

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Schwerpunkt Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie, Rheumatologie
und Pulmologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Identifikation der Zielstruktur eines mit murinen
Megakaryozyten kreuzreagierenden anti-humanen
Citrullin Antikörpers**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Marie-Sophie Ilse
aus
Heidelberg

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Professor Dr. H. Salih

2.Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

III

In nature's infinite book of secrecy
A little I can read

William Shakespeare

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Megakaryozyten und Thrombozytopoese	1
1.1.1. Die pluripotente Stammzelle	1
1.1.2. Liniendetermination und Progenitorzellen	2
1.1.3. Polyploidie durch Endomitose	4
1.1.4. Zytoplasmatische Differenzierungsprozesse.....	4
1.1.5. Thrombozyten.....	6
1.1.6. Thrombozytopoese	6
1.1.7. Regulation der Thrombozytopoese durch Thrombopoetin.....	8
1.1.8. Assoziation des c-Mpl-Rezeptors mit der Januskinase JAK-2.....	10
1.1.9. Transkriptionsfaktoren in der Thrombozytopoese	10
1.2. Citrullinierte Peptide	12
1.3. Mögliche Antigene	14
1.3.1. Cullin 5	14
1.3.2. Ptpn 13.....	15
1.4. Fragestellung	16
2. Material.....	17
2.1. C57BL/6 Mäuse.....	17
2.2. Reagenzien und Chemikalien	17
2.3. Zytokine.....	18
2.4. Antikörper.....	18
2.5. Kits	19
2.6. Lösungen und Medien	19
2.7. Gebrauchswaren	20
2.8. Geräte.....	21
3. Methoden	22
3.1. Lineage Cell Depletion zur Isolierung muriner Stammzellen	22
3.2. Sca1 ⁺ -Selektion	23
3.3. Megakaryozyten- Differenzierungs-Assay aus murinen Stammzellen	24
3.4. Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten	24
3.5. Immunhistochemie an Zytozentrifugenpräparaten.....	25
3.6. Immunhistologie auf Paraffingewebe mit DAB-Entwicklung	25
3.7. Immunfluoreszenz	26
3.8. Durchflusszytometrie.....	27
3.9. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay.....	28
3.10. Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29

3.11. Western Blot	30
3.12. Immunpräzipitation	31
3.13. Coomassie/Simply Blue-Färbung.....	33
3.14. Silberfärbung nach Blum et al.(modifiziert)	33
4. Ergebnisse	34
4.1. Das Knochenmark der Maus	34
4.2. Kultivierung der Lineage-negativen Zellpopulation	36
4.3. Durchflusszytometrische Reinheitsbestimmung	38
4.4. Ein Anti-Citrullin-Antikörper bindet linienspezifisch an.....	40
Megakaryozyten in murinem Knochenmark	40
4.5. Immunzytologische Färbung mit dem RAC-Antikörper.....	42
4.6. Immunfluoreszenzfärbung.....	47
4.7. Speziesspezifität des RAC-Antikörpers	48
4.8. Testung anderer Anti-Citrullin-Antikörper	51
4.9. Identifikation des bindenden Antigens	52
4.10. Ergebnis der Massenspektrometrie.....	56
4.11. Ergebnisse der immunhistochemischen Testung von Antikörpern	60
gegen Cullin 5 und ptpn13 an murinen Knochenmarkschnitten	60
5. Diskussion	61
6. Zusammenfassung.....	66
7. Abbildungsverzeichnis.....	68
8. Literaturliste.....	69
9. Danksagung	75

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin <i>(bovine serum albumin)</i>
bzw.	beziehungsweise
CD	Differenzierungsmarker <i>(cluster of differentiation)</i>
CFU	Liniendeterminierte Vorläuferzellen <i>(colony forming unit)</i>
c-mpl	TPO-Rezeptor-Gen
CRL	Cullin-abhängiger-Ligase <i>(cullin related ligase)</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMS	Demarkations-Membransystem
DTS	dichtes tubuläres System
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere <i>(et altera)</i>
FACS	Durchflusszytometer <i>(fluorescence activated cell sorter)</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOG	Friend of GATA
g	Standard Gravitation (9.80616 m/s ²)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen –Kolonie- stimulierender Faktor <i>(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)</i>
GMP	Granulozyten/ Monozyten-Vorläuferzelle

VII

GP	Glykoprotein
h	Stunde/n
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KIND-Domäne	<i>kinase noncatalytic C lobe domain</i>
KM	Knochenmark
LIF	Leukämie inhibitorischer Faktor
LSK	<i>long-term repopulating stem cells</i>
MACS	<i>magnetic associated cell sorting</i>
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
MEP	megakaryo-/erythrozytäre Vorläuferzelle
NF-E2	<i>nuclear factor-erythroid derived 2</i>
nm	Nanometer
OCS	offenes kanalikuläres System
PAD	Peptidyl-Arginin-Deiminase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	PBS mit Tween 20
PTP	Phosphotyrosinphosphatase
PTPN13	<i>non-receptor protein tyrosin phosphatase</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAC-AK	Rabbit anti-Citrulline Antikörper
RING	really interesting new gene
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

VIII

sec	Sekunde/n
SCA1	Stammzellantigen-1 (<i>Stem cell antigen-1</i>)
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
SOCS-Box	<i>supressor of cytocin signaling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v-Mpl	Onkogen des murinen Myeloproliferative- Leukämie-Virus
vWF	von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

1.1. Megakaryozyten und Thrombozytopoese

1.1.1. Die pluripotente Stammzelle

Megakaryozyten entstehen im Rahmen der Hämatopoese aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs). Obwohl diese nur 0,05-0,1% der kernhaltigen Zellen des Knochenmarks stellen, sind sie für die Bildung aller zirkulierenden, reifen Blutzellen über das gesamte Leben eines Organismus hinweg zuständig (Ogawa et al., 1984).

HSCs sind bisher allein über ihre spezifischen Fähigkeiten definiert. Zum einen besitzen sie die Fähigkeit, sich unbestimmt häufig in identische Tochterzellen zu teilen und sich somit selbst zu erneuern (self-renewal). Dadurch sind sie in der Lage das Knochenmark dauerhaft z.B. im Rahmen einer Stammzelltransplantation zu repopulieren (Passier and Mummery, 2003). Desweiteren differenzieren sie sich in Vorläuferzellen der verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen, was ein hohes Proliferationsvermögen mit sich bringt.

Hämatopoetische Stammzellen sind morphologisch nur schwer von anderen mononukleären Zellen zu unterscheiden. Sie erweisen sich als Zellen von geringer Größe mit fehlenden Lineage Markern (lin⁻). Eines der wichtigsten Proteine zur Immunphänotypisierung von HSC ist das auf ihrer Oberfläche exprimierte CD34. Allerdings lässt sich dieses Antigen auch auf den schon liniendeterminierten Progenitorzellen finden, wo es im Laufe der fortschreitenden Differenzierung herunterreguliert wird (Terstappen et al., 1991). Es bestehen weitere Charakteristika hinsichtlich der Oberflächenmarker, durch die sich die Population der Stammzellen näher determinieren lässt, jedoch ist kein Antigen bekannt, das für eine exakte Unterscheidung von den übrigen hämatopoetischen Zellen genutzt werden kann (Mohle et al., 1999).

Die hämatopoetische Stammzelle ist in einem definierten Kompartement („Microenvironment“) in der Substantia spongiosa der Knochen angesiedelt, der sogenannten „Stammzellnische“, welche an der endostalen Grenzfläche im Knochenmark und lokalisiert ist (Calvi et al., 2003; Zipori, 2010). Megakaryozyten hingegen befinden sich gemäß ihrer Aufgabe, Thrombozyten zu synthetisieren und freizusetzen, in direkter Nähe zu den Endothelzellen der sinusoidalen Gefäße, in der „vaskulären Nische“ (Lambertsen and Weiss, 1984). Dort herrscht eine höhere Konzentration an Sauerstoff und Wachstumsfaktoren, was die Differenzierung der Zellen fördert. In welchem Stadium der Differenzierung die Zellen von der „Stammzellnische“ in die „vaskuläre Nische“ wandern und welche molekularen Mechanismen zu dieser Migration führen, ist momentan noch Gegenstand der Forschung.

1.1.2. Liniendetermination und Progenitorzellen

In der Entwicklung von der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle hin zum Megakaryozyten werden diverse Zellstadien durchlaufen. Aus den HSCs, die die Fähigkeit besitzen die Hämatopoese über einen unbegrenzten Zeitraum aufrechtzuerhalten (long-term HSC) gehen zunächst die sogenannten short-term HSCs hervor, die sich häufiger teilen, jedoch eine geringere Fähigkeit zur Selbsterneuerung aufweisen (Yang et al., 2005). Aus ihnen entwickeln sich sowohl die CLPs (common lymphoid progenitors), die die Vorläuferzellen der lymphatischen Zellreihe darstellen, als auch die CMPs (common myeloid progenitors), die der myeloischen Zellreihe zuzuordnen sind, aus denen sich im Verlauf sowohl Granulozyten und Makrophagen (GMP), als auch Erythrozyten und Megakaryozyten (MEP) entwickeln können (Weissman et al., 2001). Unter Einfluss von Zytokinen differenziert sich die myeloide Progenitorzelle weiter in eine megakaryozytäre Vorläuferform und bilden dabei eine abgrenzbare Kolonie, die CFU-Meg (colony forming unit, megakaryocyte) (Nakorn et al., 2003). In diesem Entwicklungsstadium erfolgt vermutlich die Migration der Zellen in die „vaskuläre Nische“. Auf der Oberfläche der Zellen erscheint der

typische Marker der megakaryozytären Entwicklungsreihe, das Glykoprotein GPIIb (CD41), wohingegen GbIIIa (CD61) erst im späteren Verlauf ausgebildet wird (Kanz et al., 1988). Unter der Stimulation des TPO-Rezeptors kommt es zu einer starken Proliferation und es entstehen Megakaryoblasten. Diese Zellen sind ca. 15–50 µm groß, besitzen einen großen runden Kern und wenig Zytoplasma, das wiederum zahlreiche Ribosomen enthält und sich basophil anfärben lässt. Im weiteren Verlauf nehmen sie stark an Volumen zu und lassen eine zunehmend megakaryozytäre Morphologie erkennen. Durch Endomitosen entsteht ein mehrfach gelappter Zellkern und es kommt zu typischen Differenzierungsprozessen des Zytoplasmas, die schlussendlich den reifen Megakaryozyten charakterisieren (Möhle, 2010).

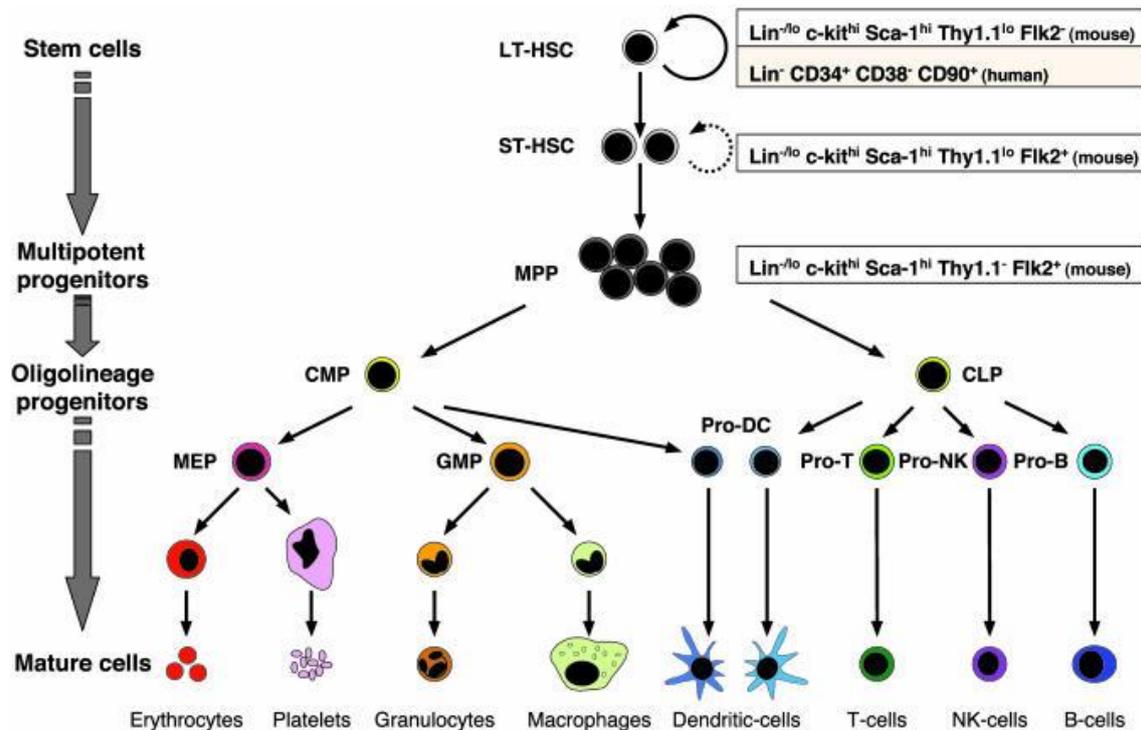


Abbildung 1.1. Stammbaum der Hämatopoese.

Hämatopoetische Stammzellen besitzen zunächst die Fähigkeit sich selbst unbegrenzt zu erneuern und die Hämatopoese eines Lebewesens ein Leben lang aufrecht zu erhalten (long-term (LT)-HSC). Short-term (ST)-HSC haben diese Eigenschaft verloren und weisen nur noch ein begrenztes Potential zur Selbsterneuerung auf.

Nach (Passegue et al., 2003).

1.1.3. Polyploidie durch Endomitose

Eine der wichtigsten Eigenschaften der Megakaryozyten ist die Fähigkeit zur Endomitose, die Vervielfältigung des haploiden Chromosomensatzes ohne Zellteilung (Polyploidie). Megakaryozyten durchlaufen dafür einen modifizierten Zellzyklus, der wie in der normalen Mitose von der Prophase über die Metaphase in die Anaphase A übergeht, dann jedoch gestoppt wird. Es kommt weder zu einer Nukleus- (Karyokinese) noch zu einer Zellteilung (Zytokinese), wodurch ein multilobulär gelappter Kern entsteht, der einen doppelten Chromosomensatz enthält. Megakaryozyten können diesen Zyklus der Endomitose diverse Male durchlaufen, bis hin zu einem $128n$ -Stadium, wobei die häufigste Polyploidiestufe jedoch $16n$ ist (Odell, Jr. et al., 1970).

Die so erlangte Polyploidie bringt ein enormes Größenwachstum mit sich und bildet durch die erhöhte Transkriptionsrate die Grundlage für die metabolische Leistungsfähigkeit der Megakaryozyten (Brodsky and Uryvaeva, 1977). Die dadurch mögliche Synthese großer Mengen an thrombozyten- bzw. megakaryozytenspezifischer Proteine ist die Voraussetzung für die später folgende Thrombozytopoese (Raslova et al., 2003).

1.1.4. Zytoplasmatische Differenzierungsprozesse

Neben der endomitotischen Vervielfältigung der DNA kommt es im reifenden Megakaryozyten zu weiteren Differenzierungsprozessen im Bereich des Zytoplasmas. Zahlreiche Proteine, die für die spätere hämostatische Funktion der Thrombozyten essentiell sind, werden synthetisiert und entweder an die Zelloberfläche transportiert, oder in Granula verpackt. Hierbei lassen sich vor allem zwei Arten von sekretorischer Granula unterscheiden, die aus dem Golgi-Apparat hervorgehen. Die α -Granula beinhalten Gerinnungsfaktoren, Proteine für die Plättchenadhäsion sowie angiogenetische Faktoren, wie beispielsweise vWF oder VEGF, die im Rahmen einer Thrombozytenaktivierung

ausgeschüttet werden können (Heijnen et al., 1998). Die elektronendichten Granula (dense-bodies) sind kleiner und in geringerer Anzahl vorhanden. Sie enthalten Stoffe wie Serotonin und ADP, denen später wichtige Funktionen im Thrombozyten-Stoffwechsel zukommen (Heijnen et al., 1998).

Als wichtiges Differenzierungsmerkmal bilden sich im reifenden Megakaryozyten verschiedene Membransysteme, die unterschiedliche Aufgaben in der Zelle erfüllen. Das größte ist das sogenannte Demarkationsmembransystem (DMS), das durch Invagination der äußeren Zellmembran entsteht (Behnke, 1968). Aufgrund seiner Anordnung in Form von abgetrennten Feldern, die mit Granula gefüllt sind, ging man zunächst davon aus, dass es sich dabei um vorgeformte zukünftige Thrombozyten handle, die im Rahmen einer Fragmentierung der Zelle freigesetzt werden können. Heute gilt das DMS als Membranreservoir, das den immensen Zuwachs an Oberfläche ermöglicht, der für die Ausstülpung und Abschnürung von Zellmembran im Rahmen der Thrombozytensynthese benötigt wird (Radley and Haller, 1982), weshalb es auch zunehmend als „Invaginations-Membransystem“ bezeichnet wird (Italiano, Jr. and Shivdasani, 2003).

Mit fortschreitender megakaryozytärer Differenzierung entstehen zwei weitere Membransysteme, die später zytoplasmatische Bestandteile der synthetisierten Plättchen bilden. Das offene kanalikuläre System (open canaliculus system, OCS) ist über Kanäle mit der Zelloberfläche verbunden und für die Freisetzung von sekretorischen Granula bzw. ihrer Inhaltsstoffe zuständig. Im Rahmen der Hämostase können später somit die Thrombozyten Gerinnungsfaktoren schnell und effektiv sezernieren.

Desweiteren entsteht ein dichtes tubuläres System (dense tubular system, DTS), welches einen Abkömmling des endoplasmatischen Retikulums darstellt und im Inneren des Zellzytoplasmas liegt (Daimon and Gotoh, 1982). Es dient als Hauptspeicherort für Kalziumionen (Gerrard et al., 1976).

1.1.5. Thrombozyten

Megakaryozyten sind Vorläuferzellen von Thrombozyten, welche dem Körper zur Reparatur kleinster Gefäßschädigungen dienen und bei größeren Verletzungen die Thrombusbildung initiieren.

Die durchschnittliche Thrombozytenzahl liegt beim Menschen zwischen 150-450.000/ μ l. Geht man von einer Lebensdauer von ungefähr 10 Tagen, einem Blutvolumen von fünf Litern und der Annahme, dass sich etwa ein Drittel aller Thrombozyten in der Milz sammeln, aus, so muss ein durchschnittlicher Erwachsener täglich 1×10^{11} Blutplättchen produzieren, um die normale Thrombozytenzahl aufrechtzuerhalten. Bei erhöhtem Bedarf kann diese Produktion um das zehnfache gesteigert werden (Brewer, 2006).

1.1.6. Thrombozytopoese

1841 erstmals von Addison als „extrem kleine (...) Granula“ beschrieben, wurden sie von Bizzozero als „Blutplättchen“ (platelets) bezeichnet, welcher in seinen Beobachtungen von einer „erhöhten Klebrigkeit im Falle einer Gefäßwandschädigung“ spricht. Auch Osler und Hayem identifizierten Ende des 19. Jahrhunderts bei mikroskopischen Untersuchungen von Blutausstrichen Elemente mit diesen Eigenschaften.

Obwohl seit fast zweihundert Jahren als seltene Zellen des Knochenmarks bekannt, erhielten Megakaryozyten jedoch erst 1890 nach eingehenden Studien mithilfe der Camera lucida von William Henry Howell ihren Namen.

1906 postulierte James Wright, dass Blutplättchen aus dem Zytoplasma von Megakaryozyten entstehen, womit die Grundlagen der Thrombopoese gelegt waren (Kaushansky, 2008).

Von der ursprünglichen Meinung, dass Thrombozyten von pseudopodienartigen Fortsätzen der reifen Megakaryozyten abgeschnürt und so in die Zirkulation freigesetzt werden, wich man mit Entdeckung des Demarkations-

Membransystems ab, da es nun viel wahrscheinlicher schien, dass die Thrombozyten innerhalb dieses Systems präformiert und durch abrupte Fragmentierung der Zelle freigesetzt werden.

Die Entdeckung und Klonierung von Thrombopoetin Mitte der neunziger Jahre brachte jedoch die Möglichkeit mit sich, die Differenzierungsprozesse von Megakaryozyten und ihre Freisetzung von plättchenähnlichen Partikeln in vitro genauer zu studieren (Cramer et al., 1997). Dabei bestätigte sich die zuvor bereits in vivo beschriebene Beobachtung, dass reife Megakaryozyten lange verzweigte Fortsätze, die sogenannten Prothrombozyten ausbilden, von denen die Thrombozyten abgeschnürt werden (Tavassoli and Aoki, 1989), woraufhin man zu der ursprünglichen Theorie der Plättchenfreisetzung zurückkehrte (Becker and Debruyn, 1976).

Bei der Umwandlung eines einzelnen Megakaryozyten in viele Tausende Thrombozyten, kommt es zu einem massiven Bedarf an Zellmembranfläche. Die Produktion eines Membranvorrats in Form des Demarkations-Membransystems ist somit Voraussetzung für den raschen Ablauf dieses Abschnürungsprozesses (Trowbridge et al., 1984).

Dabei bilden sich an einer Seite des Megakaryozyten zunächst eines oder mehrere breite Pseudopodien, welche sich innerhalb kurzer Zeit verkleinern und stark verzweigen. An den multiplen Enden dieser Prothrombozyten bilden sich Verdickungen aus, die in ihrer Größe den späteren Thrombozyten entsprechen (Italiano et al., 1999).

Mithilfe von Mikrotubuli werden die benötigten Organellen und Granula in die Spitzen der Prothrombozyten befördert (Rojnuckarin and Kaushansky, 2001), bis das gesamte Zytoplasma des ehemaligen Megakaryozyten aufgebraucht ist und der multilobuläre Kern als komprimierte Masse ausgestoßen und phagozytiert wird (Radley and Haller, 1983).

In anderen Studien wird der Untergang des Megakaryozyten als eine Form der Apoptose beschrieben (Zauli et al., 1997). In der Tat konnte gezeigt werden, dass Caspasen bei der Plättchenfreisetzung aus Prothrombozyten von Bedeutung sind, wobei allerdings unklar bleibt, welche Teile des programmierten Zelltods aktiviert werden und wie dabei das Überleben der

freigesetzten Thrombozyten gewährleistet wird (de Botton et al., 2002). Diese werden aus den Prothrombozyten direkt in den Knochenmarksinus hinein abgegeben und gelangen somit in die Blutbahn.

Und doch gehört die „Fragmentierungstheorie“ noch nicht ganz der Vergangenheit an, denn entgegen früherer Auffassung sind Megakaryozyten durchaus zur Migration fähig (Tavassoli and Aoki, 1981), wobei zehnmal mehr intakte Megakaryozyten in der pulmoarteriellen Strombahn gefunden wurden, als in Blutproben aus der Aorta (Levine et al., 1993). Dies deutet auf eine möglicherweise mechanische Fragmentierung in Thrombozyten hin, wahrscheinlich an den Verzweigungen des ersten Kapillarnetzes in der Lunge. Welchen Anteil diese pulmonale Plättchenfreisetzung an der gesamten Thrombozytopoese hat und ob dieser bei erhöhtem Thrombozytenumsatz ansteigt, ist jedoch nicht bekannt.

1.1.7. Regulation der Thrombozytopoese durch Thrombopoetin

In den späten fünfziger Jahren konnte gezeigt werden, dass das Serum thrombozytopenischer Ratten bei Transfusion in gesunde Tiere eine Thrombozytose auslösten, was auf einen humoralen Regulator der Blutplättchenbildung schließen ließ.

1958 prägte Kelemen dafür erstmals den Begriff Thrombopoetin, angelehnt an das Hormon Erythropoetin, welches für die Bildung roter Blutzellen zuständig ist (Kelemen et al., 1958). Sämtliche Versuche Thrombopoetin mithilfe von in vivo assays zu identifizieren, blieben jedoch erfolglos. In den achtziger Jahren konnten verschiedene Megakaryozyten-Kolonie-stimulierende Faktoren detektiert werden, darunter Interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) oder leukemia inhibitory factor (LIF) (Gordon and Hoffman, 1992). Doch ob diese dem zuvor postulierten Thrombopoetin entsprachen, blieb zunächst ungeklärt.

Die Wende kam Mitte der neunziger Jahren, als im Rahmen der Suche nach dem murinen myeloproliferativen Leukämie-Virus (Wendling et al., 1986)

dessen Onkogen (v-Mpl) samt zellulären Pro-Onkogen (c-Mpl) (Souyri et al., 1990) entdeckt wurde. Letzteres erwies sich als Mitglied der hämatopoetischen Zytokin-Rezeptor-Familie, was zwei Jahre später zur Klonierung seines Liganden, dem Thrombopoetin (TPO), führte (de Sauvage et al., 1994).

Es handelt sich dabei um ein ca. 78 kDa großes Glykoprotein, welches aus 332 bis 335 Aminosäuren besteht. Seine N-terminale Domäne besitzt große Ähnlichkeit mit der des Erythropoetins. Das Gen für Thrombopoetin findet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 3, welches bei erblichen Formen der Thrombozytose und in einigen Fällen von Leukämien Mutationen aufweisen kann. Thrombopoetin wird vor allem in der Leber, aber auch in der Niere und in den Stromazellen des Knochenmarks gebildet (Jelkmann, 2001).

Verschiedene Experimente mit dem rekombinanten Protein etablierten Thrombopoetin als primären physikalischen Regulator der Thrombopoese, dessen Spiegel antiproportional mit der Plättchen- und Megakaryozytenmasse korreliert und bei Zugabe eine massive Thrombozytenzunahme induziert (Kaushansky, 2008).

Thrombopoetin ist jedoch nicht nur ein megakaryozytärer Wachstumsfaktor, auch reife Thrombozyten exprimieren c-Mpl und reagieren auf TPO mit verstärkter thrombininduzierter Aggregation und erhöhter Affinität zu Fibrinogen, Fibronectin und vWF (Kojima et al., 2001); außerdem wirkt es im Gegensatz zu Erythropoetin ebenfalls als Wachstumsfaktor für pluripotente Progenitoren und Stammzellen (Young et al., 1996).

Ein Knockout von c-Mpl oder Thrombopoetin führt erwartungsgemäß zu einer starken Reduktion der Thrombozytenzahl in vivo, allerdings nicht auf vital bedrohliche Werte, woraus sich schließen lässt, dass Thrombopoetin zwar eine sehr wichtige Regulationsfunktion innehat, jedoch nicht essentiell für die Thrombopoese ist (Murone et al., 1998).

Der Thrombopoetinspiegel wiederum wird durch die Anzahl der reifen Zellen reguliert. Nach Bindung des Hormons an seinen hochaffinen Rezeptor auf den zirkulierenden Thrombozyten kommt es zu einer Elimination des TPO/c-Mpl-Komplexes durch Makrophagen, wodurch bei steigender Plättchenzahl der Thrombopoetinspiegel im Blut sinkt. Im thrombozytopenischen Zustand

hingegen verbleibt mehr Thrombopoetin im Kreislauf und kann in seiner Funktion als hämatopoetischer Wachstumsfaktor wirken, was wiederum zur Autoregulation des Hormonspiegels führt (Scheding et al., 2002).

1.1.8. Assoziation des c-Mpl-Rezeptors mit der Januskinase JAK-2

Bei der Signaltransduktion durch Zytokinrezeptoren zur Regulierung der Zelldifferenzierung und -proliferation spielen die Tyrosinkinase aus der Familie der Januskinasen eine wichtige Rolle (Ihle et al., 1995). Gegenwärtig besteht diese Familie aus den vier Mitgliedern Jak1, Jak2, Jak3 und tyk2, benannt nach dem zweigesichtigen römischen Gott Janus, dem Wächter der Tore (Ihle, 1995).

Bei der Thrombopoetin-vermittelten Signaltransduktion über den c-Mpl-Rezeptor in Megakaryozyten ist vor allem die Jak2-Kinase von Bedeutung.

Durch Bindung eines Liganden an einen Zytokinrezeptor, wie beispielsweise c-Mpl, kommt es zu einer Phosphorylierung der Januskinase, welche so aktiviert wiederum Signalmoleküle, so genannte STATs (signal transducer and activator of transcription) phosphorylieren. Diese verlassen daraufhin den Rezeptorkomplex und wandern in den Nukleus, um dort die Transkription spezifischer Gene zu stimulieren (Darnell, Jr., 1997).

1.1.9. Transkriptionsfaktoren in der Thrombozytopoese

Neben Zytokinen und humoralen Faktoren wie TPO, wird die Megakaryopoese und damit die Thrombozytensynthese von einer Reihe wichtiger Transkriptionsfaktoren reguliert. Diese können durch direkte Interaktion mit der DNA sowohl einen bestimmten Differenzierungs-Prozess aktivieren, als auch die Entwicklung in andere Zelllinien verhindern. Hierbei kann es zu einer molekularen Interaktion sowie einer Antagonisierung einzelner Transkriptionsfaktoren kommen.

Bereits auf Stammzebene wird die Hämatopoese durch den Transkriptionsfaktor GATA-2 kontrolliert (Tsai and Orkin, 1997). Dieses Zinkfingerprotein induziert eine verstärkte Proliferation und damit Selbsterneuerung früher hämatopoetischer Zellen, bewirkt damit jedoch auch einer verminderten Differenzierung. Eine homozygote Deletion von GATA-2 bewirkt in Knock-out Mäusen eine schwere Anämie und ist bereits in utero letal (Tsai et al., 1994).

GATA-2 aktiviert im Folgenden die Expression von GATA-1, einem weiteren Zinkfingerprotein, das ab einem bestimmten Expressionslevel wiederum GATA-2 unterdrücken kann. Dies ist essentiell für den Differenzierungsschritt zur megakaryozytären-erythrozytären Vorläuferzelle (MEP), während der antagonistisch wirkende Transkriptionsfaktor PU.1 eine Entwicklung in die granulozytäre Zellreihe bewirkt (Nerlov and Graf, 1998).

Die weitere Differenzierung der megakaryozytären Progenitorzelle wird von GATA-1 im Zusammenspiel mit FOG-1 („friend of GATA-1“) reguliert (Crispino, 2005). Ein Knock-out von GATA-1 resultiert zwar in einer ausreichenden Blutbildung, jedoch zeigt sich eine verminderte Megakaryozyten-Proliferation und eine beeinträchtigte zytoplasmatische Reifung, was schlussendlich eine deutlich herabgesetzte Thrombozytenzahl bewirkt (Shivdasani et al., 1997).

Für die Freisetzung der Thrombozyten aus den reifen Megakaryozyten ist der nukleäre Faktor NF-E2 von großer Bedeutung. Im Gegensatz zum GATA-1-Knockout führt ein Fehlen dieses Transkriptionsfaktors zu einer starken, oft letalen, Thrombozytopenie aufgrund mangelnder Plättchenfreisetzung, wohingegen die Megakaryopoese normal abzulaufen scheint (Shivdasani et al., 1995). Die Thrombozyten selbst werden als anukleäre Zellen nicht mehr durch Transkriptionsfaktoren, sondern über die Aktivität verschiedener Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche und deren Interaktion mit entsprechenden Zytokinen reguliert.

1.2. Citrullinierte Peptide

Citrullin ist eine nicht-proteinogene α -Aminosäure, welche als Intermediärprodukt im Harnstoffzyklus entsteht, wobei L-Ornithin, katalysiert durch die Ornithin-Carbamoylphosphat-Transferase, mit Carbamoylphosphat unter Abspaltung eines Phosphatrestes reagiert.

Außerdem stellt der Vorgang der Citrullinierung eine wichtige posttranslationelle Modifikation vieler Proteine dar (Rogers, 1962). Die enzymatische Deiminierung von Argininresten zu Citrullin wird durch das Enzym Peptidyl-Arginin-Deiminase 4 (PAD4) katalysiert. Zu der Familie der PADs zählen momentan fünf bekannte Isotypen, die in ihrer Sequenz stark homolog aufgebaut sind, jedoch in unterschiedlichen spezifischen Geweben exprimiert werden (Kubilus et al., 1980).

PAD4 kommt vor allem in weißen Blutkörperchen, den Granulozyten und Monozyten, vor und hat als einziger Isotyp seinen Sitz im Zellkern (Nakashima et al., 2002).

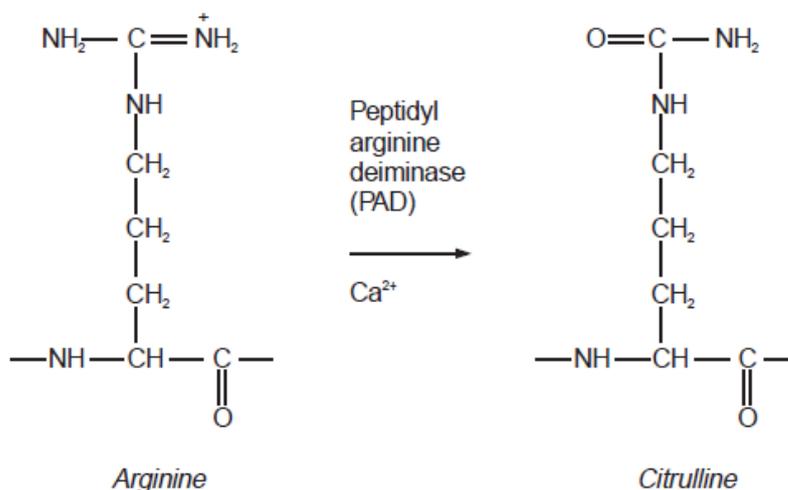


Abbildung 1. 2. Citrullinierung durch die Peptidyl-Arginin-Deiminase 4

Bei der Citrullinierung kommt es zum Verlust der ursprünglichen Tertiärstruktur des jeweiligen Proteins, wodurch neue intermolekulare Interaktionen möglich werden.

Dies ist vor allem für die epigenetische Markierung von Bedeutung, bei der durch kovalente Histonmodifikation die Transkription oder andere DNA-abhängige Prozesse positiv oder negativ beeinflusst werden (Hagiwara et al., 2002).

Bei diesen Modifizierungen handelt es sich vor allen um Phosphorylierungen, Acetylierungen, Ubiquitinierungen und Methylierungen. Letztere finden an Lysin- und Argininresten statt, wobei Arginin-Methylierungen durch Umwandlung des Methyl-Arginins in Citrullin wieder neutralisiert werden können und so DNA-Abschnitte aktiviert oder stillgelegt werden.

Zudem kann es durch solche Umwandlungen zu einer Auflockerung der Nukleosomen kommen, was zu einer vermehrten DNA-Degeneration und schließlich zur Apoptose der Zelle führen kann (Vossenaar et al., 2003b).

Neben Histonen werden auch andere Proteine posttranslational durch Citrullinierung modifiziert. Durch die Umwandlung der Proteinstruktur, werden deren biochemische und antigene Eigenschaften verändert. Als Folge können Neoepitope entstehen, welche im Krankheitsfall, beispielsweise bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, vom Immunsystem als fremd erkannt werden (Vossenaar et al., 2003a). Dementsprechend können bei den betroffenen Patienten anti-Citrullin Antikörper detektiert und zur Komplettierung der Diagnostik rheumatologischer Erkrankungen genutzt werden (Coenen et al., 2007). Außerdem kann eine gesteigerte Citrullinierung, z.B. bei Psoriasispatienten in der betroffenen Haut, durch im Versuchstier generierte anti-Citrullin Antikörper nachgewiesen und für die histopathologische Diagnostik genutzt werden.

Die physiologische Bedeutung citrullinierter Peptide ist noch weitgehend unverstanden.

1.3. Mögliche Antigene

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei Proteine identifiziert, PTPN13 und Cullin 5, welche die gesuchten Antigene zu dem verwendeten Citrullin-Antikörper darstellen könnten.

1.3.1. Cullin 5

Proteine aus der Familie der Culline sind an der Bildung Cullin-abhängiger-Ligasen (CRLs) beteiligt. Diese sind für die Ubiquitinierung und Degradation von Proteinen essentiell und kontrollieren somit verschiedene Regulationsprozesse der eukaryotischen Zelle (Lee and Zhou, 2010).

Sie bestehen aus einer zentralen Cullin-Untereinheit, die am C-terminalen Ende eine RING-Finger-Domäne aufweist und am N-terminalen Ende mit einem Substrat-Rezeptor assoziiert ist, welcher das Zielprotein für die Ubiquitinierung bindet (Petroski and Deshaies, 2005). Die RING-Finger-Domäne vermittelt die Interaktion zwischen der Cullin-abhängigen Ligase und dem Ubiquitin-konjugierenden-Enzym E2, wobei aufgrund der dadurch entstandenen räumlichen Nähe das Ubiquitin von E2 auf das Zielprotein übertragen wird (Deshaies and Joazeiro, 2009).

Als eine Familie der Substrat-Rezeptoren der Ubiquitin-Ligasen wurden die SOCS-Box-Proteine (supressor of cytocin signaling) identifiziert, die über Elongin B mit der zentralen Cullin-Untereinheit verbunden sind, wobei es sich meist um Cullin 5 handelt (Kamura et al., 2004).

SOCS-Box-Proteine inhibieren durch unterschiedliche Mechanismen Zytokin-vermittelte Signalwege und können somit z.B. die Zellproliferation regulieren (Greenhalgh and Hilton, 2001).

1.3.2. Ptpn 13

PTPN13, auch als PTPL1 oder PTP-BAS bezeichnet, ist beim Menschen auf dem Genlocus 4q21.3 lokalisiert und gehört zu der Familie der Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPs) (Abaan and Toretsky, 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass PTPN13 mit dem FAS-Rezeptor (TNF-Rezeptor) interagiert, weshalb es zudem als FAP1 bekannt ist (Sato et al., 1995). Das homologe Protein in der Maus liegt auf dem Genlocus 5E/F und wird als PTP-BL bezeichnet.

PTPs sind Signalproteine, die eine Vielzahl an Zellprozessen, wie Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose, regulieren (Walma et al., 2004). Desweiteren ist bekannt, dass auch bei neuronaler Aktivierung, bei der Gerinnung und der Insulinausschüttung die Dephosphorylierung von Tyrosinresten eine bedeutende Rolle spielt.

PTPN13 gehört zu den intrazellulären non-receptor PTPs (PTPNs) und ist mit 270kD die größte in der Familie der Phosphatasen. Diese weisen in ihrer Struktur verschiedene Bindungsdomänen auf, die für ihre physiologische Funktion der Signalübertragung von Bedeutung sind: eine NH₂-terminalen FERM-Domäne, über welche eine Verbindung zwischen Zellmembran und Zytoskelett hergestellt werden kann, eine KIND-Domäne (kinase noncatalytic C lobe domain) und fünf PDZ-Domänen, durch die verschiedene Protein-Protein-Interaktionen möglich sind (Wansink et al., 2004).

PTPN13 wurde in den meisten hämatopoetischen Zelllinien nachgewiesen, die genaue physiologische Funktion in Megakaryozyten ist bisher jedoch nicht bekannt.

1.4. Fragestellung

Bei der immunhistologischen Untersuchung von Mäuseknochenmark wurde in der Arbeitsgruppe der Autorin der Zufallsbefund erhoben, dass ein gegen humane citrullinierte Peptide generierter Antikörper spezifisch murine Megakaryozyten markiert. Der Antikörper richtet sich gegen ein Decapeptid des Mäuse-Cytokeratins-1 und bindet an citrullinierte Peptide in der menschlichen Epidermis, womit er in die Gruppe der anti Citrullin-Antikörper einzuordnen ist.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit bestanden zum einen in der Charakterisierung der Bindungsspezifität des Antikörpers in Hinsicht auf seine Zelllinienspezifität sowie Spezies-Spezifität, zum anderen in der Identifikation des bindenden Antigens in murinen Megakaryozyten, wobei der Zeitpunkt der Expression im Verlauf der megakaryozytären Reifung untersucht und das Zielprotein schlussendlich isoliert und identifiziert werden sollte.

2. Material

2.1. C57BL/6 Mäuse

Alle Tiere wurden in offener Käfighaltung, sowie unter kontrollierten Klimabedingungen bei konstantem Tag-/ Nachtrhythmus gehalten. Die Futter- und Wasserzufuhr war nicht limitiert.

Züchtung und Lieferung erfolgte durch Charles River, Sulzfeld, Deutschland.

2.2. Reagenzien und Chemikalien

Aceton	Fluka
Acetonitril 30%	Merck
AgNO ₃	Roth
Ammoniumpersulfatlösung	Sigma
Avidin-Biotin-Block	Dako
BSA	SERVA
Bromphenolblau	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
EDTA	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Formaldehyd	Sigma
Full Range Rainbow Marker	Amersham Bioscience
Glycerol	Sigma
Glycin	Sigma
H ₂ O ₂	Sigma
Hämatoxylin	Merck
Isopropanol	Merck
Methanol	VWR

MeOH	Sigma
Na ₂ S ₂ O ₃	Merck
Na ₂ CO ₃	Merck
PBS	PAA
Rotihistol	Roth
Rotiphorese	Sigma
Simply Blue Safe Stain	Invitrogen
Streptavidin/Biotin-HRP	Sigma
Tris	Sigma
Triton	Sigma
Tween 20	Sigma

2.3. Zytokine

Stammzellfaktor (SCF)	Peprotech
Thrombopoetin (TPO)	Peprotech

2.4. Antikörper

Dako Swine anti-Rabbit Biotin	Dako
Goat anti-Mouse Cy3	Jackson ImmunoResearch
Goat anti-Rabbit-Alexa 488	Invitrogen
Goat anti-Rabbit-FITC	Biozol
Rabbit anti-Human Citrullin (RAC)	Millipore
Sca1-PE	ebioscience
Swine anti-Rabbit-HRP	Dako

2.5. Kits

Blotting Detection System	ECL Amersham Plus
Catch and Release® v2.0 Kit	Upstate, Cat.#17-500
Lineage Cell Depletion Kits	Miltenyi Biotec

2.6. Lösungen und Medien

MACS-Puffer	500ml PBS, 2ml 0,5M EDTA pH 8, 2,5gr BSA (0,5%) in
X-Vivo20 ohne Serum	Cambrex
DAB-Stock-Lösung	Dako
Lyse-Puffer	Tween 20
Ladepuffer	60mM Tris/HCl pH 6,8, 1% (w/v) SDS, 1% (v/v) β-Mercapto- EtOH, 10% (v/v) Glycerol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Trenngel	3,125 mL Aqua bidest., 2,5 ml Rotiphorese (30%ige Acrylamidlösung mit 0,8% Bisacrylamid (Roth: 3029.2)), 1,875ml Trenngelpuffer (1,5M Tris/HCl pH 8,8), 37,5µL 20%ige (w/v) SDS-Lösung, 75µL 10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS) und 4,5µL TEMED

Sammelgel	1,5 mL Aqua bidest., 0,375 ml Rotiphorese (30%ige Acrylamidlösung mit 0,8% Bisacrylamid (Roth: 3029.2)), 0,625ml Sammelgelpuffer (0,5M Tris/HCl pH 6,8), 37,5µL 20%ige (w/v) SDS-Lösung, 25µL 10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS) und 2,5µL TEMED
Laufpuffer	14,3gr. Glycin, 2,8gr. TRIS, 2,0gr. SDS
Transferpuffer	14,64gr. 195mM Glycin, 100mg 0,01% (w/v) SDS, 1,15gr. 12,5mM Tris, 100ml 10% (v/v) MeOH
PBST	500 ml PBS pH 7,4, 250µL 0,05% Tween20
Retrieval Solution pH 6,0	Dako
Roti-Block	Roth
FACS-Fix	PBS 1%PFA

2.7. Gebrauchswaren

12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen
12 Well-Platte	Greiner bio-one
96 Well-Platte	Greiner bio-one
Acrylamid-Gel	NuPAGE Novex 12% Bis-Tris-Gel
Blotpapiere	Schleicher & Schüll
Deckgläser	R.Langenbrinck
Eppendorf-Gefäße	Greiner bio-one
Gelkammer	X-cell sure lock, Invitrogen

MACS Säule	Miltenyi Biotech
Nitrozellulosemembran	Amersham Bioscience
NeoMount	Merck
Objektträger	R.Langenbrinck
Paramount-Parafilm	American National Care
Pipetten, 2mL, 5mL, 10mL, 25mL, 50mL	Falcon ®
Pipetten 10µL, 100µL, 200µL, 1000µL	eppendorf Research
Pipettenspitzen 10µL, 100µL, 200µL, 1000µL	Sarstedt
Pre-seperation Filter	Miltenyi Biotech
Seperation Columns, LS, capacity 1x10 ⁸ positive cells	Miltenyi Biotech
Röhrchen 15mL, 50mL	Falcon ®

2.8. Geräte

Blot-Gerät (Semi-Dry-Blotsystem)	Owl
Cytozentrifuge	Shandon, Cytospin3
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II
Eisschrank	Sanyo, MDF-U73V
Gelelektrophorese-Gerät	Consort E835
Mikroskop	Axiovert 25
Schüttler	Certomat TC3, Braun Biotech
Software FCS Express3	DeNovo Software, Los Angeles, USA
Spektralfotometer	Tecan Sunrise
Vortex Mixer	neoLab®
Wärmeschrank	Sanyo CO ₂ Incubator
Zentrifuge	Centra GP8R, Thermo Quest

3. Methoden

3.1. Lineage Cell Depletion zur Isolierung muriner Stammzellen

Mithilfe des Lineage Cell Depletion Kit der Firma Miltenyi Biotec (Cat: 130-090-858) wurden die Stammzellen durch ein Aussortieren aller reifen Zellen, die sogenannte Lineage-Antigene (CD5, CD45R (B220), CD11b, Anti-Gr-1 (Ly6G/C), 7-4, und Ter-119) exprimieren, isoliert. Diese reifen hämatopoetischen Zellen, wie T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten, wurden mit einem Cocktail aus biotinylierten Antikörpern gegen die Lineage-Antigene und anti-Biotin MicroBeads magnetisch markiert und anschließend auf eine MACS Säule aufgetragen, in welcher sie durch das magnetische Feld zurückgehalten wurden, während die Lineage-negativen Zellen ungehindert passierten.

Aus einer Wildtypmaus wurden Femur, Tibia und Fibula steril entnommen und in MACS-Puffer gelegt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Knochenmarkzellen wurden vorsichtig aus den Knochen gespült; und um eventuell noch enthaltene Knochenfragmente zu entfernen, wurde die Zellsuspension mittels eines Zellsiebs von 40 µm Porengröße filtriert. Nach Ermittlung der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer, wurden die Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 40 µL MACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µL Biotin-Antibody-Cocktail pro 10^7 Zellen, wurde die Suspension 10 min bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden 30 µL MACS-Puffer pro 10^7 Zellen und 20 µL Anti-Biotin MicroBeads pro 10^7 Zellen zugegeben und für weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Es folgte eine Zugabe von 1-2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen, Waschen bei 300g für 10 min, um überschüssige MicroBeads zu entfernen. In der Zwischenzeit wurde die Säule zur MACS-Separation wie folgt vorbereitet:

Die LS MACS Separation Column wurde in einen Midi MACS Magneten eingespannt, der Pre-Separation Filter auf die Säule gesetzt und mit 3 ml MACS-Puffer equilibriert. Der Überstand der mittlerweile gewaschenen Zellen wurde abgesaugt und verworfen.

Das so gewonnene Zellpellet wurde in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert und über den Filter auf die Säule pipettiert. Nach Spülen der Säule mit 3x3ml MACS-Puffer, befand sich im Durchlauf nun die angereicherte Lineage negative Zellpopulation.

3.2 Sca1⁺-Selektion

Um eine Zellpopulation zu erhalten, die nur Sca1⁺ Zellen enthält, wurde eine Lineage negative Zellpopulation mit dem Sca1-PE-Antikörper der Firma ebioscience (Cat.: 12-5981) markiert und über die MACS-Säule separiert.

Hierzu wurden der zuvor gewonnenen Lineage negativen Zellsuspension 0,25 µg des Antikörpers pro 1 Million Zellen in einem Färbervolumen von 100 µl zugegeben und diese 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 10 ml MACS-Puffer aufgefüllt und die Zellen bei 300 g für 10 min abzentrifugiert.

Das Pellet wurde in 80µl MACS-Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 10µl α-PE-Micro-Beads pro 10⁸ Zellen und anschließend eine Inkubation bei 4°C für 15 Minuten.

Nach einem weiteren Waschschrift mit 10 ml MACS-Puffer bei 300 g für 10 min, wurde das Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf die zuvor mit 3 ml MACS-Puffer equilibrierte MACS-Säule aufgetragen. Nach dreimaligem Spülen der Säule mit 3 ml MACS-Puffer, wurde der Durchlauf verworfen und die abgefangenen Zellen mit dem Stempel aus der Säule gedrückt. Die gewonnene Zellpopulation enthielt nun nur noch Sca1⁺ Stammzellen.

3.3. Megakaryozyten- Differenzierungs-Assay aus murinen Stammzellen

Die mithilfe der Lineage Cell Depletion isolierten Stammzellen wurden abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml X-Vivo20 aufgenommen und wiederum die Zellzahl ermittelt. In einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml X-Vivo20 wurden die Stammzellen in eine 12Well-Platte ausgesät, je 1ml Zellsuspension bzw. 1×10^5 Zellen/Well.

Anschließend erfolgte die Zugabe folgender Zytokine: je 25 ng Endkonzentration/Well Thrombopoetin (TPO) und 30 ng Endkonzentration/Well Stammzellfaktor (SCF) an Tag 0 und je 25 ng Endkonzentration/Well TPO an Tag 2 und 4.

An Tag 5 wurden die Zellen geerntet und die Pellets zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4. Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten

Nach dem Ernten der Zellen an Tag 1-5 der Differenzierung, erfolgten die Zellzahlbestimmung und die Anfertigung der Zytozentrifugenpräparaten mit i.e. 30.000 Zellen in 100 μl Medium. Als Objektträger wurden die SuperFrost[®] Plus Objektträger der Firma R. Langenbrinck verwendet. Diese wurden mit Filterkarten bestückt und die Halterungen entsprechend den Herstellervorschriften eingespannt. Anschließend wurden sie in die Spinhalterung der Zytozentrifuge (Shandon, Cytospin3) eingesetzt und die Zellsuspension in die Spotvorlage pipettiert. Es folgte eine 3-minütige Zentrifugation mit 500 rpm bei Beschleunigung „low“. Nach Entfernung der Halterungen und Filterkarten wurden die Zytozentrifugenpräparate einige Minuten luftgetrocknet und anschließend bei -80°C gelagert.

3.5. Immunhistochemie an Zytozentrifugenpräparaten

Die Zytozentrifugenpräparate mit den *in vitro* differenzierten murinen Megakaryozyten wurden nach Lagerung bei -80°C 3 min mit Aceton fixiert und 5 min mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde zunächst 10min mit Avidin und nach kurzem Waschen in PBS 10 min mit Biotin blockiert. Die Cytospins wurden wiederum 5 min mit PBS gewaschen, woraufhin ein Protein-Block mit 5% BSA/PBS für 60 min erfolgte. Dann wurden die Objektträger mit Rabbit anti-Citrullin (Fa. Millipore) als Primärantikörper (1:75 in 1%BSA/PBS) behandelt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Abkippen des Primärantikörpers wurden die Zytozentrifugenpräparate 5 min in PBS gewaschen, anschließend ein biotinylierter Schweine anti-Kaninchen Sekundärantikörper (Dako, Klon E0431) zugegeben (1:200 in 1%BSA/PBS) und 45 min bei RT inkubiert. Die Zytozentrifugenpräparate wurden 5 min in PBS gewaschen, und nach einer Präinkubationszeit von 30 min mit Streptavidin/Biotin-HRP (horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase) (je 1:100 in 1%BSA/PBS) 30 min inkubiert. Daraufhin wurde erneut 5 min in PBS gewaschen und mit DAB-Stammlösung (1:50 in PBS) 10 min im Dunkeln inkubiert. Es folgten eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für ca. 40 sec und Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe. Schließlich wurden die Präparate eingedeckt.

3.6 Immunhistologie auf Paraffingewebe mit DAB-Entwicklung

Paraffinschnitte von murinem Knochenmark wurden in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert (30 min Rotihistol, 5 min Rotihistol/100% EtOH 1:2, EtOH 100%, 90%, 70%, 50% jeweils 5 min, H_2O 5 min). Daraufhin erfolgte das Blockieren endogener Peroxidasen mit PBS/1% H_2O_2 für 10min bei RT.

Anschließend wurde zweimal 5 min in PBS gewaschen. Um verdeckte Antigene zu demaskieren, wurden die Schnitte für 10 min in der Retrieval Solution pH 6,0

(1:10 mit A.dest) bei 95°C im Backschrank inkubiert. Nach dem Umranden der Schnitte mit Fettstift, wurde 1h bei RT mit 10% Schweineserum in PBS/0,1%BSA/0,1%Triton blockiert. Anschließend wurde der Primär-AK (Rabbit anti-Citrullin-AK (RAC-AK)) in PBS/0,1%BSA aufgetragen und bei 4°C über Nacht in feuchter Kammer inkubiert. Nach Abwaschen des Primär-AK (2 x 10 min in PBS), erfolgte die Avidin-Biotin-Blockierung (DAKO) jeweils mit 2 Tropfen für 10 min bei RT.

Pro Schnitt wurden 100-200µl biotinylierter Sekundär-AK zugegeben (DAKO: 1:400) und 30 min bei RT inkubiert. Für die Entwicklung wurden die Schnitte zweimal 5 min in PBS gewaschen und anschließend wurde je Schnitt 100-200 µl Streptavidin/HRP 1:100 in PBS/1%BSA aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde erneut 5 min in PBS gewaschen und mit DAB-Stammlösung (400 µl Substratpuffer + 8 µl DAB) im Dunkeln inkubiert. Es folgten eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 30-60 sec und eine Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (5 min. in H₂O, je 5 min in EtOH 50%, 70%, 90%, 100%, 30 min in Rotihistol).

Schließlich wurden die Präparate mit NeoMount eingedeckt.

3.7. Immunfluoreszenz

Die Darstellung einer Antigen-Antikörper-Reaktion durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Immunglobuline wird als Immunfluoreszenz bezeichnet. Sie stellt eine 1941 durch Coons et al. abgewandelte Variante der Immunhistochemie (IHC) dar. Fluoreszenz bezeichnet in der physikalischen Definition die Eigenschaft eines Stoffes, während der Dauer der Belichtung selbst zu leuchten, wodurch so markierte Strukturen dargestellt werden können.

Die Zytozentrifugenpräparate mit den in vitro differenzierten murinen Megakaryozyten wurden nach Lagerung bei -80°C aufgetaut und kurz unter dem Abzug getrocknet, anschließend wurden die Zellen mit Fettstift umrandet. Die Objektträger wurden 5 min in PBS gewaschen und daraufhin mit je 100 µl 1%BSA/PBS 60 min bei RT blockiert.

Nach Abkippen der Blockierlösung wurden je 100 µl der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung mit 1%BSA/PBS (Rabbit anti-Citrullin-Antikörper, 1:75 bzw. Mouse anti-Human CD61-AK, 1:100) aufpipettiert, wobei der Negativkontrolle nur 100 µl 1%BSA/PBS zugefügt wurden. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C.

Nach Abkippen der Primärantikörper wurden die Zytozentrifugenpräparate zweimal 10 min in PBS gewaschen und anschließend der Sekundärantikörper in entsprechender 1%BSA/PBS-Verdünnung (Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488, 1:500 bzw. Goat anti-Mouse Cy3, 1:200) zugegeben.

Nach 45minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT, wurden die Objektträger zweimal 10 min in PBS und einmal 5 min in Aqua dest. gewaschen und unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurde DAPI in PBS BSA 1% 1:2000 auf die Zytozentrifugenpräparate aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS für 5 min, erfolgte das Eindecken mit Kaisergelatine und daraufhin die Lagerung bei 4°C

3.8. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient sowohl der quantitativen als auch qualitativen Bestimmung von Zellen, DNA oder fokussierten Partikeln, welche zuvor mit geeigneten Fluorochromen markiert werden. Das Anwendungsspektrum reicht von Zelltypisierung über Zellzyklusanalysen bis hin zur Untersuchung intrazellulärer Stoffwechselfvorgänge. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Partikel werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom durch eine Kapillare an einer Laserlichtquelle vorbeigeführt. Die Detektion erfolgt zum einen anhand des Streulichts, welches Rückschlüsse über die Größe und Granularität der gemessenen Partikel zulässt. Zum anderen emittiert jedes Teilchen aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffs ein Lichtsignal mit einem charakteristischen Maximum (beispielsweise für Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) bei 530 nm). Dieses Lichtsignal wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und in einem Photomultiplier verstärkt. Passiert ein Partikel

die Messspore, so steigt das Fluoreszenzlicht bis auf ein Maximum an und fällt anschließend auf das Gleichgewichtsniveau zurück. Die Durchflussrate (Partikel/Zeit) wird über die eingehenden Signale berechnet und digital angezeigt. Die so gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert und abgespeichert.

Die isolierten murinen Knochenmarkszellen wurden abzentrifugiert und das Pellet in 1000 µL MACS-Puffer aufgenommen. Es wurden je 100 µL der Zellsuspension, die circa 250.000 Zellen enthielten, in zwei Eppendorfgefäße gegeben, wovon eines die Leerprobe darstellte.

Dem Probenröhrchen wurden 2 µl Antikörper (CD61-FITC) hinzugefügt, beide kurz vermischt und anschließend 20 Minuten bei 4°C inkubiert.

Um nichtgebundenen Antikörper zu entfernen wurde bei 6000 rpm für 2 min gewaschen. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und pro Eppendorfgefäß 300 µl FACS-Fix dazugegeben. Nach sofortigem gründlichen Vortexen Vermischen, wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt.

3.9. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Um das in den in vitro differenzierten murinen Megakaryozyten enthaltene Protein bestimmen zu können, wurden die Zellen zunächst lysiert und anschließend die Methode nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976a).

Die unprotonierte anionische Sulfonat-Form von Coomassie-Brilliant-Blau G-250 bindet an kationische, nicht polare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen, woraufhin sich das Absorptionsmaximum der Lösung von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Durch die Korrelation zwischen der Intensität des Farbstoffs und der Konzentration des Proteins, ermöglicht die photometrische Messung eine genaue Bestimmung der Konzentration der extrahierten Proteine. Hierzu wurden je 50 µl Lyse-Puffer zum Pellet zugegeben, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um Zelltrümmer und intakte Zellen zu entfernen.

1 µl des Überstands wurde mit 49 µl Aqua dest. und 200 µl ROTI-Nanoquant-Lösung auf eine 96Well-Platte pipettiert. Im Spektralphotometer (Tecan Sunrise) wurde die jeweilige Absorption bei 450 nm und 590 nm gemessen und aus den Werten rechnerisch die Proteinkonzentration bestimmt.

3.10. Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophoresetechnik dient der Auftrennung eines Proteingemischs in einer Trägermatrix entsprechend der Größe der enthaltenen Proteine. Dabei wandern die unterschiedlich großen Proteine unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel, welches dabei wie ein Molekularsieb wirkt. Proteine einer bestimmten molekularen Masse bilden eine Bande, die anschließend durch Vergleich mit einem Molekülmassenstandard identifiziert werden kann.

Proben mit einem Proteingehalt von 25 µg bzw. 50 µg wurden mit Ladepuffer versetzt, welcher auch einen negativ geladenen Farbstoff (Bromphenolblau) enthält, bei 95°C 3 min denaturiert und auf ein kleines SDS-Acrylamid-Gel aufgetragen. Die Zugabe von SDS hat den Vorteil, dass dadurch die Proteine denaturiert werden, wodurch sie ihre Eigenladung verlieren und somit nur noch nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Anfangs wurde das Gel eigenhändig gegossen, in späteren Versuchen dann aber durch ein vorgefertigtes Gel (12% Bis-Tris-Gel / Invitrogen) ersetzt. Ein Marker (Full Range Rainbow Marker) aus einem vorgefärbten Proteingemisch diente zur Identifikation der molekularen Massen der detektierten Proteine. Das Polyacrylamid-Gel wurde in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Bei zunächst 75 Volt für 15 min und anschließend 150 Volt für 60 min wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wird beendet, wenn der Farbstoff komplett die Matrix durchlaufen hat.

3.11. Western Blot

Anschließend an die Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der isolierten Proteine auf eine PVDF-Membran nach dem Semi-Dry-Blotsystem. Dazu wurde ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt und für 9x8 cm Membranen für 75 min bei einer Stromstärke von 65 mA geblottet, wodurch die Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern. Diese wurde zuvor mit MeOH aktiviert, wodurch es zu hydrophoben Wechselwirkungen mit den aufgetrennten Proteinen kommt, welche an der Oberfläche der Membran im Muster der elektrophoretischen Auftrennung haften bleiben.

Nach dem Blotten wurde in mehreren Waschschritten das SDS aus der Membran gewaschen, worauf die übertragenen Proteine ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen können, und anschließend mit Roti-Block 1:10 für 60 min blockiert, um die unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran abzudecken. Die übertragenen Proteinbanden können nun durch eine Immundetektion mithilfe spezifischer Antikörper visualisiert werden.

Hierbei bindet ein Primärantikörper antigenspezifisch an das passende Epitop, woraufhin ein Sekundärantikörper an dessen Fc-Teil andockt und anschließend detektiert wird. Als Primärantikörper wurde der im Kaninchen generierte RAC-Antikörper (Verdünnung 1:1000) verwendet und damit die Membran über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert.

Gründliches Waschen mit PBST entfernt unspezifisch gebundene Antikörper, woraufhin der Sekundärantikörper Schwein-Anti-Kaninchen-HRP in einer Verdünnung von 1:5000 in Roti-Block zugegeben und 60 min bei RT inkubiert wurde. Nach weiteren Waschschritten erfolgten die Substratexposition (ECL Amersham Plus Blotting Detection System), wobei das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym HRP das zugegebene Substrat umsetzt und das daraufhin emittierte Lichtsignal nach 5minütiger Inkubation im Dunkeln mittels einer Röntgenfilmexposition mit unterschiedlichen Zeitspannen detektiert werden kann.

3.12. Immunpräzipitation

(Catch and Release® v2.0 Kit-, Firma Millipore, Cat.#17-500)

Die Immunpräzipitation ist eine molekularbiologische Methode um mithilfe eines spezifisch bindenden Antikörpers ein Antigen aus einem Eluat heraus zu isolieren. Dabei binden Harz-Beads (Resin) mittels eines Antibody-Capture-Affinity-Liganden an den Fc-Teil der Primärantikörper und werden durch Zentrifugation von dem restlichen Proteingemisch getrennt.

Der im Kit enthaltene Waschpuffer wurde 10 fach verdünnt. Anschließend wurden die Säulen beschriftet, in die Tubes gestellt und bei 2000 g für eine Minute zentrifugiert. Die Harz-Beads wurden zweimal mit 400 µl Waschpuffer gespült, anschließend jeweils zentrifugiert und das Eluat verworfen. Nachdem die Volumina der benötigten Reagenzien bestimmt worden waren, wurden diese in folgender Reihenfolge in die geschlossenen Säulen gegeben: Waschpuffer, Cell Lysate, RAC-Antikörper und Antibody Capture Affinity Ligand. Die Säulen wurden eine Stunde bei RT inkubiert. In dieser Zeit binden die Primärantikörper an die zu detektierenden Antigene und an jene wiederum die Beads.

Anschließend wurden die Säulen im Capture Tube bei 2000 g eine Minute zentrifugiert, Der flow-through wurde aufgehoben, um möglicherweise ungebundenes Antigen zu sichern.

Nach dreimaligem Waschen der Säulen mit je 400 µl Waschpuffer, wurden diese in neue Capture Tubes transferriert.

Es folgte eine nicht-denaturierende und anschließend eine denaturierende Proteinelution, um eine möglichst große Menge des präzipitierten Antigens von den Beads zu lösen. Die gewonnenen Eluate enthielten das präzipitierte Protein, welches mittels Gelelektrophorese und anschließender Färbung (Simply Blue- oder Silberfärbung) nachgewiesen wurde.

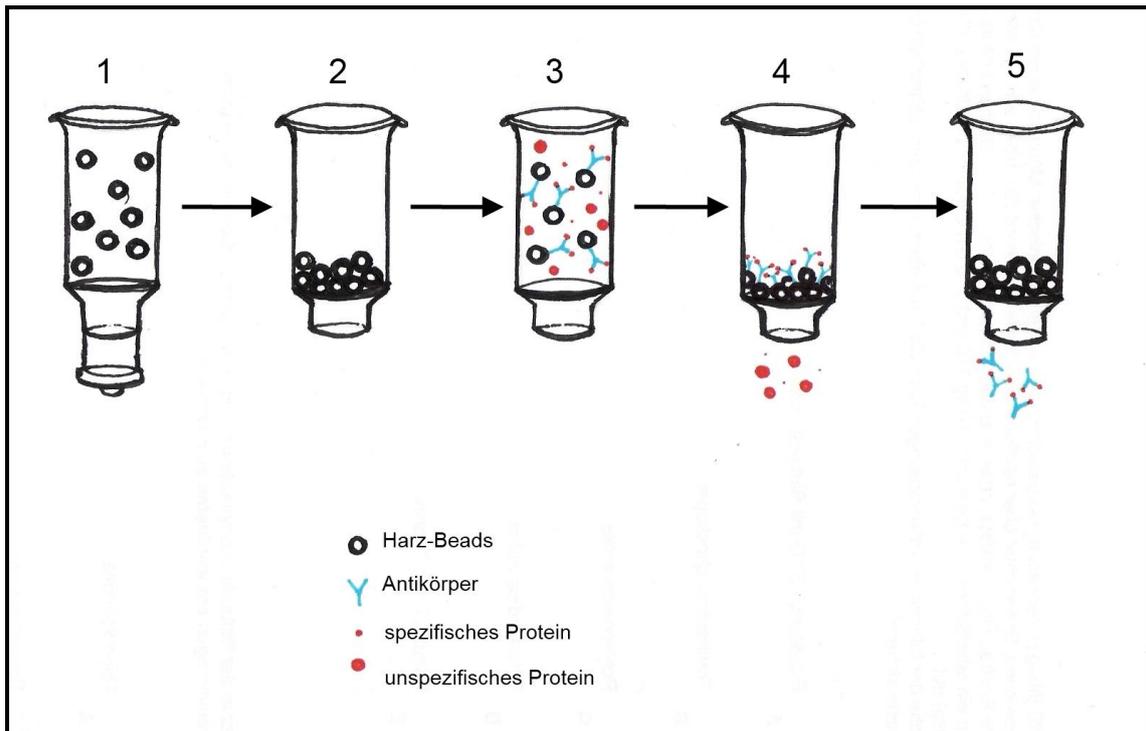


Abbildung 3.1. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation mit dem Catch and Release Kit (Upstate) erfolgt in mehreren Schritten:

- 1) die Harz-Beads als Ausgangsmaterial in der Säule
- 2) Waschen und Zentrifugation der Harz-Beads
- 3) Zugabe von Waschlösung, Cell Lysate, RAC-Antikörper und Antibody Capture Affinity Ligand
- 4) nach Inkubation Auswaschen des unpezifischen Proteins
- 5) Proteinelution (nicht-denaturierend und denaturierend)

3.13. Coomassie/Simply Blue-Färbung

Nach der Gelelektrophorese und dreimaligem Waschen in Aqua bidest. für je 5 min wurde das Gel gemäß Protokoll eine Stunde mit Simply Blue Safe Stain (Invitrogen) gefärbt. Dieser Triphenylmethanfarbstoff lagert sich an die kationischen Seitenketten der Aminosäuren an und kann somit Proteine unspezifisch anfärben.

3.14. Silberfärbung nach Blum et al.(modifiziert)

(Proteomics 2001,1,1359-1363, Mortz, Krogh et alt.)

Wurde die Membran zuvor mit Simply Blue angefärbt, so muss sie, bevor mit der Silberfärbung gemäß dem Protokoll begonnen werden kann, mit Acetonitril 30% für 30 min Coomassie entfärbt werden. Anschließend wird mit 40% Ethanol und 10% Essigsäure für eine Stunde fixiert. Nach einem zweimal 20minütigem Waschen mit 30% Ethanol und einem 20minütigem Waschen in Aqua bidest. wurde die Membran mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10 mg / 50 ml Aqua bidest) für eine Minute inkubiert und daraufhin dreimal 20 sec in Aqua bidest. gewaschen. Es folgte eine Färbung mit AgNO_3 (50 mg / 50 ml kaltes Aqua bidest.) für 20 min bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua bidest. für je 30 sec, wurde die Gelkammer gewechselt und anschließend nochmals eine Minute mit Aqua bidest. gewaschen. Entwickelt wurde mit 3 g Na_2CO_3 und 50 μl 37%igem Formaldehyd auf 100 ml Aqua bidest. Sobald Spots erschienen, wurde die Membran nochmals 20 sec mit Aqua bidest. gewaschen und die Reaktion mit 5%iger Essigsäure gestoppt (10-15 min). Nach dreimaligem zehminütigem Waschen in Aqua bidest. kann die Membran in 1%iger Essigsäure aufbewahrt werden.

4. Ergebnisse

4.1. Das Knochenmark der Maus

Das Knochenmark ist das wichtigste blutbildende Organ des adulten Säugetierorganismus. Da Untersuchungen zur Erforschung des humanen hämatopoetischen Systems am lebenden Menschen nur eingeschränkt möglich sind, dient murines Knochenmark oft als Tiermodell, um Erkenntnisse über Morphologie und Verhalten einzelner hämatopoetischer Zellen zu gewinnen.

Grundgewebe des Knochenmarks ist ein retikuläres Bindegewebe, welches sich aus Fibroblasten zusammensetzt. Seine Zwischenräume sind angefüllt mit myeloiden und lymphoiden Stammzellen, mehreren Zwischenstufen und den ausgereiften Zellen des hämatopoetischen Systems, wie beispielsweise Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten oder Megakaryozyten. Um letztere zu gewinnen, wurden aus einer Wildtypmaus Femur, Tibia und Fibula steril entnommen und die Knochenmarkszellen vorsichtig aus den Knochen gespült.

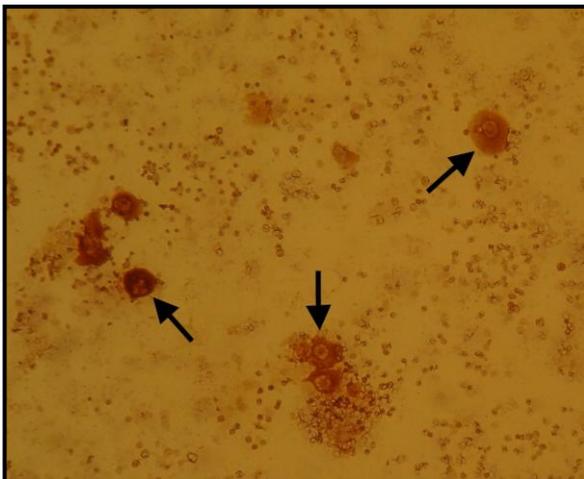
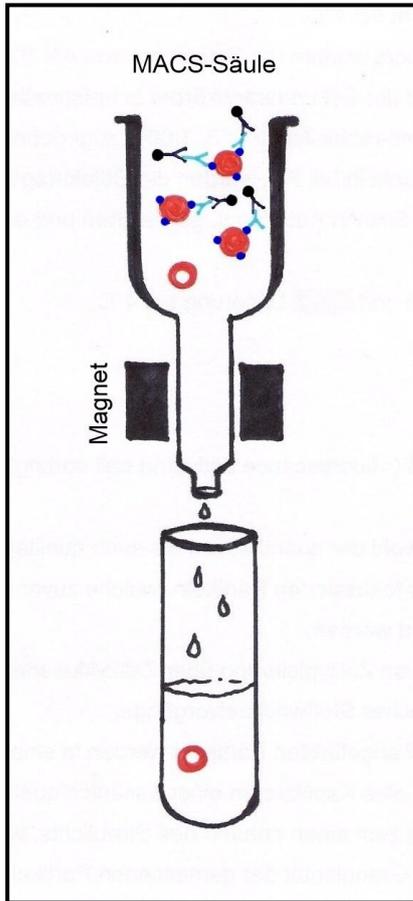


Abbildung 4.1. Zytocentrifugenpräparat, murines KM, 100x vergrößert

Megakaryozyten zeichnen sich als sehr große Zellen mit gelappten Zellkernen aus (s. Pfeile)



Anschließend wurden Zellen, die sogenannte Lineage-Antigene (CD5, CD45R (B220), CD11b, Anti-Gr-1 (Ly6G/C), 7-4, und Ter-119) exprimieren, mithilfe einer Lineage Cell Depletion über eine MACS-Säule entfernt. Im Durchlauf der LS MACS Separation Column befand sich schlussendlich die angereicherte Lineage negative Zellpopulation, in der Stammzellen, Megakaryozyten und deren Vorstufen enthalten sind.

Abbildung 4.2. MACS-Separation

Die Auftrennung erfolgte magnetisch nach Markierung mit biotinylierten Antikörpern gegen die Lineage-Antigene und Anti-Biotin MicroBeads.

Megakaryozyten sind die größten Zellen des Knochenmarks. Mit einer Größe von 50-150 μm weisen sie oftmals einen unregelmäßig gelappten Kern auf, welcher 8, 16 oder mehr Chromosomensätze enthalten kann (Rabellino, 1984). Beim Menschen beträgt die Gesamtzahl der Megakaryozyten etwa sechs Millionen pro Kilogramm Körpergewicht, im hämatopoetisch aktiven Knochenmark machen sie jedoch nur ungefähr 1% der dort ansässigen Zellen aus (Levine et al., 1980).

Aus diesem Grund wurde die durch die Lineage Cell Depletion gewonnene Zellmenge mittels Kultivierung vermehrt. Hierzu wurden die isolierten Zellen in X-Vivo20 aufgenommen und auf einer 12Well-Platte ausgesät. Unter der Zugabe der Zytokine Thrombopoetin (TPO) und Stammzellfaktor (SCF) wurden die Zellen kultiviert und an Tag 5 geerntet.

4.2. Kultivierung der Lineage-negativen Zellpopulation

Um eine große Menge an Megakaryozyten zu erhalten, wurde die mithilfe der Lineage Cell Depletion isolierte Zellpopulation im Nährmedium X-Vivo20 für fünf Tage in Kultur genommen.

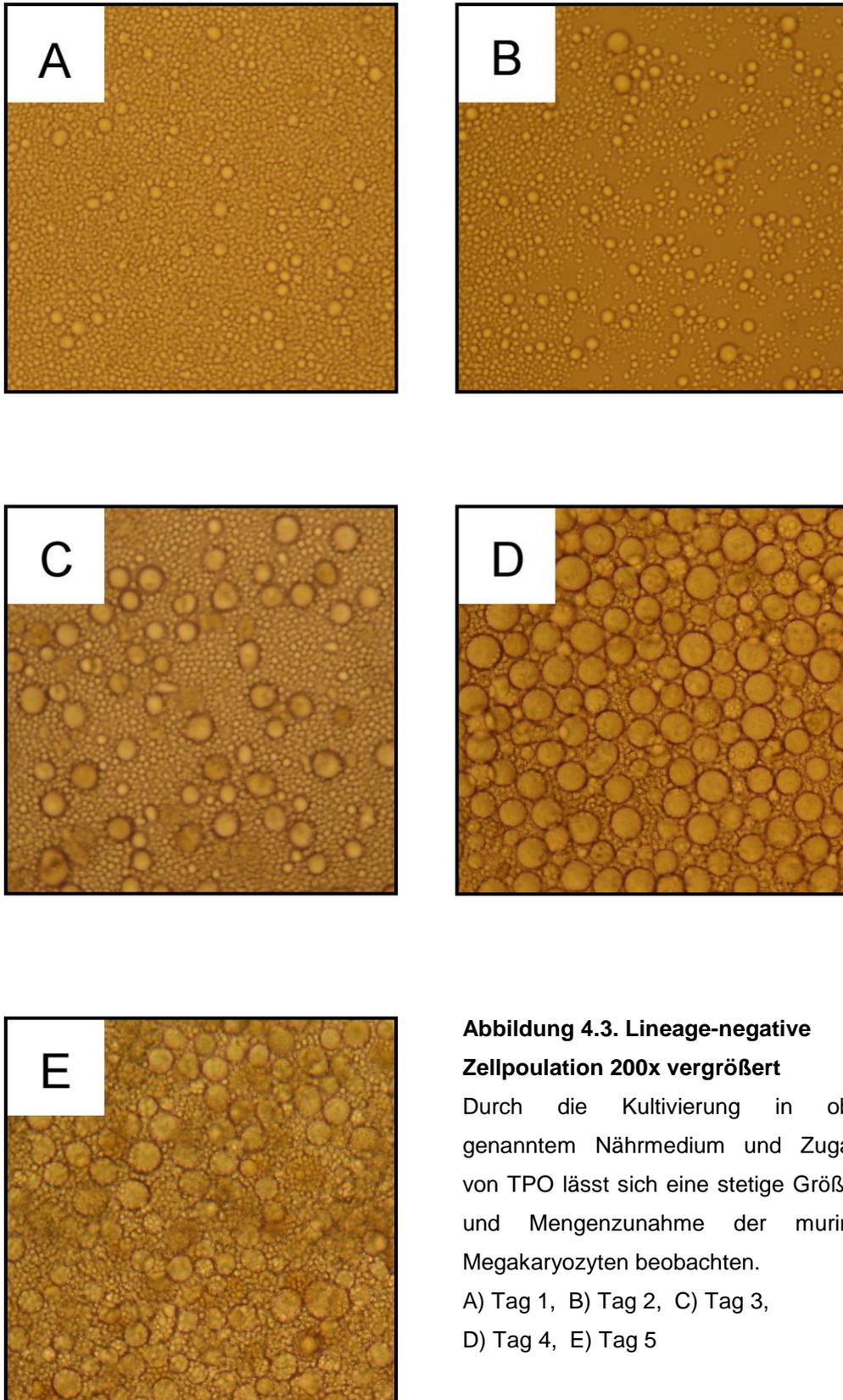
Morphologisch als Megakaryozyten bzw. als Megakaryozyten-Vorläufer identifizierbare Zellen waren dabei bereits wie oben erläutert initial nachweisbar. Es erfolgte eine Zugabe von je 25 ng Endkonzentration/Well Thrombopoetin (TPO) und 30 ng Endkonzentration/Well Stammzellofaktor (SCF) an Tag 0 und je 25 ng Endkonzentration/Well TPO an Tag 2 und 4.

SCF ist ein essentieller Wachstumsfaktor, der für die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen von Bedeutung ist (Smith et al., 2001).

Das Zytokin Thrombopoetin wurde Mitte der neunziger Jahre als megakaryozytärer Wachstumsfaktor entdeckt und durch verschiedene Experimente mit dem rekombinanten Protein als primärer physikalischer Regulator der Thrombopoese etabliert. So entwickeln sich aus Populationen muriner Vorläuferzellen bei Zugabe von hochkonzentriertem humanen TPO Megakaryozyten (Zeigler et al., 1994), wobei das TPO sowohl die Differenzierung als auch das Wachstum der heranreifenden Megakaryozyten stimuliert (Banu et al., 1995).

Aus den proliferierenden CFU-Meg entstehen somit diploide (2n) Megakaryoblasten, es kommt zu einer starken Volumenzunahme und der Kern bzw. das Zytoplasma weisen zunehmend megakaryozytäre Morphologie auf.

Anhand der täglichen fotografischen Dokumentation der Zellkultur, konnte der Progress des Megakaryozyten-Wachstums verfolgt werden.



4.3. Durchflusszytometrische Reinheitsbestimmung

Um eine Aussage über die Reinheit der mithilfe der Lineage Cell Depletion isolierten und wie oben dargelegt in vitro differenzierten Megakaryozyten treffen zu können, wurde eine Probe mit dem Durchflusszytometer (BD FACSCanto II) gemessen. Mittels dieser Methode lassen sich Zellen, welche zuvor mit entsprechenden Fluorochromen markiert wurden, sowohl quantitativ als auch qualitativ bestimmen. Hierzu werden die Partikel an einer Laserlichtquelle vorbeigeführt und über das Streulicht kann daraufhin Größe und Granularität der gemessenen Zellen detektiert werden.

Es wurden je 100 µl einer Zellsuspension, welche die isolierten murinen Knochenmarkzellen enthielt, in zwei Eppendorfgefäße gegeben, so dass pro Röhrchen etwa 250.000 Zellen enthalten waren.

Eines der Gefäße stellte die Leerprobe dar, dem anderen wurden 2 µl Antikörper (CD61-FITC) zugegeben, welcher die CD61⁺-Zellen und somit die Megakaryozyten markieren sollte.

Nach einer Inkubation von 20 min bei 4°C, mehreren Waschschritten und einer Fixierung mit FACS- Fixierungspuffer, wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und konnten daraufhin am FACS-Gerät gemessen werden.

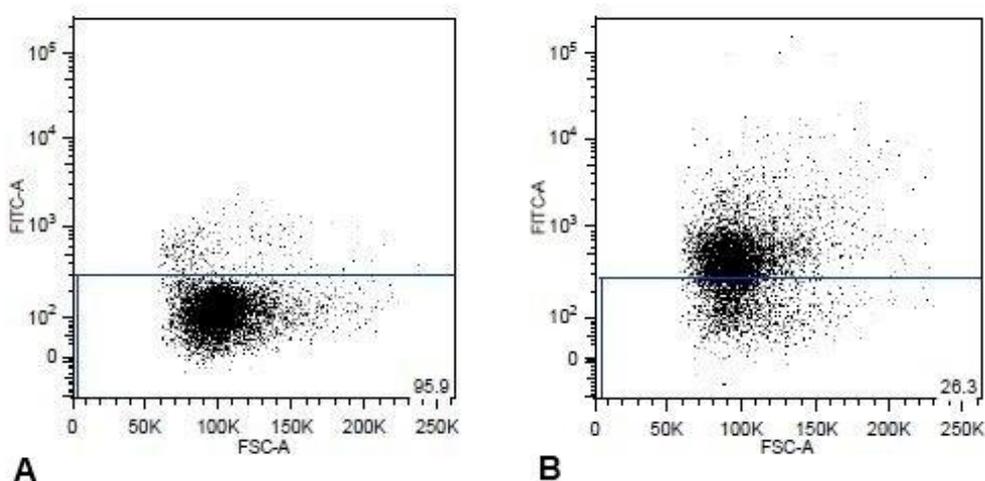


Abbildung 4.4. FACS-Messung der isolierten murinen Knochenmarkzellen, Tag 4

A) Population ungefärbt, B) CD61-FITC

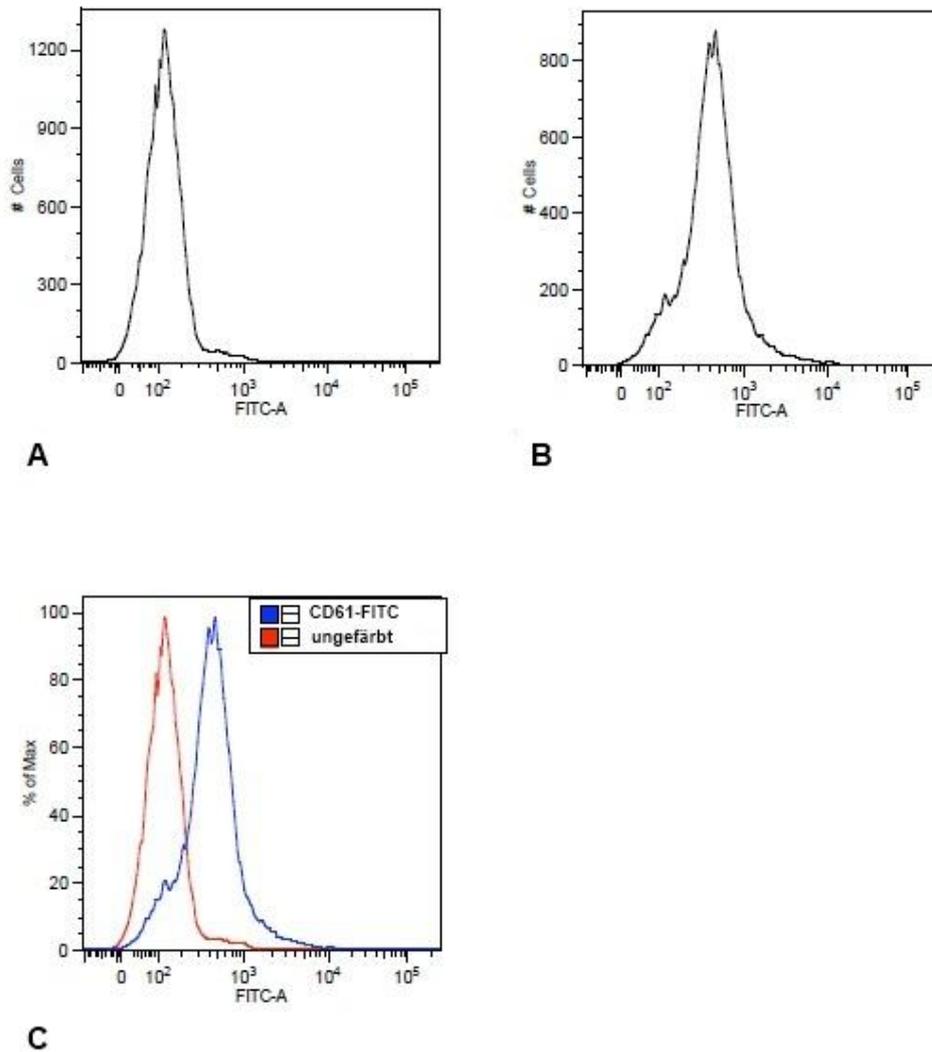


Abbildung 4.5. Histogramm der FACS-Messung, Tag 4

A) Population ungefärbt, B) CD61-FITC, C) Überlappende Darstellung von A und B

Die Ergebnisse der Messung wurden mithilfe der Software FCS Express3 (DeNovo Software, Los Angeles, USA) ausgewertet und in Diagrammen visualisiert. Hier zeigt sich in Dot Blot und Histogramm eine Zunahme der Expression von CD61 (GpIIIa), entsprechend einer Reinheit der gewonnenen Megakaryozyten von > 90%.

4.4. Ein Anti-Citrullin-Antikörper bindet linienspezifisch an Megakaryozyten in murinem Knochenmark

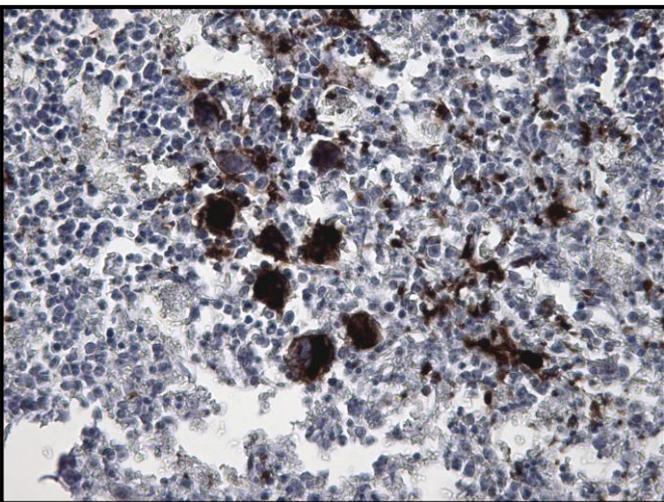
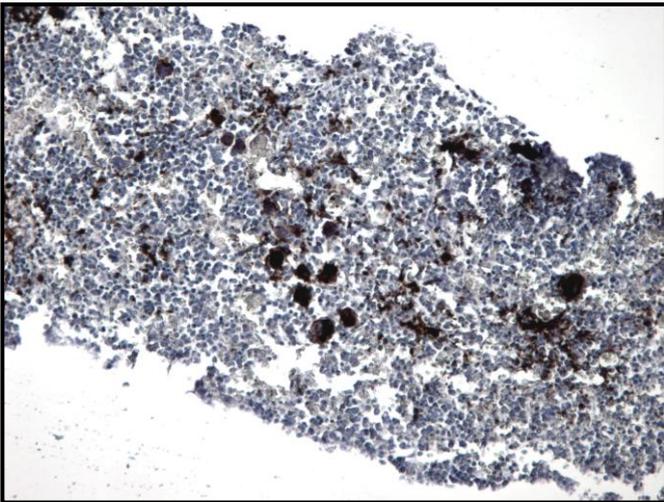
Ein 2006 publizierter Zufallsbefund zeigte, dass ein Citrullinpeptid-Antikörper murine Megakaryozyten linienspezifisch erkennt. (Kopp et al., 2006). Der verwendete Rabbit anti-Citrulline Antikörper (im Folgenden „RAC“) stammt von der Firma Upstate (Cat.: #24232) und ist ein im Kaninchen generierter anti-humaner-Antikörper. Er erkennt Keratinstrukturen in der menschlichen Hornhaut bei Psoriasispatienten.

Bisher gilt CD41, auch Glykoprotein IIb (GP IIb) bzw. Integrin alpha IIb genannt, zusammen mit CD61 (GP IIIa) als klassischer Marker der Thrombozytopoese und färbt somit zuverlässig Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen an (Rabellino et al., 1979).

CD41 und CD61 gehören zu der Familie der Integrine und sind Ca^{2+} -abhängige Membranproteine thrombopoetischer Zellen. Integrine sind Mediatoren bei Zell-Zell und Zell-Substrat Interaktionen, dienen der Adhäsion und der Signalübertragung. CD41 ist vor allem auf der Plasmamembran, im offenen kanikulären System und auf den α -Granula der Thrombozyten nachweisbar.

Dort dient es vor allem als Rezeptor für Fibrinogen, Fibronectin und den von-Willebrand-Faktor und somit als Mediator bei der Thrombozytenadhäsion und –aggregation (Phillips et al., 1992).

Immunhistochemische Färbungen diverser Cytospins und Schnitte murinen Knochenmarks mit dem CD41-Antikörper und dem RAC-Antikörper zeigten, dass dieselben Zellen angefärbt wurden, welche morphologisch eindeutig anhand der Größe und Vielkernigkeit als Megakaryozyten identifiziert werden konnten.



**Abbildung 4.6. Murines KM,
immunhistochemisch gefärbt**

Murines Knochenmark konnte immunhistochemisch mit dem RAC-AK gefärbt werden.

Es zeigte sich eine spezifische Anfärbung der Megakaryozyten.

A) 100 x vergrößert

B) 200 x vergrößert

Somit konnte die absolute Spezifität nachgewiesen werden, mit welcher der RAC-Antikörper nur an Zellen der reifen polyploiden Megakaryozyten-Zelllinie bindet, ohne mit Endothelialzellen oder anderen nicht thrombopoetischen Zellen zu reagieren.

Allerdings blieb das Ziel-Antigen der Antikörper unklar. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Speziespezifität der oben genannten Befunde zu erörtern und vor allem das spezifische Antigen zu isolieren.

4.5. Immunzytologische Färbung mit dem RAC-Antikörper

Um die Bindung des RAC-Antikörpers an ein Antigen der verschiedenen Differenzierungsstufen der murinen Megakaryozyten und ihrer Vorläuferzellen darzustellen, wurden an Tag 1-5 der Kultivierung Cytospins mit jeweils ungefähr 30.000 Zellen in 100 µl Medium angefertigt.

Anschließend wurden diese immunhistochemisch gefärbt.

Als Primärantikörper diente dabei der RAC-Antikörper (1:75 in 1%BSA/PBS), als Sekundärantikörper Dako Schwein Anti-Kaninchen Immunglobulin Biotinylated (1:200 in 1%BSA/PBS). Nach Inkubation mit Streptavidin/Biotin-HRP (je 1:100 in 1%BSA/PBS) und DAB-Stammlösung (1:50 in PBS) und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin, konnte wie erwartet eine Markierung der morphologisch als Megakaryozyten identifizierbaren Zellstrukturen in Form einer Braunfärbung gesehen werden.



Abbildung 4.7. Immunhistochemisch gefärbter muriner Megakaryozyt, 200x vergrößert

Antigene eines murinen Megakaryozyten wurden vom RAC-AK erkannt und dieser mit einem Sekundärantikörper markiert. Durch eine Enzym-Substrat-Reaktion der DAB-Stammlösung und des Hämatoxylins kommt es zur Braunfärbung der markierten Strukturen, der Zellkern imponiert blau.

Um zu klären, ab welchem Zeitpunkt in der Megakaryopoese sich die angefärbten Strukturen entwickeln, wurde ein Spezialvorgehen angewandt, bei welchem zunächst eine Lineage Depletion erfolgte und anschließend eine positive Selektion der Sca1⁺ (stem cell antigen-1) Zellen durchgeführt wurde.

Durch die An (+)- bzw. Abwesenheit (-) gewisser Antigene lassen sich Stammzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien voneinander unterscheiden. Als Sca1⁺ erweisen sich die sehr frühen und somit komplett undifferenzierten Stadien einer hämatopoetischen Stammzellpopulation, die die Fähigkeit zur Repopulation des Knochenmarks in vivo aufweisen (Spangrude et al., 1988).

Mithilfe einer positiven Selektion dieser Zellen sollte eine Population gewonnen werden, die initial weder Megakaryozyten noch deren Vorläuferzellen enthält. Anschließend wurde diese so isolierte Population wiederum unter Zugabe von Zytokinen in Kultur genommen, im Abstand von 8, 24, 48 und 72 Stunden Zytozentrifugenpräparate angefertigt und gefärbt und die Zellentwicklung photographisch dokumentiert.

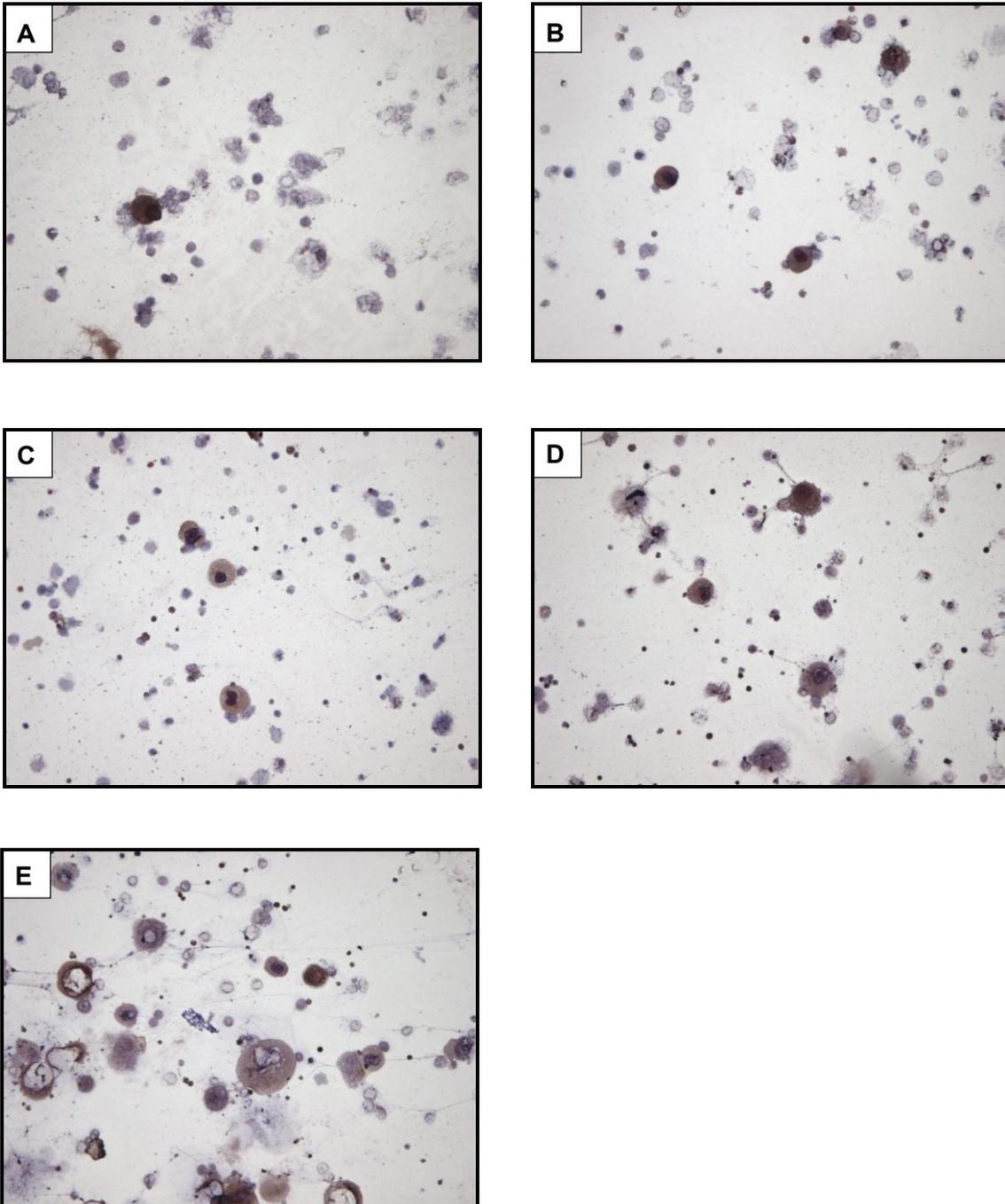


Abbildung 4.8. Zytocentrifugenpräparat, immunzytochemisch gefärbt, 100x vergrößert,

- A) 0 Stunden in Kultur
- B) 8 Stunden in Kultur
- C) 24 Stunden in Kultur
- D) 48 Stunden in Kultur
- E) 72 Stunden in Kultur

Bei der photographischen Dokumentation der Zellentwicklung fällt eindeutig eine mit der Zeit stetige Mengen- und Größenzunahme megakaryozytärer Zellen auf. Auch die Entwicklung hin zur polyploiden Zelle durch Endomitose ist dabei von großer Bedeutung und lässt sich mikroskopisch beobachten.

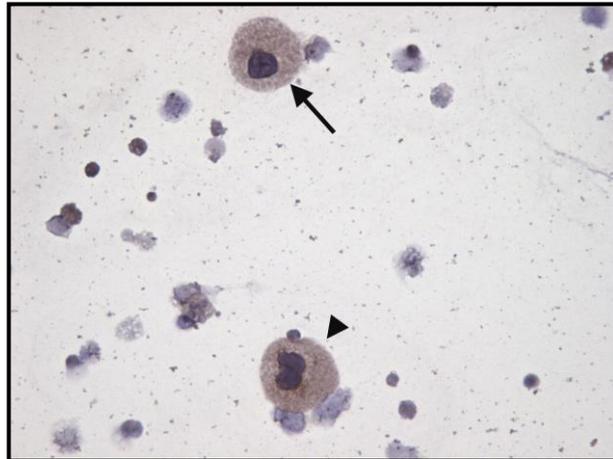


Abbildung 4.9. Zytozentrifugenpräparat, immunzytochemisch gefärbt, 200x vergr., 24h

Im Laufe der Megakaryopoese sind mikroskopisch verschiedene Entwicklungsstadien erkennbar, wobei die Polyploidität ein wichtiges Differenzierungsmerkmal darstellt.

Pfeil: 1n-Megakaryozyt, Pfeilspitze: 2n-Megakaryozyt

Desweiteren lassen die Bilder der Zytozentrifugenpräparate eine beginnende Instabilität der Megakaryozyten nach 72 h erkennen. Unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen (3-minütige Zentrifugation mit 500 rpm bei Beschleunigung „low“) nahm die Anzahl der rupturierten Zellen deutlich zu.

Allerdings lässt sich anhand der Bilder auch erkennen, dass bereits zu Beginn der Beobachtung (0h) morphologisch als Megakaryozyten bzw. Megakaryozytenvorläufer identifizierbare Zellen vorhanden sind, was darauf hindeutet, dass die positive Sca1-Selektion nicht vollständig funktioniert hat und es wahrscheinlich zu unspezifischen Sca1-Antikörperbindungen gekommen ist.

Trotzdem lässt sich aus den Beobachtungen der Schluss ziehen, dass sehr früh im Verlauf der Megakaryopoese, wohl bereits im 1n- bis 2n-Stadium, ein Antigen gebildet wird, das von dem RAC-Antikörper erkannt wird.

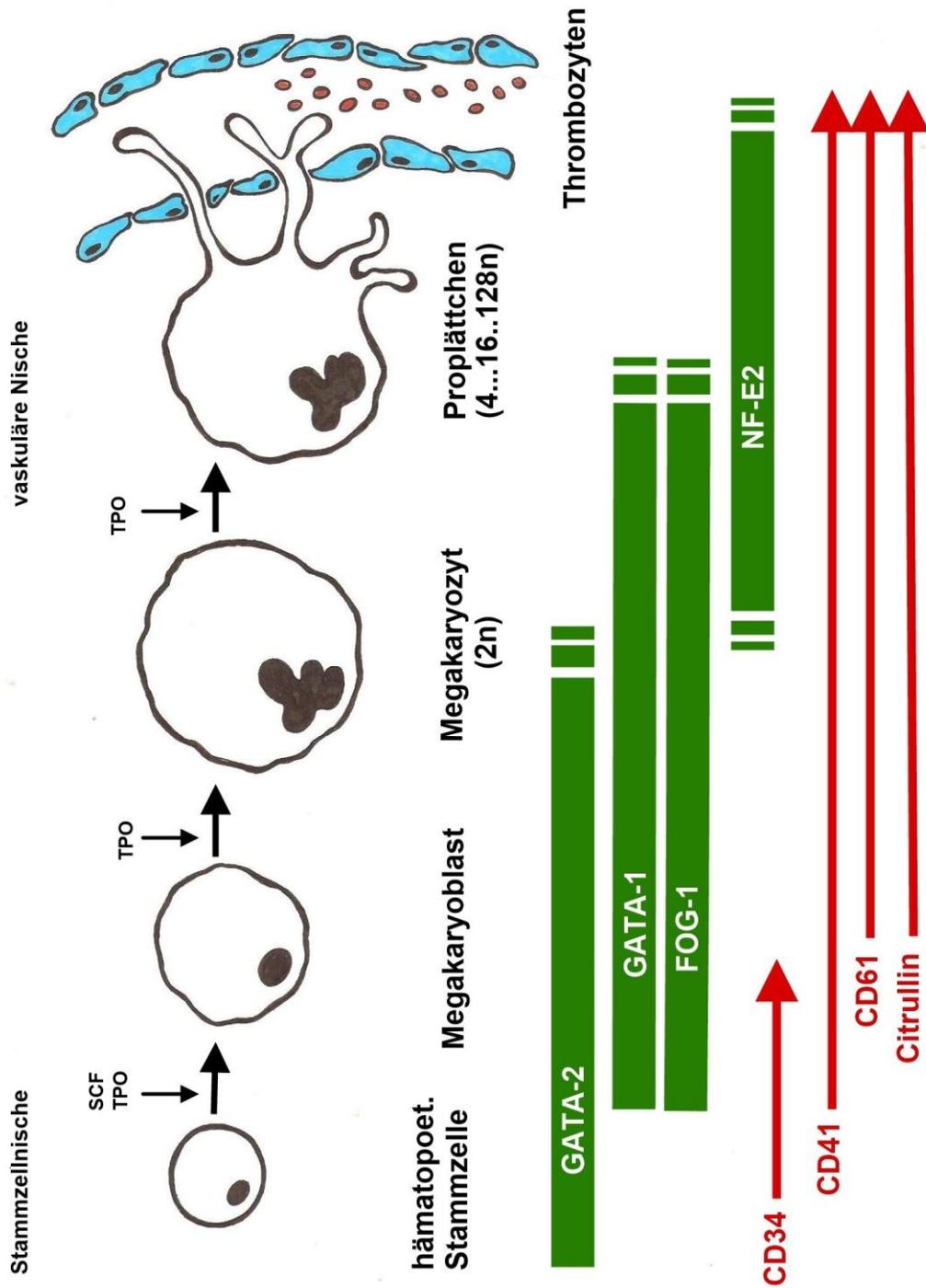


Abbildung 4.10. Phasen der Megakaryopoese

Das Schema zeigt die für die einzelnen Differenzierungsstufen typische Expression charakteristischer Antigene (rot) und die Aktivität einzelner Transkriptionsfaktoren (grün).

4.6. Immunfluoreszenzfärbung

Die Bindung des RAC-Antikörpers an murine Megakaryozyten konnte außerdem mittels einer Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Als Ausgangsmaterial dienten Zytocentrifugenpräparate der Megakaryozyten-Kultur von Tag 5 der Differenzierung (3-minütige Zentrifugation mit 500 rpm bei Beschleunigung „low“). Als Primärantikörper dienten der RAC-Antikörper sowie ein Mouse anti-Human CD61 AK, als Sekundärantikörper wurden ein Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488 bzw. ein Goat anti-Mouse Cy3 eingesetzt.

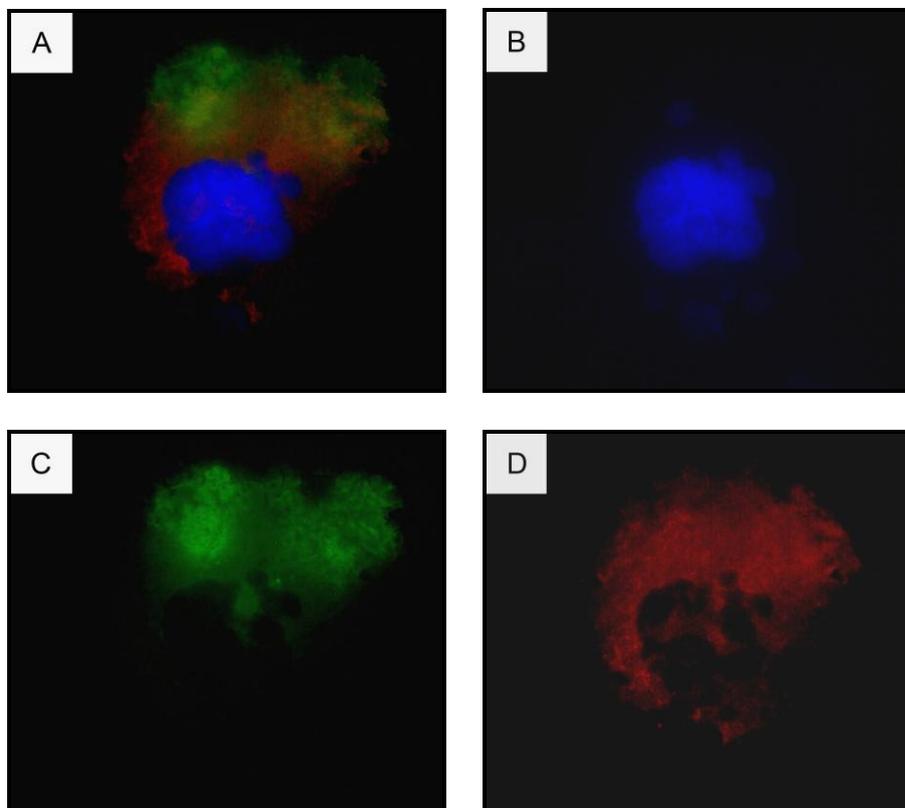


Abbildung 4.11. Megakaryozyt nach Immunfluoreszenzfärbung

A) Ergebnisbild mit Überlappung, B) DAPI, C) Alexa Fluor 488, D) Cy3

Es zeigte sich, dass sich sowohl mit Alexa Fluor, als auch mit Cy3 die gleichen Zellstrukturen anfärben ließen, womit das Antigen, gegen das sich der RAC-Antikörper richtet, und CD61 in derselben Zelle nachweisbar sind.

4.7. Speziesspezifität des RAC-Antikörpers

Zu Vergleichszwecken wurden neben der murinen Lineage-negativen Zellpopulation humane Megakaryozyten der Zelllinie MEG-01 in Kultur genommen.

Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die 1983 aus dem Knochenmark eines Philadelphia-Chromosom-positiven CML-Patienten in akuter Blastenkrise gewonnen wurde. CD41 (GPIIb) kann mittels Immunfluoreszenzfärbung auf der Oberfläche der MEG-01 Zellen nachgewiesen werden und sie gleichen auch in anderen Eigenschaften den normalen humanen Megakaryozyten.

Somit stellt diese megakaryoplastische Zelllinie ein nützliches Modell dar, um humane Megakaryozytenreifung und –differenzierung zu untersuchen (Ogura et al., 1985). MEG-01 Zellen wachsen mit einer Verdopplungsrate von 36 - 48 Stunden, wobei sich die Pseudopodienbildung als typischer megakaryozytärer Differenzierungsprozess gut beobachten ließ.

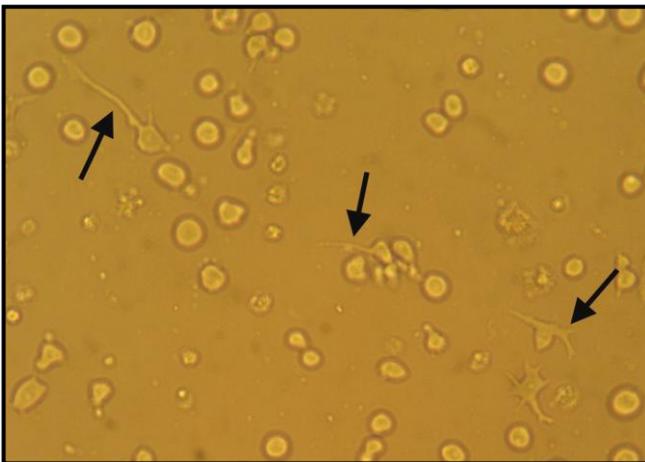


Abbildung 4.12. Humane Megakaryozyten (Meg-01) in Kultur, 200x vergrößert

Ab einem gewissen Reifezustand bilden Megakaryozyten pseudopodienartige Fortsätze aus (s. Pfeile), von denen die Thrombozyten abgeschnürt werden.

Von dieser humanen Zellpopulation wurden ebenfalls Zytozentrifugenpräparate angefertigt (3-minütige Zentrifugation mit 500 rpm bei Beschleunigung „low“), welche immunhistochemisch mit dem RAC-Antikörper als Primärantikörper gefärbt wurden.

Allerdings zeigte sich hier keine spezifische Reaktion des Antikörpers mit den humanen Megakaryozyten. Der getestete RAC-Antikörper bindet somit spezifisch an ein in der Maus exprimiertes Antigen.

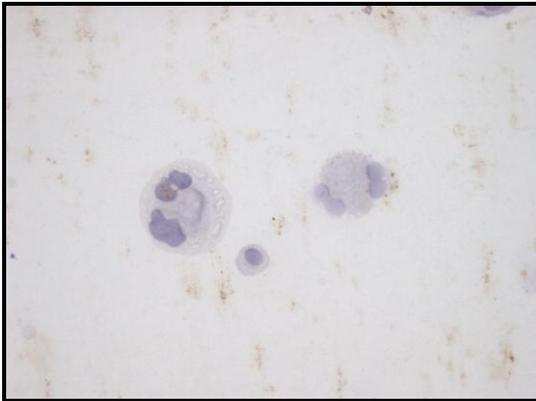


Abbildung 4.13. humane Megakaryozyten CD45-negativ, Tag 10, 200x vergrößert

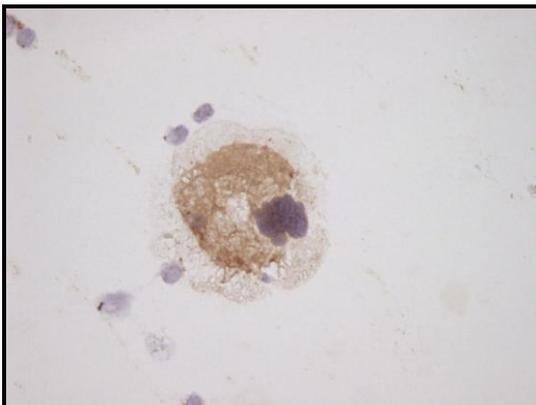
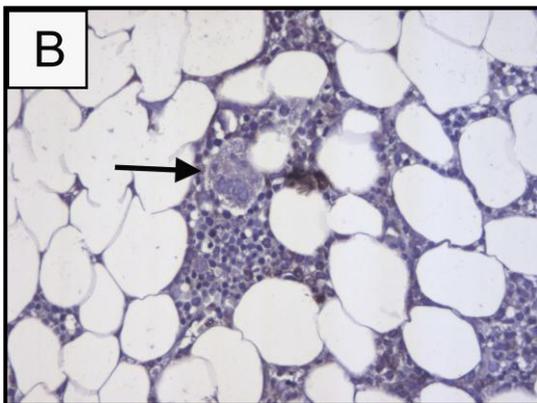
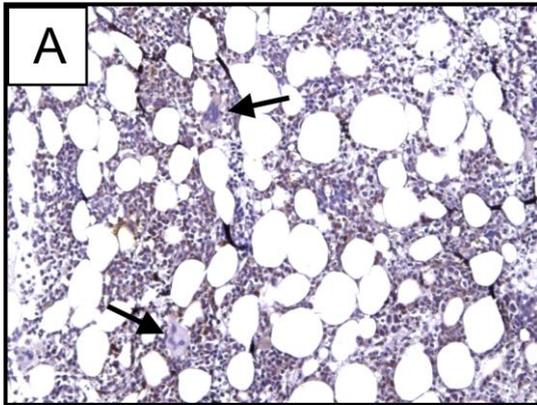


Abbildung 4.14. murine Megakaryozyten, Tag 5, 200x vergrößert, Positivkontrolle



Abbildung 4.15. humane Megakaryozyten CD45-negativ, Tag 7, 200x vergrößert, Negativkontrolle

Desweiteren wurden humane Knochenmarktrepanate immunhistochemisch analysiert, um die Interaktion der Megakaryozyten mit dem RAC-Antikörper in ihrem natürlichen Zellzusammenschluss zu untersuchen.



**Abbildung 4.16. humanes Knochenmark.
Immunhistochemisch gefärbt**

(A) 100x vergrößert, (B) 200x vergrößert

Die humanen Megakaryozyten zeigten auch in vivo keine spezifische Reaktion mit dem RAC-Antikörper

Auch hier ließen sich die humanen Megakaryozyten nicht mit dem RAC-Antikörper anfärben, was die Speziespezifität des Antikörpers für Mäuseknochenmark bestätigte.

4.8. Testung anderer Anti-Citrullin-Antikörper

Als erster Schritt in der Identifikation des Zielantigens wurde die Hypothese formuliert, dass der Test-Antikörper aufgrund seiner Spezifität für citrullinierte Proteine an Megakaryozyten bindet. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden weitere Färbungen mit Antikörpern gegen citrullinierte Peptide angefertigt. Die Ergebnisse an Paraffinschnitten aus Mäuseknochenmark zeigten, dass nur der RAC-AK von Millipore spezifisch Megakaryozyten anfärbte, wohingegen andere Anti-Citrullin- Antikörper entweder gar keine Bindungsstelle in den Knochenmarkschnitten fanden oder aber unspezifisch färbten.

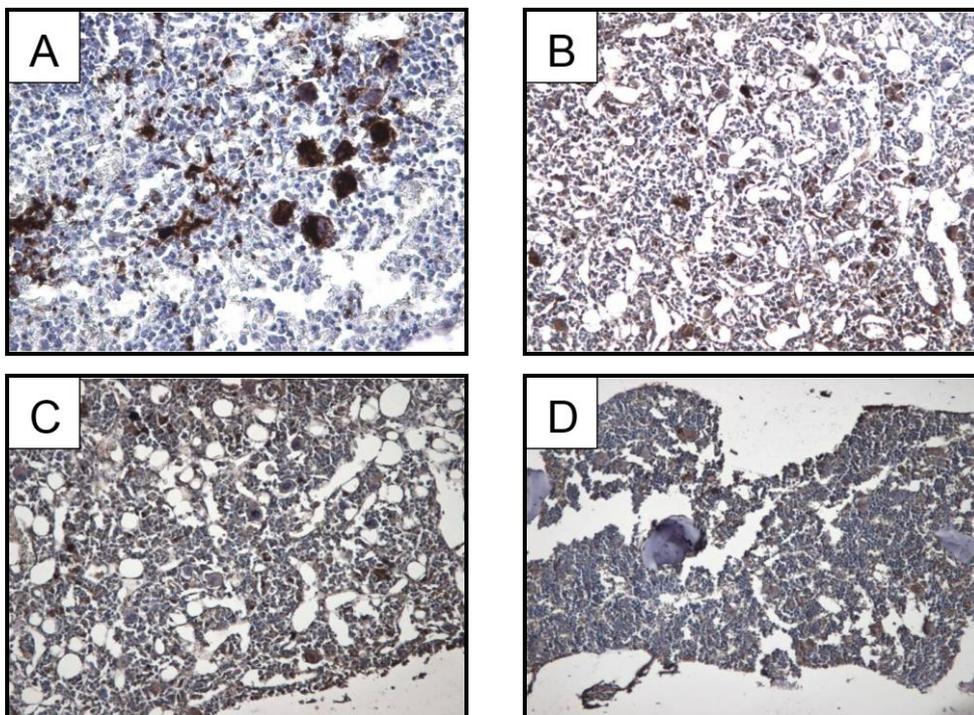


Abbildung 4.17. Murines Knochenmarkschnitte, 100x vergrößert, immunhistochemisch gefärbt mit verschiedenen Anti-Citrullin-Antikörpern

A) RAC-AK von Millipore, B) Citrullin 06 Bib-AK, C) Pineda Cit KLH1, D) Pineda Cit Urea

Dieses Resultat spricht gegen die Hypothese, dass eine Citrullin-spezifische Bindung vorliegt.

4.9. Identifikation des bindenden Antigens

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war es, das Antigen der murinen Megakaryozyten, welches mit dem RAC-Antikörper reagiert, zu identifizieren.

Hierzu wurde zunächst in der durch die Lineage Cell Depletion gewonnenen Zellpopulation mittels Bradford-Assay die Gesamtproteinmenge bestimmt (Bradford, 1976b).

Die Zellen wurden lysiert und eine Probe des Eluats auf eine 96Well-Platte aufgebracht. Im Spektralfotometer wurde die jeweilige Absorption bei 450 nm und 590 nm gemessen und daraus rechnerisch mithilfe der Software XFLOUR4 die Proteinkonzentration bestimmt.

Measurement mode:	Absorbance		
Measurement wavelength:	590nm		
Shake duration (Inside Normal):	10s		
Rawdata			
<>	1	2	
Leerwert	0,2880	0,2840	
Probe	0,4160	0,4110	
Measurement mode: Absorbance			
Measurement wavelength: 450nm			
Rawdata			
<>	1	2	
Leerwert	0,5430	0,5250	
Probe	0,4920	0,4970	
590/450			
		Mittelwert:	µg/µl
0,530387	0,540952	0,53567	-0,17083 Leerwert
0,845528	0,826962	0,836245	0,914278 Megakaryozyten

Abbildung 4.18. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Spektralfotometer

Es wurden jeweils zwei Proben und zwei Leerwerte gemessen, um anschließend aus den gewonnenen Mittelwerten die Proteinkonzentration zu berechnen.

Das Protein-Eluat wurde daraufhin mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei Proben mit einem Proteingehalt von 10 µg bzw. 25 µg auf ein Acrylamid-Gel aufgetragen wurde und ein Proteinstandard (Full Range Rainbow Marker) zur Größenbestimmung der molekularen Massen diente. Bei zunächst 75 Volt für 15 min und anschließend 150 Volt für 60 min wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt.

Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt, um die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran zu transferieren. Der Transfer erfolgte in einem Semi-Dry-Blotsystem (Owl), in welchem für 9x8 cm Membranen für 75 min mit einer Stromstärke von 65 mA geblottet wird. Daraufhin wurde mit Roti-Block 1:10 für 60 min blockiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem RAC-Antikörper inkubiert und nach mehrmaligem gründlichen Waschen abermals für 60 min bei RT mit dem Sekundärantikörper Schwein-Anti-Kaninchen-HRP (1:5000 in Roti-Block) inkubiert.

Nach der Substratexposition (ECL Plus Amersham) und einer Röntgenfilmexposition mit unterschiedlichen Zeitspannen erhielten wir folgendes Bild:

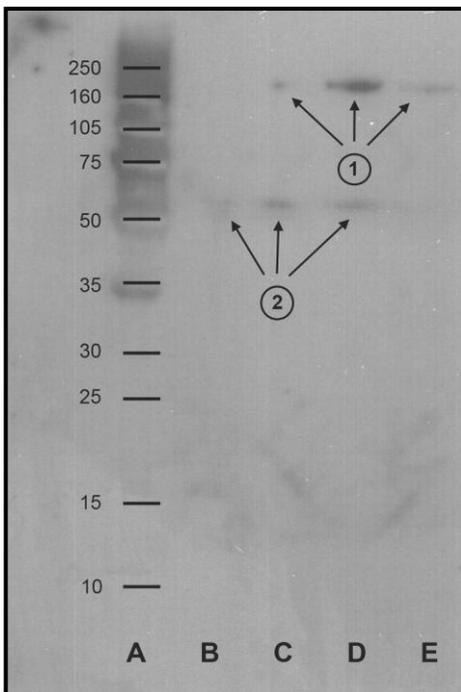


Abbildung 4.19. Röntgenfilm nach Western Blot

Die Proben wurden wie folgt auf das Acrylamid-Gel aufgetragen:

- A) Full Range Rainbow Marker
- B) Protein-Eluat 1, 10 µg
- C) Protein-Eluat 2, 10 µg
- D) Protein-Eluat 1, 25 µg
- E) Protein-Eluat 2, 25 µg

Es zeigten sich zwei Banden, welche mithilfe des aufgetragenen Proteinstandards auf ungefähr 160 kDa (1) bzw. 50 kDa (2) eingeschätzt werden konnten.

Um das Protein, welches jene Banden bildete, identifizieren zu können, sollte es mithilfe einer Immunpräzipitation von den restlichen Proteinen des Eluats, welches wir nach der Lysierung der Megakaryozyten erhalten hatten, isoliert werden.

Hierzu wurde der Catch and Release® Kit der Firma Upstate genutzt, bei dem Harz-Beads mittels eines Antibody-Capture-Affinity-Liganden an den Fc-Teil der Primärantikörper (RAC-Antikörper) binden, mit welchen zuvor das gesuchte Protein markiert worden war. Nach der Bildung des Antigen-Antikörper-Bead-Komplexes kann dieser durch Zentrifugation von dem restlichen Proteingemisch getrennt werden. Die Immunpräzipitation wurde laut Protokoll durchgeführt und schlussendlich erfolgte sowohl eine nicht-denaturierende als auch eine denaturierende Proteinelution, um eine möglichst große Menge des präzipitierten Antigens von den Beads zu lösen. Die gewonnenen Eluate, welche das präzipitierte Protein enthielten, wurden abermals mittels Gelelektrophorese (75 Volt für 15 min, 150 Volt für 60 min) aufgetrennt.

Um das isolierte Protein zu visualisieren, wurde das Acrylamid-Gel mit Simply-Blue gefärbt und anschließend eine Silberfärbung nach Blum et al. (modifiziert) durchgeführt.

In den Positivkontrollen (Spur 3 und 4) zeigten sich zwei auffällige Banden, wohingegen bei den Negativkontrollen (Spur 6 und 7) nichts angefärbt wurde. Das Eluat 1 (Spur 3) war mit dem RAC-Antikörper versetzt und nach der IP nicht denaturierend eluiert worden. Hier zeigte sich eine Bande (A) bei ungefähr 150 kDa. Das Eluat 2 (Spur 4), welches ebenfalls mit dem RAC-Antikörper markiert worden war, war nach der IP denaturierend eluiert worden. Die dort entstandene Bande (B) lag bei ungefähr 50 kDa.

Beide Banden wurden ausgeschnitten und weitergehend im Medizinisch-naturwissenschaftlichen Forschungszentrum der Universität Tübingen (MNF) von der Arbeitsgruppe Dr. Kalbacher massenspektrometrisch analysiert.

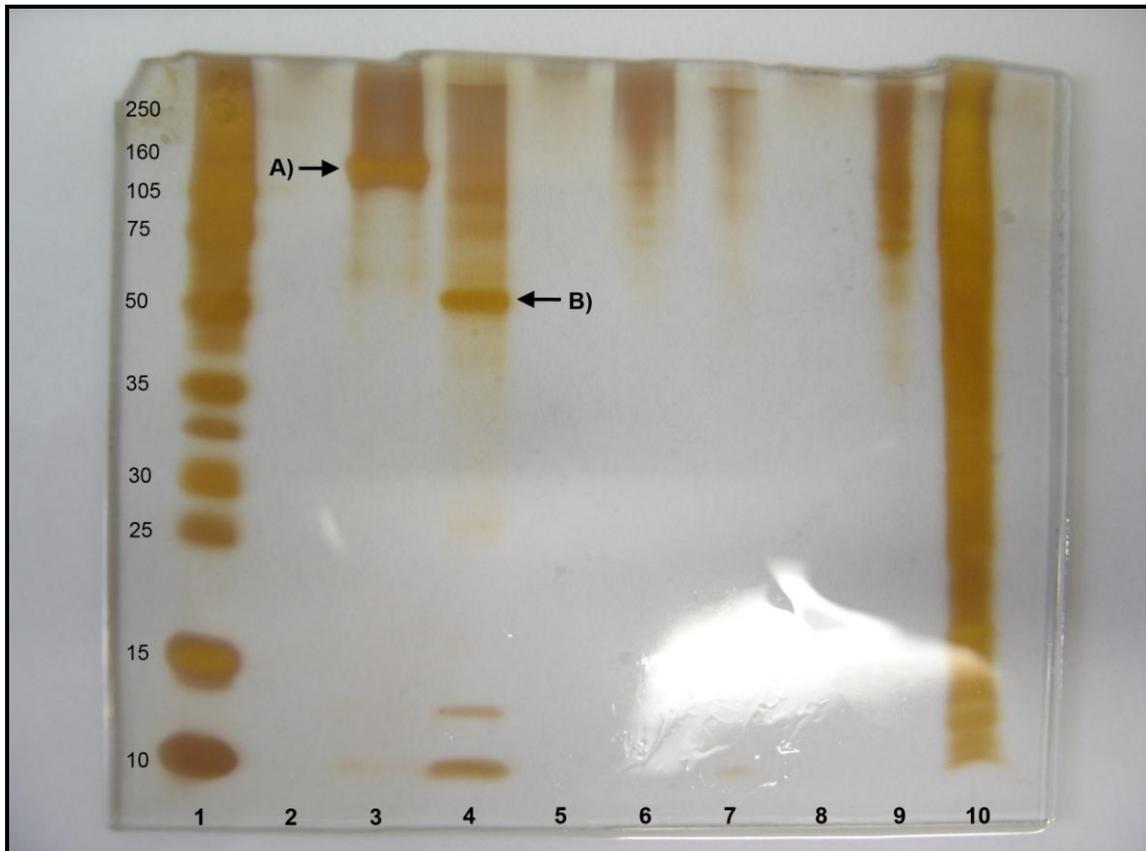


Abbildung 4.20. Silberfärbung eines Acrylamid-Gels nach Immunpräzipitation

Die mithilfe einer IP gewonnenen Proben wurden wie folgt auf ein Acrylamid-Gel aufgetragen:

- 1) 3 ml Rainbow-Marker
- 2) 15 μ l Ladepuffer
- 3) Eluat 1+ (nicht denaturiert) + 7 μ l Ladepuffer
- 4) Eluat 2+ (denaturiert) + 7 μ l Ladepuffer
- 5) 15 μ l Ladepuffer
- 6) Eluat 1 (ohne Antikörper/Negativkontrolle)
- 7) Eluat 2 (ohne Antikörper/Negativkontrolle)
- 8) 15 μ l Ladepuffer
- 9) Wash1 + 7 μ l A.bidest + 7 μ l Ladepuffer
- 10) 1 μ l Gesamtprotein gepoolt

4.10. Ergebnis der Massenspektrometrie

Von den beiden Banden, die sich nach der Immunpräzipitation in der Gelelektrophorese gezeigt hatten, wurden nach tryptischem Verdau eine Massenspektrometrie angefertigt. Dazu wurden die zuvor ionisierten Teilchen der zu untersuchenden Proben durch ein elektrisches Feld beschleunigt und nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/q) aufgetrennt.

Bei der größeren Bande (A) zeigte sich folgende Peakverteilung:

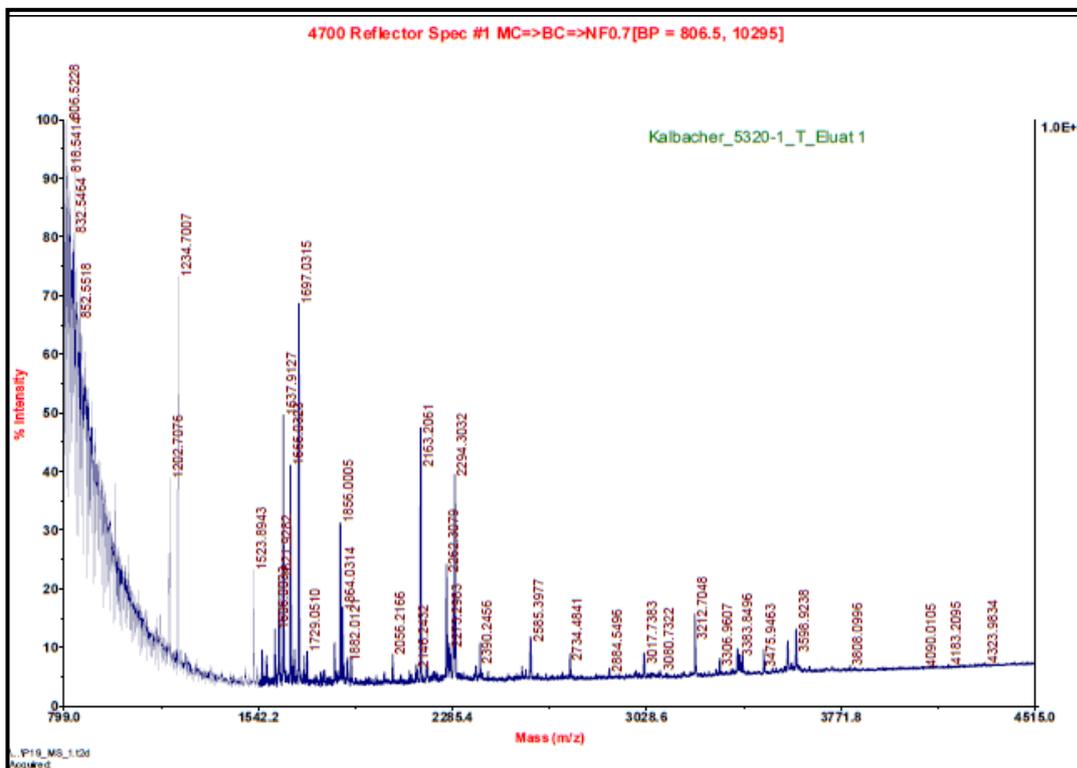


Abbildung 4.21. Massenspektrometrische Auftrennung der Bande A (150kDa)

In der Datenbankanalyse zeigte diese Peakverteilung die höchste Übereinstimmung mit murinem Cullin 5.

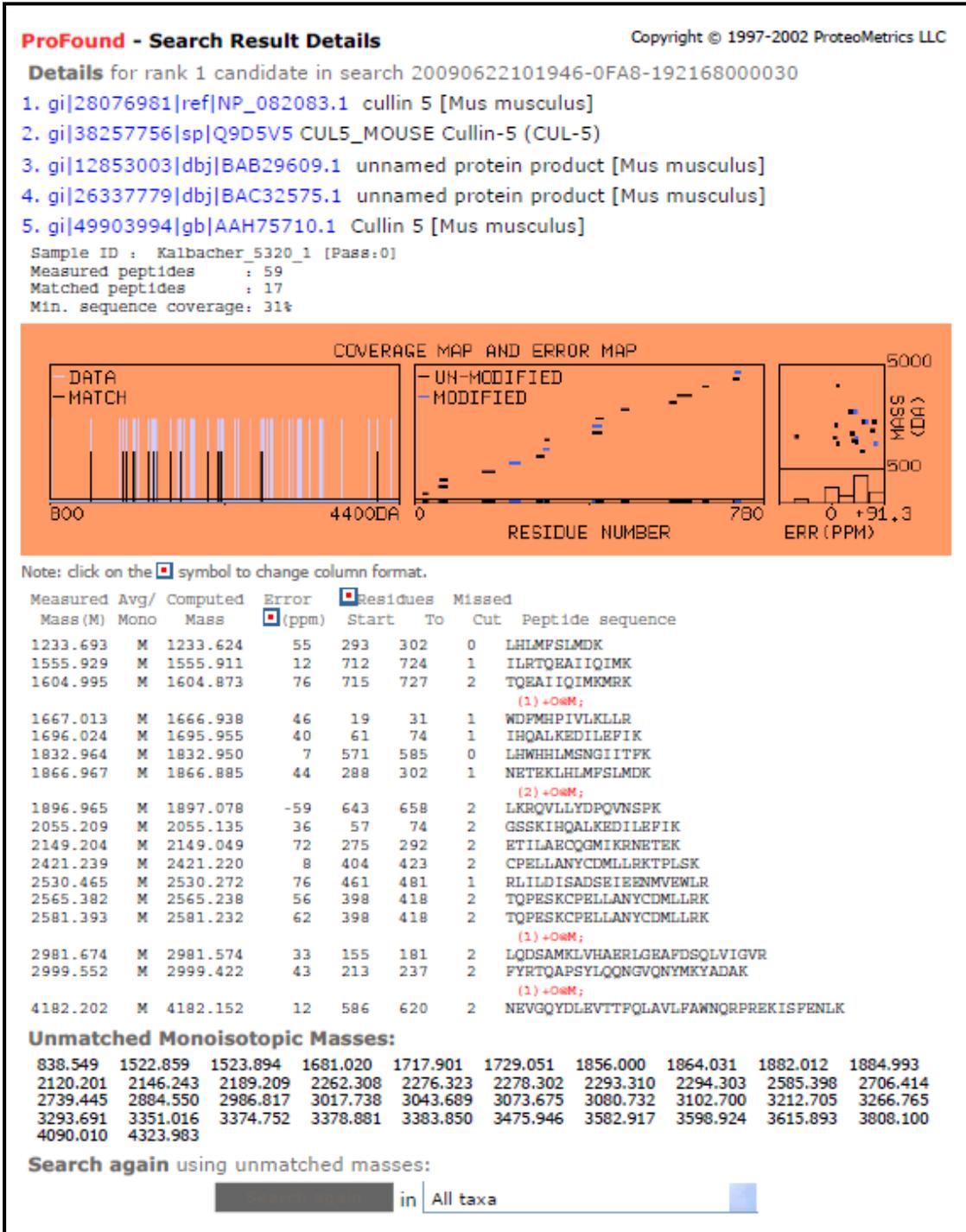


Abbildung 4.22. Überprüfung der Ergebnisse der Massenspektrometrie für die Bande A
 Es zeigte sich die höchste Übereinstimmung der Peakverteilung mit Cullin 5.

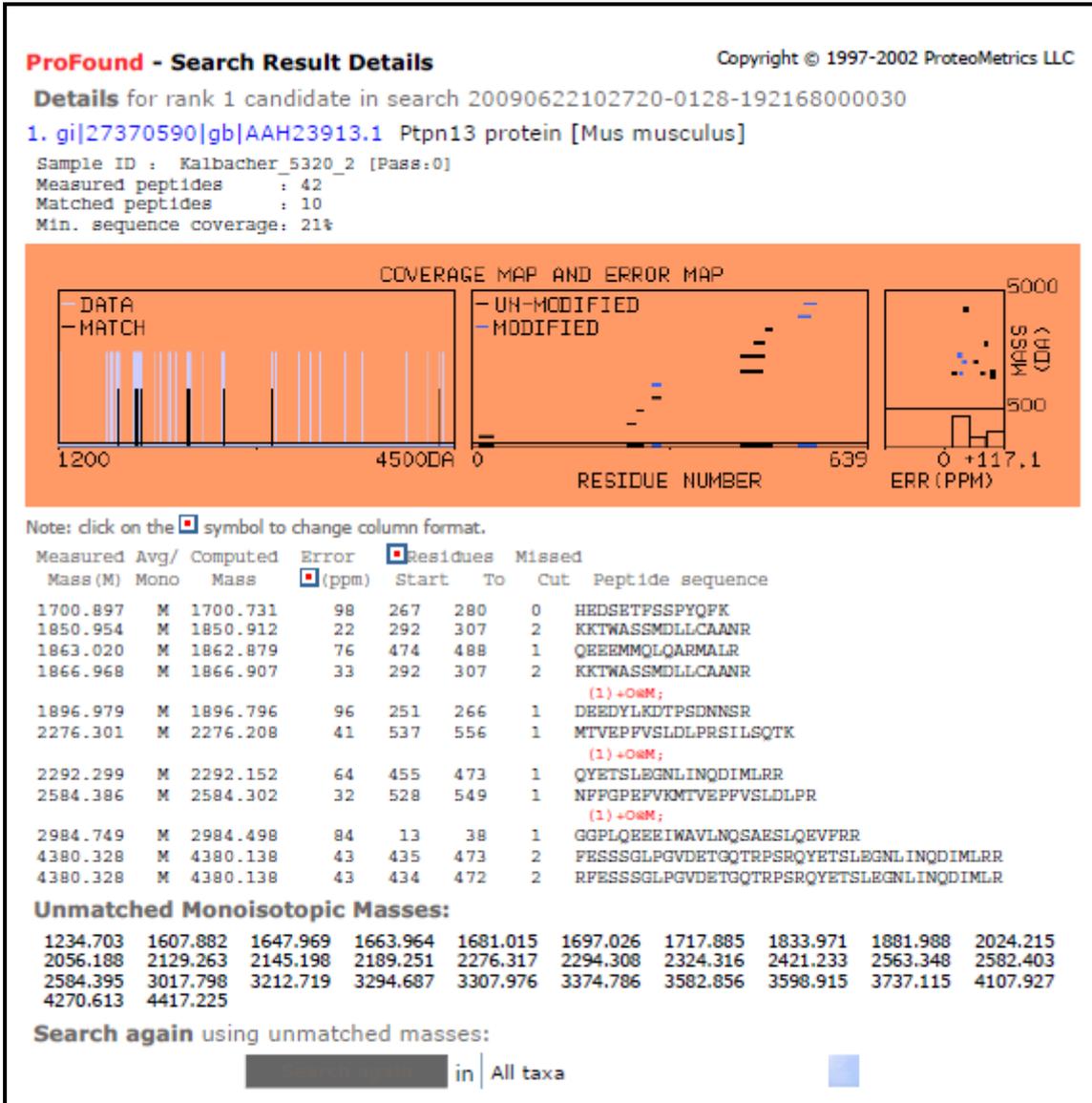


Abbildung 4.24. Überprüfung der Ergebnisse der Massenspektrometrie für die Bande A
 Neben einer möglichen Detektion der schweren Kette des verwendeten Antikörpers, zeigte sich hier die höchste Übereinstimmung mit Ptpn 13.

Um genauere Ergebnisse zu erhalten, wurde eine MS/MS-Analyse der Banden addiert, allerdings ohne dass zusätzliche Informationen gewonnen werden konnten.

4.11. Ergebnisse der immunhistochemischen Testung von Antikörpern gegen Cullin 5 und ptpn13 an murinen Knochenmarkschnitten

Um die Expression der massenspektrometrisch identifizierten möglichen Target-Antigene Cullin 5 und ptpn13 in Megakaryozyten zu überprüfen, wurden entsprechende, kommerziell erhältliche Antikörper gegen diese Antigene auf ihre Interaktion mit thrombopoetischen Zellen getestet. Hierzu wurden Paraffinschnitte aus murinem Knochenmark angefertigt und mit unterschiedlichen Primärantikörpern immunhistochemisch gefärbt.

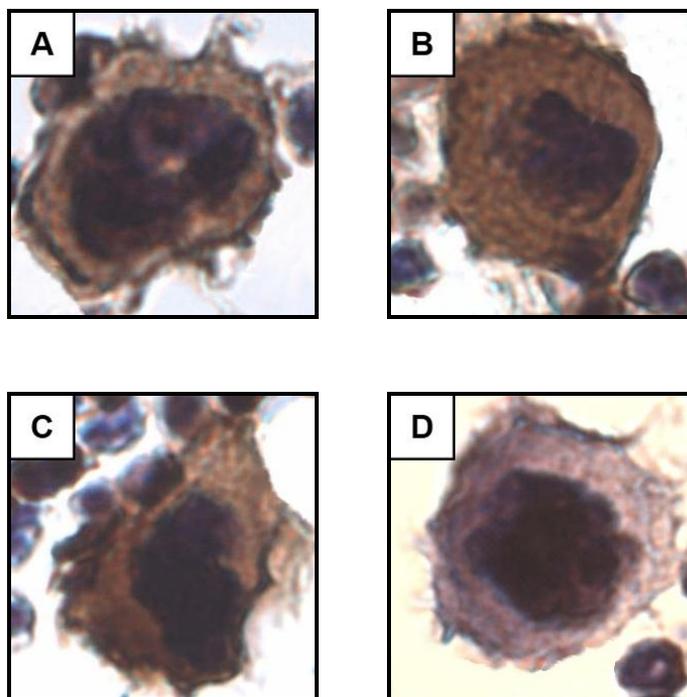


Abbildung 4.25. Knochenmarkschnitte, immunhistochemisch gefärbt, 100x vergrößert

Paraffinschnitte aus murinem Knochenmark wurden mit Antikörpern gegen folgende Antigene gefärbt: A) CD 61, B) Cullin 5, C) Ptpn 13, D) Negativkontrolle.

Die Antikörper gegen Cullin5 und Ptpn13 färbten die Megakaryozyten ebenso wie CD61spezifisch an, wohingegen sich in der Negativkontrolle keine Reaktion nachweisen ließ. Somit konnte gezeigt werden, dass beide Antigene in Megakaryozyten exprimiert sind (Abb. 4.25.).

5. Diskussion

Zur immunhistochemischen Darstellung von Megakaryozyten und Thrombozyten werden in der Regel Antikörper gegen Alpha II- oder Beta III-Integrin verwendet (i.e. CD41 bzw. CD61). Auch Antikörper gegen Thrombospondin wurden eingesetzt. In dieser Arbeit wird beschrieben, dass ein experimenteller Antikörper, nämlich der Rabbit-Anti-Citrulline-Antikörper (RAC) der Fa. Millipore, welcher ursprünglich in Kaninchen gegen humanes citrulliniertes Peptid generiert wurde, spezies- und zellreihenspezifisch an murine Megakaryozyten bindet. Dieser Zufallsbefund wurde bereits publiziert (Kopp 2006, JCI). Bislang unklar blieb jedoch die Zielstruktur, an die der Antikörper in Mäusemegakaryozyten bindet.

In zahlreichen, experimentellen Schritten und unter Einsatz multipler Methoden wurde im Rahmen dieser Dissertation an der Identifikation des entsprechenden Zielantigens gearbeitet.

Da Megakaryozyten nur in geringer Absolutzahl im Knochenmark vorhanden und bei der Bearbeitung äußerst anfällig sind, ist der Isolation dieser Zellart die *in vitro* Generierung vorzuziehen. Hierzu wurde das Knochenmark aus Femora, Tibiae und Fibulae von Wildtypmäusen entnommen. Die darin enthaltenen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wurden über antikörperbasierte Methoden spezifisch angereichert und konnten anschließend *in vitro* zu einer großen Zahl von Megakaryozyten differenziert werden. In Kultur ließen sich die megakaryozytären Zellen und ihre Progenitoren gut mikroskopisch darstellen und ihre Proliferation sowie Differenzierung konnte fotografisch dokumentiert werden. Die durchflußzytometrisch gemessene Reinheit der gewonnenen Megakaryozyten betrug über 90%.

Techniken zur immunzytologischen Charakterisierung dieser Zellen wurden ebenso etabliert wie die Immunhistochemie an Gefrier- und Paraffinschnitten von Mäusefemora mit dem RAC-Antikörper. Verglichen mit einer Färbung mit CD41-Antikörper zeigte sich, dass dieselben Zellen angefärbt wurden, wodurch

die linienspezifische Bindung des Antikörpers an Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis konnte mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung nochmals bestätigt werden.

Anhand der immunhistochemischen Färbungen konnte außerdem sehr gut die Proliferation und Polyploidität der Megakaryozyten in verschiedenen Stadien der Differenzierung nachvollzogen werden. Um den genauen Zeitpunkt in der Megakaryopoese zu bestimmen, ab dem das gesuchte Antigen exprimiert wird, wurde eine positive Selektion der Sca1⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen durchgeführt, durch die eine Population gewonnen werden sollte, die initial weder Megakaryozyten noch deren Vorläuferzellen enthält. Allerdings ließen sich bereits zu Beginn der Kultivierung (0h) morphologisch als Megakaryozyten identifizierbare Zellen anfärben. Dies deutet darauf hin, dass die Sca1⁺-Selektion nicht vollständig funktioniert hat und es wahrscheinlich zu unspezifischen Sca1-Antikörperbindungen an die Fc-Rezeptor exprimierenden Megakaryozyten gekommen ist. Dieses Problem könnte eventuell gelöst werden, indem mit einer größeren Ausgangspopulation begonnen wird, was die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen herabsetzen würde, oder vermehrte Waschschriffe durchgeführt werden, um die Reinheit der positiv selektierten Zellen zu erhöhen. Megakaryozyten sind aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie allerdings sehr leicht und unverwechselbar zytologisch als solche identifizierbar, so dass selbst geringe Beimengungen leicht mikroskopisch erfaßt werden können. So konnte in der gewonnenen Population festgestellt werden, dass das gesuchte Antigen bereits sehr früh im Differenzierungsprozess der Megakaryozyten exprimiert wird. Das Zielantigen erscheint etwas später als CD41, welches bereits in megakaryozytären Vorläuferzellen gebildet wird, und zwar zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie CD61.

Um das gesuchte Antigen weiter zu charakterisieren, untersuchten wir die Spezifität des RAC-Antikörpers im Hinblick auf humane Megakaryozyten. Hier zeigte sich weder in Zytozentrifugenpräparaten noch in Knochenmarktrepanaten einer MEG-01 Zelllinie eine Interaktion des Anti-

Citrullin-Antikörpers mit den Megakaryozyten. Dieser bindet somit nicht an humane Megakaryozyten.

Anschließend wurde die Hypothese überprüft, daß die Bindung an murine Megakaryozyten durch Bindung an ein citrulliniertes Peptide entstände. Um dies weiter zu untersuchen, testeten wir unterschiedliche Anti-Citrullin-Antikörper, welche allerdings in Knochenmarktrepanaten entweder keinerlei Strukturen erkannten oder diese unspezifisch anfärbten. Dies wird als die oben genannte Hypothese falsifizierende Evidenz interpretiert.

Im Laufe dieser Arbeit ist es gelungen einen Western Blot und eine Immunpräzipitation zur Isolierung des gesuchten Antigens durchzuführen. Nach der Auftrennung der gewonnenen Proteinelution mittels Gelelektrophorese zeigten sich zwei auffällige Banden bei 50 kDa bzw. 150 kDa. Diese wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Kalbacher massenspektrometrisch analysiert und die Ergebnisse mit Prozeom-Datenbanken verglichen.

Die Analyse der größeren Bande von 150 kDa erbrachte dabei die größte Übereinstimmung mit Cullin5.

Cullin 5 ist ein wichtiger Baustein Cullin-abhängiger-Ligasen (CRLs), die für verschiedene zelluläre Regulationsprozesse verantwortlich sind. Desweiteren bildet es die zentrale verbindende Untereinheit in SOCS-Box-Proteinen, die eine inhibitorische Funktion auf Zytokin-induzierte Signalwege ausüben. Wie Laszlo und Cooper (2009) zeigen konnten, gehört Src zu diesen so kontrollierten Signalproteinen und kann durch Cullin 5 inhibiert werden (Laszlo and Cooper, 2009).

Die Familie der Src-Kinasen besteht aus acht Mitgliedern (Src, Yes, Fgr, Fyn, Lck, Lyn, Blk und Hck) und reguliert eine Vielzahl an Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und Migration (Brown and Cooper, 1996) (Thomas and Brugge, 1997). In Megakaryozyten zeigt sich eine besonders hohe Expression von Fyn und Lyn, deren Stimulation die TPO-induzierte Entwicklung von Megakaryozyten unterdrücken kann (Lannutti et al., 2003). TPO gilt als der wichtigste Regulator der Megakaryopoese und stimuliert sowohl die

Proliferation als auch die Differenzierung der Megakaryozyten, bei welcher der Endomitose eine besondere Rolle zukommt (Rojnuckarin et al., 1999). Die Inhibierung der genannten Src-Kinasen führt bei Megakaryozyten-Populationen zu einer vermehrten Proliferation, einer erhöhten Polyploidität und einer gesteigerten Expression der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK), die durch die Bindung von TPO an seinen Liganden Mpl aktiviert wird. Somit konnten Lannutti und Drachmann nachweisen, dass Src-Kinasen die Differenzierung von Megakaryozyten hemmen (Lannutti and Drachman, 2004). Cullin 5 würde demnach als Src-inhibierendes Protein zu einer verstärkten Differenzierung im Rahmen der Megakaryopoese führen, seine Expression in Megakaryozyten ist somit plausibel.

Bei der massenspektrometrischen Analyse der kleineren Bande von ungefähr 50kDa zeigte sich eine hohe Übereinstimmung mit der schweren Kette des verwendeten Kaninchenantikörpers. Eine Reanalyse lässt außerdem das Protein Ptpn13 vermuten.

Ptpn13 gehört zu der Familie der Protein Tyrosin Phosphatasen und ist ein Signalprotein, das an der Modulation vieler zellulärer Prozesse, wie Zellwachstum und Differenzierung, beteiligt ist (Abaan and Toretsky, 2008). Bereits 1996 wurde beschrieben, dass Protein Tyrosin Kinasen in der Lage sind in Hefe-Zellen die Aktivität von c-Src herabzusetzen (Superti-Furga et al., 1996). Src Kinasen können aufgrund ihrer wichtigen Regulationseigenschaften bei abnormer Aktivität protoonkogenetische Veränderungen in Zellen hervorrufen; Ptpn13 kann Src durch Dephosphorylierung inaktivieren und so eine maligne Zellentartung verhindern (Zhang et al., 2009). Wie Glondu-Lassis et al. zeigten, kommt es in Ptpn13-Knockout-Zellen zu einer unkontrollierten Zellproliferation (Glondu-Lassis et al., 2010). Somit kann angenommen werden, dass Ptpn13, genauso wie Cullin5, in megakaryozytären Zellen durch die Hemmung von Src die Differenzierung der Zelle fördert.

Um zu überprüfen, ob die identifizierten möglichen Antigene tatsächlich in Megakaryozyten exprimiert werden, wurden immunhistochemische Färbungen

von Knochenmarktrepanaten mit kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen Cullin5 und Ptpn13 durchgeführt. Beide Antigene konnten spezifisch in Megakaryozyten nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass der RAC-Antikörper linien- und speziesspezifisch an ein in murinen Megakaryozyten exprimiertes Zielantigen bindet, das im Rahmen dieser Arbeit in vielen seiner Eigenschaften charakterisiert, jedoch nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Bei dem gesuchten Antigen handelt es sich um das Protein Ptpn13 oder mit noch höherer Wahrscheinlichkeit um Cullin5. Beide Proteine finden sich spezifisch in murinen Megakaryozyten exprimiert, eine Funktion in der Regulation megakaryozytenspezifischer Zellteilungsvorgänge wie der Endomitose ist für beide Proteine denkbar.

6. Zusammenfassung

Bisher galten CD41 und CD61 (Alpha II- bzw. Beta III-Integrin) als klassische Marker thrombozytopoetischer Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch der Rabbit Anti-Citrulline Antikörper (in dieser Arbeit: „RAC“) der Firma Upstate (Cat.: #24232) murine Megakaryozyten linien- und speziesspezifisch erkennt.

Zum Nachweis dieser Tatsache wurden aus Black 6 Wildtypmäusen Knochmarkzellen gewonnen und mittels Lineage Cell Depletion die Megakaryozyten sowie deren Vorläuferzellen isoliert. Diese wurden mit X-Vivo 20 In Kultur genommen und mit Zytokinen (SCF und TPO) stimuliert, woraufhin es zu einer starken Proliferation und megakaryozytentypischen Endomitose der Zellen kam. Die Reinheit der gewonnenen Zellkulturen konnte zudem durchflusszytometrisch bestätigt werden.

In diversen immunhistochemischen und Immunfluoreszenz-Färbungen zeigte sich, dass der RAC-Antikörper an dieselben Zellstrukturen bindet wie die klassischen Marker CD41 und CD61. Die Expression in megakaryozytären Vorläuferzellen beginnt ungefähr zeitgleich mit dem Erscheinen von CD61 auf der Zelloberfläche.

Der RAC-Antikörper wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit citrullinierten Peptiden gewonnen. Da beim RAC-Antikörper eigentlich eine Speziesspezifität für Mensch angenommen werden sollte, wurden zunächst menschliche Zellen bzw. Gewebe auf Reaktivität getestet. Hier zeigte sich allerdings keine Bindung, so dass postuliert wurde, dass die Reaktion mit murinen Megakaryozyten eher eine zufällige Kreuzreaktion als eine spezifische Bindung an ein citrulliniertes Zielantigen mit Sequenzhomologie zur Vakzine widerspiegelt.

Weitergehende Untersuchungen zielten dementsprechend auf die Isolation der unbekanntes Zielstruktur in murinen Megakaryozyten ab. Hierzu kamen Western Blot sowie Immunpräzipitation zum Einsatz. Die hier gewonnenen

neuen Banden wurden nachfolgend massenspektrometrisch analysiert. Beim Abgleich der Ergebnisse mit Proteom-Datenbanken zeigte sich die höchste Übereinstimmung mit Cullin5 und Ptpn13. Beide Proteine sind bisher nicht in Megakaryozyten beschrieben. Aufgrund ihrer regulativen Funktionen im Zusammenhang mit Zellproliferation und –differenzierung ist es prinzipiell denkbar, dass sie die Endomitose regulieren und deshalb in Megakaryozyten spezifisch exprimiert gefunden werden. Beide Proteine konnten in immunhistochemischen Färbungen in Megakaryozyten nachgewiesen werden, die endgültige Unterscheidung gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht.

Zusammenfassend kreuzreagiert der untersuchte Rabbit anti-Human Citrullin Antikörper mit einer spezifisch in murinen Megakaryozyten exprimierten Zielstruktur. Es handelt sich entweder um Ptpn13 oder Cullin5.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Stammbaum der Hämatopoese.	3
Abbildung 1. 2. Citrullinierung durch die Peptidyl-Arginin-Deiminase 4.....	12
Abbildung 3.1. Immunpräzipitation	32
Abbildung 4.1. Zytozentrifugenpräperat, murines KM, 100x vergrößert	34
Abbildung 4.2. MACS-Seperation	35
Abbildung 4.3. Lineage-negative Zellpoulation 200x vergrößert.....	37
Abbildung 4.4. FACS-Messung der isolierten murinen Knochenmarkzellen, Tag 4	38
Abbildung 4.5. Histogramm der FACS-Messung, Tag 4.....	39
Abbildung 4.6. Murines KM, immunhistochemisch gefärbt	41
Abbildung 4.7. Immunhistochemisch gefärbter muriner Megakaryozyt, 200x vergrößert.....	42
Abbildung 4.8. Zytozentrifugenpräperat, immunzytochemisch gefärbt, 100x vergrößert,	44
Abbildung 4.9. Zytozentrifugenpräparat, immunzytochemisch gefärbt, 200x vergr., 24h	45
Abbildung 4.10. Phasen der Megakaryopoese	46
Abbildung 4.11. Megakaryozyt nach Immunfluoreszenzfärbung	47
Abbildung 4.12. Humane Megakaryozyten (Meg-01) in Kultur, 200x vergrößert.....	48
Abbildung 4.13. humane Megakaryozyten CD45-negativ, Tag 10, 200x vergrößert.....	49
Abbildung 4.14. murine Megakaryozyten, Tag 5, 200x vergrößert, Positivkontrolle.....	49
Abbildung 4.15. humane Megakaryozyten CD45-negativ, Tag 7, 200x vergrößert, Negativkontrolle.....	49
Abbildung 4.16. humanes Knochenmark. Immunhistochemisch gefärbt	50
Abbildung 4.17. Murines Knochenmarkschnitte, 100x vergrößert, immunhistochemisch gefärbt	51
Abbildung 4.18. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Spektralphotometer	52
Abbildung 4.19. Röntgenfilm nach Western Blot.....	53
Abbildung 4.20. Silberfärbung eines Acrylamid-Gels nach Immunpräzipitation	55
Abbildung 4.21. Massenspektrometrische Auftrennung der Bande A (150kDa).....	56
Abbildung 4.22. Überprüfung der Ergebnisse der Massenspektrometrie für die Bande A	57
Abbildung 4.0.23. Massenspektrometrische Auftrennung der Bande B (50kDa).....	58
Abbildung 4.24. Überprüfung der Ergebnisse der Massenspektrometrie für die Bande A	59
Abbildung 4.25. Knochenmarkschnitte, immunhistochemisch gefärbt, 100x vergrößert	60

8. Literaturliste

Abaan,O.D., andJ.A.Toretsky. 2008. PTPL1: a large phosphatase with a split personality. *Cancer Metastasis Rev.* 27:205-214.

Banu,N., J.F.Wang, B.Deng, J.E.Groopman, and H.Avraham. 1995. Modulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin: the c-Mpl ligand. *Blood* 86:1331-1338.

Becker,R.P., andP.P.H.Debruyn. 1976. Transmural Passage of Blood-Cells Into Myeloid Sinusoids and Entry of Platelets Into Sinusoidal Circulation - Scanning Electron-Microscopic Investigation. *American Journal of Anatomy* 145:183-205.

Behnke,O. 1968. An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J. Ultrastruct. Res.* 24:412-433.

Bradford,M.M. 1976a. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Bradford,M.M. 1976b. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brewer,D.B. 2006. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br. J. Haematol.* 133:251-258.

Brodsky,W.Y., andI.V.Uryvaeva. 1977. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *Int. Rev. Cytol.* 50:275-332.

Brown,M.T., andJ.A.Cooper. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* 1287:121-149.

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

Coenen,D., P.Verschueren, R.Westhovens, and X.Bossuyt. 2007. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin. Chem.* 53:498-504.

Cramer,E.M., F.Norol, J.Guichard, J.Breton-Gorius, W.Vainchenker, J.M.Masse, and N.Debili. 1997. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood* 89:2336-2346.

Crispino,J.D. 2005. GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16:137-147.

Daimon,T., andY.Gotoh. 1982. Cytochemical evidence of the origin of the dense tubular system in the mouse platelet. *Histochemistry* 76:189-196.

Darnell,J.E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.

de Botton,S., S.Sabri, E.Daugas, Y.Zermati, J.E.Guidotti, O.Hermine, G.Kroemer, W.Vainchenker, and N.Debili. 2002. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 100:1310-1317.

- de Sauvage, F.J., P.E.Hass, S.D.Spencer, B.E.Malloy, A.L.Gurney, S.A.Spencer, W.C.Darbonne, W.J.Henzel, S.C.Wong, W.J.Kuang, and . 1994. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369:533-538.
- Deshaies, R.J., and C.A.Joazeiro. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 78:399-434.
- Gerrard, J.M., J.G.White, G.H.Rao, and D.Townsend. 1976. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am. J. Pathol.* 83:283-298.
- Glondou-Lassis, M., M.Dromard, M.Lacroix-Triki, P.Nirde, C.Puech, D.Knani, D.Chalbos, and G.Freiss. 2010. PTPN13 regulates breast cancer cell aggressiveness through direct inactivation of Src kinase. *Cancer Res.* 70:5116-5126.
- Gordon, M.S., and R.Hoffman. 1992. Growth factors affecting human thrombocytopoiesis: potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood* 80:302-307.
- Greenhalgh, C.J., and D.J.Hilton. 2001. Negative regulation of cytokine signaling. *J. Leukoc. Biol.* 70:348-356.
- Hagiwara, T., K.Nakashima, H.Hirano, T.Senshu, and M.Yamada. 2002. Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:979-983.
- Heijnen, H.F., N.Debili, W.Vainchencker, J.Breton-Gorius, H.J.Geuze, and J.J.Sixma. 1998. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood* 91:2313-2325.
- Ihle, J.N. 1995. Cytokine receptor signalling. *Nature* 377:591-594.
- Ihle, J.N., B.A.Witthuhn, F.W.Quelle, K.Yamamoto, and O.Silvennoinen. 1995. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 13:369-398.
- Italiano, J.E., P.Lecine, R.A.Shivdasani, and J.H.Hartwig. 1999. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *Journal of Cell Biology* 147:1299-1312.
- Italiano, J.E., Jr., and R.A.Shivdasani. 2003. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J. Thromb. Haemost.* 1:1174-1182.
- Jelkmann, W. 2001. The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13:791-801.
- Kamura, T., K.Maenaka, S.Kotoshiba, M.Matsumoto, D.Kohda, R.C.Conaway, J.W.Conaway, and K.I.Nakayama. 2004. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev.* 18:3055-3065.
- Kanz, L., R.Mielke, and A.A.Fauser. 1988. Analysis of human hemopoietic progenitor cells for the expression of glycoprotein IIIa. *Exp. Hematol.* 16:741-747.
- Kaushansky, K. 2008. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 111:981-986.
- Kelemen, E., I.Cserhati, and B.Tanos. 1958. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol.* 20:350-355.

- Kojima,H., A.Shinagawa, S.Shimizu, H.Kanada, M.Hibi, T.Hirano, and T.Nagasawa. 2001. Role of phosphatidylinositol-3 kinase and its association with Gab1 in thrombopoietin-mediated up-regulation of platelet function. *Exp. Hematol.* 29:616-622.
- Kopp,H.G., A.T.Hooper, M.J.Broekman, S.T.Avecilla, I.Petit, M.Luo, T.Milde, C.A.Ramos, F.Zhang, T.Kopp, P.Bornstein, D.K.Jin, A.J.Marcus, and S.Rafii. 2006. Thrombospondins deployed by thrombopoietic cells determine angiogenic switch and extent of revascularization. *J. Clin. Invest* 116:3277-3291.
- Kubilus,J., R.F.Waitkus, and H.P.Baden. 1980. Partial purification and specificity of an arginine-converting enzyme from bovine epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* 615:246-251.
- Lambertsen,R.H., andL.Weiss. 1984. A model of intramedullary hematopoietic microenvironments based on stereologic study of the distribution of endocloned marrow colonies. *Blood* 63:287-297.
- Lannutti,B.J., andJ.G.Drachman. 2004. Lyn tyrosine kinase regulates thrombopoietin-induced proliferation of hematopoietic cell lines and primary megakaryocytic progenitors. *Blood* 103:3736-3743.
- Lannutti,B.J., M.H.Shim, N.Blake, J.A.Reems, and J.G.Drachman. 2003. Identification and activation of Src family kinases in primary megakaryocytes. *Exp. Hematol.* 31:1268-1274.
- Laszlo,G.S., andJ.A.Cooper. 2009. Restriction of Src activity by Cullin-5. *Curr. Biol.* 19:157-162.
- Lee,J., andP.Zhou. 2010. Cullins and Cancer. *Genes Cancer* 1:690-699.
- Levine,R.F., P.A.Bunn, Jr., K.C.Hazzard, and M.L.Schlam. 1980. Flow cytometric analysis of megakaryocyte ploidy. Comparison with Feulgen microdensitometry and discovery that 8N is the predominant ploidy class in guinea pig and monkey marrow. *Blood* 56:210-217.
- Levine,R.F., A.Eldor, P.K.Shoff, S.Kirwin, D.Tenza, and E.M.Cramer. 1993. Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur. J. Haematol.* 51:233-246.
- Mohle,R., H-G.K., L.K. 2010. Thrombozytopoese. p. 29-40. *Hämostaseologie*.
- Mohle,R., F.Bautz, S.Rafii, M.A.Moore, W.Brugger, and L.Kanz. 1999. Regulation of transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 872:176-185.
- Murone,M., D.A.Carpenter, and F.J.de Sauvage. 1998. Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. *Stem Cells* 16:1-6.
- Nakashima,K., T.Hagiwara, and M.Yamada. 2002. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J. Biol. Chem.* 277:49562-49568.
- Nakorn,T.N., T.Miyamoto, and I.L.Weissman. 2003. Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:205-210.
- Nerlov,C., andT.Graf. 1998. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 12:2403-2412.
- Odell,T.T., Jr., C.W.Jackson, and T.J.Friday. 1970. Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy. *Blood* 35:775-782.
- Ogawa,M., T.Suda, and J.Suda. 1984. Differentiation and proliferative kinetics of hemopoietic stem cells in culture. *Prog. Clin. Biol. Res.* 148:35-43.

- Ogura, M., Y. Morishima, R. Ohno, Y. Kato, N. Hirabayashi, H. Nagura, and H. Saito. 1985. Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 66:1384-1392.
- Passegue, E., C. H. Jamieson, L. E. Ailles, and I. L. Weissman. 2003. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 Suppl 1:11842-11849.
- Passier, R., and C. Mummery. 2003. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc. Res.* 58:324-335.
- Petroski, M. D., and R. J. Deshaies. 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:9-20.
- Phillips, D. R., L. Fitzgerald, L. Parise, and B. Steiner. 1992. Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex: purification, characterization, and reconstitution into phospholipid vesicles. *Methods Enzymol.* 215:244-263.
- Rabellino, E. M. 1984. Biology of human megakaryocytes: recent developments. *Prog. Hemost. Thromb.* 7:151-166.
- Rabellino, E. M., R. L. Nachman, N. Williams, R. J. Winchester, and G. D. Ross. 1979. Human megakaryocytes. I. Characterization of the membrane and cytoplasmic components of isolated marrow megakaryocytes. *J. Exp. Med.* 149:1273-1287.
- Radley, J. M., and C. J. Haller. 1982. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* 60:213-219.
- Radley, J. M., and C. J. Haller. 1983. Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br. J. Haematol.* 53:277-287.
- Raslova, H., L. Roy, C. Vourc'h, J. P. Le Couedic, O. Brison, D. Metivier, J. Feunteun, G. Kroemer, N. Debili, and W. Vainchenker. 2003. Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood* 101:541-544.
- Rogers, G. E. 1962. Occurrence of citrulline in proteins. *Nature* 194:1149-1151.
- Rojnuckarin, P., J. G. Drachman, and K. Kaushansky. 1999. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood* 94:1273-1282.
- Rojnuckarin, P., and K. Kaushansky. 2001. Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha. *Blood* 97:154-161.
- Sato, T., S. Irie, S. Kitada, and J. C. Reed. 1995. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268:411-415.
- Scheding, S., M. Bergmann, A. Shimosaka, P. Wolff, C. Driessen, G. Rathke, K. Jaschonek, W. Brugger, and L. Kanz. 2002. Human plasma thrombopoietin levels are regulated by binding to platelet thrombopoietin receptors in vivo. *Transfusion* 42:321-327.
- Shivdasani, R. A., Y. Fujiwara, M. A. McDevitt, and S. H. Orkin. 1997. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* 16:3965-3973.

- Shivdasani,R.A., M.F.Rosenblatt, D.Zucker-Franklin, C.W.Jackson, P.Hunt, C.J.Saris, and S.H.Orkin. 1995. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* 81:695-704.
- Smith,M.A., Court EL, and J.G.Smith. 2001. Stem cell factor: laboratory and clinical aspects. *Blood Rev.* 15:191-197.
- Souyri,M., I.Vigon, J.F.Penciolelli, J.M.Heard, P.Tambourin, and F.Wendling. 1990. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 63:1137-1147.
- Spangrude,G.J., S.Heimfeld, and I.L.Weissman. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241:58-62.
- Superti-Furga,G., K.Jonsson, and S.A.Courtneidge. 1996. A functional screen in yeast for regulators and antagonizers of heterologous protein tyrosine kinases. *Nat. Biotechnol.* 14:600-605.
- Tavassoli,M., andM.Aoki. 1981. Migration of entire megakaryocytes through the marrow--blood barrier. *Br. J. Haematol.* 48:25-29.
- Tavassoli,M., andM.Aoki. 1989. Localization of Megakaryocytes in the Bone-Marrow. *Blood Cells* 15:3-14.
- Terstappen,L.W., S.Huang, M.Safford, P.M.Lansdorp, and M.R.Loken. 1991. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+. *Blood* 77:1218-1227.
- Thomas,S.M., andJ.S.Brugge. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:513-609.
- Trowbridge,E.A., J.F.Martin, D.N.Slater, Y.T.Kishk, C.W.Warren, P.J.Harley, and B.Woodcock. 1984. The origin of platelet count and volume. *Clin. Phys. Physiol Meas.* 5:145-170.
- Tsai,F.Y., G.Keller, F.C.Kuo, M.Weiss, J.Chen, M.Rosenblatt, F.W.Alt, and S.H.Orkin. 1994. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371:221-226.
- Tsai,F.Y., andS.H.Orkin. 1997. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 89:3636-3643.
- Vossenaar,E.R., S.Nijenhuis, M.M.Helsen, H.A.van der, T.Senshu, W.B.van den Berg, W.J.van Venrooij, and L.A.Joosten. 2003a. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48:2489-2500.
- Vossenaar,E.R., A.J.Zendman, W.J.van Venrooij, and G.J.Pruijn. 2003b. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25:1106-1118.
- Walma,T., J.Aelen, S.B.Nabuurs, M.Oostendorp, B.L.van den, W.Hendriks, and G.W.Vuister. 2004. A closed binding pocket and global destabilization modify the binding properties of an alternatively spliced form of the second PDZ domain of PTP-BL. *Structure.* 12:11-20.
- Wansink,D.G., W.Peters, I.Schaafsma, R.P.Sutmuller, F.Oerlemans, G.J.Adema, B.Wieringa, C.E.van der Zee, and W.Hendriks. 2004. Mild impairment of motor nerve repair in mice lacking PTP-BL tyrosine phosphatase activity. *Physiol Genomics* 19:50-60.

Weissman, I.L., D.J. Anderson, and F. Gage. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:387-403.

Wendling, F., P. Varlet, M. Charon, and P. Tambourin. 1986. MPLV: a retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemic disorder in adult mice. *Virology* 149:242-246.

Yang, L., D. Bryder, J. Adolfsson, J. Nygren, R. Mansson, M. Sigvardsson, and S.E. Jacobsen. 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.

Young, J.C., E. Bruno, K.M. Luens, S. Wu, M. Backer, and L.J. Murray. 1996. Thrombopoietin stimulates megakaryocytopoiesis, myelopoiesis, and expansion of CD34+ progenitor cells from single CD34+Thy-1+Lin- primitive progenitor cells. *Blood* 88:1619-1631.

Zauli, G., M. Vitale, E. Falcieri, D. Gibellini, A. Bassini, C. Celeghini, M. Columbaro, and S. Capitani. 1997. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood* 90:2234-2243.

Zeigler, F.C., F. de Sauvage, H.R. Widmer, G.A. Keller, C. Donahue, R.D. Schreiber, B. Malloy, P. Hass, D. Eaton, and W. Matthews. 1994. In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. *Blood* 84:4045-4052.

Zhang, Y., Y. Tu, J. Zhao, K. Chen, and C. Wu. 2009. Reversion-induced LIM interaction with Src reveals a novel Src inactivation cycle. *J. Cell Biol.* 184:785-792.

Zipori, D. 2010. The hemopoietic stem cell niche versus the microenvironment of the multiple myeloma-tumor initiating cell. *Cancer Microenviron.* 3:15-28.

9. Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum von März 2008 bis Mai 2011 in der Abteilung Onkologie, Hämatologie, Rheumatologie, Immunologie und Pulmologie der Eberhard-KarlsUniversitätsklinik Tübingen unter Leitung des Ärztlichen Direktors Professor Dr. L. Kanz. Dies wäre ohne die Unterstützung, den Rat und die Geduld zahlreicher Personen nicht möglich gewesen, bei denen ich mich im Nachfolgenden herzlich bedanken möchte.

Herr Professor Salih und Herr Professor Handgretinger erklärten sich freundlicherweise bereit, sich als Berichterstatter für die vorliegende Arbeit zur Verfügung zu stellen, ihnen gebührt mein ganz besonderer Dank.

Herr Dr. Kalbacher und seine Arbeitsgruppe des Medizinisch-naturwissenschaftlichen Forschungszentrums der Universität Tübingen führten die massenspektrometrischen Analysen der gewonnenen Proteinbanden durch, wofür ich mich sehr bedanken möchte.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Hans-Georg Kopp, seine Begeisterung und sein Enthusiasmus haben mich immer wieder aufs Neue motiviert und ohne seine wertvollen Hinweise und Anregungen wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Danke dir, Hans-Georg.

Zudem möchte ich mich bei Frau Tina Wiesner und Frau Elke Malenke bedanken, die mir mit Rat und Tat unermüdlich zur Seite standen und mit ihrem Wissen, ihrer Hilfe und Kritik maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Der gesamten Arbeitsgruppe AG Kopp danke ich für das supernette Arbeitsklima, die vielen Gespräche über mehr oder minder wissenschaftliche Themen, vom Erklären labortechnischer Methoden bis hin zur Einführung in virtuellen Gartenbau, für Kaffee und Kekse und für die lustigen Laborstammtisch-Abende!

Zuletzt möchte ich hier meine Familie und Freunde erwähnen, die stets für mich da sind und mir in allen Phasen meines Lebens zur Seite stehen. Ohne eure liebevolle Unterstützung, eure Geduld und Kraft wäre ich nicht dort, wo ich heute bin.