

Einfluss einer CXCR4 gain-of-function-Mutation auf die (un)reife Hämatopoese

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14)

der Johann Wolfgang Goethe -Universität

in Frankfurt am Main

von Benjamin Tast

aus Meschede

Frankfurt 2019

(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter:

Prof. Dr. Rolf Marschalek

Prof. Dr. Halvard Bönig

Datum der Disputation:

"Eine Gang, ein Team, ein 'You'll never walk alone',
so wurd' es beigebracht, so wird es jetzt gemacht, mein Sohn!"

Marcus Wiesbusch - Der Tag wird kommen

Inhaltsverzeichnis	
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1. Das hämatopoetische System	3
1.2. Hämatopoetische Stammzellen	5
1.3. Hämatopoetische Stammzellnische	5
1.4. CXCR4-CXCL12-Signalachse	6
1.5. B-Zellentwicklung	7
1.6. Das WHIM-Syndrom	9
1.7. Fragestellung	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Material	14
2.1.1. Antikörper und andere Färbereagenzien	14
2.1.2. Chemikalien und andere Reagenzien	18
2.1.3. Geräte	19
2.1.4. Größenstandards	22
2.1.5. Kits	22
2.1.6. Medikamente	23
2.1.7. Puffer und Medien	25
2.1.8. Software	30
2.2. Methoden	31
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1.1. Genotypisierung	31
2.2.1.2. RNA-Isolierung	32
2.2.1.3. Umschreiben in cDNA	33
2.2.1.4. quantitative Real Time-PCR	34
2.2.2. Biochemische Methoden	35
2.2.2.1. Proteinquantifizierung	35

2.2.2.2. CXCL12-Konzentrationsbestimmung	35
2.2.3. Zellkulturtechnische Methoden	36
2.2.3.1. Methylzellulose-Assay	36
2.2.3.2. Transwell Migration-Assay	36
2.2.3.3. Immunomagnetische Zellanreicherung	37
2.2.3.4. F-Aktin Polymerisierung	37
2.2.3.5. MAPK-Aktivierung am Beispiel der Erk-Aktivierung	37
2.2.4. Durchflusszytometrische Methoden	39
2.2.4.1. Oberflächenanalyse	39
2.2.4.2. Zellzyklusanalyse	39
2.2.4.3. Zellsortierung	40
2.2.4.4. Apoptose-Assay	40
2.2.5. Tierexperimentelle Methoden	41
2.2.5.1. Tierhaltung	41
2.2.5.2. Organentnahme	41
2.2.5.3. Erythrozyten-Lyse	41
2.2.3.4. Herstellung von Knochenmark- und Milzzellsuspensionen	42
2.2.3.5. Gewinnung von Plasma	42
2.2.5.6. Gewinnung von Knochenmark- Milzflüssigkeit	42
2.2.5.7. Automatische Hämazytometrie	42
2.2.5.8. Immunisierung	43
2.2.5.9. Mobilisierung	43
2.2.5.10. Bestrahlung	43
2.2.5.11. Transplantation	43
2.2.5.12. Homing	45
2.2.5.13. Induktion einer akuten myeloischen Leukämie	45
2.2.5.1. Splenektomie	46
2.2.6. Datenanalysen und Software	46

3.5. Auswirkungen der WHIM-Mutation in einem Leukämie-Modell	91
3.5.1. Leukämie-Primärtransplantation	91
3.5.2. Leukämie-Sekundärtransplantation	92
3.5.3. Behandlung mit Cytarabin	94
4. Diskussion	95
4.1. Einfluss der hyperaktiven CXCR4-Mutanten auf homöostastische HSPC	96
4.2. CXCR4-abhängige Mobilisierung	100
4.3. Einfluss der hyperaktiven CXCR4-Mutanten auf die Repopulationkapazität	101
4.4. Einfluss der hyperaktiven CXCR4-Mutanten auf die B-Lymphopoese	107
4.5. Zusammenfassung	111
5. Literaturverzeichnis	112
6. Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	128
6.1. Abkürzungsverzeichnis	128
6.2. Abbildungsverzeichnis	130
6.3. Tabellenverzeichnis	132
7. Anhänge	133
8. Präsentationen	150
9. Lebenslauf	151
10. Danksagung	153
11. Ehrenwörtliche Erklärung	155

Zusammenfassung

Die CXCR4-CXCL12-Signalachse gilt als eines der bislang am besten studierten Signalsysteme in der Hämatopoese. Allerdings stammt unser Wissen über diesen kritischen Signalweg maßgeblich aus subtraktiven Studien, wie z.B. *knock-out* Modellen oder pharmakologischer Inaktivierung. Zwar können aus diesen Modellen wichtige Erkenntnisse über die physiologische Rolle dieses Signalwegs abgeleitet werden, aber dennoch bleiben einige Phänomene ungeklärt. So konnte gezeigt werden, dass es sowohl bei CXCR4-Defizienz als auch bei Patienten mit dem WHIM-Syndrom (ausgelöst durch eine überaktive CXCR4-Mutante) zu einer ausgeprägten B-Zellaplasie kommt. Dies scheint intuitiv nicht vereinbar. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modell mit einer überaktiven CXCR4-Mutante (CXCR4^{1013/1013}) hinsichtlich der (un)reifen Hämatopoese systematisch untersucht.

Zunächst wurden hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSPC) hinsichtlich der aberranten CXCR4-Signalweiterleitung *ex vivo* analysiert. Die CXCR4-Überaktivierung konnte sowohl in frühen Effekten nach Aktivierung des Rezeptors (F-Aktinpolymerisierung, Aktivierung des MAPK-Signalweges), als auch in späten, zellfunktionellen Effekten (Migrationsassay) nachgewiesen werden. Die veränderte CXCR4 Signalintegration hatte auch bereits in der Homöostase organismische Konsequenzen im Mausmodell. So konnte eine massiv vergrößerte HSPC-Population in der Milz von CXCR4^{1013/1013}-Tieren detektiert werden, im Sinne einer extramedullären Hämatopoese. Knochenmarks-HSPC aus CXCR4^{1013/1013}-Tiere zeigten ein massiv eingeschränktes (serielles) Repopulationspotenzial. Kombiniert mit der oben genannten ausgeprägten extramedullären Hämatopoese in diesen Tiere interpretieren wir diese Beobachtung als starken Hinweis auf eine dysfunktionelle Interaktion der Stammzellen mit der hämatopoetischen Stammzellnische im Knochenmark. In diesem Zusammenhang besonders interessant ist die Tatsache, dass auch ein Kompetitor Knochenmark das Überleben einer Sekundärtransplantation nicht sichert. Dabei ist zu diskutieren, ob dieser Effekt durch eine effizientere Besetzung von Stammzellnischen durch CXCR4^{1013/1013}-Zellen, eine Akkumulation von CXCL12 in der Knochenmarkflüssigkeit (siehe unten) oder eventuell sogar ein vesikelabhängiger Transport von mutiertem CXCR4 in Kompetitorzellen ausgelöst wird. Ein weiteres Merkmal dieser Dysfunktion könnte ebenfalls die gezeigte Akkumulation von CXCL12 in der Knochenmarkflüssigkeit von CXCR4^{1013/1013}-Tiere darstellen. Diese Akkumulation könnte die Suppression co-transplantierte wildtypischer Hämatopoese sowie die verminderte Effizienz der G-CSF-induzierten Stammzellmobilisierung funktionell erklären. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark durch einen CXCR4-Inhibitor in CXCR4^{1013/1013}-Tieren ebenfalls erheblich hinter der in Wildtypmäusen zurückbleibt.

Analog zu Patienten mit WHIM-Syndrom zeichnen sich CXCR4^{1013/1013}-Mäuse weiterhin durch eine ausgeprägte Leukopenie, insbesondere durch einen schweren B-Zell-Mangel, aus. Aus diesem Grund wurde die B-Lymphopoese und humorale Immunfunktion genauer analysiert. Eine grundsätzliche humorale Immunkompetenz von CXCR4^{1013/1013}-Tieren konnte nachgewiesen werden, jedoch ist die B-Memory-Funktion erheblich eingeschränkt. Durchflusszytometrisch und funktionell konnte eine reduzierte preB/pro-B Population im Knochenmark bei einer gleichzeitig vergrößerten preB/pro-B Population in der Milz (vgl. extramedulläre Hämatopoese) nachgewiesen werden. Ebenfalls konnten wir in dieser Zellpopulation eine stark erhöhte CXCR4-Oberflächenexpression im Vergleich zu wildtypischen Zellen nachweisen. Da diese unreifen B-Zellen keine verstärkte Apoptoserate aufweisen, gehen wir derzeit davon aus, dass der Differenzierungsstopp nicht durch selektiven Zelltod, sondern durch aberrante Retention der preB/proB-Zellen in einer primitiven B-Vorläufer-Nische im Knochenmark zustande kommt, beziehungsweise durch eine gestörte Migration in differenzierende Nischen im Knochenmark. Alternativ könnte die Überdosis CXCR4-Signal differenzierenden Signalen entgegenstehen. Beide Hypothesen können das eingangs erwähnte Paradoxon bezüglich einer B-Zellaplasie in CXCR4-defizienten und CXCR4-überaktiven Zellen hinreichend erklären.

1. Einleitung

1.1. Das hämatopoetische System

Die Blutzellen unseres Körpers besitzen eine außergewöhnlich kurze Lebensspanne im Bereich von Stunden bis Tagen, gleichzeitig ist ihre Gesamtanzahl sehr hoch: ca. ein Viertel aller Körperzellen sind Blutzellen. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit eines extrem hohen Zellumsatzes, welcher nur durch die Existenz von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) mit Selbsterneuerungspotential an der Apex der hämatopoetischen Hierarchie aufrechterhalten werden kann. Die aufgrund der extrem hohen Zellumsätze maximal hohen Sauerstoffpartialdrucke im Knochenmark bedingen (Harrison et al, 2002), dass Stammzellen zum Schutz vor noxischen (mutagenen) Sauerstoffspezies mit sehr starker antioxidativer Maschinerie ausgestattet sind und überwiegend quieszent vorliegen, also selten in den Zellzyklus eintreten (Ito et al, 2006; Wilson et al, 2008). Aus den HSC gehen nicht mehr selbsterneuerungsfähige Vorläuferstufen (MPP, *multipotent progenitor*, vgl. Kap. 1.2.) hervor, welche das Gros der Blutbildung übernehmen. Verluste in diesen Vorläuferpopulationen werden bei Bedarf aus den Stammzellen rekonstituiert. Durch diese Eigenschaften - die Selbsterneuerung der HSC, sowie die Möglichkeit in jede reife Blutzelle differenzieren zu können - und die Fähigkeit, nach Infusion ins Blut zurück in das Knochenmark zu finden, können HSCs kurativ in Form von mobilisierten Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantationen als Ersatz defekter Hämatopoese eingesetzt werden (Lane et al, 1995; Matsunaga et al, 1993; Thomas et al, 1957).

Die oben beschriebenen Vorläufer können sich entweder in myeloide Zellen (*common myeloid progenitor*, CMP) (Akashi et al, 2000) oder in Zellen der lymphatischen Linie (*common lymphoid progenitor*, CLP) (Kondo et al, 1997) differenzieren. Durch verschiedene weitere Unterstufen mit zunehmend höheren Differenzierungsgrad können anschließend reife Blutzellen gebildet werden. Diese klassische hierarchische Struktur ist vereinfacht in Abb. 1.1. dargestellt. Die zunehmenden Möglichkeiten der Einzelzellanalyse beginnen diese Struktur weiter zu verfeinern. Während in der klassischen Hierarchie maßgeblich phänotypische Merkmale verwendet wurden, können nun funktionelle Merkmale identifiziert werden (Buenroostro et al, 2018; Han et al, 2018). Welche Signale genau die Linienentscheidungen beeinflussen, ist nicht im Detail verstanden. Als gesichert gilt allerdings, dass ein Zusammenspiel von Zytokinen (Rieger et al, 2009), Transkriptionsfaktoren (Dakic et al, 2005; Iwasaki et al, 2003) und epigenetischen Modifikationen (Herkt et al, 2018) benötigt wird.

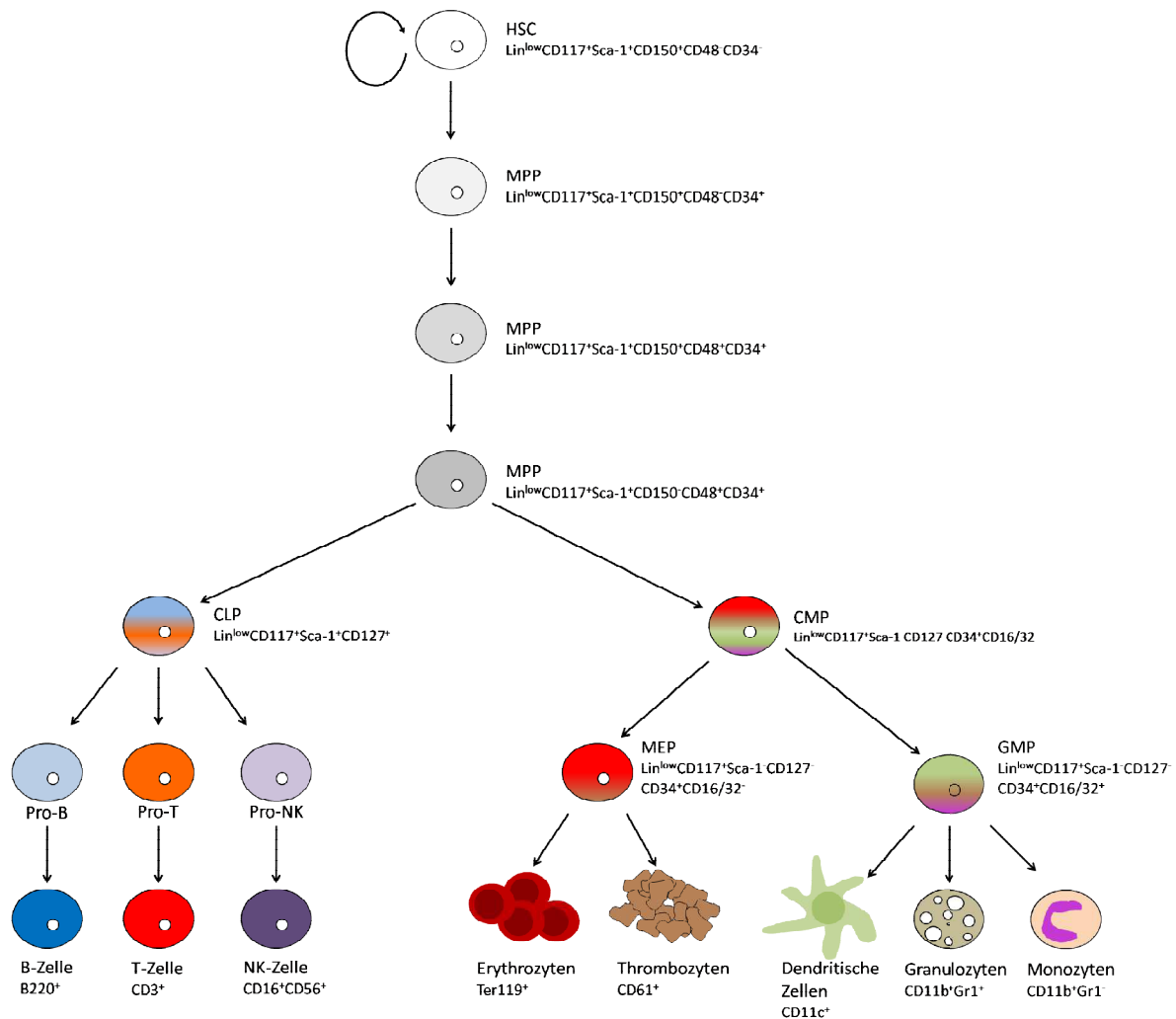


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der Hämatopoese. Hämatopoetische Stammzellen (HSC) stehen an der Spitze eines hierarchischen Prozesses. Diese Zellen sind als Einzige in der Lage, sich selbst zu erneuern, aber auch in alle Blutzelllinien zu differenzieren. Über verschiedene multipotente Vorläuferstadien (MPP) entwickeln sich linienspezifische Vorläuferzellen, welche nur noch in die lymphatische (CLP) oder myeloische (CMP) Linie differenzieren können. Angegeben sind die Oberflächenmarker, die zur Identifikation der jeweiligen Entwicklungsstufe genutzt werden. Lin = Lineage, MEP = *megakaryocyte/erythrocyte progenitor*, GMP = *granulocyte/macrophage progenitor*.

Der Ort der Hämatopoese ist unter homöostatischen Bedingungen in post-natalen Säugern das Knochenmark. Allerdings kann es unter bestimmten (Stress-)Bedingungen vorkommen, dass die Hämatopoese partiell nicht im Knochenmark vollzogen wird, sondern von anderen Organen (z.B. der Leber oder Milz) übernommen wird. In diesen Fall wird von einer extramedullären Hämatopoese (EMH) gesprochen. EMH kann z.B. durch Osteopetrosis, leukämische Erkrankungen, Schwangerschaft, Blutverlust oder Infektionen ausgelöst werden (Burberry et al, 2014; Gerritsen et al, 1994; Inra et al, 2015; Nakada et al, 2014; O'Malley, 2007; Singhal et al, 2011; Toms et al, 2010).

1.2. Hämatopoetische Stammzellen

Die eben genannte Repopulationsfähigkeit ist der bislang einzige experimentell-funktionelle Nachweis für das Vorliegen von HSCs in einer gemischten Zellpopulation. Für das murine System wurden verschiedene Transplantationsexperimente durchgeführt, um sich dem Immunphänotyp dieser Zellen anzunähern. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenmarker CD117 und Sca1 bei gleichzeitiger Abwesenheit reifer Marker (Lineage-Marker) eine unreife Population darstellen, welche Langzeit-Hämatopoese nach Transplantation in myelo-ablatierte Empfänger wiederherstellen können (Okada et al, 1992). Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine immer noch heterogene Zellpopulation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) handelte, da nur jede fünfte Zelle eine Langzeit-Hämatopoese etablierte (Morrison & Weissman, 1994; Spangrude et al, 1988). Diese Population konnte durch den Einschluss des *signaling lymphocyte activation markers* (CD150, SLAM) und einer differenziellen Expression von CD48 in HSCs mit Langzeitrepopulationspotenzial (CD150⁺CD48⁻) und Zellen mit transientem Repopulationspotential (CD150⁺CD48⁺) aufgetrennt werden. In dieser Population etablierte bereits jede zweite Zelle bei letal bestrahlten Empfängern multilineäre Langzeit-Hämatopoese (Kiel et al, 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine differenzielle Oberflächenexpression von CD34 im murinen System Unterscheidungen zwischen quieszenten (CD34⁻) und aktivierten (CD34⁺) HCSs zulässt (Osawa et al, 1996; Yang et al, 2005).

1.3. Hämatopoetische Stammzellnische

Die genaue Lokalisation von HSCs im Knochenmark – perivaskulär versus endosteal – wird kontrovers diskutiert (Ellis et al, 2011; Lo Celso et al, 2009; Sugiyama et al, 2006; Zhao et al, 2019). Die Diskussion wird befruchtet vom bereits 1978 von Schofield postulierten Konzept einer hämatopoetischen Stammzellnische (Schofield, 1978). Gemäß diesem Konzept nistet sich die HSC in ihre (ökologische) Nische ein und wird von einer hochspezialisierten Umgebung versorgt (*nursing cells*) und bezüglich ihres Zellschicksals instruiert. Diese Nischenzellen sind teils hämatopoetischen Ursprungs (Monozyten/Makrophagen (Chow et al, 2011; Hur et al, 2016; Winkler et al, 2010), Megakaryozyten (Bruns et al, 2014; Zhao et al, 2014)) teils nicht hämatopoetischen Ursprungs (Osteoblasten (Calvi et al, 2003; Christopher et al, 2009; Visnjic et al, 2004; Zhang et al, 2003; Zhu et al, 2007), hoch CXCL12-exprimierende retikuläre Zellen (*CXCL12-abundant reticular cells*, CAR-Zellen) (Greenbaum et al, 2013; Omatsu et al, 2010), Leptin-Rezeptor⁺-Zellen (Zhou et al, 2014), Nestin⁺-Zellen (Mendez-Ferrer et al, 2010), Endothelzellen (Ding et al, 2012)). Die Beweislage für eine relevante Nischenfunktion ist für die unterschiedlichen Zelltypen unterschiedlich gut. Neben einer Vielzahl anderer Faktoren (z.B. primitiven Zytokinen wie *stem cell factor* (SCF) (Barker, 1994; Czechowicz et al, 2007; Fleischman & Mintz, 1979) oder Thrombopoetin (TPO) (Kimura et al, 1998;

Qian et al, 2007; Sitnicka et al, 1996; Yoshihara et al, 2007)) ist die CXCR4-CXCL12-Signalachse von besonderer Bedeutung für die hämatopoetische Stammzellbiologie.

1.4. CXCR4-CXCL12-Signalachse

CXCR4 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) und das Chemokin CXCL12 der wichtigste Ligand dieses Rezeptors. Die Kritikalität dieses Signalweges kann aus der embryonalen Letalität der jeweiligen *knock-out* Modelle abgeleitet werden (Ma et al, 1998; Nagasawa et al, 1996; Tachibana et al, 1998), welche allerdings nicht an ihrem hämatopoetischen Phänotyp versterben. Jenseits der Embryonalphase scheint CXCR4/CXCL12 allerdings mit Ausnahme der Hämatopoiese/Immunfunktion verzichtbar zu sein. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass murines und humanes CXCL12 kreuzreaktiv sind. Diese hohe evolutionäre Konservierung (Unterschied nur in einer Aminosäure) ist ein weiteres Indiz für die Kritikalität (Shirozu et al, 1995).

Im Laufe der Zeit wurden eine Reihe von Funktionen der CXCR4-CXCL12-Signalachse identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg wichtig ist für die Selbsterneuerung und *stemness* der HSC (Sugiyama et al, 2006; Tzeng et al, 2011), Lokalisation der HSC (Foudi et al, 2006; Wright et al, 2002), Quieszenz der HSC (Karpova et al, 2017; Nie et al, 2008; Sugiyama et al, 2006) oder auch das Überleben der HSC (Guo et al, 2005; Issaad et al, 1993; Itoh et al, 1989; Zipori & Lee, 1988).

Analog zu anderen GPCRs wird auch CXCR4 nach Aktivierung durch seinen Liganden CXCL12 zunächst am intrazellulären C-Terminus durch Proteine der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) phosphoryliert (Balabanian et al, 2008; Busillo et al, 2010). Diese Phosphorylierung führt zur Rekrutierung von Arrestinen. Arrestine dienen zum einen als *scaffold protein* und rekrutieren weitere für die Signalweiterleitung wichtige Moleküle (Cheng et al, 2000; Sun et al, 2002) und zum anderen lösen sie die Bindung zwischen dem G-Protein und GPCR auf (Krupnick & Benovic, 1998). Zum Abschalten des Signals wird der ligandengebundene CXCR4-Rezeptor anschließend internalisiert, dieser Prozess wird Desensibilisierung genannt. Der Rezeptor kann anschließend entweder zurück zur Oberfläche transportiert oder lysosomal abgebaut werden (Kumar et al, 2011; Marchese et al, 2003), wobei letzteres offenbar zumindest in Zelllinien der häufigere Mechanismus ist (Tarasova et al, 1998). Schematisch ist die CXCR4-Signalweiterleitung in Abb. 1.2. dargestellt.

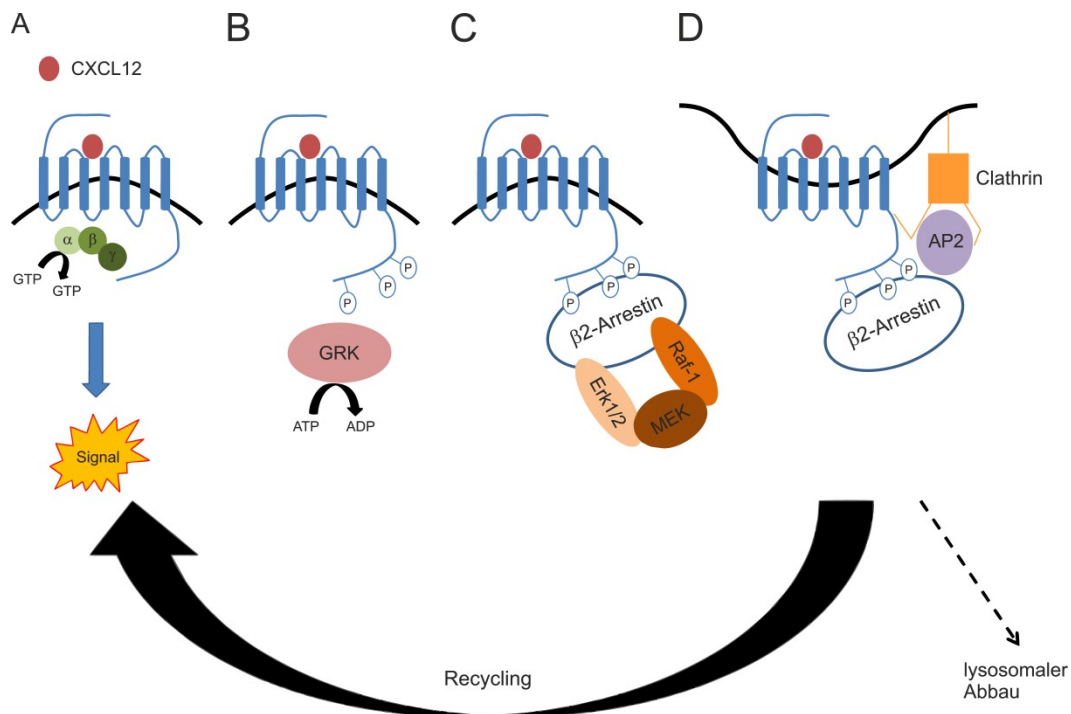


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der CXCR4 Signalweiterleitung. A) Durch die CXCL12-Ligandenbindung wird das Signal durch den Austausch von GDP durch GTP im heterotrimeren G-Protein ausgelöst. B) GRKs phosphorylieren ATP-abhängig den C-terminalen Teil des CXCR4. C) Durch die C-terminale Phosphorylierung kann β 2-Arrestin an den CXCR4 C-Terminus rekrutiert werden. β 2-Arrestin wirkt als sogenanntes *scaffold protein* und bringt nachgeschaltete Signalmoleküle (beispielsweise für den MAPK-Signalweg) in räumliche Nähe. D) zusätzlich vermittelt β 2-Arrestin durch die Rekrutierung des AP2-Adaptorkomplexes die Clathrin-vermittelte Endozytose von CXCR4. Durch diesen Vorgang wird CXCR4 von der Zelloberfläche entfernt und dadurch abgeschaltet (Desensibilisierung). Anschließend kann der internalisierte Rezeptor entweder lysosomal abgebaut oder zurück an die Zelloberfläche transportiert werden. GTP = Guanosintriphosphat, GDP = Guanosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, Erk = *extracellular-signal regulated kinases*, Raf = *rapidly accelerated fibrosarcoma*, MEK = *mitogen-activated protein kinase kinase*, AP2 = AP2 Adapterkomplex.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch die Darreichungsform des Chemokins Einfluss auf die zelluläre Antwort haben kann. CXCL12 kann löslich oder membrangebunden vorliegen. Membrangebundenes CXCL12 löst in humanen CD34⁺-Zellen Integrin-vermittelte Adhäsion aus, was für lösliches CXCL12 nicht nachweisbar war (Burk et al, 2015; Peled et al, 1999a). Diese Unterschiede bzw. das Zusammenspiel von löslichem und membrangebundenem CXCL12 kann *in vitro* nur schwerlich nachgestellt werden, was organismische Analysen unabdingbar macht.

1.5. B-Zellentwicklung

Allerdings ist die CXCR4-CXCL12-Achse nicht nur für die hämatopoetische Stammzellbiologie von Bedeutung, auch für reife Blutzelllinien, insbesondere B-Zellen, ist diese Signalachse kritisch. Tatsächlich wurde CXCL12 dadurch entdeckt, dass es das Wachstum einer murinen preB-Zelllinie unterstützte und wurde daher zunächst *pre-B cell growth stimulating factor* (PBSF) genannt (Nagasawa et al, 1994). Die Kritikalität der CXCR4-CXCL12-Signalachse für die B-Lymphopoese wird deutlich, wenn betrachtet wird, dass eine Defizienz für CXCR4 oder CXCL12 zu einer ausgeprägten B-

Zellaplasie führt (Ma et al, 1998; Nagasawa et al, 1996). Die B-Lymphopoese verläuft - wie auch die restliche Hämatopoese - zunächst im Knochenmark. Nachdem die frühe Linienentscheidung zur CLP unter Mitwirkung der Transkriptionsfaktoren PU.1 und Ikaros stattgefunden hat, differenzieren die CLP durch die Transkriptionsfaktoren E2A, EBF1 und PAX5 zu einer frühen B-Vorläuferzelle (preproB-Zelle) (Medina et al, 2004). Wichtig für die B-Zellentwicklung ist die Expression eines funktionellen B-Zellrezeptors (BCR). Der B-Zellrezeptor ist ein membrangebundenes Immunglobulin und besteht aus je zwei identischen leichten und schweren Ketten. Die sogenannten V- und J-Regionen (im Falle der schweren Kette zusätzlich die D-Region) kodieren für die variablen Domänen der Antikörper. Durch alternatives *Splicen* entstehen verschiedene, randomisierte Genprodukte, welche die Antigenspezifität vermitteln. Dieser Vorgang wird auch V-D-J-Rekombination genannt (Brack et al, 1978; Li et al, 2004; Tonegawa, 1983). Zusätzlich wird durch zufällige Deletionen und Insertionen die Variabilität ein weiteres Mal gesteigert. In Modellrechnungen wird von 10^{18} möglichen Kombinationen ausgegangen (Elhanati et al, 2015). Sollte sich ein so generierter B-Zellrezeptor als autoreaktiv erweisen, wird die ihn exprimierende Zelle durch Apoptose aus dem System entfernt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass - im Menschen - mindestens die Hälfte der generierten BCRs sich als autoreaktiv erwiesen (Wardemann et al, 2003). Im proB-Zellstadium kommt es zunächst zur Umlagerung der schweren Kette zur sogenannten μ -Kette. Bei erfolgreicher Umlagerung kann die Zelle in das preB-Zellstadium eintreten (Chen et al, 1993; Kitamura et al, 1991). Im preB-Zellstadium wird zunächst die μ -Kette mit einer transienten leichten Kette an der Zelloberfläche exprimiert (preB Zellrezeptor) (Minegishi et al, 1999). Nach erfolgreicher Umlagerung der leichten Ketten wird auf den unreifen B-Zellen der B-Zellrezeptor in Form eines IgM-Immunglobulins präsentiert. Die unreifen B-Zellen verlassen das Knochenmark. Dieser Prozess wird durch Sphingosin-1-phosphat und Cannabinoide reguliert (Pereira et al, 2009; Pereira et al, 2010). Die transitionalen B-Zellen homen zur weiteren Reifung in die Milz, allerdings erreichen nur ca. 10% der täglichen 2×10^7 produzierten B-Zellen die Milz, von denen wiederum nur 1-3% schlussendlich zum reifen B-Zell Pool beitragen (Allman et al, 1993; Melchers et al, 1995). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die B-Zellentwicklung einen streng regulierten, mehrstufigen Prozess darstellt (schematische Darstellung in Abb. 1.3.). Aufgrund verschiedener Kombinationen von Oberflächenmolekülen können die eben genannten Entwicklungsschritte durchflusszytometrisch verfolgt werden.

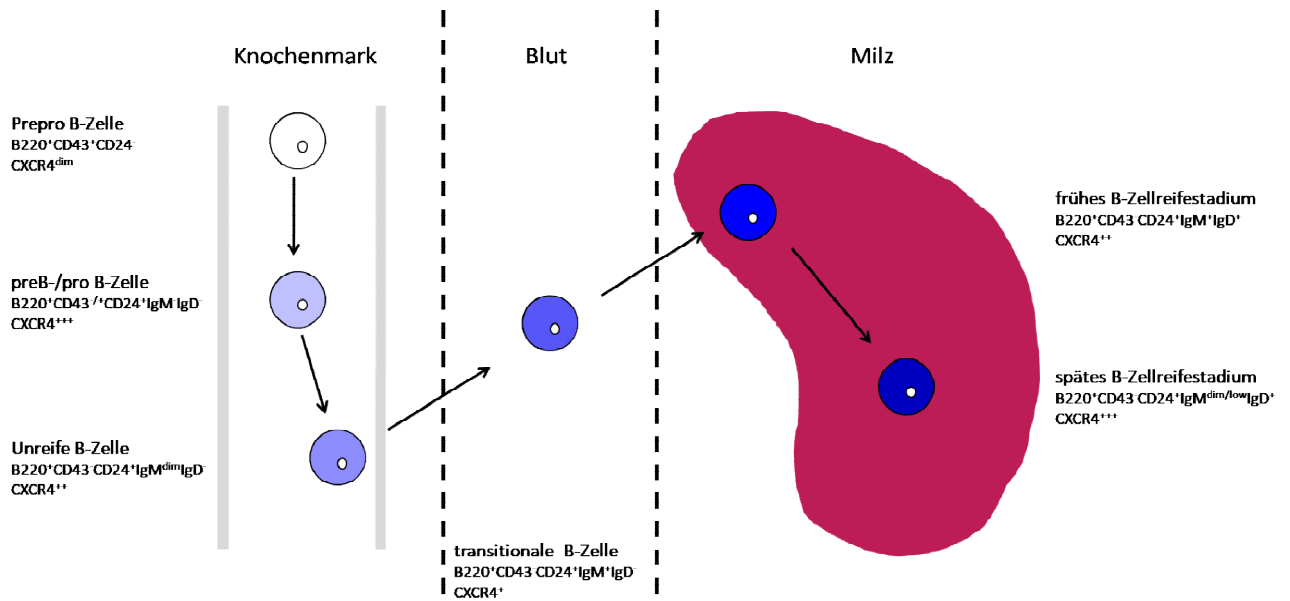


Abbildung 1.3. Schematische Darstellung der B-Zellreifung. B-Zellen entwickeln sich zunächst im Knochenmark über mehrere Entwicklungsstadien hinweg. Als unreife B-Zellen kann das Knochenmark verlassen werden. Die transitionalen B-Zellen homen zur Milz. In der Milz wird die Reifung schließlich abgeschlossen. Dargestellt sind neben den charakteristischen Oberflächenmarkern ebenfalls die relative CXCR4-Expression (in Bezug auf die verschiedenen Entwicklungsstadien).

1.6. Das WHIM Syndrom

Das WHIM-Syndrom ist eine sehr seltene, autosomal dominant vererbte Immunschwäche, welche erstmal 1964 beschrieben wurde (Krill et al, 1964; Zuelzer, 1964). Der Name dieses Syndroms ist ein Akronym der Symptome, unter denen diese Patienten leiden:

W = (HPV-induzierte) Warzen

H = Hypogammaglobulinämie

I = (wiederkehrende) Infektionen

M = Myelokathexis

Allerdings gestaltet sich die klinische Diagnose schwierig, da nicht zwangsläufig alle Symptome auftreten oder sich nur subklinisch manifestieren (Badolato & Donadieu, 2017). Aufgrund dieses Umstandes könnte das WHIM-Syndrom auch unterdiagnostiziert in der Bevölkerung vorliegen. Die Immunschwäche der Patienten resultiert maßgeblich aus einer Neutropenie und einer B-Lymphopenie mit der daraus folgenden Hypogammaglobulinämie. Aus der Heterogenität der Symptome bzw. der unterschiedlich starken Ausprägung der Symptome ergeben sich unterschiedliche Behandlungsregime für die Patienten. Zusammenfassend kann allerdings gesagt werden, dass sich die aktuelle Behandlung auf die Gabe von G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) (Mobilisierung der Neutrophilen aus dem Knochenmark), intravenösen Immunglobuline und

prophylaktischen Antibiotika beschränkt (Badolato & Donadieu, 2017; Kawai & Malech, 2009). Eine Knochenmarktransplantation kann kurativ eingesetzt werden (Krivan et al, 2010; Moens et al, 2016), allerdings müssen hier die Risiken (Konditionierung des Patienten, mögliche *graft-vs-host-disease* (GVHD)) sehr gegen die Nutzen abgewogen werden. Vielversprechend konnte auch der CXCR4-Antagonist Plerixafor in klinischen Studien getestet werden (McDermott et al, 2011a; McDermott et al, 2014; McDermott et al, 2011b; McDermott et al, 2019). Hier ist auffällig, dass Plerixafor, das normalerweise eine sehr kurze Wirkdauer von wenigen Stunden hat, einen langanhaltenden pharmakologischen Effekt mit weitgehender Korrektur der peripheren Leukopenie zur Folge hat. Diese Beobachtung steht möglicherweise mit der angenommenen aberranten Signalweiterleitung aufgrund des Internalisierungs-defizienten mutierten CXCR4 im Zusammenhang und wird im Zusammenhang mit Stammzell-Mobilisierungsdaten in der analog mutierten Maus zu diskutieren sein. Einen interessanten Einzelfall stellt ebenfalls die spontane Heilung einer WHIM-Patientin durch Chromotrypsis dar. Durch die Zerstörung und zufällige Neuorganisation des Chromosoms in einer Progenitorzelle kam es zu einem Verlust des mutierten CXCR4-Gens - neben dem Verlust weiterer 149 Gene. Diese nun für CXCR4 hemizygote Zelle scheint einen Überlebens- bzw. Proliferationsvorteil gegenüber anderen Progenitorzellen zu besitzen und rekonstituierte die Hämatopoese der Patientin (McDermott et al, 2015). Auch dieser bemerkenswerte Phänotyp einer Haploinsuffizienz für CXCR4 wird im Kontext von Daten mit *gain-of-function* Mutanten im CXCR4 noch zu diskutieren sein.

Im Jahr 2003 konnte erstmals gezeigt werden, dass das WHIM-Syndrom mit einer Mutation des CXCR4-Gens einhergeht. Dies wurde als erste menschliche Krankheit mit Bezug zu einem GPCR beschrieben (Hernandez et al, 2003). Im Laufe der Zeit konnten acht weitere, funktionell mutmaßlich analoge WHIM-auslösende CXCR4-Mutationen identifiziert werden (siehe Tab. 1.1.). Dazu sei angemerkt, dass ebenfalls WHIM-Patienten mit unauffälligen CXCR4-Genen beschrieben wurden. In diesen Patienten konnte gezeigt werden, dass die CXCR4-Signalweiterleitung durch Mutationen (z.B. GRK3-Mutation) gestört ist (Balabanian et al, 2008).

Tabelle 1.1. Liste der bekannten WHIM-auslösenden CXCR4-Mutationen

Mutation	Auswirkung
E343K (Liu et al, 2012)	Ladungsänderung am C-Terminus
R334X (Hernandez et al, 2003)	Nonsens
S338X (Alapi et al, 2007)	Nonsens
G336X (Gulino et al, 2004)	Nonsens
E343X (Hernandez et al, 2003)	Nonsens
L324fs(Beaussant Cohen et al, 2012)	Insertion
L329fs (Liu et al, 2016)	Frameshift
S339fs (Hernandez et al, 2003)	Deletion
S341fs(Tassone et al, 2009)	Deletion

Die oben genannten Mutationen führen zu einer Überaktivierung von CXCR4. Dies konnte durch Analysen von Chemotaxis, Ca^{2+} -Flux nach CXCL12-Stimulation oder Aktivierung des MAPK Signalweges nachgewiesen werden (Balabanian et al, 2005; Gulino et al, 2004; Hernandez et al, 2003; Kawai et al, 2007; Kawai et al, 2005) und wurde auf eine gestörte CXCR4-Internalisierung zurückgeführt (Balabanian et al, 2005; Kawai et al, 2005; Lagane et al, 2008). Die Trunkierung des C-Terminus führt zu einem Verlust von Serin/Threonin-Resten, welche entscheidend für die Arrestin-vermittelte Internalisierung sind (McCormick et al, 2009; Orsini et al, 1999). Ein schematischer Vergleich zwischen wildtypischem und trunkiertem CXCR4 (am Beispiel der S338X Mutation) ist in Abb. 1.4. zu sehen. Infolge des Verlusts dieser Phosphorylierungsdomänen ist die Rekrutierung von assoziierten Proteinen gestört und die Signalweiterleitung kann nicht mit der für GPCR charakteristischen Geschwindigkeit abgeschaltet werden (vgl. Kap. 1.4.). Im Jahr 2012 wurde ein WHIM-Mausmodell etabliert (Balabanian et al, 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit diesem Modell generiert.

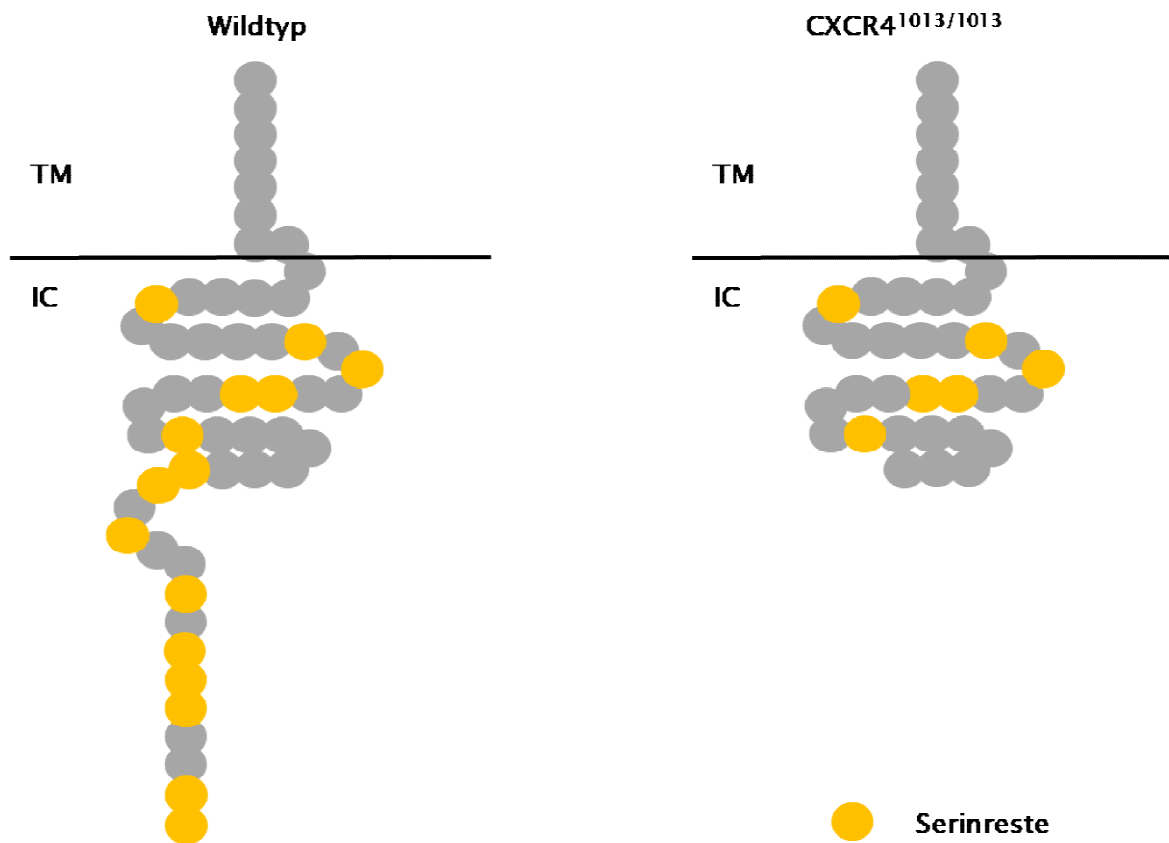


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung des CXCR4 C-Terminus von wildtypischen (links) und CXCR4^{1013/1013}-Tieren (rechts). Durch die CXCR4^{1013/1013}-Mutation gehen neun Serinreste auf der intrazellulären Seite des CXCR4 verloren. Diese Serinreste sind Phosphorylierungsstellen, welche kritisch für die Arrestin-Rekrutierung nach Rezeptoraktivierung zur Internalisierung des Rezeptors sind. TM = Transmembran-Region, IC = intrazellulär.

1.7 Fragestellung

Die Kenntnisse über die CXCR4-CXCL12-Signalachse beruhen maßgeblich auf subtraktiven Studien. Allerdings kann aus diesen Studien abgeleitet werden, dass diese Signalachse sowohl für die unreife, als auch die reife Hämatopoese von zentraler Bedeutung ist. Da die Hämatopoese aufgrund der Komplexität nicht *in vitro* nachgestellt werden kann, muss ein organismisches Modell untersucht werden. Das in dieser Arbeit untersuchte Mausmodell zeichnet sich durch eine Mutation im CXCR4 C-Terminus aus, welche zu einer hyperaktiven CXCR4-Mutanten führt.

Auf Grundlage der oben beschriebenen Annahmen stellen wir die Hypothese auf, dass sich eine aberrante CXCR4 Signalweiterleitung quantitativ und qualitativ auf das unreife Kompartiment und auch das reife Kompartiment auswirken sollte. Daher werden in dieser Arbeit

- a) das unreife Kompartiment hinsichtlich Quantität, Signalweiterleitung, Funktionalität inklusive Repopulationsfähigkeit untersucht
- b) beispielhaft für den Einfluss auf reife hämatopoetische Zellen, B-Zellen hinsichtlich Quantität und Funktionalität untersucht.

2.1. Material

2.1.1. Antikörper und andere Färbereagenzien

Sofern nicht anders angegeben, werden Maus-spezifische Antikörper für die Experimente eingesetzt.

Tabelle 2.1. Liste der verwendeten Antikörper und anderer Färbereagenzien

Name	Klon	Fluorochrom	Hersteller
anti-GFP	polyklonal	AlexaFluor 488	Invitrogen Carlsbad, USA
anti-mouse/human CD11b	M1/70	PE	BioLegend San Diego, USA
anti-mouse/human CD45R/B220	RA3-6B2	PE/Cy7	BioLegend San Diego, USA
anti-mouse/human CD45R/B220	RA3-6B2	APC/Fire750	BioLegend San Diego, USA
CD117 (c-kit)	ACK2	PE/Cy7	BioLegend San Diego, USA
CD127 (IL-7R α)	A7R34	PE/Cy7	BioLegend San Diego, USA
CD150 (SLAMF7)	TC15- 12F12.2	APC	BioLegend San Diego, USA
CD184 (CXCR4)	L276F12	PE/Dazzle	BioLegend San Diego, USA
CD24	M1/69	Brilliant Violet 421	BioLegend San Diego, USA

Name	Klon	Fluorochrom	Hersteller
CD249 (BP-1)	6C3	PE	Invitrogen Carlsbad, USA
CD3	17A2	AlexaFluor700	BioLegend San Diego, USA
CD3ε	145-2C11	APC	BioLegend San Diego, USA
CD43	S11	APC	BioLegend San Diego, USA
CD45	30-F11	Brilliant Violet 421	BioLegend San Diego, USA
CD45	30-F11	FITC	BioLegend San Diego, USA
CD45.1	A20	APC/Cy7	BioLegend San Diego, USA
CD45.2	104	eFluor 450	eBioscience Frankfurt/Main, Deutschland
CD45.2	104	Brilliant Violet 510	BioLegend San Diego, USA
CD48 Antibody	HM48-1	AlexaFluor700	BioLegend San Diego, USA
IgD	11-26c.2a	Brilliant Violet 510	BioLegend San Diego, USA

Name	Klon	Fluorochrom	Hersteller
IgM	RMM-1	FITC	BioLegend San Diego, USA
IRDye 680RD Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	polyklonal	680RD	Li-Cor Biotechnology Lincoln, USA
IRDye 800CW Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	polyklonal	800CW	Li-Cor Biotechnology Lincoln, USA
Ki-67	SolA15	FITC	eBioscience Frankfurt/Main, Deutschland
Ki-67	SolA15	eFluor 450	eBioscience Frankfurt/Main, Deutschland
Lineage Cocktail	145-2C11 M1/70 RA3-6B2 Ter-119 RB6-8C	APC	Beckton Dickinson Franklin Lakes, USA
Lineage Cocktail	17A2 RB6-8C5 RA3-6B2 Ter-119 M1/70	PacificBlue	BioLegend San Diego, USA
Ly-6A/E (Sca-1)	D7	PE	BioLegend San Diego, USA

Name	Klon	Fluorochrom	Hersteller
Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	RB6-8C5	APC/Cy	BioLegend San Diego, USA
Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	RB6-8C5	APC	BioLegend San Diego, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2) Mouse mAb	L34F12	-	Cell Signaling Technology Danvers, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody	polyklonal	-	Cell Signaling Technology Danvers, USA
7-AAD Viability Staining Solution			BioLegend San Diego, USA
Annexin V		PE/Cy7	BioLegend San Diego, USA
Ethidiumbromidlösung 1 %			Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Phalloidin		AlexaFluor 568	Invitrogen Carlsbad, USA

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.2. Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
CXCL12	PeproTech Hamburg, Deutschland Cell Systems Troisdorf, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	VWR International Radnor, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco Carlsbad, USA
Saponin	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland

2.1.3. Geräte

Tabelle 2.3. Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
AutoMACS	autoMACS pro	MiltenyiBiotec Bergisch Gladbach, Deutschland
Automatisches Hämazytometer	Hemavet Multi-Cell 3 / LV	Drew Scientific Miami Lakes, USA
Blot-Kammer	TransBlot Turbo	BioRad Hercules, USA
DNA/RNA Spektrometer	NanoDrop 200c	Thermo Fisher Waltham, USA
Durchflusszytometer	LSR Fortessa II	Becton Dickinson Franklin Lakes, USA
Elektrophoresekammer	Mini Protean Tetra Cell	BioRad Hercules, USA
Flow Sorter	FACSAria II	Becton Dickinson Franklin Lakes, USA
Fluoreszenzmikroskop	IX71	Olympus Shinjuku, Japan

Gerät	Modell	Hersteller
<hr/>		
Gefrierschrank	IIRF400LE H (-20°C)	Gram Bioline Voljens, Dänemark
	MDF-53V (-80°C)	Sanyo Osaka, Japan
	ÖkoArctis (-20°C)	AEG Frankfurt/Main, Deutschland
<hr/>		
Gelelektrophoresekammer	Compact XS/S	Biometra Göttingen, Deutschland
	Midi-Large	G&P Kunststofftechnik Kassel, Deutschland
<hr/>		
Heizblock	Digital Heatblock	VWR International Radnor, USA
	Thermomixer R	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
<hr/>		
Inkubator	Steri Cycle CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Waltham, USA

Gerät	Modell	Hersteller
Kühlschrank	Profi-Line	Liebherr
		Bulle FR, Schweiz
Lichtmikroskop	CKX41	Olympus
		Shinjuku, Japan
PCR-Cycler		
	MyCycler	BioRad
		Hercules, USA
	PTC-200	BioRad
		Hercules, USA
Plattenlesegerät	Viktor X4	Perkin Elmer
		Waltham, USA
RT-Cycler	StepOnePlus	Applied Biosystems
		Foster City, USA
Spannungsquelle		
	PowerPac Basic	BioRad
		Hercules, USA
	PowerPac HC	BioRad
		Hercules, USA
Sterilwerkbank	Holten Safe 2010 1.2	Thermo Fisher
		Waltham, USA
Transilluminator	Gel Doc™ XR+	BioRad
		Hercules, USA

Gerät	Modell	Hersteller
Zentrifuge		
	Rotina 420R	HettichZentrifugen Tuttlingen, Deutschland
	Rotina 420	HettichZentrifugen Tuttlingen, Deutschland

2.1.4. Größenstandards

Tabelle 2.4. Liste der verwendeten Größenstandards

Name	Hersteller
EZ Run Prestained Rec Protein ladder	Thermo Fisher Waltham, USA
GeneRuler 1kb Plus DNA ladder	Thermo Fisher Waltham, USA

2.1.5. Kits

Tabelle 2.5. Liste der verwendeten Kits

Name	Hersteller
CD117 microbeads, mouse	MiltenyiBiotec Bergisch-Gladbach, Deutschland
CXCL12/SDF-1 alphaQuantikine ELISA	R&DSytems Minneapolis, USA

Name	Hersteller
DC Protein Assay	BioRad Hercules, USA
iTaq Universal SYBR Green Supermix	BioRad Hercules, USA
Lineage Cell Depletion Kit, mouse	MiltenyiBiotec Bergisch-Gladbach, Deutschland
RedExtract–N-Amp PCR ReadyMix	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
RNA Mini Kit	Bio & Sell Feucht, Deutschland
Superscript III Reverse Transkriptase Kit	Thermo Fisher Waltham, USA

2.1.6. Medikamente

Tabelle 2.6. Liste der verwendeten Medikamente

Name	Hersteller
5-Fluorouracil	Medac Wedel, Deutschland
AMD3100 octahydrochloridehydrate (Plerixafor)	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Enrofloxazin	Bayer Leverkusen, Deutschland

Name	Hersteller
Engerix B Erwachsene	GlaxoSmithKline Brentford, Vereinigtes Königreich
Filgrastim (rhG-CSF)	Hexal Holzkirchen, Deutschland
Forene (Isofluran)	AbbVie North Chicago, USA
Ketamin	Zoetis Parsippany-Troy Hills Township, USA
Metacam (Metamizol)	Boehringer Ingelheim Ingelheim am Rhein, Deutschland
Metamizol	Winthrop Arzneimittel GmbH Frankfurt/Main, Deutschland
Xylazin2%	Bayer Leverkusen, Deutschland

2.1.7. Puffer und Medien

Name				Hersteller
0,9% NaCl				B. Braun Melsungen, Deutschland
Annexin V Binding Buffer				BioLegend San Diego, USA
DMEM, high glucose, GlutaMax				Gibco Carlsbad, USA
Methocult® M3630				StemCell Technologies Vancouver, Kanada
Methocult®GF M3434				StemCell Technologies Vancouver, Kanada
PBS				Gibco Carlsbad, USA
RPMI 1640, GlutaMax				Gibco Carlsbad, USA
DMEM++				
DMEM, high glucose, GlutaMax	500	ml		Gibco Carlsbad, USA
Fötale Kälberserum	50	ml		PAA Laboratories Pasching, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	0,5	%		Gibco Carlsbad, USA

Erythrozyten-Lysepuffer (10x)

ddH ₂ O	450	ml	
Ammoniumchlorid	41,5	g	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
TRIS-HCl	6,05	g	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland

pH auf 7,5 anpassen, auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen, autoklavieren

Laemmli Puffer (4x)

TRIS-HCl 2 M pH 6,8	2,5	ml	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
20% SDS	8	ml	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	8	ml	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	1	Spatelspitze	Serva Heidelberg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	1,05	ml	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland

NOP-Puffer

NP40	2	%	AppliChem
			Darmstadt, Deutschland
TRIS-HCl	20	mM	Carl Roth
			Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	150	mM	Carl Roth
			Karlsruhe, Deutschland

pH auf 7,5 anpassen

NOP+ (10 ml)

NOP-Puffer

PhosStop	1	Tablette	Roche
			Basel, Schweiz
complete	1	Tablette	Roche
			Basel, Schweiz
DTT	2	mM	Thermo Fisher
			Waltham, USA
N-Ethylmaleimid	5	mM	Sigma-Aldrich
			St. Louis, USA

PBS/BSA

PBS	500	ml	Gibco Carlsbad, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	0,5	%	VWR International Radnor, USA

PBS/BSA/EDTA

PBS	500	ml	Gibco Carlsbad, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	0,5	%	VWR International Radnor, USA
EDTA-Lösung	2	mM	Sigma-Aldrich St. Louis, USA

10x SDS-Laufpuffer (10x) (1 l)

ddH ₂ O	900	ml	
TRIS-HCl	30	g	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Glycin	144	g	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
SDS	10	g	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland

pH auf 8,3 anpassen, auf 1000 ml mit ddH₂O auffüllen

Blot-Puffer

1x SDS-Laufpuffer

Methanol	20	%	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
----------	----	---	-------------------------------------

TAE-Puffer (50x) (1 l)

TRIS-HCl	242	g	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure (99,8%)	57,1	ml	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
0,5 M EDTA pH 8,0	100	ml	Sigma-Aldrich St. Louis, USA

pH auf 8,3 einstellen, mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen

TBS (10x) (1 l)

ddH ₂ O	900	ml	
TRIS-HCl	60,5	g	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	87,6	g	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland

pH auf 7,5 anpassen, mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen

TBS-T

1x TBS

Tween20	0,1	%	Carl Roth
			Karlsruhe, Deutschland

2.1.8. Software

Tabelle 2.7. Liste der verwendeten Software

Name	Hersteller
FACSDiva 7.0	Becton Dickinson Franklin Lakes, USA
GraphPadPrism 5.0	GraphPadPrism Software, Inc. La Jolla, USA
Image Studio 2.0	Li-Cor Lincoln, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Redmond, USA
Microsoft Powerpoint 2010	Microsoft Redmond, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Redmond, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Genotypisierung

Gewebebiospien (Schwanzspitzen oder Ohrlochstanzen) werden in 200 µl DirectTail (PCR) (ViagenBiotech, Inc., Los Angeles, USA) mit 200 µg/ml Proteinase K (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) ü.N. bei 56 °C inkubiert. Es folgt eine Inkubation bei 85 °C zur Inaktivierung der Proteinase K. Für die Genotypisierungs-PCR wird 1 µl des Extrakts eingesetzt. Der Genotyp wird durch die An- bzw. Abwesenheit von einer loxP-Sequenz, welche aufgrund der Generierungsstrategie nachzuweisen ist, bestimmt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird, wie in Tab. 2.8. dargestellt, durchgeführt (Saiki et al, 1988). Die Sequenzen der Genotypisierungsoligonukleotide sind in Tab. 2.9. aufgelistet.

Tabelle 2.8. Reaktionsansatz und PCR-Programm zur Genotypisierungs-PCR

PCR Ansatz		PCR Programm		
Reagenz	Volumen [µl]	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]
RedExtract–N-Amp PCR ReadyMix	10	1	94	180
ddH2O	8	2	94	60
WHIM_fwd	0,5	3	62	60
WHIM_rev	0,5	4	72	60
DNA Extrakt	1	wdh. ab Schritt 2 (1x)		
		5	94	30
		6	62	30
		7	72	30
		wdh. ab Schritt 5 (29x)		
		8	10	Ende

Tabelle 2.9. Genotypisierungsoligonukleotide

Primername	Primersequenz (5'→3')
WHIM_fwd	CTTTAATCTCACTCAGCTCTGGCGAG
WHIM_rev	ACACATTTATGGCTTCCCGGAGACC

Die DNA Fragmente der Genotypisierungs-PCR werden in einem 2% Agarose-Gel in 1x TAE Puffer mit 0,005% Ethidiumbromid der Größe nach aufgetrennt und am Gel Doc™ XR+ visualisiert. Für ein wildtypisches Allel wird eine Bandengröße von 249bp erwartet. Die Bande für ein WHIM Allel ist aufgrund der vorhandenen loxP-Sequenz größer (283bp). Als Größenmaßstab wird der Generuler 1kb Plus verwendet. In Abb. 2.1. ist das Bandenmuster für die drei möglichen Genotypen exemplarisch dargestellt.

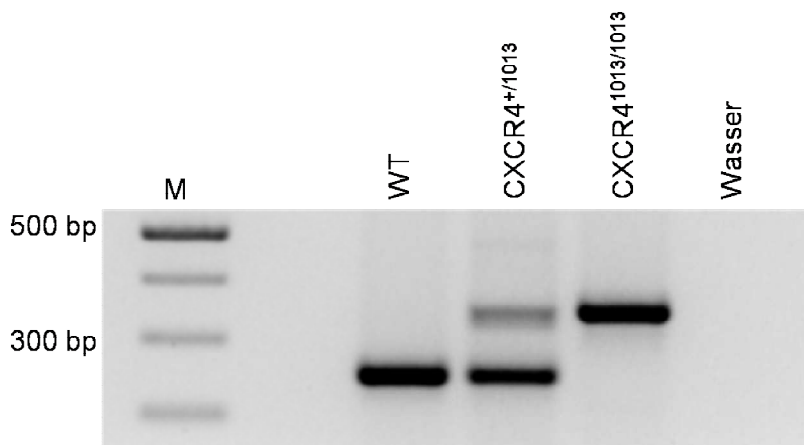


Abbildung 2.1. CXCR4¹⁰¹³-Genotypisierung. Aufgetragen sind Marker (M), Proben von einem wildtypischen Tier (WT), einem heterozygoten CXCR4^{+/1013} Tier, einem homozygoten CXCR4^{1013/1013} Tier, sowie eine Wasserkontrolle. Im Anschluss an die PCR wurde das PCR-Produkt in einem 2% Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

2.2.1.2. RNA Isolierung

RNA wird aus Lin⁻CD117⁺ angereicherten Zellen (siehe 2.2.3.4.) isoliert. Die Isolation der RNA erfolgt mit Hilfe des RNA Mini Kit. Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden wird die Arbeitsfläche zu Beginn mit RNaseZap (Invitrogen, Carlsbad, USA) behandelt. Die Isolierung erfolgt nach Herstellerangaben und die RNA wird in 30 µl RNase-freies Wasser eluiert. Die Quantifizierung der erhaltenen RNA-Menge erfolgt über das NanoDrop200c. Die Reinheit kann zum einen anhand des Spektrums und zum anderen durch den Absorptionsquotienten 260/280 abgeschätzt werden.

2.2.1.3. Umschreiben in cDNA

Pro Reaktion werden 1 µg RNA („RT“) in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Als interne Negativkontrolle für die anschließende qPCR werden 0,5 µg RNA ohne reverse Transkriptase im Prozess mitgeführt („no RT“). Zunächst wird noch potentiell vorhandene Rest-DNA durch RQ1 RNase-free DNaseI (1 U/µl) (Promega, Madison, USA) abgebaut. Dazu wird ein Ansatz entsprechend Tab. 2.10. verwendet und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 2.10. Reaktionsansatz zur DNA-Umschreibung

Reagenz	RT Volumen [µl]	no RT Volumen [µl]
isolierte RNA	X	X
DEPC-H ₂ O	ad 24,5	ad 12,25
DNase	1	0,5
RQ1 Puffer (10x)	3	1,5

Für die no-RT Kontrollen werden jeweils halbe Ansätze angesetzt, die reverse Transkriptase ausgespart und das entsprechende Volumen an DEPC-H₂O zugegeben. Zum Abstoppen der Reaktion werden 1 µl bzw. 0,5 µl DNaseStop Solution zugegeben (RT bzw. no RT Ansatz) und 10 min bei 65 °C inkubiert. Um eine Amplifikation der gesamten RNA zu gewährleisten werden anschließend 2,5 µl bzw. 1,25 µl dNTPs (100 mM) (Promega, Madison, USA) und 5 µl/2,5 µl an zufälligen Positionen anlagernde Oligonukleotide (500 µg/ml) (*random primer*) (Promega, Madison, USA) zugefügt. Um eine Anlagerung der *random primer* zu ermöglichen, wird der Reaktionsansatz 5 min bei 65 °C inkubiert und bis zum nächsten Schritt auf 4 °C gekühlt. Das Umschreiben wird mit Hilfe des Superscript III Reverse Transkriptase Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.4. quantitative Real Time-PCR

Zur Amplifikation der in 2.2.1.3. hergestellten cDNA wird die quantitative Real Time-PCR verwendet. Diese Methode ermöglicht eine Quantifizierung der Expressionsstärke des Zielgens anhand der Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green, welcher sich an doppelsträngige DNA anlagert und somit proportional zum Amplifikat ansteigt. Die Expressionsstärke des Zielgens (CXCR4) wird auf die Expressionstärke einer ubiquitär exprimierten internen Kontrolle normalisiert. Als interne

Kontrolle wurde das Gen Rpl13A gewählt, welches für ein ribosomales Gen kodiert. Nach Beendigung des qPCR-Laufs wird eine Schmelzkurve ermittelt. Dadurch kann abgeschätzt werden, ob es sich um spezifische Amplifikationen handelt. Spezifische Amplifikate haben aufgrund ihrer Größe eine höhere Schmelztemperatur als z.B. unspezifische Primerdimere. Die entsprechenden Ansätze können Tab. 2.11., die genutzten Primerpaare Tab. 2.12. entnommen werden. RT-Proben werden jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt, die korrespondierenden no-RT-Proben in Einzelbestimmung. Das genutzte qPCR-Programm kann Tab. 2.13. entnommen werden. Zur Quantifizierung wird die $\Delta\Delta CT$ -Methode verwendet (Pfaffl, 2001). Die Real Time-PCR Reaktion wird in einem StepOnePlus™ Real Time-PCR System durchgeführt.

Tabelle 2.11. Reaktionsansatz zur Real Time-PCR

	RT [μ l]	no RT [μ l]
cDNA	1	2
forward Primer (10 μ M)	0,5	0,5
reverse Primer (10 μ M)	0,5	0,5
SYBR Green (2x)	10	10
HPLC-H ₂ O	8	7

Tabelle 2.12. Eingesetzte Oligonukleotidpaare in der Real Time-PCR

Primernamen	Primersequenz (5'→3')
mCXCR4_for	CTTTCTTTGCCTGCTGGCTG
mCXCR4_rev	AGGGCCTCTGTGATGGAGAT
mRpl13A_for	TGAGGTCGGGTGGAAGTACC
mRpl13A_rev	GGAGTCCGTTGGTCTTGAGG

Tabelle 2.13. Real Time-PCR-Programm

Programmschritt	Temperatur [°C]	Dauer
1	95	10 min
2	95	15 sec
3	60	60 sec
wdh. ab Schritt 2 (40x)		
4	95	15 sec
5	60	60 sec

Erhöhung der Temperatur in 0,3°C Schritten bis 95°C erreicht sind

2.2.2. Biochemische Methoden

2.2.2.1. Proteinquantifizierung

Die Proteinmenge in Knochenmarkflüssigkeit und Plasma wird nach Herstellerangaben mit 5 µl Probenmaterial durch das DC Protein Assay in Doppelbestimmungen ermittelt. Als Referenz wird eine Eichgerade aus bekannten Proteinkonzentrationen (0 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml BSA) mitgeführt. Die Vermessung des Assays erfolgt am Plattenlesegerät Victor X4 bei 570 nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgt durch die mitgeführte Eichgerade.

2.2.2.2. CXCL12 Konzentrationsbestimmung

Plasma (Kap. 2.2.5.5.), Knochenmark- und Milzflüssigkeit (Kap. 2.2.5.6.) werden wie beschrieben gewonnen. Zur Bestimmung der CXCL12-Konzentration wird der kommerzielle ELISA "Mouse CXCL12/SDF-1 alpha Quantikine ELISA" genutzt und nach Herstellerangaben durchgeführt. Plasmaproben werden 1:2 mit HPLC-H₂O verdünnt. Für jede Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Mit einer im Kit enthaltenen CXCL12-Probe wird eine Verdünnungsreihe mit bekannten CXCL12-Konzentrationen (0 ng/ml, 0,156 ng/ml, 0,313 ng/ml, 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml) angesetzt. Diese wird als Eichgerade für die spätere Auswertung mitgeführt. Um eine Bezugsgröße für die ermittelten CXCL12-Konzentrationen zu erhalten, wird die Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe (Kap. 2.2.2.1.) bestimmt und die erhaltene CXCL12-Konzentration auf die Gesamtproteinmenge bezogen.

2.2.3. Zellkulturtechnische Methoden

2.2.3.1. Methylzellulose Assay

Zur Quantifizierung funktioneller hämatopoetischer Vorläuferzellen wird das semisolid Medium Methylzellulose mit entsprechenden Zytokinen eingesetzt. Anhand von Farbe und Morphologie der sich bildenden Kolonien (*colony-forming units-culture*, CFU-C) lassen sich unterschiedliche Linienspezifizierungen („Lineages“) differenzieren.

Blut: 70 – 200 µl frisches Vollblut werden mit 10 ml PBS/BSA gewaschen. Nach der Zentrifugation (400g, 5 min, RT) werden die Zellen in 2 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und 5 min bei 37 °C inkubiert. Dieses Lyseprinzip beruht auf dem ständigen Zustrom von Ammoniumchlorid in die Erythrozyten, wodurch sich ein osmotischer Druck aufbaut, welcher die Erythrozyten aufquellen und schlussendlich platzen lässt. Zum Abstoppen der Reaktion werden 10 ml PBS/BSA zugegeben und die Suspension zentrifugiert (400g, 5 min, RT). Das Zellpellet wird in 200 µl DMEM++ aufgenommen und in 2 ml Methocult®GF M3434 Methylzellulose gegeben.

Knochenmark/Milz: 5×10^4 Knochenmarkzellen bzw. $1,5 \times 10^5$ Milzzellen werden in 200 µl DMEM++ aufgenommen und in 2 ml Methylzellulose gegeben.

Die Zellsuspension wird sorgfältig mit der Methylzellulose vermischt und anschließend auf zwei 3 cm Kulturschalen ausplattiert. Nach einer Inkubation von 6 – 9 Tagen bei 37 °C im Inkubator können die Kolonien mikroskopisch quantifiziert und anhand ihrer Morphologie differenziert werden.

Die Quantifizierung von preB-Vorläuferzellen verläuft analog. Allerdings werden 200 µl Vollblut, 3×10^5 Knochenmark-, bzw. 3×10^6 Milzzellen eingesetzt. Diese werden in Methocult® M3630 Methylzellulose ausplattiert.

2.2.3.2. Transwell Migration-Assay

Zur Testung einer gerichteten chemotaktischen Antwort wird ein Migrationstest eingesetzt. Dazu werden Polycarbonateinsätze mit einer Porengröße von 5 µm (Corning, New York, USA) genutzt, welche in 24well Platten eingesetzt werden (Corning, New York, USA). 3×10^5 Knochenmarkzellen in 100 µl DMEM++ werden in das obere Kompartiment pipettiert. In das untere Kompartiment wird entweder 600 µl DMEM++ (Kontrollmedium, spontane Migration) oder 600 µl DMEM++ mit 100 ng/ml CXCL12 gegeben. Zur Quantifizierung werden außerdem 3×10^4 Knochenmarkzellen in 600 µl DMEM++ ohne Transwell-Einsatz mitgeführt. Nach einer Inkubation von 4 Stunden im Inkubator (37 °C, 5% CO₂) werden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 min mit 4500 rpm (Biofuge 13, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) zentrifugiert. Es werden 400 µl des

Überstandes verworfen und die Zellen im verbleibenden Überstand resuspendiert und anschließend in Methylzellulose ausplattiert (siehe 2.2.3.1.).

2.2.3.3. Immunomagnetische Zellanreicherung

Zur Anreicherung einer unreifen hämatopoetischen Zellpopulation werden immunomagnetische *beads* genutzt. Dabei sind superparamagnetische Partikel kovalent an spezifische Antikörper gebunden. Diese Antikörper markieren entweder alle reifen Populationen (Lineage depletion Kit) bzw. CD117⁺-Zellen (CD117 *microbeads*). Zunächst werden die reifen Zellen durch das Lineage depletion Kit entfernt und anschließend eine unreife CD117⁺-Population angereichert. Alternativ kann auf die Lineage Depletion verzichtet werden. Die Kits werden entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Anreicherung erfolgt automatisch durch den AutoMACS pro Separator.

2.2.3.4. F-Aktin Polymerisierung

Die Neuorganisation des Aktinzytoskeletts ist eine der ersten zellulären Antworten nach Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors durch seinen Liganden. Zum Nachweis wird AlexaFluor568-markiertes Phalloidin eingesetzt. 1×10^6 CD117⁺-angereicherte Knochenmarkzellen (Kap. 2.2.3.3.) werden in 1 ml DMEM mit 0,5% BSA aufgenommen und 30 – 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird eine unstimulierte Probe entnommen und mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Die Stimulation erfolgt mit 100 ng/ml CXCL12. Zu den angegebenen Zeitpunkten (i.d.R. 10s, 20s, 30s, 60s, 300s) wird ebenfalls eine Probe entnommen und fixiert. Nach Abschluss der Stimulation wird abermals eine unstimulierte Probe entnommen um einen eventuellen Einfluss der Inkubationszeit ausschließen zu können. Die Fixierung wird bei RT für 15 min durchgeführt. Formaldehyd wird durch Zentrifugation entfernt und die Zellen für 5 min mit 0,1% Saponin in PBS permeabilisiert. Anschließend werden die Zellen mit AlexaFluor568-gekoppeltem Phalloidin gefärbt (20 min, 4 °C, dunkel) und am Durchflusszytometer vermessen.

2.2.3.5. MAPK-Aktivierung am Beispiel der Erk-Phosphorylierung

2×10^6 CD117⁺-angereicherte Knochenmarkzellen (Kap. 2.2.3.3.) werden in 100 µl RPMI pro Ansatz für ca. 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 100 ng/ml CXCL12 für 0 Sekunden, 15 Sekunden, 30 Sekunden, 60 Sekunden, 150 Sekunden und 300 Sekunden stimuliert und die Reaktion mit 1 ml eiskaltem PBS abgestoppt. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 4 °C bei 3500 rpm (BiofugeFresco, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 45 µl NOP+ Puffer aufgenommen und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Entfernung von Zelltrümmern wird die Suspension ein weiteres Mal mit 13.000 rpm bei 4 °C für

15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und kann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Kap. 2.2.2.1.) werden 50 µg Gesamtprotein je Zeitpunkt mit einer entsprechenden Menge 4x Laemmli Puffer aufgenommen (Tab. 2.14.) und bei 95 °C für 5 min zur Denaturierung der Proteine inkubiert. Die denaturierte Proteinsuspension wird anschließend auf ein kommerzielles SDS-Gradientengel 4 – 15% (Mini-Protean TGX, BioRad, Hercules, USA) zusammen mit dem Größenstandard EZ Run, PrestainedRec Protein ladder aufgetragen. Zum Einlaufen in das Gradientengel wird zunächst für ca. 10 Minuten eine Spannung von 120 V angelegt. Anschließend werden die Proteine anhand ihrer Größe bei 200 V für ca. 30 Minuten aufgetrennt.

Tabelle 2.14. Probenansatz für SDS-Gelelektrophorese

Reagenz	Volumen [µl]
4x Laemmli	10
Proteinsuspension	X
H ₂ O	ad 40

Zur Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (0,45 µm) (BioRad, Hercules, USA) wird ein Semi-dry Western Blot verwendet. Auf 6 Lagen mit Blot-Puffer getränkten Whatman-Papiers wird die ebenfalls in Blot-Puffer getränkte Nitrozellulose-Membran gelegt. Das Gradientengel wird für 15 Minuten in Blot-Puffer equilibriert und anschließend auf die Nitrozellulose-Membran gegeben. Abschließend folgen 6 weitere Lagen getränkten Whatman-Papiers. Luftblasen werden entfernt und der Stapel wird in der Blot-Kammer eingeklemmt. Die Übertragung der Proteine erfolgt bei 0,3 A für 20 Minuten. Um freie Bindestellen auf der Membran abzusättigen wird die Nitrozellulose-Membran für 1 h unter Schütteln mit 5% Milchpulver in TBS-T blockiert. Die Inkubation der Erstantikörper (p44/42 MAPK (Erk1/2) Mouse mAb, 1:1000, in TBS-T, Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody, 1:1000 in TBS-T) erfolgt ü.N. bei 4 °C. Um freien Antikörper zu entfernen, wird die Membran 3x 10 min bei RT mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (1:10000, 5% Milchpulver in TBS-T) erfolgt für 1 h bei RT im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T kann die Nitrozellulose-Membran mit dem OdysseyCLx (Li-Cor, Lincoln, USA) entwickelt werden. Die Datenanalyse erfolgt mit der Image Studio 2.0-Software (Li-Cor, Lincoln, USA). Zur Ermittlung der Erk-Aktivierung wird anschließend die mittlere Fluoreszenzintensität des phosphorylierten Erks durch die mittlere Fluoreszenzintensität des Gesamt-

ERKs dividiert. Dadurch können auch mögliche Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge relativiert werden.

2.2.4. Durchflusszytometrische Methoden

2.2.4.1. Oberflächenanalyse

Für durchflusszytometrische Analysen werden zwischen 30 µl und 50 µl Peripherblut bzw. zwischen $0,5 \times 10^6$ und 2×10^6 Knochenmark- oder Milzzellen gefärbt. Zur Färbung werden optimale Antikörperkonzentrationen eingesetzt. Die Proben werden mit entsprechenden Antikörperkombinationen für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden in Peripherblutproben die Erythrozyten lysiert (siehe 2.2.5.3.) und die Proben einmal mit PBS/BSA gewaschen. Die Vermessung der Proben erfolgt am LSR Fortessa II Durchflusszytometer. Direkt vor der Messung werden Knochenmark- und Milzproben durch einen 35 µm Filter (Corning, New York, USA) filtriert. Das Durchflusszytometer wird mit ungefärbten Proben und FMO-Kontrollen eingestellt. Zur Kompensation werden Einzelfärbungen verwendet. Die Analyse wird mit FACSDiva Software durchgeführt. Beispielplots der unterschiedlichen Analyse können in den Anhängen eingesehen werden.

2.2.4.2. Zellzyklusanalyse

Durch eine Färbung des zellzyklusaktiven Kernproteins Ki67 in Kombination mit dem DNA Farbstoff 7-AAD können verschiedene Zellzyklusstadien (G0, G1 und G2/S/M) unterschieden werden. G0 zeichnet sich durch die Abwesenheit von Ki67, sowie einen einfachen Chromosomensatz (2n) aus. In der G1 Phase bleibt die DNA Färbung unverändert und Ki67 wird nachweisbar. In den Phasen G2/S/M (weitere Differenzierungen werden nicht vorgenommen) erhöht sich der DNA-Gehalt entsprechend der Neusynthese der DNA auf $2 < n < 4$.

Zunächst wird die Oberfläche für Lineage, CD117 und Sca-1 gefärbt (siehe 2.2.4.1.). Zum Aufschluss werden die Zellen mit dem Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer (eBiosciences, Frankfurt/Main, Deutschland) fixiert und permeabilisiert (45 min, 4 °C, dunkel). Zur Entfernung des Puffers werden die Zellen zentrifugiert und einmal mit 1x Permeabilization Buffer (eBioscience, Frankfurt/Main, Deutschland) gewaschen. Das Kernprotein Ki-67 wird gefärbt (30 min, 4 °C, dunkel), dann wird einmal mit 1x Permeabilization Buffer gewaschen. Für kompetitive Transplantationen muss ebenfalls das intrazelluläre GFP gefärbt werden (analoge Inkubationsbedingungen wie für Ki-67), da durch die Fixierung die zur Fluoreszenz benötigte Konformationsumlagerung des GFP-Moleküls verhindert wird. Da 7-AAD ebenfalls an RNA bindet, wird diese mit 1 ml 20 µg/ml RNaseA (Pepqab, Erlangen, Deutschland) in 1x Permeabilization Buffer für 30 min bei 37 °C abgebaut. Nach

Zentrifugation (400g, RT, 5 min) erfolgt eine Inkubation mit 7-AAD (10 min, RT, dunkel). Abschließend werden die Proben einmal mit 1x Permeabilization Buffer gewaschen, in 500 µl 1x Permeabilization Buffer aufgenommen und am Durchflusszytometer vermessen. Beispielplots der unterschiedlichen Analysen können in den Anhängen eingesehen werden.

2.2.4.3. Zellsortierung

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Analyse können an einem *cell sorter* definierte Populationen aufgefangen werden und stehen damit für weitere Analysen zur Verfügung. Analog zur durchflusszytometrischen Analyse wird der *cell sorter* zunächst mit ungefärbten bzw. Einzelfärbungen eingestellt und kompensiert. Dies wird in dieser Arbeit nach der Primärtransplantation mit induzierten leukämischen Zellen (Kap. 2.2.5.13.) verwendet. Das isolierte Knochenmark primärtransplantierter Empfänger wird immunomagnetisch Lineage-depletiert (Kap. 2.2.3.3.). Das Lineage-depletierte Knochenmark wird mit einem Lineage-Cocktail gefärbt (20 min, 4 °C, dunkel) und anschließend am *cell sorter* auf Lineage⁻GFP⁺ sortiert. Dadurch kann eine unreife, transgene Population isoliert werden und steht für die anschließende Sekundärtransplantation zur Verfügung.

2.2.4.4. Apoptose Assay

Zur Bestimmung der Apoptose wird Fluoreszenz-markiertes Annexin V eingesetzt. Da dieses Protein Calcium-abhängig bindet, müssen definierte Pufferbedingungen eingehalten werden. Zellen werden zunächst wie in Kap. 2.2.4.1. beschrieben mit spezifischen Antikörpern gefärbt und zweimalig mit PBS/BSA gewaschen. Die Zellen werden in 100 µl Annexin V Binding Buffer resuspendiert und mit 5 µl 7-AAD und 2,5 µl Annexin V-PECy7 für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden 400 µl Annexin V Binding Buffer zugegeben und die Proben innerhalb von 60 min am Durchflusszytometer vermessen.

2.2.5. Tierexperimentelle Methoden

2.2.5.1. Tierhaltung

Die Zucht der Tiere wird von einem externen Dienstleister (mfdDiagnostics GmbH, Wendelsheim, Deutschland) übernommen. Dieser übernimmt auch die Gewinnung der Schwanzbiopsien bzw. der Ohrlochstanzen. Für Versuche werden die Tiere in die Zentrale Forschungseinrichtung (ZFE) der Universitätsklinik Frankfurt überführt und von den dortigen Tierpflegern versorgt. Einstreu, Futter und Wasser werden wöchentlich gewechselt. Die Tiere werden in der ZFE unter nicht spezifisch pathogenfreien Bedingungen in IVC-Käfigen (*Individually Ventilated Cages*) in Gruppen von bis zu 5 Tieren gehalten. Der Tag/Nacht Rhythmus der Tiere wird durch 12 Stunden Dunkelheit und 12 Stunden Licht aufrechterhalten. Das Trinkwasser wird autoklaviert und das Futtermittel vom Hersteller bestrahlt um Kontaminationen zu vermeiden. Futter und Wasser steht den Tieren *ad libitum* zur Verfügung Ein Tierversuchsantrag liegt dem Regierungspräsidium Darmstadt unter der Aktennummer F27/1001 vor.

2.2.5.2. Organentnahme

Die Entnahme von Peripherblut erfolgt am wachen Tier. Die Halsvene wird durch einen festen Mausgriff gestaut und die *vena facialis* mit einer 20G Kanüle punktiert. Das Blut wird direkt mit einem Kalium/EDTA beschichteten Röhrchen (Microvette, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen. Bis zur weiteren Verwendung wird das Blut bei RT gelagert.

Zur Entnahme der Milzen und Knochen werden die Tiere schmerzlos durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend werden die Tiere auf einer Unterlage fixiert, die Haut proximal bis Jugulum und bis zum distalen Ende der Tibiae mobilisiert und die benötigten Knochen (i.d.R. Femora und Tibiae, falls nötig ebenfalls Pelvis) möglichst gewebefrei entnommen. Das Peritoneum wird geöffnet und die Milz gewebefrei entfernt.

2.2.5.3. Erythrozyten-Lyse

Erythrozyten werden durch eine hypotone Ammoniumchlorid-Lösung lysiert. Durchflusszytometrische Proben werden wie in 2.2.4.1. beschrieben gefärbt und anschließend mit 2 ml 1x RBC LysisBuffer (eBioscience, Frankfurt/Main, Deutschland) für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zur Entfernung des Lyse-Puffers werden die Zellen zentrifugiert (400g, 5 min, RT) und mit PBS/BSA gewaschen.

Proben für Methylzellulose Assays werden mit 2 ml autoklaviertem Erythrozyten-Lysepuffer für 5 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Im weiteren Verlauf werden die Proben analog zu durchflusszytometrischen Proben behandelt.

2.2.5.4. Herstellung von Knochenmark- und Milzzellsuspensionen

Die Knochen werden mit Hilfe einer 23G Kanüle von beiden Seiten mit PBS/BSA gespült. Milzen werden an einer Seite punktiert und ausgestrichen. Die Milzzellen werden suspendiert und zur Entfernung von Geweberesten über einen 40 µm Filter (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) gegeben. Für die automatische Hämazytometrie (siehe 2.2.5.7.) werden die Suspensionen zentrifugiert (400g, 5 min RT) und das Pellet in einem definierten Volumen aufgenommen. Knochenmark- und Milzelldispersion werden bis zur Verwendung in PBS/BSA auf Eis gelagert.

2.2.5.5. Gewinnung von Plasma

Peripherblut wird wie in 2.2.5.2. beschrieben am wachen Tier in EDTA-Microvetten abgenommen. Das Vollblut wird anschließend bei 4500 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Plasma abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.5.6. Gewinnung von Knochenmark- und Milzflüssigkeit

Ein Femur und eine Tibia werden in 0,5 ml PBS ausgespült. Die Suspension wird zentrifugiert (400g, 5 min, RT) und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Es wird wie in 2.2.5.4. beschrieben eine Milzsuspension in 1 ml PBS hergestellt. Anschließend wird Suspension zentrifugiert (400g, RT, 5 min) und der Überstand abgenommen. Bis zur weiteren Verwendung kann die gewonnene Milzflüssigkeit bei -80 °C gelagert werden.

2.2.5.7. Automatische Hämazytometrie

Zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung einer Zellsuspension (peripheres Blut, Knochenmark, Milz-Extrakt) wird das Hemavet verwendet. Für die Erstellung eines großen Blutbildes werden 35 µl Suspension benötigt.

2.2.5.8. Immunisierung

Um die Funktionalität von B-Zellen zu überprüfen werden die Tiere mit einem Hepatitis B Impfstoff immunisiert. Den Tieren wird unter Isofluran-Narkose 100 µl des Impfstoffes pro Maus (50 µl/Oberschenkel) intramuskulär (i.m.) injiziert. Dies entspricht 10% einer humanen Erwachsenenendosis. Die Immunisierung wird im Abstand von jeweils einer Woche zweimal wiederholt. Eine Woche nach der letzten Injektion wird Plasma gewonnen und die Anti-HBsAG-Spiegel am Architect (Abbot Core Laboratory, Abbot Park, USA) vermessen. Um die Bildung von B-Gedächtniszellen zu überprüfen, werden die Tiere ca. 3 Monate nach der letzten Immunisierung ein weiteres Mal immunisiert und nach einer Woche wiederum die Anti-HBsAGs-Spiegel bestimmt, zur Überprüfung eines etwaigen Boost-Effekts, wie er bei immungesunden Tieren zu erwarten ist.

2.2.5.9. Mobilisierung

Die Mobilisierung mit Plerixafor erfolgt intraperitoneal (i.p.) als Bolusgabe (10 mg/kg). Um die Mobilisierungskinetik darstellen zu können, werden nach 1h, 2h und 4h Blutproben entnommen, Blutbilder erstellt (siehe 2.2.5.7.) und Kolonieassays durchgeführt (siehe 2.2.3.1.). Die Mobilisierung mit G-CSF über 9 Dosen mit 100 µg/kg pro Dosis im Abstand von 12h durchgeführt. Nach der letzten Dosis wird Peripherblut gewonnen und ebenfalls Blutbilder erstellt und Kolonieassays durchgeführt.

2.2.5.10. Bestrahlung

Für Transplantationsversuche werden die Tiere mit 9,5 Gy (Homing 12,5 Gy) mit einer Cäsiumquelle Ganzkörper-bestrahlt. Die Dosisrate beträgt dabei 1 Gy/min. Die Transplantation der Tiere erfolgt wenige Stunden nach der Bestrahlung.

2.2.5.11. Transplantation

Grundsätzlich werden zwei Arten von Transplantationsexperimenten unterschieden. Bei der nicht kompetitiven Transplantation wird die Fähigkeit des transplantierten Knochenmarks untersucht, ein neues hämatopoetisches System zu etablieren. Bei kompetitiven Transplantationen werden das zu untersuchende und ein zusätzliches kompetitives Knochenmark (z.B. GFP-exprimierendes Knochenmark) transplantiert. Diese Tiere entwickeln ein hämatopoetisches System, welches von beiden Transplantaten entstammt; diese werden als gemischte Chimären bezeichnet. Durch den Grad des Chimärismus kann untersucht werden, wie gut sich das entsprechende Knochenmark unter kompetitiven Bedingungen durchsetzen kann (Abb. 2.2.).

Für nicht kompetitive Transplantationen werden $0,25 - 0,5 \times 10^5$ Knochenmarkszellen als Transplantat eingesetzt. Bei kompetitiven Transplantationen werden $1,5 \times 10^5$ Zellen des zu untersuchenden Knochenmarks und $1,5 \times 10^5$ Zellen des Kompetitor-Knochenmarks genutzt. Die Zellsuspensionen werden vor der Transplantation über einen $40 \mu\text{m}$ Filter filtriert, um mögliche Gewebereste oder Knochensplitter zu entfernen. Die bestrahlten Empfänger werden mit einer Rotlichtlampe erwärmt und mit einer 27G Kanüle über eine Schwanzvene i.v. transplantiert. Zur Prävention einer neutropenischen Infektion werden die transplantierten Tiere über einen Verlauf von vier Wochen prophylaktisch mit einem Breitbandantibiotikum (Gyrasehemmer Baytril; 0,02% im Trinkwasser) behandelt.

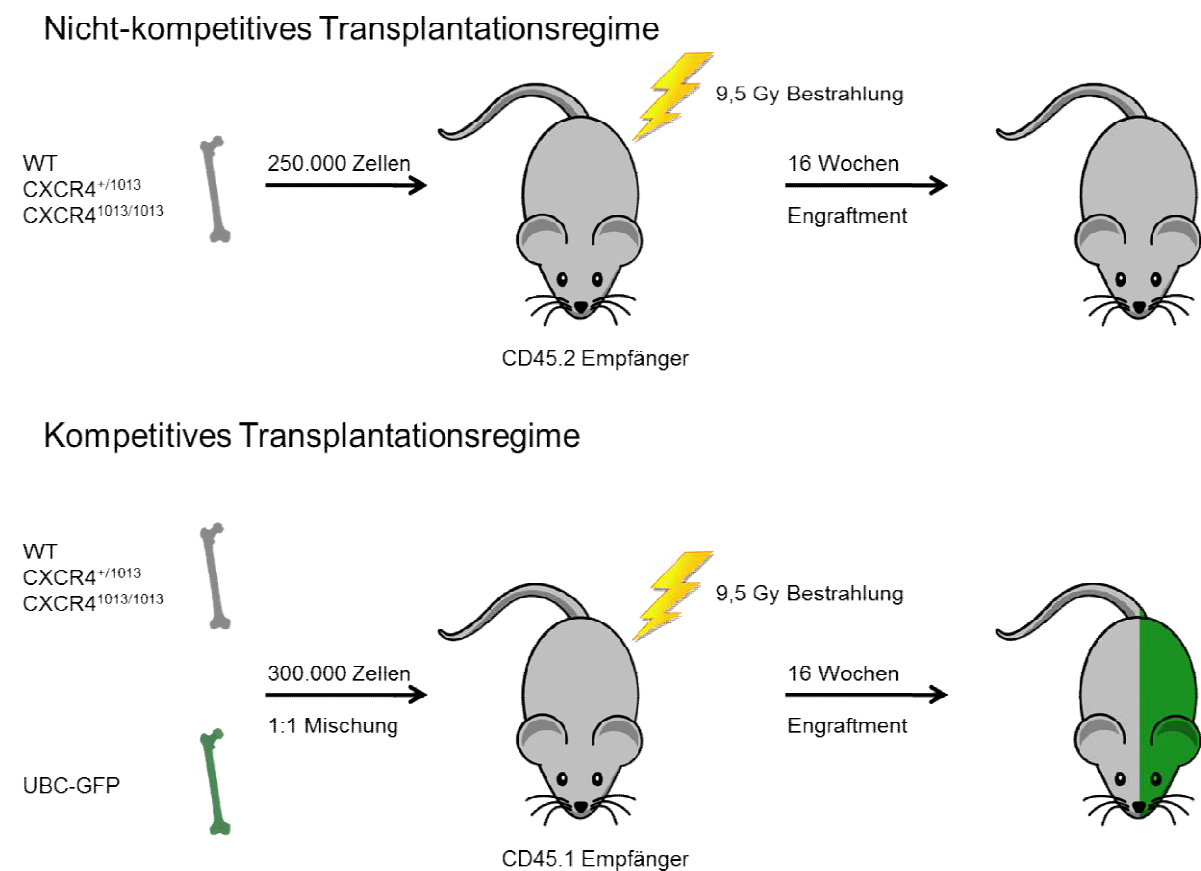


Abbildung 2.2. Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Transplantationsregime.

2.2.5.12. Homing

Knochenmarkzellen aus Spendermäusen werden präpariert, filtriert und vereinigt. Die bestrahlten Empfängertiere werden mit 1×10^7 Zellen intravenös (i.v.) über die Schwanzvene transplantiert (analog zu 2.2.5.11.). Nach 18 Stunden werden die hämatopoetischen Organe (Peripherblut, Milz und Knochenmark) auf den Gehalt an funktionellen Stamm- und Vorläuferzellen mit Hilfe eines Methylzellulose-Assays (siehe 2.2.3.1.) untersucht. Es wird die größtmögliche Menge an Peripherblut, 1/16 der Knochenmarksuspension von 2 Femora und 1/50 der Milzsuspension ausplattiert. Die erhaltenen Koloniezahlen werden dann auf die transplantierten CFU-C normalisiert.

2.2.5.13. Induktion einer akuten myeloischen Leukämie

Für die Überprüfung der Auswirkung der WHIM-Mutation in einer Leukämie wird das Leukämie-induzierende MLL-AF9 System gewählt. Die Transduktion mit einem Vektor für dieses Fusionsprotein führt zuverlässig zur Ausbildung eines akuten myeloischen Leukämie (AML) ähnlichen, rasch progredienten leukämischen Krankheitsbildes. Neben dem MLL-AF9 Fusionsprotein wird zusätzlich GFP durch den Vektor exprimiert, dies dient zur späteren Identifikation der malignen Zellen. Es werden Spendertiere mit 5-Fluorouracil ablatiert (200 mg/kg, i.v.) und Knochenmark drei Tage nach Injektion isoliert. Die Transduktion des Knochenmarks wird in Kooperation mit Prof. Daniela Krause (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main, Deutschland) durchgeführt. Nach zweimaliger Transduktion werden 500.000 Zellen in subletal bestrahlte Empfängertiere (2x 450 Gy) transplantiert. Nach einer zweiwöchigen Erholungsphase wird den Tieren einmal wöchentliches Blut abgenommen und sowohl ein Blutbild erstellt (siehe 2.2.5.7.) als auch das Blut durchflusszytometrisch analysiert (siehe 2.2.4.1.). Als *cut-off* Bedingung für eine sekundäre Transplantation wird eine periphere Tumorlast von durchschnittlich 50% festgelegt. Als Tumorzellen werden GFP⁺Gr1⁺-Zellen definiert. Bei Erreichen dieser Grenze werden drei Tiere aus der Gruppe entfernt, schmerzlos getötet und das Knochenmark isoliert. Das Knochenmark wird immunomagnetisch Lineage-depletiert (siehe 2.2.3.3.) und anschließend auf Lineage⁻GFP⁺ sortiert (siehe 2.2.4.3.). 15.000 sortierte Zellen werden mit 2×10^6 unbehandelten, wildtypischen Knochenmarkzellen in subletal bestrahlte Empfänger (2x 450 Gy) transplantiert. Diese Tiere werden analog zur Primärtransplantation überwacht. Moribunde Tiere werden schmerzlos getötet.

2.2.5.14. Splenektomie

Die Milz ist in der Maus ein Ort der extramedullären Hämatopoese. Durch die Entfernung der Milz können direkt Rückschlüsse auf die Bedeutung im jeweiligen genetischen Kontext gezogen werden. Die Splenektomie findet unter Xylazin/Ketamin Narkose (5 mg/kg / 100 mg/kg, i.p.) statt. Zusätzlich erhalten die Tiere vor der Operation das Analgetikum Metamizol (200 mg/kg, s.c.). Zur Entnahme wird nach Rasur und Hautdesinfektion eine links-laterale Laparotomie durchgeführt, die Milz stumpf präpariert, der vordere und hintere Gefäßstumpf ligiert und anschließend durchtrennt, die Milz blutlos entfernt. Anschließend wird das Peritoneum mit Einzelknopfnähten adaptiert und die Haut durch chirurgische Clips verschlossen (diese werden nach ca. 10 Tagen entfernt). Zur anschließenden Schmerzmedikation erhalten die Tiere Metamizol über das Trinkwasser (1 ml / 250 ml Trinkwasser).

2.2.6. Datenanalyse und Software

Die erhobenen Daten werden mit Microsoft Excel verarbeitet und ausgewertet. Zur Berechnung statistischer Signifikanzen und zur Erstellung der Abbildungen wird Graphpad Prism verwendet. Zur Unterscheidung von zwei Wertepaaren wird der Student t-Test, für drei oder mehr Wertepaare eine One-Way ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur genutzt. Überlebensstatistiken werden mit Hilfe des log rank Tests ausgewertet. Zur Erstellung von Schemata wird Microsoft Powerpoint und zum Layout der Arbeit wird Microsoft Word verwendet. Die Erstellung des Literaturverzeichnisses erfolgt mit EndNote.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der homöostatischen Hämatopoese

CXCR4^{1013/1013}-Tiere im Alter von 8 -12 Wochen wurden mit gleichaltrigen wildtypischen Kontrollen (WT) verglichen. Zunächst wurden die drei hämatopoetischen Organe – Peripherblut, Knochenmark und Milz – in der Homöostase untersucht. Dazu wurde der immunphänotypische Status, die Anzahl der Vorläuferzellen, sowie die Oberflächenexpression von CXCR4 auf verschiedenen unreifen und reifen hämatopoetischen Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die so gewonnenen Daten wurden im späteren Verlauf als Referenzwerte für die nachfolgenden Stressmodelle genutzt.

3.1.1. Bestimmung der Zellularität in der Homöostase

Mit Hilfe der automatischen Hämazytometrie wurden zunächst Differentialblutbilder des Peripherbluts erstellt. Die Leukozytenzahl (WBC) der CXCR4^{1013/1013}-Tiere war im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen um 70,4±2,2% (p < 0,001) reduziert. Diese Reduktion resultierte aus einer Beeinträchtigung aller gemessenen Subpopulationen. Neutrophile waren um 47,5±5,4% (p < 0,001), Lymphozyten um 76,2±1,4% (p < 0,001) und Monozyten um 63,9±3,0% (p < 0,001) vermindert (Abb. 3.1.A). Im Gegensatz zu den Leukozyten konnte kein Einfluss des trunkierten CXCR4-Rezeptors auf die Gesamtzahl der Erythrozyten (RBC) (Abb. 3.1.B links) bzw. die weiteren das rote Blutbild charakterisierenden Parameter Hämoglobinwert (Hb), Hämatokrit (HCT), mittleres Erythrozyteneinzelzellvolumen (MCV) und mittleres Erythrozyteneinzelzell-Hämoglobin (MCH) nachgewiesen werden (Abb. 3.1.C). Die Thrombozyten (PLT) waren ebenfalls unbeeinträchtigt (Abb. 3.1.B rechts).

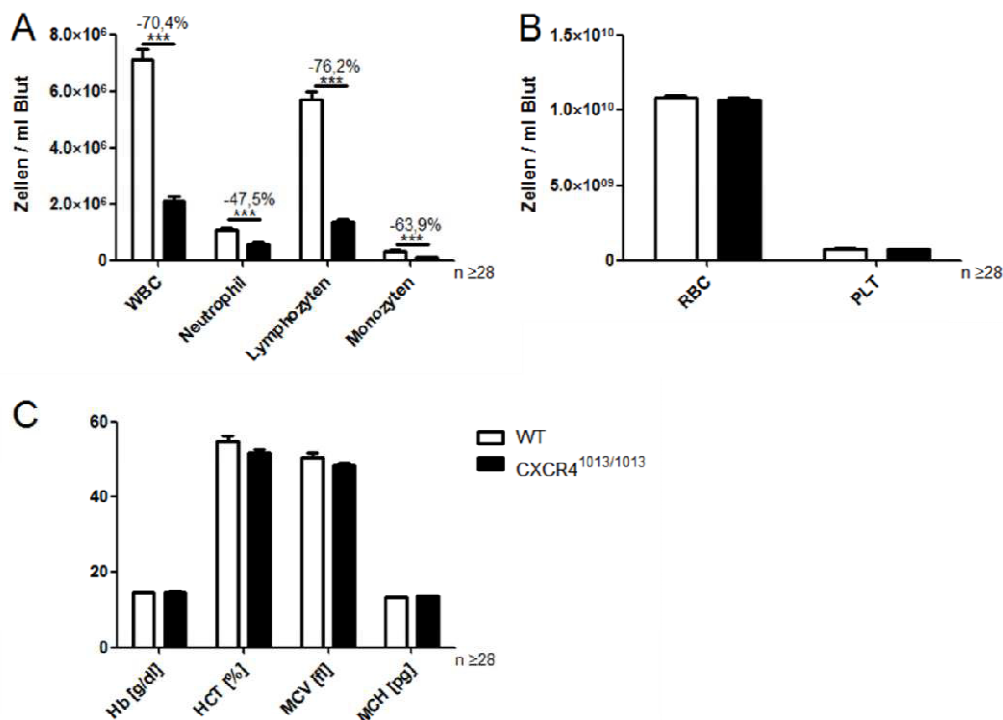


Abbildung 3.1. Blutbild einschl. Differentialblutbild. EDTA-Vollblut wurde mit Hilfe der automatischen Hämazytometrie analysiert. A) Gesamt-Leukozytenzahl (WBC), sowie die Subpopulationen, B) Anzahl der Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT), C) Hämoglobin-Wert (Hb), Hämatokrit (HCT), Mittleres Erythrozyteneinzelzellvolumen (MCV), Mittleres Erythrozyteneinzelzell-Hämoglobin (MCH). Signifikante Unterschiede sind in Prozent zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW±SEM, *** = p<0,001. n ≥ 28.

Zur Bestimmung der Gesamt-Leukozytenzahl im Femur bzw. in der Milz wurde ebenfalls die automatische Hämazytometrie verwendet. Dazu wurden die Femora/Milzen gespült, die Zellen vereinzelt und in einem definierten Volumen aufgenommen, wodurch die Gesamt-Leukozytenzahl pro Femur/Milz berechnet werden konnte. Die Gesamt-Leukozytenzahl im Femur war nicht beeinträchtigt, wohingegen die Milzen der CXCR4^{1013/1013}-Tiere eine im Durchschnitt 49,0±4,4% ($p < 0,001$) niedrigere Zellularität aufwiesen (Abb. 3.2.B). Die Splenomikrie war bereits makroskopisch deutlich zu erkennen.

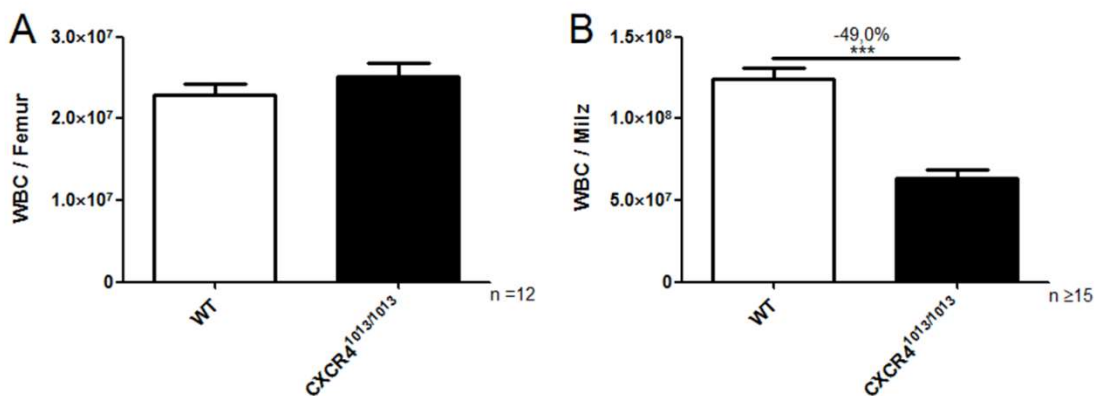


Abbildung 3.2 Gesamt-Leukozytenzahl (WBC) im Femur (A) und in der Milz (B). Signifikante Unterschiede sind in Prozent zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW±SEM,*** = $p < 0,001$. $n \geq 12$.

3.1.2. Immunphänotypische Analyse und CXCR4-Oberflächenexpression in der Homöostase

Die drei untersuchten Organe enthalten eine heterogene Mischung verschiedenster hämatopoetischer Zellen unterschiedlicher Reifezustände. Zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der reifen Zellen wurden die Zellen aus Peripherblut, Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch bezüglich ihres Immunphänotyps untersucht. Dabei wurden B-Zellen (B220⁺), T-Zellen (CD3⁺), Monozyten (CD11b⁺Gr1⁻) und Granulozyten (CD11b⁺Gr1⁺) unterschieden und quantifiziert. Zur Quantifizierung wurde angenommen, dass ein von der automatischen Hämazytometrie erkannter Leukozyt einer CD45⁺-Zelle entspricht (Barbosa et al, 1999).

Im Peripherblut konnte die in Kap. 3.1.1. beschriebene pan-Leukopenie bei CXCR4^{1013/1013}-Tieren bestätigt werden. B-Zellen sind mit 81,7±1,2% ($p < 0,001$) Reduktion im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen besonders schwer betroffen. Dabei muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass es sich bei der B-Zellpopulation der CXCR4^{1013/1013}-Tiere um eine Mischpopulation von reifen und - zumindest phänotypisch - unreifen B-Zellen handelte. Diese wird im Kapitel B-Zell Reifung (Kap. 3.3.) genauer analysiert. Aber auch T-Zellen (65,7±1,2%, $p < 0,001$), Monozyten (69,2±1,7%, $p < 0,001$) und Granulozyten (46,6±8,3%, $p = 0,0102$) sind in CXCR4^{1013/1013}-Tieren signifikant vermindert (Abb. 3.3.A). Im Knochenmark konnten, wie in Kapitel 3.1.1. beschrieben, bezüglich der

reifen Leukozyten-Subpopulationen keine Unterschiede in der Zellularität festgestellt werden (Abb. 3.2.A). Die immunphänotypische Analyse konnte allerdings eine unterschiedliche Subpopulationszusammensetzung zwischen wildtypischen Kontrollen und CXCR4^{1013/1013}-Tieren nachweisen. B-Zellen lagen im Knochenmark um 16,0±4,8% (p = 0,0113) leicht reduziert in den CXCR4^{1013/1013}-Tieren vor. Die Frequenz der anderen untersuchten Subpopulationen war entsprechend leicht, aber statistisch signifikant erhöht. T-Zellen waren um 116,8±26,2% (p = 0,0011), Monozyten um 40,4±9,1% (p < 0,001) und Granulozyten um 14,2±4,7% (p = 0,009) erhöht (Abb. 3.3.B). Die Analyse der Milzleukozyten ergab wiederum eine besonders starke Reduktion der lymphoiden Linien B-Zellen (47,6±1,2%, p < 0,001) und T-Zellen (60,5±2,0%, p < 0,001). Analog zum Peripherblut muss auch in der Milz die oben getätigte Einschränkung beachtet werden, dass es sich bei der B-Zell-Population in den CXCR4^{1013/1013}-Tieren um eine Mischpopulation von phänotypisch „reifen“ und „unreifen“ B-Zellen handelt (vgl. Kap. 3.3.). Die Zahl der splenischen Granulozyten, insgesamt eine weniger frequente Zellreihe in der Milz, war bei CXCR4^{1013/1013}-Tieren um 185,4±42,1% (p < 0,001) erhöht im Vergleich zu wildtypischen Mäusen (Abb. 3.3.C).

Peripherblut, als auch in der Milz, die B-Zellpopulation in den CXCR4^{1013/1013}-Tieren sowohl aus phänotypisch „reifen“ und „unreifen“ B-Zellen bestand. Die CXCR4-Expression der einzelnen B-Zellentwicklungsstufen wird ebenfalls genauer in Kap. 3.3. analysiert.

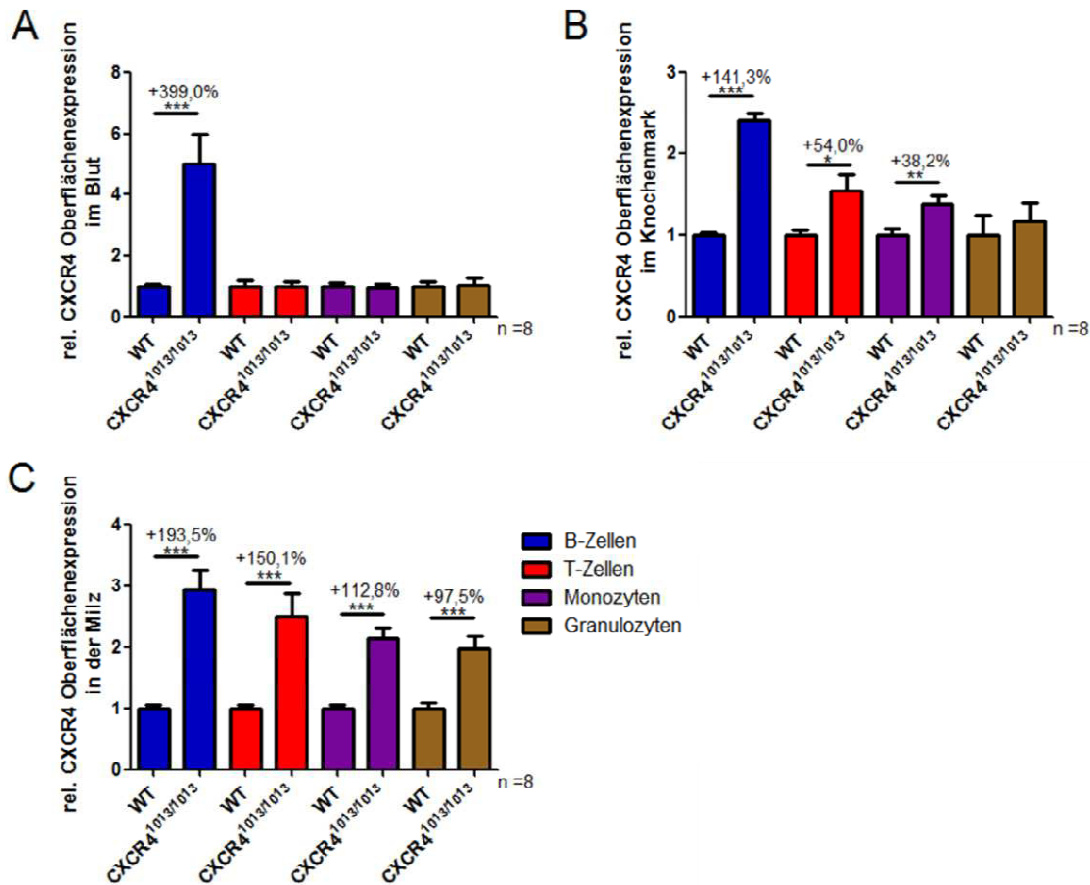


Abbildung 3.4. CXCR4-Oberflächenexpression reifer Blutzelllinien in der Homöostase. Die CXCR4-Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch (FMO kontrolliert) auf unterschiedlichen Leukozytenpopulationen im Peripherblut (A), im Knochenmark (B) und in der Milz (C) analysiert und anschließend auf die wildtypische Kontrolle normalisiert. Signifikante Unterschiedesind in Prozent zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW±SEM, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. n = 8.

3.1.3. Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen in der Homöostase

Zur Bestimmung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in den drei untersuchten Organen wurden zum einen CFU-Assays und zum anderen phänotypische (durchflusszytometrische) Analysen (Knochenmark und Milz) verwendet. Auf eine durchflusszytometrische Analyse des Peripherbluts wurde verzichtet, da Vorläuferzellen in nur sehr geringen Frequenzen zirkulieren. Die erhaltenen Kolonien wurden auf einen Milliliter Blut bzw. pro Femur (ca. 1/16 des Gesamt-Knochenmarks) oder Milz normalisiert. Die durchflusszytometrisch ermittelten Vorläuferzellen wurden auf die Anzahl CD45⁺-Zellen normalisiert.

Analog zu den reduzierten reifen Blutzellen (Kap. 3.1.1. und Kap. 3.1.2.) konnten im Peripherblut mittels CFU-C Assay $67,7 \pm 6,8\%$ ($p < 0,001$) weniger Vorläuferzellen im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle ermittelt werden (Abb. 3.5.A). Das Knochenmark war - ebenfalls analog zu Kap. 3.1.1. - unauffällig hinsichtlich des Gehalts an hämatopoetischen Vorläuferzellen (Abb. 3.5.B). In der Milz konnte bezüglich der absoluten Vorläuferzahl pro Milz lediglich ein Trend zu einer Erhöhung in den CXCR4^{1013/1013}-Tieren detektiert werden ($p = 0,056$) (Abb. 3.5.C). Wird allerdings die Frequenz unreifer pro Gesamt-Leukozyten betrachtet, so ergibt sich bei CXCR4^{1013/1013}-Mäusen infolge der verringerten Zellularität (vgl Abb. 3.2.B) eine um $205,6 \pm 33,0\%$ ($p < 0,001$) erhöhte Vorläuferzell-Frequenz im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen (Abb. 3.5.D).

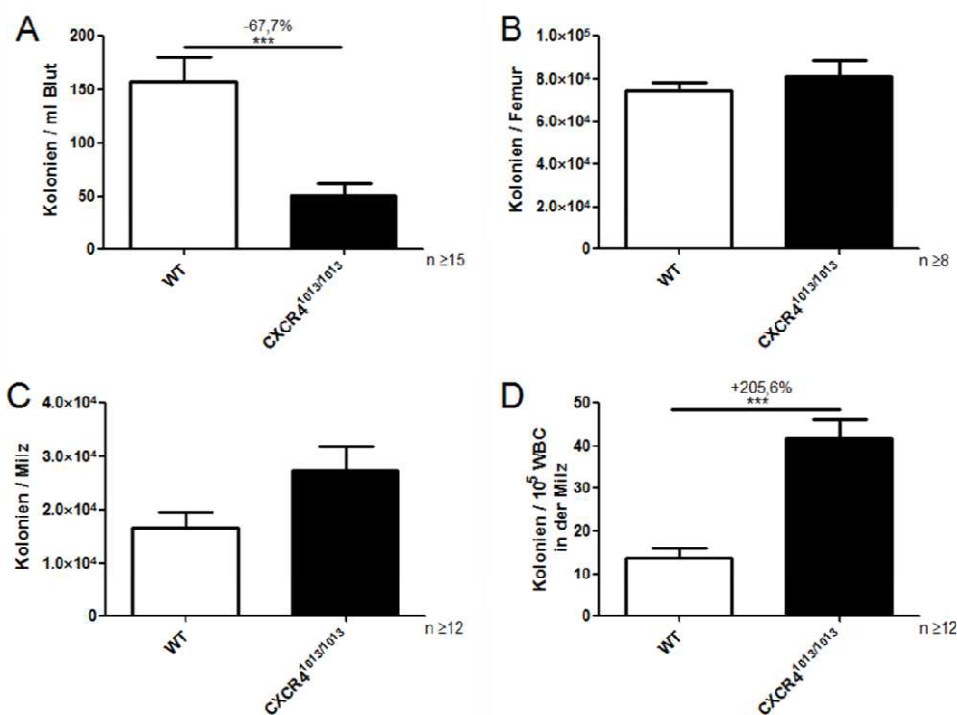


Abbildung 3.5. Hämatopoetische Vorläuferzellen im CFU-Assay in der Homöostase. Ein definiertes Volumen EDTA-Vollblut (A) bzw. eine definierte Zellzahl aus dem Knochenmark (B) oder aus der Milz (C) wurde in Zytokin-haltiger Methylzellulose ausplattiert. Nach 6-8 Tagen Inkubation wurde die Koloniezahl bestimmt und auf einen Milliliter Blut bzw. pro Femur oder Milz hochgerechnet. (D) Berechnung der Frequenz hämatopoetischer Vorläufer pro 10^5 WBC. Signifikante Unterschiede sind in Prozent zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW \pm SEM, *** = $p < 0,001$. $n \geq 8$.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Vorläuferzellen wurden zum einen LSK-Zellen (Lineage⁻, Sca-1⁺, cKit⁺), sowie HSC-Zellen (zusätzlich CD48⁻, CD150⁺) gefärbt. Als Referenzmarker wurde wiederum CD45 verwendet, um die Frequenz zu berechnen. Die durchflusszytometrische Analyse der Vorläufer konnte die Ergebnisse der CFU-Assays bestätigen. Im Knochenmark konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen wildtypischen und CXCR4^{1013/1013}-Tieren festgestellt werden (Abb. 3.6.A). In der Milz wurde eine um 329,2±50,0% (p < 0,001) erhöhte LSK-Frequenz, sowie eine um 354,5±112,5% (p = 0,015) erhöhte HSC-Frequenz detektiert (Abb. 3.6.B).

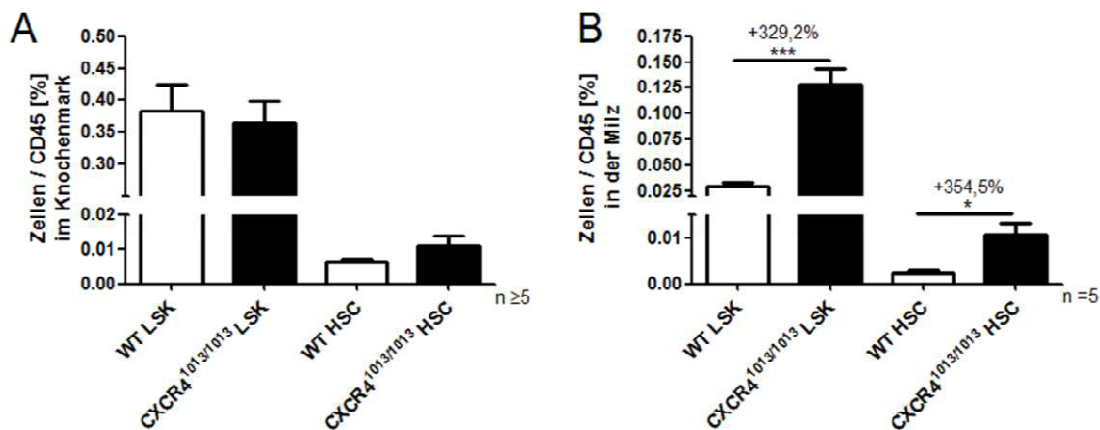


Abbildung 3.6. Durchflusszytometrische Bestimmung hämatopoetischer Vorläuferzellen in der Homöostase. LSK (Lineage⁻, Sca-1⁺, cKit⁺)- und HSC (LSK, CD48⁻, CD150⁺)-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert und enumeriert. Als Referenz wurde der pan-Leukozytenmarker CD45 verwendet. Signifikante Unterschiede sind in Prozent zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW±SEM, * = p < 0,05, *** = p < 0,001. n ≥ 5.

Analog zu den reifen Zellen wurde auch auf den hämatopoetischen Vorläufern die CXCR4-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch analysiert. Dabei konnte lediglich in der LSK-Population im Knochenmark eine Erhöhung der CXCR4-Oberflächenexpression von 14,6±3,0% (p = 0,008) in CXCR4^{1013/1013}-Tieren gemessen werden (Abb. 3.7.A). Weder die HSC-Population im Knochenmark (Abb. 3.7.A) noch die entsprechenden Populationen in der Milz (Abb. 3.7.B) wiesen weitere signifikante Änderungen auf.

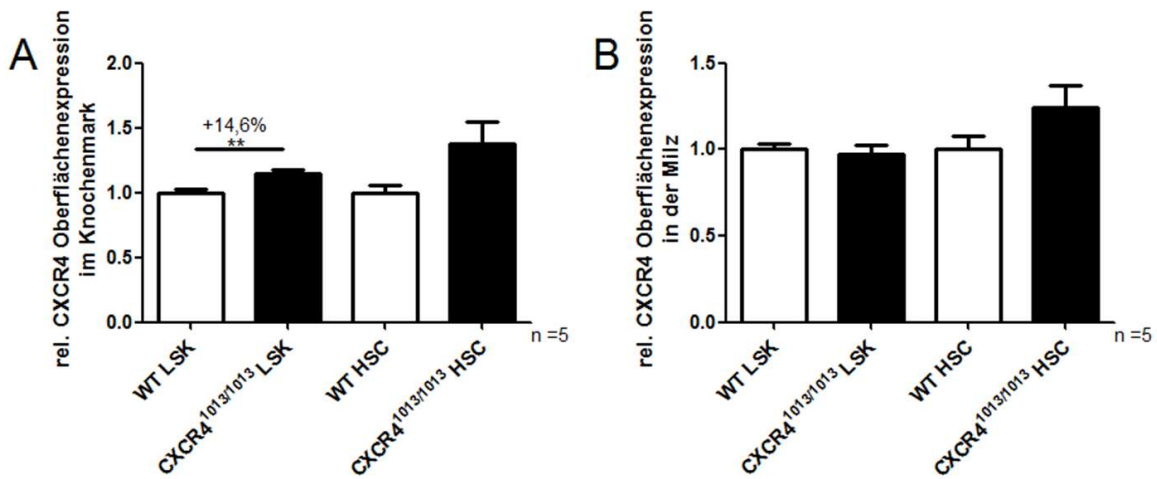


Abbildung 3.7. CXCR4-Oberflächenexpression auf hämatopoetischen Vorläufern in der Homöostase. Die CXCR4-Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch (FMO-kontrolliert) auf LSK(Lineage⁻, Sca-1⁺, cKit⁺)- und HSC(LSK, CD48⁻, CD150⁺)-Zellen im Knochenmark (A) und in der Milz (B) analysiert und anschließend auf die wildtypischen Kontrollen normalisiert. Signifikante Unterschiede sind in Prozent zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW±SEM, ** = p < 0,01. n = 5.

Die durchflusszytometrisch ermittelte höhere Oberflächenexpression von CXCR4 auf LSK-Zellen im Knochenmark führte zu der Frage, ob diese durch eine erhöhte Proteinexpression oder z.B. durch den für das trunkierte CXCR4 beschriebenen Internalisierungsdefekt (Balabanian et al, 2005) zustande kommt. Zur Klärung wurde die CXCR4-cRNA mittels Reverse-Transkriptase-Echtzeit-PCR (qPCR) in Lineage-depletierten und cKit-angereicherten Knochenmarkzellen quantifiziert. Als Referenz wurde Rpl13a cRNA verwendet. Die qPCR konnte die erhöhte CXCR4-Expression in CXCR4^{1013/1013}-Zellen bestätigen. Allerdings liegt die durch die qPCR um 71,6±25,0% (p = 0,0300) erhöhte CXCR4-Expression deutlich über der durchflusszytometrisch bestimmten, um nur 14,6±3,0% erhöhten Oberflächenexpression von CXCR4 (Abb. 3.8.).

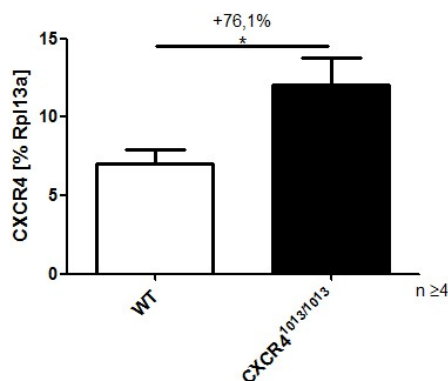


Abbildung 3.8. qPCR-Analyse der CXCR4-Expression unreifer Zellen in der Homöostase. Die CXCR4-Expression wurde in Lineage-depletierten, cKit-angereicherten Knochenmarkzellen mittels qPCR analysiert. Signifikante Unterschiede sind in Prozent zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW±SEM, * = p < 0,05. n ≥ 4.

3.1.4. Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklus-Aktivität wurde mit Hilfe des intrazellulären Proteins Ki-67 und des Ploidiegrads (durch einen DNA-Farbstoff, 7-AAD) bestimmt. Ki-67 wird erst in der G1-Phase exprimiert (Gerdes et al, 1984), so dass die G0-Phase durch Ki-67⁻ und einen zweifachen Chromosomensatz (2n) definiert ist. Die G1-Phase ist entsprechend durch Ki-67⁺ 2n und die G2/S/M-Phasen durch Ki-67⁺ 2 < n < 4 beschrieben. Der Zellzyklusstatus wurde in LSK⁻, Lin^{low}- und Lin⁺-Zellen in wildtypischen Kontrollen und CXCR4^{1013/1013}-Zellen analysiert.

Im Knochenmark konnte bezüglich der Zellzyklus-Aktivität in LSK⁻ (Abb. 3.9.A), sowie in Lin⁺-Zellen kein Unterschied zwischen wildtypischen Kontrollen und CXCR4^{1013/1013}-Tieren festgestellt werden. Lediglich in der Lin^{low}-Zellpopulation war der Anteil quieszenter Zellen (G0) bei CXCR4^{1013/1013}-Zellen signifikant erhöht (p < 0,001), Zellen in der G1-Phase entsprechend vermindert (p = 0,005) (Abb. 3.9.B).

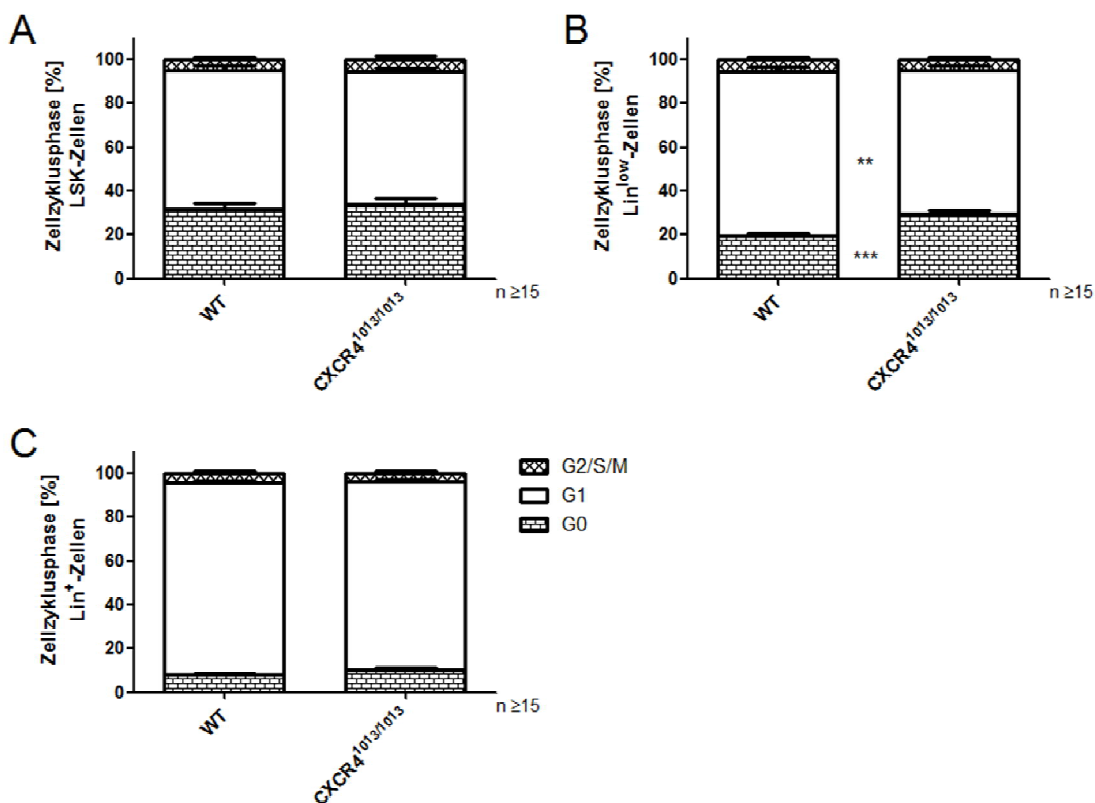


Abbildung 3.9. Zellzyklusanalyse in Knochenmarkzellen in der Homöostase. LSK⁻ (A), Lin^{low}- (B) und Lin⁺-Zellen (C) wurden durch eine Oberflächenfärbung markiert. Die Zellzyklusphasen konnten durch eine intrazelluläre Färbung des Ki-67 Proteins und der DNA durch 7-AAD unterschieden werden. MW±SEM, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. n ≥ 15.

Während sich die Zellzyklus-Aktivität im Knochenmark zwischen CXCR4^{1013/1013}-Tieren und den wildtypischen Kontrollen sehr ähnlich verhielt, konnten deutliche, möglicherweise kompensatorische, Unterschiede in der Milz detektiert werden: In allen untersuchten Subpopulationen konnte eine gesteigerte Zellzyklusaktivität der jeweiligen CXCR4^{1013/1013}-Zellen beobachtet werden. Die CXCR4^{1013/1013}-Zellen konnten vermehrt in der G1-Phase (LSK: p = 0,001; Lin^{low}: p < 0,001; Lin⁺: p < 0,001) und in den G2/S/M-Phasen (LSK: p = 0,005; Lin^{low}: p = 0,011; Lin⁺: p = 0,009) detektiert werden. Dazu korrespondierend lagen CXCR4^{1013/1013}-Zellen vermindert in der G0-Phase (LSK: p < 0,001; Lin^{low}: p < 0,001; Lin⁺: p < 0,001) im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen vor (Abb. 3.10.).

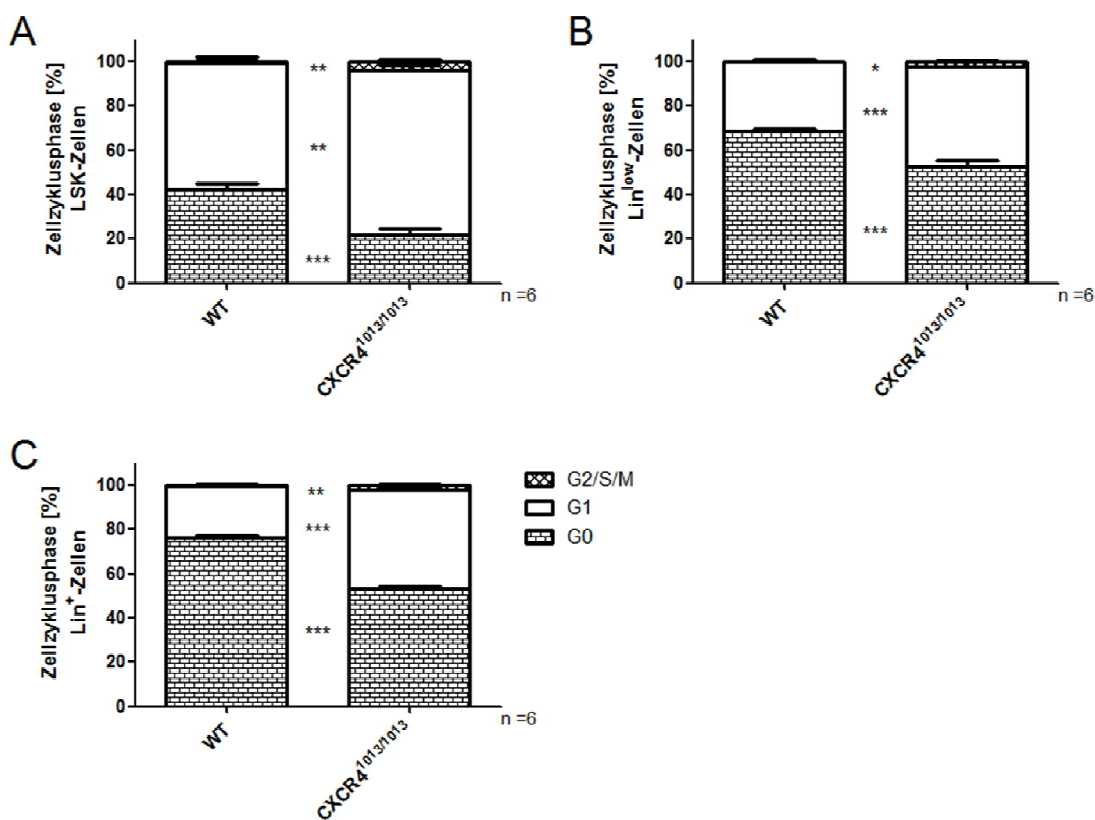


Abbildung 3.10. Zellzyklusanalyse in Milzzellen in der Homöostase. LSK- (A), Lin^{low}- (B) und Lin⁺-Zellen (C) wurden durch eine Oberflächenfärbung markiert. Die Zellzyklusphasen konnten durch eine intrazelluläre Färbung des Ki-67 Proteins und der DNA durch 7-AAD unterschieden werden. MW±SEM, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. n = 6.

3.1.5. CXCL12 Konzentrationsbestimmung

Zur vollständigen Beurteilung der CXCR4/CXCL12-Achse wurden CXCL12 Spiegel in Knochenmarkflüssigkeit (BMFL) und Plasma mit Hilfe eines kommerziellen ELISA untersucht. Die ermittelten Werte wurden anschließend auf das Gesamtprotein der entsprechenden Probe normalisiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen im Plasma festgestellt werden. In der Knochenmarkflüssigkeit von CXCR4^{1013/1013}-Tieren wurde ein um 133,3±13,2% ($p < 0,001$) erhöhter CXCL12 Spiegel detektiert. In der Milz konnte ebenfalls ein signifikant erhöhter CXCL12-Spiegel um 48,0±10,4% ($p = 0,003$) in den CXCR4^{1013/1013}-Tieren nachgewiesen werden (Abb. 3.11.). Auch hier gilt zu beachten (vgl. Abb. 3.2.B), dass die Milzen von CXCR4^{1013/1013}-Tiere einen um ca. die Hälfte niedrigere Zellularität als die Milzen wildtypischer Kontrollen aufwiesen.

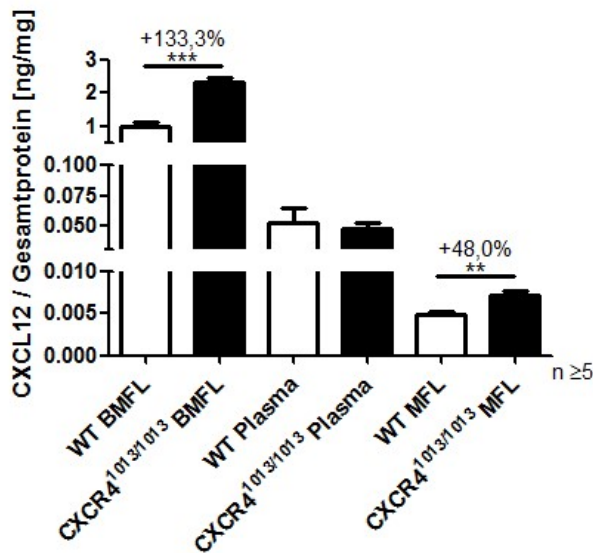


Abbildung 3.11. CXCL12 Konzentrationsbestimmung in der Homöostase. CXCL12 Spiegel wurden in Knochenmarkflüssigkeit (BMFL), im Plasma und in Milzflüssigkeit (MFL) mittels ELISA bestimmt und auf das Gesamtprotein normalisiert. Gesamtprotein wurde colorimetrisch bestimmt. Signifikante Unterschiede sind prozentual zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW±SEM, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. $n \geq 5$.

3.1.6. Zirkadiane Rhythmik

In der Literatur ist ein Einfluss von CXCR4 auf die zirkadiane Oszillation der Anzahl reifer und unreifer Blutzellen im Blut beschrieben. Serielle Analysen zeigen, dass Mäuse ein Tagesmaximum in Bezug auf zirkulierende Leukozyten im Peripherblut ca. 2 Stunden nach Sonnenaufgang und ein Tagesminimum ca. 2 Stunden nach Sonnenuntergang aufweisen (Lucas et al, 2008). Dies wurde in CXCR4^{1013/1013}-Tieren getestet. Es konnte gezeigt werden, dass trotz der deutlichen Leukopenie in CXCR4^{1013/1013}-Tieren morgens ca. viermal so viele zirkulierende Leukozyten detektiert werden konnten, wie abends ($p = 0,016$). Die wildtypischen Kontrollen verhielten sich analog ($p < 0,001$) (Abb. 3.12.).

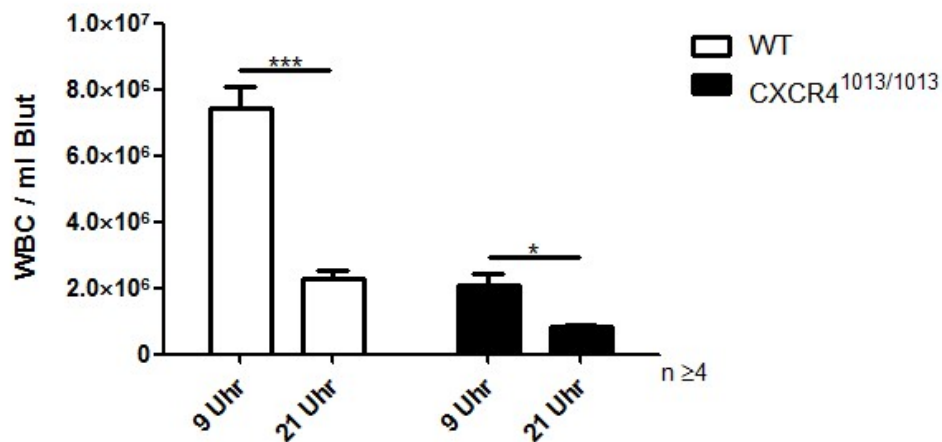


Abbildung 3.12. Zirkadiane Rhythmik zirkulierender Leukozyten. Den Tieren wurde zu den indizierten Zeitpunkten Blut entnommen und die Gesamt-Leukozytenzahl mit Hilfe der automatischen Hämazytometrie bestimmt. MW±SEM; * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$. $n \geq 4$.

3.2. Funktionelle Analysen des trunkierten CXCR4-Rezeptors

Zur Überprüfung der Funktionalität des trunkierten Rezeptors wurden Systeme verwendet, deren Aussagen sich direkt mit der Rezeptorfunktionalität korrelieren lassen. Es wurden die gerichtete Migration hämatopoetischer Vorläuferzellen gegen einen CXCL12-Gradienten untersucht, sowie die F-Aktin Polymerisierung nach CXCL12-Stimulation in einer unreifen Knochenmarkpopulation und die Aktivierung des MAPK-Signalweges am Beispiel der Erk-Phosphorylierung.

3.2.1. Migrationsexperimente

Knochenmarkzellen wurden gegen einen CXCL12-Gradienten (100 ng/ μ l) über 4 Stunden in einem Transwell-Assay inkubiert. Anschließend wurden die Zellen der unteren Kammer resuspendiert und in Zytokin-haltige Methylzellulose ausplattiert. Dadurch sollte die Migrationsfähigkeit hämatopoetischer Vorläuferzellen untersucht werden. Nach einer Woche wurden die Kolonien gezählt und auf die Gesamtzahl der eingesetzten hämatopoetischen Vorläufer normalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass Vorläuferzellen von CXCR4^{1013/1013}-Tieren deutlich stärker (193,5 \pm 39,0%, $p < 0,001$) gegen einen CXCL12-Gradienten migrieren als die Zellen wildtypischer Kontrollen (Abb. 3.13.).

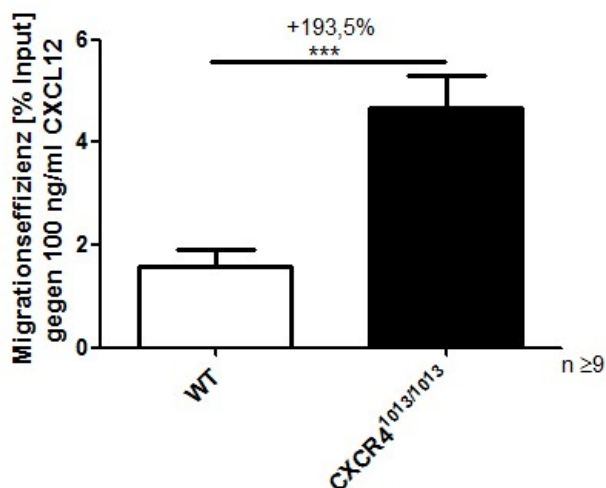


Abbildung 3.13. Migrationsassay von Knochenmarkzellen. Das Migrationspotential hämatopoetischer Vorläuferzellen wurde mit Hilfe eines Transwell-Assays (5 μ m Porengröße) gegen einen 100 ng/ml CXCL12-Gradienten bestimmt. Erhaltene CFU-C wurden anschließend auf Prozent eingesetzte CFU-C normalisiert (% Input). Signifikante Unterschiede sind in Prozent zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW \pm SEM, *** = $p < 0,001$. $n \geq 9$.

3.2.2. F-Aktin Polymerisierung

Die F-Aktin Polymerisierung ist essentiell für die Motilität von Zellen und einer der ersten Schritte nach der Aktivierung von CXCR4 durch seinen Liganden CXCL12 (Howard & Meyer, 1984). cKit-angereicherte Zellen wurden mit CXCL12 (100 ng/μl) inkubiert und zu den indizierten Zeitpunkten Proben genommen und fixiert. Nach Permeabilisierung der Zellen wurden die F-Aktin-Filamente mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin - dem Gift des Knollenblätterpilzes - angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass wildtypische und CXCR4^{1013/1013}-Zellen ein Maximum an Filamentbildung nach ca. 10 - 20 Sekunden erreichen, aber dann entsprechend abfallen. Allerdings zeigten die CXCR4^{1013/1013}-Zellen ein signifikant höheres Maximum (p = 0,045) und wiesen auch eine verzögerte F-Aktin-Filament Rückbildungskinetik auf (30 sec: p = 0,003, 60 sec: p = 0,007, 300 sec: p = 0,003) (Abb. 3.14.).

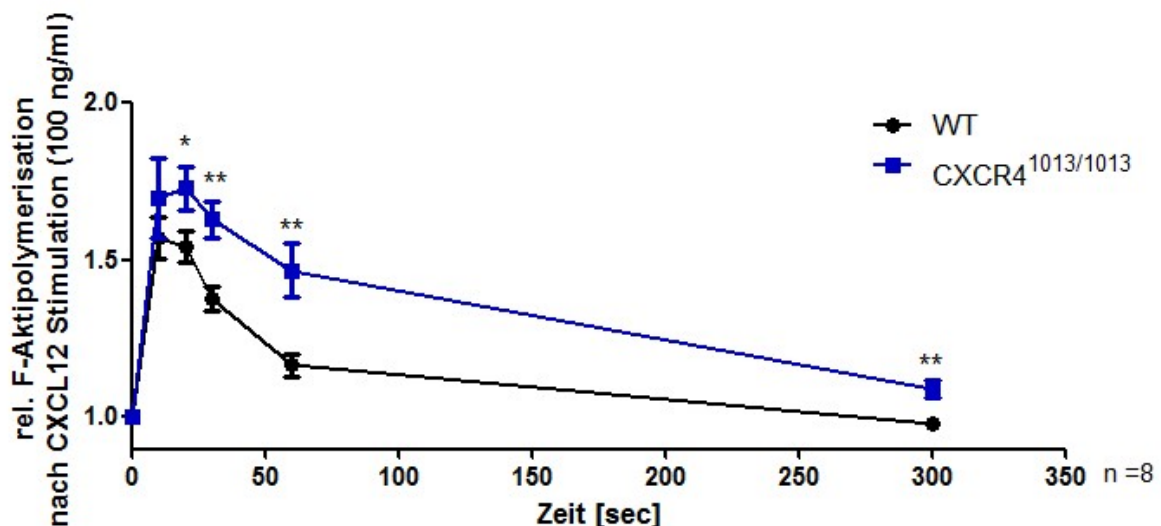


Abbildung 3.14. F-Aktin Polymerisierung unreifer Knochenmarkzellen nach CXCL12-Stimulation. cKit-angereicherte Zellen wurden mit 100 ng/μl CXCL12 behandelt und zu den indizierten Zeitpunkten Proben genommen und fixiert. Nach Phalloidin-Färbung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. MW±SEM, * = p < 0,05, ** = p < 0,01. n = 8.

3.2.3. Aktivierung des MAPK-Signalwegs nach CXCL12-Stimulation

Die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch CXCL12-Stimulation wurde beispielhaft durch die Phosphorylierung von Erk1/2 untersucht. Wiederrum wurden cKit-angereicherte Zellen mit 100 ng/ml CXCL12 stimuliert und zu den indizierten Zeitpunkten Proben genommen, die Zellen lysiert und die phospho-Erk- und Erk-Proteinmenge durch einen Westerblot bestimmt. In Abb. 3.15.A wurden beispielhafte Westernblots abgebildet. Aufgrund großer Schwankungen der Einzelmessungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen CXCR4^{1013/1013}-Zellen und den wildtypischen Kontrollzellen detektiert werden. Allerdings war ein deutlicher Trend für eine Überaktivierung der CXCR4^{1013/1013}-Zellen zu erkennen (Abb. 3.15.B).

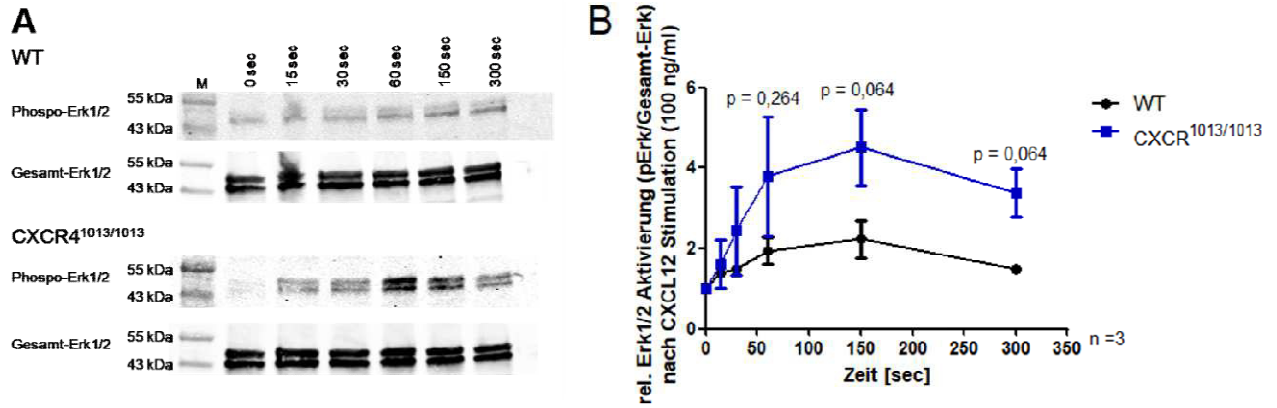


Abbildung 3.15. Erk-Aktivierung nach CXCL12-Stimulation in unreifen Knochenmarkzellen. cKit-angereicherte Zellen wurden mit 100 ng/ml CXCL12 stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und die phospho- und Gesamt-Erk-Proteinmenge mit einem Westernblot bestimmt. In A) sind repräsentative Beispielblots abgebildet für wildtypische Zellen (oben) und CXCR4^{1013/1013}-Zellen (unten), in B) die Quantifizierung der Ergebnisse. MW±SEM. M = Marker. n = 3.

3.3. B-Zell Reifung und Funktionalität

3.3.1. Analyse der B-Zellreifung

Wie in Kap. 3.1.1. erwähnt, wurde in durchflusszytometrischen Analysen in der B-Zellpopulation der CXCR4^{1013/1013}-Tiere eine auffällige Mischung von phänotypisch reifen und unreifen Zellen im Peripherblut und in der Milz nachgewiesen. Im Knochenmark hingegen trat diese Mischpopulation in beiden untersuchten Genotypen auf. Diese B220^{dim}-Population wurde als "unreife" B-Zellen (Montecino-Rodriguez et al, 2006) beschrieben, aus welchen im Knochenmark "reife" B-Zellen entstehen. In Abb. 3.16. sind repräsentative Beispiele der durchflusszytometrischen Analyse dargestellt und in Tab. 3.1. werden die Ergebnisse der Messungen von wildtypischen Kontrollen und CXCR4^{1013/1013}-Tieren quantitativ gegenübergestellt. Aus der Tabelle kann entnommen werden, dass diese "unreife" B-Zellpopulation im Blut und in der Milz jeweils ca. die Hälfte der jeweiligen B-Zellpopulation in CXCR4^{1013/1013}-Tieren darstellt (Blut: 45,3±4,0%, Milz 46,4±3,3%), während sie in den wildtypischen Kontrollen nur jeweils zu ca. 10% vertreten war. Im Knochenmark hingegen zeigte sich, dass die B220^{dim}-Population in den wildtypischen Kontrollen einen Großteil der B-Zellpopulation ausmachte (74,2±3,1%), während in CXCR4^{1013/1013}-Tieren nur ca. die Hälfte (56,7±1,2%) der B-Zellpopulation aus B220^{dim}-Zellen bestand.

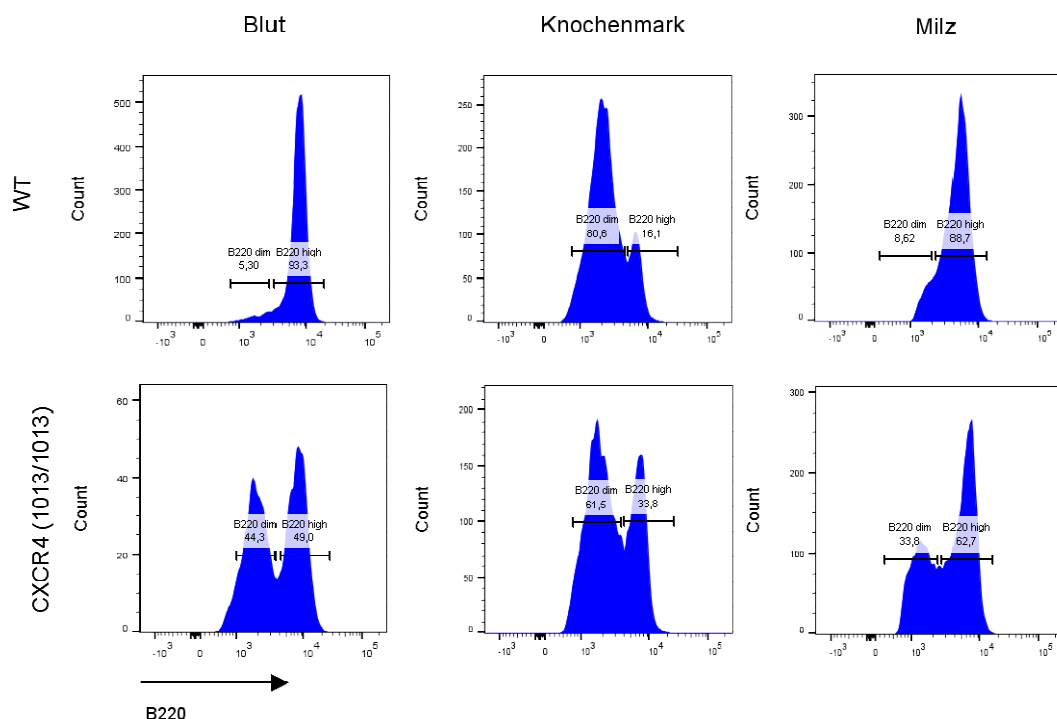


Abbildung 3.16. Repräsentatives Beispiel für die detektierte B220^{dim} B-Zellpopulation in den drei untersuchten Organen. Nach einem lebend/tot Ausschluss, einem morphologischen Gate und Dubletten Ausschluss wurde auf CD45⁺-Zellen und anschließend auf B220⁺ gated.

Tabelle 3.1. Prozentuale Verteilung zwischen der B220^{dim}- und B220^{high} B-Zellpopulation in den drei untersuchten Organen. MW in % ± SEM. n =5.

	Blut		Knochenmark		Milz	
	B220 ^{dim}	B220 ^{high}	B220 ^{dim}	B220 ^{high}	B220 ^{dim}	B220 ^{high}
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
WT	11,0±1,2	89,0±1,2	74,2±3,1	25,8±3,1	8,2±0,6	91,8±0,6
CXCR4 ^{1013/1013}	45,3±4,0	54,7±4,0	56,7±1,2	43,3±1,1	46,4±3,3	53,6±3,3

Um eine reale Verteilung der unterschiedlichen B-Zellpopulationen darzustellen wurden mit Hilfe der in Kap. 3.1.2. bestimmten B-Zellwerte absolute Werte für die B220^{dim}- und B220^{high}-Population in den drei untersuchten Organen errechnet. Die Anzahl an B220^{dim}-Zellen in CXCR4^{1013/1013}-Tieren unterscheidet sich nicht von denen in wildtypischen Kontrollen. Der in Kap. 3.1.2. dargestellte Verlust von etwa 80% der B-Zellen im Peripherblut resultierte ausschließlich aus dem Verlust von phänotypisch reifen B220^{high}-Zellen ($p < 0,001$) (Abb. 3.17.A). Im Knochenmark lagen B220^{dim}-Zellen in CXCR4^{1013/1013}-Tieren signifikant reduziert vor ($p < 0,001$), während vermehrt B220^{high}-Zellen im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen detektiert werden konnten ($p = 0,014$) (Abb. 3.17.B). In der Milz wurde eine vergleichbare Verteilung wie im Peripherblut nachgewiesen. Splenische B220^{high} Zellen lagen in den CXCR4^{1013/1013}-Tieren in verringerten Maßen vor ($p < 0,001$), allerdings wurden - im Gegensatz zum Peripherblut - vermehrt B220^{dim}-Zellen nachgewiesen ($p < 0,001$) (Abb. 3.17.C).

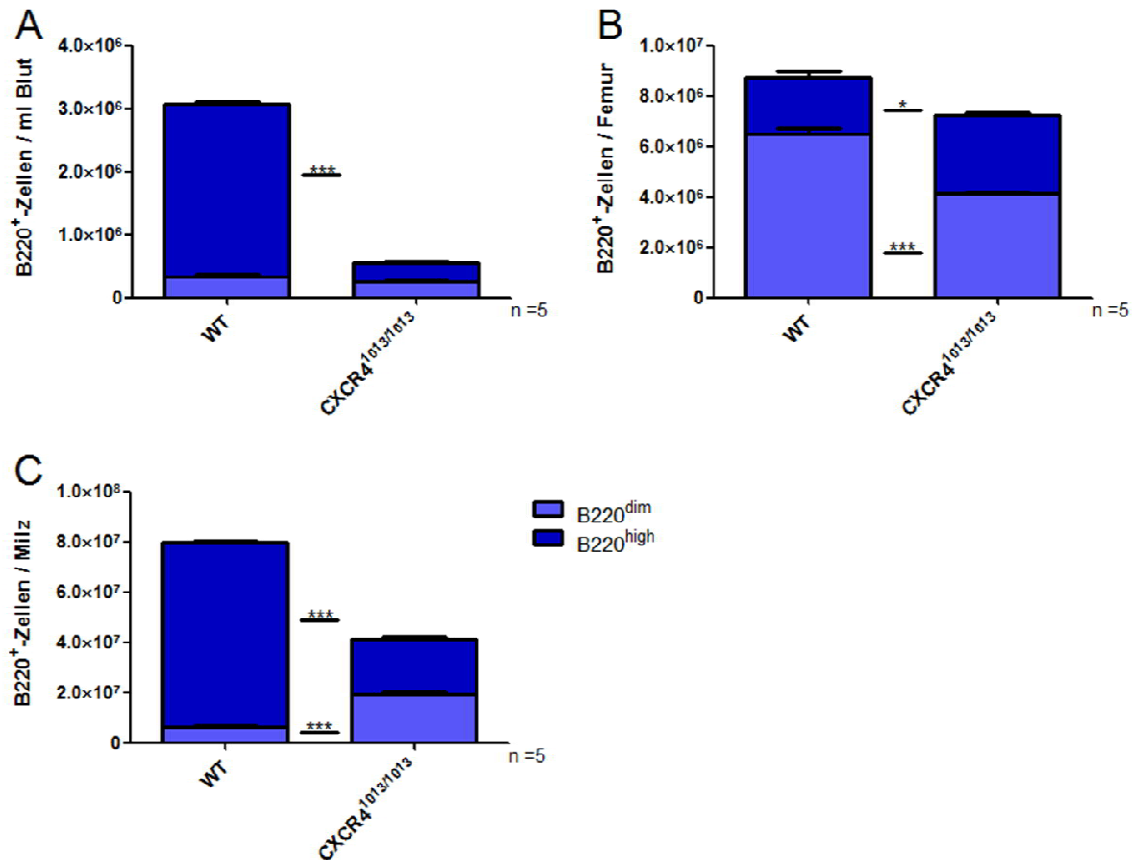
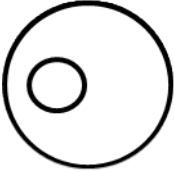
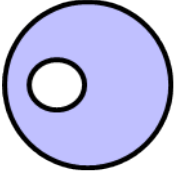
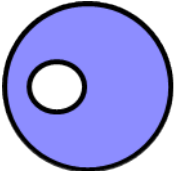

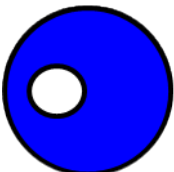
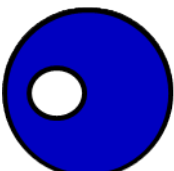


Abbildung 3.17. Verteilung zwischen B220^{dim} und B220^{high} Populationen in den drei untersuchten Organen. Nach einem lebend/tot Ausschluss, morphologischem Gate und Dubletten Ausschluss wurde auf CD45⁺ und B220⁺-Zellen gategatet. Die prozentuale Verteilung wurde auf die in Kap. 3.1.2 errechneten Gesamtzellzahlen hochgerechnet. MW±SEM, * = p < 0,05, *** = p < 0,001. n = 5.

Zur weiteren Differenzierung der B-Zellreifung wurde eine durchflusszytometrische Analyse aus der Broschüre "B-Cell research - Flow cytometry tools for the study of B-cell biology"¹ von Becton Dickinson adaptiert. Durch die Kombination von Oberflächenmarkern können unterschiedliche Reifestadien der B-Zellen differenziert werden. PreproB -Zellen werden als CD43⁺CD24⁻, preB/proB als CD43⁻CD24⁺IgM⁻IgD⁻, unreife B-Zellen als CD43⁻CD24⁺IgM^{dim}IgD⁻, transitionale B-Zellen als CD43⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁻, ein frühes B-Zellreifestadium als CD43⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁺ und ein spätes B-Zellreifestadium als CD43⁻CD24⁺IgM^{dim/low}IgD⁺ definiert (Allman et al, 2001; Hardy et al, 1991) (Tab.3.2.). Zur Berechnung der absoluten Werte wurden wie zuvor beschrieben die absoluten Zahlen aus der Bestimmung des Immunphänotyps zu Grunde gelegt (Kap. 3.1.2).

¹ https://wwwbdbiosciences.com/documents/Bcell_Brochure.pdf, zuletzt abgerufen am 30.01.2019

Tabelle 3.2. Markerkombinationen der unterschiedlichen B-Zellsubpopulationen

	Population	Markerkombination
	PrePro B	CD43 ⁺ CD24 ⁻
	preB/proB	CD43 ^{-/+} CD24 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻
	Unreife B-Zellen	CD43 ⁻ CD24 ⁺ IgM ^{dim} IgD ⁻
	Transitionale B-Zellen	CD43 ⁻ CD24 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻
	frühes B-Zellreifestadium	CD43 ⁻ CD24 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺
	spätes B-Zellreifestadium	CD43 ⁻ CD24 ⁺ IgM ^{dim/low} IgD ⁺

Im Peripherblut lagen die frühen PrePro B-Zellen um 28,1±6,6% (p = 0,025) leicht reduziert vor, im Gegensatz zu den preB/proB-Zellen, welche um 765,3±95,1% (p < 0,001) erhöht zu den wildtypischen Kontrollen vorlagen. Mit zunehmender Reife der B-Zellen manifestierte sich anschließend die Reduktion der "reifen" Zellen, wie sie ebenfalls in Abb. 3.16. dargestellt ist. Waren die unreifen B-Zellen lediglich um 36,1±5,1% (p = 0,045) reduziert, war der Anteil an transitionalen B-Zellen schon um 82,4±2,8% (p = 0,001) und die frühen und späten B-Zellreifestadien um 90,6±2,3% (p < 0,001) bzw. 90,5±1,3% (p < 0,001) reduziert in den CXCR4^{1013/1013}-Tieren (Abb. 3.18.A). Auch im Knochenmark

konnten die Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten weitgehend verifiziert werden. Während die unreiferen Zellen - mit Ausnahme der PreproB-Zellen, welche um $30,8 \pm 9,8\%$ ($p = 0,034$) vermehrt detektiert werden konnten - reduziert vorlagen (preB/proB: $37,2 \pm 6,1\%$ ($p = 0,003$), unreife B-Zellen: $45,9 \pm 2,1\%$ ($p < 0,001$), transitionale B-Zellen: $37,5 \pm 4,2\%$ ($p < 0,001$)), konnten in dem frühen und späten B-Zellreifestadium keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abb. 3.18.B). Die Ergebnisse der Milz (Abb. 3.18.C) stellen eine Kombination der Ergebnisse des Peripherblutes und des Knochenmarks dar. Die Reduktion der PrePro B-Zellen um $59,5 \pm 3,0\%$ ($p < 0,001$) und eine Erhöhung der preB/proB-Population um $151,3 \pm 37,6\%$ ($p = 0,012$) konnte ebenfalls ähnlich im Knochenmark gemessen werden. Die Reduktion des frühen und späten B-Zellreifestadiums um $52,3 \pm 4,0\%$ ($p < 0,001$) bzw. $66,4 \pm 2,5\%$ ($p < 0,001$) fand ich so auch im Peripherblut.

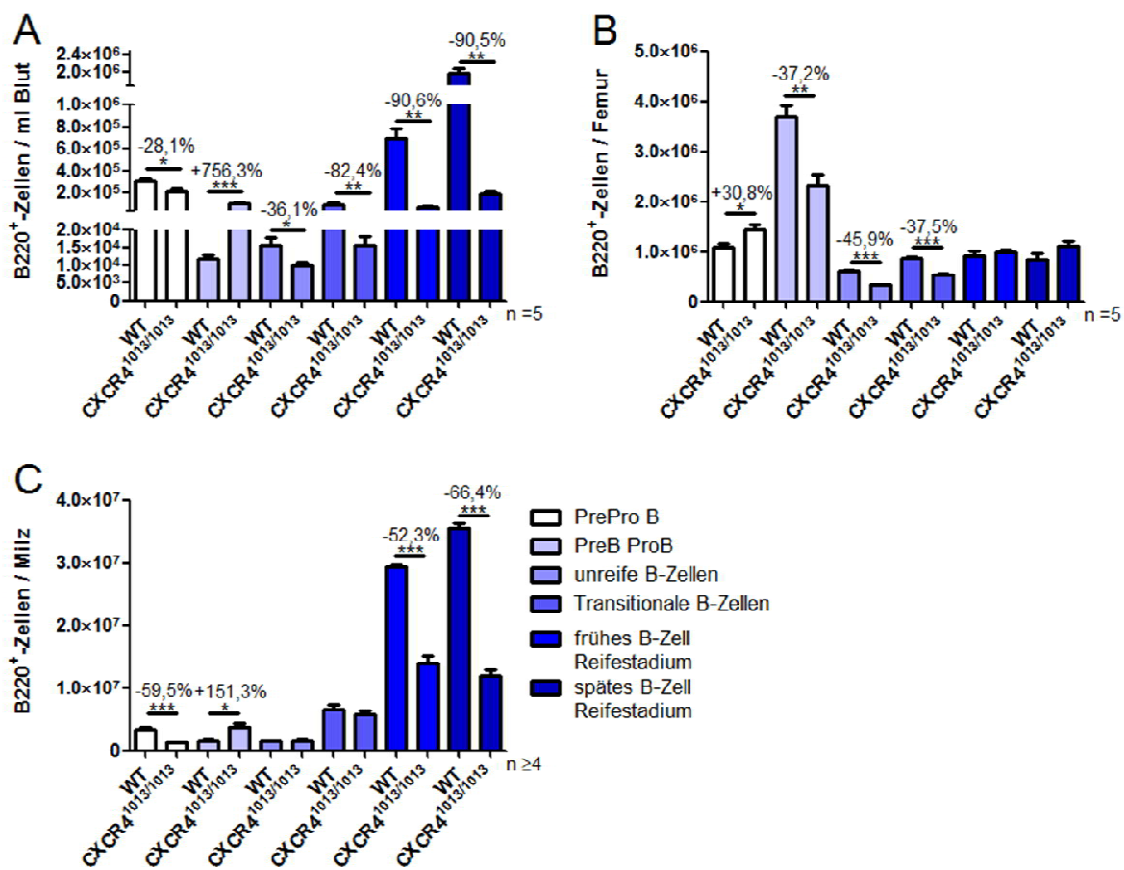


Abbildung 3.18. B-Zellreifungsanalyse. B-Zellen wurden als CD45⁺B220⁺ im Blut (A), im Knochenmark (B) und in der Milz (C) definiert. Anschließend wurden die Subpopulationen wie folgt definiert: PreProB-Zellen: CD43⁺CD24⁻, PreB/ProB-Zellen: CD43^{-/+} CD24⁺IgM⁻IgD⁻, unreife B-Zellen CD43⁻ CD24⁺IgM^{dim}IgD⁻, transitionale B-Zellen: CD43⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁻, ein frühes B-Zellreifestadium: CD43⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁺, ein spätes B-Zellreifestadium: CD43⁻CD24⁺IgM^{dim/low}IgD⁺. Die prozentuale Verteilung wurde auf die in Kap. 3.1.2. bestimmte Gesamt-B-Zellzahl hochgerechnet. Signifikante Unterschiede sind prozentual zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW±SEM, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. $n \geq 4$.

Da der CXCR4/CXCL12 Signalweg entscheidend für die Entwicklung von B-Zellen ist (Ma et al, 1998; Nagasawa et al, 1996) wurde die Oberflächenexpression von CXCR4 auf den verschiedenen B-Zellreifestadien durchflusszytometrisch analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte auf die wildtypischen Kontrollen normalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die CXCR4-Oberflächenexpression fast ausschließlich in den unreifen B-Zellentwicklungsstadien in CXCR4^{1013/1013}-Tieren erhöht ist. Die einzige Ausnahme konnte im frühen B-Zellreifestadium in der Milz mit einer Erhöhung um 83,2±28,9% (p = 0,044) im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen gezeigt werden (Abb. 3.19.C). Im Besonderen auf der preB/proB-Zellpopulation konnte CXCR4 massiv erhöht in allen drei untersuchten Organen nachgewiesen werden (Blut: 752,2±75,2% (p < 0,001), Knochenmark: 522,4±19,6% (p < 0,001), Milz: 1144,4±229,4% (p = 0,003)). Die PrePro-B-Zellen im Peripherblut und im Knochenmark wiesen mit 446,6±41,2% (p < 0,001) bzw. 148,6±39,7% (p = 0,014) ebenfalls deutlich erhöhte CXCR4-Oberflächenexpressionen im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen auf. In der Milz konnte in dieser Subpopulation keine signifikanter Unterschied zu den wildtypischen Kontrollen nachgewiesen werden. Im Knochenmark konnte auf den unreifen B-Zellen eine um 365,9±43,9% (p < 0,001) und in den transitionalen B-Zellen eine um 149,4±21,2% (p < 0,001) erhöhte CXCR4-Expression nachgewiesen werden. Diese Zahlen verdeutlichen, dass sich mit zunehmender Reife der B-Zellen die CXCR4-Oberflächenexpression den wildtypischen Kontrollen annähert (Abb. 3.19).

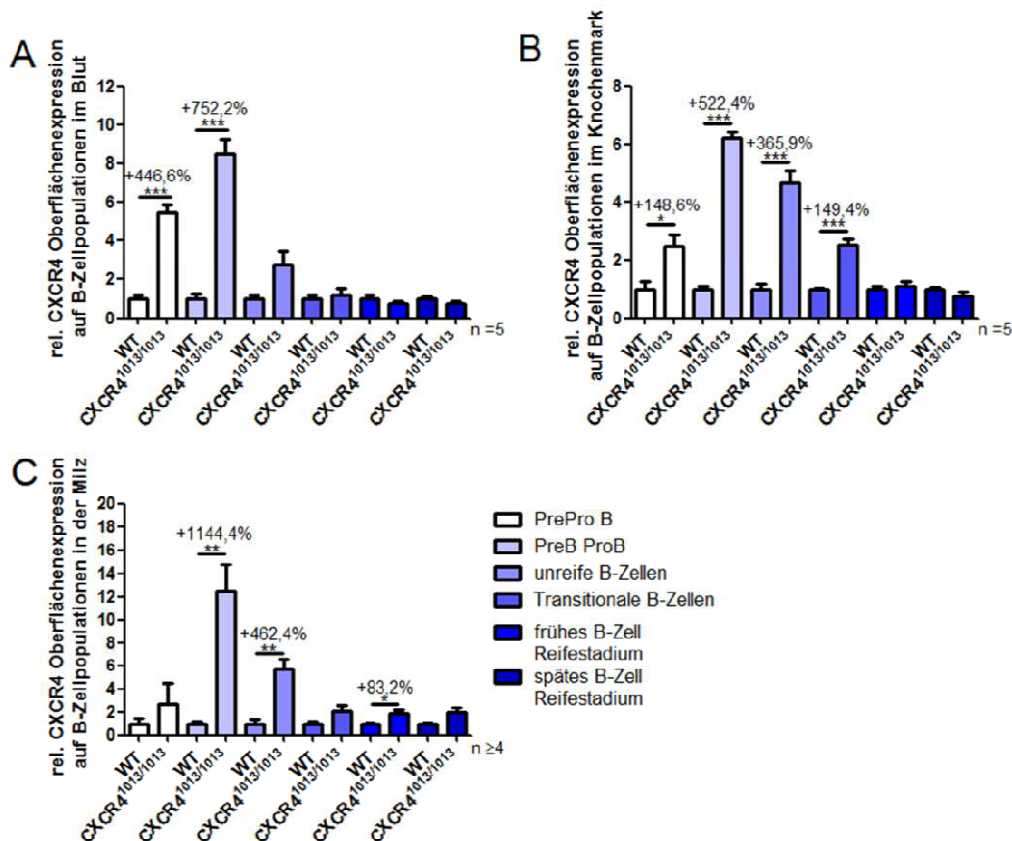


Abbildung 3.19. CXCR4-Oberflächenexpression auf B-Zellreifestadien. B-Zellen wurden als CD45⁺B220⁺ im Blut (A), im Knochenmark (B) und in der Milz (C) definiert. Anschließend wurden die Subpopulationen wie folgt definiert: PreProB-Zellen: CD43⁺CD24⁻, PreB/ProB-Zellen: CD43^{-/+}CD24⁺IgM⁻IgD⁻, unreife B-Zellen CD43⁻CD24⁺IgM^{dim}IgD⁻, transitionale B-Zellen: CD43⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁻, ein frühes B-Zellreifestadium: CD43⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁺, ein spätes B-Zellreifestadium: CD43⁻CD24⁺IgM^{dim/low}IgD⁺. CXCR4-Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch (FMO-kontrolliert) ermittelt und auf wildtypische Kontrollen normalisiert. Signifikante Unterschiede zur wildtypischen Kontrolle sind prozentual angegeben. MW±SEM, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. n ≥ 4.

3.3.2. Apoptose in B-Zellsubpopulationen

Der gestörten B-Zellentwicklung könnte entweder ein Reifungsstopp oder eine vermehrte Apoptose einzelner oder aller B-Zellsubpopulationen zu Grunde liegen. Die Apoptoserate wurde mit Hilfe eines Annexin V-Assays in den verschiedenen B-Zellsubpopulationen bestimmt. Annexin V bindet Calcium-abhängig an Phosphatidylserin-Reste, welche in intakten Zellen ausschließlich intrazellulär zu finden sind (Koopman et al, 1994). Als apoptotische Zellen wurden Annexin V⁺7-AAD⁻-Zellen definiert. Die Vermessung von Fluoreszenz-markiertem Annexin V am Durchflusszytometer ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen CXCR4^{1013/1013}-Zellen und den wildtypischen Kontrollen (Abb. 3.20.)

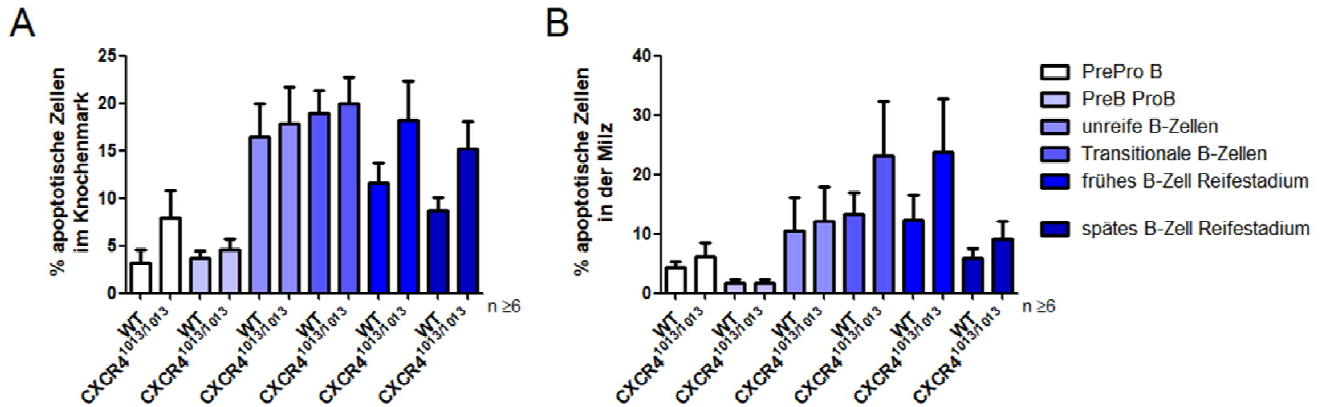


Abbildung 3.20. Apoptoserate in B-Zellsubpopulationen. B-Zellen wurden als CD45⁺B220⁺ im Knochenmark (A) und in der Milz (B) definiert. Anschließend wurden die Subpopulationen wie folgt definiert: PreProB-Zellen: CD43⁺CD24⁻, PreB/ProB-Zellen: CD43^{-/+}CD24⁺IgM⁻IgD⁻, unreife B-Zellen CD43⁻CD24⁺IgM^{dim}IgD⁻, transitionale B-Zellen: CD43⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁻, ein frühes B-Zellreifestadium: CD43⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁺, ein spätes B-Zellreifestadium: CD43⁻CD24⁺IgM^{dim/low}IgD⁺. Apoptotische Zellen wurden als Annexin V⁺ 7-AAD⁻ erkannt. MW±SEM. n ≥ 6.

3.3.3. Bestimmung funktioneller B-Zellvorläufer

Phänotypisch konnten im Knochenmark weniger B-Zellvorläufer in CXCR4^{1013/1013}-Tieren im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.17. und Abb. 3.18.). Diese Beobachtung sollte auch funktionell überprüft werden. Im Peripherblut wurden weder in den wildtypischen Kontrollen noch in CXCR4^{1013/1013}-Tieren preB-Kolonien nachgewiesen (nicht gezeigt). Im Knochenmark lagen die preB-Kolonien in den CXCR4^{1013/1013}-Tieren reduziert im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen vor (p = 0,022), in der Milz war die Verteilung im Vergleich zum Knochenmark gegenteilig (p = 0,014).

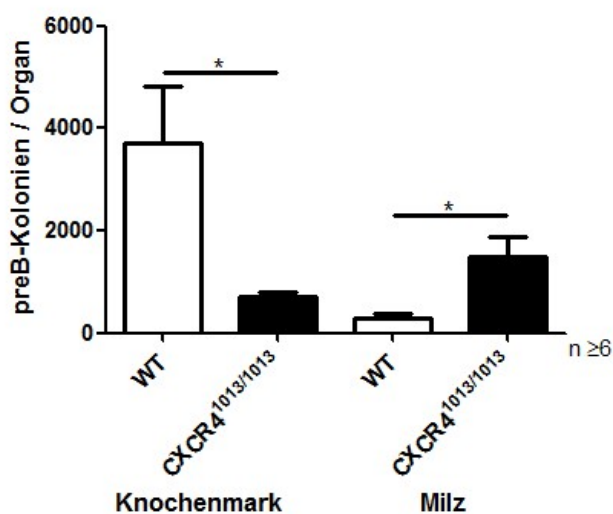


Abbildung 3.21. Quantifizierung von preB-Kolonien. 300.000 Knochenmarkszellen bzw. 3*10⁶ Milzzellen wurden in IL-7-haltiger Methylzellulose ausplattiert und nach 6-8 Tagen wurden die Kolonien gezählt und die Koloniezahl auf einen Femur (1/16 des Gesamt-KM-Volumens) bzw. die Milz hochgerechnet. MW±SEM, * = p < 0,05. n ≥ 6.

3.3.4. Immunisierungssassay

Zur Überprüfung der Funktionalität der B-Zellen wurden die Tiere mit humanem rekombinanten Hepatitis B Impfstoff (HBsAG) immunisiert. Dazu wurden 10% einer humanen Dosis über 3 Wochen einmal wöchentlich i.m. injiziert und eine Woche nach der letzten Injektion Plasma gewonnen um die spezifische Antikörperkonzentration gegen HbSAG (Anti-HBsAG) zu messen (primäre Immunisierung). Nach der primären Immunisierung konnte in beiden Genotypen eine spezifische Impfantwort nachgewiesen werden. Allerdings zeigten CXCR4^{1013/1013}-Tiere in der primären Immunisierung eine um 74,1±6,5% (p = 0,035) reduzierte Impfantwort im Sinne eines leichten humoralen Immundefekts (Abb. 3.22.A). Nach ca. 3 Monaten wurde den Tieren ein weiteres Mal 10% einer humanen Dosis i.m. injiziert (sekundäre Immunisierung). Analog zur primären Immunisierung wurde eine Woche nach der Injektion Plasma gewonnen und Anti-HBsAG bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.22.B dargestellt. Während die wildtypischen Kontrolltiere erwartungsgemäß mit einer verstärkten Immunantwort reagierten (ca. dreifach im Vergleich zur primären Immunisierung), konnte eine vergleichbare Reaktion in den CXCR4^{1013/1013}-Tieren nicht festgestellt werden. Ferner ist zu beachten, dass die Hälfte der wildtypischen Kontrolltiere (3/6) so stark auf die sekundäre Immunisierung reagierten, dass lediglich ein maximaler Grenzwert aufgrund der Gerätespezifikation bestimmt werden konnte. Daher kann angenommen werden, dass der in Abb. 3.22.B angegebene Anti-HBsAG-Titer den tatsächlichen noch unterschätzt.

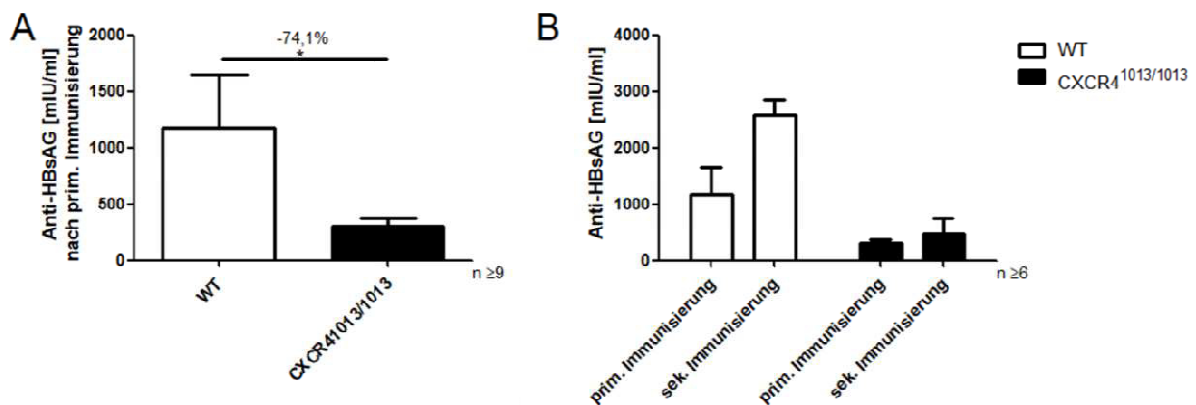


Abbildung 3.22. Spezifische Impfantwort. Nach Immunisierung mit 10% einer humanen Hepatitis B Impfdosis (i.m., wöchentlich, über 3 Wochen) wurde Plasma von den Tieren gewonnen und der spezifische Antikörpertiter gegen das Hepatitis B-Virus gemessen (primäre Immunisierung). Nach 3 Monaten wurden die Tiere ein weiteres Mal immunisiert und der spezifische Antikörpertiter bestimmt (sekundäre Immunisierung). Signifikante Unterschiede sind prozentual im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle angegeben. MW±SEM, * = p < 0,05, *** = p < 0,001. n ≥ 6.

3.4. Hämatopoetische Stressmodelle

Die Regeneration nach hämatopoetischem Stress ist ein wichtiges Merkmal der Funktionalität des hämatopoetischen Systems. Zur Analyse der Regenerationsfähigkeit der CXCR4^{1013/1013}-Tiere wurden verschiedene Stressmodelle durchgeführt. Als Referenz wurden immer wildtypische Kontrollen mitgeführt. Eine Funktion der CXCR4/CXCL12-Achse ist die Retention von HSPC im Knochenmark. Ein Stören dieser Signalachse führt zum Egress von HSPC in die Peripherie. Um eine Mobilisierung auszulösen, wurden entweder der CXCR4-Antagonist Plerixafor, welcher direkt an CXCR4 bindet und somit die CXCR4-CXCL12-Interaktion stört (Broxmeyer et al, 2005; Uy et al, 2008), oder das Zytokin G-CSF eingesetzt, G-CSF fördert die Ausschüttung von Proteasen, die CXCL12 N-terminal truncieren und somit den CXCR4-CXCL12-Signalweg schwächen (Christopher et al, 2011; Levesque et al, 2003). Außerdem wurden nicht-kompetitive und kompetitive Transplantationsexperimente durchgeführt, um die Repopulationsfunktionalität von CXCR4^{1013/1013}-Zellen zu untersuchen.

3.4.1. Plerixafor Mobilisierung

Nach einer Bolusgabe von Plerixafor (10 mg/kg, i.p. in 0,9% NaCl-Lösung) wurden zirkulierende HSPC zu den angegebenen Zeitpunkten anhand eines CFU-C Assays bestimmt. Der reduzierte Grundwert der CXCR4^{1013/1013}-Tiere war bereits aufgrund der Analyse der Homöostase bekannt ($p < 0,001$). In den CXCR4^{1013/1013}-Tieren konnte eine veränderte Plerixafor-Kinetik bei ähnlichen Maximalwerten wie in den wildtypischen Kontrollen nachgewiesen werden. Während in den wildtypischen Kontrollen die maximale Mobilisierung 2 Stunden nach der Injektion erreicht wurde und danach rasch rückläufig war, konnte in CXCR4^{1013/1013}-Tieren eine signifikant erhöhte Mobilisierung nach 4 Stunden ($p = 0,004$) und 6 Stunden ($p = 0,005$) im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 3.23.A). Die Plerixafor-Mobilisierung wurde analog in splenektomierten Tieren durchgeführt. Auch hier wurden reduzierte Basalwerte in CXCR4^{1013/1013}-Tieren detektiert ($p = 0,009$). Während wildtypische Kontrolltiere eine vergleichbare Maximalmobilisierung aufwiesen, unabhängig davon ob sie eine Milz besaßen oder nicht (homöostatisch: $1674 \pm 268,2\%$; splenektomiert: $1610 \pm 128,7\%$), konnte in CXCR4^{1013/1013}-Tieren das Maximum der Homöostase in splenektomierten Tieren nicht erreicht werden. Die Mobilisierungskinetik splenektomierter Tiere erwies sich in beiden untersuchten Genotypen als abnorm. Es konnte kein Abfallen der zirkulierenden HSPC nach 2 Stunden festgestellt werden, stattdessen erreichten beide Gruppen nach 2 Stunden ein Plateau (Abb. 3.23.B). Nach 1 Stunde und 2 Stunden konnten in den wildtypischen Kontrollen mehr HSPC als in CXCR4^{1013/1013}-Tieren mobilisiert werden (1 Stunde: $p = 0,0048$, 2 Stunden: $p = 0,003$). Die korrespondierenden Gesamt-Leukozytenzahlen im Peripherblut verhielten sich bei den homöostatischen und auch splenektomierten Tieren analog zu den zirkulierenden HSPC (nicht gezeigt).

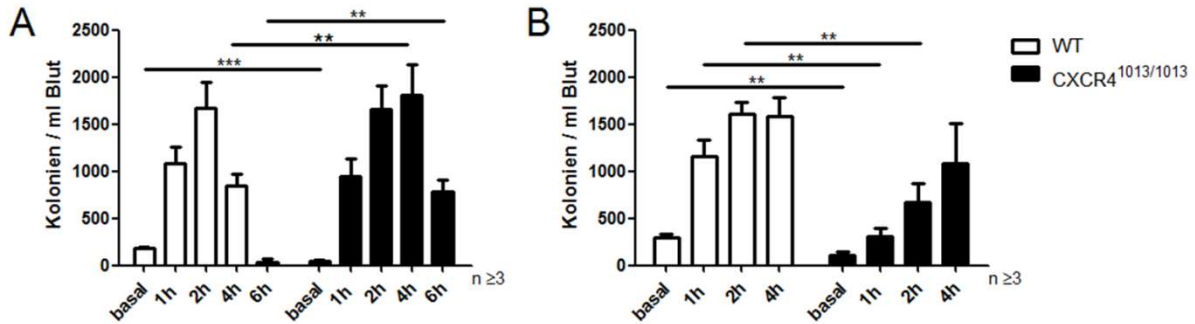


Abbildung 3.23. Plerixafor-Mobilisierung. Die Tiere wurden mit einer Bolusgabe Plerixafor (10 mg/kg, i.p.) behandelt. Zirkulierende HSPC wurden anhand eines CFU-C Assays zu den angegebenen Zeitpunkten im Blut enumeriert. (A) zeigt homöostatische, (B) splenektomierte Tiere. MW±SEM, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. $n \geq 3$.

3.4.2. G-CSF Mobilisierung

Die Mobilisierung durch G-CSF wurde durch 5-tägige- bzw. 9-tägige Behandlung à 100 µg/kg in 100 µl 0,9% NaCl-Lösung i.p. in einem Abstand von 12 Stunden erreicht. Nach der 9. bzw. 17. Injektion wurde Peripherblut entnommen und zirkulierende HSPC mit Hilfe eines CFU-Assays enumeriert. Nach der 17. Dosis wurden die Tiere getötet und zusätzlich der HSPC-Gehalt im Knochenmark und in der Milz ermittelt. Im Gegensatz zu der Mobilisierung mit Plerixafor konnten CXCR4^{1013/1013}-Tiere weder nach 9 Dosen ($p < 0,001$) noch nach 17 Dosen ($p = 0,001$) die Maximalwerte wildtypischer Kontrollen erreichen (Abb. 3.24.A). Im Knochenmark wurden analog zur Homöostase keine Unterschiede zwischen CXCR4^{1013/1013}-Tieren und den wildtypischen Kontrollen nachgewiesen (Abb. 3.24.C). In der Milz hingegen wurde die homöostatische Situation umgekehrt. Es wurden mehr als doppelt so viele HSPC in wildtypischen Milzen ($p = 0,001$) detektiert (Abb. 3.24.D). Die G-CSF Mobilisierung wurde ebenfalls in splenektomierten Tieren durchgeführt. Wie in den nicht splenektomierten Tieren konnten die CXCR4^{1013/1013}-Tiere nicht das Maximum der wildtypischen Kontrollen nach 9 Dosen G-CSF ($p < 0,001$) erreichen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass splenektomierte wildtypische und CXCR4^{1013/1013}-Tiere im Vergleich zu den jeweiligen nicht splenektomierten Tieren effizienter mobilisieren (WT: $223,8 \pm 9,6\%$ ($p < 0,001$); CXCR4^{1013/1013}: $173,8 \pm 68,5\%$ ($p = 0,002$)) (Abb. 3.24.B).

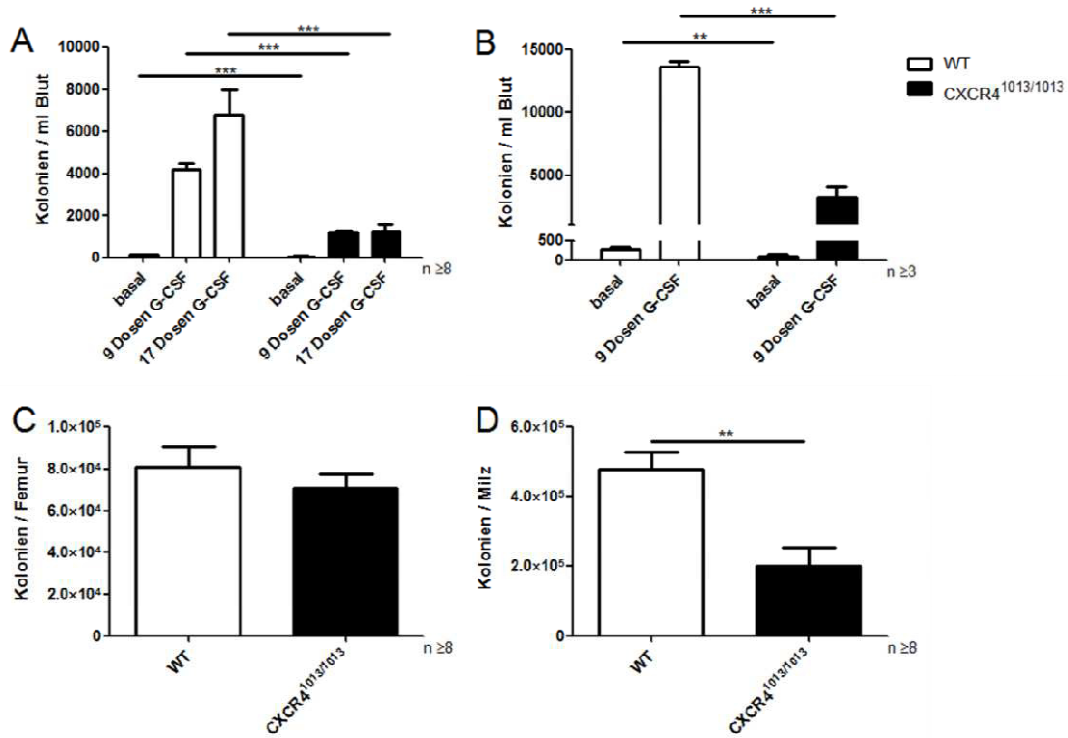


Abbildung 3.24. G-CSF Mobilisierung. Die Tiere wurden mit 9 bzw. 17 Dosen G-CSF (100 µg/kg, 12-stündlich) behandelt. Zu den indizierten Zeitpunkten wurden die zirkulierenden HSPC mit einem CFU-C Assay in nicht splenektomierten Tieren (A) oder splenektomierten Tieren (B) bestimmt. Nach 17 Dosen wurden die nicht splenektomierten Tiere getötet und die HSPC im Knochenmark (C) bzw. in der Milz (D) analysiert. MW±SEM, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. n ≥ 3.

3.4.3. Transplantationsexperimente

3.4.3.1. Homing

Der erste Schritt nach i.v.-Transplantation von HSPC ist das Wiedereinwandern der HSPC in das Knochenmark; dieser Prozess wird auch Homing genannt. Knochenmarkszellen aus wildtypischen Kontrollen oder CXCR4^{1013/1013}-Tieren wurden in letal bestrahlte (12,5 Gy) wildtypische Empfänger transplantiert. Die Tiere wurden 18 - 20 Stunden nach Transplantation getötet, HSPC in den drei hämatopoetischen Organen bestimmt und als relativer Anteil der transplantierten HSPC berechnet. Das Verlassen des Peripherbluts von HSPC verlief in den Empfängern von CXCR4^{1013/1013}-Zellen effizienter ($p = 0,007$), wobei die absolute Anzahl nach 18 – 20 Stunden zirkulierender CFU-C so war, dass der Eindruck einer vermehrten Wiederfindung in Milz und Knochenmark aufgrund der geringen Präzision der Messmethode keine statistische Signifikanz erreichte (Knochenmark: $p = 0,051$, Milz: $p=0,062$) (Abb. 3.25)

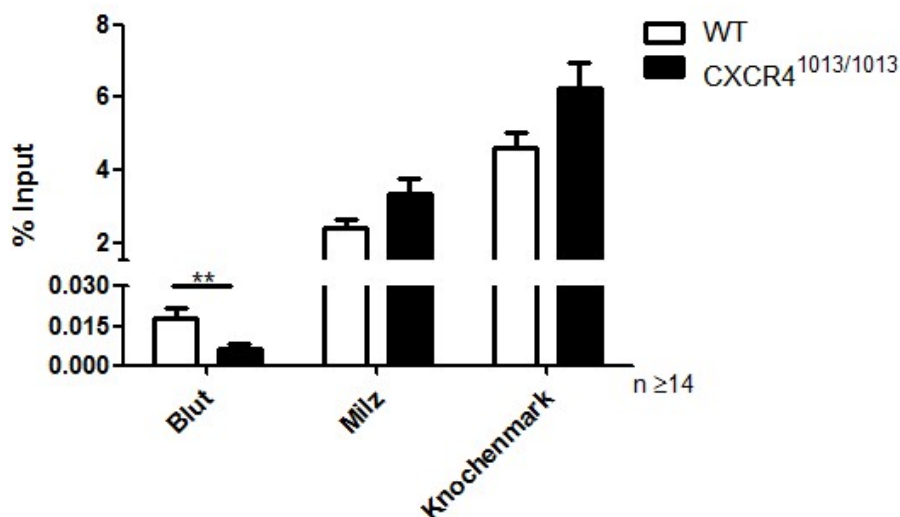


Abbildung 3.25. Hominganalyse. Wildtypisches oder CXCR4^{1013/1013}-Knochenmark ($1 \cdot 10^7$ Zellen) wurde in letal bestrahlte (12,5 Gy) wildtypische Empfängertransplantiert. Die Tiere wurden 18 - 20 Stunden nach Transplantation getötet und CFU-C in Peripherblut, Milz und Knochenmark bestimmt und als Prozent der transplantierten CFU-C berechnet. MW \pm SEM, ** = $p < 0,01$. $n \geq 14$.

3.4.3.2. Engraftment

Nach erfolgreichem Homing und Besetzen der Stammzellnische durch die transplantierten HSPC beginnen diese zu proliferieren und das Knochenmark, später das Peripherblut und andere hämatopoietische Organe zu repopulieren. Dieses Anwachsen wird als Engraftment bezeichnet. Letal bestrahlten (9,5 Gy) wildtypischen Empfängern wurde wildtypisches oder CXCR4⁺¹⁰¹³-Knochenmark transplantiert. Zusätzlich wurden auch CXCR4⁺¹⁰¹³-Tiere als Empfänger genutzt, um etwaige zellextrinsische Effekte der CXCR4 Mutante auf die Blutbildung zu überprüfen. In Abb. 3.26 A/B sind

die Ergebnisse eines repräsentativen Transplantationsexperiments dargestellt. Abb. 3.26.A zeigt das Engraftment über die Zeit, wobei die Gesamt-Leukozytenzahl im Peripherblut mit Hilfe der automatischen Hämazytometrie bestimmt wurde. Dabei konnte die Unabhängigkeit des Engraftments vom Empfänger-genotyp gezeigt werden, d.h. die WHIM-Mutation hat ausschließlich zellintrinsische Auswirkungen auf die Hämatopoese. Die Empfänger wildtypischen Knochenmarks und CXCR4^{+/-1013}-Knochenmarks erreichten jeweils ca. 70 Tage nach der Transplantation ein Plateau mit im Wesentlichen homöostatischen Blutbildwerten. In Abb. 3.26.B ist die Endpunktanalyse dargestellt. 4 Monate nach Transplantation bildeten die jeweiligen Empfänger eine Hämatopoese ausschließlich abhängig vom Spendergenotyp aus, d.h. CXCR4^{+/-1013}-Knochenmark ist grundsätzlich hämatopoetisch kompetent (radioprotectiert). Die Engraftmentkinetik für CXCR4^{1013/1013}-Zellen verhielt sich ähnlich wie für wildtypische Zellen. Empfänger von CXCR4^{1013/1013}-Knochenmark zeigten normales Engraftment. Zusätzlich zu den wildtypischen Kontrollen wurde auch Knochenmark von UBC-GFP Tieren getestet, um etwaige Engraftmentdefekte für die nachfolgenden kompetitiven Transplantationsexperimente (Kap. 3.4.3.3.) auszuschließen (Abb. 3.26.C/D). Durch das normale Engraftment der Empfänger von UBC-GFP Knochenmark konnte die grundsätzliche Repopulations-Kompetenz von UBC-GFP HSPCs demonstriert werden.

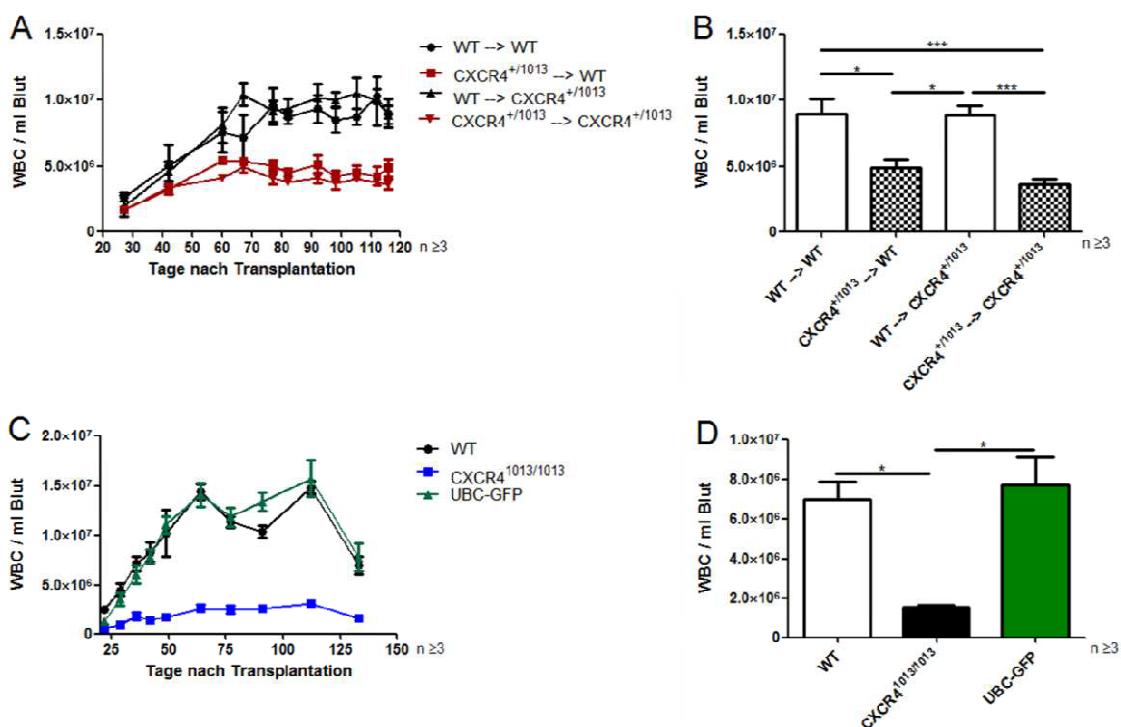


Abbildung 3.26. Engraftmentanalyse. Letal bestrahlte (9,5 Gy) Tiere wurden transplantiert. In (A) wurden wildtypische und CXCR4^{+/-1013}-Tiere sowohl als Empfänger als auch als Spender eingesetzt und das Engraftment durch regelmäßige Blutentnahmen mit anschließender automatischer Hämazytometrie überwacht. (B) zeigt die korrespondierende Endpunktanalyse. In (C) wurde wildtypisches, CXCR4^{1013/1013} oder UBC-GFP-Knochenmark in letal bestrahlte wildtypische Empfänger transplantiert und das Engraftment analog zu (A) dokumentiert, (D) zeigt wiederum die korrespondierende Endpunktanalyse. MW±SEM, * = p < 0,05, *** = p < 0,001. n ≥ 3.

3.4.3.3. Analyse der hämatopoetischen Organe nach kompetitiver Transplantation

In Kap. 3.4.3.2. konnte gezeigt werden, dass CXCR4^{1013/1013}-Knochenmarkzellen grundsätzlich letal bestrahltes Knochenmark repopulieren und regenerieren können. In kompetitiven Transplantationsexperimenten sollte anschließend analysiert werden, ob CXCR4^{1013/1013}-Stammzellen funktionell äquipotent sind wie WT-Stammzellen. Um das zu untersuchende wildtypische oder CXCR4^{1013/1013}-Knochenmark (*bone marrow of interest*, BOI) von dem Kompetitor durchflusszytometrisch unterscheiden zu können, wurde Knochenmark aus UBC-GFP-Tieren verwendet (GFP-Kompetitor). In diesen Tieren wird in allen Zellen das fluoreszierende Protein GFP (*green fluorescent protein*) unter dem Ubiquitin-Promotor exprimiert (Schaefer et al, 2001). Als Empfänger wurden CD45.1-Tiere verwendet. Diese Tiere tragen einen Polymorphismus im CD45-Protein, welcher durch einen Antikörper detektiert werden kann. Dadurch konnte auch eine potentielle autologe Rekonstitution (autolog = CD45.1⁺) nachgewiesen werden. Nach 4 Monaten wurden die Tiere getötet und die drei hämatopoetischen Organe untersucht. Autologe T-Zellen wurden aufgrund ihrer Persistenz in den nachfolgenden Daten nicht berücksichtigt.

Im Peripherblut der transplantierten Tiere konnte eine Reduktion der Gesamt-Leukozyten in den Empfängern von CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP-Transplantaten um 59,9±4,6% ($p < 0,001$) nachgewiesen werden. Das GFP-Kompetitor-Knochenmark trägt sowohl im wildtypischen als auch im CXCR4^{1013/1013}-Transplantationsregime im gleichen Umfang zu den zirkulierenden Gesamt-Leukozyten bei (Abb. 3.27.A). Auch die Betrachtung des Immunphänotyps lieferte im Vergleich zur Homöostase vergleichbare Ergebnisse (vgl. Abb. 3.3.A). Mit Ausnahme der Monozyten lagen alle untersuchten Subpopulationen im Peripherblut in Empfängern von CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP-Knochenmark reduziert vor (B-Zellen: 69,9±5,0% ($p < 0,001$), T-Zellen: 37,3±7,9% ($p = 0,025$), Granulozyten: 61,1±7,9% ($p = 0,003$)) (Abb. 3.27.B). Zusätzlich wurden in allen Subpopulationen noch die Beiträge des zu untersuchenden Knochenmarks und des GFP-Kompetitors analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Subpopulationen - analog zu den Gesamt-Leukozyten - der Beitrag von GFP-Kompetitorzellen keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der co-transplantierten Knochenmark-Spezies aufweist. Lediglich der Beitrag der CXCR4^{1013/1013}-Zellen ist im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen in allen Subpopulationen reduziert entsprechend der Situation in homöostatischen CXCR4^{1013/1013}-Tieren (B-Zellen: $p < 0,001$, T-Zellen: $p = 0,002$, Monozyten: $p = 0,002$, Granulozyten: $p < 0,001$) (Abb. 3.27. C/D).

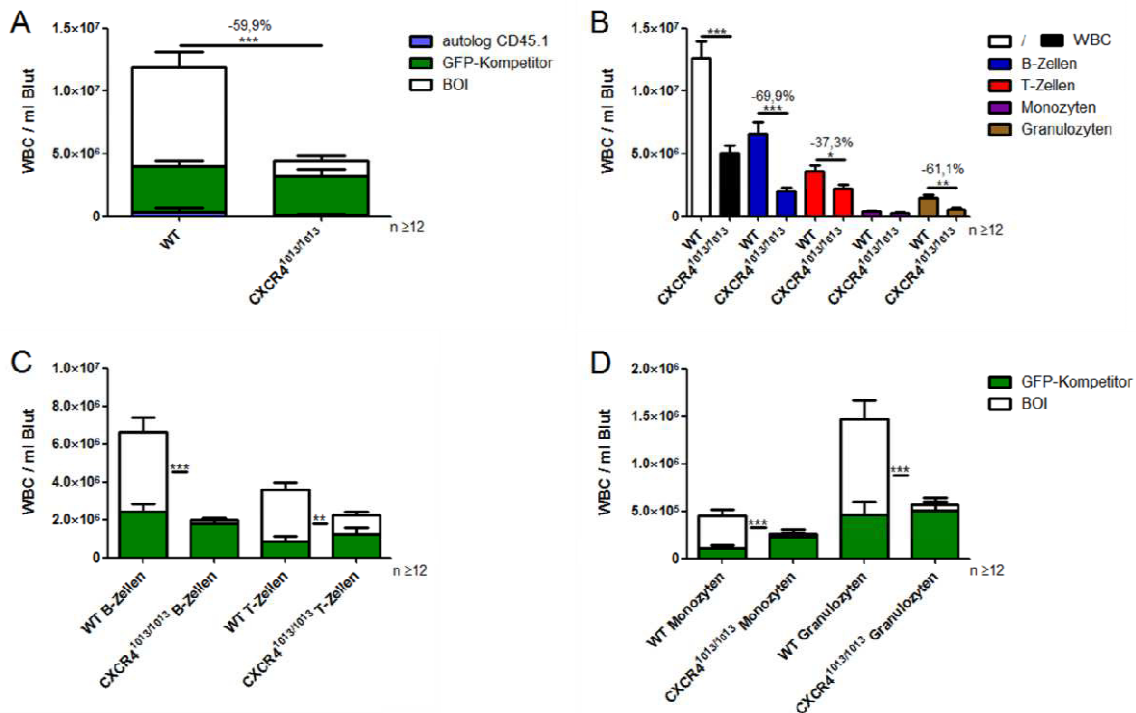


Abbildung 3.27. Endanalyse des Peripherbluts 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit UBC-GFP-Kompetitor. (A) Gesamt-Leukozytenzahl, sowie Beiträge der autologen, GFP-Kompetitor- und wildtypischen/ CXCR4^{1013/1013}-Zellen. (B) Immunphänotypische Analyse der CD45.2⁺ Zellen. CD45.2 wurde als Referenz genutzt. Die reifen Zellen wurden durch Antikörper gegen B220 (B-Zellen, blau), CD3 (T-Zellen, rot), CD11b (Monozyten, violett) und CD11b + Gr1 (Granulozyten, braun) unterschieden. (C) Aufschlüsselung der Beiträge von UBC-GFP und wildtypischen/ CXCR4^{1013/1013}-Zellen in B-Zellen und T-Zellen. (D) Aufschlüsselung der Beiträge von UBC-GFP und wildtypischen/ CXCR4^{1013/1013}-Zellen in Monozyten und Granulozyten. Signifikante Unterschiede sind prozentual zur WT/UBC-GFP-Transplantation angegeben. Auf der X-Achse ist jeweils nur das *bone marrow of interest* (BOI) aufgetragen. MW±SEM, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. n ≥ 12.

Im Knochenmark der kompetitiv transplantierten Tiere konnten zunächst keine Unterschiede bezüglich der Gesamt-Leukozytenzahl zwischen WT/UBC-GFP- und CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP-Empfängern ermittelt werden. Jedoch konnte ein leicht reduzierter Beitrag von CXCR4^{1013/1013}-Zellen zu den Gesamt-Leukozyten detektiert werden (p = 0,028) (Abb. 3.28.A). Die Analyse des Immunphänotyps des Knochenmarks ergab - wiederum ähnlich zur Homöostase (vgl. Abb. 3.3.B) - reduzierte B-Zellen (32,2±9,7%, p = 0,028) und erhöhte T-Zellen (255,7±120,0%, p = 0,020) in den CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP-Empfängern. Monozyten und Granulozyten waren unauffällig (Abb. 3.28.B). In der Analyse der Beiträge von WT/CXCR4^{1013/1013}-Zellen bzw. UBC-GFP-Zellen zu den einzelnen Linien konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der B-Zellen und Erhöhung der T-Zellen ausschließlich auf die wildtypischen bzw. CXCR4^{1013/1013}-Zellen zurückzuführen waren. Die CXCR4^{1013/1013} B-Zellen lagen reduziert (p = 0,010) und die CXCR4^{1013/1013} T-Zellen lagen erhöht (p < 0,001) vor. Die Beiträge der UBC-GFP-Zellen waren in beiden Linien nicht unterschiedlich (3.28.C). Der Beitrag von UBC-GFP-Zellen in CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP-Empfängern zu den Monozyten war erhöht (p = 0,049) und der Beitrag von CXCR4^{1013/1013}-Zellen zu den Granulozyten reduziert

($p = 0,0031$), allerdings hatten diese Änderungen keine Auswirkungen auf die Gesamtzahlen der entsprechenden Linien (Abb. 3.28.D).

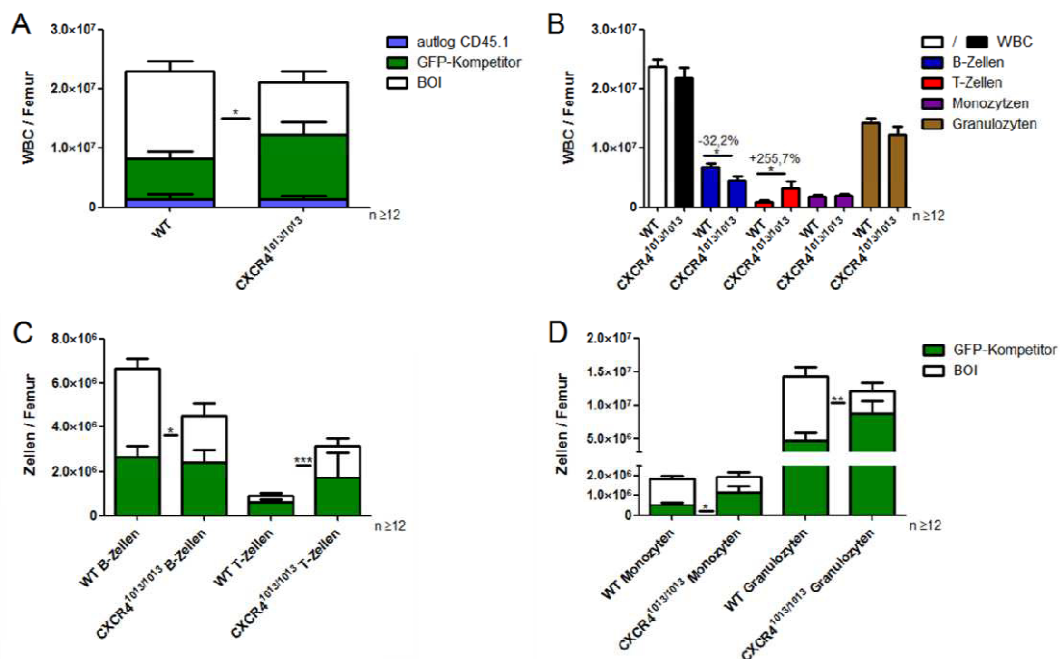


Abbildung 3.28. Endanalyse des Knochenmarks 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit UBC-GFP-Kompetitor. (A) Gesamt-Leukozytenzahl, sowie Beiträge der autologen, GFP-Kompetitor- und wildtypischen/CXCR4^{1013/1013}-Zellen. (B) Immunphänotypische Analyse der CD45.2⁺ Zellen. CD45.2 wurde als Referenz genutzt. Die reifen Zellen wurden durch Antikörper gegen B220 (B-Zellen, blau), CD3 (T-Zellen, rot), CD11b (Monozyten, violett) und CD11b + Gr1 (Granulozyten, braun) unterschieden. (C) Aufschlüsselung der Beiträge von UBC-GFP und wildtypischen/CXCR4^{1013/1013}-Zellen in B-Zellen und T-Zellen. (D) Aufschlüsselung der Beiträge von UBC-GFP und wildtypischen/ CXCR4^{1013/1013}-Zellen in Monozyten und Granulozyten. Signifikante Unterschiede sind prozentual zur WT/UBC-GFP-Transplantation angegeben. Auf der X-Achse ist jeweils nur das *bone marrow of interest* (BOI) aufgetragen. MW±SEM, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. $n \geq 12$.

Ähnlich dem Knochenmark konnten in der Milz keine Unterschiede in der Gesamt-Leukozytenzahl festgestellt werden, trotz eines reduzierten Anteils von CXCR4^{1013/1013}-Zellen ($p = 0,004$) (Abb. 3.29.A). Der B-Zelldefekt der CXCR4^{1013/1013}-Zellen konnte auch in der Milz nachgewiesen werden, die B-Zellen waren um $50,8 \pm 8,7\%$ ($p = 0,005$) reduziert. T-Zellen und Monozyten waren in Bezug auf ihre Gesamtzahl unauffällig, die Granulozyten lagen in CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP Empfängern um $275,6 \pm 142,0\%$ ($p = 0,027$) vermehrt vor (Abb. 3.29.B). Die Beiträge der Transplantate ergab für die B-Zellen ein vergleichbares Ergebnis zum Peripherblut und zum Knochenmark. Die Reduktion der B-Zellen erfolgte ausschließlich aufgrund eines verminderten Anteils von CXCR4^{1013/1013}-Zellen ($p < 0,001$). Für die T-Zellen konnte weder in der Gesamtzahl noch in der Verteilung ein signifikanter Unterschied (BOI: $p = 0,480$, GFP-Kompetitor: $p = 0,054$) festgestellt werden (Abb. 3.29.C). Für die Monozyten und Granulozyten konnten in den Empfängern des CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP Transplantats jeweils erhöhte Beiträge der UBC-GFP-Zellen im Vergleich zu Empfängern des WT/UBC-GFP Transplantats (Monozyten: $p = 0,004$, Granulozyten: $p = 0,016$) gezeigt werden (Abb. 3.29.D).

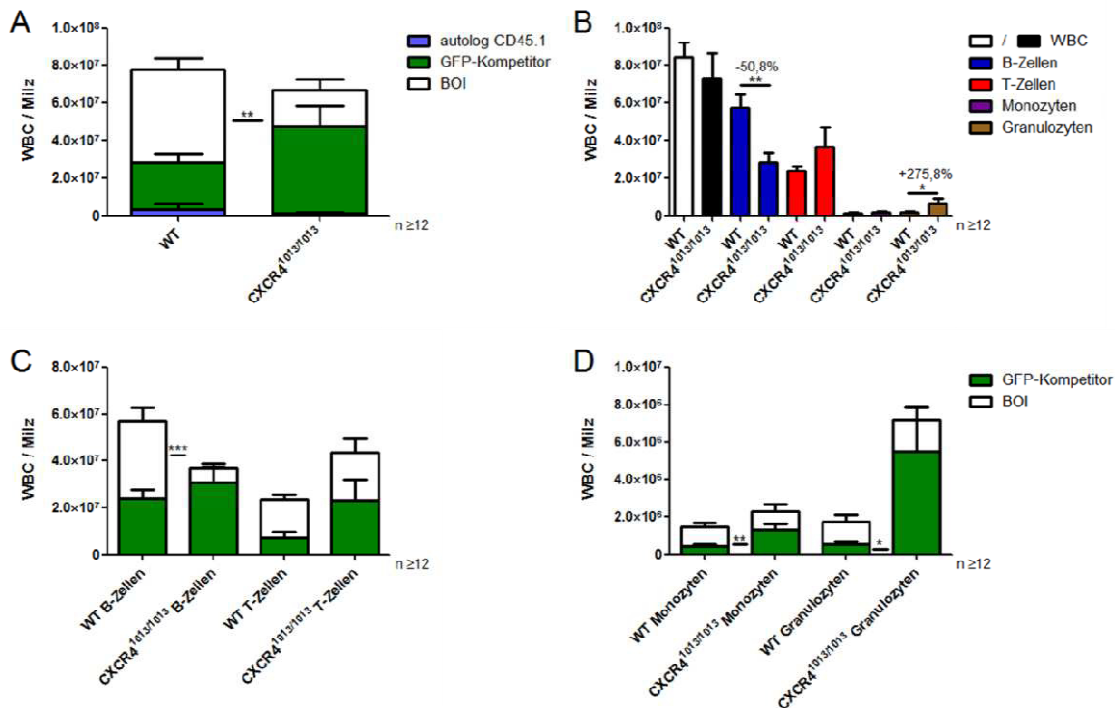


Abbildung 3.29. Endanalyse der Milz 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit UBC-GFP-Kompetitor. (A) Gesamt-Leukozyten, sowie Beiträge der autologen, GFP-Kompetitor- und wildtypischen/CXCR4^{1013/1013}-Zellen. (B) Immunphänotypische Analyse der CD45.2⁺ Zellen. CD45.2 wurde als Referenz genutzt. Die reifen Zellen wurden durch Antikörper gegen B220 (B-Zellen, blau), CD3 (T-Zellen, rot), CD11b (Monozyten, violett) und CD11b + Gr1 (Granulozyten, braun) unterschieden. (C) Aufschlüsselung der Beiträge von UBC-GFP und wildtypischen/CXCR4^{1013/1013}-Zellen in B-Zellen und T-Zellen. (D) Aufschlüsselung der Beiträge von UBC-GFP und wildtypischen/CXCR4^{1013/1013}-Zellen in Monozyten und Granulozyten. Signifikante Unterschiede sind prozentual zur WT/UBC-GFP-Transplantation angegeben. Auf der X-Achse ist jeweils nur das *bone marrow of interest* (BOI) aufgetragen. MW±SEM, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. n ≥ 12.

Neben den reifen Zellen wurden auch HSPC in den drei hämatopoetischen Organen mit Hilfe von CFU-C Assays und Durchflusszytometrie bestimmt. Die Unterscheidung zwischen WT/CXCR4^{1013/1013}- und UBC-GFP-HSPC erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Im Peripherblut konnte eine Reduktion der zirkulierenden HSPC um 87,7±12,3% (p = 0,016) ermittelt werden. Diese Reduktion war wiederum ausschließlich auf eine Reduktion der CXCR4^{1013/1013}-HSPC zurückzuführen (p = 0,013), die zirkulierenden UBC-GFP-HSPC im Peripherblut waren unbeeinflusst (Abb. 3.30.A). Im Knochenmark (Abb. 3.30.B), sowie in der Milz (Abb. 3.30.C) konnten keine Unterschiede in Bezug auf Gesamtzahl oder die Herkunft der HSPC detektiert werden. HSPC wurden zusätzlich durchflusszytometrisch im Knochenmark bestimmt. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen Empfängern von WT/UBC-GFP-Zellen oder CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP-Zellen ermittelt werden (Abb.3.30.D). Dies bestätigt die Ergebnisse des CFU-C Assays im Knochenmark (Abb. 3.30.B).

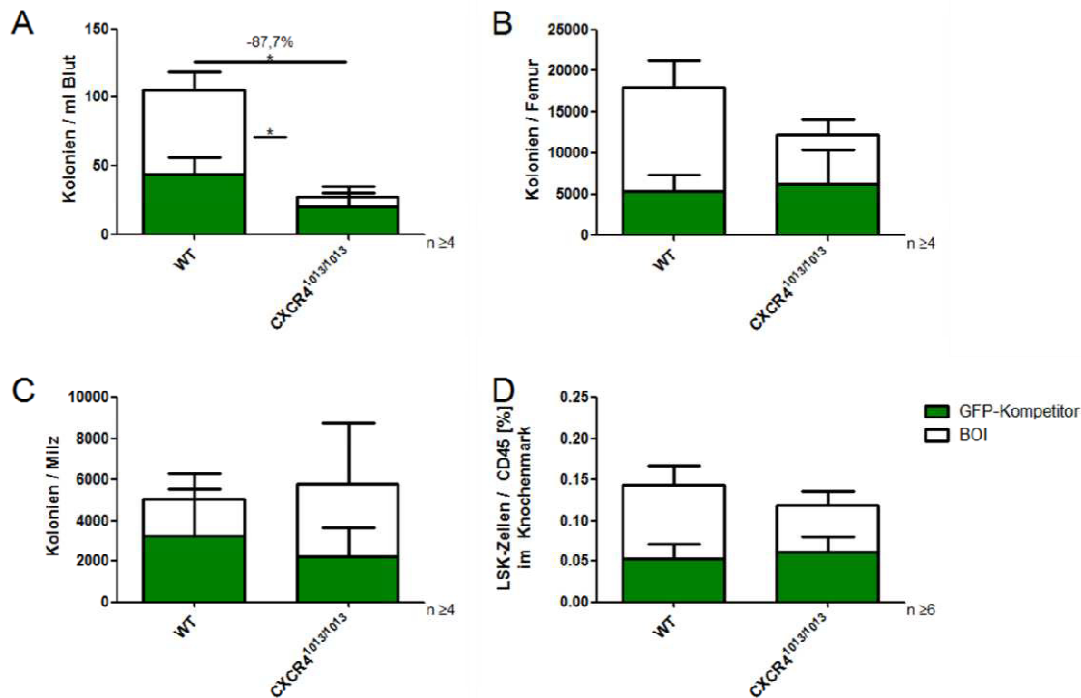


Abbildung 3.30. HSPC nach kompetitiver Transplantation mit UBC-GFP-Kompetitor. HSPC wurden nach kompetitiver Transplantation im Peripherblut (A), im Knochenmark (B) und in der Milz (C) mit Hilfe eines CFU-C Assays bestimmt. Die Unterscheidung zwischen BOI- und GFP-Kompetitor Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. In (D) wurden durchflusszytometrisch LSK (Lineage⁻, Sca-1⁺, cKit⁺)-Zellen detektiert. Auf der X-Achse ist jeweils nur das bone marrow of interest (BOI) aufgetragen. MW±SEM, * = p < 0,05. n ≥ 4.

Außerdem wurde in den transplantierten Tieren zusätzlich der Zellzyklus in LSK-, Lin^{low}- und Lin⁺-Zellen untersucht. Wie bereits in Kap. 3.1.4. beschrieben, wurde zunächst die Oberfläche zur Unterscheidung der zu untersuchenden Subpopulationen gefärbt mit anschließender Färbung von Ki-67 und der DNA. Zusätzlich musste auch GFP mit einem AlexaFluor-488 konjugierten Antikörper markiert werden, da GFP durch die Fixation seine fluoreszierende Eigenschaft verliert. In Abb. 3.31. sind die Ergebnisse dargestellt. Dabei repräsentieren die linken Balken die Situation in WT/UBC-GFP-transplantierten Tieren, während die jeweils rechten Balken die Situation in CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP widerspiegeln. Es konnten allerdings in keiner Subpopulation Unterschiede zwischen den beiden Transplantatquellen detektiert werden (Abb. 3.31.A-C).

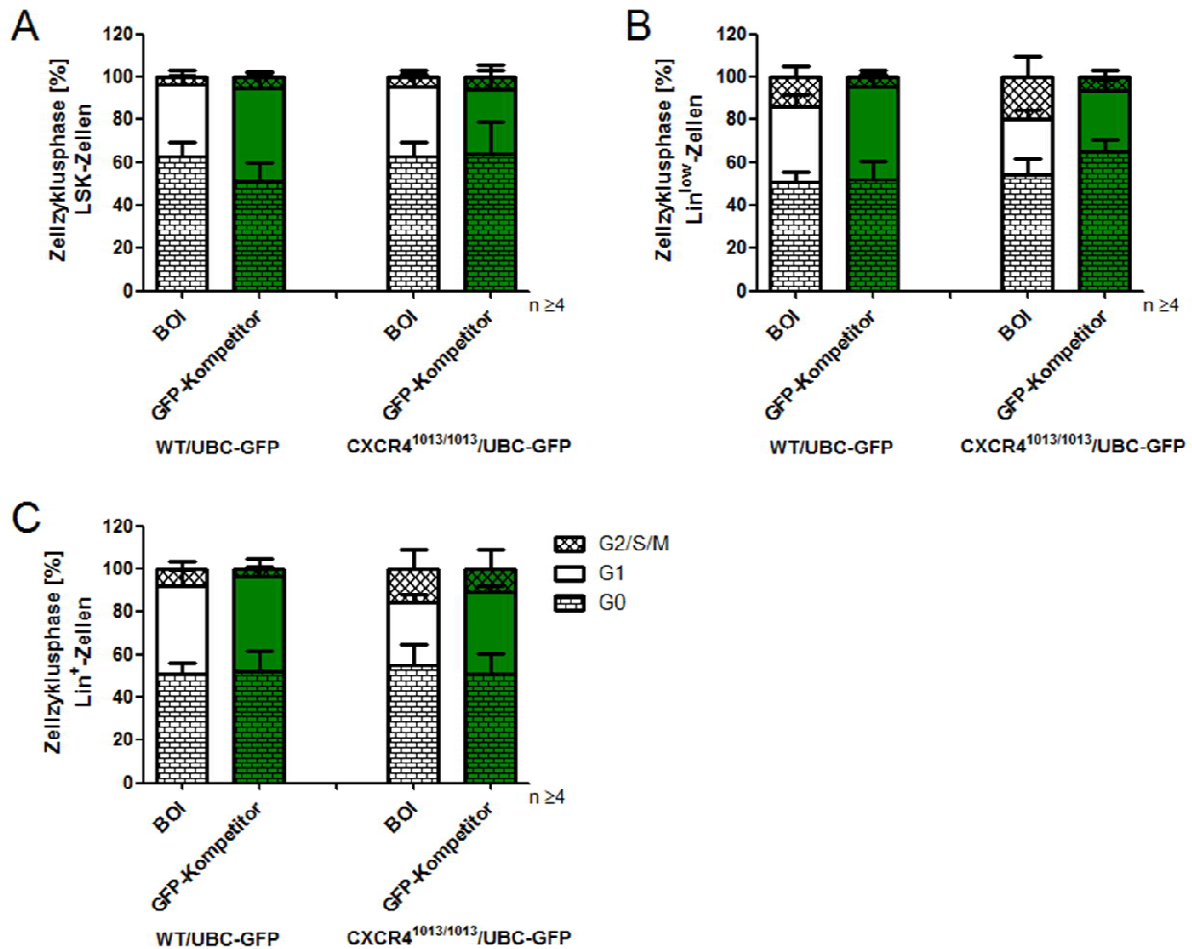


Abbildung 3.31. Zellzyklusanalyse im Knochenmark nach kompetitiver Transplantation mit UBC-GFP-Kompetitor. Knochenmarkszellen wurden zur Unterscheidung der Subpopulationen mit einem Lineage-Cocktail, Sca-1- und cKit-Antikörpern gefärbt. Nach einer Fixation/Permeabilisierung wurden Ki-67, GFP durch spezifische Antikörper und die DNA mit Hilfe von 7-AAD gefärbt. In (A) sind LSK-, in (B) Lin^{low}- und in (C) Lin⁺-Zellen dargestellt. Die linken Balken stellen jeweils das WT/UBC-GFP-Transplantationsregime dar, die jeweils rechten Balken das CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP-Transplantationsregime. MW±SEM. n ≥ 4.

3.4.3.4. Sekundärtransplantationen

Die Repopulation in Primärtransplantationen wird nicht notwendigerweise von Stammzellen, sondern von frühen Vorläuferzellen vollzogen (Kiel et al, 2005). Um die *stemness* von Stammzellen zu prüfen, werden serielle Transplantationen durchgeführt; der Standard zum Nachweis normaler Stammzellfunktion verlangt derzeit zumindest zweimalige Retransplantierbarkeit (Morrison & Weissman, 1994; Osawa et al, 1996). Dazu wird das Knochenmark aus primär transplantierten Tieren gewonnen, das Knochenmark innerhalb einer Gruppe vereinigt und in letal bestrahlte CD45.1-Empfänger transplantiert. Es erwies sich als sehr schwierig, Sekundärtransplantationen zu untersuchen, da in den ersten zwei Versuchsansätzen alle Empfänger von CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP-Knochenmark zwischen dem 30. und 60. Tag nach der Transplantation verstarben (bei normaler Überlebensrate der Empfänger von WT/UBC-GFP-Knochenmark). Wie schon in Kap. 3.4.3.3., wurden auch in der folgenden Grafik autologe T-Zellen aufgrund ihrer Persistenz zensiert. 16 Wochen nach

der Sekundärtransplantation wurden die überlebenden Tiere getötet und die Zusammensetzung der drei hämatopoetischen Organe in Bezug auf die unterschiedlichen Spenderzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl in den Empfängern von WT/UBC-GFP- als auch in den Empfängern von CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP-Knochenmark zu einer erheblichen autologen Rekonstitution kommt. Dies schien in den Empfängern von CXCR4^{1013/1013}/UBC-GFP-Knochenmark in etwas höherem Maße zu geschehen, erreichte allerdings keine statistische Signifikanz. Ebenso war der Anteil an UBC-GFP-Zellen in allen Organen in beiden Versuchsgruppen in etwa vergleichbar. Allerdings konnte gezeigt werden, dass CXCR4^{1013/1013}-Zellen in allen drei Organen weitgehend ausgelöscht waren im Vergleich zu den wildtypischen Zellen in der Vergleichsgruppe, die wesentlich zur Repopulation beitrugen. Im Blut ($p = 0,009$) und im Knochenmark ($p = 0,016$) waren kaum noch CXCR4^{1013/1013}-Zellen nachweisbar (Blut: $2,4 \pm 1,1\%$, Knochenmark: $4,7 \pm 1,9\%$), in der Milz ($p = 0,005$) konnte zumindest noch eine kleine Population von $9,0 \pm 3,6\%$ detektiert werden (Abb. 3.32.). Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass das zur Sekundärtransplantation eingesetzte Knochenmark ähnlich in Bezug auf den Anteil des BOI- bzw. des UBC-GFP-Knochenmarks zusammen gesetzt war (vgl. Abb. 3.28.A).

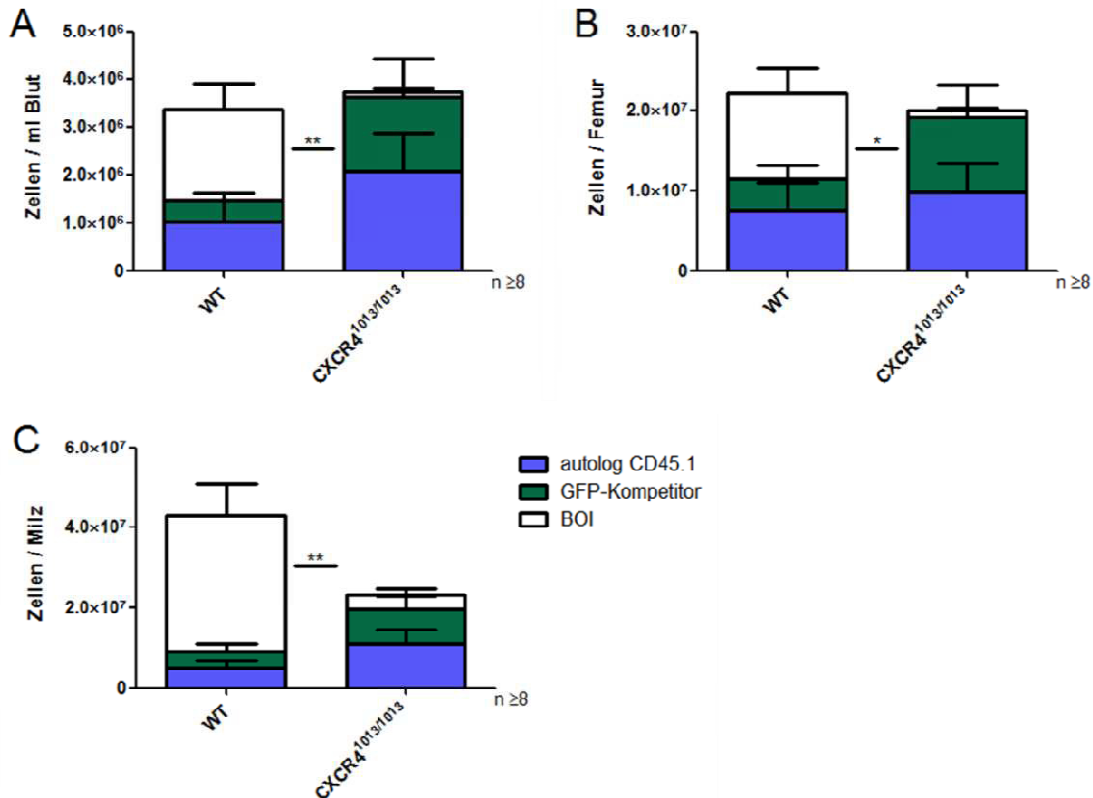


Abbildung 3.32. Endanalyse der Sekundärtransplantation mit UBC-GFP-Kompetitor. 300.000 Knochenmarkszellen aus der Vereinigung der jeweiligen Gruppe wurden in letal bestrahlte (9,5 Gy) Empfänger transplantiert. Nach 16 Wochen wurden die Tiere getötet und die drei hämatopoetischen Organe Blut (A), Knochenmark (B) und Milz (C) untersucht. Die Gesamtzahlen wurden mit Hilfe der automatischen Hämazytometrie und die Zusammensetzung durchflusszytometrisch ermittelt. Auf der X-Achse ist jeweils nur das *bone marrow of interest* (BOI) bei der Transplantation aufgetragen. MW±SEM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. $n \geq 8$.

3.4.3.5. Wechsel des Kompetitor-Knochenmarks

Um zu überprüfen, ob die in 3.4.3.3. beobachteten Effekte nicht durch das UBC-GFP-Kompetitorknochenmark ausgelöst wurden, wurde das Transplantationsregime abgeändert. Da die autologe Rekonstitution in Primärtransplantationen vernachlässigt werden konnte (vgl. Abb. 3.27.A, 3.28.A, 3.29.A) wurden letal bestrahlte wildtypische Empfänger und CD45.1 Knochenmark als Kompetitor-Knochenmark eingesetzt. 16 Wochen nach der Transplantation wurden die Tiere getötet und die drei hämatopoetischen Organe analysiert.

Im Peripherblut konnte der Verlust von B-Zellen aus den vorangegangenen Experimenten reproduziert werden. B-Zellen waren in den Empfängern von CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Knochenmark um 73,4±14,2% ($p = 0,044$) reduziert. Reduzierte T-Zellen, sowie reduzierte Granulozyten im Blut von CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Empfängern konnten nicht - oder lediglich als Trend - reproduziert werden (Abb. 3.33.).

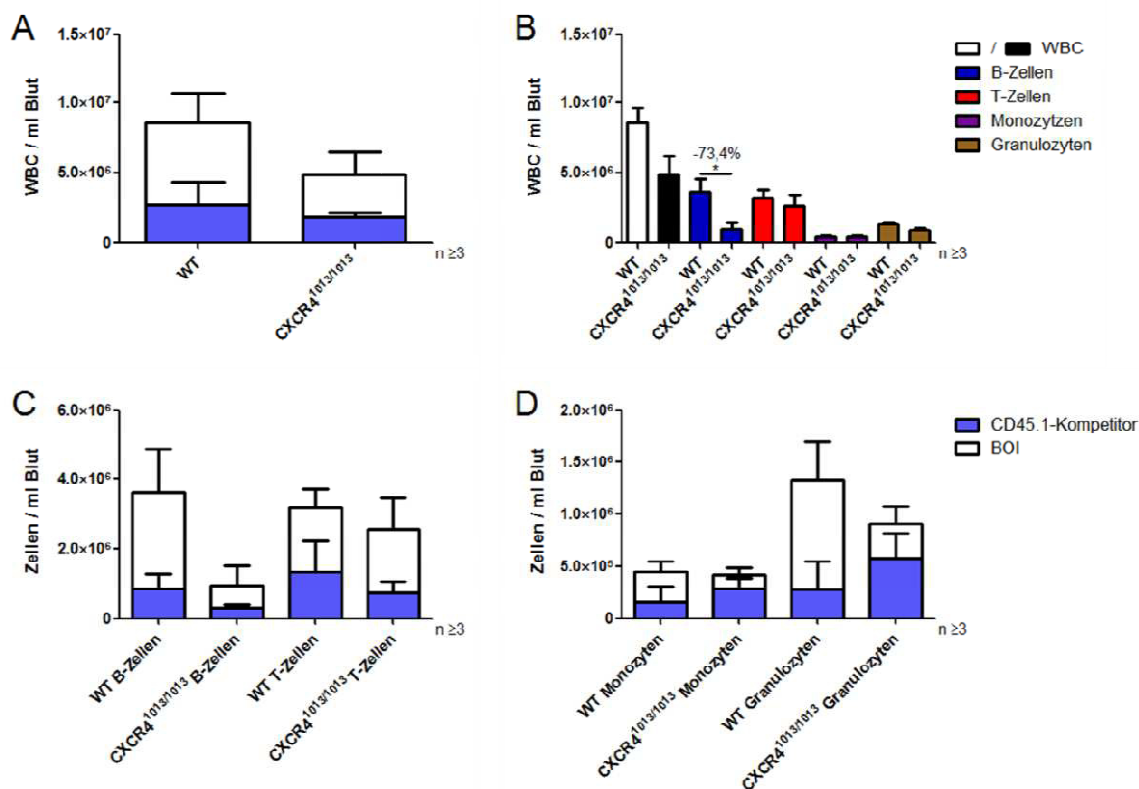


Abbildung 3.33. Endanalyse des Peripherbluts 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit CD45.1-Kompetitor. A) Die Gesamtzellzahl wurde durch automatische Hämazytometrie bestimmt, die Anteile des *bone marrow of interest* (BOI) und CD45.1-Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. B) Immunphänotypische Analyse des Peripherbluts. Die Summe der CD45.1- und CD45.2-Zellen wurde als Referenz genutzt. Die reifen Zellen wurden anhand von Antikörpern gegen B220 (B-Zellen), CD3 (T-Zellen), CD11b (Monozyten) und CD11b und Gr1 (Granulozyten) differenziert. C) Die Beiträge von CD45.1-Kompetitorzellen und wildtypischen/CXCR4^{1013/1013}-Zellen wurde in B- und T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. D) Die Beiträge von CD45.1-Kompetitorzellen und wildtypischen/CXCR4^{1013/1013}-Zellen wurden in Monozyten und Granulozyten durchflusszytometrisch analysiert. Signifikante Unterschiede sind prozentual zur WT/CD45.1-Transplantation angegeben. Auf der X-Achse ist jeweils nur das BOI der Transplantation aufgetragen. MW±SEM. * = p < 0,05. n ≥ 3.

Im Knochenmark konnte zunächst der erhöhte Anteil von wildtypischen Zellen im Vergleich zu CXCR4^{1013/1013}-Zellen bei ähnlicher Zellularität reproduziert werden (p = 0,030) (Abb. 3.34.A). Dieser Effekt reflektiert die bekannte größere Rekonstitutionskompetenz wildtypischer Zellen gegenüber GFP⁺- bzw. CD45.1 Zellen (Faltusova et al, 2018; Mercier et al, 2016). Allerdings konnten wiederum vermehrt CXCR4^{1013/1013}-T-Zellen in den Empfängern von CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Knochenmarkzellen detektiert werden (p = 0,009) (Abb. 3.29.B). Die Analyse der einzelnen reifen Linien ergab ähnliche Ergebnisse wie bereits durch die Transplantation mit BOI/UBC-GFP (vgl. Abb. 3.28.C/D). Der Anteil von BOI B-Zellen war in dem Empfängern von CXCR4^{1013/1013}-Zellen reduziert (p = 0,030) (Abb. 3.34.C). Interessanterweise konnte auch ein erhöhter Anteil von Kompetitorzellen in der Monozytenpopulation von CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Zellen Empfängern im Vergleich zu den Empfängern von WT/CD45.1-Zellen reproduziert werden (p = 0,033) (Abb. 3.34.D). Analog zur BOI/UBC-GFP-Transplantation konnte kein Unterschied in der Frequenz oder Verteilung von LSK-Zellen im Knochenmark detektiert werden (Abb. 3.34.E).

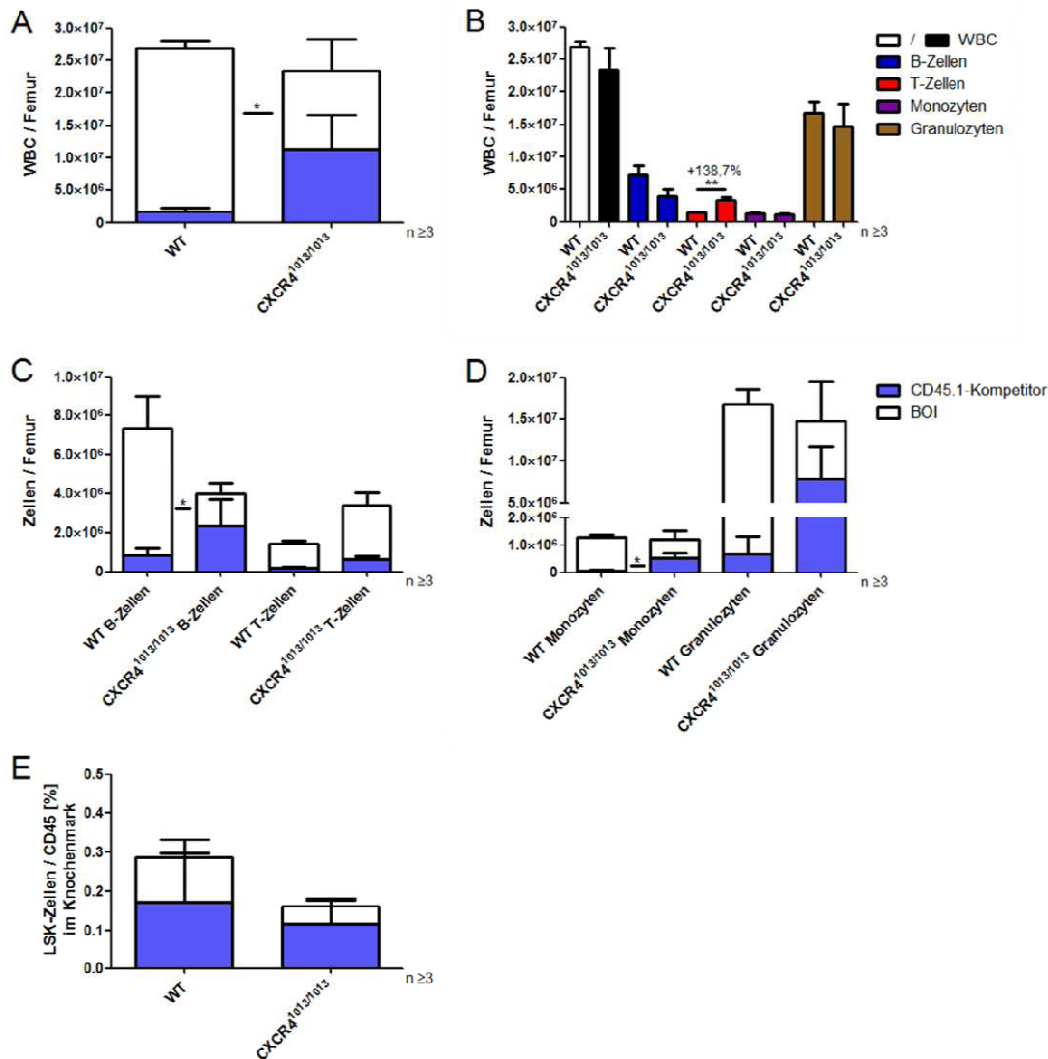


Abbildung 3.34. Endanalyse des Knochenmarks 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit CD45.1-Kompetitor. A) Die Gesamtzellzahl wurde durch automatische Hämazytometrie bestimmt, die Anteile des *bone marrow of interest* (BOI) und CD45.1-Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. B) Immunphänotypische Analyse des Knochenmarks. Die Summe der CD45.1- und CD45.2-Zellen wurde als Referenz genutzt. Die reifen Zellen wurden anhand von Antikörpern gegen B220 (B-Zellen), CD3 (T-Zellen), CD11b (Monozyten) und CD11b und Gr1 (Granulozyten) differenziert. C) Die Beiträge von CD45.1-Kompetitorzellen und wildtypischen/CXCR4^{1013/1013}-Zellen wurde in B- und T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. D) Die Beiträge von CD45.1-Kompetitorzellen und wildtypischen/CXCR4^{1013/1013}-Zellen wurden in Monozyten und Granulozyten durchflusszytometrisch analysiert. E) Die Frequenz der LSK-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und auf die Gesamtzahl der CD45.1- und CD45.2-Zellen normalisiert. Signifikante Unterschiede sind prozentual zur WT/CD45.1-Transplantation angegeben. Auf der X-Achse ist jeweils nur das BOI der Transplantation aufgetragen. MW \pm SEM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. $n \geq 3$.

Wie im Knochenmark konnte auch in der Milz die Überlegenheit wildtypischer Zellen über CD45.1-Zellen nachgewiesen werden ($p = 0,011$) (Abb. 3.35.A). Der immunphänotypische Vergleich von WT/CD45.1-Empfängern und CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Empfängern lieferte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (3.35.B). Es konnte ein erhöhter Anteil wildtypischer B-Zellen ($p = 0,011$) und ein erhöhter Anteil von CD45.1-Zellen ($p = 0,046$) in den Empfängern von CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Zellen

nachgewiesen werden (Abb. 3.35.C). Monozyten und Granulozyten waren in der Milz bezüglich ihrer Gesamtzahl und Zusammensetzung von BOI/CD45.1-Kompetitor unauffällig (Abb. 3.35.D).

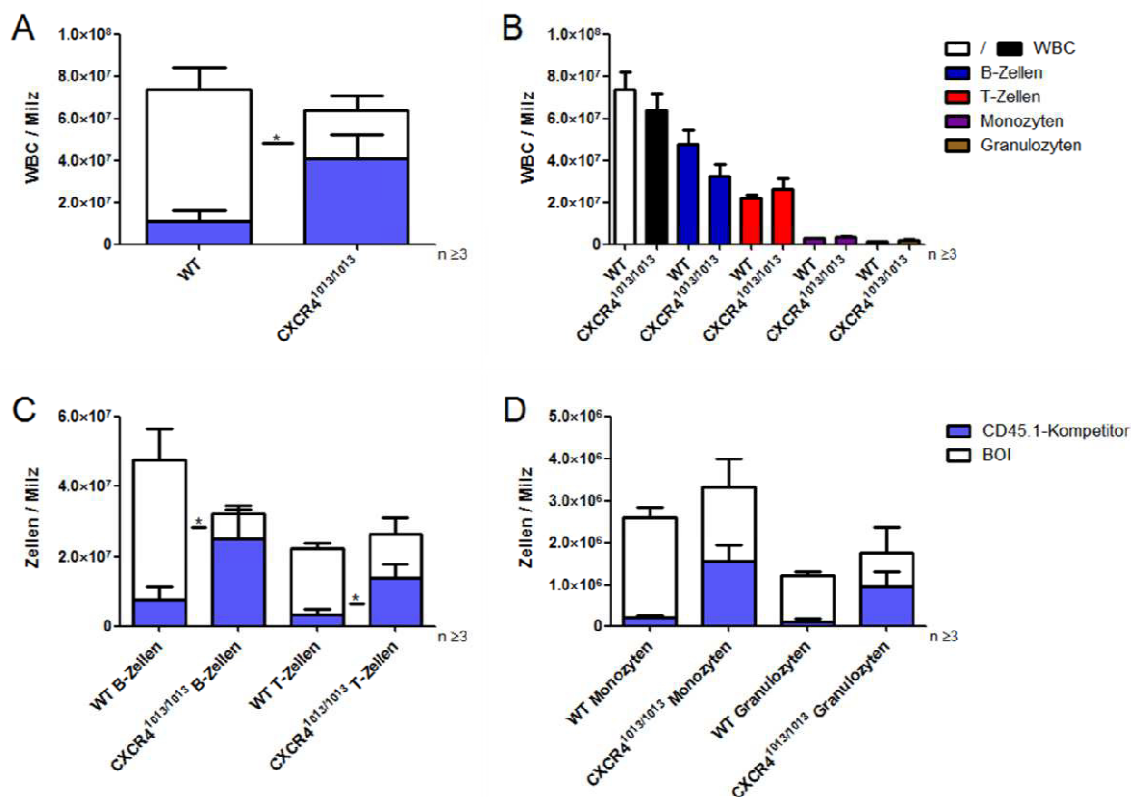
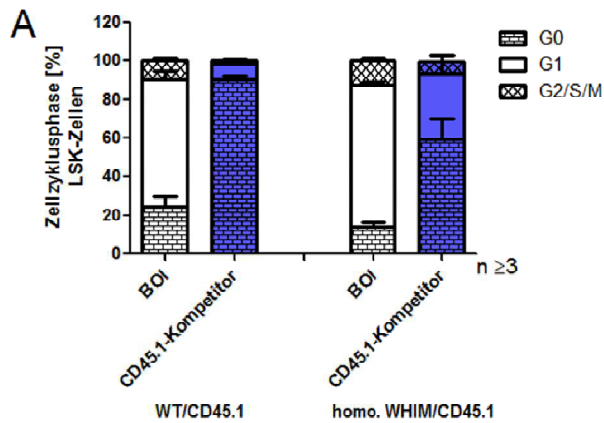


Abbildung 3.35. Endanalyse der Milz 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit CD45.1-Kompetitor. A) Die Gesamtzellzahl wurde durch automatische Hämazytometrie bestimmt, die Anteile des *bone marrow of interest* (BOI) und CD45.1-Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. B) Immunphänotypische Analyse des Knochenmarks. Die Summe der CD45.1- und CD45.2-Zellen wurde als Referenz genutzt. Die reifen Zellen wurden anhand von Antikörpern gegen B220 (B-Zellen), CD3 (T-Zellen), CD11b (Monozyten) und CD11b und Gr1 (Granulozyten) differenziert. C) Die Beiträge von CD45.1-Kompetitorzellen und wildtypischen/CXCR4^{1013/1013}-Zellen wurde in B- und T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. D) Die Beiträge von CD45.1-Kompetitorzellen wurden in Monozyten und Granulozyten durchflusszytometrisch analysiert. Signifikante Unterschiede sind prozentual zur WT/CD45.1-Transplantation angegeben. Auf der X-Achse ist jeweils nur das BOI der Transplantation aufgetragen. MW \pm SEM. * = $p < 0,05$. $n \geq 3$.

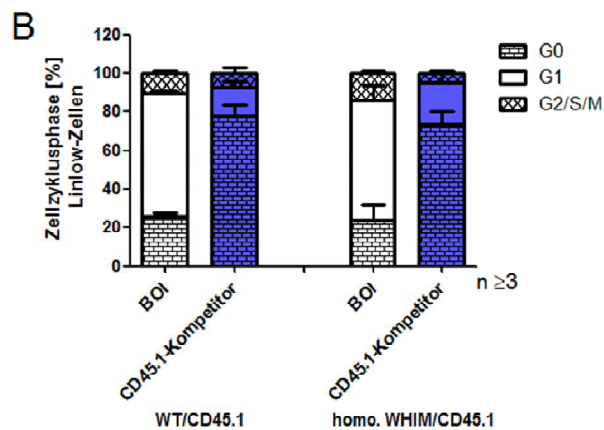
In diesem Transplantationsregime wurde ebenfalls der Zellzyklus in LSK-, Lin^{low}- und Lin⁺-Zellen im Knochenmark untersucht. Die Zellzyklusanalyse nach BOI/UBC-GFP-Kompetitor ergab keine Unterschiede (vgl. Abb. 3.30.). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.36. dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die signifikanten Änderungen tabellarisch neben der Abbildung aufgelistet.

Die Zellzyklusanalyse nach BOI/CD45.1-Kompetitor-Transplantation konnte die Ergebnisse teilweise reproduzieren. So konnte gezeigt werden, dass sich in keiner Subpopulation die Zellzyklus-Aktivität von wildtypischen oder CXCR4^{1013/1013}-Zellen unterscheidet (Abb. 3.36. A-C, Zeile 2). Ebenso konnte gezeigt werden, dass sich auch die Kompetitoren im Vergleich nicht unterscheiden (Abb. 3.36. A-C, Zeile 5). Die beobachteten Unterschiede beziehen sich jeweils auf den Vergleich des CD45.1-Kompetitors mit dem jeweiligen BOI. Es konnte gezeigt werden, dass die CD45.1-Zellen im Vergleich

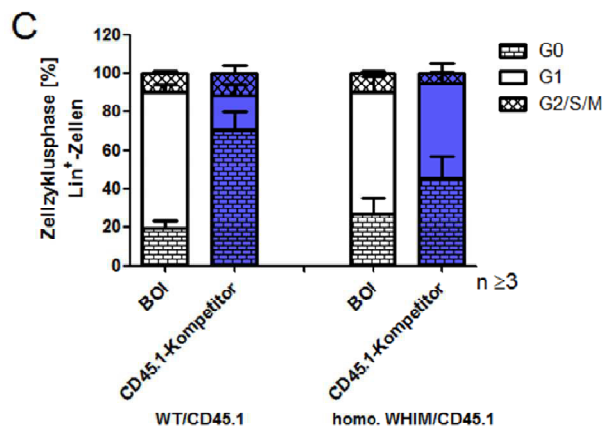
zu den wildtypischen, aber auch zu den CXCR4^{1013/1013}-Zellen, sich vermehrt in der G0-Phase befinden, d.h. zellzyklisch weniger aktiv sind (Abb. 3.36. A-C, Zeile 1/6, Spalte G0) mit einer korrespondierenden Verringerung der entsprechenden G1-Phase (Abb. 3.36. A-C, Zeile 1/6, Spalte G1).



Vergleich	G0	G1	G2/S/M
WT vs. Kompetitor (WT)	***	***	ns
WT vs. CXCR4 ^{1013/1013}	ns	ns	ns
WT vs. Kompetitor (CXCR4 ^{1013/1013})	*	*	ns
CXCR4 ^{1013/1013} vs. Kompetitor (WT)	***	***	*
Kompetitor (WT) vs. Kompetitor (CXCR4 ^{1013/1013})	ns	ns	ns
CXCR4 ^{1013/1013} vs. Kompetitor (homo. WHIM)	**	**	ns



Vergleich	G0	G1	G2/S/M
WT vs. Kompetitor (WT)	**	**	ns
WT vs. CXCR4 ^{1013/1013}	ns	ns	ns
WT vs. Kompetitor (CXCR4 ^{1013/1013})	**	**	ns
CXCR4 ^{1013/1013} vs. Kompetitor (WT)	***	**	ns
Kompetitor (WT) vs. Kompetitor (CXCR4 ^{1013/1013})	ns	ns	ns
CXCR4 ^{1013/1013} vs. Kompetitor (CXCR4 ^{1013/1013})	**	**	**



Vergleich	G0	G1	G2/S/M
WT vs. Kompetitor (WT)	*	*	ns
WT vs. CXCR4 ^{1013/1013}	ns	ns	ns
WT vs. Kompetitor (CXCR4 ^{1013/1013})	ns	ns	ns
CXCR4 ^{1013/1013} vs. Kompetitor (WT)	*	*	ns
Kompetitor (WT) vs. Kompetitor (CXCR4 ^{1013/1013})	ns	ns	ns
CXCR4 ^{1013/1013} vs. Kompetitor (CXCR4 ^{1013/1013})	ns	ns	ns

Abbildung 3.36. Zellzyklusanalyse im Knochenmark nach kompetitiver Transplantation mit CD45.1-Kompetitor. Knochenmarkszellen wurden zur Unterscheidung der Subpopulationen mit einem Lineage-Cocktail, Sca-1- und cKit-Antikörpern gefärbt. Nach einer Fixation/Permeabilisierung wurde Ki-67 durch einen spezifischen Antikörper und die DNA mit Hilfe von 7-AAD gefärbt. In (A) sind LSK-, in (B) Lin^{low}- und in (C) Lin⁺-Zellen dargestellt. Die linken Balken stellen jeweils das WT/CD45.1-Transplantationsregime dar, die jeweils rechten Balken das CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Transplantationsregime. Signifikante Unterschiede sind tabellarisch neben der entsprechenden Abbildung aufgetragen. MW±SEM. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. n ≥ 3.

Ebenfalls sollte in dem BOI/CD45.1-Transplantationsregime eine Sekundärtransplantation durchgeführt werden. Knochenmark aus den jeweiligen Gruppen wurde am Ende der Primärtransplantation vereinigt und 300.000 Zellen in UBC-GFP Empfänger transplantiert, um potentielle autologe Rekonstitution detektieren zu können. Es wurden 4 Tiere mit WT/CD45.1-Knochenmark und 5 Tiere mit CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Knochenmark transplantiert. Allerdings musste der Versuch an Tag 62 abgebrochen werden, da zu diesem Zeitpunkt alle mit CXCR4^{1013/1013}/CD45.1 Knochenmark transplantierten Tiere verstorben waren. In Abb. 3.37. ist das Engraftment für WT/CD45.1-Empfänger (Abb. 3.37.A) und CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Empfänger (Abb. 3.37.B) dargestellt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass in Empfängern von WT/CD45.1-Knochenmarkzellen mehr als doppelt so viele zirkulierende Leukozyten gemessen wurden. Diese Zellen waren nahezu ausnahmslos wildtypischen Ursprungs (Abb. 3.37.A), wie zu erwarten war, da das Transplantat nur noch nahezu ausschließlich wildtypische Knochenmarkzellen enthielt (vgl. Abb. 3.34.A). Die zirkulierenden Leukozyten in CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Empfängern waren hingegen nahezu alle auf das Kompetitorknochenmark zurückzuführen (Abb. 3.37.B), obwohl ca. 50% CXCR4^{1013/1013}-Zellen transplantiert worden waren (vgl. Abb. 3.34.A). Der Vergleich zur Sekundärtransplantation im BOI/UBC-GFP-Transplantation (vgl. Kap. 3.4.3.4.) macht deutlich, dass die Empfänger von CXCR4^{1013/1013}/Kompetitor-Knochenmark ohne einen erheblichen Anteil autologer Rekonstitution nicht überlebensfähig waren.

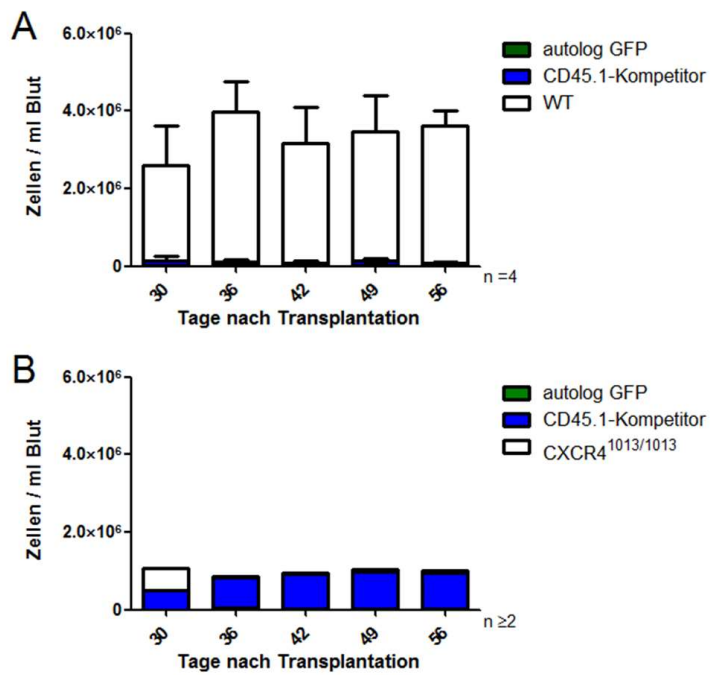


Abbildung 3.37. Engraftment nach Sekundärtransplantation mit CD45.1-Kompetitorzellen. In Folge der Endanalyse der Primärtransplantation wurden 9 letal bestrahlte (9,5 Gy) UBC-GFP-Empfänger sekundärtransplantiert. 4 erhielten WT/CD45.1-Knochenmark, 5 CXCR4^{1013/1013}/CD45.1 Knochenmark. Den Tieren wurde zu den indizierten Zeitpunkten Blut entnommen, die Zellzahl bestimmt und der Anteil der unterschiedlichen Populationen durchflusszytometrisch bestimmt. In (A) ist das Engraftment für die Empfänger von WT/CD45.1-Knochenmark und in (B) das Engraftment für die Empfänger von CXCR4^{1013/1013}/CD45.1-Knochenmark dargestellt. $n \geq 2$.

3.5. Auswirkungen der WHIM-Mutation in einem Leukämie-Modell

Es wurde bereits beschrieben, dass eine CXCR4-Überexpression in verschiedenen Krebsentitäten zu einer Verschlechterung der Prognose führt (Arya et al, 2004; Darash-Yahana et al, 2004; Phillips et al, 2003; Speetjens et al, 2009; Su et al, 2005; Terasaki et al, 2011; Williams et al, 2010). Im Besonderen führen WHIM-ähnliche Mutationen im Morbus Waldenström zu einer aggressiveren Variante (Hunter et al, 2014; Treon et al, 2014). Auswirkungen von WHIM-ähnlichen Mutationen sind für leukämische Erkrankungen bisher nicht beschrieben. Hier wurde eine CXCR4^{1013/1013}-Mutation in einem induzierten akuten myeloischen Leukämie-Modell (AML) (MLL-AF9-System) hinsichtlich der Überlebensrate getestet (Mulloy et al, 2008).

3.5.1 Leukämie-Primärtransplantation

Die Induktion wurde wie in Kap. 2.2.5.12 beschrieben in 5-Fluorouracil depletierten Knochenmarkzellen durchgeführt und nach zweimaliger Transduktion mit einem MLL-AF9-Lentivirus wurden 500.000 Zellen über die Schwanzvene in subletal bestrahlte (2x 450 Gy) wildtypische Empfänger transplantiert. Das Überleben primär transplantiert Tiere wurde täglich überwacht und moribunde Tiere schmerzfrei getötet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Empfänger MLL-AF9 transduzierter CXCR4^{1013/1013}-Zellen einen geringen, aber statistisch signifikanten Überlebensnachteil gegenüber den wildtypischen Kontrollen hatten ($p = 0,002$) (Abb. 3.38.). Der mittlere Überlebenszeitraum für Empfänger transduzierter wildtypischer Zellen betrug dabei 64 Tage, für Empfänger transduzierter CXCR4^{1013/1013}-Zellen 57 Tage.

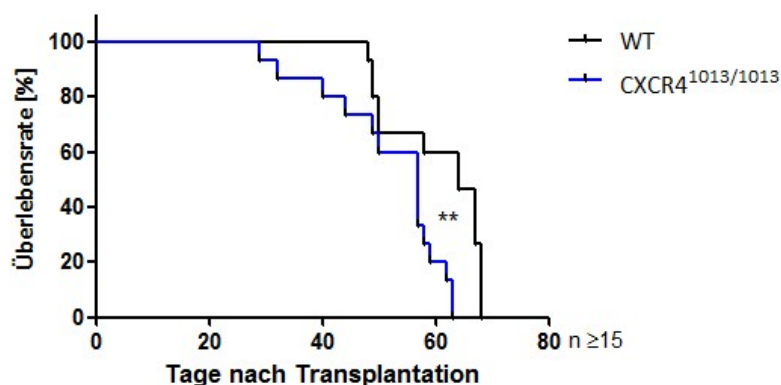


Abbildung 3.38. Überlebensrate nach primärer Leukämietransplantation. Zweifach mit MLL-AF9 transduziertes 5-FU depletiertes Knochenmark (500.000 Zellen) wurde in subletal bestrahlte (2x 450 Gy) wildtypische Empfänger transplantiert, die täglich überwacht wurden. Moribunde Tiere wurden schmerzfrei getötet. ** = $p < 0,01$. $n \geq 15$.

3.5.2 Leukämie-Sekundärtransplantation

Die Sekundärtransplantation lieferte kein eindeutiges Ergebnis. Die Sekundärtransplantation wurde durchgeführt, nachdem in der primären Kohorte eine durchschnittliche periphere Tumorlast von über 50% detektiert wurde. Dabei wurden Tumorzellen als $\text{Transgen}^+\text{Gr1}^+$ definiert. Drei Tiere wurden aus der primären Kohorte entfernt, das Knochenmark isoliert, immunomagnetisch Lineage-depletiert und anschließend auf $\text{Lin}^-\text{Transgen}^+$ sortiert. 15.000 der sortierten Zellen wurden mit 2×10^6 wildtypischen Kompetitorzellen in subletal bestrahlte (2×450 Gy) wildtypische Empfänger transplantiert. Analog zur Primärtransplantation (Kap. 3.4.4.1.) wurden die Tiere täglich überwacht und moribunde Tiere schmerzfrei getötet. Zunächst wurde der Eindruck der Primärtransplantation bestätigt und ein Überlebensnachteil nach Transplantation mit MLL-AF9-transduzierten $\text{CXCR4}^{1013/1013}$ -Zellen bestätigt ($p = 0,002$). Das mittlere Überleben wurde mit 63 Tagen für Empfänger von transduzierten wildtypischen Zellen und 43 Tage für Empfänger von transduzierten $\text{CXCR4}^{1013/1013}$ -Zellen berechnet (Abb. 3.39.A). In einer Reproduktion hingegen verhielt es sich umgekehrt. Die Empfänger von $\text{CXCR4}^{1013/1013}$ -Zellen überlebten im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen länger ($p < 0,001$). Das mittlere Überleben der Empfänger transduzierter wildtypischer Zellen betrug dabei 23 Tage, das der Empfänger transduzierter $\text{CXCR4}^{1013/1013}$ -Zellen 52 Tage (Abb. 3.39.B). Abb. 3.39.C zeigt die Kombination beider Experimente. Es ergibt sich kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen und das mittlere Überleben betrug 58 Tage für die Empfänger transduzierter wildtypischer Zellen und 46,5 Tage für die Empfänger transduzierter $\text{CXCR4}^{1013/1013}$ -Zellen. Dabei ist auffällig, dass sich die transduzierten $\text{CXCR4}^{1013/1013}$ -Zellen in beiden Experimenten sehr ähnlich verhielten, so dass möglicherweise eine nicht kontrollierte Variable der Kontrollgruppe für das widersprüchliche Ergebnis verantwortlich ist (Abb. 3.39.A/B).

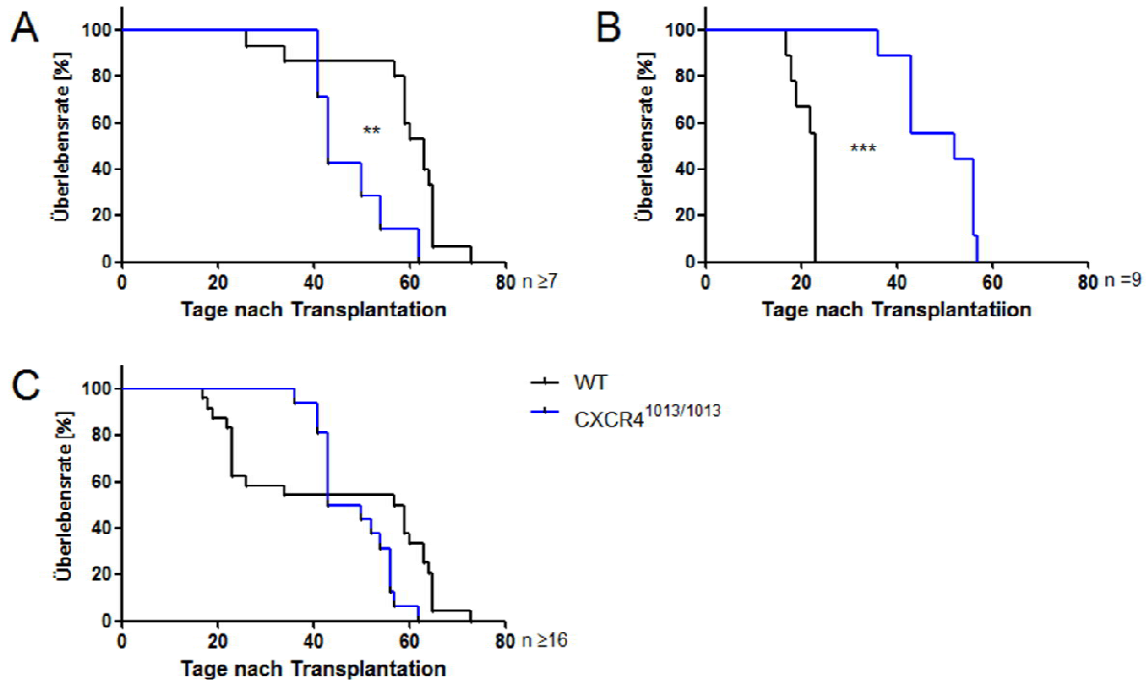


Abbildung 3.39. Überlebensrate nach sekundärer Leukämietransplantation. Nach Erreichen einer peripheren Tumorlast von 50% in primär transplantierten Tieren wurden je 3 Tiere aus den Gruppen getötet, das Knochenmark gesammelt und immunmagnetisch Lineage-depletiert. Anschließend wurde das Knochenmark auf Lineage^{Transgen}⁺ durchflusszytometrisch sortiert. 15.000 sortierte Zellen wurden mit 2×10^6 wildtypischen Zellen pro Maus in sublethal bestrahlte (2×450 Gy) wildtypische Empfänger transplantiert. Die Tiere wurden täglich überwacht und moribunde Tiere schmerzfrei getötet. ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. $n \geq 7$.

3.5.3. Behandlung mit Cytarabin

Zur Behandlung einer AML wird häufig das Zytostatikum Cytarabin (AraC) eingesetzt. Es sollte untersucht werden, ob die untersuchte WHIM-Mutation Auswirkungen auf eine mögliche Behandlung mit AraC hat. Sekundärtransplantierte Empfänger wurden ab der 2. Woche nach Transplantation alternierend jeweils 5 Tage mit AraC (150 mg/kg in 0,9% NaCl-Lösung, i.p.) behandelt, anschließend konnten die Tiere eine Woche regenerieren. Die Behandlung wurde auf diese Weise bis zum Tod der Tiere an Leukämie fortgeführt. Es konnte durch die AraC-Behandlung allerdings kein Überlebensvorteil im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten Kontrollgruppe ermittelt werden (Abb. 3.40.).

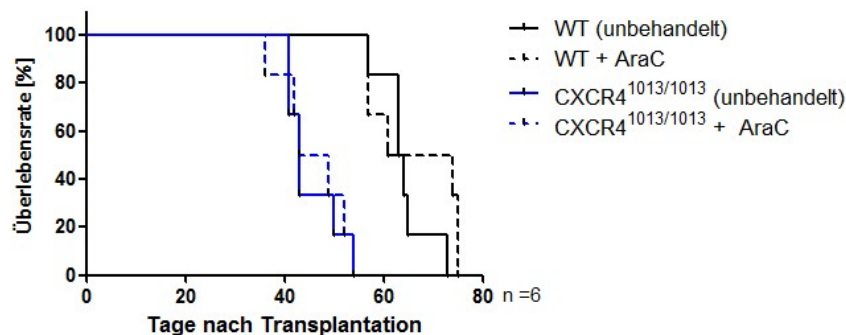


Abbildung 3.40. Behandlung der induzierten AML mit Cytarabin. Nach Erreichen einer peripheren Tumorlast von 50% in primär transplantierten Tieren wurden je 3 Tiere aus den Gruppen getötet, das Knochenmark gesammelt und immunomagnetisch Lineage-depletiert. Anschließend wurde das Knochenmark auf Lineage-Transgen⁺durchflusszytometrisch sortiert. 15.000 sortierte Zellen wurden mit 2×10^6 wildtypischen Zellen pro Maus in subletal bestrahlte (2×450 Gy) wildtypische Empfänger transplantiert. Ab Tag 14 nach Transplantation wurden die Tiere 5 Tage mit Cytarabin behandelt, anschließend konnten die Tiere eine Woche regenerieren. Dieses Behandlungsschema wurde bis zum Tod der Tiere fortgesetzt. Die Tiere wurden täglich überwacht, moribunde Tiere wurden schmerzfrei getötet. $n = 6$.

4. Diskussion

Die Bedeutung der CXCR4-CXCL12-Achse insbesondere auch für die Hämatopoese wurde bereits in der Einleitung grob skizziert. Allerdings beruhen unsere Annahmen über die physiologische Funktion dieses entscheidenden Signalwegs maßgeblich auf subtraktiven Studien in *knock-out* Modellen oder nach pharmakologischer Inaktivierung von CXCR4 oder CXCL12. Allgemeine Schwächen organismischer Modelle – Kompensation durch alternative Signalwege, Schwierigkeiten bei der Differenzierbarkeit primärer und sekundärer Phänomene – könnten bei CXCR4/CXCL12 aufgrund der Kritikalität des Signalweges *quoad vitam* besonders zutage treten.

Durch die Generierung eines WHIM-Mausmodells durch Balabanian und Kollegen (Balabanian et al, 2012) wurde die Möglichkeit geschaffen, die CXCR4-CXCL12-Achse in einem CXCR4-überaktiven System zu untersuchen. Diese überaktive Mutante, generiert durch Deletion des Poly-Serin Tail am C-Terminus, sollte mit einer qualitativ veränderten Signalintegration einher gehen, ist somit konzeptionell verschieden von einer einfachen Überexpression eines Vollängenrezeptors unter der Kontrolle eines ubiquitären Promoters, wo mutmaßlich maximal quantitative Veränderungen in der Rezeptorantwort zu beobachten sein sollten. Im Gegensatz zu den embryonal letalen *knock-out* Modellen ermöglicht es das WHIM-Modell, die CXCR4-CXCL12-Achse in einem weitgehend funktionellen adulten Organismus zu studieren. Diese *gain-of-function* Analysen sind kritisch, um das Vollbild der Rolle von CXCR4 für reife und unreife Hämatopoese zu deduzieren, wie das folgende Beispiel anschaulich macht: Deletion von CXCR4 oder CXCL12 führte zu einer fast vollständigen B-Zell-Aplasie (Ma et al, 1998; Nagasawa et al, 1996; Sugiyama et al, 2006). Diese Daten wurden interpretiert als Beweis einer kritischen Abhängigkeit der B-Zell-Linienspezifizierung vom CXCR4/CXCL12 Signalweg, was sicher richtig ist, aber nach dieser Hypothese sollte eine überschießende Aktivität dieses Signalwegs zu einer B-Zell-Hyperplasie führen. Unsere und die Beobachtungen anderer Gruppen, aber auch Untersuchungen bei Patienten mit *gain-of-function* Mutationen im CXCR4, zeigen jedoch genau das Gegenteil, nämlich eine ausgeprägte zumindest quantitative Defizienz der B-Zell-Linie (Badolato & Donadieu, 2017; Kawai & Malech, 2009). Diese Daten fordern eine Neubewertung der Rolle von CXCR4/CXCL12, der zufolge eine kritische Signaldosis erforderlich ist, um die normale B-Zell-Homöostase einzustellen. Wir postulieren an dieser Stelle, dass Analoges auch für andere CXCR4/CXCL12-responsive hämatopoetische Zellsysteme gelten sollte, was im Weiteren zu diskutieren sein wird.

4.1. Einfluss der hyperaktiven CXCR4-Mutanten auf homöostatische HSPC

Die CXCR4-CXCL12-Achse ist nachweislich kritisch in verschiedene Prozesse der hämatopoetischen Stammzellbiologie involviert, wenn auch Details der Signalverarbeitung, sogar des Signalangebotes (lösliches vs. stromagebundenes CXCL12, direkte Effekte über CXCR4 auf Stammzellen vs. indirekte über CXCR4 auf reifen hämatopoetischen oder nicht-hämatopoetischen Nischenzellen, etc.), unklar bleiben. Durch die embryonale Letalität des CXCR4 *knock-outs* ist die Vergleichbarkeit zwischen diesen Studien und Studien in adulten Tieren schwierig. Der Ort der embryonalen Hämatopoese ist zunächst die fötale Leber (FL). Im Laufe der Embryogenese besiedeln die fötalen HSPC das Knochenmark in dem maßgeblich die adulte Hämatopoese stattfindet (Kikuchi & Kondo, 2006). Histologisch konnte gezeigt werden, dass CXCR4-Defizienz zu einer Hypozellularität des Knochenmarks an E15,5 führt (Ma et al, 1998). In Transplantationsexperimenten von CXCR4-defizienten FL-Zellen konnte die grundsätzliche Funktionalität (Repopulationskapazität) der HSPC gezeigt werden. CXCR4-defiziente FL-Zellen waren in der Lage, das Knochenmark letal bestrahlter Empfängertiere zu repopulieren und es konnte eine vergleichbare Anzahl LSK-Zellen in Empfängern CXCR4-kompetenter und -defizienter Zellen ermittelt werden (Kawabata et al, 1999; Ma et al, 1999). Im Einklang mit der Hypothese der „versorgenden Nische“ konnte gezeigt werden, dass die Transplantation CXCL12-defizienter FL-Zellen zu einem unauffälligen Blutbild führt, da die Stromazellen des Empfängerorganismus CXCL12-kompetent waren ((Kawabata et al, 1999) und eigene, nicht publizierte Daten). Aus diesen Daten wurde geschlussfolgert, dass die Migration zwischen der FL und dem Knochenmark ein CXCR4/CXCL12-abhängiger Prozess ist und damit die Signalachse für die Lokalisation von HSPC verantwortlich ist. Bestärkt wird diese These durch die Ergebnisse von Wright und Kollegen. In einem Vergleich verschiedener Chemokine konnten sie zeigen, dass HSPC *in vitro* ausschließlich gegen einen CXCL12-Gradienten migrieren (Wright et al, 2002). Zum Studium adulter Systeme wurden verschiedene linienspezifische CXCR4 *knock-out* Modelle verwendet. Allerdings kommen diese Studien zu keinem einheitlichen Bild. Bezüglich der Knochenmark HSPC-Population wurde berichtet, dass der HSPC-Pool nach Induktion des CXCR4 *knock-outs* verkleinert (Sugiyama et al, 2006), expandiert (Tzeng et al, 2011) oder normal groß (Nie et al, 2008) vorliegt. Diese Widersprüche können allerdings – partiell – durch die genaue Betrachtung der Daten aufgelöst werden, da HS(P)C nicht einheitlich definiert genutzt wird. So zeigen Sugiyama und Kollegen eine Reduktion von LSK CD34⁻-Zellen und begründen diese mit erhöhter Zellzyklusaktivität und Ausreifung, Tzeng und Kollegen hingegen beschreiben eine vergrößerte LSK-Population. Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse könnten allerdings in Einklang gebracht werden, da es sich bei LSK-Zellen um eine relativ reifere Population handelt, die aus den LSK CD34⁻-Zellen an der Apex der Stammzellhierarchie hervorgeht. Ein weiterer Unterschied dieser Studien sind unterschiedliche Induktionsagenzien. So wurde postuliert, dass das Induktionsagens

Polyinosinsäure:Polycytidylsäure des Mx1Cre-Systems (welches in der Arbeit von Sugiyama und Kollegen genutzt wurde) möglicherweise die Zellzyklusaktivität/Proliferation von HSPC anregt (Nie et al, 2008), dies konnte allerdings in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden (Velasco-Hernandez et al, 2016). Unabhängig von diesen Diskrepanzen konnte in allen Studien für CXCR4-defiziente HSPC sowohl eine gesteigerte Zellzyklusaktivität, als auch ein vergrößerter HSPC-Pool im Peripherblut nachgewiesen werden. Dies könnte sowohl mit der erhöhten Proliferation, aber auch mit dem Verlust des Retentionssignals durch die CXCR4/CXCL12-Achse erklärt werden. Dieser Effekt konnte ebenfalls durch eine Dauerinfusion mit pharmakologischen CXCR4-Antagonisten beobachtet werden (Karpova et al, 2017). Ein weiterer Nachteil der subtraktiven Analyse ist die fehlende Möglichkeit die Signalweiterleitung nach der Aktivierung von CXCR4 durch CXCL12 zu untersuchen. GRK6-defiziente (G-Protein Rezeptor Kinase 6) Mäuse weisen eine verstärkte zelluläre Antwort nach CXCL12-Aktivierung auf, dies wurde durch Chemotaxis-Experimente sowie die Aktivierung des MAPK-Signalweges nachgewiesen (Chudziak et al, 2015). GRK-Proteine phosphorylieren C-terminale Reste G-Protein gekoppelter Rezeptoren, wodurch die Internalisierung und damit das Abschalten des Signals initiiert wird. Chudziak und Kollegen konnten lediglich einen milden Phänotyp GRK6-defizienter Mäuse nachweisen, was durch einen kompensatorischen Effekt anderer Proteine der GRK-Familie begründet werden kann. Durch die hohe Konservierung der CXCR4-CXCL12-Signalachse wird kein vergleichbarer Kompensationsmechanismus erwartet.

Ein interessanter Ansatz wurde von Lai und Kollegen verfolgt. Um eine Überaktivierung zu erreichen, wurden HSPCs aufgereinigt und anschließend mit wildtypischen oder C-terminal trunkierten CXCR4 (Δ CXCR4) retroviral transduziert. In Δ CXCR4-Zellen konnte eine verminderte CXCR4-Internalisierung nach CXCL12-Aktivierung, ein erhöhtes Migrationspotential, sowie eine verstärkte Aktivierung des MAPK-Signalweges festgestellt werden im Vergleich zu wildtypisch transduzierten Zellen. Außerdem beobachtete die Gruppe eine tendenziell stufenweise verbesserte Proliferation der transduzierten Zellen (Δ CXCR4 > WT > Mock/nicht transduziert) *in vitro* (Lai et al, 2014). Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu den Schlussfolgerungen aus den zuvor beschriebenen subtraktiven Studien. Allerdings ist die Vergleichbarkeit zwischen *in vitro* und *in vivo* Experimenten grundsätzlich schwierig. Zell-Zell-Kontakte insbesondere mit nicht-hämatopoetischen Knochenmarkzellen, das Angebot von CXCL12 (löslich vs. gebunden), sowie die Kombination und auch Konkurrenz um verschiedene Zytokine (im Beispiel des CXCL12 noch in unterschiedlichen Konzentrationen) sind *in vitro* nicht nachstellbar. Nichtsdestotrotz liefert dieses Experiment eine wichtige Erkenntnis: nicht immer liefert dasselbe Signal auch dieselbe zelluläre Antwort. Offenbar wird die zelluläre Antwort auch von der zellulären Umgebung der Zellen beeinflusst.

Zusammenfassend können aus diesen Daten diverse Hypothesen für den Einfluss eines überaktiven CXCR4-Rezeptors auf die Stammzellbiologie in der Homöostase abgeleitet werden. Der starke und selektiv von CXCL12-abhängige Migrationsphänotyp könnte zu einer Relokalisation der Stammzellen im Organismus führen. Im Besonderen könnte eine verstärkte Retention der HSPC im Knochenmark erwartet werden. Nicht nur die Lokalisation, sondern auch der Stammzellpool an sich könnte verändert sein, diesbezüglich sind die Daten nicht eindeutig, was die Hypothesengenerierung erschwert. Davon abhängig muss auch die Proliferationsrate untersucht werden. Eine stärker proliferierende Zellpopulation könnte eine Erklärung für einen vergrößerten HSPC-Pool sein und umgekehrt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die aberrante Aktivierung - sowohl verstärkt als auch deutlich verlängert - des CXCR4-Rezeptors nach Ligandenbindung in HSPC durch drei unterschiedliche Methoden *in vitro* nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die frühen zellulären Antworten, wie die F-Aktin Polymerisierung (vgl. Abb. 3.14) und die Aktivierung des MAPK-Signalwegs am Beispiel der Erk-Phosphorylierung (vgl. Abb. 3.16), als auch die späten funktionellen Konsequenzen am Beispiel von Transwell-Migrationsassays (vgl. Abb. 3.13) in CXCR4^{1013/1013}-Zellen verstärkt detektierbar waren. Freitas und Kollegen konnten vergleichbare Migrationsergebnisse mit aufgereinigten Lineage⁻-Zellen erreichen (Freitas et al, 2017). Wie allerdings zuvor erläutert, sind *in vitro* Ergebnisse nicht unbedingt mit den *in vivo* Einflüssen korrelierbar. Die vorherrschende Meinung beschreibt eine hohe CXCL12-Konzentration innerhalb der Stammzellnische. Den hier eingesetzten Zellen wird bewusst CXCL12 entzogen, um die Rezeptorantwort zu untersuchen. Zur Verfeinerung der Ergebnisse könnte eine Restimulation mit CXCL12 nach der initialen Stimulation (für F-Aktin Polymerisierung und MAPK-Signalweg) oder sogar eine Präinkubation mit CXCL12 (für alle drei eingesetzten Analysemethoden) genutzt werden, um sich einer *in vivo* Situation anzunähern. Dies gilt im Besonderen, da eine im Vergleich zu wildtypischen Tieren erhöhte CXCL12-Konzentration in der Knochenmarkflüssigkeit von CXCR4^{1013/1013}-Tieren nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 3.11.). Diese erhöhte CXCL12-Konzentration kann entweder durch eine erhöhte CXCL12-Produktion oder eine Akkumulation von CXCL12 durch verminderten Verbrauch (Verbrauch über Rezeptorbindung und Internalisierung, aber auch lokale Proteolyse durch verschiedene Metalloproteasen) hervorgerufen werden (Levesque et al, 2003; McQuibban et al, 2001; Steinl et al, 2013). Freitas und Kollegen konnten ebenfalls eine erhöhte CXCL12-Konzentration in der Milz detektieren (Freitas et al, 2017) und auf Transkriptionsniveau nachweisen, dass keine erhöhte CXCL12-Genexpression vorliegt. Dies kann ebenfalls für die Situation im Knochenmark angenommen werden. Zur Klärung dieser Frage könnte eine RT-PCR auf Stromazellen (z.B. Ter119⁻CD45⁻-Zellen) eingesetzt werden. Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine Akkumulation von CXCL12 hin, welche möglicherweise durch die gestörte Internalisierung des Rezeptors verursacht wird. Durch diese schlechtere Internalisierung

des Rezeptors könnte es in den Aktivierungs-Experimenten zu einem inversen Ausgang kommen, nämlich dass weniger CXCR4 auf der Oberfläche der CXCR4^{1013/1013}-Zellen zusätzlich aktiviert werden kann (geringes Delta zwischen Basalaktivierung und Stimulation), da bereits ein Anteil des extrazellulär präsentierten CXCR4s aktiviert ist und nicht internalisiert wurde. Dadurch könnten minimale Schwankungen im CXCL12-Konzentrationsgradienten möglicherweise von CXCR4^{1013/1013}-Zellen nicht adäquat verarbeitet werden. Somit könnte es netto zu einer Abschwächung des Signals kommen. Dieser Effekt könnte unter anderem auch die beschriebene Myelokathexis bei Patienten mit heterozygoter CXCR4¹⁰¹³-Mutation erklären. Dabei ist festzuhalten, dass die beobachtete CXCR4-Überaktivierung nicht durch eine Überexpression des Rezeptors auf der Zelloberfläche hervorgerufen wird, vielmehr ist die mittlere Fluoreszenzintensität nach Färbung mit anti-CXCR4 Antikörper bei WT und CXCR4^{1013/1013}-LSK-Zellen gleich (vgl. Abb. 3.7.). Der erhöhte Nachweis von CXCR4-Transkript in Lineage⁻CD117⁺-Zellen (vgl. Abb. 3.8.) könnte durch differenzielle Verunreinigung durch andere Zellen (es wurden eine ca. 80% reine Population für die Analyse verwendet) oder durch Zellen erklärt werden, welche bereits erste Differenzierungsschritte, z.B. zu B-Zellen, durchlaufen haben und in WT und CXCR4^{1013/1013}-Mäusen unterschiedlich verteilt sind. Für hinreichend angereicherte Populationen (durchflusszytometrisch sortiert) postulieren wir keine Unterschiede bezüglich der Genexpression von CXCR4. Auch Freitas und Kollegen detektieren durchflusszytometrisch eine vergleichbare CXCR4-Oberflächenexpression von wildtypischen bzw. CXCR4^{1013/1013}-HSPC. Allerdings werden nur ca. 15% der LSK-SLAM-Zellen als CXCR4⁺ detektiert. Dies widerspricht zum einen den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen (nicht gezeigt), als auch anderen publizierten Daten, in denen eine CXCR4-Expression auf mindestens 80% der LSK-SLAM-Zellen sowohl durchflusszytometrisch als auch via RT-PCR auf Einzelzellbasis nachgewiesen wurde (Ciriza et al, 2012). Diese Diskrepanz lässt sich eventuell durch die unterschiedliche Antikörperklone gegen CXCR4 erklären.

Zwar konnte eine verminderte Zahl HSPC im Peripherblut von CXCR4^{1013/1013}-Tieren nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.5.A), allerdings kann aus den vorliegenden Daten ein Retentionsdefekt im Knochenmark weder festgestellt, noch ausgeschlossen werden. Im Knochenmark konnten weder funktionell (vgl. Abb. 3.5.B) noch durchflusszytometrisch (vgl. Abb. 3.6.A) veränderte HSPC-Populationen nachgewiesen werden. Numerisch ist der Anteil der zirkulierenden HSPCs am Gesamt-HSPC-Pool allerdings so gering, dass ein etwaiger Unterschied nicht nachweisbar wäre. Unstrittig hingegen ist eine vergrößerte HSPC-Population in der Milz der CXCR4^{1013/1013}-Tiere, welche ebenfalls funktionell (vgl. Abb. 3.5.C/D) und durchflusszytometrisch (vgl. Abb. 3.6.B) nachgewiesen werden konnte. Dieser vergrößerte HSPC-Pool kann durch verstärkte Migration in die Milz oder durch eine Generierung von HSPCs in der Milz erklärt werden. Analog zur einer möglichen verstärkten Retention im Knochenmark, ist eine verstärkte Migration in die Milz nicht nachweisbar. Allerdings konnte durch Analyse der zellzyklischen Aktivität gezeigt werden, dass CXCR4^{1013/1013} LSK-Zellen der Milz zellzyklisch

aktiver sind als die wildtypischen Kontrollzellen (vgl. Abb. 3.10.), im Sinne einer vermehrten Proliferationsaktivität von HSPC in der Milz. Im Knochenmark hingegen waren die untersuchten Zellen zellzyklisch unauffällig (vgl. Abb. 3.9.). In diesem Punkt widersprechen die von uns erhobenen Daten den bereits publizierten von Freitas und Kollegen. Diese konnten durchflusszytometrisch eine, wenn auch subtile, Hemmung des Zellzyklus in LSK-Zellen von CXCR4^{1013/1013}-Tieren zeigen und erklären dies zusätzlich mit einer reduzierten Expression der D-Zykline (Ccmd1, Ccmd2 und Ccmd3) in diesen Zellen. Allerdings können keine Auswirkungen der verminderten Zellzyklusaktivität (z.B. numerisch reduzierte HSPC im Knochenmark) gezeigt werden. Die Befunde in der Milz stimmen mit denen in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen überein, allerdings führten Freitas und Kollegen keine Zellzyklusanalysen in Milzzellen durch, sondern postulierten lediglich, dass es sich um eine verstärkte extramedulläre Hämatopoese (EMH) handelt. Begründet wird diese Hypothese unter anderem mit der zuvor beschriebenen erhöhten CXCL12-Konzentration in der Milzflüssigkeit, welche in dieser Arbeit ebenfalls reproduziert werden konnte (vgl. Abb. 3.11.). Die hier diskutierten Ergebnisse stützen diese These und im weiteren Verlauf werden zusätzliche Belege präsentiert werden. Um die Auswirkung der EMH genauer analysieren zu können, müssten die durchgeführten Versuche in splenektomierten Tieren wiederholt werden. Splenektomierte CXCR4^{1013/1013}-Tiere sind lebensfähig (vgl. Abb. 3.23./24.), wodurch ausgeschlossen werden kann, dass die gesamte Hämatopoese dieser Tiere ausschließlich auf der EMH in der Milz beruht. Außerdem könnten weitere Organe (z.B. die Leber) auf eine etwaige EMH untersucht werden. Zusätzlich könnten Transplantationsexperimente mit Milzzellen durchgeführt werden, um zu prüfen, ob sich durch die gesteigerte Proliferationsrate in der Homöostase mögliche Erschöpfungs-Effekte einstellen. Werden konditionelle CXCR4 *knock-out* Tiere wöchentlich mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil behandelt, so haben sie eine geringere Lebenserwartung als CXCR4-kompetente Tiere (Nie et al, 2008).

4.2. CXCR4-abhängige Mobilisierung

Durch die Gabe von Plerixafor und/oder dem Zytokin G-CSF können HSPC in die Peripherie mobilisiert werden. Beide Reagenzien wirken auf die CXCR4-CXCL12-Achse ein, allerdings mit einem unterschiedlichen Wirkmechanismus. Während Plerixafor ein direkter CXCR4-Antagonist ist, wirkt G-CSF indirekt an der CXCR4-CXCL12-Achse, nämlich durch von Neutrophilen ausgeschüttete Proteasen, welche CXCL12 N-terminal trunkieren, dadurch inaktivieren und somit die CXCR4-CXCL12-vermittelte Retention der HSPC im Knochenmark unterbrechen. Diese unterschiedlichen Wirkmechanismen erklären auch den synergistischen Effekt bei gleichzeitiger Gabe, welcher ebenfalls mit anderen direkten CXCR4-Antagonisten nachweisbar ist (Broxmeyer et al, 2005; Karpova et al, 2013). Experimentelle Daten legen die Vermutung nahe, dass die Mobilisierung maßgeblich aus

dem Knochenmark erfolgt, da splenektomierte Tiere mit einer vergleichbaren Effizienz mobilisieren wie nicht splenektomierte Kontrolltiere (Bonig et al, 2009; Ramirez et al, 2009).

Die publizierten Daten zu Tieren mit C-terminal trunkiertem CXCR4 von Balabanian und Kollegen bzw. Freitas und Kollegen sind nicht konsistent. Balabanian und Kollegen beschreiben 3 Stunden nach Plerixafor Injektion vergleichbare Werte von Gesamt-Leukozyten, B-Zellen und Neutrophilen im Blut von CXCR4^{+ /1013}-Tieren bzw. wildtypischen Kontrollen (Balabanian et al, 2012). Dies entspricht allerdings nicht der erwarteten Kinetik, welche ein Maximum zwischen 60 und 120 Minuten nach Injektion beschreibt, welches anschließend wieder rapide auf homöostatisches Level abfällt (Balabanian et al, 2012; Broxmeyer et al, 2005). Freitas und Kollegen hingegen beschreiben eine Mobilisierungsdefizienz unreifer Zellen (LSK und CFU-C) 60 Minuten nach Plerixafor-Injektion in CXCR4^{+ /1013}- und CXCR4^{1013/1013}-Tieren (Freitas et al, 2017). Eine differenzielle Mobilisierung von reifen und unreifen Zellen erscheint mindestens ungewöhnlich und deckt sich auch nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Hier konnte gezeigt werden, dass die Mobilisierungseffizienz mit Plerixafor im Maximum (60 min bzw. 120 min nach Plerixafor-Injektion) vergleichbar zwischen CXCR4^{1013/1013}-Tieren und den wildtypischen Kontrollen war, es allerdings im weiteren Verlauf (nach 4 Stunden bzw. 6 Stunden) zu einer veränderten Kinetik kam (vgl. 3.23.A). Diese Veränderung kann gut durch den Internalisierungsphänotyp erklärt werden. Der mit Plerixafor inaktivierte Rezeptor verbleibt auf der Oberfläche, wodurch ein Re-Homing (z.B. in das Knochenmark oder die Milz) verzögert wird. Interessanterweise konnte dies in splenektomierten Tieren nicht reproduziert werden. In diesen Tieren konnte ein Mobilisierungsdefizienz der CXCR4^{1013/1013}-Tiere gezeigt werden (vgl. Abb. 3.23.B). Aufgrund dieses Ergebnisses muss davon ausgegangen werden, dass die Plerixafor-vermittelte Mobilisierung in den CXCR4^{1013/1013}-Tieren anders als bei wildtypischen Mäusen maßgeblich aus der Milz stattfindet.

Die Mobilisierung mit Hilfe von G-CSF ergab hingegen eine Mobilisierungsdefizienz der CXCR4^{1013/1013}-Tiere, welche qualitativ ebenfalls in den splenektomierten Tieren nachweisbar war (vgl. Abb. 3.24.A+B). Dieser Phänotyp könnte durch den erhöhten CXCL12-Spiegel in der Knochenmarkflüssigkeit der CXCR4^{1013/1013}-Tiere erklärt werden (vgl. Abb. 3.11.). Dies könnte durch eine Messung der CXCL12-Spiegel nach G-CSF Mobilisierung verifiziert werden, wobei Antikörper verwendet werden müssten, die zwischen Vollängen- und trunkiertem CXCL12 unterscheiden. Allerdings sind derartige Antikörper uns nur aus dem humanen System bekannt.

4.3. Einfluss der hyperaktiven CXCR4-Mutanten auf die Repopulationkapazität

Das maßgebliche Charakteristikum einer hämatopoetischen Stammzelle ist die Fähigkeit, das Knochenmark eines myeloablativ konditionierten Empfängertieres zu repopulieren und anschließend

eine neue, multilineäre Hämatopoese vom Spendertyp zu etablieren. Mit anderen Worten ist der definitive Nachweis für die Existenz von *bonafide* Blutstammzellen die (serielle) Transplantierbarkeit dieser Zellen (Morrison & Weissman, 1994; Osawa et al, 1996). Die Zellen müssen zunächst in das Knochenmark des Empfängertieres gelangen (Homing, (K. Lahiri & M. Van Putten, 1969; Testa et al, 1972)), anschließend ihren Platz in der Stammzellnische einnehmen (Jiang et al, 2009), proliferieren und dadurch das neue hämatopoetische System aufbauen (engraftment). Wie bereits beschrieben, sind CXCR4-defiziente Zellen in der Lage, das Überleben des Empfängertieres mit gewissen Einschränkungen (z.B. B-Zellaplasie) zu sichern. Diese Erkenntnis bedeutet zugleich, dass CXCR4-defiziente Zellen grundsätzlich in der Lage sind zu homing, aber ob das Homing quantitativ möglicherweise von CXCR4-vermittelten Signalen begünstigt wird oder nicht, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockierung der CXCR4/CXCL12-Signalachse durch Pertussis-Toxin oder Plerixafor, aber auch die Überexpression von CXCR4 bzw. Δ CXCR4 keinen Einfluss auf das Homing haben (Bonig et al, 2004; Bonig et al, 2006; Lai et al, 2014). Bezüglich der „Überexpression“ ist anzumerken, dass jederzeit nur ein Bruchteil der Rezeptoren auf der Oberfläche präsentiert wird (Zhang et al, 2004), so dass unklar ist, inwieweit zusätzlich synthetisierte CXCR4 Moleküle die Oberflächenexpressionsdichte oder die CXCR4-Signalstärke überhaupt beeinträchtigen. Dies wurde möglicherweise bisher in der Literatur zu wenig thematisiert. Peled und Kollegen konnten nach Präinkubation humaner CD34+-Zellen mit Maus-anti-humanem antifunktionellem CXCR4 Antikörper kein Homing dieser Zellen in NOD/SCID-Mäusen nachweisen, wobei einschränkend angemerkt werden muss, dass diese Zellen auch in der Peripherie nicht nachweisbar waren (Peled et al, 1999b), so dass zytotoxische Effekte des verwendeten antifunktionellen Antikörpers zu diskutieren wären. Unterschiede in der CXCR4-Abhängigkeit zwischen humanen und murinen HSPCs sind ebenfalls nicht *a priori* auszuschließen. Einen indirekten Nachweis für eine mögliche CXCR4-Abhängigkeit bezüglich des Homings in der Maus liefern Nie und Kollegen. In ihren Experimenten wurden konditionelle CXCR4 *knock-out* Zellen kompetitiv transplantiert. Dabei wurde der *knock-out* einmal vor der Transplantation und einmal nach der Transplantation induziert. Der Vergleich ergab, dass Zellen, in denen CXCR4 vor der Transplantation deletiert wurde, eine schlechtere Repopulierungseffizienz aufwiesen als eine CXCR4-Deletion nach der Transplantation. Daraus wurde ein Einfluss auf das Homing abgeleitet (Nie et al, 2008). Allerdings könnten diese Ergebnisse auch aufgrund anderer Faktoren zu Stande kommen. So könnte auch eine wenig effiziente Nischenbesetzung durch CXCR4-defiziente Zellen oder bereits erwähnte Ausdifferenzierung der HSPC zu Lasten der Selbsterneuerung (siehe Kap. 4.1.) für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein. Nach der spontanen Heilung einer WHIM-Patientin durch Chromothrypsis wurden außerdem Experimente mit hemizygoten CXCR4-Tieren durchgeführt, wobei durchflusszytometrisch gezeigt werden konnte, dass hemizygoten CXCR4-Zellen eine schlechtere Homing-Effizienz aufwiesen als

wildtypische Kontrollzellen (Gao et al, 2018). Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durchflusszytometrische Hominganalysen mit zellpermeablen Farbstoffen durch *microenvironmental contaminations* (MEC) verfälscht werden können (Lassailly et al, 2010). Diese MECs treten vor allem in Tumor- und Entzündungssituationen auf. Durch die der Transplantation vorangehende Bestrahlung ist das Knochenmark der Empfängertiere ein hochentzündliches Milieu, in dem das Auftreten von MECs wahrscheinlich ist. Die Datenlage bezüglich des Einflusses der CXCR4-CXCL12-Signalachse auf das Homing ist somit widersprüchlich. Ein möglicher Einfluss sollte funktionell untersucht werden, um Artefakte durch MECs zu vermeiden.

Die Datenlage für den Einfluss der CXCR4-CXCL12-Achse auf das Engraftment ist allerdings eindeutiger. Sowohl Nie und Kollegen, als auch Lai und Kollegen, postulieren eine verstärkte Repopulationsfähigkeit von konditionellen *knock-out* Zellen in einem kompetitiven Transplantationsexperiment (Lai et al, 2014; Nie et al, 2008). Interessanterweise wurden sowohl für konditionelle CXCR4 *knock-out* Zellen als auch für eine CXCR4-Überexpression bzw. Δ CXCR4-Expression ein ähnlicher Phänotyp im Peripherblut bestimmt, welcher durch eine Leukopenie gekennzeichnet ist. In beiden Fällen wurde ein dramatisch reduzierter Anteil am Donor-Chimärismus festgestellt. In der Studie von Lai und Kollegen wurden allerdings keine absoluten Leukozytenzahlen bestimmt, was den Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit erschwert. Für hemizygote CXCR4-Zellen wurde hingegen ein Engraftmentvorteil gegenüber wildtypischen Zellen gezeigt. Allerdings fehlen in diesen Studien für eine definitive Bewertung der Ergebnisse wichtige Kontrollen. Es wurden weder - für den Vergleich wichtig - Daten aus der Homöostase erhoben, noch wurde ein Beweis geführt, dass die Hemizygotie für CXCR4 tatsächlich einen Einfluss auf die CXCR4-Expression oder -Oberflächenpräsentation hat. Zudem wurde gezeigt, dass hemizygote Zellen in der Lage sein sollen, unkonditionierte Empfänger zu engraften (bis zu 20% der Leukozyten im Peripherblut, ca. 5% im Knochenmark) (Gao et al, 2018; McDermott et al, 2015). Eine CXCR4-Herunterregulierung in hemizygoten CXCR4-Tieren wäre insofern interessant, da es strukturelle Hinweise gibt, dass auch monomeres CXCR4 als funktionelle Einheit agieren kann (Kufareva et al, 2014). Strukturelle Daten sind zwar sehr artifiziell, könnten aber durch geeignete biophysikalische Methoden erweitert und verifiziert werden (Dietz et al, 2013). Nach Sekundärtransplantationen konnte gezeigt werden, dass sowohl CXCR4-überexprimierende als auch Δ CXCR4-exprimierende Zellen einen deutlich unterdurchschnittlichen Anteil zum Donor-Chimärismus beitrugen (Lai et al, 2014). Die Daten von Gao bzw. McDermott und Kollegen und Lai und Kollegen scheinen sich zu widersprechen, allerdings wurden keine Experimente durchgeführt, die mögliche Erklärungen zum Auflösen dieses Widerspruchs liefern. Zum Beispiel könnte eine erhöhte Proliferationsrate der Δ CXCR4-exprimierenden HSPC auf mögliche Erschöpfungseffekte hindeuten.

Die hier mit CXCR4^{1013/1013}-Knochenmark-CFU-C erhobenen Daten unterstützen einen Einfluss der CXCR4-CXCL12-Achse auf das Homing von HSPC (vgl. Abb. 3.25.). Es konnte eine diskrete, aber signifikante, Verringerung von CFU-C im Peripherblut in Empfängern von CXCR4^{1013/1013}-Zellen nachgewiesen werden. Dieser Einfluss ist allerdings quantitativ gering und hat vermutlich keine große biologische Relevanz, da sogar CXCR4 *knock-out* Zellen homing können. Freitas und Kollegen können ebenfalls einen Homing-Effekt nachweisen. Allerdings steht dieser in diametralen Widerspruch zu den hier gefundenen Daten, in denen CXCR4^{1013/1013}-Zellen eine tendenziell bessere Homingeffizienz aufweisen als die wildtypischen Kontrollen. Diese Diskrepanz könnte möglicherweise durch die unterschiedliche Methodik aufgelöst werden. Die Daten von Freitas und Kollegen legen einen sehr ausgeprägten negativen Homing-Effekt nahe (~50% reduzierte Homing Effizienz bei LSK-Zellen, ~66% bei LSK SLAM-Zellen), welcher allerdings keine weiteren Konsequenzen zu haben scheint. Es wurden z.B. weder ein Engraftment-Defekt noch eine verminderte Überlebensrate dieser Tiere gezeigt, was zumindest überraschend ist. Es konnte lediglich eine um die Hälfte verminderte LSK SLAM-Population nach 4 Monaten in den Empfängern von CXCR4^{1013/1013}-Zellen gezeigt werden. Diese Reduktion lässt sich vermutlich nicht auf den Homing-Defekt zurückführen, da die Empfänger von heterozygoten CXCR4⁺¹⁰¹³-Zellen ähnlich eingeschränkt in ihrer Homing-Kapazität beschrieben wurden, die LSK SLAM-Population in diesen Tieren allerdings normal groß war. Eine mögliche weitere Erklärung für den hier gezeigten Homing-Phänotyp könnte eine Modulation von Integrin-Präsentation auf der Oberfläche der HSPC darstellen. Dies könnte zukünftig durchflusszytometrisch oder funktionell analysiert werden.

In dieser Arbeit konnte in nicht kompetitiven Transplantationsexperimenten gezeigt werden, dass das Engraftment in Empfängern von wildtypischen, heterozygoten CXCR4⁺¹⁰¹³, homozygoten CXCR4^{1013/1013}- und GFP⁺-Zellen vergleichbar war (vgl. Abb. 3.26.). Nach ca. 70 Tagen wurden stabile Leukozytenzahlen im Peripherblut der Empfänger in allen untersuchten Transplantationsregimen nachgewiesen. Allerdings muss einschränkend angemerkt werden, dass Empfänger von CXCR4⁺¹⁰¹³- bzw. CXCR4^{1013/1013}-Zellen sich auf niedrigerem Niveau stabilisierten. Dieses war jedoch vergleichbar mit den entsprechenden homöostatischen Werten. Durch die ausschließliche Abhängigkeit vom Spenderknochenmark kann ein potentieller Einfluss des Stromas ausgeschlossen und ein hämatopoetisch zellintrinsic Mechanismus nachgewiesen werden. Diese Schlussfolgerung ist mit Beobachtungen anderer Gruppen vereinbar (Freitas et al, 2017; Lai et al, 2014).

Die kompetitiven Transplantationsexperimente lieferten nicht die erwarteten Ergebnisse. Es wurde angenommen, dass die in homöostatischen CXCR4^{1013/1013}-Mäusen verminderten Blutleukozytenpopulationen durch einen entsprechend erhöhten Beitrag von Kompetitorzellen auf physiologisches Niveau angehoben werden würde. Wie in Abb. 3.27.A dargestellt, war dies jedoch

nicht der Fall. Kompetitive Transplantationsexperimente wurden in ähnlicher Weise von McDermott und Kollegen durchgeführt. Allerdings wurden dort lediglich prozentuale Beiträge des jeweiligen Genotyps angegeben, wodurch diese schwer mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar sind. Als weiterer Unterschied wurden von McDermott und Kollegen ausschließlich heterozygote CXCR4^{+ / 1013}-Zellen eingesetzt. Nichtsdestotrotz können wir wie auch McDermott einen im Vergleich zu wildtypischen CXCR4-Transplantaten niedrigeren prozentualen Beitrag von CXCR4^{1013 / 1013} bzw. CXCR4^{+ / 1013}-Zellen im Peripherblut nachweisen. Ein möglicher toxischer Einfluss von GFP mit Konsequenz eines relativ unterdurchschnittlichen Engraftments wurde in der Literatur kontrovers diskutiert (Baens et al, 2006; Faltusova et al, 2018; Liu et al, 1999). Allerdings konnten wir einen vergleichbaren Anteil von GFP-Kompetitorzellen unabhängig vom jeweiligen *bone marrow of interest* (BOI) in allen reifen Blutzelllinien feststellen, womit die etwaige Zytotoxizität von eGFP unter unseren Bedingungen durch den experimentellen Aufbau kontrolliert wird (Abb. 3.27.C+D). Wird das im Vergleich zu WT-CXCR4-Zellen tendenziell verbesserte Homing der CXCR4^{1013 / 1013}-Zellen in Betracht gezogen, hätte eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp eine verbesserte Repopulationseffizienz des Knochenmarks durch CXCR4^{1013 / 1013}-Zellen sein können, was allerdings experimentell ausgeschlossen werden konnte. Die Repopulationskapazitäten von wildtypischen bzw. CXCR4^{1013 / 1013}-Zellen waren vergleichbar und entsprachen in etwa dem transplantierten Verhältnis (vgl. Abb. 3.28.A). Analog zum Peripherblut konnten auch im Knochenmark - mit Ausnahme der Monozyten - keine signifikanten Unterschiede im Beitrag der GFP-Kompetitorzellen detektiert werden (vgl. Abb. 3.28.B+D). Dies legt einen möglichen trans-Effekt der CXCR4^{1013 / 1013}-Zellen auf die GFP⁺-Zellen nahe. Analoge Ergebnisse wie im reifen wurden auch im unreifen Kompartiment beobachtet. Weder funktionell noch durchflusszytometrisch konnte eine unterschiedliche Verteilung zwischen dem jeweiligen BOI und dem GFP-Kompetitor festgestellt werden (vgl. Abb. 3.30.B+D). Ebenfalls konnte eine zellzyklisch unterschiedliche Aktivität von LSK-Zellen im Knochenmark ausgeschlossen werden (Abb. 3.31). Durch den Einsatz von CD45.1-Zellen als Kompetitor konnten tendenziell vergleichbare Ergebnisse zur Transplantation mit GFP⁺-Kompetitorzellen erzielt werden. Allerdings macht die sehr kleine Kohorte definitive Aussagen schwierig. Zur Überprüfung müsste die Kohorte vergrößert werden. Die in der Homöostase kritische Rolle der Milz müsste ebenfalls genauer analysiert werden, z.B. durch Zellzyklusanalysen. Ebenfalls könnten HSPC durchflusszytometrisch determiniert werden. Allerdings konnten wir zeigen, dass qualitativ vergleichbare Ergebnisse bei der durchflusszytometrischen und funktionellen Bestimmung von HSPC erzielt werden konnten (vgl. Abb. Abb. 3.5.B-D und Abb. 3.6.), wodurch anzunehmen ist, dass die funktionellen Ergebnisse aus Abb. 3.30.C eine mindestens gute Annäherung darstellen.

Ein Rätsel bleibt weiterhin der Mechanismus, der die Kompetitorzellen davon abhält, die Peripherie auf ein physiologisches Niveau aufzufüllen. Der Einfluss wird besonders in den sekundären

Transplantationen deutlich. Obwohl in den Empfängern kaum CXCR4^{1013/1013}-Zellen in den hämatopoetischen Organen im Vergleich zu den Kompetitorzellen nachweisbar waren (vgl. Abb. 3.32.), wurde das Überleben - mutmaßlich - wesentlich durch eine autologe Rekonstitution gesichert. Diese Vermutung erhärtet sich, wenn betrachtet wird, dass nach dem Ausbleiben einer autologen Rekonstitution alle Empfängertiere innerhalb von ca. 8 Wochen verstarben (vgl. Abb. 3.37. und Kap. 3.4.3.4.) bei einer normalen Überlebensrate der WT/Kompetitor sekundär transplantierten Tiere. Freitas und Kollegen können ebenfalls eine dramatisch reduzierte LSK-SLAM-Population nach Sekundärtransplantationen in einem nicht-kompetitiven Versuchsansatz in den Empfängern von CXCR4^{1013/1013}-Zellen nachweisen. Wie bereits diskutiert, konnte keine erhöhte Zellzyklusaktivität in LSK-Zellen im Knochenmark (weder in der Homöostase, noch nach Transplantation) nachgewiesen werden, wodurch ein Erschöpfungsmechanismus ausgeschlossen werden kann. Das verbesserte Homing könnte dazu führen, dass durch die CXCR4^{1013/1013}-Zellen die Stammzellnischen effizienter im Vergleich zum Kompetitor besetzt werden können und das Engraftment von Kompetitorzellen lediglich auf Vorläuferzellen beruht, welche nach Sekundärtransplantation nicht mehr repopulieren können. Diese Frage könnte durch kompetitive Homing-Experimente geklärt werden, welche technisch allerdings sehr herausfordernd sind. Eine weitere Möglichkeit könnte die Akkumulation von CXCL12 darstellen. In der Homöostase konnte bei CXCR4^{1013/1013} Mäusen eine Akkumulation von CXCL12 in der Knochenmarkflüssigkeit nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.11.), welche allerdings - mutmaßlich - nicht auf eine erhöhte CXCL12-Genexpression zurückzuführen ist. Eine Messung der CXCL12-Spiegel nach (kompetitiver) Transplantation könnte Rückschlüsse auf eine mögliche CXCL12-Akkumulation zulassen. Allerdings kann durch diesen Nachweis nicht die Quelle des CXCL12 bestimmt werden, wobei CXCL12 aus hämatopoetischen Zellen wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle spielen dürfte. Eine weitere interessante Möglichkeit stellt der Austausch von extrazellulären Vesikeln dar. Es konnte bereits experimentell gezeigt werden, dass durch extrazelluläre Vesikel auch funktionelle Proteine übertragen werden können und diese auch die Funktion von Zellen modulieren können (Mancek-Keber et al, 2018). Zusätzlich argumentierten Janowska-Wieczorek und Kollegen, dass Antigene von Thrombozyten (inklusive CXCR4) durch sogenannte *platelet-derived microparticle* (PMP) auf andere Zellen übertragen werden können (Janowska-Wieczorek et al, 2001). Zusammengenommen könnten diese Ergebnisse auf eine mögliche Übertragung des C-terminaltrunkierten Rezeptors schließen lassen. Allerdings ist vollkommen unklar, was übertragen wird (mRNA, DNA oder Protein) und unter welchen Umständen es zu dieser Übertragung kommen kann, wodurch eine experimentelle Prüfung dieser Theorie erschwert wird. Beispielweise könnte eine Co-Kultur aus Zellen, welche markiertes CXCR4 (z.B. HA-tagged), und anderweitig markierte vergleichbare Zellen (z.B. GFP-exprimierend) angelegt werden und diese in definierten Zeitabständen durchflusszytometrisch untersucht werden. Das Vorhandensein von HA-

CXCR4 auf GFP⁺-Zellen würde somit einen Austausch belegen. Der genaue Übertragungsweg würde allerdings trotzdem unklar bleiben. Ebenso könnte argumentiert werden, dass eventuell wichtige Stimuli fehlen, falls keine derartigen Zellen nachgewiesen werden können.

4.4. Einfluss der hyperaktiven CXCR4-Mutanten auf die B-Lymphopoese

Bereits zu Beginn dieses Kapitels wurde auf das Paradoxon hingewiesen, dass sowohl eine CXCR4-Defizienz, als auch eine CXCR4-Überaktivierung zu einer B-Zellaplasie führen. Allerdings ist festzuhalten, dass die Datenlage bezüglich eines kritischen Einflusses der CXCR4-CXCL12-Achse nicht eindeutiger sein könnte. Sowohl der (linienspezifische) *knock-out* für CXCR4 oder CXCL12 (Kawabata et al, 1999; Lai et al, 2014; Ma et al, 1998; Ma et al, 1999; Nie et al, 2008; Sugiyama et al, 2006), als auch die pharmakologische Unterbrechung des Signalweges (Day et al, 2015; Karpova et al, 2017; Winkler et al, 2013), wie auch die Überaktivierung vom CXCR4 (Balabanian et al, 2012; Biajoux et al, 2016; Freitas et al, 2017) sind mit einer numerischen Reduktion der B-Zellen vergesellschaftet. Ma und Kollegen konnten zeigen, dass nach Transplantation CXCR4-defizienter Zellen in wildtypische Empfänger im Knochenmark eine reduzierte B-Zellvorläuferpopulation nachzuweisen war. Diese Vorläufer waren allerdings *in vitro* in der Lage zu reifen B-Zellen auszudifferenzieren (Ma et al, 1999). Die *in vitro* Differenzierung wird, *notabene*, in Abwesenheit von CXCL12 durchgeführt und ist insofern nur bedingt repräsentativ für die physiologische Ausreifung von B-Zellen. Dazu passend konnte durch Chemotaxis- und Ca²⁺-Mobilisierungsexperimente gezeigt werden, dass die CXCR4-CXCL12-Achse im Besonderen in den unreifen proB- und preB-Zellen aktiv ist (D'Apuzzo et al, 1997). Dies korreliert nicht überraschend mit maximal hoher CXCR4-Expression in diesen B-Zellsubpopulationen, welche im Laufe der Ausreifung zunächst graduell abfällt und erst in post-medullären, reifen B-Zellen wieder hochreguliert wird (Beck et al, 2014; Pereira et al, 2009), wie auch hier gezeigt (Abb. 4.1.). Zusammengefasst schlagen diese Ergebnisse einen Lokalisationsmechanismus in der Ausreifung von B-Zellen für die CXCR4-CXCL12-Signalachse vor. Die unreifen B-Zellen werden zunächst CXCR4-abhängig im Knochenmark zurückgehalten. Durch Herunterregulation der Oberflächenexpression von CXCR4 können die Zellen weiter ausdifferenzieren und schließlich im Zustand der inneren B-Zelldifferenzierung niedrigsten CXCR4-Oberflächenpräsentation kommt es zum Egress. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen (relativer) Herunterregulierung von CXCR4 und Egress, bzw. umgekehrt zwischen quantitativer Retention von B-Zellvorläufern und maximal hoher CXCR4-Oberflächenexpression, wäre zu postulieren. Dies legen auch Studien von Hardy und Kollegen nahe, die in unreifen Stadien eine starke Stromaabhängigkeit der B-Zellentwicklung ausmachen, welche später durch eine IL-7 Abhängigkeit ersetzt wird (Hardy et al, 1991).

In dieser Arbeit konnte durchflusszytometrisch und funktionell gezeigt werden, dass die CXCR4-Überaktivierung zu einem Verlust von proB/preB-Zellen im Knochenmark bei gleichzeitiger

Vergrößerung dieser Populationen in der Milz führt (vgl. Abb. 3.18. und Abb. 3.21). Ein prämaturer Egress aus dem Knochenmark könnte diskutiert werden und tatsächlich können wir auch eine deutlich vergrößerte proB/preB-Population im Peripherblut von CXCR4^{1013/1013}-Tieren nachweisen (vgl. Abb. 3.18.A), allerdings kann dies aufgrund numerischer Unterschiede nicht die alleinige Ursache darstellen. Balabanian und Kollegen und Freitas und Kollegen zeigen ähnliche Befunde bezüglich des Knochenmarks von CXCR4^{+ / 1013} bzw. CXCR4^{1013/1013}-Tieren (Balabanian et al, 2012; Freitas et al, 2017). Wie zuvor beschrieben, postulieren Freitas und Kollegen, dass in der Milz von CXCR4^{1013/1013}-Tieren EMH stattfindet. Ob es sich dabei um ein funktionell relevantes Stress-kompensatorisches Ereignis oder den Phänotyp einer CXCR4-hyperaktiven unreifen Hämatopoese handelt, wird nicht thematisiert. Im Einklang mit der zuvor beschriebenen Literatur konnten wir im wildtypischen Knochenmark eine B-subpopulationsspezifische CXCR4-Oberflächenexpression detektieren, welche nach dem preB/proB-Stadium zunächst relativ herunter- und anschließend in den reifen B-Zellstadien wieder hochreguliert wird (Abb. 4.1.) (Beck et al, 2014; Pereira et al, 2009). Letzteres war in CXCR4^{1013/1013}-Tieren nicht der Fall, wobei in Betracht gezogen werden muss, dass die quantitativ massiv verminderten reifen B-Zellstadien in diesen Tieren immer noch vergleichbare CXCR4-Oberflächenexpressionen mit den wildtypischen Kontrollen aufwiesen. Aufgrund der Normalisierung auf die wildtypischen Kontrollen ist diese Information allerdings nicht aus der Abb. 3.19. ersichtlich, weshalb sie an dieser Stelle nochmal in absoluten MFI-Werten (*mean fluorescence intensity*) dargestellt ist (siehe. Abb. 4.1.). Zur weiteren Detailanalyse könnte mit RT-PCR Experimenten in den einzelnen Subpopulationen geklärt werden, ob es sich bei diesen Ergebnissen (nur) um eine erhöhte Oberflächenpräsentation oder das Ergebnis einer erhöhten Genexpression handelt. Zusätzlich könnte untersucht werden, ob sich preB und proB-Zellen *in vitro* zu reifen B-Zellen - analog zu Ma und Kollegen - ausdifferenzieren lassen. Dieser Assay wird in Abwesenheit von CXCL12 durchgeführt. Die Tatsache, dass CXCR4^{1013/1013}-Tiere reife B-Zellen besitzen (wenn auch in geringerer Zahl), diese eine vergleichbare CXCR4-Oberflächenexpression zu den wildtypischen Kontrollen aufweisen und funktionell sind (siehe unten), deuten darauf hin, dass die Ausdifferenzierung nicht gestört sein dürfte und es sich - im Einklang mit der Literatur - um einen CXCR4/CXCL12 induzierten Lokalisationsphänotyp handelt. Karpova und Kollegen konnten durch Dauerinfusion mit einem CXCR4-Antagonisten die B-Lymphopoese in wildtypischen Tieren stark einschränken (Karpova et al, 2017). Dieselbe Behandlung in CXCR4^{1013/1013}-Tieren könnte zu einer Normalisierung der B-Lymphopoese führen, wobei zunächst die Dauer der Behandlung und die Konzentration des CXCR4-Antagonisten bestimmt werden müssten.

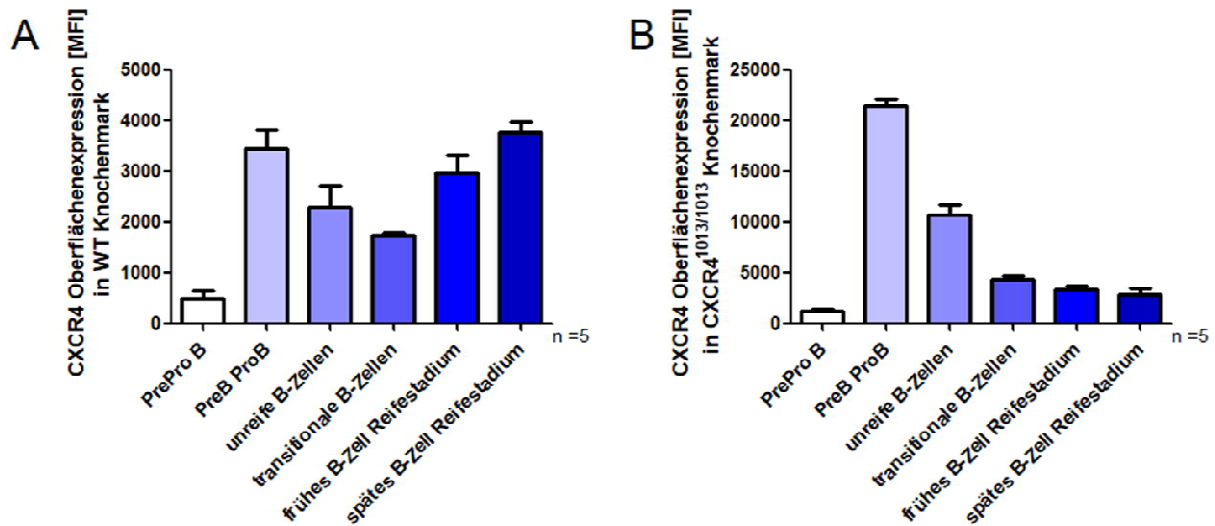


Abbildung 4.1. CXCR4-Oberflächenexpression auf B-Zellreifestadien (absolut). B-Zellen wurden als CD45⁺B220⁺ im Knochenmark von wildtypischen (A) oder CXCR4^{1013/1013}-Tieren (B) definiert. Anschließend wurden die Subpopulationen wie folgt definiert: PreProB-Zellen: CD43⁺CD24⁻, preB/proB-Zellen: CD43⁻CD24⁺IgM⁻IgD⁻, unreife B-Zellen CD43⁻CD24⁺IgM^{dim}IgD⁻, transitionale B-Zellen: CD43⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁻, ein frühes B-Zellreifestadium: CD43⁻CD24⁺IgM⁺IgD⁺, ein spätes B-Zellreifestadium: CD43⁻CD24⁺IgM^{dim/low}IgD⁺. CXCR4-Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch (FMO-kontrolliert) ermittelt und die MFI der einzelnen Subpopulationen bestimmt. MW±SEM.

Anschließend wurde die Frage adressiert, ob der Verlust der reifen B-Zellen in der Peripherie (vgl. Abb. 3.18.A) Folge einer erhöhten Apoptose-Rate oder eines Reifungsstopps ist. Unsere Experimente können keine vermehrte Apoptose in den B-Subpopulationen nachweisen (vgl. Abb. 3.20.), weshalb wir einen Reifungsstopp vermuten. Dies lässt sich gut mit dem zuvor beschriebenen Lokalisationsmechanismus der CXCR4-CXCL12-Achse in der B-Lymphopoese nachvollziehen. Balabanian und Kollegen konnten in heterozygoten CXCR4⁺¹⁰¹³-Zellen im Knochenmark ebenfalls keine veränderte Apoptose-Rate in proB/preB-Zellen nachweisen. Wohingegen Freitas und Kollegen sowohl im Knochenmark von CXCR4⁺¹⁰¹³-, als auch von CXCR4^{1013/1013}-Tieren, vermehrt Apoptose in der proB/preB-Population zeigen. Tatsächlich zeigen einige Studien, dass die CXCR4-CXCL12-Achse ausschließlich dann anti-apoptotisch wirken kann, wenn eine erfolgreiche Endozytose/Internalisierung des Rezeptors stattfindet (English et al, 2018; Khan et al, 2004); diese Ergebnisse wurden allerdings in humanen Zellen oder Zelllinien generiert. Nichtsdestotrotz scheinen die Studien von English *et al.* und Khan *et al.* zunächst die Aussagen von Freitas und Kollegen zu unterstützen, wobei anzumerken ist, dass diese ebenfalls eine verminderte CXCR4-Internalisierungskompetenz in heterozygoten CXCR4⁺¹⁰¹³-Zellen feststellen, welche aber dennoch nicht zu einer erhöhten Apoptose-Rate führt. Zur Validierung der Ergebnisse könnten weitere Apoptose-Assays genutzt werden, z.B. die Bestimmung aktiver Caspase-3 via ELISA oder die Bestimmung fragmentierter genomischer DNA via PCR (Hooker et al, 2012). Zusätzlich könnten *single*

cell tracking Analysen von B-Zellvorstufen klären, ob diese Zellen länger als wildtypische Zellen in einer Nische zurückgehalten werden oder ob diese Zellen apoptotisch abgebaut werden. Auch der bereits erwähnte *ex vivo* Differenzierungsassay könnte weitere Hinweise auf das Schicksal dieser Zellen liefern. Eine erfolgreiche *ex vivo* Differenzierung würde die Theorie stützen, dass es sich um einen - aufgrund einer aberranten Lokalisation im Bezug auf die B-Zell-Differenzierung - Ausreifungsstopp handelt.

Nicht nur zeigten die reduzierten reifen B-Zellen in CXCR4^{1013/1013}-Tiere eine ungefähr vergleichbare CXCR4-Expression mit den wildtypischen Kontrollzellen (d.h. die Herunterregulierung im Rahmen der Differenzierung funktioniert), wir konnten ebenfalls die grundsätzliche Funktionalität des humoralen Immunsystems durch Impf-Assays belegen (vgl. Abb. 3.22.A). Beide Mauslinien waren in der Lage eine robuste spezifische humorale Immunantwort zu generieren, wenn auch die CXCR4^{1013/1013}-Tiere signifikant niedrigere Impftiter erreichten, was möglicherweise auf die deutlich verkleinerte B-Zellpopulation infolge des bereits diskutierten Reifungsstopps zurückgeführt werden könnte. Biajoux und Kollegen konnten in heterozygoten CXCR4^{+/1013}-Tieren keine Unterschiede bezüglich des Titers nach einer Primärimmunisierung feststellen. Allerdings zeigten sie eindrucksvoll, dass CXCR4^{+/1013} nicht mit einem gesteigerten Impftiter nach einer sekundären Immunisierung reagieren (Biajoux et al, 2016). Dieses Ergebnis können wir in unserem möglicherweise relevanteren Hepatitis B-Impfmodell mit homozygoten CXCR4^{1013/1013}-Tieren reproduzieren (vgl. Abb. 3.22.B). Biajoux und Kollegen führen dieses Phänomen darauf zurück, dass die Tiere keine Plasmazellen ausbilden können, was eine plausible Erklärung für den Phänotyp wäre. Diese Tatsache könnte auch die Erklärung für ein Impfversagen von Patienten mit dem WHIM-Syndrom verantwortlich sein (McDermott et al, 2014). Spezifische Analysen von Plasmazellfrequenzen und -funktion wurden über die Booster-Impfung hinaus nicht durchgeführt.

4.5. Zusammenfassung

Die aberrante CXCR4-Signalweiterleitung konnte durch drei verschiedene Methoden in HSPC nachgewiesen werden. Entgegen der Annahme konnte keine vergrößerte HSPC-Population im Knochenmark nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine ausgeprägte EMH in der Milz gezeigt werden. Dies kann als negative Beeinflussung der aberranten Signalweiterleitung ausgelegt werden und möglicherweise auf eine dysfunktionelle Stammzellnische oder die Interaktion mit dieser im Knochenmark hindeuten. Diese Vermutung wird durch eine unzureichende Repopulationsfähigkeit von CXCR4^{1013/1013}-Knochenmarkzellen erhärtet.

Die grundsätzliche Funktionalität reifer B-Zellen in CXCR4^{1013/1013}-Tieren, zusammen mit einer Überexpression von CXCR4 in der proB/preB-Subpopulation in CXCR4^{1013/1013}-Tieren bei nicht nachweisbar veränderter Apoptoserate in dieser Population wird von uns als ein Reifungsstop der B-Zellen auf dem proB/preB-Stadium ausgelegt.

5. Literaturverzeichnis

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193-197

Alapi K, Erdos M, Kovacs G, Marodi L (2007) Recurrent CXCR4 sequence variation in a girl with WHIM syndrome. *Eur J Haematol* 78: 86-88

Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, Rudd K, Shinton SA, Hardy RR (2001) Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* 167: 6834-6840

Allman DM, Ferguson SE, Lentz VM, Cancro MP (1993) Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol* 151: 4431-4444

Arya M, Patel HR, McGurk C, Tatoud R, Klocker H, Masters J, Williamson M (2004) The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. *Journal of experimental therapeutics & oncology* 4: 291-303

Badolato R, Donadieu J (2017) How I treat warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis syndrome. *Blood* 130: 2491-2498

Baens M, Noels H, Broeckx V, Hagens S, Fevery S, Billiau AD, Vankelecom H, Marynen P (2006) The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS One* 1: e54

Balabanian K, Brotin E, Biajoux V, Bouchet-Delbos L, Lainey E, Fenneteau O, Bonnet D, Fiette L, Emilie D, Bachelierie F (2012) Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. *Blood* 119: 5722-5730

Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, Laurent L, Planchenault T, Verola O, Lebbe C, Kerob D, Dupuy A, Hermine O et al (2005) WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* 105: 2449-2457

Balabanian K, Levoye A, Klemm L, Lagane B, Hermine O, Harriague J, Baleux F, Arenzana-Seisdedos F, Bachelierie F (2008) Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest* 118: 1074-1084

Barbosa IL, Sousa ME, Godinho MI, Sousa F, Carvalhais A (1999) Single- versus dual-platform assays for human CD34+ cell enumeration. *Cytometry* 38: 274-279

Barker JE (1994) SI/Sld hematopoietic progenitors are deficient in situ. *Experimental hematology* 22: 174-177

Beaussant Cohen S, Fenneteau O, Plouvier E, Rohrlich PS, Daltroff G, Plantier I, Dupuy A, Kerob D, Beaupain B, Bordigoni P et al (2012) Description and outcome of a cohort of 8 patients with WHIM syndrome from the French Severe Chronic Neutropenia Registry. *Orphanet J Rare Dis* 7: 71

Beck TC, Gomes AC, Cyster JG, Pereira JP (2014) CXCR4 and a cell-extrinsic mechanism control immature B lymphocyte egress from bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 211: 2567-2581

Biajoux V, Natt J, Freitas C, Alouche N, Sacquin A, Hemon P, Gaudin F, Fazilleau N, Espeli M, Balabanian K (2016) Efficient Plasma Cell Differentiation and Trafficking Require Cxcr4 Desensitization. *Cell reports* 17: 193-205

Bonig H, Priestley GV, Nilsson LM, Jiang Y, Papayannopoulou T (2004) PTX-sensitive signals in bone marrow homing of fetal and adult hematopoietic progenitor cells. *Blood* 104: 2299-2306

Bonig H, Priestley GV, Papayannopoulou T (2006) Hierarchy of molecular-pathway usage in bone marrow homing and its shift by cytokines. *Blood* 107: 79-86

Bonig H, Watts KL, Chang KH, Kiem HP, Papayannopoulou T (2009) Concurrent blockade of alpha4-integrin and CXCR4 in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27: 836-837

Brack C, Hiram M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S (1978) A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15: 1-14

Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB et al (2005) Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *The Journal of experimental medicine* 201: 1307-1318

Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, Scheiermann C, Schiff L, Poncz M, Bergman A et al (2014) Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med* 20: 1315-1320

Buenrostro JD, Corces MR, Lareau CA, Wu B, Schep AN, Aryee MJ, Majeti R, Chang HY, Greenleaf WJ (2018) Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation. *Cell* 173: 1535-1548 e1516

Burberry A, Zeng MY, Ding L, Wicks I, Inohara N, Morrison SJ, Nunez G (2014) Infection mobilizes hematopoietic stem cells through cooperative NOD-like receptor and Toll-like receptor signaling. *Cell Host Microbe* 15: 779-791

Burk AS, Monzel C, Yoshikawa HY, Wuchter P, Saffrich R, Eckstein V, Tanaka M, Ho AD (2015) Quantifying adhesion mechanisms and dynamics of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Sci Rep* 5: 9370

Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL (2010) Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *The Journal of biological chemistry* 285: 7805-7817

Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR et al (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841-846

Chen J, Trounstein M, Alt FW, Young F, Kurahara C, Loring JF, Huszar D (1993) Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol* 5: 647-656

Cheng ZJ, Zhao J, Sun Y, Hu W, Wu YL, Cen B, Wu GX, Pei G (2000) beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *The Journal of biological chemistry* 275: 2479-2485

Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Mendez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N et al (2011) Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *The Journal of experimental medicine* 208: 261-271

Christopher MJ, Liu F, Hilton MJ, Long F, Link DC (2009) Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood* 114: 1331-1339

Christopher MJ, Rao M, Liu F, Woloszynek JR, Link DC (2011) Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *The Journal of experimental medicine* 208: 251-260

Chudziak D, Spohn G, Karpova D, Dauber K, Wiercinska E, Miettinen JA, Papayannopoulou T, Bonig H (2015) Functional consequences of perturbed CXCL12 signal processing: analyses of immature hematopoiesis in GRK6-deficient mice. *Stem Cells Dev* 24: 737-746

Ciriza J, Hall D, Lu A, De Sena JR, Al-Kuhlani M, Garcia-Ojeda ME (2012) Single-cell analysis of murine long-term hematopoietic stem cells reveals distinct patterns of gene expression during fetal migration. *PLoS One* 7: e30542

Czechowicz A, Kraft D, Weissman IL, Bhattacharya D (2007) Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches. *Science (New York, NY)* 318: 1296-1299

D'Apuzzo M, Rolink A, Loetscher M, Hoxie JA, Clark-Lewis I, Melchers F, Baggiolini M, Moser B (1997) The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *European journal of immunology* 27: 1788-1793

Dakic A, Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Wu L, Nutt SL (2005) PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 201: 1487-1502

Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, Beider K, Avniel S, Kasem S, Galun E et al (2004) Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 1240-1242

Day RB, Bhattacharya D, Nagasawa T, Link DC (2015) Granulocyte colony-stimulating factor reprograms bone marrow stromal cells to actively suppress B lymphopoiesis in mice. *Blood* 125: 3114-3117

Dietz MS, Hasse D, Ferraris DM, Gohler A, Niemann HH, Heilemann M (2013) Single-molecule photobleaching reveals increased MET receptor dimerization upon ligand binding in intact cells. *BMC Biophys* 6: 6

Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481: 457-462

Elhanati Y, Sethna Z, Marcou Q, Callan CG, Jr., Mora T, Walczak AM (2015) Inferring processes underlying B-cell repertoire diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370

Ellis SL, Grassinger J, Jones A, Borg J, Camenisch T, Haylock D, Bertocello I, Nilsson SK (2011) The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood* 118: 1516-1524

English EJ, Mahn SA, Marchese A (2018) Endocytosis is required for CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4)-mediated Akt activation and antiapoptotic signaling. *The Journal of biological chemistry* 293: 11470-11480

Faltusova K, Szikszai K, Molik M, Linhartova J, Paral P, Sefc L, Savvulidi F, Necas E (2018) Stem Cell Defect in Ubiquitin-Green Fluorescent Protein Mice Facilitates Engraftment of Lymphoid-Primed Hematopoietic Stem Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 36: 1237-1248

Fleischman RA, Mintz B (1979) Prevention of genetic anemias in mice by microinjection of normal hematopoietic stem cells into the fetal placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 5736-5740

Foudi A, Jarrier P, Zhang Y, Wittner M, Geay JF, Lecluse Y, Nagasawa T, Vainchenker W, Louache F (2006) Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4^{-/-} chimeric mice. *Blood* 107: 2243-2251

Freitas C, Wittner M, Nguyen J, Rondeau V, Biajoux V, Aknin ML, Gaudin F, Beaussant-Cohen S, Bertrand Y, Bellanne-Chantelot C et al (2017) Lymphoid differentiation of hematopoietic stem cells requires efficient Cxcr4 desensitization. *The Journal of experimental medicine* 214: 2023-2040

Gao JL, Yim E, Siwicki M, Yang A, Liu Q, Azani A, Owusu-Ansah A, McDermott DH, Murphy PM (2018) Cxcr4-haploinsufficient bone marrow transplantation corrects leukopenia in an unconditioned WHIM syndrome model. *J Clin Invest* 128: 3312-3318

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1715

Gerritsen EJ, Vossen JM, van Loo IH, Hermans J, Helfrich MH, Griscelli C, Fischer A (1994) Autosomal recessive osteopetrosis: variability of findings at diagnosis and during the natural course. *Pediatrics* 93: 247-253

Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, Nagasawa T, Link DC (2013) CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495: 227-230

Gulino AV, Moratto D, Sozzani S, Cavadini P, Otero K, Tassone L, Imberti L, Pirovano S, Notarangelo LD, Soresina R et al (2004) Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood* 104: 444-452

Guo Y, Hangoc G, Bian H, Pelus LM, Broxmeyer HE (2005) SDF-1/CXCL12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23: 1324-1332

Han X, Wang R, Zhou Y, Fei L, Sun H, Lai S, Saadatpour A, Zhou Z, Chen H, Ye F et al (2018) Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. *Cell* 172: 1091-1107 e1017

Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K (1991) Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 173: 1213-1225

Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P (2002) Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood* 99: 394

Herkt SC, Kuvardina ON, Herglotz J, Schneider L, Meyer A, Pommerenke C, Salinas-Riester G, Seifried E, Bonig H, Lausen J (2018) Protein arginine methyltransferase 6 controls erythroid gene expression and differentiation of human CD34(+) progenitor cells. *Haematologica* 103: 18-29

Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, Klotman ME, Diaz GA (2003) Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nature genetics* 34: 70-74

Hooker DJ, Mobarok M, Anderson JL, Rajasuriar R, Gray LR, Ellett AM, Lewin SR, Gorry PR, Cherry CL (2012) A new way of measuring apoptosis by absolute quantitation of inter-nucleosomally fragmented genomic DNA. *Nucleic acids research* 40: e113

Howard TH, Meyer WH (1984) Chemotactic peptide modulation of actin assembly and locomotion in neutrophils. *The Journal of cell biology* 98: 1265-1271

Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, Manning RJ, Tripsas C, Patterson CJ, Sheehy P et al (2014) The genomic landscape of Waldenstrom macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* 123: 1637-1646

Hur J, Choi JI, Lee H, Nham P, Kim TW, Chae CW, Yun JY, Kang JA, Kang J, Lee SE et al (2016) CD82/KAI1 Maintains the Dormancy of Long-Term Hematopoietic Stem Cells through Interaction with DARC-Expressing Macrophages. *Cell stem cell* 18: 508-521

Inra CN, Zhou BO, Acar M, Murphy MM, Richardson J, Zhao Z, Morrison SJ (2015) A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature* 527: 466-471

Issaad C, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, Coulombel L (1993) A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34⁺⁺/CD38⁻ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood* 81: 2916-2924

Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y et al (2006) Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12: 446-451

Itoh K, Tezuka H, Sakoda H, Konno M, Nagata K, Uchiyama T, Uchino H, Mori KJ (1989) Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Experimental hematology* 17: 145-153

Iwasaki H, Mizuno S, Wells RA, Cantor AB, Watanabe S, Akashi K (2003) GATA-1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages. *Immunity* 19: 451-462

Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Turner AR, Ratajczak J, Emerson SG, Kowalska MA, Ratajczak MZ (2001) Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 98: 3143-3149

Jiang Y, Bonig H, Ulyanova T, Chang K, Papayannopoulou T (2009) On the adaptation of endosteal stem cell niche function in response to stress. *Blood* 114: 3773-3782

K. Lahiri S, M. Van Putten L (1969) Distribution and multiplication of colony-forming units from bone marrow and spleen after injection in irradiated mice:

Karpova D, Dauber K, Spohn G, Chudziak D, Wiercinska E, Schulz M, Pettit AR, Levesque JP, Romagnoli B, Patel K et al (2013) The novel CXCR4 antagonist POL5551 mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells with greater efficiency than Plerixafor. *Leukemia* 27: 2322-2331

Karpova D, Ritchey JK, Holt MS, Abou-Ezzi G, Monlish D, Batoon L, Millard S, Spohn G, Wiercinska E, Chendamarai E et al (2017) Continuous blockade of CXCR4 results in dramatic mobilization and expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 129: 2939-2949

Kawabata K, Ujikawa M, Egawa T, Kawamoto H, Tachibana K, Iizasa H, Katsura Y, Kishimoto T, Nagasawa T (1999) A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5663-5667

Kawai T, Choi U, Cardwell L, DeRavin SS, Naumann N, Whiting-Theobald NL, Linton GF, Moon J, Murphy PM, Malech HL (2007) WHIM syndrome myelokathexis reproduced in the NOD/SCID mouse xenotransplant model engrafted with healthy human stem cells transduced with C-terminus-truncated CXCR4. *Blood* 109: 78-84

Kawai T, Choi U, Whiting-Theobald NL, Linton GF, Brenner S, Sechler JM, Murphy PM, Malech HL (2005) Enhanced function with decreased internalization of carboxy-terminus truncated CXCR4 responsible for WHIM syndrome. *Experimental hematology* 33: 460-468

Kawai T, Malech HL (2009) WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Current opinion in hematology* 16: 20-26

Khan MZ, Brandimarti R, Patel JP, Huynh N, Wang J, Huang Z, Fatatis A, Meucci O (2004) Apoptotic and antiapoptotic effects of CXCR4: is it a matter of intrinsic efficacy? Implications for HIV neuropathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 1063-1071

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121: 1109-1121

Kikuchi K, Kondo M (2006) Developmental switch of mouse hematopoietic stem cells from fetal to adult type occurs in bone marrow after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17852-17857

Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS (1998) Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1195-1200

Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K (1991) A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350: 423-426

Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91: 661-672

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420

Krill CE, Jr., Smith HD, Mauer AM (1964) CHRONIC IDIOPATHIC GRANULOCYTOPENIA. *The New England journal of medicine* 270: 973-979

Krivan G, Erdos M, Kallay K, Benyo G, Toth A, Sinko J, Goda V, Toth B, Marodi L (2010) Successful umbilical cord blood stem cell transplantation in a child with WHIM syndrome. *Eur J Haematol* 84: 274-275

Krupnick JG, Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 289-319

Kufareva I, Stephens BS, Holden LG, Qin L, Zhao C, Kawamura T, Abagyan R, Handel TM (2014) Stoichiometry and geometry of the CXCR4 chemokine receptor 4 complex with CXCL12: molecular modeling and experimental validation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E5363-5372

Kumar A, Kremer KN, Dominguez D, Tadi M, Hedin KE (2011) Gα13 and Rho mediate endosomal trafficking of CXCR4 into Rab11+ vesicles upon stromal cell-derived factor-1 stimulation. *J Immunol* 186: 951-958

Lagane B, Chow KY, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T, Baleux F, Gunera-Saad N, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F (2008) CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* 112: 34-44

Lai CY, Yamazaki S, Okabe M, Suzuki S, Maeyama Y, Iimura Y, Onodera M, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M et al (2014) Stage-specific roles for CXCR4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32: 1929-1942

Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, Mealiffe M, Terstappen LW, Hardwick A, Moubayed M et al (1995) Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 85: 275-282

Lassailly F, Griessinger E, Bonnet D (2010) "Microenvironmental contaminations" induced by fluorescent lipophilic dyes used for noninvasive in vitro and in vivo cell tracking. *Blood* 115: 5347-5354

Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ (2003) Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 111: 187-196

Li A, Rue M, Zhou J, Wang H, Goldwasser MA, Neuberg D, Dalton V, Zuckerman D, Lyons C, Silverman LB et al (2004) Utilization of Ig heavy chain variable, diversity, and joining gene segments in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia: implications for the mechanisms of VDJ recombination and for pathogenesis. *Blood* 103: 4602-4609

Liu HS, Jan MS, Chou CK, Chen PH, Ke NJ (1999) Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun* 260: 712-717

Liu Q, Chen H, Ojode T, Gao X, Anaya-O'Brien S, Turner NA, Ulrick J, DeCastro R, Kelly C, Cardones AR et al (2012) WHIM syndrome caused by a single amino acid substitution in the carboxy-tail of chemokine receptor CXCR4. *Blood* 120: 181-189

Liu Q, Pan C, Lopez L, Gao J, Velez D, Anaya-O'Brien S, Ulrick J, Littel P, Corns JS, Ellenburg DT et al (2016) WHIM Syndrome Caused by Waldenstrom's Macroglobulinemia-Associated Mutation CXCR4 (L329fs). *Journal of clinical immunology* 36: 397-405

Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, Cote D, Rowe DW, Lin CP, Scadden DT (2009) Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* 457: 92-96

Lucas D, Battista M, Shi PA, Isola L, Frenette PS (2008) Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell stem cell* 3: 364-366

Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA (1998) Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9448-9453

Ma Q, Jones D, Springer TA (1999) The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 10: 463-471

Mancek-Keber M, Lainscek D, Bencina M, Chen JG, Romih R, Hunter ZR, Treon SP, Jerala R (2018) Extracellular vesicle-mediated transfer of constitutively active MyD88(L265P) engages MyD88(wt) and activates signaling. *Blood* 131: 1720-1729

Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H, Benovic JL (2003) The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell* 5: 709-722

Matsunaga T, Sakamaki S, Kohgo Y, Ohi S, Hirayama Y, Niitsu Y (1993) Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor can mobilize sufficient amounts of peripheral blood stem cells in healthy volunteers for allogeneic transplantation. *Bone marrow transplantation* 11: 103-108

McCormick PJ, Segarra M, Gasperini P, Gulino AV, Tosato G (2009) Impaired recruitment of Grk6 and beta-Arrestin 2 causes delayed internalization and desensitization of a WHIM syndrome-associated CXCR4 mutant receptor. *PLoS One* 4: e8102

McDermott DH, Gao JL, Liu Q, Siwicki M, Martens C, Jacobs P, Velez D, Yim E, Bryke CR, Hsu N et al (2015) Chromothriptic cure of WHIM syndrome. *Cell* 160: 686-699

McDermott DH, Liu Q, Ulrick J, Kwatema N, Anaya-O'Brien S, Penzak SR, Filho JO, Priel DA, Kelly C, Garofalo M et al (2011a) The CXCR4 antagonist plerixafor corrects panleukopenia in patients with WHIM syndrome. *Blood* 118: 4957-4962

McDermott DH, Liu Q, Velez D, Lopez L, Anaya-O'Brien S, Ulrick J, Kwatema N, Starling J, Fleisher TA, Priel DA et al (2014) A phase 1 clinical trial of long-term, low-dose treatment of WHIM syndrome with the CXCR4 antagonist plerixafor. *Blood* 123: 2308-2316

McDermott DH, Lopez J, Deng F, Liu Q, Ojode T, Chen H, Ulrick J, Kwatema N, Kelly C, Anaya-O'Brien S et al (2011b) AMD3100 is a potent antagonist at CXCR4(R334X), a hyperfunctional mutant chemokine receptor and cause of WHIM syndrome. *Journal of cellular and molecular medicine* 15: 2071-2081

McDermott DH, Pastrana DV, Calvo KR, Pittaluga S, Velez D, Cho E, Liu Q, Trout HH, 3rd, Neves JF, Gardner PJ et al (2019) Plerixafor for the Treatment of WHIM Syndrome. *The New England journal of medicine* 380: 163-170

McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, Overall CM (2001) Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *The Journal of biological chemistry* 276: 43503-43508

Medina KL, Pongubala JM, Reddy KL, Lancki DW, Dekoter R, Kieslinger M, Grosschedl R, Singh H (2004) Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Dev Cell* 7: 607-617

Melchers F, Rolink A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Ghia P, Andersson J (1995) Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* 7: 214-227

Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466: 829-834

Mercier FE, Sykes DB, Scadden DT (2016) Single Targeted Exon Mutation Creates a True Congenic Mouse for Competitive Hematopoietic Stem Cell Transplantation: The C57BL/6-CD45.1(STEM) Mouse. *Stem Cell Reports* 6: 985-992

Minegishi Y, Coustan-Smith E, Rapalus L, Ersoy F, Campana D, Conley ME (1999) Mutations in Igalpha (CD79a) result in a complete block in B-cell development. *J Clin Invest* 104: 1115-1121

Moens L, Frans G, Bosch B, Bossuyt X, Verbinnen B, Poppe W, Boeckx N, Slatter M, Brusselmans C, Diaz G et al (2016) Successful hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis in an adult with warts-hypogammaglobulinemia-immunodeficiency-myelokathexis syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology* 138: 1485-1489.e1482

Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K (2006) Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* 7: 293-301

Morrison SJ, Weissman IL (1994) The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1: 661-673

Mulloy JC, Wunderlich M, Zheng Y, Wei J (2008) Transforming human blood stem and progenitor cells: a new way forward in leukemia modeling. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7: 3314-3319

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T (1996) Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382: 635-638

Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T (1994) Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2305-2309

Nakada D, Oguro H, Levi BP, Ryan N, Kitano A, Saitoh Y, Takeichi M, Wendt GR, Morrison SJ (2014) Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. *Nature* 505: 555-558

Nie Y, Han YC, Zou YR (2008) CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine* 205: 777-783

O'Malley DP (2007) Benign extramedullary myeloid proliferations. *Mod Pathol* 20: 405-415

Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T (1992) In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* 80: 3044-3050

- Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T (2010) The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 33: 387-399
- Orsini MJ, Parent JL, Mundell SJ, Marchese A, Benovic JL (1999) Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* 274: 31076-31086
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H (1996) Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science (New York, NY)* 273: 242-245
- Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, Ben-Hur H, Lapidot T, Alon R (1999a) The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest* 104: 1199-1211
- Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L et al (1999b) Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science (New York, NY)* 283: 845-848
- Pereira JP, An J, Xu Y, Huang Y, Cyster JG (2009) Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. *Nat Immunol* 10: 403-411
- Pereira JP, Xu Y, Cyster JG (2010) A role for S1P and S1P1 in immature-B cell egress from mouse bone marrow. *PLoS One* 5: e9277
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45
- Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM (2003) The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *American journal of respiratory and critical care medicine* 167: 1676-1686
- Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Mansson R, Thoren LA, Ekblom M, Alexander WS, Jacobsen SE (2007) Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* 1: 671-684
- Ramirez P, Rettig MP, Uy GL, Deych E, Holt MS, Ritchey JK, DiPersio JF (2009) BIO5192, a small molecule inhibitor of VLA-4, mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 114: 1340-1343
- Rieger MA, Hoppe PS, Smejkal BM, Eitelhuber AC, Schroeder T (2009) Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice. *Science (New York, NY)* 325: 217-218

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, NY)* 239: 487-491

Schaefer BC, Schaefer ML, Kappler JW, Marrack P, Kiedl RM (2001) Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/ dendritic cell interactions in vivo. *Cell Immunol* 214: 110-122

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

Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T (1995) Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28: 495-500

Singhal N, Tahlan A, Bansal C, Handa U, D'Cruz S (2011) Coexistence of leukemic infiltration and extramedullary hematopoiesis in a lymph node: A cytological diagnosis. *J Cytol* 28: 138-140

Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, Fox N, Broudy VC, Wolf NS, Kaushansky K (1996) The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 87: 4998-5005

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science (New York, NY)* 241: 58-62

Speetjens FM, Liefers GJ, Korbee CJ, Mesker WE, van de Velde CJ, van Vlierberghe RL, Morreau H, Tollenaar RA, Kuppen PJ (2009) Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 2: 1-7

Steinl C, Essl M, Schreiber TD, Geiger K, Prokop L, Stevanovic S, Potz O, Abele H, Wessels JT, Aicher WK et al (2013) Release of matrix metalloproteinase-8 during physiological trafficking and induced mobilization of human hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dev* 22: 1307-1318

Su L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, Xiong S (2005) Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11: 8273-8280

Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T (2006) Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25: 977-988

Sun Y, Cheng Z, Ma L, Pei G (2002) Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *The Journal of biological chemistry* 277: 49212-49219

Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S et al (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393: 591-594

Tarasova NI, Stauber RH, Michejda CJ (1998) Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXCR4 chemokine receptor. *The Journal of biological chemistry* 273: 15883-15886

Tassone L, Notarangelo LD, Bonomi V, Savoldi G, Sensi A, Soresina A, Smith CI, Porta F, Plebani A, Notarangelo LD et al (2009) Clinical and genetic diagnosis of warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis syndrome in 10 patients. *The Journal of allergy and clinical immunology* 123: 1170-1173, 1173 e1171-1173

Terasaki M, Sugita Y, Arakawa F, Okada Y, Ohshima K, Shigemori M (2011) CXCL12/CXCR4 signaling in malignant brain tumors: a potential pharmacological therapeutic target. *Brain tumor pathology* 28: 89-97

Testa NG, Lord BI, Shore NA (1972) The in vivo seeding of hemopoietic colony-forming cells in irradiated mice. *Blood* 40: 654-661

Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW (1957) Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England journal of medicine* 257: 491-496

Toms DR, Cannick L, Stuart RK, Jenrette JM, Terwiliger L (2010) Helical tomotherapy for extramedullary hematopoiesis involving the pericardium in a patient with chronic myeloid leukemia. *Jpn J Radiol* 28: 476-478

Tonegawa S (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-581

Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR (2014) Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 123: 2791-2796

Tzeng YS, Li H, Kang YL, Chen WC, Cheng WC, Lai DM (2011) Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood* 117: 429-439

Uy GL, Rettig MP, Cashen AF (2008) Plerixafor, a CXCR4 antagonist for the mobilization of hematopoietic stem cells. *Expert opinion on biological therapy* 8: 1797-1804

Velasco-Hernandez T, Sawen P, Bryder D, Cammenga J (2016) Potential Pitfalls of the Mx1-Cre System: Implications for Experimental Modeling of Normal and Malignant Hematopoiesis. *Stem Cell Reports* 7: 11-18

Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL (2004) Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 103: 3258-3264

Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC (2003) Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science (New York, NY)* 301: 1374-1377

Williams SA, Harata-Lee Y, Comerford I, Anderson RL, Smyth MJ, McColl SR (2010) Multiple functions of CXCL12 in a syngeneic model of breast cancer. *Molecular cancer* 9: 250

Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E et al (2008) Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135: 1118-1129

Winkler IG, Bendall LJ, Forristal CE, Helwani F, Nowlan B, Barbier V, Shen Y, Cisterne A, Sedger LM, Levesque JP (2013) B-lymphopoiesis is stopped by mobilizing doses of G-CSF and is rescued by overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl2. *Haematologica* 98: 325-333

Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, Poulton IJ, van Rooijen N, Alexander KA, Raggatt LJ et al (2010) Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 116: 4815-4828

Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL (2002) Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *The Journal of experimental medicine* 195: 1145-1154

Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Mansson R, Sigvardsson M, Jacobsen SE (2005) Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 105: 2717-2723

Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K et al (2007) Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell stem cell* 1: 685-697

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ et al (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425: 836-841

Zhang Y, Foudi A, Geay JF, Berthebaud M, Buet D, Jarrier P, Jalil A, Vainchenker W, Louache F (2004) Intracellular localization and constitutive endocytosis of CXCR4 in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22: 1015-1029

Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, Ahamed J, Li L (2014) Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. Nat Med 20: 1321-1326

Zhao M, Tao F, Venkatraman A, Li Z, Smith SE, Unruh J, Chen S, Ward C, Qian P, Perry JM et al (2019) N-Cadherin-Expressing Bone and Marrow Stromal Progenitor Cells Maintain Reserve Hematopoietic Stem Cells. Cell reports 26: 652-669.e656

Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ (2014) Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. Cell stem cell 15: 154-168

Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J, Joe GJ, Hexner E, Choi Y, Taichman RS et al (2007) Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. Blood 109: 3706-3712

Zipori D, Lee F (1988) Introduction of interleukin-3 gene into stromal cells from the bone marrow alters hemopoietic differentiation but does not modify stem cell renewal. Blood 71: 586-596

Zuelzer WW (1964) "MYELOKATHEXIS"--A NEW FORM OF CHRONIC GRANULOCYTOPENIA. REPORT OF A CASE. The New England journal of medicine 270: 699-704

6.1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
7-AAD	7-Aminoactinomycin
ADP	Adenosindiphosphat
AML	Akute myeloische Leukämie
AP2	AP2-Adaptorkomplex
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zellrezeptor (B-cell receptor)
BM	Knochenmark
BOI	Zu untersuchendes Knochenmark (<i>bone marrow of interest</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR-Zellen	CXCL12-exprimierende retikuläre Zellen (<i>CXCL12-abundant reticular cells</i>)
cDNA	Komplementäre DNA
CFU-C	<i>colony-forming unit cell</i>
CLP	Lymphoide Vorläuferzelle (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMP	Myeloide Vorläuferzelle (<i>common myeloid progenitor</i>)
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMH	Extramedulläre Hämatopoese
ERK	<i>extracellular-signal related kinases</i>
FL	fötale Leber
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPRC	G-Protein gekoppelter Rezeptor (<i>G-protein coupled receptor</i>)
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase (<i>G-protein coupled receptor kinase</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
GVHD	<i>graft-vs-host-disease</i>
Hb	Hämoglobinwert
HCT	Hämatokrit
HPV	Humane Papillomviren
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (<i>hematopoetic stem cell</i>)
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (<i>hematopoetic stem and progenitor cells</i>)
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVC	<i>individually ventilated Cages</i>
LSK-SLAM	LSK-Zellen und zusätzlich CD150 ⁺ CD48 ⁻
LSK-Zellen	Lin ⁻ Sca1 ⁺ CD117 ⁺ -Zellen
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCH	Mittleres Erythrozyteneinzelzell-Hämoglobin
MCV	Mittleres Erythrozyteneinzelzellvolumen
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MFI	Mittelere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NOD/SCID	<i>non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>

Abkürzung	Bedeutung
no-RT	Ansatz ohne reverse Transkriptase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBSF	<i>pre-B cell growth stimulating factor</i> (vgl. CXCL12)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PLT	Thrombozyten
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RBC	Erythrozytenzahl (<i>red blood cell count</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLAM	<i>signaling lymphocyte activation marker</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TPO	Thrombopoetin
TRIS-HCl	Tris-aminomethan-HCl
WBC	Leukozytenzahl (<i>white blood cell count</i>)
WT	Wildtyp
ZFE	Zentrale Forschungseinrichtung der Uniklinik Frankfurt

6.2. Abbildungsverzeichnis

#	Titel	Seite
Abb. 1.1.	Schematische Darstellung der Hämatopoese	4
Abb. 1.2.	Schematische Darstellung der CXCR4 Signalweiterleitung	7
Abb. 1.3.	Schematische Darstellung der B-Zellreifung	9
Abb. 1.4.	Schematische Darstellung des C-Terminus von wildtypischen (links) und CXCR4 ^{1013/1013} -Tieren (rechts)	12
Abb. 2.1.	CXCR4 ¹⁰¹³ -Genotypisierung	32
Abb. 2.2.	Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Transplantationsregime	44
Abb. 3.1.	Blutbild einschl. Differentialblutbild	48
Abb. 3.2.	Gesamt-Leukozytenzahl im Femur und in der Milz	49
Abb. 3.3.	Immunphänotypische Analyse der Homöostase.	51
Abb. 3.4.	CXCR4-Oberflächenexpression reifer Blutzelllinien in der Homöostase.	52
Abb. 3.5.	Hämatopoetische Vorläuferzellen im CFU-Assay in der Homöostase	53
Abb. 3.6.	Durchflusszytometrische Bestimmung hämatopoetischer Vorläuferzellen in der Homöostase	54
Abb. 3.7.	CXCR4-Oberflächenexpression auf hämatopoetischen Vorläufern in der Homöostase.	55
Abb. 3.8.	qPCR-Analyse der CXCR4-Expression unreifer Zellen in der Homöostase	55
Abb. 3.9.	Zellzyklusanalyse in Knochenmarkzellen in der Homöostase	56
Abb. 3.10.	Zellzyklusanalyse in Milzzellen in der Homöostase	57
Abb. 3.11.	CXCL12 Konzentrationsbestimmung in der Homöostase	58
Abb. 3.12.	Zirkadiane Rhythmik zirkulierender Leukozyten	59
Abb. 3.13.	Migrationsassay von Knochenmarkzellen	60
Abb. 3.14.	F-Aktin Polymerisierung unreifer Zellen nach CXCL12-Stimulation	61
Abb. 3.15.	Erk-Aktivierung nach CXCL12-Stimulation in unreifen Knochenmarkzellen	62
Abb. 3.16.	Repräsentatives Beispiel für die detektierte B220 ^{dim} B-Zellpopulation in den drei untersuchten Organen	63
Abb. 3.17.	Verteilung zwischen B220 ^{dim} und B220 ^{high} Populationen in den drei untersuchten Organen	65
Abb. 3.18.	B-Zellreifungsanalyse	67
Abb. 3.19.	CXCR4-Oberflächenexpression auf B-Zellreifestadien	69
Abb. 3.20.	Apoptoserate in B-Zellsubpopulationen	70
Abb. 3.21.	Quantifizierung von preB-Kolonien	70
Abb. 3.22.	Spezifische Impfantwort	71
Abb. 3.23.	Plerixafor-Mobilisierung	73
Abb. 3.24.	G-CSF Mobilisierung	74
Abb. 3.25.	Hominganalyse	75
Abb. 3.26.	Engraftmentanalyse	76
Abb. 3.27.	Endanalyse des Peripherbluts 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit UBC-GFP-Kompetitor	78
Abb. 3.28.	Endanalyse des Knochenmarks 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit UBC-GFP-Kompetitor	79
Abb. 3.29.	Endanalyse der Milz 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit UBC-GFP-Kompetitor	80
Abb. 3.30.	HSPC nach kompetitiver Transplantation mit UBC-GFP-Kompetitor	81
Abb. 3.31.	Zellzyklusanalyse nach kompetitiver Transplantation mit UBC-GFP-Kompetitor im Knochenmark.	82

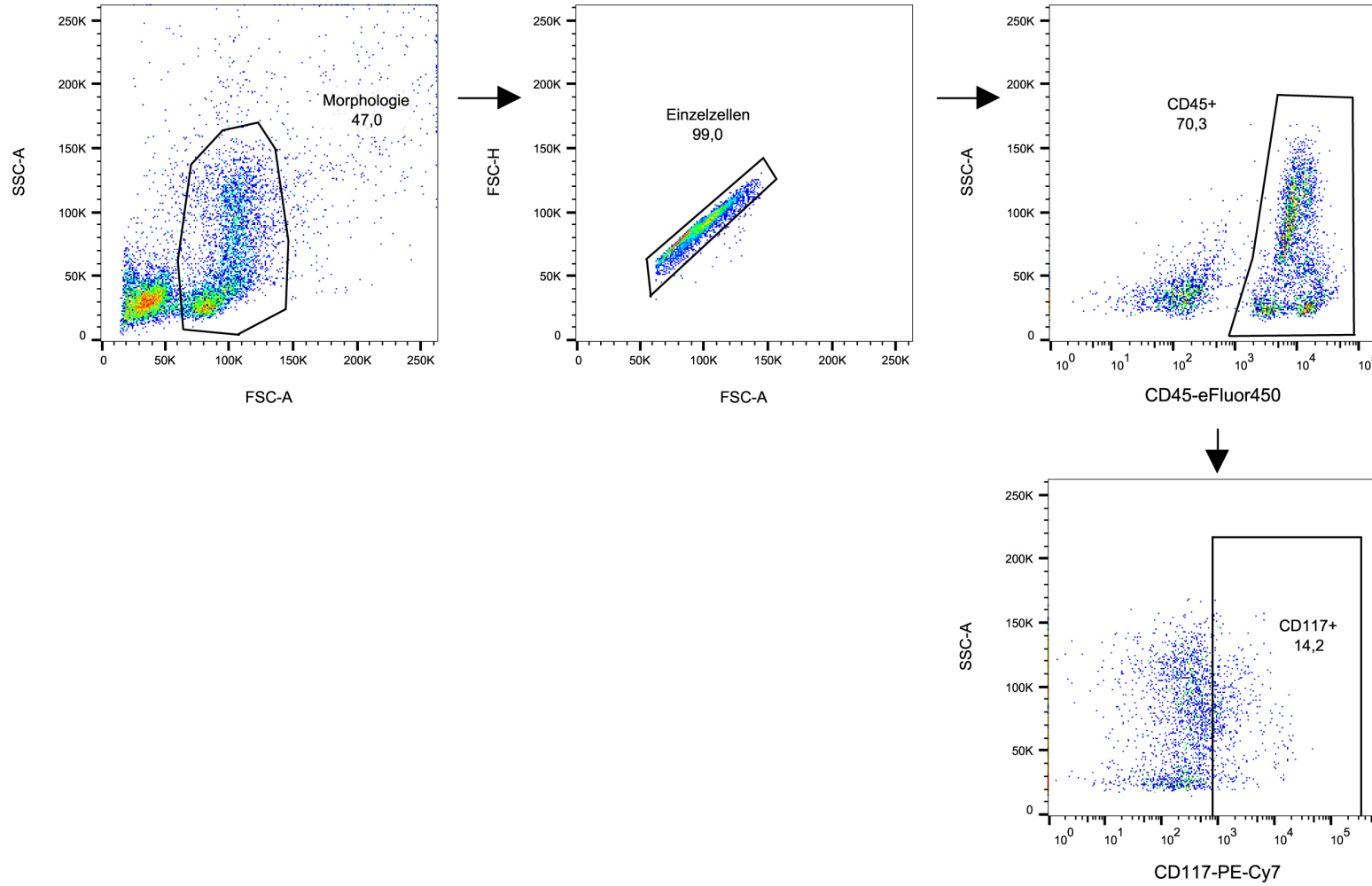
#	Titel	Seite
Abb. 3.32.	Endanalyse der Sekundärtransplantation mit UBC-GFP-Kompetitor	84
Abb. 3.33.	Endanalyse des Peripherbluts 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit CD45.1-Kompetitor	85
Abb. 3.34.	Endanalyse des Knochenmarks 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit CD45.1-Kompetitor	86
Abb. 3.35.	Endanalyse der Milz 16 Wochen nach kompetitiver Transplantation mit CD45.1-Kompetitor	87
Abb. 3.36.	Zellzyklusanalyse im Knochenmark nach kompetitiver Transplantation mit CD45.1-Kompetitor	88
Abb. 3.37.	Engraftment nach Sekundärtransplantation mit CD45.1-Kompetitorzellen	90
Abb. 3.38.	Überlebensrate nach primärer Leukämietransplantation	91
Abb. 3.39.	Überlebensrate nach sekundärer Leukämietransplantation	93
Abb. 3.40.	Behandlung induzierten der AML mit Cytarabin	94
Abb. 4.1.	CXCR4-Oberflächenexpression auf B-Zellreifestadien (absolut)	109

6.3. Tabellenverzeichnis

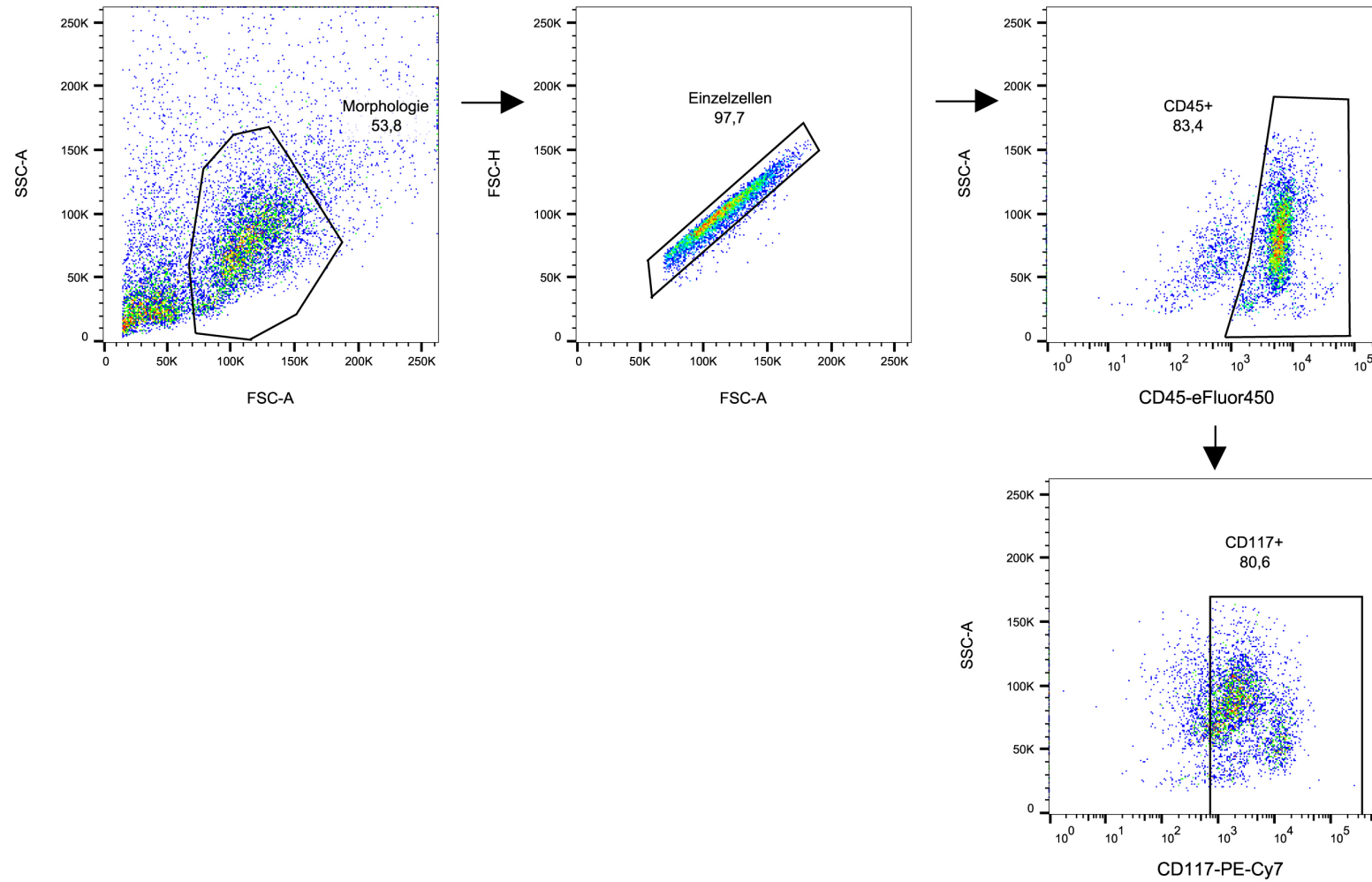
#	Titel	Seite
Tabelle 1.1.	Liste der bekannten WHIM-auslösenden CXCR4-Mutationen	11
Tabelle 2.1.	Liste der verwendeten Antikörper und anderer Färbereagenzien	14
Tabelle 2.2.	Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	18
Tabelle 2.3.	Liste der verwendeten Geräte	19
Tabelle 2.4.	Liste der verwendeten Größenstandards	22
Tabelle 2.5.	Liste der verwendeten Kits	22
Tabelle 2.6.	Liste der verwendeten Medikamente	23
Tabelle 2.7.	Liste der verwendeten Software	30
Tabelle 2.8.	Reaktionsansatz und PCR-Programm zur Genotypisierungs-PCR	31
Tabelle 2.9.	Genotypisierungsoligonukleotide	32
Tabelle 2.10.	Reaktionsansatz zur DNA-Umschreibung	33
Tabelle 2.11.	Reaktionsansatz zur Real Time-PCR	34
Tabelle 2.12.	Eingesetzte Oligonukleotidpaare in der Real Time-PCR	34
Tabelle 2.13.	Real Time-PCR Programm	35
Tabelle 2.14.	Probenansatz für SDS-Gelelektrophorese	38
Tabelle 3.1.	Prozentuale Verteilung zwischen der B220 ^{dim} - und B220 ^{high} B-Zellpopulation in den drei untersuchten Organen	64
Tabelle 3.2.	Markerkombinationen der unterschiedlichen B-Zellsubpopulationen	66

7. Anhänge

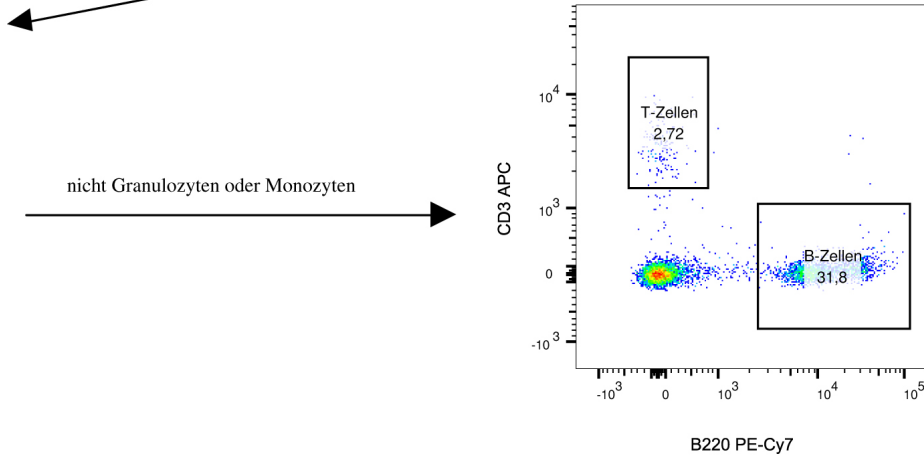
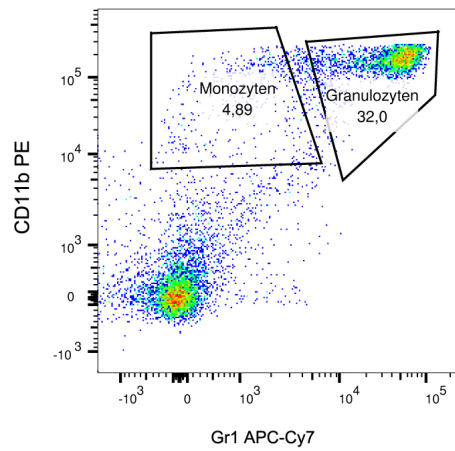
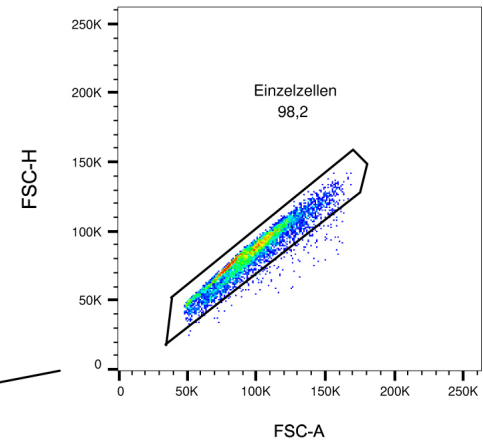
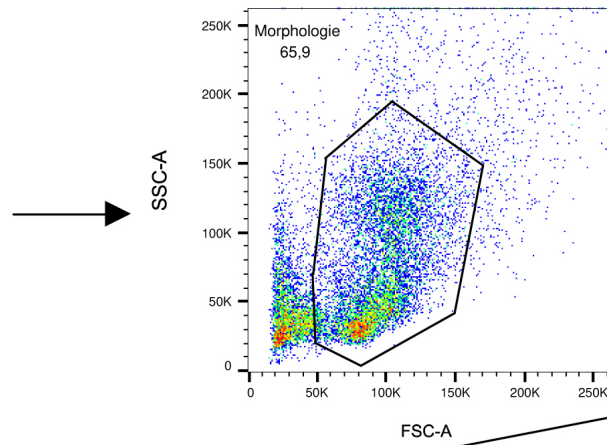
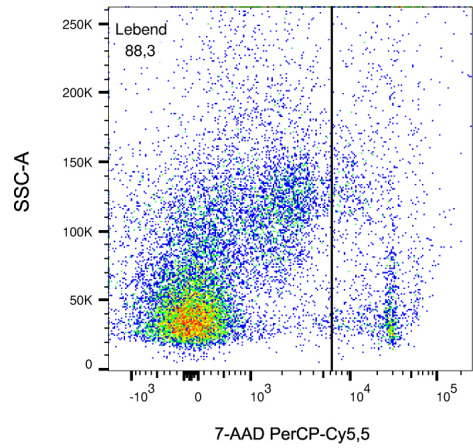
Beispiel: CD117-Aufreinigung (input)

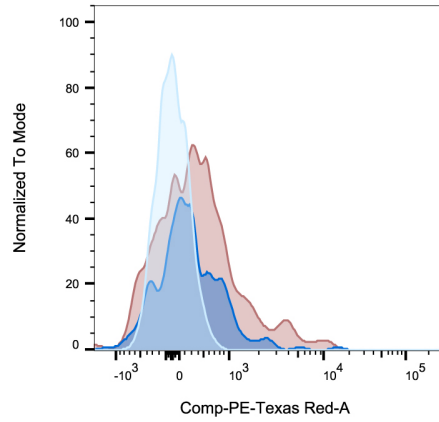


Beispiel: CD117-Aufreinigung (Positivfraktion)

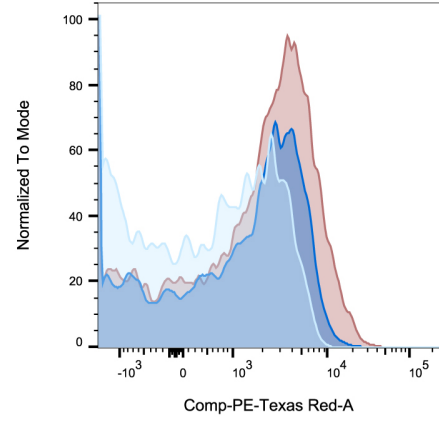


Beispiel: Gatingstrategie Immunphänotyp mit CXCR4-Oberflächenexpression

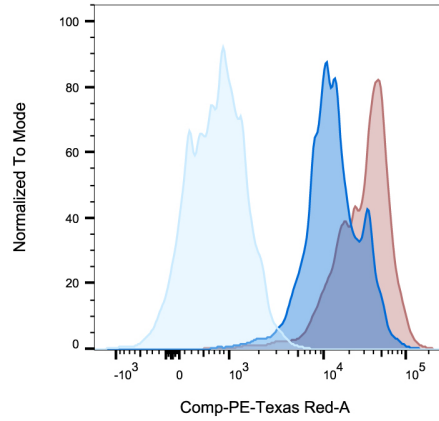




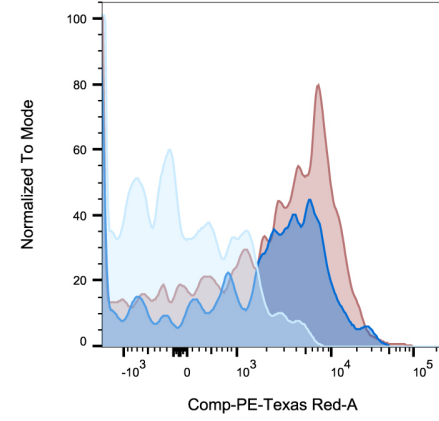
SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	T-Zellen	24,0
WT	T-Zellen	434
CXCR4(1013/1013)	T-Zellen	674



SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	Granulozyten	37,0
WT	Granulozyten	1357
CXCR4(1013/1013)	Granulozyten	2623

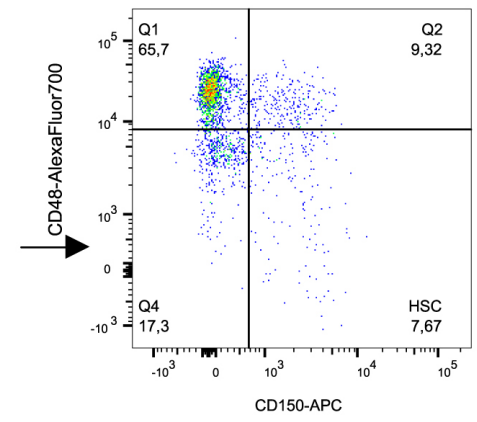
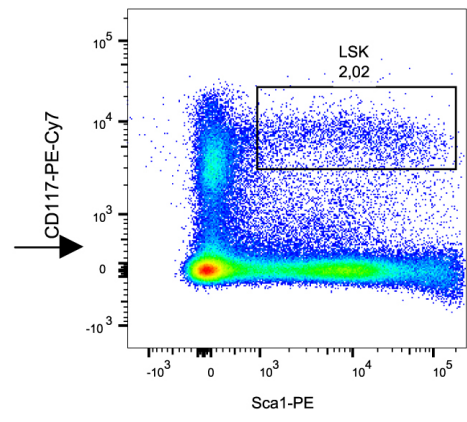
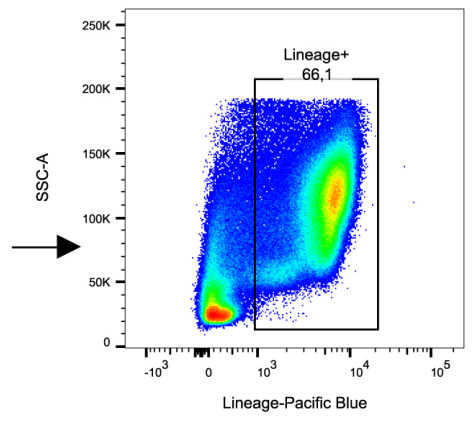
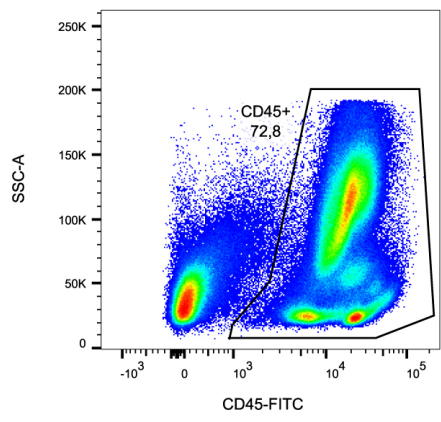
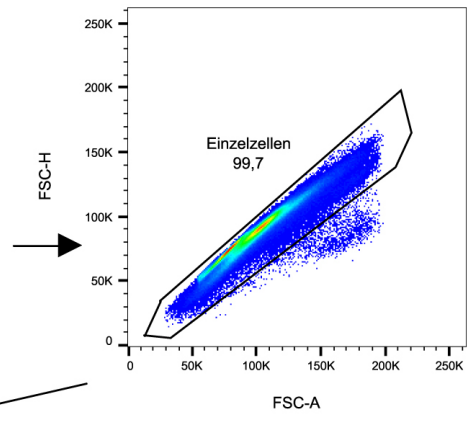
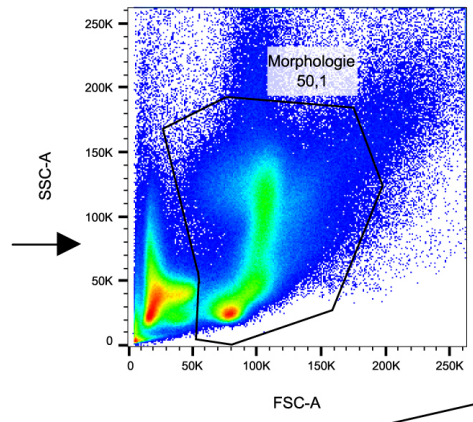
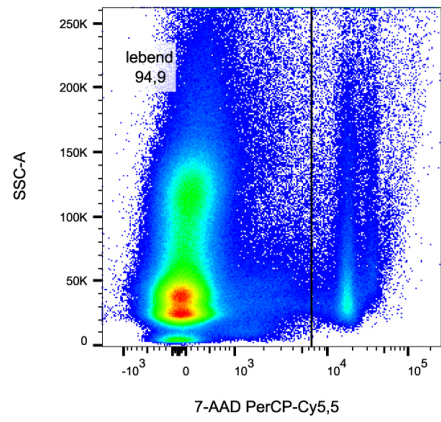


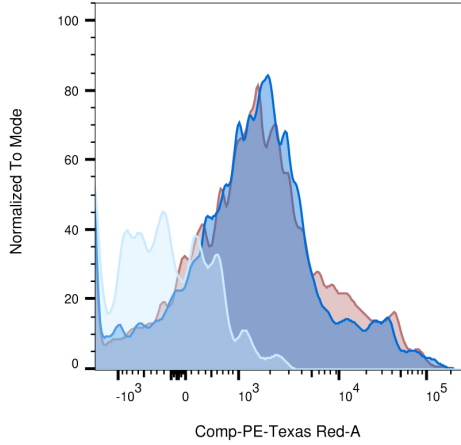
SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	B-Zellen	886
WT	B-Zellen	17030
CXCR4(1013/1013)	B-Zellen	36791



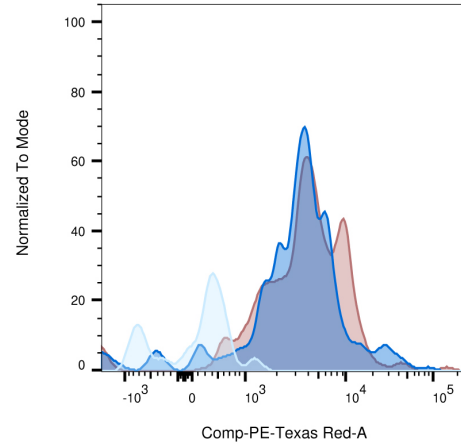
SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	Monozyten	-27,0
WT	Monozyten	3587
CXCR4(1013/1013)	Monozyten	4311

Beispiel: Gatingstrategie LSK-Zellen mit CXCR4-Oberflächene xpression



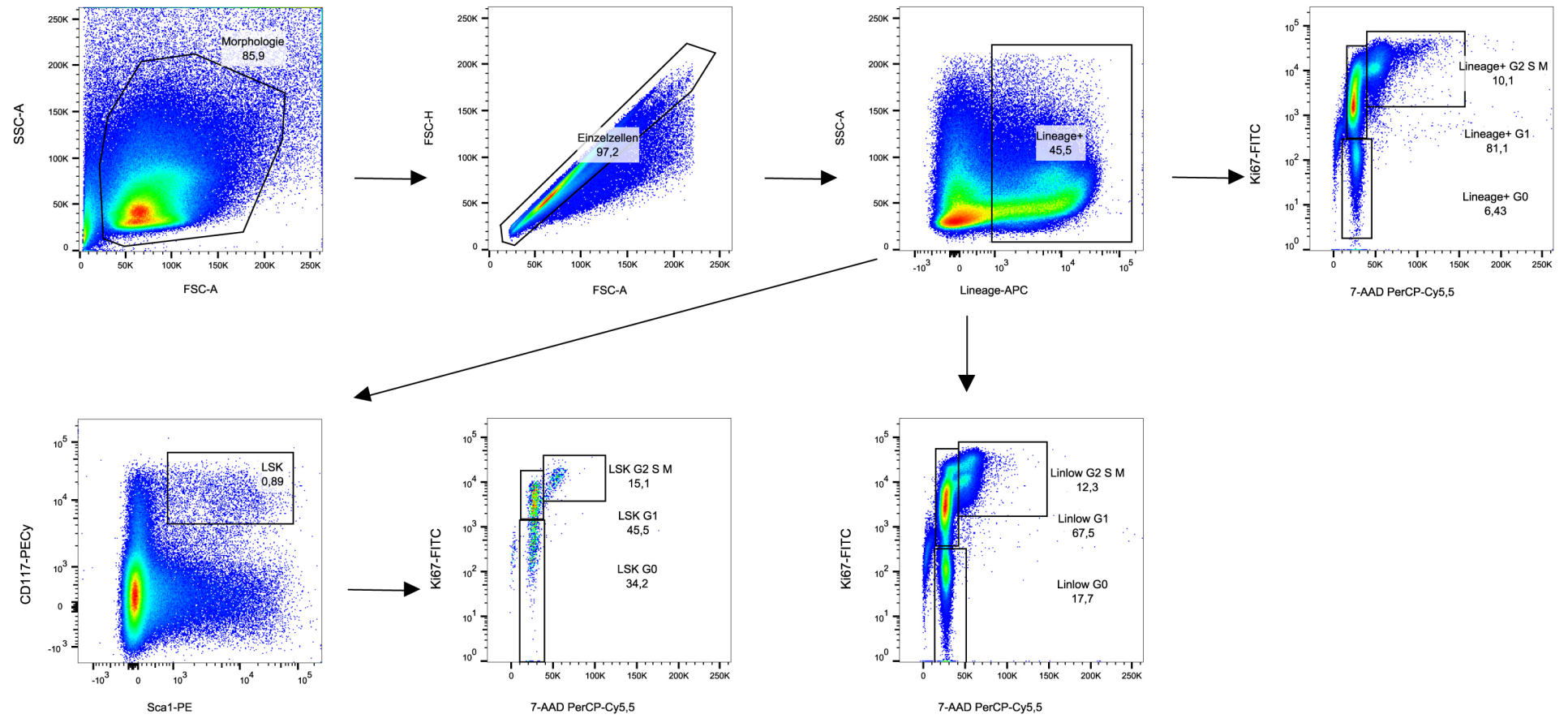


SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	LSK	-157
WT	LSK	4981
CXCR4(1013/1013)	LSK	5481

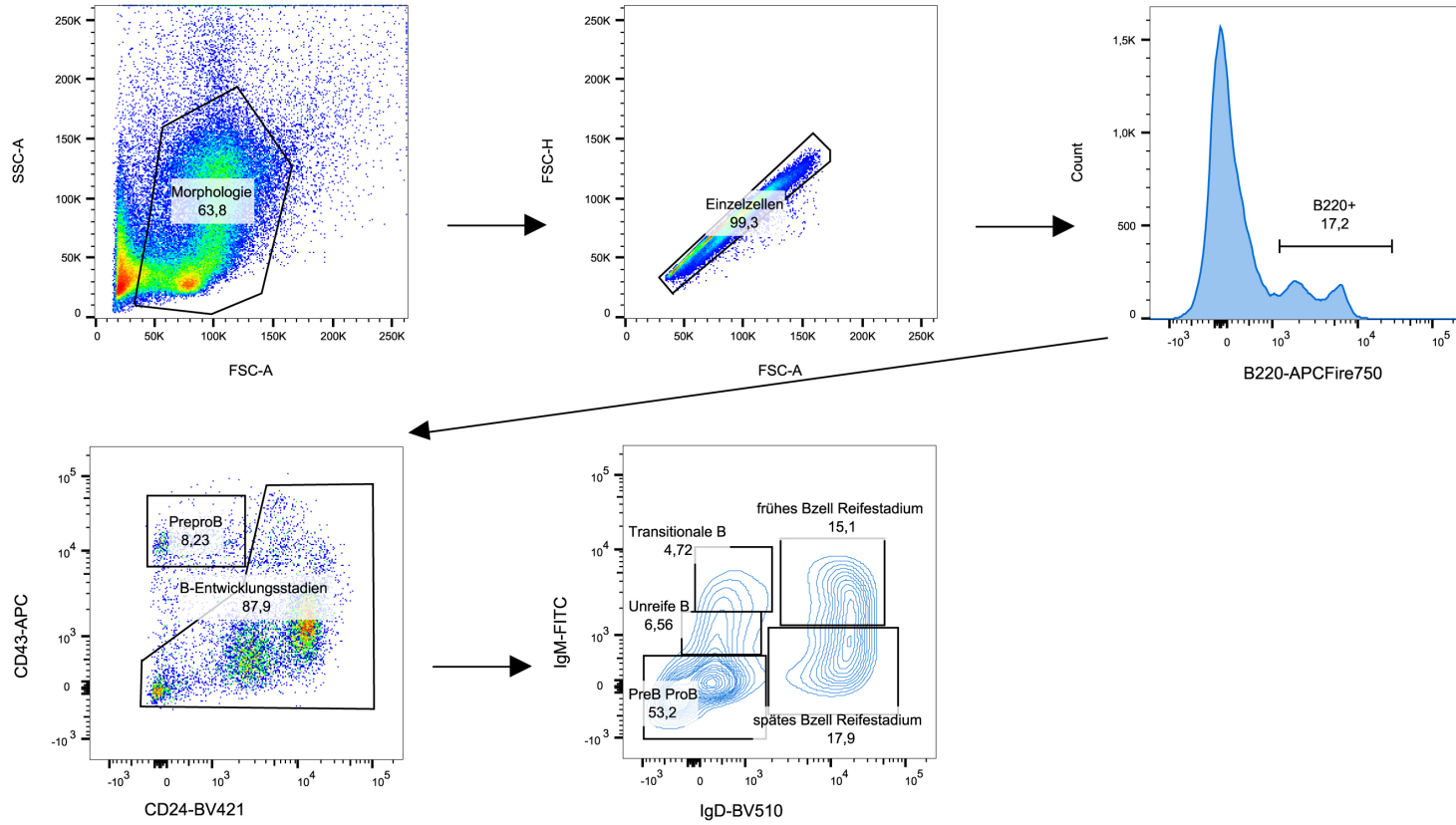


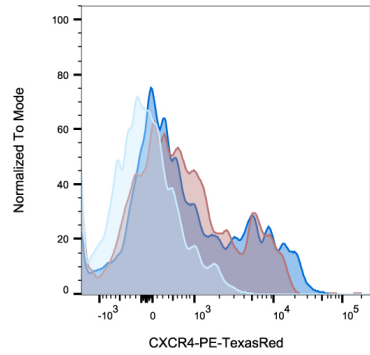
SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	HSC	171
WT	HSC	5627
CXCR4(1013/1013)	HSC	6154

Beispiel: Gatingstrategie Zellzyklusanalyse

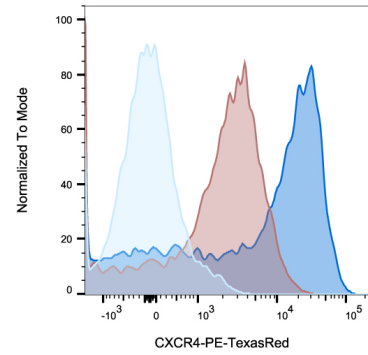


Beispiel: Gatingstrategie B-Zellentwicklungsstufen

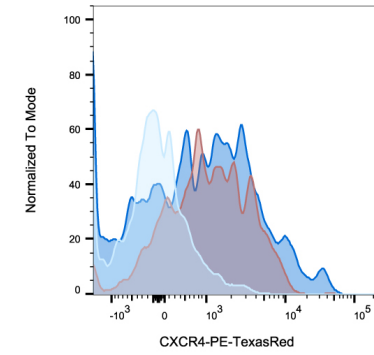




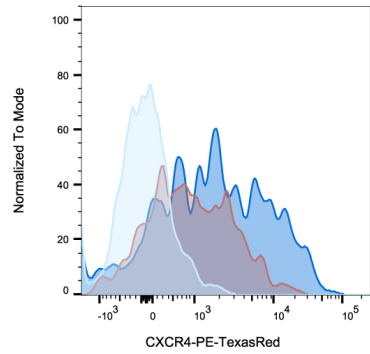
SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	PreproB	10,8
WT	PreproB	1969
CXCR4(1013/1013)	PreproB	2671



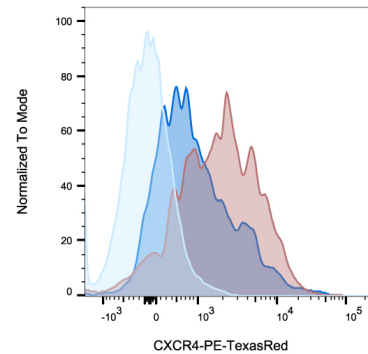
SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	PreB ProB	-22,3
WT	[Error: Dataset missing]	[Error: Dataset missing]
CXCR4(1013/1013)	[Error: Dataset missing]	[Error: Dataset missing]



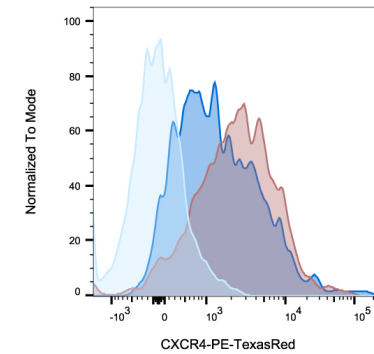
SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	Unreife B	-15,7
WT	[Error: Dataset missing]	[Error: Dataset missing]
CXCR4(1013/1013)	[Error: Dataset missing]	[Error: Dataset missing]



SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	Transitionale B	-10,6
WT	[Error: Dataset missing]	[Error: Dataset missing]
CXCR4(1013/1013)	[Error: Dataset missing]	[Error: Dataset missing]

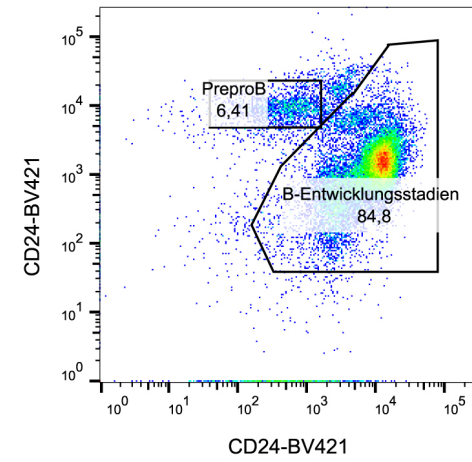
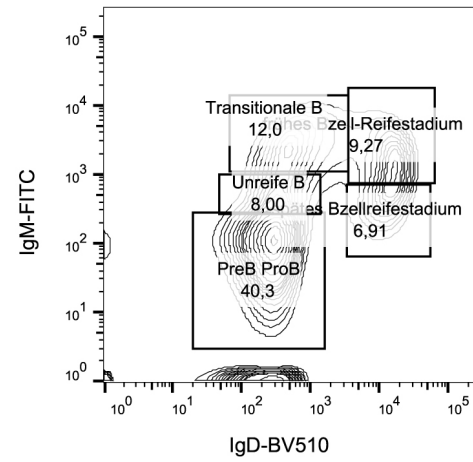
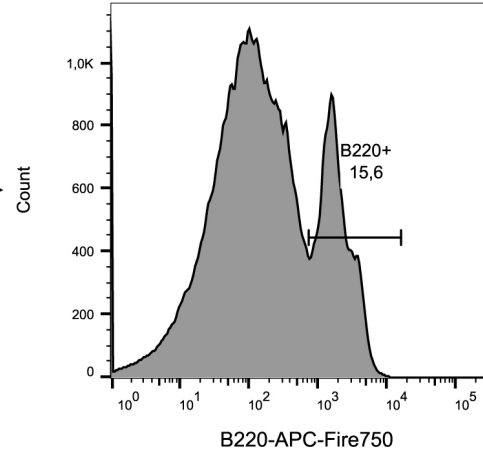
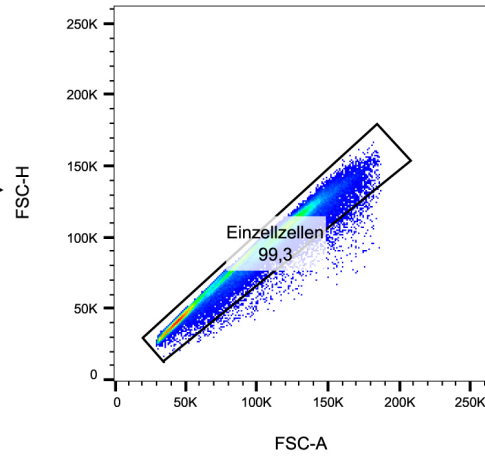
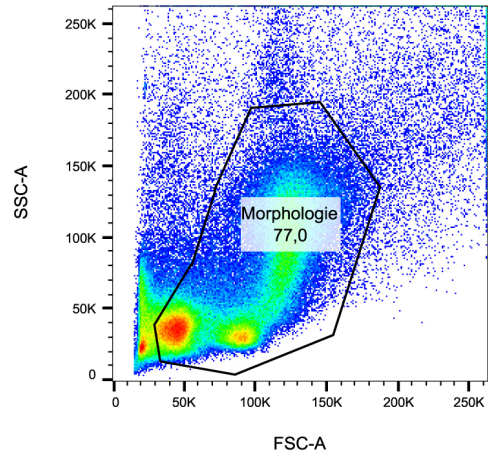


SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	frühes Bzell Reifestadium	-42,3
WT	[Error: Dataset missing]	[Error: Dataset missing]
CXCR4(1013/1013)	[Error: Dataset missing]	[Error: Dataset missing]



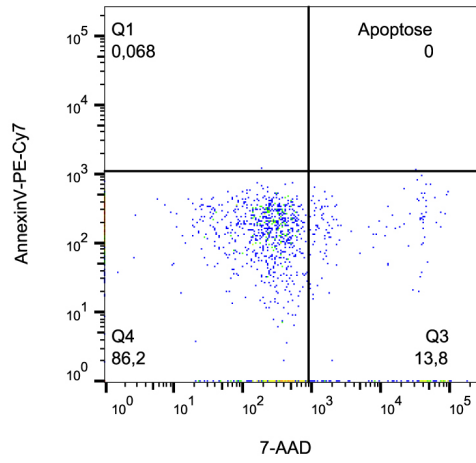
SampleID	Subset Name	Mean : Comp-PE-Texas Red-A
FMO	spätes Bzell Reifestadium	7,61
WT	[Error: Dataset missing]	[Error: Dataset missing]
CXCR4(1013/1013)	[Error: Dataset missing]	[Error: Dataset missing]

Beispiel: Gatingstrategie Apoptose verschiedener B-Zellentwicklungsstufen

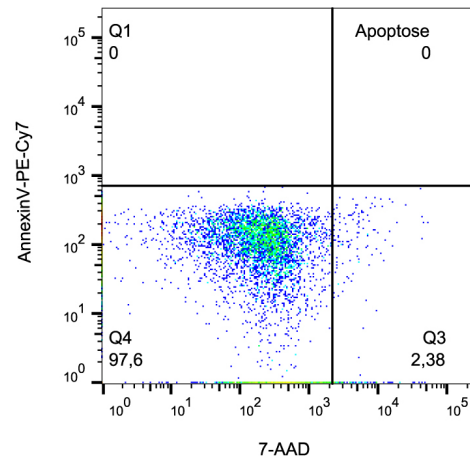


Kontrolle

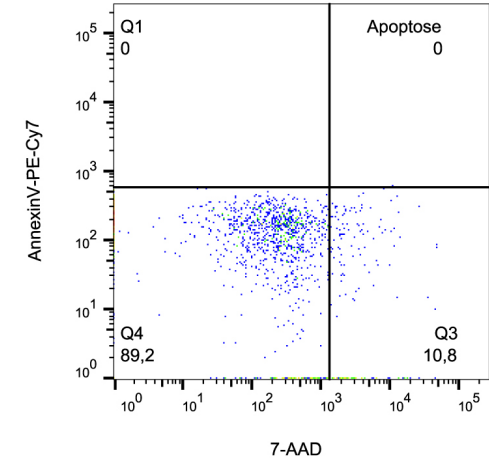
PreproB-Zellen



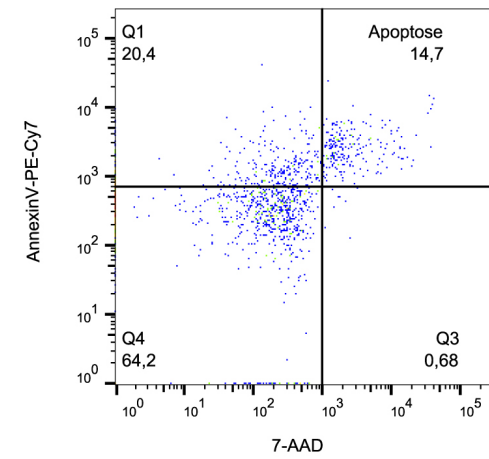
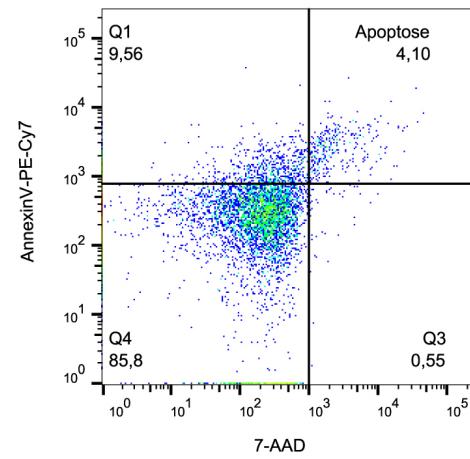
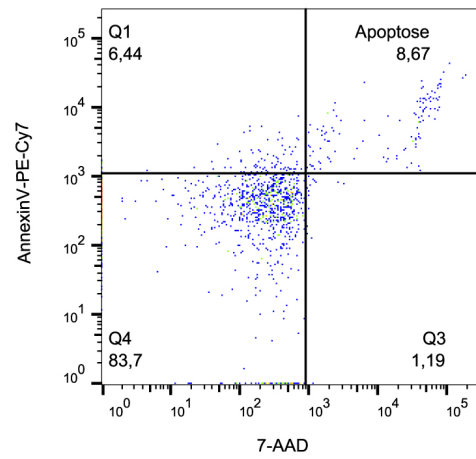
PreB ProB



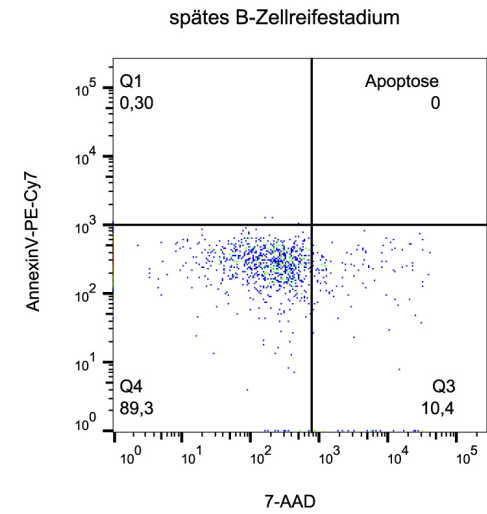
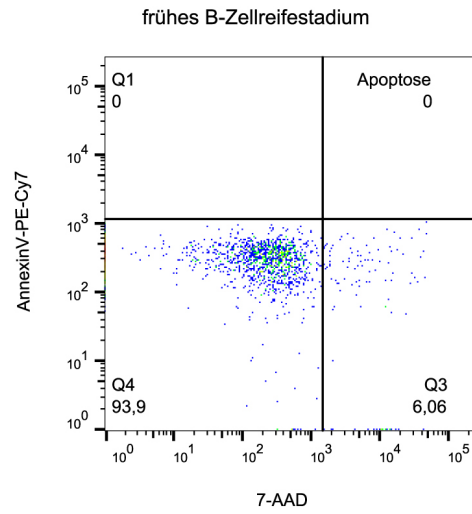
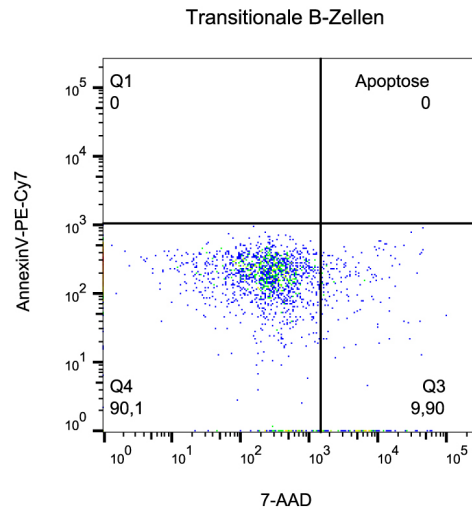
Unreife B-Zellen



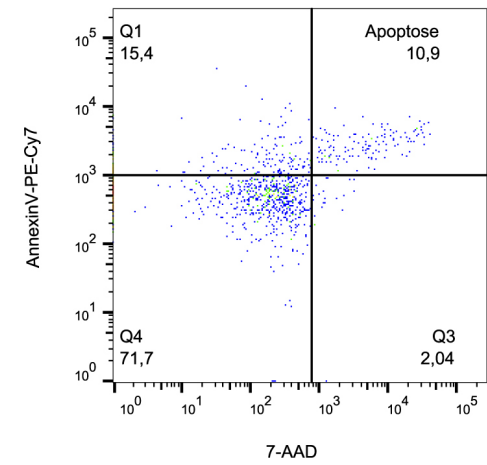
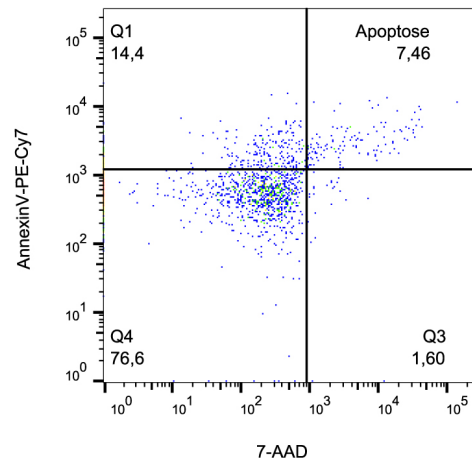
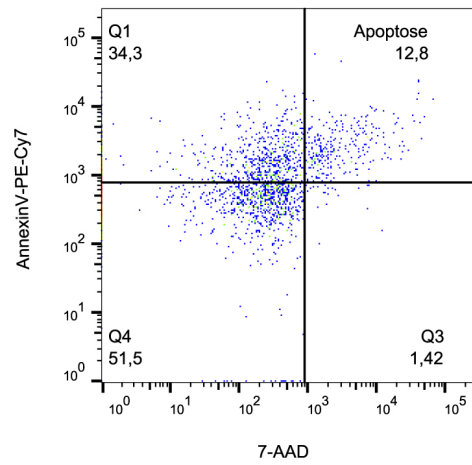
Beispiel



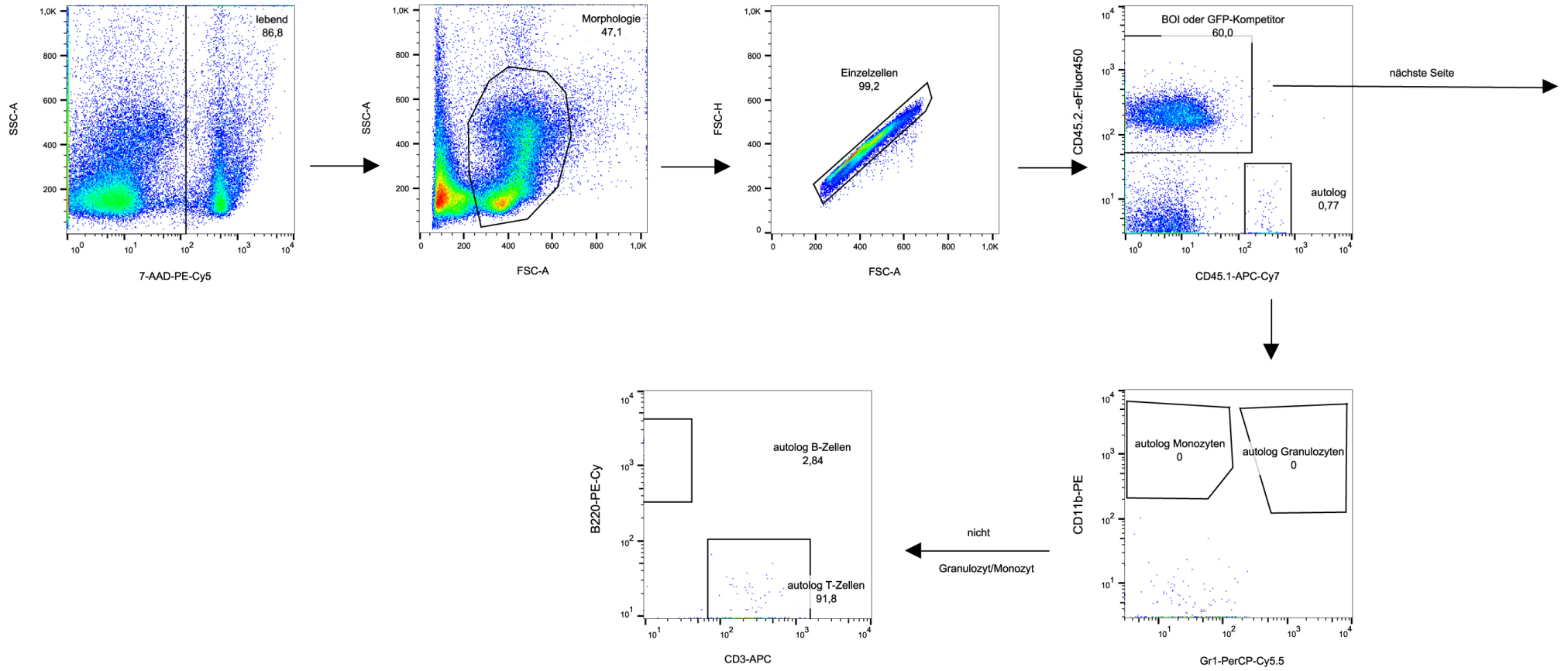
Kontrolle

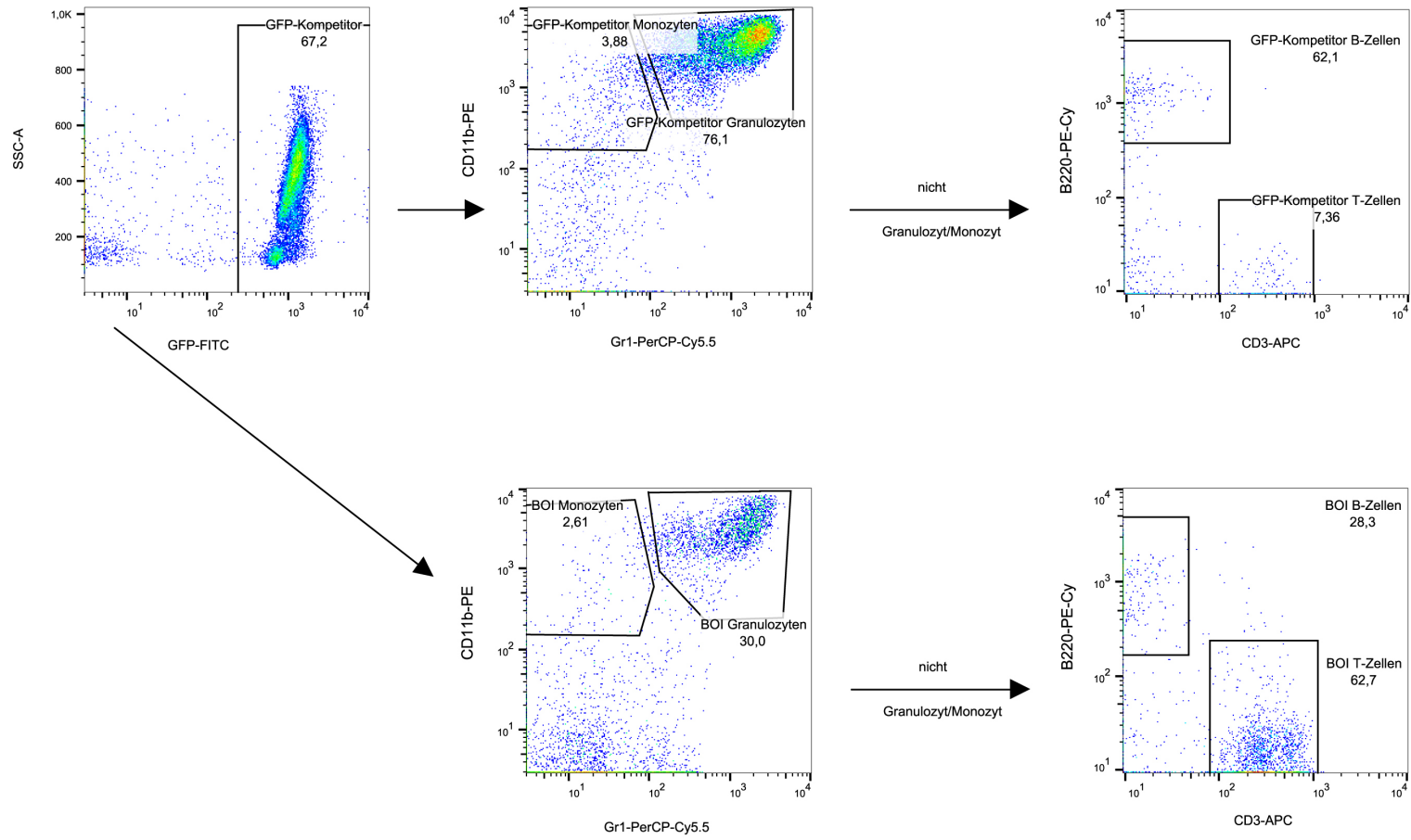


Beispiel

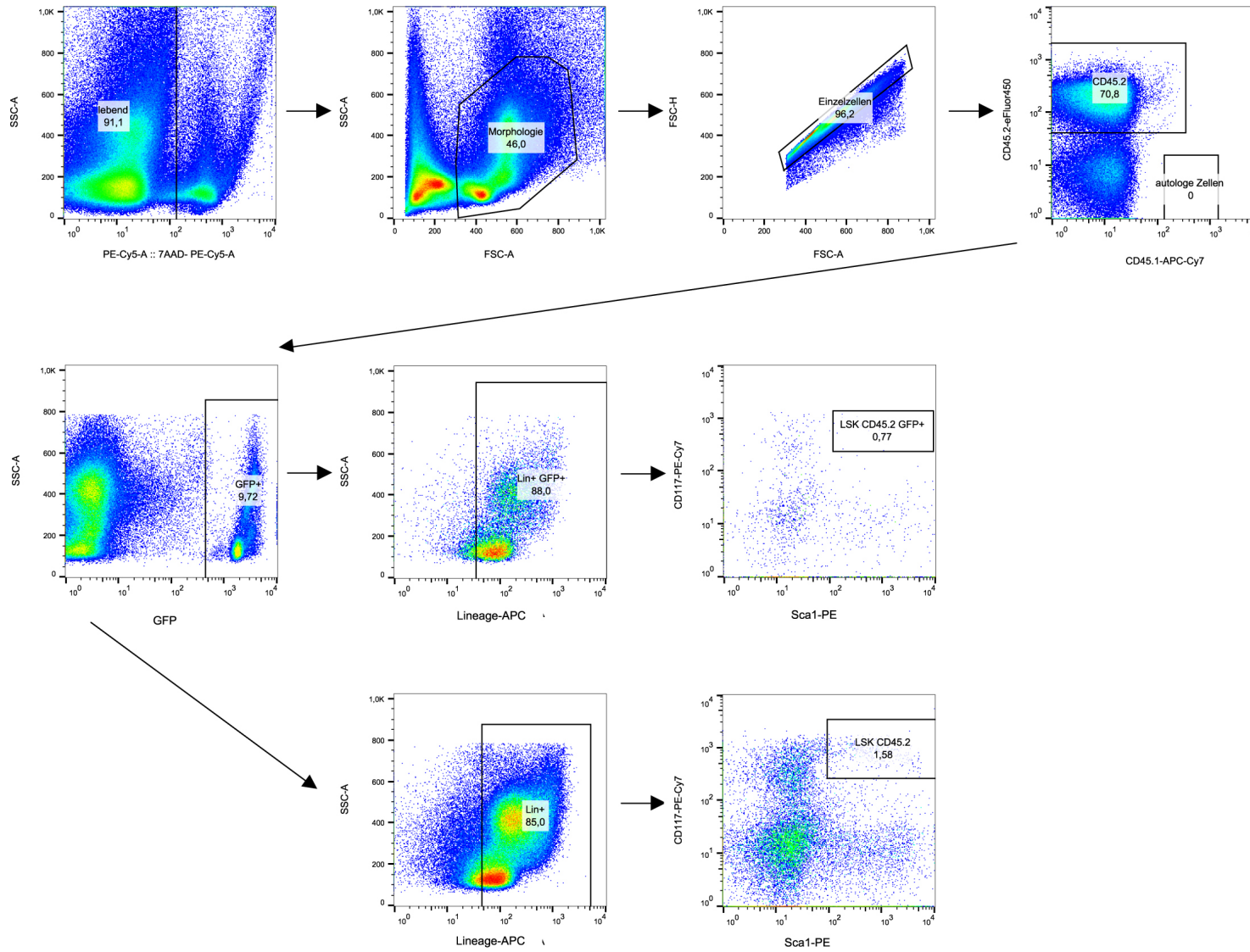


Gatingstrategie: Immunphänotyp nach kompetitiver Transplantation

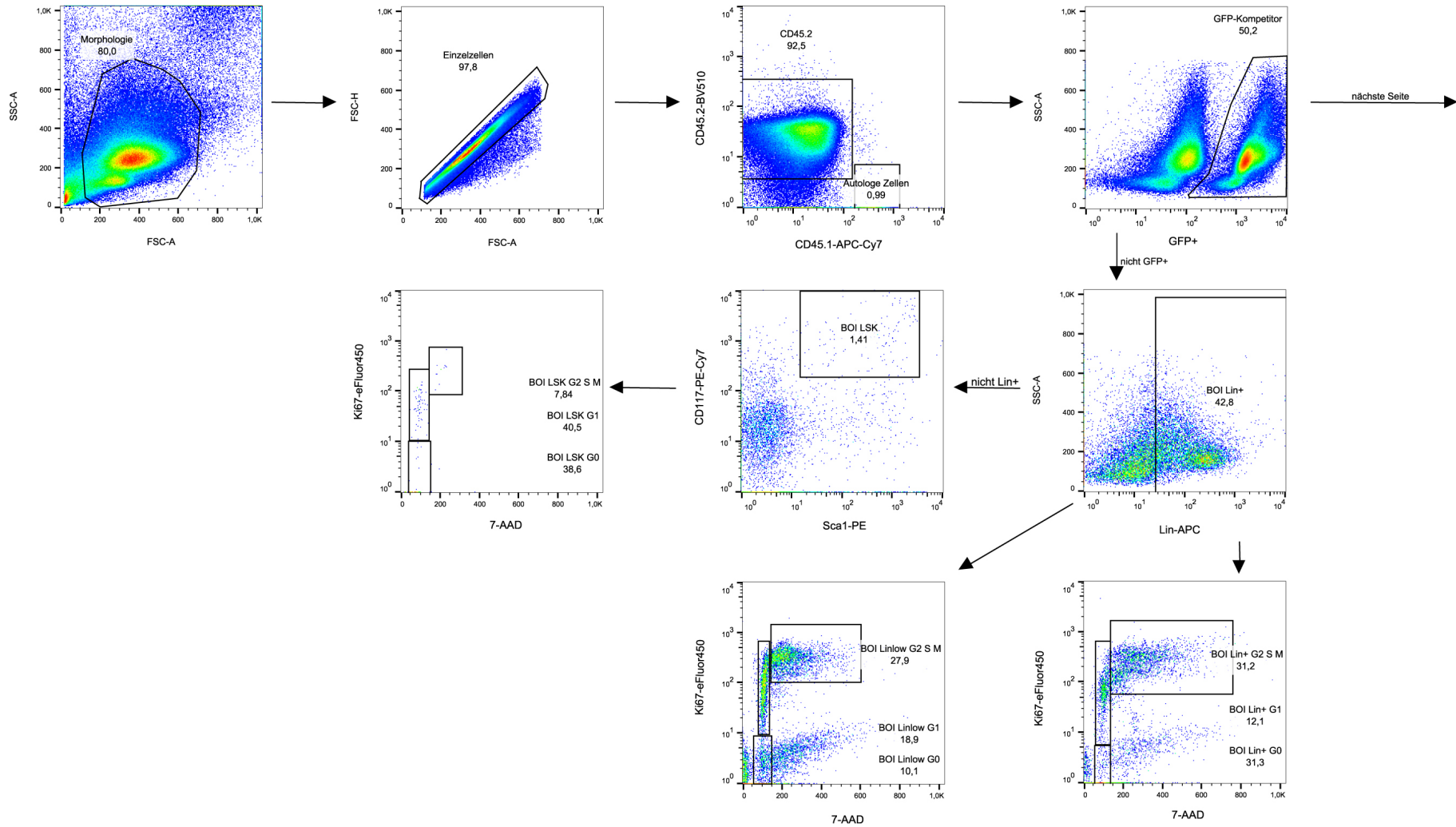


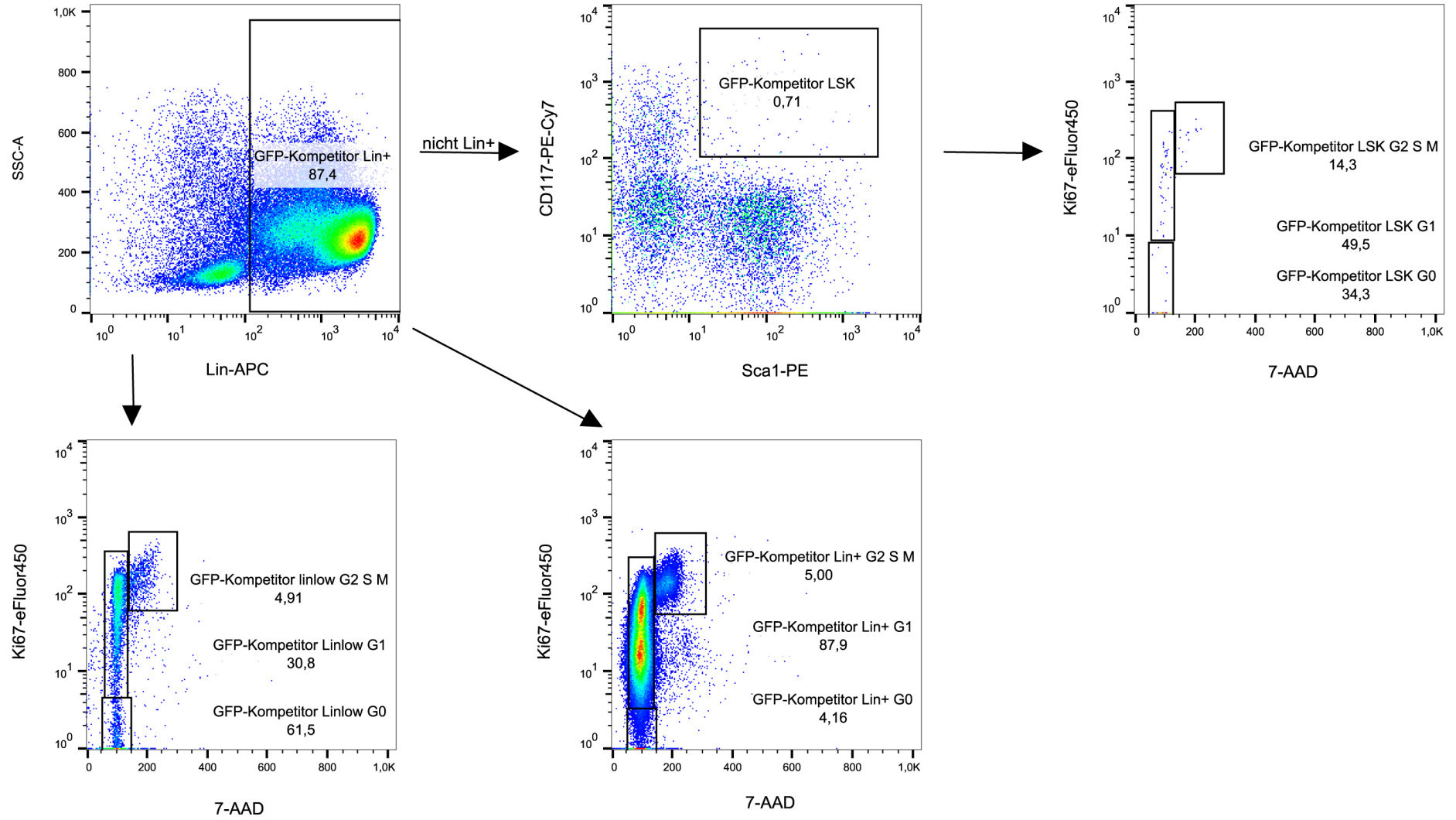


Beispiel: Gatingstrategie LSK-Zellen nach kompetitiver Transplantation



Beispiel: Gatingstrategie Zellzyklusanalyse nach kompetitiver Transplantation





8. Präsentationen

J. Miettinen, D. Karpova, **B. Tast**, G. Spohn, E. Wiercinska, H. Bönig. Hämatopoietisch-zellautonome Wirkungen von CXCL12 für Stammzellhomöostase, Stammzellmobilisation und Stammzelltransplantation, DRK Forschungsseminar, Frankfurt (2014)

B. Tast, G. Spohn, E. Wiercinska, D. Karpova, H. Bönig. Unreife Hämatopoese in der WHIM-Maus, DRK Science Day, Frankfurt (2016)

D. Karpova, J. A. Miettinen, **B. Tast**, E. Wiercinska, G. Spohn, H. Bönig. Auto-/parakrines CXCL12 unterstützt Stammzellmobilisierung durch G-CSF, Nürnberg (2016) (Poster)

B. Tast, N. Hayduk, J. Butenschön, E. Danner, D. Krause, H. Bönig. Effects of a gain-of-function mutation of CXCR4 on leukemia development and progression, Frankfurt (2017) (Poster)

10. Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Rolf Marschalek für die Annahme und Begutachtung meiner Arbeit als interner Betreuer an der Universität Frankfurt danken. Danke auch für den Input bei unseren regelmäßigen Treffen.

Mein größter Dank gilt natürlich Prof. Dr. Halvard Bönig. Danke, dass Du mich in deine Arbeitsgruppe aufgenommen hast und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast. Im Besonderen in schwierigen persönlichen Zeit des Umbruchs. Bei guten, wie auch schlechten Ergebnissen oder Ereignissen war deine Tür im wahrsten Sinne des Wortes immer offen und das ist sicherlich nicht selbstverständlich.

Natürlich möchte ich auch der ganzen AG Bönig für die gute Zusammenarbeit und den Spaß danken, den wir zusammen hatten. Hier muss ich im besonders Elisabeth und Katharina hervorheben, die am meisten unter dem "ausladenden Wesen" meines Schreibtisches zu leiden hatten. Aber natürlich auch Seo-Youn, die sich im Laufe der Zeit ein bisschen zu unserer Teilzeit-Mama entwickelte. Sabine konnte man selten mit "Hast du mal..."- oder "Kannst du mal..."-Anfragen schockieren, auch dafür ein herzliches Dankeschön. Und Eva möchte ich für die Hilfe bei Bestrahlungen und Präparationstätigen danken und natürlich langen Nächten auf den Forschungsseminaren. Ohne Steffi wären viele, viele Dinge schon an den organisatorischen Dingen gescheitert. Danke, dass du quasi immer die Übersicht behalten hast. Und vielen Dank Nina für deinen Input bei meinen ersten Schreibversuchen. Durch diesen Austausch konnte ich dann schnell meine finale Struktur finden.

Vielen Dank auch an die Mitglieder der AG Lausen. Nach anfänglichen "Revierkämpfen" haben wir uns doch sehr gut zusammengefunden und konnten uns gut ergänzen. Durch euch habe ich einen weiteren Blickwinkel erhalten und konnte so auch ein wenig über den Tellerrand hinausschauen. Auch wenn bis heute bei euch für mich meist nur "irgendwas rauf und irgendwas runter" geht.

Selbstverständlich gebührt auch Gabi ein ganz besonderes Dankeschön. Danke, dass du das "große Küken" zu Beginn unter deine Fittiche genommen hast. Danke, dass du dir die Zeit genommen hast mir alle grundlegenden Dinge beizubringen und an meinem ersten echten Experimenttag auch um 23 Uhr noch mit mir ausplattiert hast. Außerdem konnte ich bei dir die Kunst der "Milz-Meditation" erlernen.

Darja muss ich dafür danken, dass sie mich das Facsen lehrte. Eine Fähigkeit, die mich sicherlich noch eine ganze Weile begleiten wird.

Prof. Dr. Daniela Krause und ihrer Arbeitsgruppe möchte ich für die Unterstützung des Leukämieprojekts danken.

Auch der AG Schwäble, der AG Tonn und der AG Schäfer gilt mein Dank. Bei Fragen und Problemen aller Art konnten wir immer sehr gut zusammenarbeiten oder auch einfach nur im Gärtchen sitzen.

Den Damen und Herren aus der Zellseparation und dem stationären Entnahmeteam habe ich auch zu danken: für Knochenmarkfilter, unzählige Verbrauchsmaterialien und jede Menge Nerven, die ich sicherlich gekostet habe.

Letzteres gilt vermutlich auch für die Tierpfleger der ZFE und den Verantwortlichen bei mfd, denen ich natürlich im selben Umfang danken möchte.

Auf persönlicher Ebene muss ich Marina für deine "priceless friendship" danken und dafür, dass du definitiv die beste Patentante bist, die ich mir für Emily vorstellen kann. Dazu muss ich auch Gundi danken. In deine Hände würde ich Emmy jederzeit wieder geben.

Und selbstverständlich gebührt ein sehr, sehr großer Dank Verena und Emily, die mir gerade zum Schluss den Rücken so sehr freigehalten haben, dass ich mich wirklich vollends aufs Schreiben konzentrieren und die Arbeit beenden konnte.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den

Unterschrift

Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über

"Einfluss einer CXCR4 gain-of-function-Mutation auf die (un)reife Hämatopoese"

.....

.....

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den

(Unterschrift)