

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main
Med. Klinik II Hämatologie
(Ärztlichen Direktor: Prof. Dr. med. D. Hoelzer)

und

dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
DRK Blutspendedienst
Frankfurt am Main
(Ärztlichen Direktor: Prof. Dr. med. E. Seifried)

Homingverhalten von normalen und leukämischen hämatopoetischen Progenitorzellen

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe Universität zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Roxana Bistran
aus Deva, Rumänien

Frankfurt am Main, 2006

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Tag der Prüfung: 04.12.2007

Erster Prüfer: Prof. Dr. med. Jens Gille

Zweiter Prüfer: Prof. Dr. Prakasch Chandra

Dritter Prüfer: Prof. Dr. med. Erhard Seifried

Vierter Prüfer: Pd. Dr. med. Hans Martin

INHALTSVERZEICHNIS

1.0 Einführung	5
1.1 Hämatopoese	5
1.2 Knochenmark- und Stammzelltransplantation.....	6
1.3 Homing transplanteder Stammzellen.....	7
1.4 Das Auftreten von Stammzellen in unterschiedlichen Organen.....	7
1.5 Interaktion hämatopoetischer Stammzellen mit Endothelzellen	8
2.0 Fragestellung	9
3.0 Materialien und Methoden	10
3.1 Chemikalien und Reagenzien.....	10
3.2 Zellen.....	11
3.3 Durchflussskammer.....	12
Isolierung von Plättchen-Mikropartikeln (PMP).....	14
Adhäsion von HPC an humanes Fibronectin.....	15
Kompetitive hämatopoetische Repopulation in Mäusen.....	15
Intravitale Mikroskopie.....	17
4.0 Ergebnisse	19
4.1 Nachweis von repopulierenden Stammzellen in verschiedenen Organen nach Knochenmark-Transplantation durch kompetitive Repopulation in Mäusen.....	19
4.2 Interaktion hämatopoetischer Vorläuferzellen mit Endothelzellen unter Scherdruck.....	23
4.3 Bedeutung von Plättchen-Mikropartikeln (PMP) für Interaktionen von HPC mit Endothelzellen unter Flussbedingungen.....	28
4.4 Interaktion von Blasten der akuten myeloischen Leukämie (AML) mit Endothelzellen über Selektin-Bindungen.....	37
5.0 Diskussion	47
5.1 Homingverhalten repopulierender Zellen nach Transplantation in Mäuse.....	47
5.2 Adhäsionsverhalten hämatopoetischer Vorläuferzellen an Endothelzellen.....	49
5.3 Bedeutung von Plättchen-Mikropartikeln (PMP) für die Interaktion von hämatopoetischer Vorläuferzellen mit Endothel unter Flussbedingungen	50
6.0 Zusammenfassung	52
7.0 Literatur	53

1. Einführung

1.1 Hämatopoese

Jeder Mensch bildet täglich etwa eine halbe Billion (10^{12}) neue Zellen des Blutes. Dieser kontinuierliche Erneuerungsprozess wird von einer relativ kleinen Population primitiver Knochenmarkszellen bewerkstelligt, den hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, sich einerseits immer wieder durch Zellteilung selbst zu erneuern, andererseits determinierte Progenitorzellen (HPC) abzugeben, die weiter in verschiedene Zellreihen differenzieren¹. In den 1970er und 1980er Jahren erkannte man, dass unterschiedliche primitive hämatopoetische Vorläuferzellen (HPC) ein limitiertes Selbsterneuerungspotential besitzen und zur weiteren Differenzierung in jeweils nur eine "uni-lineage" oder mehrere "multi-lineage" Zellreihen imstande sind. Das folgende Schema ordnet Stammzellen und verschiedene Linien-determinierte Vorläuferzellen entsprechend ihrer Stellung in der Reifungshierarchie² (siehe Abb. 1).

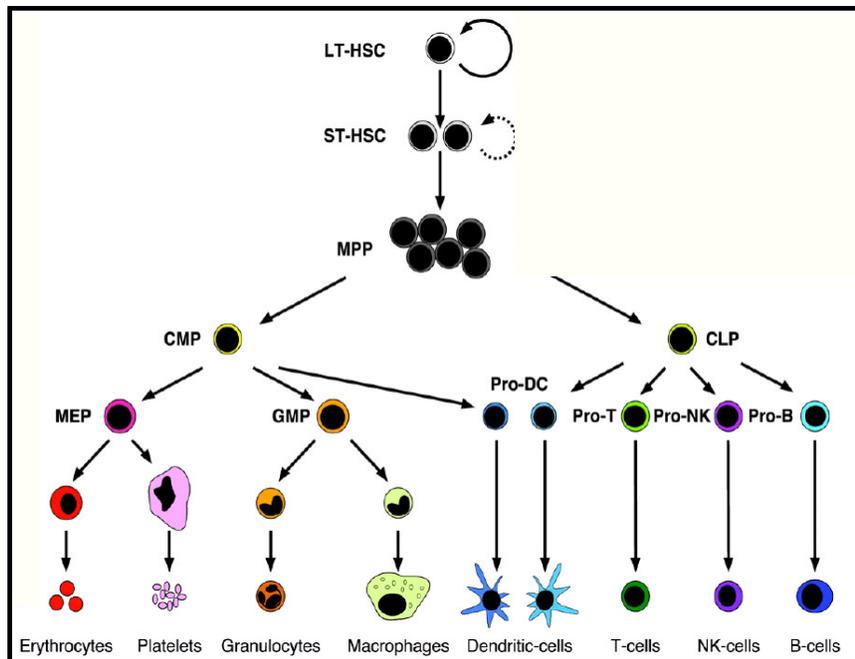


Abb. 1 Schema der hämatopoetischen Hierarchie ausgehend von den Stammzellen bis zu reifen Blutzellen nach Passegue et al. LT-HSC: Langzeit repopulierende hämatopoetische Stammzellen; ST-HSC: Kurzzeit repopulierende hämatopoetische Stammzellen; MPP: Multipotente Progenitorzellen; CMP: gemeinsame myeloische Progenitorzellen; CLP: gemeinsame lymphatische Progenitorzellen; MEP: Megakaryozytär-erythrozytäre Progenitorzellen; GMP: Granulozyten-Macrophagen Progenitorzellen; Pro-DC: Pro-Dendritische Zellen; Pro-T: Pro-T Zellen; Pro-NK: Pro-Natural-Killer Zellen; Pro-B: Pro-B Zellen. Nach Passegue et al².

Ausgehend von der Nachweismöglichkeit sogenannter Kolonie-bildender linien-determinierter Progenitorzellen in Weichagarkulturen ("Colony Forming Cells", CFC) wurden verschiedene hämatopoetische Wachstumsfaktoren ("Colony-Stimulating Factors, CSF") entdeckt und beschrieben, die typischerweise jeweils auf 1 – 2 Zellreihen der Hämatopoese wirken. Sie bewirken dort die Proliferation und schließlich die terminale Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen. So wird in Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GM-CFC) die Ausdifferenzierung zu reifen Monozyten und Granulozyten durch G-CSF und M-CSF stimuliert; Erythropoetin (EPO) unterstützt die Erythropoese, Thrombopoetin (TPO) die Thrombopoese ¹. Zusätzlich zu CSFs wurden verschiedene Faktoren charakterisiert, die selbst keine Koloniebildung induzieren, die jedoch mit CSFs synergistisch wirken wie z.B. Stammzellefaktor (SCF), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) ³.

Dexter und Mitarbeiter charakterisierten darüber hinaus 1977 die Methode der "Knochenmark-Langzeitkulturen" (LTC) ^{4,5} und wiesen die Fähigkeit dieser Kulturen nach, HSC über Zeiträume von 4-6 Wochen in Gegenwart adhärenter Stromazellen in Kultur am Leben zu erhalten ⁶. Später wurde nachgewiesen, dass Knochenmark-Stromazellen in den LTC hämatopoetische Wachstumsfaktoren auf ihrer Oberfläche präsentieren. Das hämatopoetisch aktive Stroma wurde als so genanntes hämatopoetisches "Micro-Environment" charakterisiert ⁷.

1.2 Knochenmark- und Stammzelltransplantation

Von Bekkum gelang es 1957 ⁸, das hämatopoetische System von Mäusen durch Vorbestrahlung der Empfängermäuse selektiv zu vernichten und durch ein transplantiertes syngenes Hämatopoesesystem abzulösen. Seit Ende der 1950er Jahre versuchten Thomas und Storb kontinuierlich, zunächst in Hunden und immer wieder auch in Patienten, Individuen mit Leukämien dadurch zu heilen, dass nach dem Prinzip der Knochenmark-Transplantation zunächst das maligne hämatopoetische System durch eine Ganzkörperbestrahlung oder eine Hochdosis-Chemotherapie eradiziert wurde und anschließend ein gesundes allogenes Donor-Hämatopoesesystem transplantiert wurde. Jedoch gelang erst nach der systematischen Erarbeitung der wesentlicher sogenannten Histokompatibilitäts-Antigene die erfolgreiche Transplantation von Knochenmark-Stammzellen, für die E.D. Thomas im Jahre 1990 den Nobelpreis für Medizin erhielt ⁹⁻¹¹. Es war hierdurch erstmals möglich geworden, Erwachsene mit hämatologischen Neoplasien systematisch zu heilen. Eine wesentliche Erweiterung dieses Verfahrens ergab sich durch die Möglichkeit, Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut zu mobilisieren ^{12, 13, 14}. Heute stellt die Mobilisierung blutbildender Stammzellen durch den Wachstumsfaktor G-CSF in Kontinentaleuropa die häufigste Art der Stammzell-gewinnung zur hämatopoetischen Transplantation dar.

1.3 Homing transplanterter Stammzellen

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation erfolgt typischerweise durch die intravenöse Injektion von Stamm- und Vorläuferzellen. Diese Zellen finden dann selbständig ihren Weg in die hämatopoetischen Organe. Überraschenderweise finden sich im Tiermodell in den klassischen hämatopoetischen Organen Knochenmark und Milz jedoch nur einige wenige Prozent der injizierten Zellen wieder^{15,16}. Silvassy et al¹⁷ beobachteten, dass *ex vivo* manipulierte Stammzellen gegenüber frisch isolierten Zellen eine noch weiter reduzierte Effizienz des Homings ins Knochenmark aufweisen. Quesenberry¹⁸ und Szilvassy¹⁹ beschrieben dass hochaufgereinigte Linienmarker-negative (lin⁻) Stammzellantigen (Sca-1)-tragende Vorläuferzellen mit sehr geringer Effizienz ins Knochenmark einwandern, und zwar überwiegend in die Epiphysen-Regionen, benachbart zu Osteoblasten.

1.4 Lokalisation von Stammzellen in unterschiedlichen Organen

Hämatopoetische Stammzellen sind durch die Fähigkeit der Selbsterneuerung charakterisiert. Das bedeutet, daß sie nach einer seriellen Transplantation in bestrahlte Empfängermäuse die Hämatopoese re-initiiieren können. Das von Szilvassy beschriebene System der kompetitiven Repopulation syngener Mäuse, bei denen ein Polymorphismus im CD45(Ly 5)-Gen vorliegt, kann verwendet werden, um hämatopoetische Stammzellen nach Transfusion zu quantifizieren²⁰. Als Langzeit-rekonstituierende Stammzellen (LT-HSC) werden die Stammzellen klassifiziert, die über einen Zeitraum von ca. 6 Monaten eine Donorhämatopoese aufrecht erhalten. Im Gegensatz dazu unterstützen sogenannte Kurzzeit-repopulierende Stammzellen (ST-HSC) die hämatopoetische Rekonstitution über 4 Wochen bis 3 Monate. Überraschend fand man gegen Ende der 1990er Jahre auch Stammzellen für andere Gewebe im Knochenmark. Umgekehrt fanden sich hämatopoetische Stammzellen auch außerhalb des Knochenmarks in verschiedenen anderen Organsystemen, wenn auch mit weit geringerer Frequenz²¹. Von so genannter "Plastizität" der Stammzellen spricht man, wenn aus einem Gewebe stammende hämatopoetische Stammzellen nach Transplantation im Empfängerorganismus zu Zellen anderer Gewebe ausreifen. Dabei wurde sowohl die Transdifferenzierung hämatopoetischer Stammzellen in verschiedene nicht-hämatopoetische Gewebe wie auch das Vorkommen hämatopoetischer Stammzellen in nicht hämatopoetischen Geweben beschrieben^{22, 23, 24, 25}.

1.5 Interaktion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen mit Endothelzellen

Einen wesentlichen Schritt für ein gewebespezifisches "Homing" als Grundlage einer erfolgreichen hämatopoetischen Rekonstruktion stellten die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Timothy Springer in Boston^{26,27} in den 1990er Jahren an Leukozyten dar. Diese Autoren zeigten, dass der initiale Kontakt im Blut strömender Leukozyten in einem so genannten "Tethering" besteht, bei dem auf dem Endothel entlang rollende Zellen mit sogenannten "Selektinen" der Endothelzellen in Wechselwirkung treten. Dieses wurde als "Rolling" der Leukozyten am Gefäßendothel bezeichnet²⁷. Weiterhin wurde gezeigt, dass Immunzellen über Integrin-Rezeptoren an Endothelzellen binden. Dies resultiert in einer festen Adhäsion. Schließlich sind es dann Chemokin-Rezeptoren, mit Hilfe derer offenbar die gerichtete Transmigration durch das aktivierte Endothel in ein Zielgewebe induziert wird²⁶ (siehe Abb. 1.2).

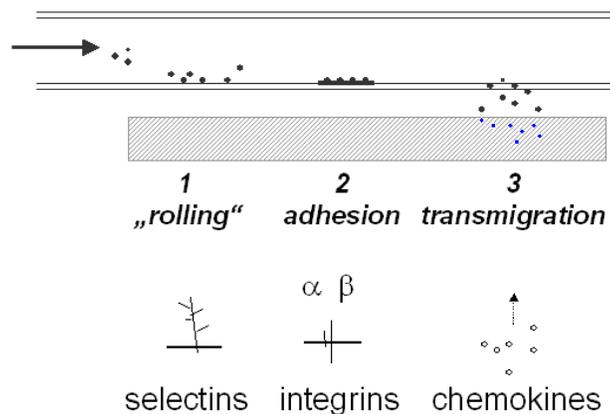


Abb 1.2 Darstellung des 3-Phasen-Extravasationsmodells von Leukozyten durch Gefäßendothelzellen. (Modifiziert nach Springer et al, 1995).

Durch die differenzielle Expression bestimmter Selektine und Selektinliganden, Integrine sowie Chemokin-Rezeptoren auf den Leukozyten und Endothel-ständigen Chemokinen lässt sich das gerichtete Homing-Verhalten verschiedener Zellpopulationen des Immunsystems erklären, wie z.B. die von Leukozyten, B-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen in spezifische Areale des Thymus, Lymphknotens, der Milz oder der Haut.

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie verteilen sich repopulierende hämatopoetische Stammzellen auf verschiedene Organen und Gewebe nach Transplantation in letal bestrahlte Mäuse? Hierzu sollte ein Kurzzeit-Repopulationsmodell der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen in C57/BL6 Mäusen etabliert werden, die Stammzellen aus den transplantierten Organen isoliert und angereichert werden, und ihr Transplantationspotential durch sekundäre kompetitive Repopulation nach Retransplantation in Ly 5.1/5.2 Mausmodell erfasst werden.

2. Die Wechselwirkungen von HPC mit aktivierten Endothelzellen sollten unter Flussbedingungen charakterisiert werden und involvierte Adhäsionsmoleküle identifiziert werden.

3. In dem *in vitro* Durchflussskammermodell sollte der Einfluß von Plättchenmikropartikeln auf das Adhäsionsverhalten von HPC an Endothelzellen charakterisiert werden. Hierzu sollten die eingesetzten Plättchenmikropartikeln aufgereinigt und von Plättchen getrennt werden.

4. Der Einfluss von Selektinmolekülen auf das Interaktionsverhalten von leukämischen Blastenpopulationen mit Endothelzellen sollte unter Flussbedingungen charakterisiert werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Zellkulturmedien und Seren: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) und RPMI Kulturmedium, jeweils mit Zusatz vom L-Glutamin, wurden von der Firma GIBCO (Paisley, UK) bezogen. Vorselektierte Chargen von Pferdeserum und fetalem Kälberserum (FBS) stammten von Perbio-Science GmbH (Bonn). Endothelzellkultur-Medium mit Supplementen (FBS 2%, Hydrocortison w/v 0,04%, h FGF-B 2 ml, VEGF 0,5 ml, IGF-1 0,5 ml, h EGF 0,5 ml, Heparin 0,5 ml, Ascorbic Säure 0,5 ml, GA-1000 0,5 ml) wurden von der Firma Clonetics (Cottonwood, USA) benutzt.

Zytokine: Rekombinantes (r) murines (m) Interleukin (IL)-3, rm IL-6, rm-Stammzellfaktor (SCF) rm-Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), rm Thrombopoetin (TPO), rh FLT3 Ligand, sowie rh Tumor-Nekrosefaktor (TNF)- α wurden von der Firma R&D -Systems GmbH, Wiesbaden, bezogen.

Antikörper: Die mit Fluorescein (FITC)-konjugierten Antikörper gegen humanes CD61, humanes CD45, sowie eine IgG₁ Kontrolle, sowie die mit Phycoerythrin (PE)-konjugierten Antikörper gegen humanes CD34 sowie IgG_{2a} und Annexin V wurden von der Firma BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, bezogen. FITC-konjugierte Antikörper gegen murines Ly 5.2 (Klon 104) sowie Ly 5.1 (Klon 30-FF) und Ratten Anti-Maus IgG_{2a} kappa (Klone R35-95), sowie PE-konjugiertes Ratten-Antimaus IgG_{2b} (Klone A 95-1), Anti-Maus CD45.1 (Klone A20), Anti-Maus TER 119, CD45R (E220, Klone RA3-6B2), Mac1 (CD11b, Klon M1/70), Gr-1 (RB6-8C5) wurden von Pharmingen, Heidelberg, erworben. Magnetisierbare Mikro-Beads gekoppelte Antikörper zur selektiven Anreicherung von CD34⁺-Zellen stammten von Milteny Biotech (Bergisch-Gladbach). Mikro-Beads zur Kalibrierung des durchflusszytometrische Analysen (TRUE COUNT) stammten von BD Bioscience. Als blockierende Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle wurden Anti P-Selektin (Klon AK4, BD Bioscience, Heidelberg), und Anti E-Selektin (BBA2, R&D-Systems GmbH, Wiesbaden) verwendet.

Weitere Reagenzien: Biocoll Trennlösung wurde von der Biochrom AG, Berlin, Dimethylsulfoxid (DMSO), PKH26 Vitalfarbstoff sowie Magnesium Chlorid (MgCl₂) wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Dextran 40 von der Apotheke des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, DNase I von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 1%-Trypsinlösung von der Firma GIBCO, (Paisley, UK), bezogen. Humanes Fibronectin, v/w 0,5% in PBS Gelatine, Penicillin/Streptomycin, Ionomycin A, TNF- α sowie Paraformaldehyd wurden von Sigma-Aldrich, bezogen. 5, 6-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester (5(6)-

CFDA) - zur Lebendzellmarkierung wurde von der Firma Molecular Probes, Oregon, U.S.A. bezogen.

3.2. Zellen

FDCP-Mix murine multipotente hämatopoetische Vorläuferzellen (Faktor-dependent Cell Paterson) ²⁸ A4 wurden von Dr. C. Heyworth und Dr. E. Spooncer, Paterson Institute for Cancer Research, Manchester, UK, zur Verfügung gestellt. Sie wurden stabil transfiziert mit einem Plasmid, das die Expression des "Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)" unter der Kontrolle vom EF-1 α Promotor vermittelt und Neomycin Resistenz verleiht ²⁹. FDCP-Mix Zellen wurden in IMDM in Gegenwart von 20% Pferdeserum und 20 mg/ml rmlL-3 bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und expandiert.

KG1-Zellen wurden mit dem lentiviralen Vektor SEW stabil transduziert, der unter der Kontrolle des eGFP "spleen focus-forming virus promotor" (SFFV-P) exprimiert (freundlicherweise von Dr. Manuel Grez überlassen). Die KG1 Zellen wurden in IMDM in Gegenwart von 20% FCS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Primäre AML-Zellen wurden durch Blutentnahme aus dem peripherem Blut von Patienten oder durch therapeutische Leukapherese aus Patienten mit der Diagnose einer primären AML mit hohen Blastenzahlen im peripheren Blut isoliert, die in der Abteilung Innere Medizin II am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt behandelt wurden. Die Patienten wurden entsprechend einem Ethik-Votum über das Vorgehen informiert und ihr Einverständnis eingeholt. Mononukleäre Zellsuspensionen wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation hergestellt. Nach der Isolierung wurden die AML-Blasten direkt analysiert.

Humane Endothelzellen aus Nabelschnur (HUVEC) wurden über die Firma Cell Systems, Maryland, USA, bezogen. Die tiefgefrorene Ampulle wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Das Volumen der Zellsuspension wurde danach durch tropfenweise Zugabe von einem ml Endothelzell-Kulturmedium mit einer Verdoppelung des Volumens pro Minute bis zum Erreichen von 8 ml vergrößert. Die Zellen wurden direkt auf 0,1% Gelatine-lösung vorbeschichtete Zellkulturflaschen ausplattiert, und es wurden weitere 5 ml Kulturmedium zugesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:6 durch Trypsinierung umgesetzt. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurden hierfür 0,4 ml Trypsinlösung (1:5) auf die Zellen zugegeben und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurden 5 ml supplementiertes Zellwachstumsmedium zugegeben, die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und durch 10 minütige Zentrifugation bei 400g pelletiert. Es wurden jeweils Kulturen aus in der Passage 3 eingefrorenen Aliquots verwendet, aus

denen die Zellen für die Analyse in der Durchflußkammer im supplementierten Endothelzellmedium auf spezielle Glasträger aufgebracht wurden.

“Lineage“ (lin⁻)-Depletion. Knochenmarkzellen wurden aus den Femuren 6-10 Wochen alter weiblicher C57BL/6 Mäuse entnommen, die zuvor durch Inhalationsnarkose mit Isofluran eingeschläfert und entblutet wurden. Der Inhalt der Femurknochen wurde durch eine 18G-Nadel in eine Zellsuspension in PBS überführt. Zellen dieser Zellsuspension wurden durch Zugabe von Antikörpern gegen TER119, CD45R/B220 und Mac1/CD11b, die mit magnetischen Mikro-Beads gekoppelt wurden inkubiert (10 µl/1x10⁷ Zellen). Anschließend erfolgte eine Passage dieser Zellsuspension über Magnetdepletions-Säulen (LD, Miltenyi Biotech). Die Reinheit der lin⁻-Zellen wurde durchflusszytometrisch durch Färbung der Zellen mit PE-konjugierten Antikörpern gegen TER119, CD45R/B220 sowie Mac1/CD11b bestimmt.

3.3 Methoden

Durchflusskammer. Die Interaktion zwischen dem Endothel ist ein kritischer Schritt bei der Extravasation und dem Homing im Blut zirkulierender spezialisierter Zellpopulationen. Die meisten für Bindungsanalysen zwischen zirkulierenden Blutzellen und Endothelzellen zur Verfügung stehenden *in vitro*-Methoden sind statischer Natur und können den Scherdruck als essentielle Komponente der Interaktion von im Blut zirkulierender Zellen mit der Gefäßwand nicht erfassen. Die Durchflusskammer berücksichtigt diesen Scherdruck, indem Kulturmedium über eine Endothelschicht in einem geometrisch definierten Glas-Acryl-Kanal in einer laminaren Strömung fließt²⁷.

Die zirkuläre Durchflusskammer (circular parallel plate flow chamber, Glycotech, Gaithersburg, Maryland, USA). Sie besitzt einen Einlass- und Auslass-Stützen sowie einen Anschluss für ein Vakuumsystem. Ein Teflon-Schlauchsystem wird über Luer-Lock-Verbindungen mit diesen Stützen verbunden. So wird der mit den Endothelzellen vorbeschichtete Glasobjektträger mit Hilfe des Vakuums fest und mit definierten Abstand mit der übrigen Acrylglas-Kammer in Verbindung gehalten. Das System wird auf ein inverses Mikroskop positioniert und mit einem Bild- und Videoerfassungssystem verbunden (CCD Kamera). Die Zellen werden über einen Teflonschlauch aus einer 50 ml Injektionsspritze, die über einen Infusomaten (Perfusor Secura FT, Braun, Heidelberg) bedient wird, zugeführt. Über einen

Dreiwegehahn zwischen der Spritze und dem zuführenden Schlauch werden die Zellen in einem Volumen von 1 ml in den zuführenden Schlauch injiziert. Die Flussgeschwindigkeit ist verstellbar zwischen 2,5 ml/h und 99 ml/h. Das System stellt einen laminaren Flüssigkeitsstrom der Zellen über der Endothelschicht in der Kammer über einen konstanten Bereich im Zentrum der Beobachtungsfeldes sicher. Nach der Passage über die Endothelzell-Schicht werden die Zellen in einem abführenden Schlauch abgeleitet und in einem Abfallreservoir aufgefangen.

Entsprechend der Dicke und Weite des Durchflusskanals, und abhängig von der Pumpgeschwindigkeit, kann der Scherdruck nach der folgenden Formel berechnet werden:

Scherdruck = $6Q\mu/Bh^2$, wobei
Q = Flussrate (cm^3/s)
 μ = Viskosität des Mediums (cp oder $\text{dyn} \times \text{s} \times \text{cm}^2$)
h = Höhe des Durchflusskanals (μm)
B = Weite des Durchflusskanals (mm).

In den vorgestellten Experimenten betrug die Weite des Durchflusskanals 5mm, die Höhe 450 μm . Der kleinste applizierbare Scherdruck betrug 0,1 dyn/cm^2 , der größte Scherdruck 4 dyn/cm^2 , dies entspricht Pumpgeschwindigkeiten von 2,5 ml/h und 99 ml/h.

Um das Rolling-Verhalten von HPC oder leukämischen Blasten über Endothelzellschichten als initialen Schritt des Prozesses der Extravasation dieser Zellen aus dem Blutstrom zu erfassen, sowie um die Abhängigkeit des Rollings vom Scherdruck zu bestimmen, würde das System zunächst bei einer Flussgeschwindigkeit von 2,5 ml/h mit Zellen in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ bei einem berechneten Scherdruck von 0,1 dyn/cm^2 eine Minute lang perfundiert. Dies dient der Induktion der Adhäsion der Vorläuferzellen auf einer mit rhTNF- α vorstimulierten Endothelzellschicht. Während dieser Zeit wurde eine "Real-Time" Video Sequenz aufgezeichnet, um die Bewegungsgeschwindigkeit der Zellen zu dokumentieren. Jede Minute würde der Scherdruck in Stufen (0,4, 1, 1,5, 2, 3) auf maximal 4 dyn/cm^2 erhöht. Für jeden Scherdruck wurde anschließend die Zahl der Zellen, die bei niedriger (15-25 $\mu\text{l}/\text{s}$), intermediärer (40-60 $\mu\text{l}/\text{s}$) und hoher (> 100 $\mu\text{l}/\text{s}$) Geschwindigkeit an der Endothelschicht bestimmt, sowie die Zahl der adhärenenten Zellen in 4 verschiedenen Blickfeldern durch Einzelbilder dokumentiert.

Zur Bestimmung der Adhäsion wurden Zellen (1×10^6 in 1 ml) mit einem initialen Scherdruck von $0,4 \text{ dyn/cm}^2$ 10 Minuten lang über die Endothelschicht perfundiert. In 3 verschiedenen Feldern wurden jeweils Bilder aufgenommen, um die Zahl der adhärenen Zellen am Ende dieses Intervalls zu bestimmen. Anschließend wurde der Scherdruck für weitere 10 Minuten auf 2 dyn/cm^2 erhöht, und jeweils 3 weitere Bilder auf denselben Blickfeldern dokumentiert. Die Blickfelder wurden mit Hilfe eines numerierten "Grids" festgelegt und wiedergefunden.

Für die Bestimmung der Beteiligung von Selektinen bei der Interaktion von leukämischen Blasten und Endothelzellen wurden die Endothelzellschichten zunächst mit rhTNF- α in einer Endkonzentration von $30 \text{ }\mu\text{g/ml}$ vorstimuliert, um die Selektin-Expression zu induzieren. Die Stimulation wurde auf 2 Arten durchgeführt: Übernacht-Inkubationen zur Induktion von P-Selektin, sowie Induktionen für 3h für Experimente zur Bestimmung der Rolle von E-Selektin. Vor Durchführung des Assays wurden die Endothelzellen eine Stunde lang mit monoklonalen Antikörpern gegen P- oder E-Selektin in einer Konzentration von $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$ präinkubiert. Glasobjektträger mit den vorbeschichteten HUVEC Endothelzellen wurden auf die Flusskammer aufgebracht und bei einem initialen Scherdruck von $0,4 \text{ dyn/cm}^2$ 10 Minuten lang mit Medium durchspült. Frisch isolierte oder aufgetaute leukämische Blasten wurden in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in 1 ml IMDM in die Durchflusskammer eingebracht. Nach 10 Minuten initialen Flusses bei $0,4 \text{ dyn/cm}^2$ wurde der Scherdruck auf 2 dyn/cm^2 für weitere 10 Minuten erhöht. Die Zahl der rollenden und adhärenen Zellen wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Isolierung von Plättchen-Mikropartikeln (PMP). PMP wurden aus antikoaguliertem Blut (EDTA oder Citrat) oder Leukozyten-depletierten Thrombozytenkonzentraten hergestellt. Die Thrombozytenkonzentrate wurden aus "Buffy-Coats" von jeweils 4 Vollblutspenden gepoolt, gemäß der Spezifikation der Arzneimittelzulassung des BSD Baden-Württemberg "Pool-Thrombozytenkonzentrat, DRK Blutspendedienst". Hieraus wurden 40 ml entnommen und bei 800 g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in einer Sorvall-Zentrifuge bei 44.000 g über Nacht zentrifugiert, um die PMP zu pelletieren. Die PMP wurden aus dem Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und anschließend in die Messungen eingesetzt. Aus Aliquots wurde die Reinheit der PMP durchflusszytometrisch durch Inkubation mit Anti-CD61-FITC monoklonalem Antikörper (mAK) und Annexin V-FITC bestimmt. Nach Zugabe kalibrierter Mikro-Beads wurden die PMP durchflusszytometrisch nach Akquisition von 5.000 Ereignissen in einem Live-Cell-Gate quantifiziert. Die Gates wurden entsprechend den Scatter-Profilen für Thrombozyten, PMP und Mikro-Beads gesetzt.

Bindung von PMP an HPC. 5.000 HPC wurden in $100 \text{ }\mu\text{l}$ IMDM/20% FCS in 96 Well-Platten zusammen mit $4,5 \times 10^5$ PMP 30 min lang bei 37°C in 5% CO_2 inkubiert. Anschließend

wurden die HPC mit 10 µl Anti-CD61-FITC 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Um die Bindekinetik der PMP an KG1 Zellen zu bestimmen, wurden 1×10^6 HPC mit 5×10^7 PMP in jeweils 100 µl IMDM/20% FCS inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen durch Zugabe von einer 4% Paraformaldehyd-Lösung 10 min auf Eis fixiert. Die Zellen wurden 2 x durch Zentrifugation mit PBS gewaschen, anschließend mit Anti-CD61 FITC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Interaktion von HPC mit Endothelzellen. 1×10^6 KG1 oder CD34⁺ HPC wurden mit 5×10^7 PMP eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ in 100 µl in 96-Well-Platten inkubiert. Anschließend wurden sie wie weiter oben beschrieben in der Flusskammer analysiert.

Adhäsion von HPC an humanes Fibronectin. Das Flusskammer-System wurde einer mit Fibronectin-vorbeschichteten Glasplatte bestückt. Hierfür wurden die Platten im Gegenwart von 1 ng/ml in PBS humanem Fibronectin 1 Stunde bei Raumtemperatur vorbeschichtet. Die Objektträger wurden anschließend 2 x mit PBS gewaschen. KG1 oder CD34⁺ HPC (10^6) wurden mit 5×10^7 PMP in 100 µl IMDM/20% FCS für verschiedene Zeiträume bei 37°C in 5% CO₂ präinkubiert. Anschließend wurde die Analyse in der Durchflusskammer wie oben beschrieben durchgeführt.

Chemotaxis von KG1 HPC. Die unteren Kammern einer 48 Well-Chemotaxis-Kammer (Neuroprobe, Cabin John, Maryland, USA) wurden mit DMEM/20% FCS und verschiedenen Konzentrationen von PMP vorbefüllt. Eine Polycarbonat-Membran mit einem Porendurchmesser von 5 µm (Receptor Technologies, Oxford, UK) deckte die Oberseiten der unteren Wells dicht ab. Anschließend wurden die oberen Wells mit 30.000 KG1-GFP-Zellen in DMEM/20% FCS befüllt. Das Befüllungsvolumen lag bei 32 µl. Die Migration wurde bei 37°C, 5% CO₂ im befeuchteten Inkubator 4 Stunden lang durchgeführt. Die Zellen in den unteren Wells wurden durch durchflusszytometrische Analyse nach Zugabe einer vorbestimmten Menge von 100.000 (nicht-fluoreszierenden) KG1-Zellen zu jeder Probe in einem festen Volumen von 400 µl PBS bestimmt.

Kompetitive hämatopoetische Zellpopulation in Mäusen. Für dieses Experiment wurde der Mausstamm C57BL/6 verwendet. Die beiden Unterstämme C57BL/6 Ly 5.1 und Ly 5.2 unterscheiden sich durch einen Polymorphismus im extrazellulären Bereich des CD45-Moleküls. Durch spezifische monoklonale Antikörper können beide Varianten unterschieden werden, und die Anteile der Tochterzellen unterschiedlicher Spenderstammzellen nach Transplantation aus dem peripherem Blut oder hämatopoetischen Organen quantifiziert werden. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen (12 Stunden Tageslicht,

Raumtemperatur, Trockenfutter und Wasser *ad libitum*) in der Zentralen Forschungseinrichtung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität gehalten. Die Genehmigung der Überwachungsbehörde zur Durchführung der Versuche wurde vom Regierungspräsidium Darmstadt erteilt (AZ: F27/01). Die Empfängermause wurden im Zentrum für Radiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität mit 11 Gy Gamma bestrahlt, aufgeteilt auf 2 Dosen von 5,5 Gy im Abstand von 6 Stunden im Falle der primären Empfängermause, oder mit 8,5 Gy in einer Sitzung für sekundäre Empfängermause. Die Bestrahlung wurde als Ganzkörperbestrahlung durchgeführt. Aus unbestrahlten C57/BL6 Spendermäusen wurden Lin⁻ Knochenmarkzellen durch Ausspülen des Femurknochens und anschließende Magnetseparation gewonnen: Die Zellen wurden durch Zentrifugation in PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 1×10^8 pro 100 μ l eingestellt. Anschließend wurden sie mit Anti-CD45R/B220, Anti-TER-119 und Anti-CD11b Mikro-Beads (10 μ l/10⁸ Zellen) 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Auswaschen der Mikro-Beads durch Zentrifugation wurden die Zellen über eine LD MACS Anreicherungs-Trennsäule gespült und die lin⁻ Zell-Fraktion wie unter 3.2 beschrieben isoliert. Die Reinheit der angereicherten Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Markierung mit murinen anti-CD45R/B220-PE, anti-TER-119-PE und anti-CD11b-PE Antikörpern bestimmt und betrug zwischen 68 bis 100%. Die lin⁻ Zellen wurden in einem Volumen von 200 μ l, entsprechend 5×10^5 Zellen, intravenös in zuvor mit 11 Gy in 2 Sitzungen (5,5+5,5 Gy mit 6 Stunden Intervall) bestrahlte primäre Empfängermause injiziert. Nach 24 Stunden, 1 oder 4 Wochen wurden die Mäuse durch Narkose mit Isofluran betäubt und durch Genickbruch getötet. Durch eine 23G-Nadel wurde peripheres Blut aspiriert und mit 10% 0,1M EDTA pH-7,4 antikoaguliert. Femuren, Milz, Lunge, Leber, Anteile des Muskulus quadriceps femoris und Gehirne wurden präpariert und in eiskaltem PBS zwischengelagert. Im Zellkulturlabor wurden die Organe anschließend durch ein Skalpell in kleine Stücke und Scheibchen geteilt und durch Spülen über einen 100 μ m Filter gespült. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 1×10^8 pro 100 μ l eingestellt. Anschließend wurden sie mit Anti-CD45 Mikro-Beads (10 μ l/10⁸ Zellen) 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Auswaschen der Mikro-Beads durch Zentrifugation bei 400 g für 5 min wurden die Zellen über eine MS MACS Anreicherungs-Trennsäule gespült und die CD45⁺ Zell-Fraktion aufgefangen. Die Reinheit der angereicherten Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Markierung mit murinen Anti-CD45-FITC Antikörper bestimmt und betrug 50 bis 78%. Das Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und in mit 1 ml Ficolltrennlösung ($\rho = 1,079$ g/ml) vorgefüllten 5 ml-Polycarbonat-Röhrchen vorsichtig überschichtet. Durch anschließende Zentrifugation bei 500 g für 20 min wurde die mononukleäre Zellfraktion separiert. Diese wurde durch vorsichtiges Aspirieren der Interphase zurückgewonnen und 2 x mit PBS bei 400 g zentrifugiert und gewaschen. Anschließend wurden die CD45⁺ angereicherten Zellen aus den Organen, oder

mononukleäre Zellen aus Blut in die mit 8,5 Gy vorbestrahlten sekundären Rezipientenmäuse i.v. injiziert. Hierbei wurde jeweils der Gesamtgehalt des Organe aus 3 Spendermäusen gepoolt und anschließend auf 3 Empfängermause verteilt. Gleichzeitig wurden in jede Maus 1×10^6 unfraktionierte frisch isolierte Ly 5.2 Knochenmarkzellen mit Kompetitorzellen transplantiert.

Für die Analyse von Kolonie-bildenden Zellen (CFC) wurden 9×10^4 Zellen aus jeder Organzellsuspension sowie eine gleiche große Menge der mononuklearen Blutzellen einer Empfängermaus, verteilt auf 3 Kulturschalen mit je 30.000 Zellen in 9,5% Methylzellulose/IMDM/20% FCS in Gegenwart von je 20 ng/ml rmSCF, rmTPO, rmlL-3 und rmlL-6 plattiert. Die CFC-Kulturen wurden 10 Tage in einem Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5% CO₂ bei gesättigter Luftfeuchte inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien lichtmikroskopisch ausgezählt. Das hämatopoetische Repopulationspotential wurde durchflusszytometrisch ca. 5 (4-7) Wochen nach Transplantation der sekundären Empfängermause gemessen. Hierfür wurden Zellen einer Knochenmark-Zellsuspension mit Anti-Ly 5.1-PE und Anti-Ly 5.2-FITC Antikörpern inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Prozentzahl der von den Stammzellen abgeleiteten repopulierende Tochterzellen wurde entsprechend der Formel: % Ly 5.1 / (% Ly 5.1 + % Ly 5.2) errechnet. Die Absolutzellzahlen der isolierten und sekundär transplantierten CD45⁺-Zellen aus dem gleichen Organ variierten zwischen den Experimenten und betrug 2.9 ± 1.1 (Knochenmark); 2.2 ± 1.7 (Milz); 1.0 ± 0.4 (Leber); 0.26 ± 0.09 (Muskel); 0.35 ± 0.18 (Gehirn); 0.68 ± 0.35 (Lunge) and 0.52 ± 0.33 (Blut) $\times 10^6$ Zellen/Maus (Mittelwert +/- Standardabweichung). Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe eines zweiseitigen, ungepaarten Students t-Tests durchgeführt (Microsoft Office).

Intravitale Mikroskopie: Für die intravitale Mikroskopie wurden Videoaufnahmen während der Experimente über eine DCX-390 Digitalkamera (Sony, Köln) erstellt, die auf einem Inversmikroskop mit einem 10x Immersionsobjektiv montiert war. Für die Carboxyfluorescein-diacetate (CFDA) Färbung wurde 10 µl CFDA in 100 µl PBS (10mM Ca²⁺, 10mM Mg²⁺) gelöst. KG-1 AML-Blasten, bei einer Konzentration von 10^7 /ml in PSB resuspendiert, wurden in einem ml mit 30 µl CFDA-PBS Lösung vermischt. Die Mischung wurde bei 37°C, 5% CO₂ für 10 Minuten lang inkubiert. Anschliessend wurden nochmals 70 µl CFDA-PBS Lösung zugegeben und es wurde für weiter 20 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 50 ml IMDM durch Zentrifugation bei 300 x g gewaschen und in 1 ml IMDM resuspendiert und in den Versuch eingesetzt. Pro Maus wurden ca. 300 µl der Zellsuspension appliziert. P-selectin defiziente Mäuse wurden vom

Jackson Labor (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen und unter Standardbedingungen in der Zentralen Tierversuchsanlage der Johann Wolfgang Goethe Universität gehalten.

Für die intravital Mikroskopie wurden die Mäuse durch i. p. Injektion von Ketamin (200 µl/Maus) anästhesiert und unter eine Hypothermie-Decke platziert. Die *A. catoris communis* dextra wurde chirurgisch präpariert und ein Katheter in das Blutgefäß rückwärts geschoben. Das linke Ohr der Maus wurde vorsichtig auf dem Objektträger fixiert, mit Glycerin benetzt und mit einem Coverslip eingedeckt. Die Gefäßarchitektur der Mausohrs die die mit CFDA markierten Zellen wurden durch Epifluoreszenz Illumination mit Hilfe eines Multifilter-Systems sichtbar gemacht.

Bilder und Filme wurden mit einem Panasonic Videokassettenrecorder aufgezeichnet. Zellen wurden als nicht interagierend mit der Endothelzellschichten bewertet, wenn sie sich mit der Geschwindigkeit des Blutflusses bewegten. Rollende Zellen zeigten Geschwindigkeiten, die niedriger als die des Blutflusses waren.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis von repopulierenden Stammzellen in verschiedenen Organen nach Knochenmark-Transplantation durch kompetitive Repopulation in Mäusen

Das Ly 5.1/Ly 5.2-Mausmodell nutzt einen Polymorphismus des Oberflächenantigens CD45, das alle hämatopoetischen Zellen charakteristischerweise exprimieren. Mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper gegen den extrazellulären Anteil von CD45 können die aus den beiden Stämmen gewonnen hämatopoetischen Zellen durchflusszytometrisch unterschieden werden. Durch Zugabe unterschiedlicher Anteile von Donorzellen aus dem Knochenmark von Ly 5.1 sowie Ly 5.2-Mäusen wurde zunächst in einem Validierungsexperiment überprüft, ob entsprechend den gegebenen Anteilen der beiden Knochenmark-Zellpopulationen nach der Transplantation auch eine anteilige Repopulation erfolgte. In Abb. 4.1.1 sind die Resultate dargestellt. Hierbei wurde beobachtet, dass der Anteil von Ly5.2 der jeweiligen transplantierten Stammzellen ca. 4 Wochen nach Transplantation einem entsprechenden Anteil der Knochenmarkzellen in den Empfängermäusen proportional ist.

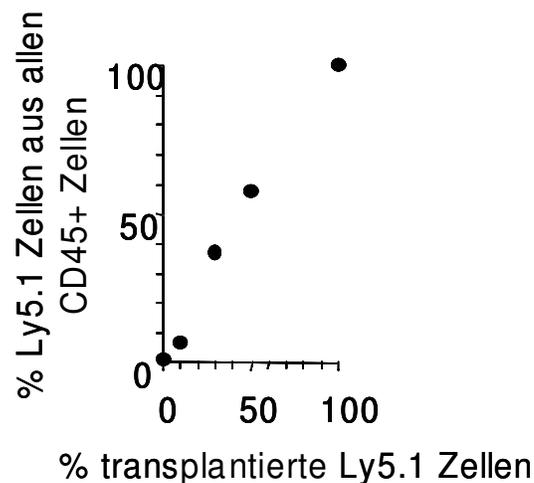


Abb. 4.1.1: Detektion unterschiedlicher Anteile von Donortyp Zellen (Ly 5.1) im Knochenmark transplantiertes, mit 8,5 Gy vorbestrahlter Ly 5.2 Empfängermäuse. Dargestellt ist jeweils der Prozentanteil der in den transplantierten Mäusen gemessenen Ly 5.1 Zellen in Abhängigkeit vom Anteil transplantiertes Ly 5.1 Knochenmarkzellen. Jeder Datenpunkt entspricht einer Analyse in einer Maus.

Anschließend wurde das kompetitive Repopulationsmodell eingesetzt, um das Homingverhalten von transplantierten Stammzellen in verschiedene Organe nach Knochenmarktransplantation durch eine Sekundärtransplantation der aus den primären Empfängern isolierten hämatopoetischen Zellen zu bestimmen. In der Abb. 4.1.2 ist dies schematisch dargestellt.

Je einer primären Ly 5.2 Empfängermäusen bei denen in der Vortransplantation durch eine myeloablativ Bestrahlung mit 11 Gy endogene hämatopoetische Stammzellen vernichtet

wurden, wurden Linienmarker-depletierte Knochenmarkszellen aus Ly 5.1-Mäusen transplantiert. Zu verschiedenen Zeitintervallen (24h, 7 Tage, 28 Tage) wurden nun Zellsuspensionen aus Knochenmark, Milz, Leber, Lunge, Muskel, Gehirn und Blut gewonnen. Diese wurden in der anschließenden sekundären Transplantation in vorbestrahlte sekundäre Ly 5.2-Empfängermäuse übertragen. Bei diesem 2. Transplantationsschritt wurde eine konstante Dosis von Ly 5.2 Kompetitor-Knochenmarkszellen, die dem vorherberechneten Repopulationspotential der im Knochenmark der primären Empfängermäuse erwarteten Stammzellzahl entsprach, ko-transplantiert (siehe Abb. 4.1.2). Ca. 5-7 Wochen nach Transplantation wurden die sekundär transplantierten Mäuse aufgearbeitet, und der Anteil jeweils Ly 5.1 und Ly 5.2 positiver Zellen in ihrem Knochenmark und der Milz bestimmt.

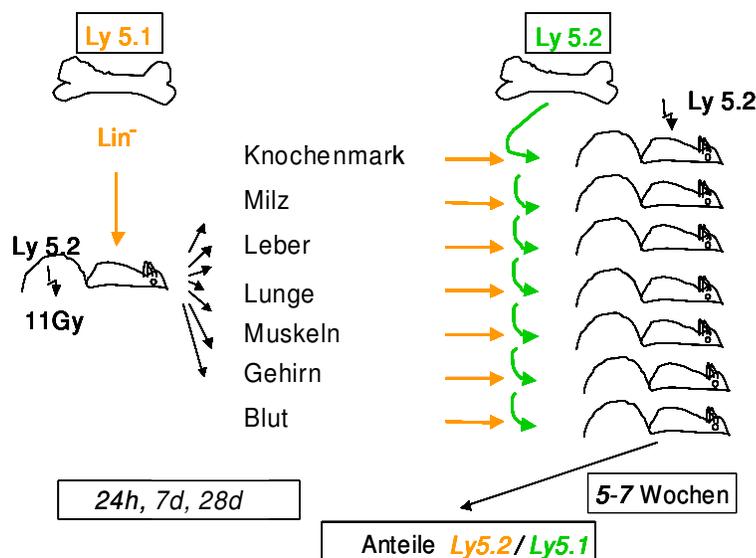


Abb. 4.1.2: Kompetitives Repopulationsmodell. Je 2×10^5 Linien-negative Donor-Knochenmarkszellen aus Ly 5.1 Mäusen wurden in mit 11 Gy vorbestrahlte Ly 5.1 Empfängertiere transplantiert. Nach 1, 7 oder 28 Tagen wurden aus diesen Mäusen Zellsuspensionen verschiedener Gewebe hergestellt und hieraus $CD45^+$ Zellen angereichert. Zellen aus jeweils einem Organ wurden zusammen mit 1×10^6 Ly 5.2 Kompetitor-Zellen in mit 8,5 Gy vorbestrahlte sekundäre Empfänger transplantiert. Das Repopulationspotential wurde nach 5 – 7 Wochen durch Messung der Anteile von Ly 5.1 und Ly 5.2 Zellen im Knochenmark der sekundären Empfängermäuse bestimmt.

Abb. 4.1.3A zeigt, dass in den Empfängermäusen ein Gemisch beider hämatopoetischer Zelltypen (Ly 5.1⁺, Ly 5.2⁺) gefunden wurde. In der Ly 5.1⁺ oder Ly 5.2⁺ Population waren sowohl B-Lymphozyten (Marker B 220), myeloische Zellen (CD11b) sowie erythrozytäre Zellen (TER 119) nachweisbar.

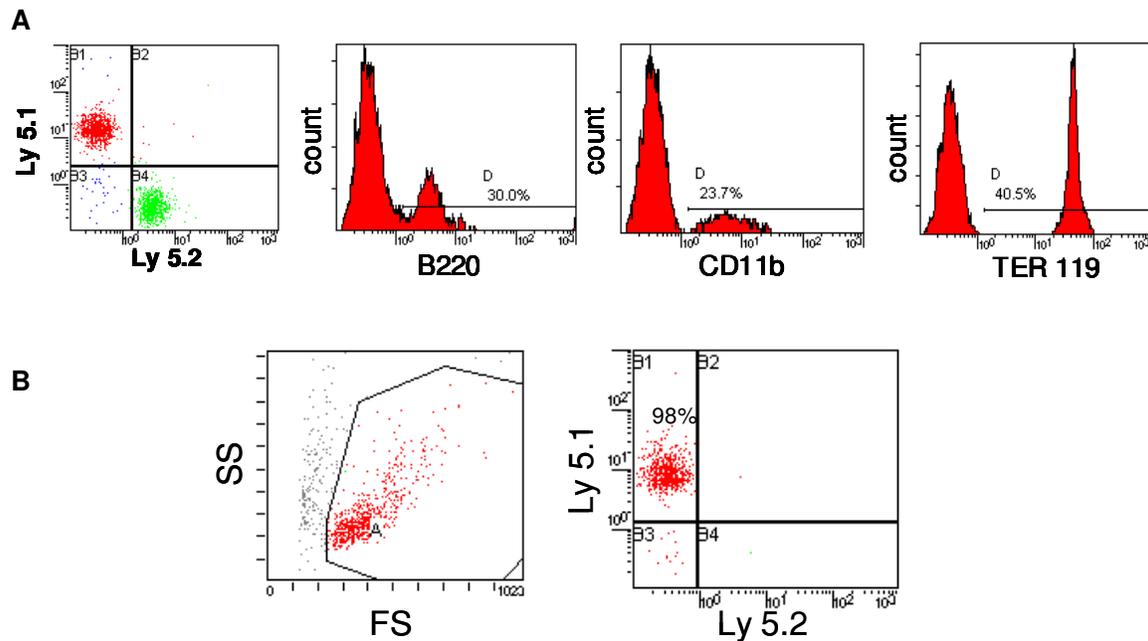


Abb 4.1.3 Durchflußzytometrische Analyse des Donoranteiles und des Multilinen-Differenzierungspotentials der repopulierenden Stammzellen und Koloniebildenden Zellen (CFC) in sekundär Empfängermäusen. (A) Durchflußzytometrische Analyse des Anteils der Ly 5.1 und Ly 5.2 Zellen aus dem Knochenmark eines sekundären Empfängertiers. In beiden mittleren sowie im rechten Histogramm wurden von bestimmten Anteil von Ly 5.1 Zellen jeweils der Anteil der für die Marker B220 (B-Leukozyten), CD11b (Monozyten/Makrophagen), sowie TER119 (erythrozytäre Zellen) tragenden Zellpopulationen bestimmt. (B) Durchflußzytometrische Analyse des Anteils der Ly 5.1 und Ly 5.2 Zellen aus den hämatopoietischen koloniebildenden Zellen eines sekundären Empfängertiers.

Die sekundäre Transplantation wurde nach verschiedenen Zeitintervallen nach der Transplantation der primären Mäuse, nämlich nach 1, 7 und 28 Tagen durchgeführt. Abb. 4.1.3 B, C zeigt, dass die hämatopoetischen koloniebildenden Zellen (CFC) in den primären transplantierten Mäusen im wesentlichen im Knochenmark, in der Leber und in der Milz gefunden wurden, nicht jedoch in den nicht-hämatopoetischen Geweben.

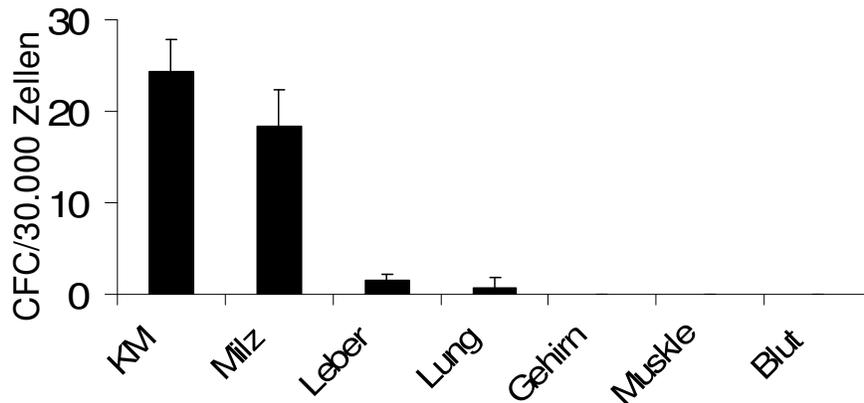


Abb 4.1.3 Hämatopoetische koloniebildende Zellen in Organen von primären Empfängermäusen. (C) Absolut Nummer von koloniebildenden Zellen in Organen von primären Empfängermäusen nach Kultivierung von 30.000 CD45+ Zellen aus Organsuspensionen in Methylzellulose/IMDM/20% FCS in Gegenwart von je 20 ng/ml rmSCF, rmTPO, rmlL-3 und rmlL-6.

In Tab. 4.1.1 sind die Anteile der Donor-Repopulation in sekundär transplantierten Mäusen gruppenweise und für die verschiedenen Organe zusammengefasst. Durch diese Transplantation wurde das Repopulationspotential in unterschiedlichen Geweben den Organen der primären transplantierten Mäuse erfasst. Es zeigt sich, dass in nicht transplantierten Kontroll-Mäusen ein signifikantes Repopulations-potential lediglich im Knochenmark zu detektieren ist, während in Milz, Leber, Muskel, Gehirn oder Lunge nur vernachlässigbar kleine Anteile von Donor-Repopulationen in den Indikator-Mäusen gemessen wurden. Hingegen zeigte sich bei der Analyse nach Knochenmarkstransplantation sowohl nach 1 wie auch 7 und 28 Tage in allen analysierten Geweben ein erhöhter Anteil an Donor-Hämatopoese. Dieser erreicht in Lunge und Gehirn ca. 1/3 bis 1/6 der Vergleichswerte im Knochenmark. In der Leber und im Muskel fand sich ein fast gleicher Anteil Donorzellen wie im Knochenmark (Tab. 4.1.1).

Donor Organ	Anzahl transplantierte Ly5.1+ Zellen / Maus (x10E6)				Anteil Ly5.1+ Zellen (%)			
	Kein Transpl.	Tag 1	Tag 7	Tag 28	kein Transpl.	Tag 1	Tag 7	Tag 28
Knochenmark	3.90	1.83	2.12	3.68	23.6 ± 15.3	41.4 ± 27.7	38.9 ± 12.5	72.9 ± 14.0
Milz	0.61	1.45	2.23	4.57	0.38 ± 0.28	13.7 ± 7.2	6.8 ± 3.7	15.0 ± 11.9
Leber	1.25	0.83	1.43	0.65	0.54 ± 0.36	35.6 ± 23.7	24.9 ± 5.9	31.7 ± 15.5
Muskel	0.18	0.36	0.19	0.29	2.14 ± 1.3	37.0 ± 22.3	24.1 ± 10.0	33.1 ± 15.5
Gehirn	0.06	0.31	0.81	0.27	1.2 ± 0.5	13.5 ± 9.2	6.8 ± 1.3	11.3 ± 10.3
Lunge	0.20	1.01	0.64	0.85	0.32 ± 0.2	12.3 ± 12.0	6.8 ± 4.4	4.4 ± 1.1
Blut	0.45	0.39	0.24	0.99	5.8 ± 5.6	19.6 ± 9.0	8.5 ± 3.7	20.8 ± 6.2

Tab. 4.1.1: Bestimmung des hämatopoetischen Repopulationspotentials in verschiedenen Organen primärer Empfängermäuse nach Knochenmark Transplantation (KMT). Primäre Empfängermäuse wurden mit 2×10^5 Lin⁻ angereicherten Knochenmarkzellen transplantiert. Aus den aufgeführten Organen wurden CD45⁺ Zellen angereichert. Hiervon wurden $2,9 \pm 1,1$ (Knochenmark); $2,2 \pm 1,7$ (Milz); $1,0 \pm 0,4$ (Leber); $0,26 \pm 0,09$ (Muskel); $0,35 \pm 0,18$ (Gehirn); $0,68 \pm 0,35$ (Lunge) und $0,52 \pm 0,33$ (Blut, jeweils Mittelwerte \pm SD) $\times 10^6$ Zellen pro Maus zusammen mit je 1×10^6 Kompetitor-Knochenmarkzellen in sekundäre Empfängermäuse transplantiert. In 6 Transplantationen wurden Ly 5.2 Lin⁻-Knochenmarkzellen in 18 Ly 5.2 primäre Empfängermäuse transplantiert, nach Reisolierung aus den Organen gemeinsam mit 10^6 Ly 5.1 Knochenmarkzellen in 126 Ly 5.2 sekundäre Empfängermäuse transplantiert. In 7 Transplantationen wurden Ly 5.1 Lin⁻-Knochenmarkzellen in insgesamt 21 primäre Ly 5.2 Rezipienten-Tiere transplantiert, sowie nach Reisolierung gemeinsam mit 10^6 Ly 5.2 Knochenmarkzellen in 147 Ly 5.2 sekundäre Empfängermäuse transplantiert. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SD aus jeweils 5 – 8 Mäusen pro Zeitpunkt dar, $p < 0,05$.

Die Daten zeigen, dass sich die hämatopoetische Repopulationskapazität in Knochenmark-transplantierten Mäusen, anders als die koloniebildenden Zellen, auf eine Reihe verschiedener Organe verteilt, und zwar in unterschiedlicher Ausprägung.

4.2. Analyse der Interaktion hämatopoetischer Vorläuferzellen mit Endothelzellen unter Scherdruck

Um die Wechselwirkungen von HPC mit Endothelzellen unter Flussbedingungen bei definierten Scherdrücken untersuchen zu können, wurde eine so genannte "Parallel-Plate-Flow-Chamber" (PPFC) verwendet. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 4.2.1 dargestellt. In dieser Kammer durchfließt Zellkulturmedium mit HPC durch einen Einlass eine rechteckige, flache Acrylglaskammer. Die Unterseite stellt eine Glasplatte dar, auf der Endothelzellen vorbeschichtet sind. Durch ein Vakuum-System wird das System stetig geschlossen gehalten. Die über eine Druckpumpe eingebrachte Flüssigkeit fließt am Ende der Flusskammer wieder aus und wird aufgefangen. Mikroskopisch wird der Fluss der HPC über die konfluente Schicht von Endothelzellen beobachtet. Es werden Echt-Zeit-Videoaufnahmen zur Erfassung der Geschwindigkeit rollender Zellen, sowie Bilder zu verschiedenen Zeitpunkten auf definierten Feldern zur Bestimmung der Zahl der adhären HPC

aufgenommen. HPC, die an den humanen aus Nabelschnur Venen isolierten Endothelzellen (HUVEC) adhären, sind in Abb. 4.2.1C gezeigt.

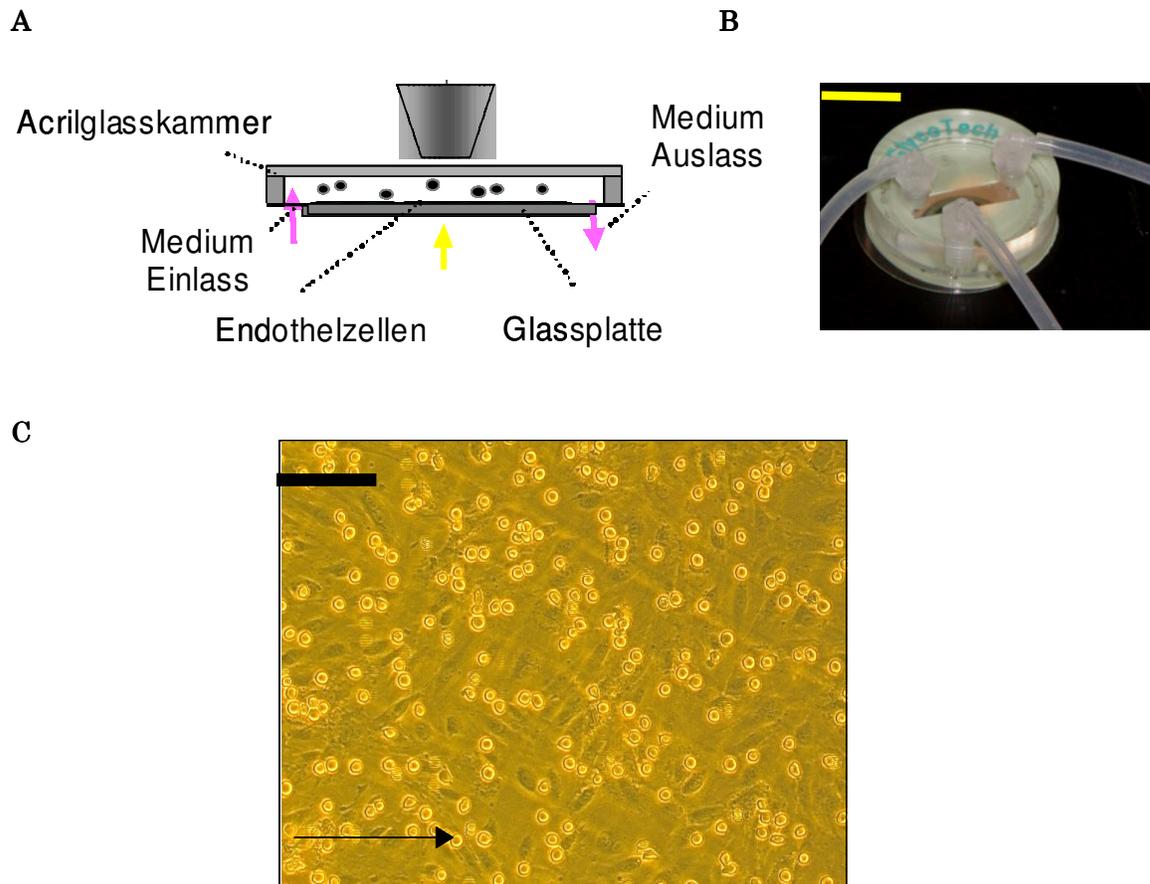


Abb. 4.2.1: Flusskammer-Modell. (A) Schema des Versuchsaufbaus. Die Durchflusskammer besteht aus einer Acrylbox mit einem Mediumeinlass ("medium inlet port"), einem Mediumauslass ("medium outlet port"), sowie einer durch Vakuum festgehaltenen Glasplatte, auf der die Endothelzellen vorbeschichtet sind. (B) Makroskopische Ansicht. (C) Mikroskopisches Bild mit hell begrenzten, rundlichen HPC, die an die Endothelzellschicht adhären. Der Pfeil zeichnet die Richtung des Flusses. Vergrößerung 200 fach. Länge des Größenmaßstabs in: (B) 1cm; in: (C) 100 μ m.

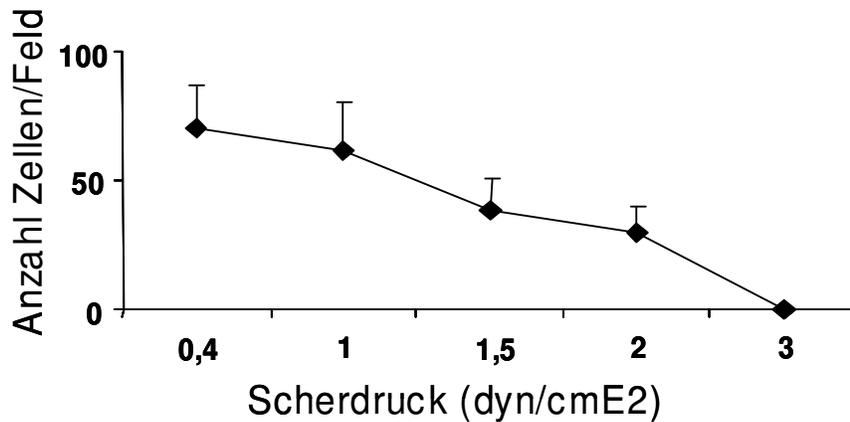


Abb. 4.2.2: Adhäsion von FDCP-Mix Zellen an Endothelzellen in Abhängigkeit vom Scherdruck. 10^6 FDCP-Mix Zellen wurden in 1ml Medium in der Durchflusskammer analysiert. Die Werte zeigen die Mittelwerte jeweils nach 10 min Durchfluss der adhärierenden Zellen beim bezeichneten Scherdruck an; die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung.

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Scherdrücke auf die Zahl der auf der Endothelzellschicht rollenden Zellen bestimmt. In Abb. 4.2.2 ist dargestellt, dass mit steigenden Scherdrücken die Zahl rollender Zellen abnimmt. Oberhalb eines Scherdrucks von 2 dyn/cm² wurden keine rollenden Zellen mehr beobachtet. In Abb. 4.2.3 ist dargestellt, dass die rollenden Zellen in Klassen verschiedener Geschwindigkeiten gruppiert werden können (Abb. 4.2.3). das langsam "Rolling" wird dabei bei einem Scherdruck von 1-1,5 dyn/cm² beobachtet.

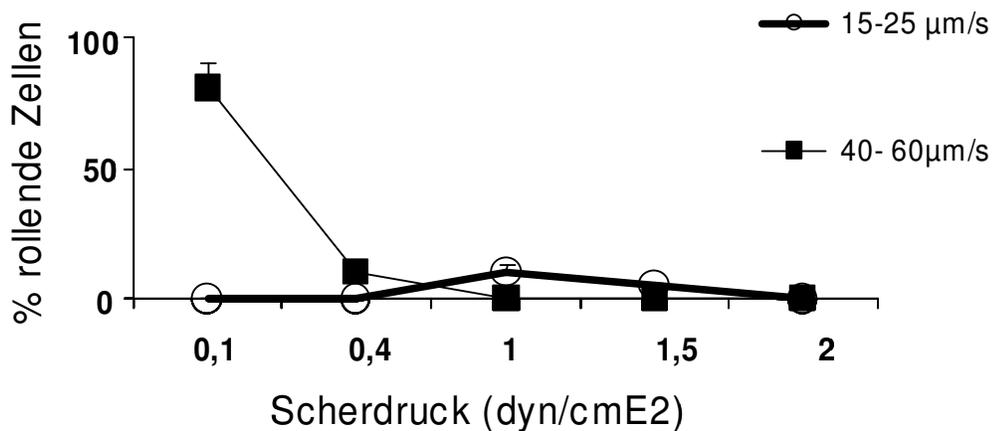


Abb. 4.2.3: „Rolling“-Verhalten von FDCP-Mix Zellen in Abhängigkeit vom Scherdruck. 1×10^6 FDCP-Mix Zellen wurden in 1ml Medium in der Durchflusskammer analysiert. Der Prozentsatz der jeweils rollenden Zellen aus den gesamten Zellen ist dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD, n=3.

Abb. 4.2.4 stellt die Zahl adhärenter Zellen in einer Flow-Chamber bei zwei unterschiedlichen Scherdrücken dar. Der 10-Minuten-Wert entspricht einem Scherdruck von 0,1 dyn/cm²; der 20-Minuten-Wert einem Scherdruck von 2 dyn/cm². Bei beiden Scherdrücken fand sich nach einer über Nacht-Inkubation der Endothelzellen mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α eine gesteigerte Adhäsion der HPC an die Endothelschicht.

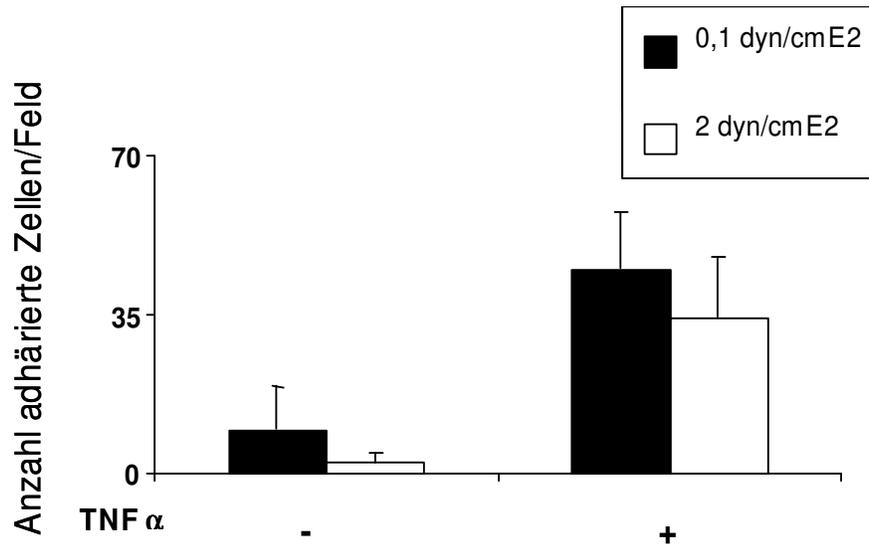


Abb. 4.2.4: Adhäsion von FDCP-Mix Zellen an Endothelzellen in Abhängigkeit vom TNF- α . 10^6 FDCP-Mix Zellen wurden in 1ml Medium in der Durchflusskammer analysiert. Hierbei wurden die HUVEC-Endothelzellen vorher über Nacht durch Zugabe von 10 ng/ml TNF α behandelt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD; n = 6.

Wenn die Endothelzellen mit einem funktionsblockierenden anti-P-Selektin-Antikörper vorbehandelt wurden, zeigte sich nach über Nacht-Stimulation mit TNF- α eine starke Reduktion der adhärenter Zellen bei beiden Scherdrücken (Abb. 4.2.5). Dies bedeutet, dass nach einer längeren Vorstimulationszeit der Endothelzellen die HPC überwiegend über P-Selektin an das Endothel binden.

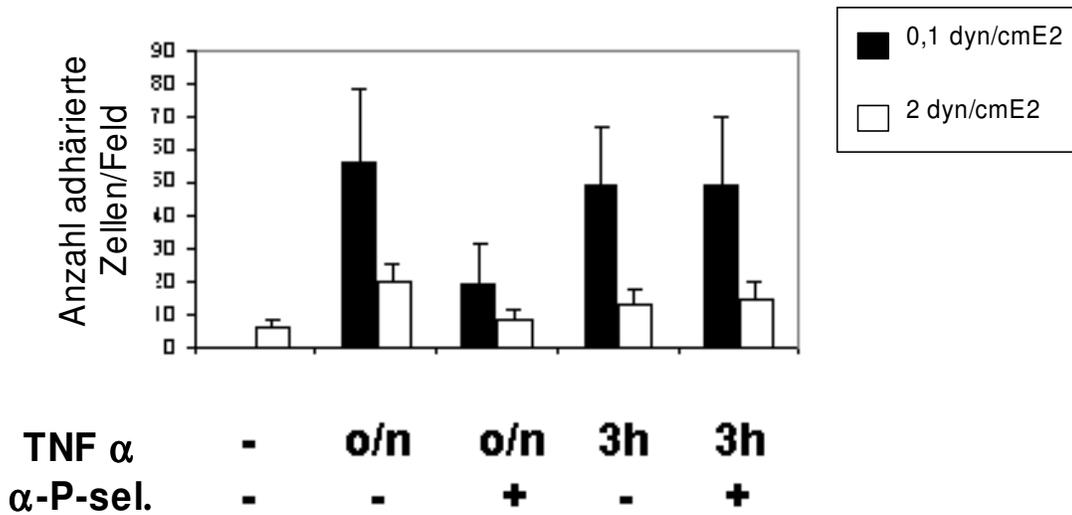


Abb. 4.2.5: P-Selektin abhängige Bindung von FDCP-Mix Zellen an Endothelzellen. 1×10^6 FDCP-Mix Zellen wurden in der Durchflusskammer analysiert. Hierbei wurden die HUVEC-Endothelzellen über Nacht oder für 3h durch Zugabe von 10 ng/ml TNF α , sowie wie angegeben zum Teil durch Zugabe von Anti-P-Selektin Antikörper 1 Stunde vor der Analyse vorbehandelt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD; n = 3.

Demgegenüber fand sich nach Stimulation der Endothelzellen mit TNF α über nur 3 Stunden und Vorbehandlung mit einem funktions-blockierenden Antikörper gegen E-Selektin eine Reduktion der Zahl adhärenter Zellen um ca. 50%. Dies weist daraufhin, dass zu früheren Zeitpunkt nach Stimulation mit TNF α die Endothelzellen HPC überwiegend über einen E-Selektin-abhängigen Mechanismus binden. (Abb. 4.2.6).

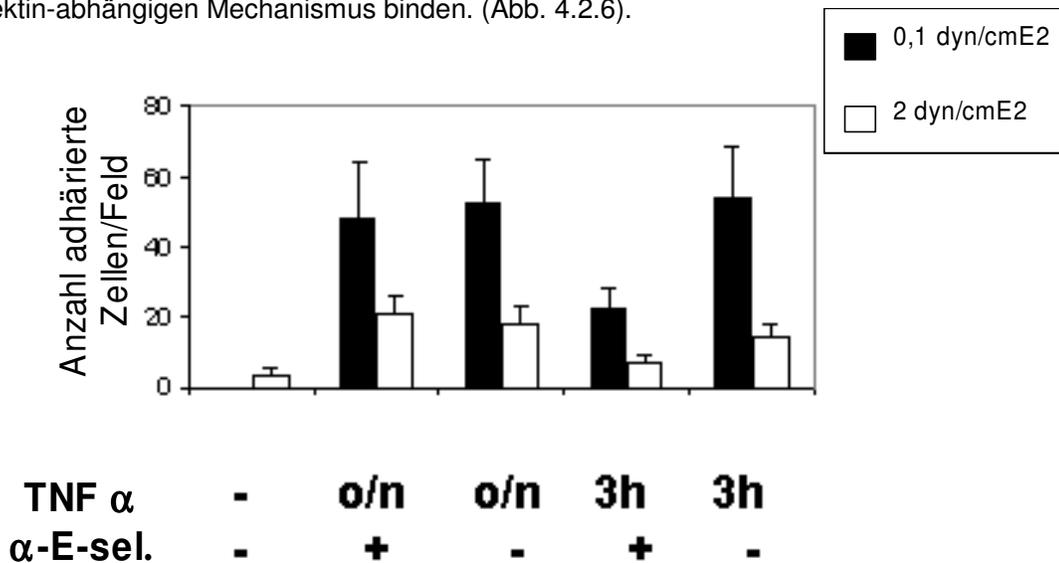


Abb. 4.2.6: E-Selektin abhängige Bindung von FDCP-Mix Zellen. 1×10^6 FDCP-Mix Zellen wurden in der Durchflusskammer analysiert. Hierbei wurden die HUVEC-Endothelzellen über Nacht oder für 3h durch Zugabe von 10 ng/ml TNF α , sowie teilweise durch Zugabe von Anti-E-Selektin Antikörper 1 Stunde vor der Analyse behandelt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD; n = 3.

Durch Einsatz funktionsblockierender Antikörper gegen PSGL1, gegen β_1 Integrin oder den VLA-4-Rezeptor wurden ebenfalls verringerte Zahlen adhärenter HPC im Vergleich zu TNF α behandelte Kontrollen verzeichnet (siehe Abb. 4.2.7). Dies zeigt, dass gemäß den von Springer formulierten 3-Phasen-Modell postulierten Interaktionen E- und P-Selektin sowie VCAM-1 auf den Endothelzellen und PSGL1 sowie β_1 Integrin-Rezeptoren auf HPC in die Interaktion involviert sind.

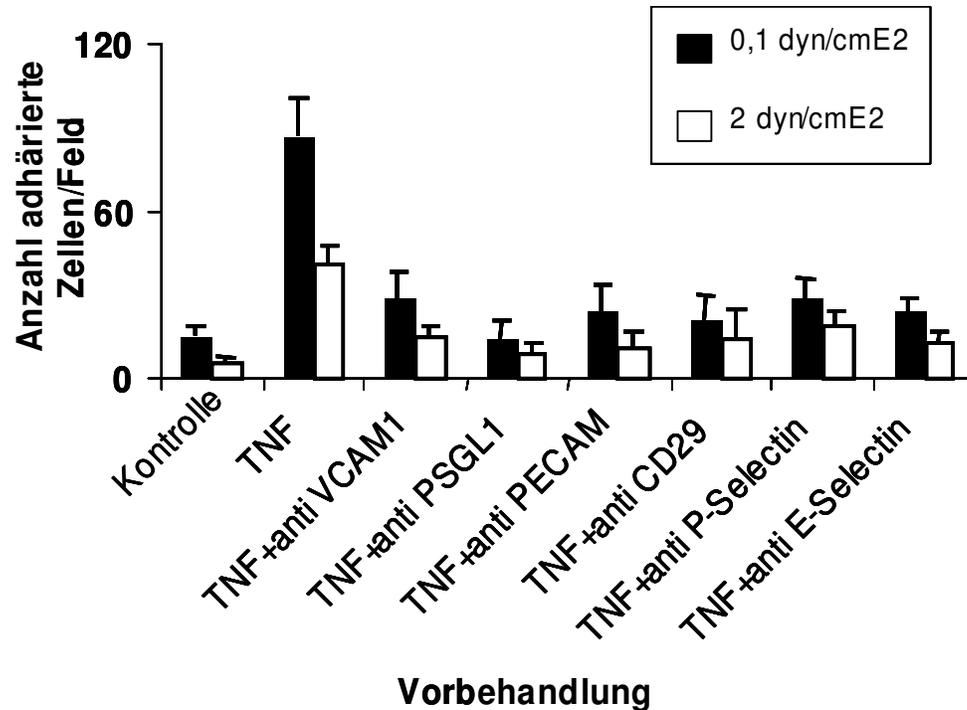


Abb. 4.2.7: VCAM-1, PSGL-1 und CD29-abhängige Bindung von FDCP-Mixzellen an Endothelzellen. 1×10^6 FDCP-Mix Zellen wurden in der Durchflusskammer analysiert. Hierbei wurden die HUVEC-Endothelzellen vorher über Nacht durch Zugabe von 10 ng/ml TNF α außer der Kontrolle, sowie teilweise durch Zugabe von anti- VCAM-1, oder die HPC durch Präinkubation mit anti-PSGL-1, anti CD29 (1 μ g/ml) Antikörper 1 Stunde vor der Analyse behandelt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD; n = 3.

4.3 Bedeutung von Plättchen-Mikropartikeln (PMP) für die Interaktionen von HPC mit Endothelzellen unter Flussbedingungen

Um den Einfluss von PMP auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten von HPC untersuchen zu können, musste zunächst eine Methode für die selektive Detektion PMPs etabliert werden. In Abb. 4.3.1 ist eine durchflusszytometrische Darstellung von Thrombozyten in Thrombozytenkonzentraten, sowie eine entsprechende Darstellung von PMP dargestellt. Die PMP wurden hierfür durch mehrere Zentrifugationsschritte angereichert. Im Gate C in der Abb. 4.3.1A und B sind jeweils die Signale des jedem

Messansatz zugegebenen Fluoreszenz-marktierten Beads dargestellt, die zur Quantifizierung der PMP dienen.

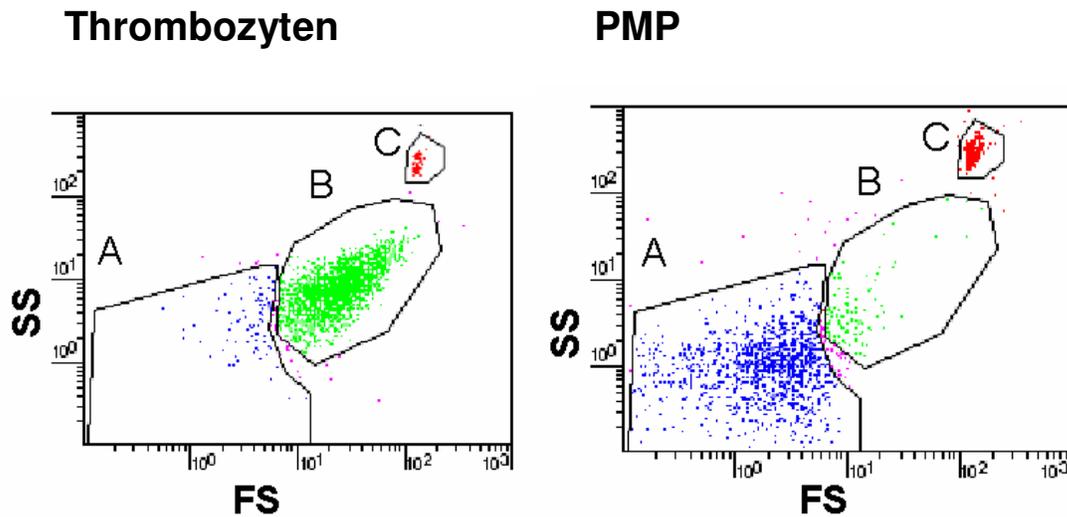
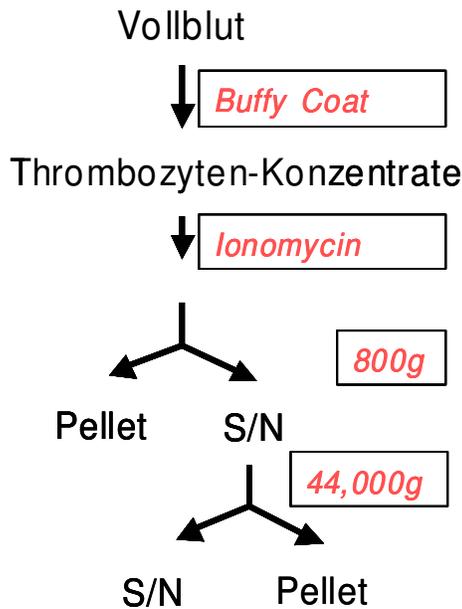


Abb. 4.3.1: Durchflusszytometrische Bestimmung von Thrombozyten und PMP. PMP wurden aus Thrombozytenkonzentraten präpariert und nach Resuspension des 44.000g Pellet gewonnen. PMP (links) und Thrombozyten (rechts) wurden mit anti-CD61-FITC-Antikörper gefärbt. Die Quantifizierung erfolgte durch die Zugabe kalibrierter Mikro-Beads (Gate C) und selektive Messung des CD61⁺ positive Ereignisse. Im Gate A sind jeweils die PMP, in Gate B die Thrombozyten quantitativ erfaßt. Die Punkte stellen eine repräsentative Auswahl der analysierten ca. 5.000 Ereignisse dar.

In Abb. 4.3.2 ist das Aufreinigungsschema für PMP aus Thrombozytenkonzentraten dargestellt. Nach Aktivierung der Thrombozyten in der Ausgangszellpopulation durch Behandlung mit dem mimetischen Oligopeptid für den PAR 1-Rezeptor SFLLRN wurden PMP generiert. Nach anschließender 800 g und 44.000 g-Zentrifugation konnten die PMP im Pellet quantitativ angereichert werden.

A



B

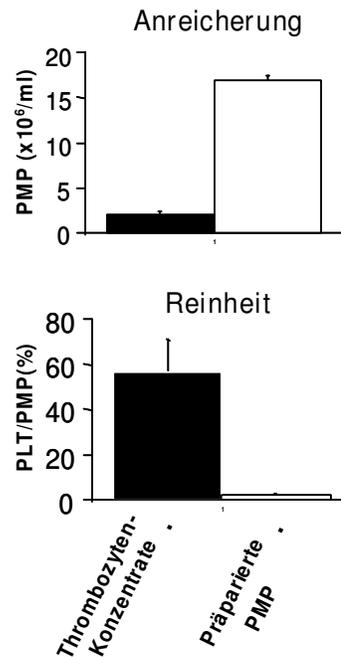


Abb. 4.3.2: Anreicherung und Reinheit der PMP. Im linken Teil der Abbildung ist die schematische Anreicherung der PMP aus initialen Thrombozytenkonzentrat dargestellt. Im rechten Teil sind die Partikel aus dem 44.000g Pellet nach Zentrifugation (weiße Säule) sowie dem Ausgangsmaterial (schwarze Säule) dargestellt. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SD dar, $n=7$. S/N = Überstand.

In Abb. 4.3.2 (B) sind die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung und der Reinheit von PMP nach der differentiellen Zentrifugation dargestellt. Die Reinheit liegt danach bei ca. 60%.

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, wie viele PMP im Blut normaler Spender, im Blut von Stammzellspendern nach G-CSF Mobilisierung, sowie in Patienten, die sowohl eine Chemotherapie als auch eine anschließende Gabe von G-CSF erhalten hatten, nachweisbar sind. In Abb. 4.3.3 sind die Messwerte aus den 3 Gruppen gegenüber gestellt. Gegenüber Kontrollpersonen und Patienten nach Stammzellmobilisierung mit G-CSF ergibt sich bei Patienten mit G-CSF und Chemotherapie, vermutlich aufgrund der bei diesen Patienten in der Regel niedriger Thrombozytenzahlen, ein verringertes Verhältnis von Thrombozyten (PLT) zu PMP. Dies zeigt, dass PMP in Unterschied zu Thrombozyten sowohl im Blut in normaler Individuen, wie auch in Stammzellspendern und Patienten nach Chemotherapie in etwa gleichen Konzentrationen vorhanden sind.

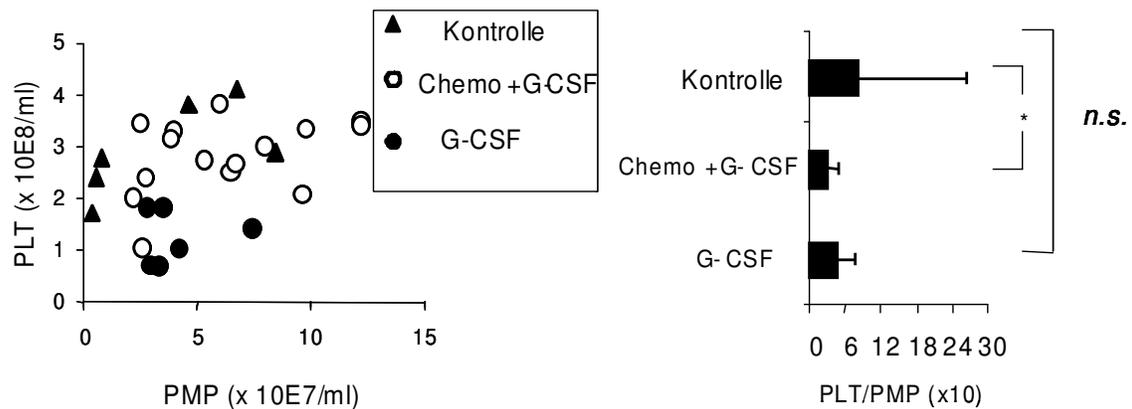


Abb. 4.3.3: Bestimmung von PMP im peripheren Blut von Normalpersonen und Stammzellspendern. Die Konzentration von PMP und PLT wurde durchflusszytometrisch nach Zugabe von kalibrierten Mikro-Beads in antikoaguliertem peripherem Blut aus Normalpersonen, nach Stammzellmobilisierung durch G-CSF sowie in Patienten nach Chemotherapie und Mobilisierung von Stammzellen durch G-CSF durchgeführt. *, statistisch signifikanter Unterschied; n.s., statistisch nicht signifikanter Unterschied im Student's t test.

Um den Einfluß von PMP an das Homingverhalten von HPC zu untersuchen, wurden die durch die differenzielle Zentrifugation hochangereicherten PMP mit HPC vermischt. Nach Zugabe von einem ca. 30-fachen Überschuss PMP zu humanen KG-1-Zellen oder isolierten CD34⁺ HPC aus Stammzellspendern, die G-CSF erhalten hatten, wurde eine Bindungskinetik erstellt (siehe Abb. 4.3.4 A und B). Als Maß für die Bindung der PMP an die Vorläuferzellen wurde die Zunahme der Fluoreszenz des auf PMP, jedoch nicht auf HPC exprimierten Oberflächenmarkers CD61 bestimmt. Die Untersuchungen zeigen in der Zelllinie KG-1 sowie in primären CD34⁺ Zellen jeweils eine Zunahme über einen Zeitraum von 30-60 Minuten, mit einem detektierbarem Anstieg des CD61 Signals schon nach wenigen Minuten. Zusätzliche Analysen zeigten, dass das Plateau der Expression des PMP-Markers CD61 auf den HPC ca. eine Stunde nach Inkubation erreicht ist, und dass die Signale über die nächsten 6 Stunden beständig sind oder geringfügig abfallen.

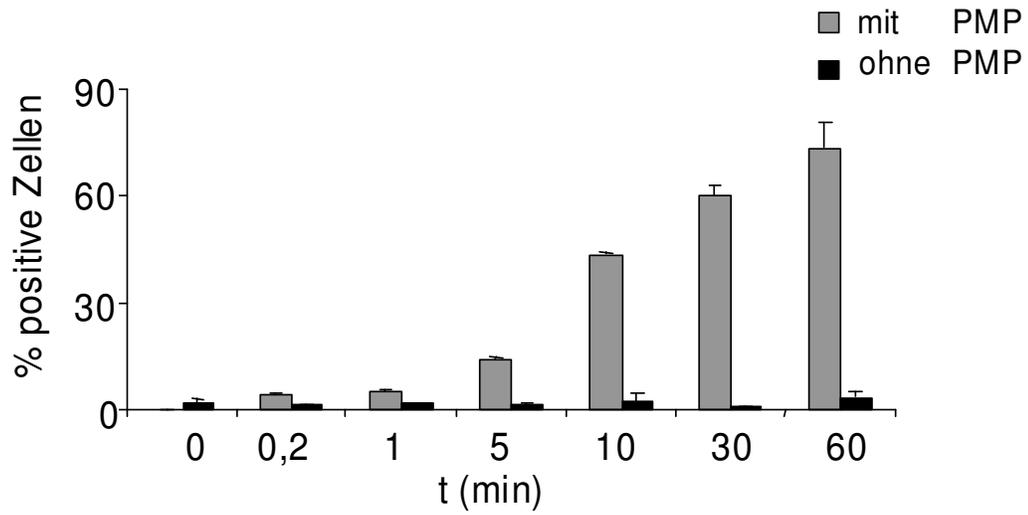
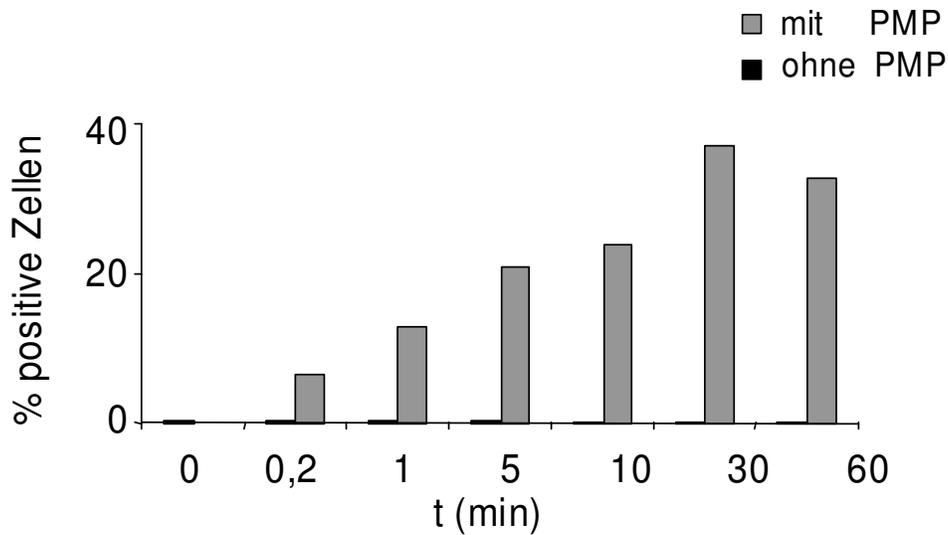
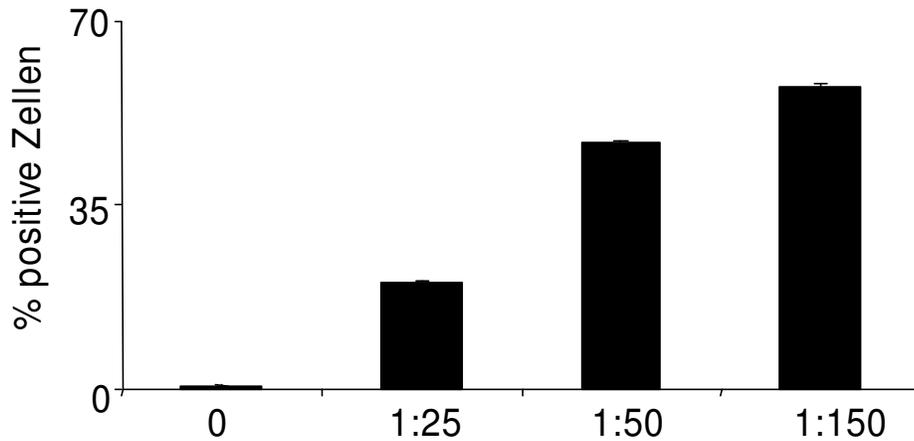
A**B**

Abb. 4.3.4: Zeitabhängigkeit der Bindung von PMP an HPC. 2×10^5 KG-1 (A) oder $CD34^+$ Zellen (B) wurden in HBSS Medium gemeinsam mit 1×10^7 PMP bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression des CD61-Antigens auf der Oberfläche der HPC durchflusszytometrisch bestimmt. Die Resultate stellen Mittelwerte \pm SD aus 3 unterschiedlichen Experimenten (A) oder je einen Messwert aus $CD34^+$ Zellen eines Spenders (B) dar.

Abb. 4.3.5 zeigt die Bindung von PMP an HPC in Abhängigkeit der PMP-Konzentration. Höhere PMP-Zahlen pro HPC korrelierten mit höheren CD61 Signalen.

A



B

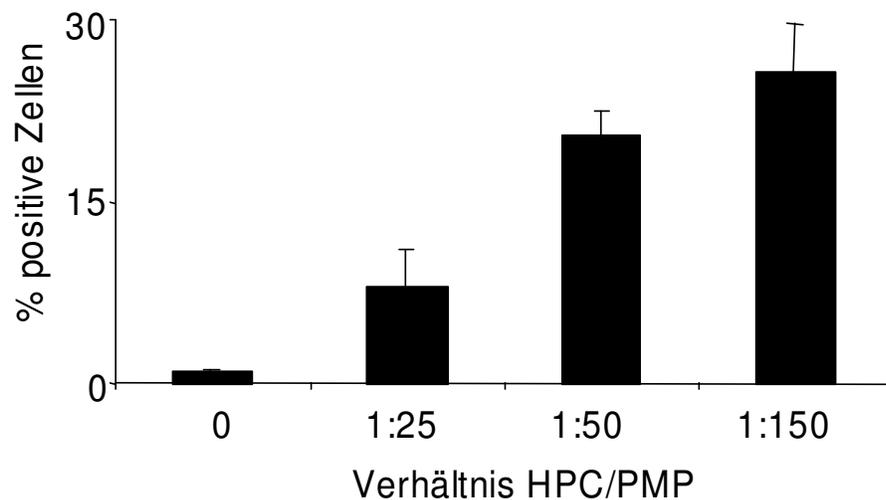
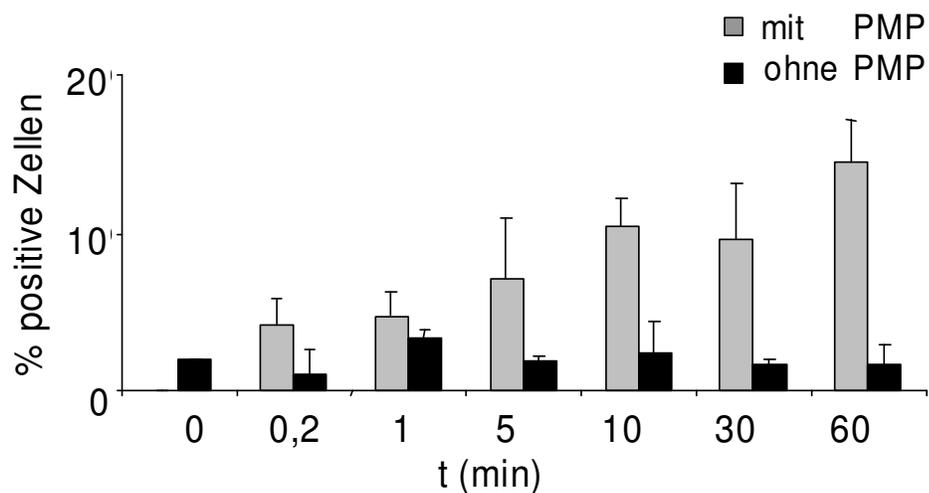


Abb. 4.3.5: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von PMP an HPC. 2×10^5 KG-1 (A) oder $CD34^+$ HPC (B) wurden in HBSS Medium gemeinsam mit 1×10^7 PMP bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Nach 30 min wurde die Expression des CD61 Antigens auf der Oberfläche der HPC durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SD aus 3 unterschiedlichen Experimenten dar.

Um der Frage nachzugehen, inwieweit auch im Blut zirkulierende Leukozyten PMP binden können, wurden immunmagnetisch selektierte $CD14^+$ Blutmonozyten oder $CD3^+$ T-Lymphozyten mit PMPs vermischt. Diese Zellen zeigten gegenüber den HPC ebenfalls eine Inkorporation von PMP, bei jedoch geringeren Frequenzen von 10 bis maximal 15% $CD61^+$ (d.h. PMP-beladenen) Zellen, gegenüber 30 – 60% positiven Zellen bei den HPC (Abb. 4.3.6).

A (CD14)



B (CD3)

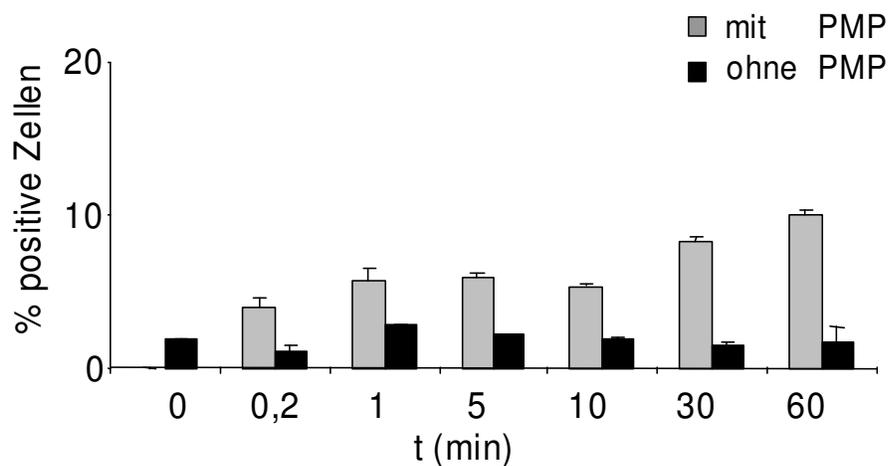


Abb. 4.3.6: Bindung von PMP an differenzierte Zellen. 2×10^5 CD14⁺ (A) oder CD3⁺ Zellen (B) wurden in HBSS Medium gemeinsam mit 1×10^7 PMP bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression des CD61 Antigens auf der Oberfläche der HPC durchflusszytometrisch bestimmt. Die Resultate stellen Mittelwerte \pm SD aus 3 unterschiedlichen Experimenten dar.

Bei der Bindung der PMP an die HPC handelt es sich um eine von der Anwesenheit von Kalzium- oder Magnesiumionen unabhängige Reaktion (Abb. 4.3.7), da die Fluoreszenz an den HPC bei Verwendung von Kulturmedien, die keine Kalzium- oder Magnesium-Ionen enthalten, nicht wesentlich verändert waren.

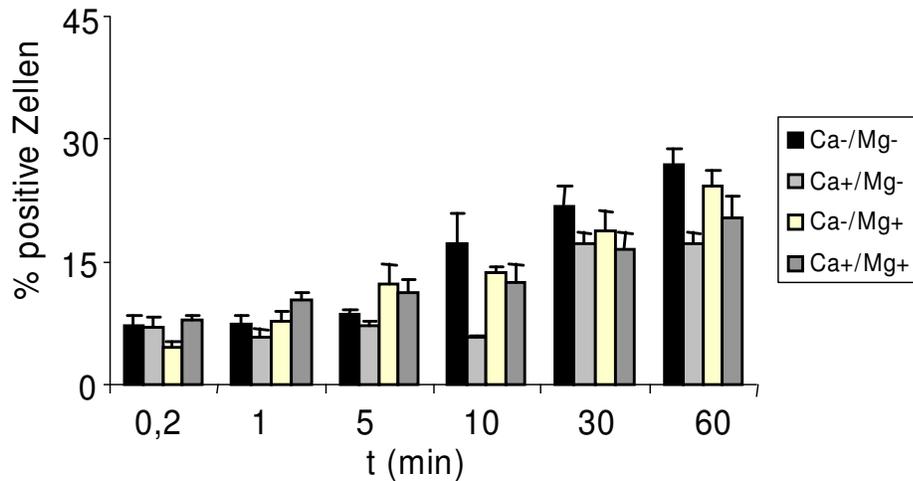


Abb. 4.3.7: Abhängigkeit der Bindung von PMP an HPC von divalenten Kationen. 2×10^7 KG1-Zellen wurden in HBSS Medium mit/ohne 10mM Ca^{2+} oder Mg^{2+} wie in der Legende angegeben ist, gemeinsam mit 1×10^7 PMP bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression des CD61-Antigens auf der Oberfläche der HPC durchflusszytometrisch bestimmt. Die Resultate stellen Mittelwerte \pm SD aus 3 unterschiedlichen Experimenten .

Weiterhin wurden Untersuchungen der Interaktion von HPC, die mit PMP präinkubiert waren, in der Flusskammer (FC) unter Flussbedingungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine mehr als 50%-ige Suppression der Zahl adhärenter HPC, wenn die Vorläuferzellen mit PMP beladen waren (Abb. 4.3.8). Dies zeigt, dass die PMP-Beladung die Adhäsion von HPC an Endothelzellen signifikant unterdrücken kann. Dieser Effekt war abhängig von der Vorinkubationszeit der HPC mit PMP.

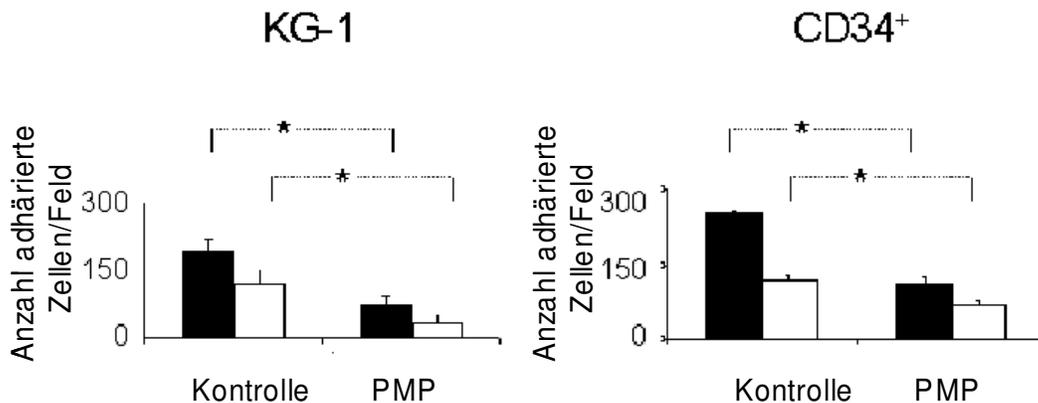
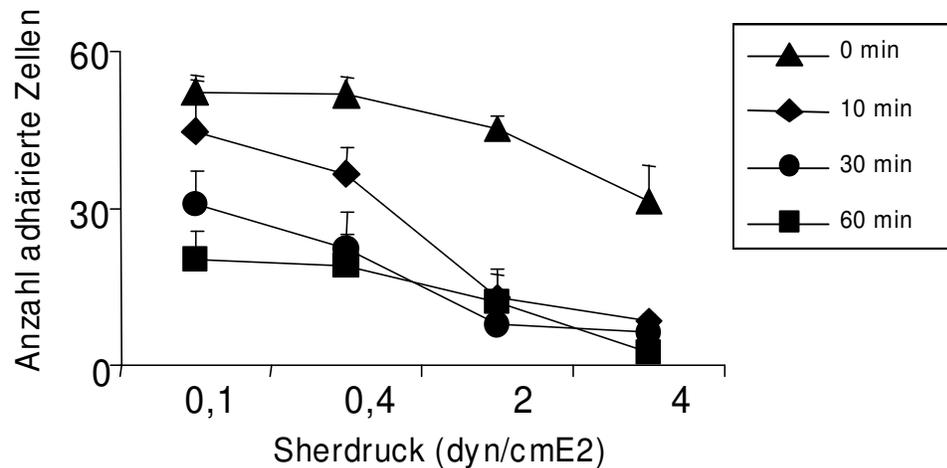


Abb. 4.3.8: Einfluss des PMPs auf die Adhärenz von HPC an TNF- α -stimulierte HUVEC-Endothelzellen in der Durchflusskammer. 1×10^6 KG-1 wurde auf CD34⁺ HPC wurden mit PMP bei 37°C und 5% CO_2 für je 1 Stunde prä-inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in der Durchflusskammer analysiert. Hierfür wurden die vorbeschichteten HUVEC-Endothelzellen über Nacht mit 10 ng/ml TNF- α behandelt. Die Adhärenz der Zellen wurde bei einem Scherdruck von 0,1 dyn/cm² (schwarzer Balken) oder 2 dyn/cm² (weißer Balken) bestimmt. Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm SD; n=3 ($p < 0.05$).

In dem in Abb. 4.3.9 dargestellten Experiment wurde statt mit Endothelzellen mit Fibronektin vorbeschichtet. Fibronektin fungiert als Ligand für das Integrin VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$). Die Daten zeigten, dass an HPC-gebundene PMP die β_1 -Integrin vermittelte Adhäsion von HPC in Abhängigkeit von vorhandenem Scherdruck supprimieren.

A



B

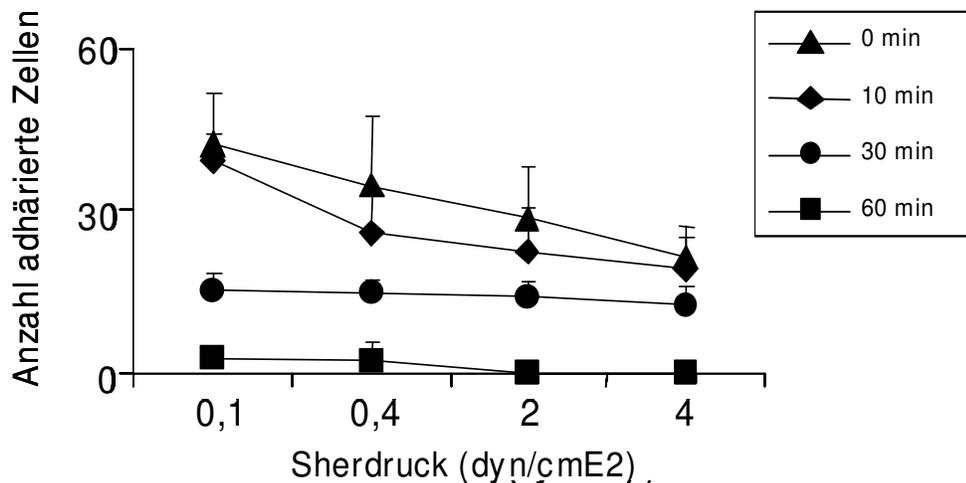


Abb. 4.3.9: Einfluss der Fibronektin-Beschichtung auf die Adhärenz von HPC in der Durchflusskammer nach Behandlung mit PMP. 1×10^6 KG-1 (A) oder CD34⁺ HPC (B) wurden für die in der Legende angegebenen Zeitintervalle mit PMP gemischt. Anschließend wurden die Zellen in die Durchflusskammer geladen und die Adhäsion an mit Fibronektin beschichtete Glassobjektträger bestimmt. Nach jeweils 1 Minute wurde der Scherdruck stufenweise wie angegeben erhöht. Die Zahl der adhärenen Zellen wurde bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD; n=3.

Aus dem 3-Phasen-Modell der Interaktion von HPC mit Endothelzellen ist bekannt, dass sowohl Selektin-, Integrin- wie auch Chemokin-abhängige Bindungen von Bedeutung sind. Um die Chemokinvermittelte Bindung näher zu untersuchen, wurden mit PMP beladene HPC im Transmigrationsexperiment in einem Gradienten des Chemokins SDF-1- α untersucht.

Abbildung 4.3.10 zeigt, dass die Migration der HPC durch die Transwellporen in Abhängigkeit der Dosis von PMP inhibiert wurde.

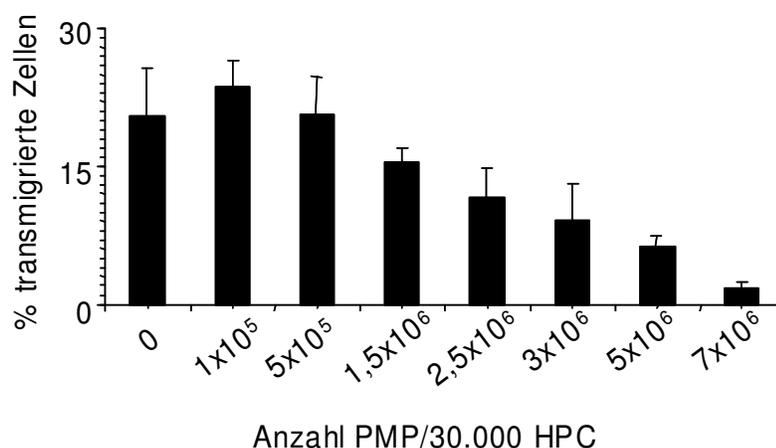


Abb. 4.3.10: Quantitative Analyse der Zahl migrierter HPC in Transwell-Kammern. FDCP-mix HPC (30.000/well) wurden in die oberen Teile einer modifizierten Boyden Transwellkammer eingesät. In die unteren Wells wurde SDF-1- α (10ng/ml) sowie verschiedene Mengen PMP eingegeben. Die Zahl der migrierten Zellen wurde nach 4h durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SD dar; n = 6.

Zusammengefasst belegen diese Resultate, dass PMP aus humanem Blut die Interaktionsbereitschaft von HPC mit Endothelzellen, Fibronektin jeweils und die Chemokinvermittelte Migration negativ regulieren.

4.4 Interaktion von Blasten der akuten myeloischen Leukämie (AML) mit Endothelzellen über Selekin-Bindungen

In diesem Teil der Studie sollte untersucht werden, inwieweit auch maligne hämatopoetische Vorläuferzellen funktionell über die zuvor mit gesunden Zellen belegten Adhäsionsmechanismen mit Endothelzellen reagieren können. Hierbei wurden primäre, aus dem Knochenmark isolierte Zellpopulationen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie verwendet, oder die aus einer Patientin mit AML abgeleitete Zelllinien KG-1. In Tab. 4.4.1 sind Alter, die FAB-Klassifikation, Karyotyp und Leukozytenwerte der analysierten Patienten zusammengefasst.

Pat.N r.	Alter	FAB Typ	Karyotyp	Blutleukozyten (x10 ⁹ /ml)
1	57	M5a	46, XY	17
2	61	biphänotyp AL	t(9 ;22), Monosomie 7	119
3	66	M4	46,XX	50
4	67	M4	46,XX	141
5	73	sec. AML	46, XY , Trisomie 8	77
6	76	sec. AML	46, XY	40
7	46	M4	46,XX	15
8	45	M5	46,XX	45
9	38	M5	46,XX	140
10	76	sec. AML	46, XY	10
11	28	M1	46,XX	120
12	67	M4	46, XY	103
13	73	M4	46, XY	108
14	66	AML n. MDS	46, XY	36
15	60	M1	46,XX	1,8
16	61	M2	t(6;11)(q27;q23)	84
17	53	M4	46,XY	198
18	38	M4	46,XX, inv16	32
19	78	M5	46,XY, inv16	48
20	49	M5	46, XY	87
21	56	M2	46, XY	19
22	63	AML n. MDS, M2	46, XY	37
23	52	M5	47,XY+8(21)	11
24	48	M2	45, X-X, t(1;19)(q12;q12)	45
25	46	M2	46, XY, t(11;17)(p15;q11)	120

Tabelle. 4.4.1: Charakteristika der Patienten aus denen die primären AML proben isoliert wurden. FAB Typ: Franko-Amerikano-Britische Klassifikation der AML (M₀-M₇).

Um die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den untersuchten AML-Blasten näher zu charakterisieren, wurde zunächst in einem Teil der Proben mittels der Durchflusszytometrie das Expressionsmuster von Selektin-Liganden und Integrin-Rezeptoren untersucht. In Abbildung 4.4.1 ist repräsentativ das Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse der Blasten eines Patienten mit einer AML vom Subtyp M5 dargestellt. Typisch für auch die meisten anderen der Proben ist die Expression von L-Selektin (CD 62L), PSGL-1 (CD162), PECAM (CD31) und, wenn auch schwächer, von β_1 Integrin (CD29). Auch die Expression von ICAM-1 (CD54) fand sich regelhaft auf den AML-Blasten; hingegen wurde die Expression VCAM-1 (CD106) sowie von P-Selektin (CD 62P) nicht beobachtet.

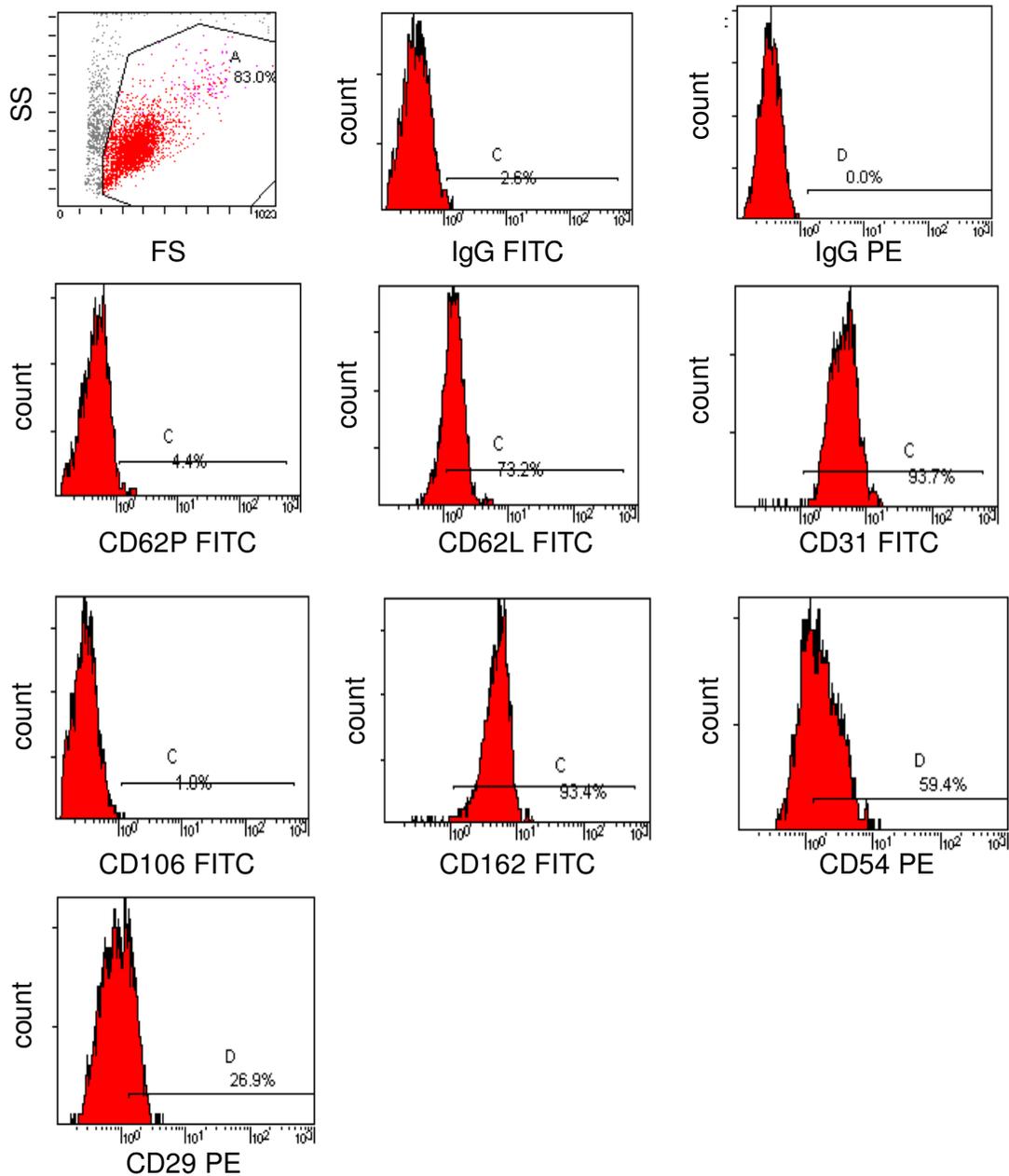


Abb. 4.4.1: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen auf AML-Blasten eines Patienten mit dem Subtyp M5. Aus dem peripheren Blut isolierte mononukleäre Zellen wurden nach Inkubation mit den in der Abbildung spezifizierten Antikörpern durchflusszytometrisch analysiert. Der Prozentsatz der im Scattergate A, sowie in den Gates C oder D positiven Zellen ist jeweils angegeben. Das Experiment zeigt ein repräsentatives Resultat aus Proben eines Patienten.

In Abbildung 4.4.2 sind die Ergebnisse von 11 solchermaßen untersuchten Patienten, geordnet nach ihrem FAB Subtyp, zusammengefasst.

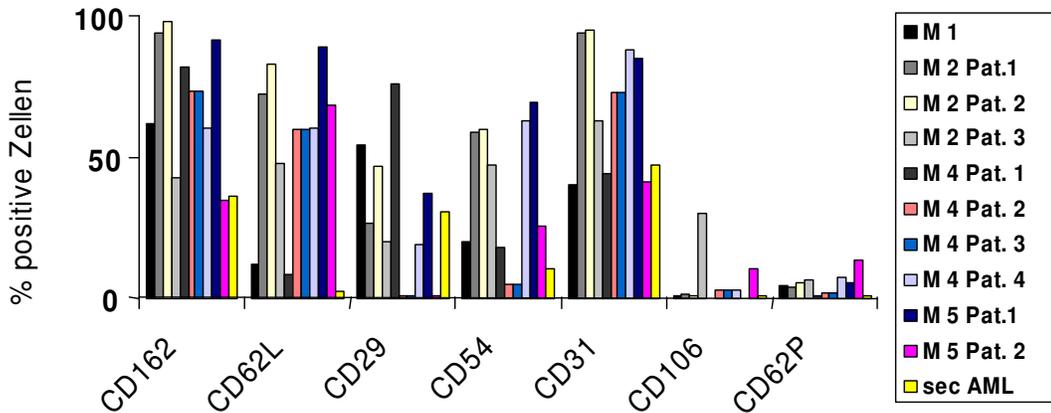


Abb. 4.4.2: Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberflächen von AML-Blasten verschiedener FAB-Subtypen, sowie sekundäre AML. Mononukleäre Zellen aus 11 AML-Proben wurden wie in Abbildung 4.4.1 beschrieben analysiert. Der Anteil positiver Zellen für die entsprechenden Oberflächenmarker ist entsprechend der in der Legende bezeichneten Farbkodierung dargestellt. Sec. AML: Patient mit sekundärer AML.

Um auch die funktionelle Kapazität der Adhäsionsmoleküle auf den AML-Zellen zu erfassen, wurde das Modell der Durchflusskammer, das im Teil 4.2 beschrieben wurde, angewandt. Hierzu wurden die AML-Blasten zunächst bei einem Scherdruck von $0,1 \text{ dyn/cm}^2$ über das mit TNF α vorstimulierte Endothel perfundiert. Anschluß wurde der Scherdruck auf 2 dyn/cm^2 erhöht und die Zahl der adhärenen Zellen erfaßt. Um den Anteil spezifischer endothelialer Selektinmoleküle auf die Adhäsion von AML-Blasten zu ermitteln, wurden monoklonale, funktionsblockierende Antikörper gegen P- und E-Selektin eingesetzt. Zunächst wurde die benötigte Menge des Antikörpers titriert. Dies ist in Abbildung 4.4.3 für den Anti-P-Selektin-Antikörper anhand der Bindung von KG1-Zellen an HUVEC-Endothelzellen gezeigt. Im Konzentrationsbereich zwischen $0,25 - 1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ korrelierte die Zahl der adhärenen Zellen invers mit der Menge des eingesetzten Antikörpers (Abb. 4.4.3). Im Gegensatz hierzu hatte ein irrelevanter eingesetzter IgG Kontroll-Antikörper keine detektierbare Wirkung.

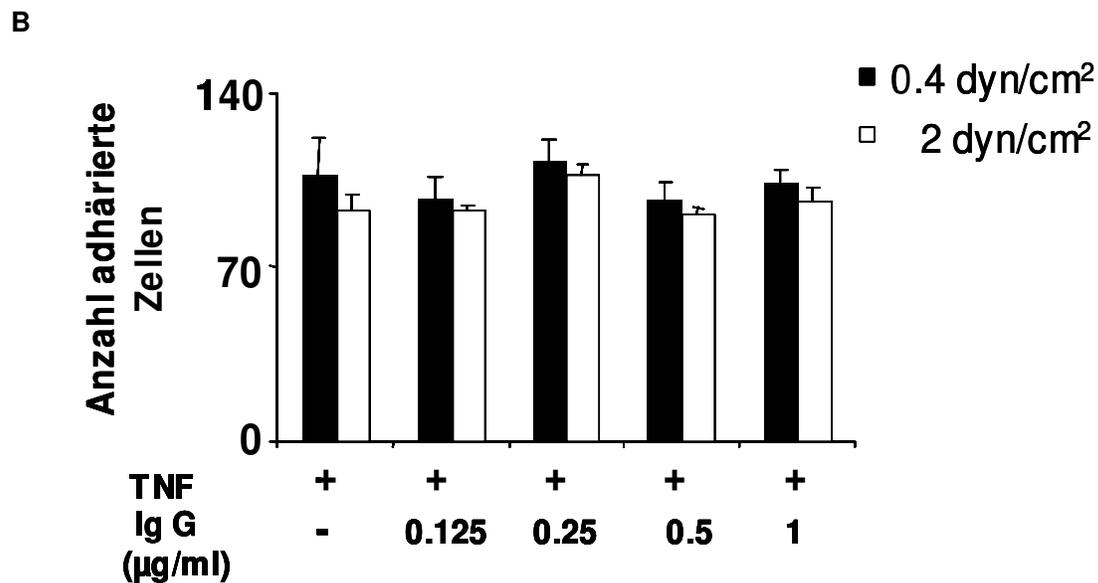
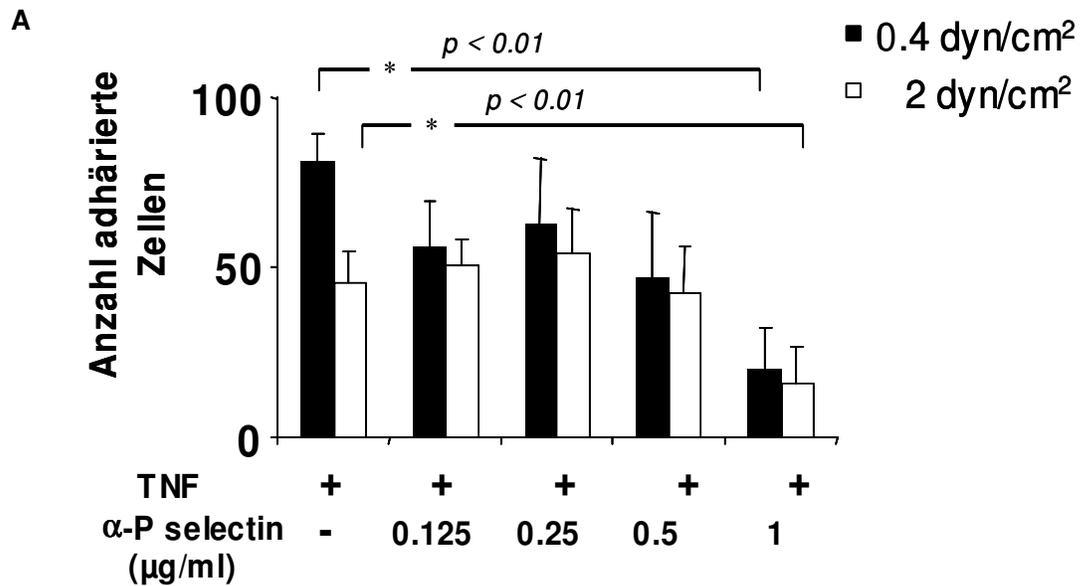


Abb. 4.4.3: Titration des funktionsblockierenden monoklonalen anti- P-Selektin Antikörpers. Nach ubernachtstimulation von HUVEC Endothelzellen mit TNF- α (10 ng/ml) wurden die Endothelzellen für eine Stunde mit dem anti-P-Selektin Antikörper (A) oder einem irrelevanten monoklonalen Antikörper (Kontroll-IgG₁, B) in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Anschließend wurden KG1 AML-Blasten bei einem Scherdruck von 0,4 dyn/cm² 10 Minuten über die HUVEC Endothelzellen perfundiert und die Zahl der adhärenten Zellen in repräsentativen Feldern bestimmt. Sodann wurde der Scherdruck auf 2,0 dyn/cm² erhöhet und die Zahl fest adharierender Zellen bestimmt. Werte: Mittelwerte \pm SD; n = 3.

Anschließend wurde das "Rolling"-Verhalten von AML-Blasten auf HUVEC-Endothelzellen in der Durchflussskammer erfasst. Die Ergebnisse aller 25 Proben

wurden hierfür einbezogen. Da die Kontrollwerte von Tag zu Tag fluktuierten, wurden alle Kontrollen auf den Wert 1 normalisiert. Nach Prästimulation der Endothelzellen mit TNF- α war die Zahl der mit intermediärer Geschwindigkeit rollenden Zellen (20-56 $\mu\text{m/s}$) gegenüber Kontrollen um ca. 25% erhöht, während die Zahl der langsam rollenden Zellen (15 – 25% $\mu\text{m/s}$) durchschnittlich auf das 5-fache gesteigert war. Gleichzeitig zeigte sich, dass sowohl durch den Anti-P-Selektin, wie auch durch den funktionsblockierenden Anti-E-Selektin Antikörper die Zahl der auf prästimulierten Endothel rollenden Zellen erheblich vermindert wurde. Am stärksten war dieser Effekt bei den langsam rollenden Zellen ausgeprägt (Abb. 4.4.4). Jedoch ergab sich auch bei den mit intermediärer Geschwindigkeit rollenden Zellen, insbesondere in Gegenwart des Anti-E-Selektin-Antikörpers, eine starke Reduktion der rollenden AML-Blasten. Die Daten zeigen, dass das Selektin-vermittelte schnelle Rolling von AML-Blasten auf der Endothelseite zum großen Teil durch die Bindung via P-Selektin und zu einem geringeren Anteil durch E-Selektin erfolgt, während das langsame Rolling stark von der Aktivierung beider Selektine abhängt.

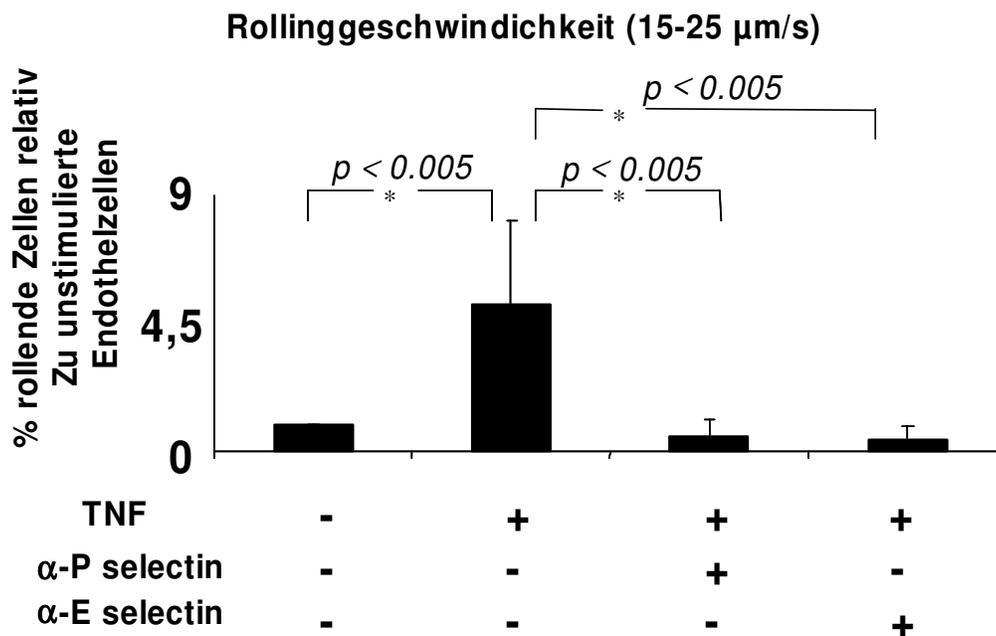
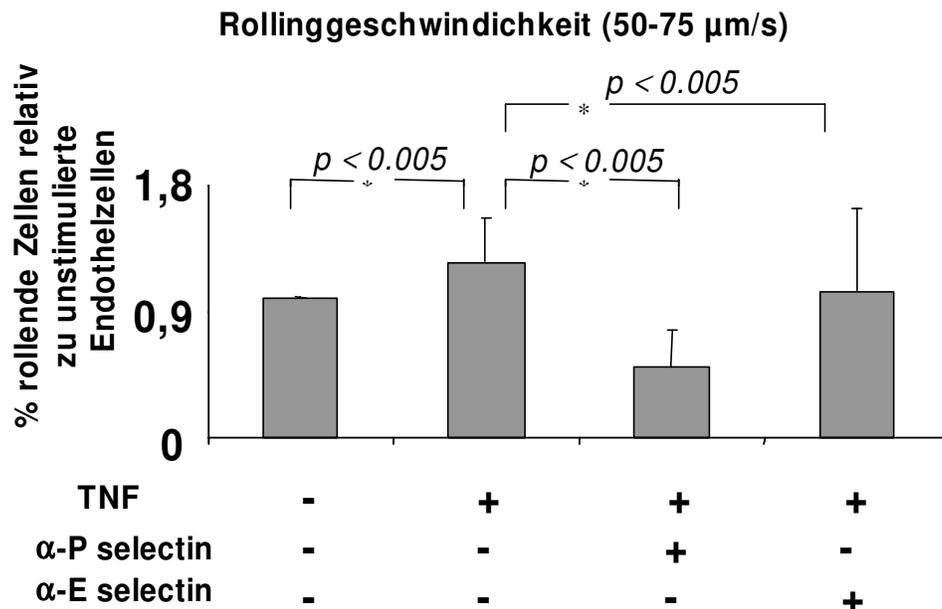


Abb. 4.4.4: "Rolling"-Verhalten von AML-Blasten auf Endothelzellen in Abhängigkeit von P- oder E-Selektin. 10^6 primäre AML-Blasten der analysierten Patienten wurden in 1 ml IMDM über prästimulierte HUVEC Endothelzellen (Prästimulation: 10 ng/ml TNF α über Nacht) perfundiert. Die Geschwindigkeit der rollenden Zellen wurde mit Hilfe von Videosequenzen über das CCD-Kamerasystem bestimmt. Die Anzahl der intermediär rollenden Zellen sowie der langsam rollenden Zellen wurde getrennt jedoch aus der gleichen Videosequenz ausgewertet. Die Werte sind: Mittelwerte \pm SD; n = 25.

Darüber hinaus wurde die feste Adhäsion der AML-Blasten an das Endothel als zweiter Endpunkt bestimmt. In Abbildung 4.4.5 sind die Resultate für die 25 analysierten Proben zusammengefasst dargestellt. Ebenso wie bei den langsam rollenden Zellen, ergibt sich eine Steigerung der Anzahl adhärierter Zellen, nach Prästimulation der Endothelzellen mit TNF α . Signifikante Erniedrigung der Anzahl adhärierter Zellen wurde Gegenwart der funktionsblockierenden anti-P-Selektin und anti-E-Selektin Antikörper gemessen (Abb. 4.4.5).

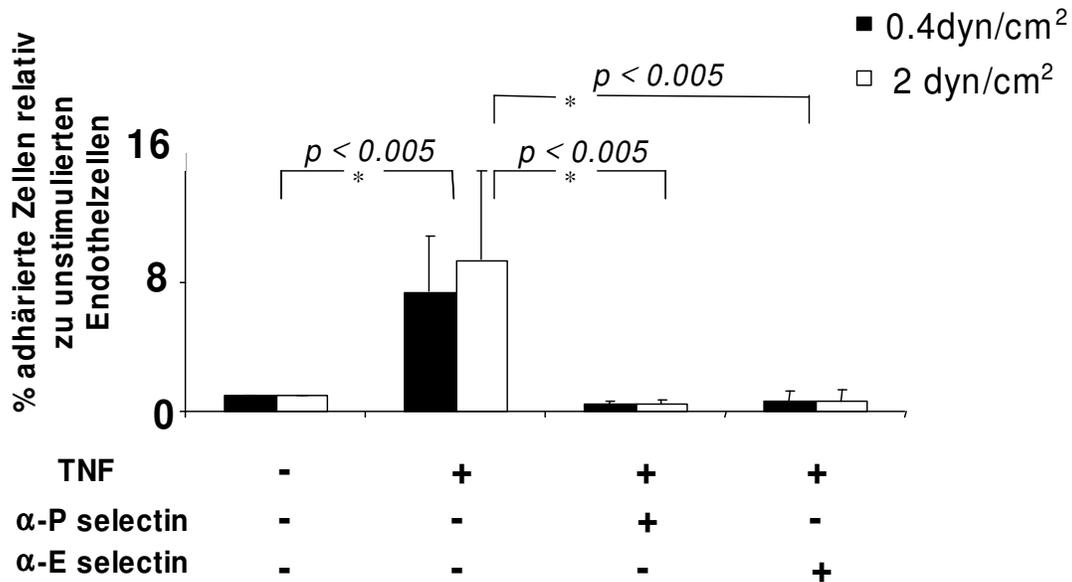


Abb. 4.4.5: Adhäsion von AML-Blasten an Endothelzellen und Einfluss von P- und E-Selektin. Nach Prästimulation von HUVEC Endothelzellen (Prästimulation: TNF α 10 ng/ml über Nacht) wurden AML-Blasten in 1 ml IMDM in der Durchflusskammer perfundiert. In Versuchen wurden jeweils auf HUVEC durchgeführt, die mit oder ohne einen Anti-P- oder E-Selektin funktionsblockierenden Antikörper prästimuliert waren. Die Perfusion erfolgte bei einem Sheardruck von 0,4 dyn/cm² über 10 Minuten, sowie anschließend nochmals für 10 Minuten bei 2,0 dyn/cm². Werte sind Mittelwerte +/- SD; n = 25.

Um die Rolle der Selektine bei der Interaktion zwischen AML-Blasten und Endothelzellen auch *in vivo* zu analysieren, wurde ein Mausmodell benutzt. Hierfür wurden normale C57BL6 Wildtyp, sowie die entsprechenden P-Selektin^{-/-} "Knockout" Mäuse auf dem im gleichen genetischen Hintergrund eingesetzt. Dabei wurde die *A. carotis communis* mikrochirurgisch präpariert und über einen Katheter Fluoreszenz-markierte KG1 AML-Blasten injiziert. Im Mikroskopfeld über dem präparierten Ohrabschnitt der Maus wurden Videosequenzen der sichtbaren zirkulierenden Fluoreszenz-markierten Zellen aufgenommen und der Anteil rollender Zellen evaluiert.

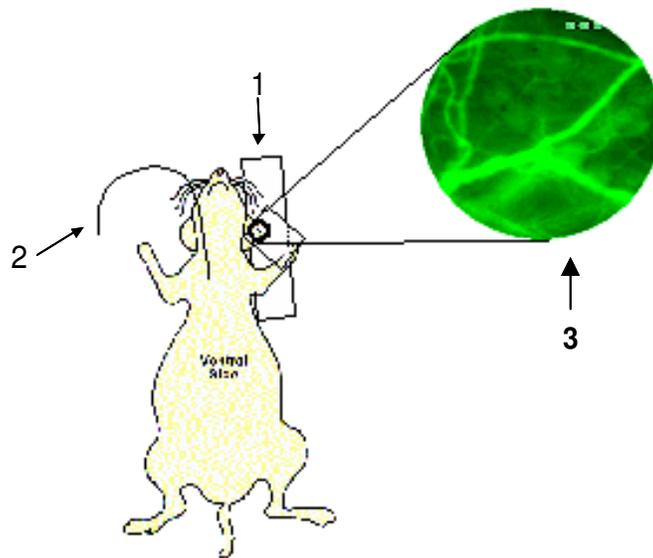


Abb. 4.4.6: Schematischer Versuchsaufbau zur intravitale Mikroskopie. Eine anästhesierte Maus wurde so fixiert, dass das Ohr über dem Sichtfeld des Mikroskops zu liegen kommt (1). Über einen Katheter in der *A. coratis communis* wurden Fluoreszenz-markierte KG1 AML-Blasten langsam injiziert (2). Im Mikroskop werden durch eine Dextran-FITC Fluoreszenz-markierte postkapilläre Venen sichtbar gemacht (3). Die Abb. wurde freundlicherweise von Dr. R. Ludwig, Zentrum der Dermatologie und Venerologie zu Verfügung gestellt.

In Abb. 4.4.6 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt. In Abb. 4.4.7 sind die Resultate der Analyse von insgesamt 9 Gefäßen in insgesamt 3 unterschiedlichen Tieren zusammengefasst dargestellt. Es zeigte sich, dass KG-1 AML-Blasten an den postkapillären Endothelzellen der Mäuse einem signifikanten Rolling unterliegen. Dagegen war die Zahl der rollenden Zellen in den P-Selektin^{-/-}-Mäusen um einen Faktor von ca. 3 erniedrigt. Dies belegt, dass KG-1 AML-Blasten auch *in vivo* ein P-Selektin-abhängiges Rollingverhalten zeigen.

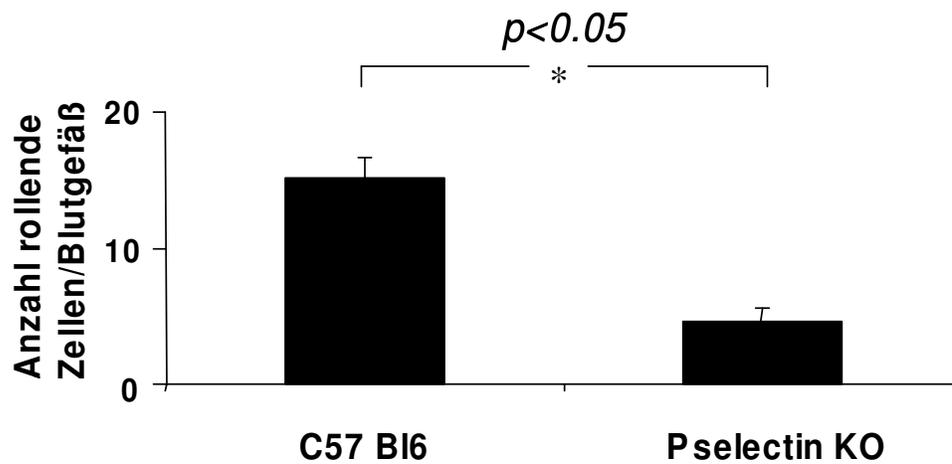


Abb. 4.4.7.: Erfassung der Interaktion von AML-Blasten mit Endothelzellen in vivo in der intravitalen Mikroskopie. Nach Injektion von 3×10^6 KG1 AML-Blasten in die *A. carotis communis* wurde über einen Zeitraum von 1 bis 2 Min die Zahl rollender Zellen in verschiedenen Gesichtsfeldern mit Hilfe der Videomikroskopie bestimmt. In jedem Experiment wurden 3 Venolen in je einer Wildtyp- sowie einer P-Selektin^{-/-}- Maus jeweils getrennt analysiert. Werte: Mittelwerte +/- SD; n = 9/3.

5.0 Diskussion

5.1 Homingverhalten repopulierender Zellen nach Transplantation in Mäusen

HSC kommen im Knochenmark, im Nabelschnurblut, im peripheren Blut nach Mobilisierung mit G-CSF sowie wie in neueren Studie belegt wurde auch in nicht-hämatopoetischen Organen wie Leber, Gehirn und quergestreifter Muskulatur vor³⁰. Die repopulierenden Zellen finden sich dabei in der Population der "Linienmarker-negativen" (Lin⁻)-Zellen²⁰. HSC befinden sich im Knochenmark meist außerhalb des Zellzyklus und können in so genannte Kurzzeit-repopulierende und Langzeit-repopulierende HSCs aufgetrennt werden². Nach Transplantation wurde beschrieben, dass sie in spezifische Nischen im Knochenmark lokalisieren³¹.

Die Effizienz, mit der HSCs in murinen Transplantationsmodellen in das Knochenmark oder die Milz als typische hämatopoetische Organe einwandern, wurde jedoch als sehr niedrig bestimmt (<10%)^{15,16}. Daher ist es möglich, dass die Mehrzahl der HSC nach einer Knochenmark-Transplantation an andere Stellen des Körpers lokalisiert. Um die Verteilung repopulierender Zellen in verschiedenen Organen und Geweben nach Knochenmarkstransplantation zu erfassen, wurden in dieser Studie Ly5.1 Knochenmarkszellen in letal vorbestrahlte syngene Ly5.2 primäre Empfängermäuse transplantiert. Die Bestrahlungsdosis betrug 11 Gy und wurde als letal beschrieben und vernichtet HSC zuverlässig und quantitativ³². 1 bis 28 Tage nach Knochenmarkstransplantation wurden aus Zellsuspensionen der Organe der primären Empfängermäuse CD45⁺ hämatopoetische Zellen präpariert und angereichert. Die kompetitive Repopulation in sekundäre Empfängermäuse, gemessen nach Kotransplantation einer konstanten Zahl von Ly5.2 Kompletitorzellen, zeigte die Anwesenheit signifikanter repopulierender Aktivitäten im Knochenmark, Milz und überraschenderweise, anders als in nicht bestrahlten nicht transplantierten Kontrollmäusen, auch in Leber, Muskel und Gehirn. Im Muskel und in der Leber erreichte die Repopulationskapazität fast diejenige des Knochenmarks. Diese Ergebnisse zeigen eine unerwartete Verteilung der repopulierenden Aktivität in transplantierten Empfängermäusen über eine Vielzahl von Organen, die bisher nicht beschrieben wurde.

Der geringe Anteil ins Knochenmark homender Zellen nach Transplantation von 2×10^5 Lin⁻ Knochenmarkzellen entspricht den Befunden anderer Gruppen^{20,33}. Es könnte allerdings sein, dass ein Anteil der repopulierenden Zellen während der Versuche nicht komplett aus den Knochen ausgespült wurde. Daten der Arbeitsgruppe von Quesenberry zeigen dass dies eher unwahrscheinlich ist. Gooddell et al beschrieben (1999)²¹, dass in nicht vorbehandelten Mäusen in verschiedenen Organen hämatopoetische Stammzellen detektierbar sind. Ihre Frequenz liegt jedoch weit unter derjenigen im Knochenmark, im Bereich von 1:100.000 Zellen oder geringer. Gegenüber diesen Studien zeigen unsere Ergebnisse nach Bestrahlung und Transplantation ein deutlich erhöhtes Repopulationspotential, das demjenigen im Knochenmark entspricht.

Einschränkend muß gesagt werden, dass eine hämatopoetische Langzeit-Repopulation noch nicht bestimmt wurde, und die Ergebnisse am ehesten dem sog. "Kurzzeit-Repopulationspotential" entsprechen. In der Studie wurden jedoch Experimente zur Bestimmung des Langzeit-Repopulationsverhaltens angelegt, die weiter verfolgt werden.

Überraschenderweise unterschied sich das Homingverhalten von Kolonie-bildenden Vorläuferzellen (CFC) deutlich von dem hämatopoetischer repopulierender Zellen. In den CD45⁺ angereicherten Zellfraktionen aus Gehirn, Muskel, Blut oder Lunge wurden nur sehr geringe Zahlen oder gar keine CFC nachgewiesen. Dies zeigt ein fundamental unterschiedliches Homingverhalten hämatopoetischer repopulierender Zellen und klonogener Vorläuferzellen. Eine Erklärung hierfür könnten die Befunde von Petit et al ergeben³⁴. Diese beschrieben, dass Organüberstände transplantierte Mäuse ein Chemoattraktionspotential für primitive Vorläuferzellen besitzen, die den Chemokinrezeptor CXCR4 exprimieren. CXCR4 wird in der Regel von HPC und HSC exprimiert. Die vorliegenden Resultate zeigen, dass in Phasen der Aktivierung wie z.B. nach Knochenmarktransplantation erhöhte Zahlen repopulierender Zellen in verschiedene nicht hämatopoetische Organe lokalisieren, die zusätzliche Reservoirs für diesen potenten Zelltyp darstellen.

5.2 Adhäsionsverhalten hämatopoetischer Vorläuferzellen an Endothelzellen

Ein erfolgreicher Homingprozess nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation stellt die Voraussetzungen für das Angehen eines Transplantats dar. Die einzelnen Schritte der Interaktion hämatopoetischer Zellen mit dem Endothel sind jedoch bisher unvollständig geklärt. Springer et al.²⁷ beschrieben ein 4-Phasen-Modell der Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen, unter Einbeziehung der Interaktion von Selektin-Liganden mit Selektinen, Integrinen sowie Chemokin-Rezeptoren auf den Vorläuferzellen und entsprechenden Liganden auf den Endothelzellen^{35 36 37}. Erst alle Schritte zusammen führen zu einer festen Adhäsion und einer anschließenden Transmigration der Zellen in das Zielgewebe.

Um den *in vivo* Homingprozeß von HSC *in vitro* nachzubilden, wurde das Durchflussskammermodell etabliert. In diesem Modell wird ein laminarer Fluß verwendet mit einem dem postkapitären Venen ähnlichem entsprechendem Scherdruck modelliert³⁸. Da P- und E-Selektin normalerweise auf Endothelzellen in Zellkultur nicht konstitutiv exprimiert oder aktiviert werden, wurde als proinflammatorische Stimulus die Prästimulation mit dem Zytokin TNF- α eingesetzt. Hierbei ist eine rasche Aktivierung von P- und E-Selektin innerhalb von 24 Stunden zu erwarten^{39 40}. In dieser Studie wurde zunächst die TNF- α induzierte P- und E-Selektin-abhängige Bindung der Vorläuferzellen an Endothelzellen nachgewiesen. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Zellen auf aktivierten Endothel rollen. In der vorliegenden Studie wurde das Selektin-abhängige Adhäsionsverhalten normaler Vorläufer und das leukämischer Blasten der AML analysiert. Dabei zeigte die Charakterisierung der Expression der Selektin-Liganden die Anwesenheit von PSGL1, dem Gegenrezeptor für P-Selektin, auf fast allen AML-Zellen.

Das "Rolling"-Verhalten der AML-Blasten entsprach demjenigen hämatopoetischer Vorläuferzellen. Gegenüber hämatopoetischen Vorläuferzellen zeigen die AML-Blasten jedoch eine stärkere Suppression des "Rolling" und auch ihrer Adhäsion nach Einsatz funktionsblockierender anti-P-Selektin-Antikörper. Zwischen verschiedenen FAB-Subtypen der AML wurden hierbei keine systematischen Unterschiede beobachtet. Die Studie zeigt erstmals, dass P-Selektin-Moleküle eine entscheidende Rolle im leukämischen Homing-Prozeß spielen könnten. Das Modell

legt nahe, dass ggf. das klinische Extravasationsverhalten, z.B. die Schleimhautinfiltration bestimmter AML-Patienten vom Selektin-abhängigen Adhäsionsverhalten der Blasten abhängt. Bisher wurde die Bedeutung von P-Selektin zwar für die Adhäsion, für das Angehen und die Proliferation von chronischen myeloischen Leukämien (CML) in einem Maustransplantationsmodell beschrieben⁴¹. Für AML sind bisher jedoch keine entsprechenden Daten bekannt.

5.3 Bedeutung von Plättchenmikropartikeln (PMP) für die Interaktion von hämatopoetischen Vorläuferzellen mit Endothel unter Flussbedingungen

Plättchen-Mikropartikel sind Fragmente der Plättchenmembran, die nach Aktivierung von Thrombozyten ins Blut abgegeben werden, oder bereits physiologisch unter Scherdruck entstehen. Ratajczak et al^{42,43} zeigten, dass HSC über die Expression des P-Selektin-Liganden PSGL-1 Thrombozyten binden, die P-Selektin exprimieren. In der Konsequenz könnten PMP an HSC binden und so gebundene PMP möglicherweise die hämatopoetische Rekonstitutionsfähigkeit der HSC nach Transplantation in vorbestrahlte Empfängermäuse beeinflussen. Diese Arbeit verwendete jedoch lediglich ein Gemisch aus aktivierten Thrombozyten und PMP, die nicht separiert wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Frage gestellt, inwieweit Wechselwirkungen aufgereinigter PMP mit hämatopoetischer Vorläuferzellen das "Rolling"- und Adhäsionsverhalten von HPC an Endothelzellen sowie ihr Migrationsverhalten gegenüber Chemokinen beeinflussen können. Zunächst mussten hierfür PMPs aus Thrombozytenkonzentraten generiert werden und physikalisch von den Thrombozyten separiert werden. In der vorliegenden Studie wurden hierfür mit Ionomycin stimulierte humane Thrombozyten und eine anschließende mehrstufige Zentrifugation verwendet. Die sedimentierten PMPs wurden mit hoher Reinheit von den Thrombozyten getrennt. Somit standen den Interaktionsstudien mit HPC erstmals isolierte PMPs zur Verfügung.

Durch die etablierte Meßmethode konnten zirkulierende PMPs im Blut von Patienten und Normal Spendern nachgewiesen werden. Im Unterschied zur Konzentration der

Thrombozyten fand sich jedoch in den verschiedenen untersuchten Gruppen jeweils eine relativ konstante Zahl von ca. 10.000 – 20.000 PMPs pro μl Blut. Im Blut von Blutstammzellspendern, die zur Mobilisierung G-CSF erhalten hatten, ergab sich ein Verhältnis von ca. 30 PMP pro eine CD34^+ HPC. In den folgenden Studien wurde daher ein Mischungsverhältnis von ca. 1:30 (HPC:PMP) eingesetzt, um das Bindeverhalten von PMPs an HPC näher zu charakterisieren.

Überrascherdeweise fand sich in den Experimenten unter Flussbedingungen auf den durch $\text{TNF-}\alpha$ vorstimulierten Endothelzellen, sowie auch in einem Transwell-Migrations-Assay in Gegenwart von $\text{SDF-1-}\alpha$, kein erhöhtes Adhäsionsverhalten der HPC sondern im Gegensatz hierzu eine drastische Reduktion der Adhäsion oder Migration der PMP-beladenen HPC. Diese Befunde entsprachen zunächst nicht der Vorhersage gemäß der Arbeit von Ratajczak et al ⁴⁴, die eine Verbesserung der hämatopoietische Rekonstitution und der Transwell-Migration beschreiben.

Hierfür sind zwei Erklärungen möglich: Zum einen könnte es sein, dass in den bisherigen Studien gar nicht PMPs, sondern die in den nicht getrennten Gemischen ebenfalls vorhandenen aktivierten Restthrombozyten für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Zum anderen ist der beobachtete Endpunkt in der Studie von Ratajczak die hämatopoetische Rekonstitution nach Transplantation, und nicht wie in dieser Studie die Bindung von HPC an Endothelzellen. In den hier verwendeten *in vitro* Flusskammermodellen wird möglicherweise eine relativ allgemeine Entzündungssituation mit den $\text{TNF } \alpha$ -stimulierten Endothelzellen nachgespielt. Es könnte ein durchaus sinnvolles Prinzip in der Natur sein, dass in einer solchen Situation die mit PMPs vorbeladenen HSCs nicht in die vorkommenden Adhäsions- und Migrationsvorgänge, die überwiegend Leukozyten und Thrombozyten involvieren, einbezogen werden. Es wäre physiologisch durchaus sinnvoll, dass hämatopoetische Vorläuferzellen, wie ggf. auch andere Zellen, vor einem Homing in unspezifische Entzündungsherde geschützt werden. Die verbesserte hämatopoietische Rekonstitution nach Inkubation von HSC/HPC mit PMP ließe sich dann sehr gut dadurch erklären, dass mit PMP vorbehandelte HSC gegenüber Kontrollen nach Transplantation ein verlängertes Zirkulationsverhalten aufweisen. Dies würde dann aus relativ häufigeren Kontakten mit den in Vergleich zur Gesamtgefäßoberfläche sehr wenigen Endothelarealen im Bereich des blutbildenden

Knochenmarks führen. Somit würde die Suppression der Bindung von mit PMP beladenen HSC/HPC an entzündungsbegleitend verändertes Endothel die Chance des effizienten Homing ins Knochenmark erhöhen.

6. Zusammenfassung

Bei der Transplantation von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSC/HPC) spielt das koordinierte "Homing" dieser Zellen in ihr Zielorgan eine wichtige Rolle. Es wurde ein *in vitro* System der Interaktion von HPC mit Endothel unter Flussbedingungen etabliert. Die Selektin- und Integrinvermittelten Schritte des Homings transplanteder hämatopoietischer Vorläuferzellen wurden analysiert. Das Homing-Verhalten repopulierender Stammzellen wurde nach Knochenmarkstransplantation im kompetitiven Repopulationsmodell untersucht. Überraschend wurde eine sehr weite Verteilung der repopulierenden Stammzellen über verschiedene Gewebe und Organe gemessen. P- und E-Selektin wurden als Schlüsselregulatoren für die Interaktion von AML-Blasten mit Endothelzellen identifiziert. Weiterhin zeigte sich, dass Plättchen-Mikropartikel (PMP) einen potenten Stimulus zur Verhinderung der Adhäsion von HPC an Endothel unter Flussbedingungen darstellen. Die Daten bilden die Grundlage für Studien zur Aufklärung von Signalwegen, die HSC bei ihrer Interaktion mit Endothelzellen während wichtiger Krankheitsprozesse spielen.

Summary

Stem and progenitor cells transplantation depends of a coordinated "Homing" in their target organ. An *in vitro* system to study of interaction between HPC and endothelial cells under shear stress was established. The selectin- and integrin-dependent steps of transplanted stem cells homing were studied. The homing behaviour of repopulating stem cells was studied after bone marrow transplant in a competitive repopulation model. Surprisingly there was a very large distribution of the repopulating cells in different organs. P- and E-selectin were identified as key-regulators for the interaction of AML-blasts with endothelial cells. Further more there was showed that platelet microparticles (PMP) are potent stimuli for the inhibition of HPC adhesion on the endothelial cells under flow. The data represent the

milestone for further studies that will investigate the signal-pathways involved in the HSC interaction with endothelial cells in different diseases.

7. Literatur

1. Metcalf D. The hematopoietic colony-stimulating factors; 1984
2. Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100 Suppl 1:11842-11849
3. Moore KA, Fletcher FA, Villalon DK, Utter AE, Belmont JW. Human adenosine deaminase expression in mice. Blood. 1990;75:2085-2092
4. Dexter TM, Spooncer E, Simmons P, Allen TD. Long-term marrow culture: an overview of techniques and experience. Kroc Found Ser. 1984;18:57-96
5. Dexter TM, Simmons P, Purnell RA, Spooncer E, Schofield R. The regulation of hemopoietic cell development by the stromal cell environment and diffusible regulatory molecules. Prog Clin Biol Res. 1984;148:13-33
6. Dexter TM, Wright EG, Krizsa F, Lajtha LG. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. Biomedicine. 1977;27:344-349
7. Eaves CJ, Eaves AC. Regulation of hemopoietic progenitor cell proliferation. Behring Inst Mitt. 1988:85-92
8. Brocades Zaalberg A, Vos O, Bekkum Van DW. Surviving rat skin grafts in mice. Nature. 1957;180:238-239
9. Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone-marrow transplantation (first of two parts). N Engl J Med. 1975;292:832-843
10. Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. Semin Hematol. 1999;36:95-103
11. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone-marrow transplantation (second of two parts). N Engl J Med. 1975;292:895-902
12. Socinski MA, Cannistra, S.A., Sullivan, R., et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. Lancet. 1988;1:1194-1198
13. Gianni AM, Tarella C, Siena S, Bregni M, Boccadoro M, Lombardi F, Bengala C, Bonadonna G, Pileri A. Durable and complete hematopoietic reconstitution after autografting of rhGM-CSF exposed peripheral blood progenitor cells. Bone Marrow Transplant. 1990;6:143-145

14. To LB, Haylock, D.N., Dowse, T., Simmons, P.J., Trimboli, S., Ashman, L.K., Juttner, C.A. A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood (PB) CD34+ cells mobilized by four different protocols and those of steady-phase PB and bone marrow CD34+ cells. *Blood*. 1994;84:2930-2939
15. Hendrikx PJ, Martens CM, Hagenbeek A, Keij JF, Visser JW. Homing of fluorescently labeled murine hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 1996;24:129-140
16. van Hennik PB, de Koning AE, Ploemacher RE. Seeding efficiency of primitive human hematopoietic cells in nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mice: implications for stem cell frequency assessment. *Blood*. 1999;94:3055-3061
17. Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:8736-8740
18. Quesenberry PJ, Srikumar K, Temeles DS, McGrath HE, Crittenden R. Stromal regulation of hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res*. 1990;352:107-114
19. Szilvassy SJ, Bass MJ, Van Zant G, Grimes B. Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by Ex vivo expansion. *Blood*. 1999;93:1557-1566
20. Szilvassy SJ, Humphries, R.K., Lansdorp, P.M., Eaves, A.C., Eaves, C.J. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:8736-8740
21. Goodell MA. Introduction: Focus on hematology. CD34(+) or CD34(-): does it really matter? *Blood*. 1999;94:2545-2547
22. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*. 2000;31:235-240
23. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105:369-377
24. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4080-4085
25. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284:1168-1170
26. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-314
27. Springer TM. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol*. 1995;57:827-872

28. Spooncer E, Boettiger D, Dexter TM. Continuous in vitro generation of multipotential stem cell clones from src-infected cultures. *Nature*. 1984;310:228-230
29. Henschler R, Piiper A, Bistran R, Mobest D. SDF-1 α -induced intracellular calcium transient involves Rho GTPase signalling and is required for migration of hematopoietic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311:1067-1071
30. Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, Mi T, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;938:208-218; discussion 218-220
31. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118:149-161
32. Joslin CA, Ramsey NW, Andrews HJ. Comparison of the lethal effect of radiation on mice for acute and protracted radiation. *Br J Radiol*. 1967;40:627-630
33. Quesenberry PJ, Stewart, F.M., Zhong, S., Habibian, H., McAuliffe, C., Reilly, J., Carlson, J., Dooner, M., Nilsson, S., Peters, S., Stein, G., Stein, J., Emmons, R., Benoit, B., Bertoncetto, I., Becker, P. Lymphohematopoietic stem cell engraftment. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;872:40-47
34. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002;3:687-694
35. DeGrendele HC, Estess P, Picker LJ, Siegelman MH. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med*. 1996;183:1119-1130
36. Bullard DC, Qin L, Lorenzo I, Quinlin WM, Doyle NA, Bosse R, Vestweber D, Doerschuk CM, Beaudet AL. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin Invest*. 1995;95:1782-1788
37. Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res*. 1996;79:1196-1204
38. Brown DC, Larson RS. Improvements to parallel plate flow chambers to reduce reagent and cellular requirements. *BMC Immunol*. 2001;2:9
39. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*. 1999;79:181-213
40. Varki A. Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:7390-7397

41. Pelletier SD, Hong DS, Hu Y, Liu Y, Li S. Lack of the adhesion molecules P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 accelerate the development of BCR/ABL-induced chronic myeloid leukemia-like myeloproliferative disease in mice. *Blood*. 2004;104:2163-2171
42. Baj-Krzyworzeka M MM, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol*. 2002;30:450-459
43. Rozmyslowicz T MM, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, Ratajczak J, Gaulton GN, Ratajczak MZ. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS*. 2003;Jan 3;17(1):33-42.
44. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Turner AR, Ratajczak J, Emerson SG, Kowalska MA, Ratajczak MZ. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*. 2001;98:3143-3149

LEBENS LAUF



Name: Bistran
Vorname: Roxana-Octavia
Geburtsdatum: 21.06.1978
Geburtsort: Deva, Hunedoara, Rumänien
Nationalität: Rumänisch
Eltern: Bistran Ioan, geboren am 30.05.1949, Rumänien
Bistran Sonia, geboren am 31.05.1950, Rumänien.
Heimatadresse: Deva, Strada Marasesti, Nr.1, 2700, Hunedoara,
Rumänien
Adresse in Deutschland: Jordanstrasse 11, 60486 Frankfurt/Main
E-mail: roxideva@yahoo.com

Schule

1984-1992 Grundschule im Deva , Rumänien
1992-1996 Gymnasium - Theoretisches Lyzeum "Decebal" Deva, Rumänien,
Schwerpunkt Mathematik-Physik-Naturwissenschaften
Durchschnittsnote der Studienjahre: 9,96
(Best-Note 10, Mindesnote für Bestehung eines Studiumsfachs: 5)

06/1996 Abitur mit Durchschnitts-Note 9,33.

Studium

- 1996-09/2002:** Studium der Humanmedizin an der Universität für Medizin und Pharmazie "Victor Babes", Timisoara, Rumänien
- 09/2002** Lizenzdiplom der Universität für Medizin und Pharmazie "Victor Babes", Timisoara, Rumänien- Allgemeine Durchschnitts-Note : 8,91
- 11/2002** Residentiat (687 von 900 Punkten) nach rumänischer Approbationsordnung entspricht dem dritten deutschen Staatsexamen, einschließlich der Approbation als Ärztin (Drept libera practica)
- 11/2005** Beruflerlaubnis als Ärztin für 2 Jahre nach deutscher BÄO
- 10/2007** Approbation nach deutscher BÄO, Titel: Doctor-medic

Weitere Aktivitäten während des Studiums

Seit September 1999 bis Juni 2002 war ich Mitglied der Gesellschaft der Medizinstudenten aus Timisoara (SSMT). In dieser Zeitspanne habe ich an der Veranstaltung von zahlreichen Tätigkeiten und Projekten innerhalb dieser Gesellschaft mitgewirkt:

- 05/1999: Veranstalter der wissenschaftlichen Tagung "Medis 99"
- 07/1999: Beteiligung an einem Kurs für Public Relations organisiert von der Kreisleitung für Jugend und Sport, Timisoara
- 11/1999-11/2001: aktives Mitglied der SSMT
- 04/2000-06/2001: örtlicher Koordinator des Projektes "Orphanage Initiative-Romania"
- 05/2000: Veranstalter der wissenschaftlichen Tagung für Medizinstudenten und junge Ärzte "Medis 2000"
- 05/2001: Veranstalter der 5. wissenschaftlichen Tagung für Medizinstudenten und junge Ärzte "Medis 2001"

Auslandsaufenthalte während des Studiums

- August 2001: Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main und Medizinische Klinik III, Einheit für Knochenmark und Stammzelltransplantation und Blutspendedienst des DRK Hessen (Labor Dr. Henschler),
- August 2002

(jeweils 4-wöchiger Gast-Aufenthalt, gefördert durch Stipendium der Universität „Victor Babes“)

Tätigkeit nach Abschluss des Studiums

01.03.2005-30.10.2005 Wissenschaftlicher Gastaufenthalt am Klinikum der J.W.-Goethe-Universität, KMT-Labor der Medizinischen Klinik III und Abt. für Transfusionsmedizin, BSD Hessen des DRK mit dem Ziel der Promotion: Titel: „Homingverhalten normaler und leukämischer Vorläuferzellen (HPC)“

01.11.2005-31.01.2006→ Assistenzärztin in Städtische Kliniken Frankfurt Höchst, Abteilung Kardiologie (Notaufnahme)

01.02.2006-21.12.2006→Assistenzärztin in Städtische Kliniken Frankfurt Höchst, Abteilung Hämatologie-Onkologie

Fremdsprachen: Englisch, Deutsch, Italienisch, Spanisch

PC-Kenntnisse: Microsoft Word, Excel, Power Point, E-mail, Internet.

Publicationen:

□ **1:** Păunescu V, Deak E, Herman D, Siska IR, Tănasie G, Bunu C, Anghel S, Tatu CA, Oprea TI, Henschler R, Ruster B, **Bistriean R**, Seifried E.

In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. J Cell Mol Med. 2007 May-Jun;11(3):502-8.

□ **2:** Ruster B, Göttig S, Ludwig RJ, **Bistriean R**, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R.

Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. Blood. 2006 Dec 1;108(12):3938-44. Epub 2006 Aug 8.

□ **3:** Ludwig RJ, Alban S, **Bistriean R**, Boehncke WH, Kaufmann R, Henschler R, Gille J.

The ability of different forms of heparins to suppress P-selectin function in vitro correlates to their inhibitory capacity on bloodborne metastasis in vivo. Thromb Haemost. 2006 Mar;95(3):535-40.

□ **4:** Richter R, **Bistriean R**, Escher S, Forssmann WG, Vakili J, Henschler R, Spodsberg N, Frimpong-Boateng A, Forssmann U.

Quantum proteolytic activation of chemokine CCL15 by neutrophil granulocytes modulates mononuclear cell adhesiveness.
J Immunol. 2005 Aug 1;175(3):1599-608.]

□ **5: Henschler R, Fehervizyova Z, Bistrrian R, Seifried E.**
A mouse model to study organ homing behaviour of haemopoietic progenitor cells reveals high selectivity but low efficiency of multipotent progenitors to home into haemopoietic organs.
Br J Haematol. 2004 Jul;126(1):111-9.

□ **6: Henschler R, Piiper A, Bistrrian R, Möbest D.**
SDF-1alpha-induced intracellular calcium transient involves Rho GTPase signalling and is required for migration of hematopoietic progenitor cells.
Biochem Biophys Res Commun. 2003 Nov 28;311(4):1067-71.

Andere Artikeln in Vorbereitung:

1: R. Bistrrian, H. Martin, R. Henschler
Acute Myeloid Leukemia (AML) Blasts Adhere to Endothelial Cells via P- and E Selectin

2: R. Bistrrian, H. Martin, E. Seifried, A. M. Müller, R. Henschler ,
Multi-Organ Homing of Repopulating Hematopoietic Cells after Bone Marrow Transplantation in Mice.

3: R. Bistrrian, H. Martin, E. Seifried , R. Henschler, Rüter B
Platelet Microparticles (PMP) Influence the Homing behaviour of hematopoietic progenitor cells.

Danksagung

Herzlichen Dank an Herrn Professor Dr. med. Erhard Seifried für die Möglichkeit meiner Doctorarbeit in seinem Institut durchzuführen, an Herrn Pd. Dr. med. Hans Martin für das sehr interessante zur Verfügung gestellte Promotionsthema.

Besonders danken möchte ich Herrn dr. med. Reinhard Henschler, der die Zusammenfassung dieser Arbeit betreut hat und mir bei allen Fragen stets hilfreich zur Seite stand.

Ich danke für die freundliche und kompetente Betreuung und Unterstützung an den experimentelle Teil durch Frau Brigitte Rüter und für die schnelle Hilfe an alle Mitarbeiter aus dem Forschungslabor Dr. Henschlers und Med. Klinik. II, besonders aus dem KMT Labor.

Ich bedanke mich an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, vor allem an meine Familie, bei meinem lieben Mann der mich immer unterstutzt hat und bei meinem lieben Sohn für seinem Geduld.

Zuletzt danke ich an Herrn Prof. Dr. Prakasch Chandra und seiner Frau Angelika Chandra, die mir mit ihrem Rat stets zur Seite standen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel „Homingverhalten von normalen und leukämischen hämatopoetischen Progenitorzellen,“ in dem Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, Med. Klinik II Hämatologie und dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, DRK Blutspendedienst, Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Pd. Dr. med. Hans Martin mit Unterstützung durch Dr. med Reinhard Henschler ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.
Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher in keinem Publikationsorgan veröffentlicht.

Frankfurt am Main, den 07.12.2007