeb2-defizienten Stammzellen hinweisen. Um dies zu verifizieren sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

5.9 CFC Assay mit Inhibitoren

Um die biologische Relevanz der gefundenen Änderungen der Expression der Gene aus dem Wnt Signalweg zu überprüfen haben wir zunächst in-vitro Versuche unter chemischer Blockade ausgewählter Signalwege

durchgeführt. Da in den Genexpressionsanalysen die gesteigerte Expression von TCF7 und Minderung der SFRP4 Expression zu beobachten war, musste man von einer verstärkten Aktivität des Wnt Signalweges ausgegangen werden. XAV939 ist erst kürzlich als relativ selektiver Inhibitor des Wnt-Signalweges entwickelt und beschrieben worden (Tian et al., 2013; Yamada et al., 2013). Auch dem Medikament Salinomycin werden Wnt-inhibitorische Wirksamkeit zugeschrieben (Lu et al., 2011; Naujokat et Steinhart, 2013). Außerdem haben wir bei den konditionalen Zeb2-defizienten Tieren viele Aspekte eines humanen myeloproliferativen Syndroms festgestellt. Hier steht patho-physiologisch der aktivierte Jak/Stat Signalweg im Zusammenhang mit der Myeloproliferation. Ruxolitinib ist wiederum ein Inhibitor von Jak1&Jak2 und ist sowohl in Europa als auch in Nordamerika für die Behandlung der Myelofibrose zugelassen worden. Schließlich ist Zeb2 ursprünglich als Smad Interacting Protein definiert und somit im Zusammenhang mit TGF- β Signalweg gebracht worden. Ly2157299 ist ein Inhibitor des TGF- β Signalweges (Dituri et al., 2013). Wir haben daher im nächsten Schritt untersucht, ob die Inhibition einer dieser Signalwege eine Änderung in der Fähigkeit zur Bildung myeloischer Kolonien in vitro verursachen würde.

Der unter 4.8.1 beschriebene Colony-Forming-Cell-Assay wurde hier unter Zugabe verschiedener Inhibitoren bzw. DMSO (Kontrolle) durchgeführt. Zeb2-chKO Zellen zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Fähigkeit Kolonien in der Methylzellulose zu bilden. XAV939, Salinomycin und Ruxolitinib zeigen einen selektiven, deutlich inhibierenden Effekt auf die

Zeb2-chKO-Zellen. Wenn also der Jak/Stat-Signalweg (mit Ruxolitinib) oder der Wnt-Signalweg (mit Xav-939 oder Salinomycin) inhibiert werden, bilden Zeb2-defiziente Knochenmarkszellen signifikant weniger Kolonien im CFC Assay als die Kontrollen. Der TGF-beta-Inhibitor Ly2157299 zeigt weder bei der Kontrolle noch bei den Zeb2-chKO-Zellen einen Effekt auf die Anzahl der gebildeten Kolonien im CFC Assay.

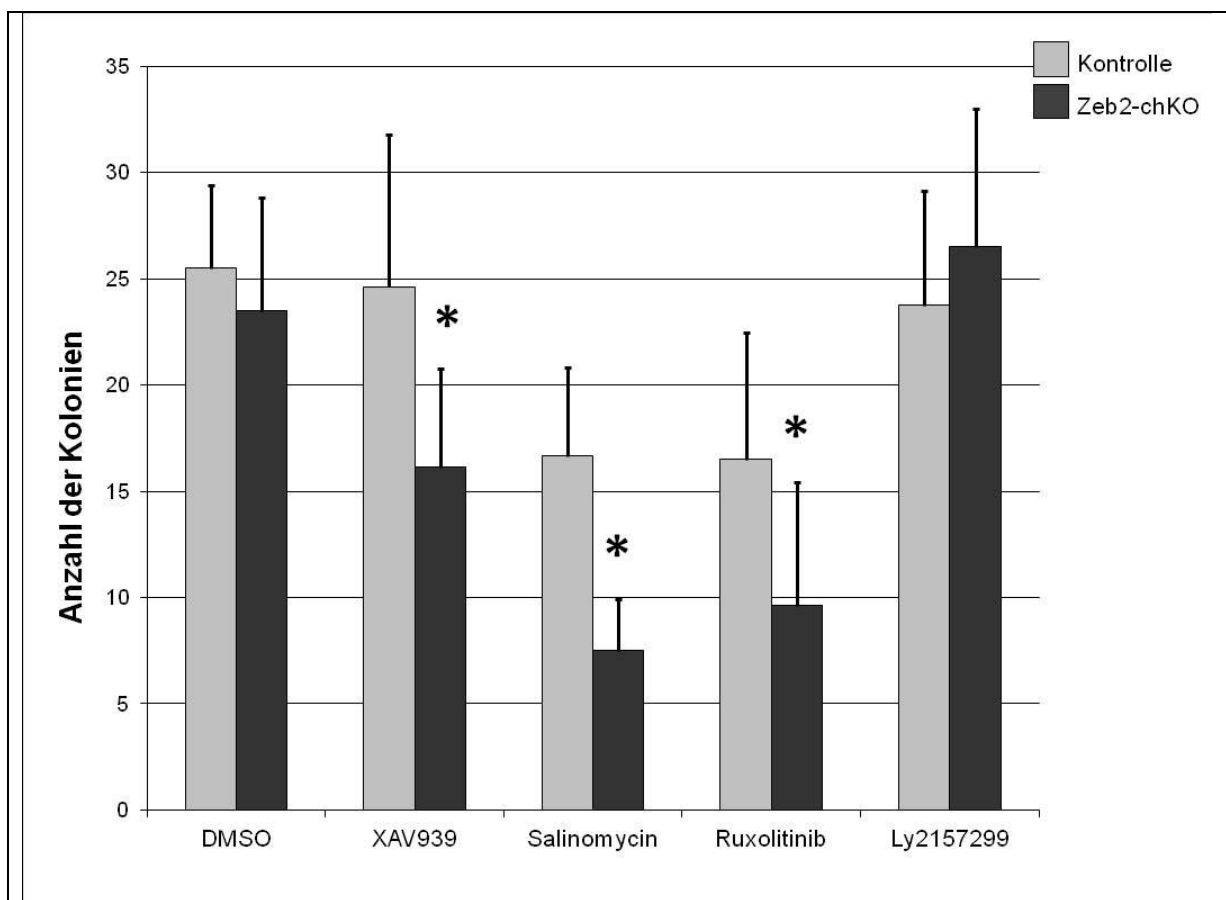


Abbildung 27 Colony-Forming-Cell Assay mit Inhibitoren. Der CFC-Assay wurde unter Zugabe von DMSO (Kontrolle) und verschiedener DMSO-löslicher Inhibitoren (XAV939, Salinomycin, Ruxolitinib und Ly2152977) durchgeführt. Die Kolonien wurden an Tag 8 ausgezählt.

Aus den hier dargestellten Untersuchungen zeigt sich, dass sowohl die Inhibition des Wnt- als auch des Jak/Stat Signalweges in Zeb2-defizienten Knochenmarkszellen zu einer Reduktion der myeloischen Kolonien in-vitro führt. Es ist daher denkbar, dass die Dysregulation dieser beiden Signalwege in Zeb2-defizienten Hämatopoese zu dem beobachteten Phänotyp einer Myeloproliferation führt. Um diese Hypothese zu testen müssten in vivo Untersuchungen mit medikamentösen oder genetischen Inhibition dieser Signalwege durchgeführt werden. Hierfür sind in nachfolgenden Studien die Applikation der Substanz Ruxolitinib in vivo und der anschließenden Analyse des Knochenmarks und der Milz vorgesehen. Eine selektive medikamentöse Inhibition des Wnt Signalweges analog der XAV-939 Inhibition in vitro ist leider noch nicht etabliert. Daher ist in weiterführenden Studien in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hay in Belgien eine konditionale Doppelknockoutmaus für Zeb2 und β -Catenin, einem zentralen Molekül des Wnt-Signalweges, vorgesehen.

Bezüglich des TGF-beta-Signalwegs hat weder die in-vitro Untersuchung mit Inhibition durch Ly-2157299, noch unsere weiterführenden Versuche, wie z.B. die Microarrays, Hinweise darauf erbracht, dass der TGF-beta-Signalweg in hämatopoetischen Zellen am Phänotyp des Zeb2-chKO beteiligt ist.

6 Diskussion

Über die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Zeb2 für die Regulation der Hämatopoese ist bislang nur sehr wenig bekannt. Wie wir bereits zuvor gemeinsam mit unseren Kooperationspartnern Jody Haigh und Steven Goossens aus Gent, Belgien zeigen konnten, spielt Zeb2 eine wichtige Rolle in der embryonalen Hämatopoese. Zeb2 ist essentiell für die Differenzierung von reifen hämatopoetischen Zellen aus Stamm- und Progenitorzellen und beeinflusst auch deren Migration/Lokalisation im Embryo.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen welche Funktion Zeb2 in der adulten murinen Hämatopoese erfüllt.

Da die gezielte Deletion von Zeb2 im hämatopoetischen System zu einer frühen embryonalen Letalität führt (um den Tag E12.5), konnte das zuvor verwendete konditionale KO-System unter Kontrolle des Tie2-Cre bzw. Vav-iCre-Promotors nicht verwendet werden um die adulte Hämatopoese in Abwesenheit von Zeb2 zu studieren. Wir haben daher für unsere Fragestellung ein in adulten Tieren induzierbares Cre-Lox System verwendet. Hierfür wurden die *Zeb2^{-flox/flox}* Tiere mit einem Mausstamm, der die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Mx1-Promotors trägt, gekreuzt. So konnten adulte Tiere gezüchtet werden, bei welchen dann im Alter von sechs bis acht Wochen mittels Poly(I:C) Injektionen die Deletion von Zeb2 induziert wurde.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Zeb2 auch in der adulten murinen Hämatopoese eine wichtige Rolle spielt und seine Deletion alle hämato-

poetischen Zelllinien beeinflusst. Der Loss-of-function-Phänotyp von Zeb2 präsentierte sich als sehr komplex und zeigte Beeinträchtigungen auf allen Stufen der Hämatopoese, angefangen von den Stammzellen über die Progenitoren bis hin zu den differenzierten Zellen. An unterschiedlichen Differenzierungsstadien waren entweder Reifungsstörungen oder übermäßige Proliferation zu beobachten.

Auf dem Stammzelllevel sahen wir eine deutliche Vermehrung der primitivsten hämatopoetischen Zellen. Bei den bereits weiter differenzierten Progenitoren konnten wir eine Verschiebung der Verhältnisse verschiedener Subpopulationen der Vorläuferzellen beobachten. Zeb2-chKO Tiere zeigten eine signifikante Vermehrung von MEPs und deutliche Verringerung von GMPs im Vergleich zum Knochenmark der Kontrolltiere. Es scheint, dass diese Verschiebungen auf ein intrinsisches Ungleichgewicht hinsichtlich des Differenzierungspotentials der Progenitoren zurückzuführen sind. Wenn wir die reifen Zellen im peripheren Blut betrachten, zeigte sich, dass beinahe alle Zellreihen von einem Differenzierungsdefekt betroffen sind und in verringerter Anzahl im peripheren Blut anzutreffen sind. Im Gegensatz hierzu waren die Granulozyten zunächst in der Anzahl kaum verändert, jedoch mit zunehmendem Alter signifikant vermehrt im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ob die Granulozyten zusätzlich Differenzierungsdefizite und somit funktionelle Einbußen aufwies wurde im Rahmen dieser Studie nicht im Detail untersucht und kann damit auch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die Transplantation von Knochenmarkzellen zeigte, dass sowohl das Knochenmark aus Kontrolltieren wie auch das Zeb2-defiziente Knochenmarkzellen in der Lage sind, eine letal bestrahlte Empfängermaus zu repopulieren und die Hämatopoese langfristig (Beobachtungszeitraum von bis zu 6 Monaten nach Transplantation) zumindest teilweise wiederherzustellen, so dass das Überleben der Empfängermäuse gewährleistet ist. Allerdings zeigt die Hämatopoese in den Tieren, die das Zeb2-defiziente Knochenmark erhalten haben, dieselben Defekte wie schon in den Zeb2-chKO Tieren, zum Teil sogar noch mit verschärfter Ausprägung (Empfänger des Zeb2-defizienten Knochenmarks zeigten nun zusätzlich auch reduzierte T-Lymphozyten und praktisch komplettes Fehlen von B-Lymphozyten im peripheren Blut.)

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der nicht-kompetitiven Transplantation zusammen mit den Ergebnissen der Transplantation von Wildtyp Zellen in eine Zeb2-defiziente Nische wird deutlich, dass der beobachtete Phänotyp von der hämatopoetischen Stammzelle ausgeht und somit zellintrinsisch zu werten ist. Aus den von uns durchgeführten Untersuchungen ergaben sich keine Hinweise auf eine signifikante Rolle der die hämatopoetische Stammzellen umgebende Nische bei den Effekten der Zeb2-Deletion in der Hämatopoese. Denn der Phänotyp wird mit der hämatopoetischen Zelle an das Empfängertier weitergegeben, tritt aber nicht auf, wenn Wildtypzellen in eine Zeb2chKO-Nische transplantiert werden.

In der kompetitiven Transplantation, bei der die Testzellen (Zeb2-chKO oder Kontrolle) im Verhältnis 1:1 mit unbehandelten Wildtypzellen gemischt transplantiert wurden, zeigten die Zeb2-defizienten hämatopoetischen Zellen ebenfalls die bereits zuvor beobachteten Defekte. Überdies traten die Defekte in einem kompetitiven Transplantationssetting noch deutlicher zum Vorschein: Die Zeb2-defizienten Zellen trugen in allen Linien außer der granulozytären Reihe weniger als 10% zu den reifen Zellen des Blutes bei, bei B-Lymphozyten und Monozyten sogar nur ca. 2%. Die einzige Zellreihe die die Zeb2-defiziente hämatopoetische Zelle in merklichem Umfang produzierte, war die granulozytäre, die knapp 30% der reifen Zellen bildete. Damit bestätigte sich auch hier ein markanter Differenzierungsdefekt, der die meisten Reihen des peripheren Blutes betrifft.

Nach einer serieller Transplantation (zweite und dritte Runde), zeigte sich, dass reife Zeb2-chKO Zellen in einem sehr geringen Umfang noch weiter gebildet werden konnten. Dies spricht gegen eine frühzeitige Erschöpfung Zeb2-defizienter Stammzellen. Allerdings wiesen auch die Zellen der Poly(I:C)-behandelten Kontrolltiere im Vergleich zu den unbehandelten Kompetitor-Zellen in serieller Transplantation eine verringerte Repopulationsfähigkeit auf. Da aber auch nach drei Runden (kompetitiver) Transplantation noch Zeb2-defiziente Zellen im peripheren Blut, sowie Stammzell- und Progenitorzellen im Knochenmark vorhanden waren, muss von einer erhaltenen Selbsterneuerungsfähigkeit Zeb2-defizienter Stammzellen ausgegangen werden. Allerdings ist die Interpretation der hier erhobenen Daten bei

gleichzeitig vorliegenden massiven Einschränkungen der Differenzierungsfähigkeit Zeb2-defizienter Hämatopoese etwas limitiert, da die Repopulationsfähigkeit von Stammzellen auf Grund der Multilineage-Rekonstitution definiert ist. Das Selbsterneuerungs- und Repopulationspotential in Zeb2-chKO Tieren scheint für ein Überleben über viele Monate unter normalen Bedingungen in der Tierhaltung und auch unter Bedingungen der seriellen Transplantation durchaus ausreichend.

Zusätzlich zu den beschriebenen Differenzierungsdefekten zeigen die Zeb2-chKO-Tiere einige Merkmale einer myeloproliferativen Erkrankung. Nach Induktion der Zeb2-Deletion zeigte sich eine deutliche Vermehrung der Granulopoese im Knochenmark einhergehend mit erhöhten Granulozytenzahlen im peripheren Blut im weiteren Verlauf, sowie zunehmende Splenomegalie und extramedulläre Hämatopoese und eine leichte Fibrose des Knochenmarks (Grad I). Auch die Lebensspanne der chKO-Mäuse war im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant verkürzt.

Die von uns beobachtete Veränderungen in der Hämatopoese und der Phänotyp der Maus lässt gewisse Parallelen zu Veränderungen bei den humanen Erkrankungen aus der Gruppe der Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) erkennen. Im speziellen erkennt man am deutlichsten die Ähnlichkeiten mit den frühen Stadien einer primären Myelofibrose. Dennoch wäre es wahrscheinlich nicht zutreffend die Zeb2-chKO-Maus als Modell für eine Myelofibrose zu bezeichnen. Insbesondere die hier im Vordergrund stehenden Reifungsstörungen in multiplen Zelllinien passen nicht zum Bild

der primären Myelofibrose. Auch die nicht weiter fortschreitende Fibrose im Knochenmark entspricht nicht dem üblichen Verlauf der humanen Erkrankung. Am meisten würde der in unserem Mausmodell entstandene Phänotyp der sehr ungenau klassifizierten Erkrankungsgruppe MPN/MDS overlap Syndrom, bzw. nach der aktuellen WHO Klassifikation MDS/MPN unclassifiable (MDS/MPNu), entsprechen. Eine fehlende Transformation in akute Leukämie könnte auf die Notwendigkeit einer sekundären Mutation für die Entstehung einer Neoplasie hinweisen.

Der Grund für die frühe Sterblichkeit der Zeb2-chKO-Tiere ist am ehesten multifaktoriell und nicht nur auf eine Ursache zurückzuführen. Mögliche Gründe die zu erhöhter Letalität beitragen sind eine im Alter fortschreitende Anämie und die damit einhergehende Beeinträchtigung des Immunsystems. Bei einigen untersuchten chKO-Tieren konnte eine chronische Entzündung, z.B. am Auge oder an der Haut sowie Lungenentzündungen (Nekropsiebefund) beobachtet werden. Auch innere Blutungen spontan oder z.B. durch eine Verletzung können zum Tod der Tiere führen.

Solch ein komplexer Phänotyp kann nur schwerlich dadurch erklärt werden, dass Zeb2 eine kleine Anzahl an spezifischen Genen reguliert, die wichtig für die Entwicklung der einen oder anderen hämatopoetischen Linie sind.

Allerdings wurde bereits gezeigt, dass Zeb2 mit dem Nucleosome Remodeling Komplex (NuRD) interagiert. Es ist bekannt, dass NuRD eine Rolle in der epigenetischen Regulation spielt. Während der Differenzierung werden in der Zelle mehr und mehr chromosomale Regionen verdichtet

und die in ihnen befindlichen Gene abgeschaltet. Deshalb kann ein Defekt im epigenetischen Silencing (Stilllegung von Chromosomenabschnitten) zu Differenzierungsstörungen führen und vielleicht die mannigfaltigen Defekte oder auch nur einen Teil des beobachteten Phänotyps in der Hämatopoese des Zeb2-chKO erklären.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese, haben wir morphologische Veränderungen, z.B. in Megakaryozyten-Kernen gefunden. Die Zeb2-chKO Zellen weisen weniger kondensiertes Kernchromatin auf. Dieser Mangel an epigenetischem Silencing könnte für die Differenzierungsdefekte auch in B-lymphozytären und erythrozytären Zelllinien verantwortlich sein.

Im Vergleich zum embryonalen Phänotyp bewirkt der Verlust von Zeb2 hauptsächlich eine Beeinträchtigung der Differenzierung in der adulten Hämatopoese, Defekte im Homing im Rahmen der Transplantationen konnten bei den adulten Stammzellen nicht beobachtet werden. Auch eine differentielle Expression von den Adhäsionsmolekülen Cxcr4 oder Integrin beta 1, wie sie im embryonalen hämatopoetischen Zeb2-KO Modell beobachtet und mit dem Migrationsdefekt in Verbindung gebracht wird, liegt im adulten Zeb2chKO-Modell nicht vor.

Der Signalweg, der am wahrscheinlichsten im Loss-of-function-Phänotyp involviert ist, ist der Wnt-Signalweg. Dafür sprechen, die Gene TCF7, Sfrp4 und Fzd7, alle am Wnt-Signaling beteiligt, die beim Zeb2-KO differentiell exprimiert sind (Microarrays und qRT-PCR) und darauf hindeuten, dass der Wnt-Signalweg möglicherweise in der Zeb2-defizienten Hämatopoese ver-

stärkt aktiv ist. Des Weiteren haben zwei verschiedene Inhibitoren des Wnt-Signalwegs, XAV939 und Salinomycin, einen signifikanten Effekt auf die Anzahl an CFC-Kolonien gezeigt. Unter diesen Inhibitoren bilden die Zeb2-chKO-Knochenmarkzellen deutlich weniger Kolonien im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen. Dies spricht für eine stärkere Abhängigkeit der Zeb2-defizienten hämatopoetischen Vorläuferzellen von der Funktion des Wnt-Signalwegs in der Ausbildung myeloischer Kolonien. Ob die Inhibition des Wnt-Signalweges in Zeb2-defizienten Hämatopoese in-vivo auch eine Veränderung des Differenzierungsverhaltens bewirkt wird in den Folgestudien mittels simultaner Deletion von Zeb2 und β -Catenin untersucht werden.

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungsergebnisse, dass der Verlust von Zeb2 eklatante Auswirkungen auf die adulte murine Hämatopoese hat. Zeb2 ist offensichtlich für die normale Differenzierung hämatopoetischer Zellen unentbehrlich. Der Verlust von Zeb2 wirkt sich auf alle Stufen der hämatopoetischen Entwicklung aus, angefangen von den Stammzellen im Knochenmark, über Progenitoren bis hin zu den reifen Zellen des Blutes. Der Phänotyp wird intrinsisch über die Zeb2-defiziente hämatopoetische Stammzelle und nicht sekundär durch das umgebende Mikromilieu des Knochenmarks vermittelt. Auf der molekularen Ebene scheinen multiple Zielmoleküle von der Expression von Zeb2 abhängig zu sein. Eine stärkere Aktivierung des Wnt-Signalweges scheint zumindest für einige Aspekte des Phänotyps verantwortlich zu sein. Auch eine Dysregulation des epigenetischen Silencing während der Differenzierung ist naheliegend, auch wenn eine direkte Inter-

aktion von Zeb2 mit Teilen der epigenetischen Maschinerie in unserem Fall noch nicht nachgewiesen werden konnte. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die genaue molekulare Wirkweise von Zeb2 aufzuklären.

Literaturverzeichnis

Adams,G.B., Martin,R.P., Alley,I.R., Chabner,K.T., Cohen,K.S., Calvi,L.M., Kronenberg,H.M., and Scadden,D.T. (2007). Therapeutic targeting of a stem cell niche. *Nat. Biotechnol.* *25*, 238-243.

Adolfsson,J., Mansson,R., Buza-Vidas,N., Hultquist,A., Liuba,K., Jensen,C.T., Bryder,D., Yang,L., Borge,O.J., Thoren,L.A., Anderson,K., Sitnicka,E., Sasaki,Y., Sigvardsson,M., and Jacobsen,S.E. (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* *121*, 295-306.

Arai, F., Hirao,A., Ohmura,M., Sato,H., Matsuoka,S., Takubo,K., Ito,K., Koh,G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* *118*, 149-161.

Blank,U., Karlsson,G., and Karlsson,S. (2008). Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* *111*, 492-503.

Brabletz, S. & Brabletz, T. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* **11**, 670-7 (2010).

Cacheux,V., Dastot-Le,M.F., Kaariainen,H., Bondurand,N., Rintala,R., Boissier,B., Wilson,M., Mowat,D., and Goossens,M. (2001). Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 1503-1510.

Calvi,L.M., Adams,G.B., Weibrecht,K.W., Weber,J.M., Olson,D.P., Knight,M.C., Martin,R.P., Schipani,E., Divieti,P., Bringham,F.R., Milner,L.A., Kronenberg,H.M., and Scadden,D.T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* *425*, 841-846.

Caudell,D., Harper,D.P., Novak,R.L., Pierce,R.M., Slape,C., Wolff,L., and Aplan,P.D. (2010). Retroviral insertional mutagenesis identifies Zeb2 activation as a novel leukemogenic collaborating event in CALM-AF10 transgenic mice. *Blood* *115*, 1194-1203.

Cheng,T., Rodrigues,N., Shen,H., Yang,Y., Dombkowski,D., Sykes,M., and Scadden,D.T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* *287*, 1804-1808.

Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT. (2000). Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nat Med.* 2000 Nov;*6*(11):1235-40.

Comijn,J., Bex,G., Vermassen,P., Verschueren,K., van,G.L., Bruyneel,E., Mareel,M., Huylebroeck,D., and van,R.F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* *7*, 1267-1278.

Dastot-Le,M.F., Wilson,M., Mowat,D., Collot,N., Niel,F., and Goossens,M. (2007). ZFHX1B mutations in patients with Mowat-Wilson syndrome. *Hum. Mutat.* 28, 313-321.

de Boer,J., Williams,A., Skavdis,G., Harker,N., Coles,M., Tolaini,M., Norton,T., Williams,K., Roderick,K., Potocnik,A.J., and Kioussis,D. (2003). Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur. J. Immunol.* 33, 314-325.

de Pooter,R.F., Schmitt,T.M., de la Pompa,J.L., Fujiwara,Y., Orkin,S.H., and Zuniga-Pflucker,J.C. (2006). Notch signaling requires GATA-2 to inhibit myelopoiesis from embryonic stem cells and primary hemopoietic progenitors. *J. Immunol.* 176, 5267-5275.

Dituri, F. *et al.* Differential Inhibition of the TGF- β Signaling Pathway in HCC Cells Using the Small Molecule Inhibitor LY2157299 and the D10 Monoclonal Antibody against TGF- β Receptor Type II. *PLoS One* 8, e67109 (2013).

Elloul,S., Elstrand,M.B., Nesland,J.M., Trope,C.G., Kvalheim,G., Goldberg,I., Reich,R., and Davidson,B. (2005). Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 103, 1631-1643.

Ghoumid, J. *et al.* ZEB2 zinc-finger missense mutations lead to hypomorphic alleles and a mild Mowat-Wilson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2652-61 (2013).

Goossens, S. *et al.* The EMT regulator Zeb2/Sip1 is essential for murine embryonic hematopoietic stem/progenitor cell differentiation and mobilization. *Blood* 117, 5620-5630 (2011).

Guenther MG, Lawton LN, Rozovskaia T, Frampton GM, Levine SS, Volkert TL *et al.* Aberrant chromatin at genes encoding stem cell regulators in human mixed-lineage leukemia. *Genes Dev* 2008; 22: 3403-3408.

Hakimi, M.-A. *et al.* A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7420-5 (2002).

Higashi,Y., Maruhashi,M., Nelles,L., Van de Putte,T., Verschueren,K., Miyoshi,T., Yoshimoto,A., Kondoh,H., and Huylebroeck,D. (2002). Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse. *Genesis.* 32, 82-84.

Hock,H., Hamblen,M.J., Rooke,H.M., Schindler,J.W., Saleque,S., Fujiwara,Y., and Orkin,S.H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 1002-1007.

Ikuta, K., Uchida, N. & Friedman (1992). Lymphocyte Development from Stem Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 759-783.

Janzen,V., Forkert,R., Fleming,H.E., Saito,Y., Waring,M.T., Dombkowski,D.M., Cheng,T., DePinho,R.A., Sharpless,N.E., and Scadden,D.T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 443, 421-426.

Katoh, M. & Katoh, M. Integrative genomic analyses of ZEB2 : Transcriptional regulation of ZEB2 based on SMADs , ETS1 , HIF1 , POU / OCT , and NF- κ B. 1737–1742 (2009). doi:10.3892/ijo

Kiel,M.J., Yilmaz,O.H., Iwashita,T., Yilmaz,O.H., Terhorst,C., and Morrison,S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.

Kim,I., He,S., Yilmaz,O.H., Kiel,M.J., and Morrison,S.J. (2006). Enhanced purification of fetal liver hematopoietic stem cells using SLAM family receptors. *Blood* 108, 737-744.

Kuhn,R., Schwenk,F., Aguet,M., and Rajewsky,K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.

Larsson,J., Ohishi,M., Garrison,B., Aspling,M., Janzen,V., Adams,G.B., Curto,M., McClatchey,A.I., Schipani,E., and Scadden,D.T. (2008). Nf2/merlin regulates hematopoietic stem cell behavior by altering microenvironmental architecture. *Cell Stem Cell* 3, 221-227.

Lin, T., Ponn, A., Hu, X., Law, B. K., Lu, J. (2011). Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated repression during mesenchymal to epithelial transition. *Oncogene* 29 (35), 4896–4904

Ling,K.W., Ottersbach,K., van Hamburg,J.P., Oziemlak,A., Tsai,F.Y., Orkin,S.H., Ploemacher,R., Hendriks,R.W., and Dzierzak,E. (2004). GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 200, 871-882.

Lu, D. Choi M.Y., Yu J., Castro J.E., Kipps T.J., Carson D.A. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13253–7 (2011).

Mani,S.A., Guo,W., Liao,M.J., Eaton,E.N., Ayyanan,A., Zhou,A.Y., Brooks,M., Reinhard,F., Zhang,C.C., Shipitsin,M., Campbell,L.L., Polyak,K., Brisken,C., Yang,J., and Weinberg,R.A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.

Mao, X., Fujiwara, Y., Chapdelaine, A., Yang, H., Orkin, S. H.; Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood* 97, 324–326 (2001).

McGaughran,J., Sinnott,S., Dastot-Le,M.F., Wilson,M., Mowat,D., Sutton,B., and Goossens,M. (2005). Recurrence of Mowat-Wilson syndrome in siblings with the same proven mutation. *Am. J. Med. Genet. A* 137A, 302-304.

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

Medvinsky,A.L. and Dzierzak,E.A. (1998). Development of the definitive hematopoietic hierarchy in the mouse. *Dev. Comp Immunol.* 22, 289-301.

Molofsky,A.V., Pardal,R., Iwashita,T., Park,I.K., Clarke,M.F., and Morrison,S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425, 962-967.

Morse, H.C., Anver M.R., Fredrickson T.N., Haines D.C., Harris A.W., Harris N.L., Jaffe E.S., Kogan S.C., MacLennan I.C., Pattengale P.K., Ward J.M. Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood* 100, 246–258 (2002).

Mowat,D.R., Croaker,G.D., Cass,D.T., Kerr,B.A., Chaitow,J., Ades,L.C., Chia,N.L., and Wilson,M.J. (1998). Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *J. Med. Genet.* 35, 617-623.

Muller,A.M., Medvinsky,A., Strouboulis,J., Grosveld,F., and Dzierzak,E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity.* 1, 291-301.

Naujokat, C. & Steinhart, R. Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 950658 (2012).

Nelles,L., Van de Putte,T., van,G.L., Huylebroeck,D., and Verschueren,K. (2003). Organization of the mouse *Zfhx1b* gene encoding the two-handed zinc finger repressor Smad-interacting protein-1. *Genomics* 82, 460-469.

Nitta,K.R., Takahashi,S., Haramoto,Y., Fukuda,M., Tanegashima,K., Onuma,Y., and Asashima,M. (2007). The N-terminus zinc finger domain of *Xenopus* SIP1 is important for neural induction, but not for suppression of *Xbra* expression. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 321-325.

Orazi, A. & Germing, U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia* 22, 1308–19 (2008).

Osawa,M., Hanada,K., Hamada,H., and Nakauchi,H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245

Ottersbach, K. & Dzierzak, E. The placenta as a haematopoietic organ. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1099–106 (2010).

Passegué, E., Jamieson, C. H. M., Ailles, L. E. & Weissman, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 Suppl 1, 11842–9 (2003).

Reya,T., Morrison,S.J., Clarke,M.F., and Weissman,I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.

Rodrigues,N.P., Janzen,V., Forkert,R., Dombkowski,D.M., Boyd,A.S., Orkin,S.H., Enver,T., Vyas,P., and Scadden,D.T. (2005). Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* 106, 477-484.

- Rieger, M. A. & Schroeder, T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, (2012).
- Rosivatz, E., Becker, I., Specht, K., Fricke, E., Luber, B., Busch, R., Hofler, H., and Becker, K.F. (2002). Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am. J. Pathol.* 161, 1881-1891.
- Rossi, L., Lin K.K., Boles N.C., Yang L., King K.Y., Jeong M., Mayle A., Goodell M.A. Less is more: unveiling the functional core of hematopoietic stem cells through knockout mice. *Cell Stem Cell* 11, 302-17 (2012).
- Scadden, D.T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441, 1075-1079.
- Shi, Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J.R., Cole P.A., Casero R.A., Shi Y. (2004). Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1 77 Avenue Louis Pasteur. 119, 941-953.
- Steinman, R. A. (2002) Cell cycle regulators and hematopoiesis. (2002). *Oncogene* 21, 3403-3413.
- Stier, S., Totzke, G., Grunewald, E., Neuhaus, T., Fronhoffs, S., Sachinidis, A., Vetter, H., Schulze-Osthoff, K., and Ko, Y. (2000). Identification of syntenin and other TNF-inducible genes in human umbilical arterial endothelial cells by suppression subtractive hybridization. *FEBS Lett.* 467, 299-304.
- Stier, S. Cheng T. Forkert R., Lutz C., Dombkowski D.M., Zhang J.L., Scadden D.T. Ex vivo targeting of p21Cip1/Waf1 permits relative expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 102, 1260-6 (2003).
- Stumpel, D. J., Schotte D., Lange-Turenhout E.A., Schneider P., Seslija L., de Menezes R.X., Marquez V.E., Pieters R., den Boer M.L., Stam R.W. Hypermethylation of specific microRNA genes in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia: major matters at a micro scale. *Leukemia* 25, 429-39 (2011).
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977-88 (2006).
- Sugiyama D., Inoue-Yokoo T., Fraser S.T., Kulkeaw K., Mizuochi C., Horio Y. Embryonic regulation of the mouse hematopoietic niche. *ScientificWorldJournal.* 11, 1770-80 (2011).
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Tian, X., Hou, W.J., Fang, Y., Fan, J., Tong, H., Bai, S.L., Chen, Q., Xu, H., Li, Y. Apoptosis in neuroblastoma cell lines by inhibiting Wnt / β -catenin signaling pathway. 1-9 (2013).
- Tothova, Z. and Gilliland, D.G. (2007). FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell* 1, 140-152.

Tothova,Z., Kollipara,R., Huntly,B.J., Lee,B.H., Castrillon,D.H., Cullen,D.E., McDowell,E.P., Lazo-Kallanian,S., Williams,I.R., Sears,C., Armstrong,S.A., Passegue,E., DePinho,R.A., and Gilliland,D.G. (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 128, 325-339.

Tsai,F.Y. and Orkin,S.H. (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 89, 3636-3643.

Tylzanowski,P., Verschueren,K., Huylebroeck,D., and Luyten,F.P. (2001). Smad-interacting protein 1 is a repressor of liver/bone/kidney alkaline phosphatase transcription in bone morphogenetic protein-induced osteogenic differentiation of C2C12 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 40001-40007.

Van de Putte,T., Francis,A., Nelles,L., van Grunsven,L.A., and Huylebroeck,D. (2007). Neural crest-specific removal of Zfhx1b in mouse leads to a wide range of neurocristopathies reminiscent of Mowat-Wilson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1423-1436.

Van de Putte,T., Maruhashi,M., Francis,A., Nelles,L., Kondoh,H., Huylebroeck,D., and Higashi,Y. (2003). Mice lacking ZFH1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 465-470.

van Grunsven,L.A., Taelman,V., Michiels,C., Opdecamp,K., Huylebroeck,D., and Bellefroid,E.J. (2006). deltaEF1 and SIP1 are differentially expressed and have overlapping activities during *Xenopus* embryogenesis. *Dev. Dyn.* 235, 1491-1500.

van Grunsven,L.A., Taelman,V., Michiels,C., Verstappen,G., Souopgui,J., Nichane,M., Moens,E., Opdecamp,K., Vanhomwegen,J., Kricha,S., Huylebroeck,D., and Bellefroid,E.J. (2007). XSip1 neuralizing activity involves the co-repressor CtBP and occurs through BMP dependent and independent mechanisms. *Dev. Biol.* 306, 34-49.

Vardiman, J. W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., Harris N.L., Le Beau M.M., Hellström-Lindberg E., Tefferi A., Bloomfield C.D. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-51 (2009).

Verschueren,K., Remacle,J.E., Collart,C., Kraff,H., Baker,B.S., Tylzanowski,P., Nelles,L., Wuytens,G., Su,M.T., Bodmer,R., Smith,J.C., and Huylebroeck,D. (1999). SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J. Biol. Chem.* 274, 20489-20498.

Verstappen,G., van Grunsven,L.A., Michiels,C., Van de Putte,T., Souopgui,J., Van,D.J., Bellefroid,E., Vandekerckhove,J., and Huylebroeck,D. (2008). Atypical Mowat-Wilson patient confirms the importance of the novel association between ZFH1B/SIP1 and NuRD corepressor complex. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1175-1183.

Warren, L. A. & Rossi, D. J. Stem cells and aging in the hematopoietic system. *Mech. Ageing Dev.* 130, 46-53 (2009).

Yamada, N., Noguchi S., Mori T., Naoe T., Maruo K., Akao Y. Tumor-suppressive microRNA-145 targets catenin δ -1 to regulate Wnt/ β -catenin signaling in human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 335, 332–42 (2013).

Yoshimoto, A., Saigou, Y., Higashi, Y., and Kondoh, H. (2005). Regulation of ocular lens development by Smad-interacting protein 1 involving Foxe3 activation. *Development* 132, 4437–4448.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., Harris, S., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., and Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836–841.

Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat cell Biol.* 2004 May;6(5):436–42.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., Harris, S., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., and Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836–841.

Zweier, C., Thiel, C.T., Dufke, A., Crow, Y.J., Meinecke, P., Suri, M., Ala-Mello, S., Beemer, F., Bernasconi, S., Bianchi, P., Bier, A., Devriendt, K., Dimitrov, B., Firth, H., Gallagher, R.C., Garavelli, L., Gillissen-Kaesbach, G., Hudgins, L., Kaariainen, H., Karstens, S., Krantz, I., Mannhardt, A., Medne, L., Mucke, J., Kibaek, M., Krogh, L.N., Peippo, M., Rittinger, O., Schulz, S., Schelley, S.L., Temple, I.K., Dennis, N.R., Van der Knaap, M.S., Wheeler, P., Yerushalmi, B., Zenker, M., Seidel, H., Lachmeijer, A., Prescott, T., Kraus, C., Lowry, R.B., and Rauch, A. (2005). Clinical and mutational spectrum of Mowat-Wilson syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* 48, 97–111.