

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor Herr Prof. Dr. Schmoll)

Charakterisierung homingrelevanter Eigenschaften
adulter hämatopoetischer Blutstammzellen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jens Abendroth
geboren am 27. Oktober 1981 in Osnabrück

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Joachim Schmoll, Halle (Saale)
Prof. Dr. William Krüger, Greifswald
PD Dr. Herbert G. Sayer, Jena

01.12.2009

13.12.2010

Gewidmet den Patienten, die diese Forschung erst ermöglichen.

Referat

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist ein seit nahezu zwei Jahrzehnten etabliertes Behandlungsverfahren in der Therapie hämatologischer und onkologischer Neoplasien: neben der Fremdspenderstammzelltransplantation kommt auch der Reinfusion autologer hämatopoetischer Stammzellen nach hochdosierter Chemotherapie klinische große Bedeutung zu. Überwiegend handelt es sich dabei um peripher gewonnene hämatopoetische Stammzellen nach Stimulation mit Granulozyten stimulierendem Wachstumsfaktor (G-CSF).

Die kryokonservierten Zellen werden nach Abschluss der Chemotherapie intravenös verabreicht, repopulieren das Knochenmark und sind nach ca. 2 Wochen in der Lage, eine ausreichende Zahl von Thrombozyten und Granulozyten im peripheren Blut zu gewährleisten. Der Prozess der "Wiedererkennung" und Ansiedlung dieser Stammzellen im Stroma des Knochenmarks wird als "Homing" bezeichnet. Während die Charakterisierung der pluripotenten Vorläuferzellen der Hämatopoese über Bestimmung des Cluster of Differentiation 34 – Antigens (CD34) klinisch routinemäßig erfolgt, sind die Antigenstrukturen dieser Zellen bezüglich Engraftment, Proliferation und Differenzierung im Zusammenhang mit dem Homing - Phänomen bislang wenig untersucht. In der vorgelegten Arbeit wurden bei 32 Patienten mit hämatologischen und onkologischen Erkrankungen Blutstammzellapheresate der klinischen Routine mittels fluoreszenzaktiviertem Zellsorting untersucht. Diese Antigenstrukturen haben dabei nicht nur eine funktionale Bedeutung sondern spiegeln auch einen Entwicklungszustand der Zelle wider. Wir fanden bei 62 % der untersuchten Proben eine Expression des Rezeptors für den Stem Cell Factor, bei nur 44 % die Expression des Rezeptors für den Stromal Cell Derived Factor und bei 48 % eine Expression des CD133. Wir sehen in der Variabilität des Nachweises dieser Antigenstrukturen eine Bedeutung für den Homingprozess; möglicherweise kann der Nachweis einzelner Marker als prognostisch relevantes Kriterium für den Erfolg der Stammzellretransfusion herangezogen werden.

Abendroth, Jens: Charakterisierung homingrelevanter Eigenschaften adulter hämatopoetischer Blutstammzellen
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 41 Seiten, 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Die hämatopoetische Stammzelle als adulte Stammzelle	2
3	Die hämatopoetische Stammzelle und das Knochenmarkstroma	4
4	Die Auswahl der Rezeptoren – Grundlagen und Zusammenfassung	5
4.1	Chemokinrezeptor 4 (CD184)	6
4.2	Interleukin 3 - Rezeptor (CD 123)	7
4.3	Interleukin-8 – Rezeptor (CD 128)	7
4.4	Stem cell factor-Rezeptor (CD117)	8
4.5	Very Late Antigen 4 (CD49)	8
4.6	CD38	9
4.7	Vascular endothelial growth factor – Rezeptor 1 (flt-1)	9
4.8	Vascular endothelial growth factor (VEGF-A)	10
4.9	Matrixmetalloprotease 9 (MMP9)	11
4.10	Hematopoietic stem cell antigen (CD 133).	12
5	Materialien und Methoden	13
5.1	Proben	13
5.2	Antikörper	14
5.3	Zur Methodik des FACS	17
5.4	Statistische Auswertung	17
6	Ergebnisse	18
6.1	Analyse der Proben	18
6.2	Vergleich bezüglich des Alters	20
7	Diskussion	21
8	Literaturverzeichnis	26
9	Anhang	38
9.1	Messverfahren	38
9.2	Verzeichnis der verwendeten Reagenzien und Antikörper	39
	Thesen	41

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

BFU	Burst Forming Units
CFU	Colony Forming Unit
CD	Cluster of differentiation
CD34	Cluster of differentiation 34
CD184	Cluster of differentiation 184, CXCR4, SDF – 1 - Rezeptor
CD123	Cluster of differentiation 123, Interleukin – 3 - Rezeptor
CD128	Cluster of differentiation 128, Interleukin – 8 - Rezeptor
CD133	Cluster of differentiation 133, AC133, Hematopoietic stem cell antigen
CD117	Cluster of differentiation 117, c-kit, Stem – Cell – Factor – Rezeptor
CD49	Cluster of differentiation 49, Very late antigen 4, VLA - 4
CD38	Cluster of differentiation 38
FACS	Fluorescens Activated Cellsorting, Fluoreszenzaktiviertes Zellsorting
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
G-CSF	Granulozytenstimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten – Makrophagenstimulierender Faktor
HSC	Hämatopoietic Stem Cell, Hämatopetische Stammzelle
MMP9	Matrix Metalloprotease 9
SCF	Stem – Cell – Factor
SDF – 1	Stromal Cell derived Factor 1
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Schlagworte: CD34, Stammzelltransplantation, Homing, Engraftment

1 Einleitung

Seit fast 100 Jahren gibt es Hinweise auf die Entwicklung der Zellen des Blutes aus einer gemeinschaftlichen hämatopoetischen Stammzelle. (Jansen et al., 2005). Heute ist das Wissen um die Morphologie und die Funktionalität dieser Art der adulten Stammzelle umfangreicher und wird für die klinische Routine genutzt. Die Zellen der Erythropoese, Granulozytopoese, der Lymphozytopoese, des Monozyten-Makrophagensystems und der Megakaryozytopoese haben ihren gemeinsamen Ursprung in einer hämatopoetischen Stammzelle, die zum Zweck der Zelltherapie isoliert, kryokonserviert und transplantiert wird. Nach intravenöser Reinfusion der Stammzellkonzentrate erfolgt eine Repopulation des Knochenmarks. Eine extramedulläre Hämatopoese ist klinisch auf seltene Krankheitsbilder der Osteomyelofibrose oder auf die fetale Hämatopoese beschränkt. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Knochenmarkstromazellen für die Hämatopoese.

Die Mobilität der hämatopoetischen Stammzellen ist schon in der Fetalperiode ausgeprägt (Dzierzak et al., 1995). Die fetalen Stammzellen (Hämangioblasten) sind an der Angiogenese beteiligt. Dies verdeutlicht die Fähigkeiten der Vorläuferzellen. Die Relevanz dieser Fähigkeit wird später umso wichtiger, wenn es um Neovaskularisation und Wundheilung geht.

Hämatopoetische Stammzellen finden sich üblicherweise nur im Knochenmark und im Nabelschnurblut. Nur nach massiver Stimulation mit Wachstumsfaktoren werden sie für kurze Zeit auch in das periphere Blut ausgeschwemmt. Daher unterscheiden sich die peripher gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen sowohl hinsichtlich ihres Entwicklungsstandes als auch hinsichtlich ihrer Oberflächenantigenexpression von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks.

Die adulte hämatopoetische Stammzelle ist durch ihre Eigenschaft, in geeigneten Nährmedien Kolonien auszubilden, ihre Morphologie und die Expression des Oberflächenstrukturmerkmals Cluster of Differentiation (CD) 34 charakterisiert.

Nachdem 1984 auf der hämatopoetischen Stammzelle das Merkmal des Cluster of Differentiation 34 (CD34) entdeckt wurde und vor ca. 25 Jahren die erste Transplantation von peripheren Blutstammzellen erfolgte, ist dieses Verfahren inzwischen etabliert und wird erfolgreich unter verschiedenen Indikationen angewandt. Mit zunehmenden molekularbiologischen Kenntnissen und Möglichkeiten der Analyse wächst zudem das Wissen über die Stammzelle.

In über 95 % der Transplantationen wird auf hämatopoetische Stammzellen aus dem peripheren Blut zurückgegriffen. Zunächst erfolgt die Mobilisierung der Stammzellen mit Cytokinen: hierzu zählt vor allem der Granulozyten stimulierende Faktor (G-CSF), aber auch der Granulozyten und Makrophagen stimulierende Faktor (GM – CSF) sowie der Stem Cell Factor (SCF). Diese bewirken unter anderem eine Differenzierung der toti- und pluripotenten Stammzelle zu Granulozyten. Homing ist dabei ein wesentlicher Bestandteil der Regeneration der Hämatopoese, abhängig von den physiologischen Eigenschaften der Zellen selbst und ihrer Umgebung. Dabei wird beobachtet, dass die Stammzelle für diesen Prozess den komplexen Ablauf von Homing und Engraftment (Lapidot et al., 2005) durchlaufen muss. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Auswahl der Oberflächenstrukturen und Eigenschaften versucht dabei, wesentliche Teilelemente des Weges von der Peripherie in das Knochenmark widerzuspiegeln.

Grundlage dieser Arbeit ist die Fragestellung, inwiefern der Phänotyp der peripher entnommenen Stammzelle variabel ist und ob die weitere Subcharakterisierung der CD34⁺ Zellen zusätzliche Informationen in Bezug auf das Homingpotential der Zellen bringen kann.

2 Die hämatopoetische Stammzelle als adulte Stammzelle

Der erste Nachweis einer Oberflächenstruktur, die eine hämatopoetische Stammzelle charakterisiert, wurde 1984 von Civin et al. geführt (Civin et al., 1984). Unter Beachtung morphologischer Eigenschaften beschrieb er My10 als ein Molekül, welches gehäuft bei entsprechend potenten Vorläuferzellen vorkommt und heute als CD34 klassifiziert wird. Andere Autoren wie Watt und Sutherland bestätigten diese Erkenntnisse (Watt et al., 1987). Sutherland et al. klärten auch die Struktur des Proteins und seine Einzigartigkeit (Sutherland et al., 1988). Strukturell handelt es sich um ein Glykoprotein, genauer ein Sialomucin (Krause et al., 1994). Es ist etwa 115 bis 120 kD groß, wobei die exakte Struktur der extrazellulären Domäne des CD34 vom Funktionszustand abhängt (Gangenahalli et al., 2006). Die Regulation und Funktion dieses Moleküls gehen dabei über die beschriebene Rolle als Marker für Vorläuferzellen hinaus. Untersuchungen an Endothelzellen von Gefäßen wiesen auf eine Rolle in der Zell – Matrix – Interaktion hin (Fina et al., 1990). Schon in einer frühen Arbeit wurde die Interaktion zwischen der hämatopoetischen Stammzelle und dem

Knochenmarksstroma über CD34 beschrieben (Healy, 1995). Majdic et al. wiesen in diesem Zusammenhang die Reaktion von Zellen unter anderem auf Antikörper gegen CD34 – Epitope nach (Majdic et al., 1994). Hier zeigte sich eine deutliche Veränderung in der Struktur des Zytoskelettes mit den Folgen einer Veränderung des Zellzustandes, einer zunehmenden Motilität und Adhäsion. Der Ligand ist jeweils L - Selectin (Baumheler et al., 1993). Ebenfalls in der Arbeit von Majdic et al. wurde der Weg der Signaltransduktion untersucht. Herbimycin A, ein Inhibitor der Proteinkinase C, führte zu einer Abnahme der Aggregation der Zellen untereinander. Hinweisend auf diesen Weg der Transduktion ist auch die Hochregulation von CD34 auf eine Stimulation der Proteinkinase C hin (To et al., 1997). CD34 erweist sich demnach als ein Protein mit multiplen Funktionen, welche unter anderem Migration und Adhäsion der Zellen betreffen.

Auch wenn die frühen Versuche – wie oben beschrieben - zu einer CD34⁺ - Selektion der hämatopoetischen Stammzellen in Forschung wie klinischer Anwendung führten (To et al., 1997), fanden sich auch CD34⁻ Zellen, die es ermöglichten, die Lympho- und Hämatopoese wieder aufzubauen (Osawa et al., 1996; Goodell et al., 1996).

Offenbar ist es nicht ohne weiteres möglich, den Begriff „Hämatopoetische Stammzelle“ mit den CD34⁺ Knochenmarksstammzellen gleichzusetzen. Hinweisend können jedoch die Eigenschaften von embryonalen Stammzellen sein (Haar, Ackermann, 1971). Auf diesen sind ebenfalls die für die Transplantation relevanten Rezeptoren erkennbar, so zum Beispiel CD184 (Kyba et al., 2002). In der frühen Phase der Erforschung wurden für die Stammzelle weitere Oberflächenstrukturen definiert, die für Stamm- oder Vorläuferzellen typisch sein sollten (Weissmann et al., 2001). Eine andere Herangehensweise bietet die Arbeit von Dykstra et al. (Dykstra et al., 2006). Mit einem Videoverfahren wurden vorher selektierte CD45^{mid}lin⁻Rho^{SP} – Zellen in vitro kultiviert. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass auch morphologische Kriterien angelegt werden können, die das Aussehen und die Veränderung im Rahmen des „self – renewal“ betreffen, wie es auch schon Majdic et al. untersucht haben (Majdic et al., 1994). Auch auf genetischer Ebene lassen sich Merkmale finden, die typisch für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen sind (Terskikh, 2003). Die Vielfältigkeit in der Fähigkeit zur Repopulation wurde von Sieburg et al. festgestellt (Sieburg et al., 2006). Es fanden sich verschiedene Muster der Repopulation, so dass die Autoren darauf schließen, dass schon im Knochenmark verschiedene Differenzierungsgrade dieser Zellpopulation vorhanden sein müssen, deren damit möglicherweise unterschiedliche Funktion ausschlaggebend ist für den Erfolg der Transplantation.

Somit findet sich keine umfassende Definition für die „Hämatopoetische Stammzelle“.

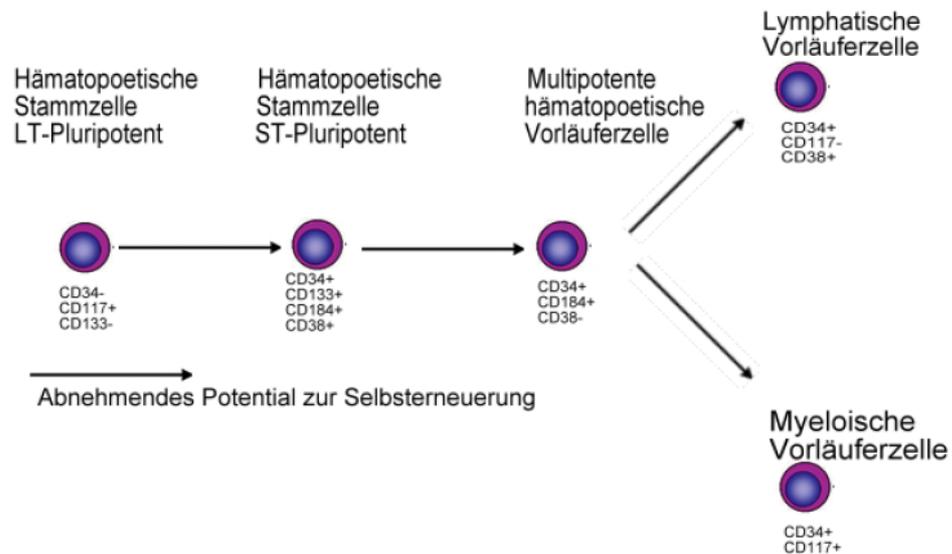


Abbildung 1: Expression der hier detektierten Oberflächenstrukturen im Rahmen der Stammzellendifferenzierung (LT: Long Time, ST: Short Time)

3 Die hämatopoetische Stammzelle und das Knochenmarkstroma

Als Stammzellnische wird der intersinusoidale Raum im Knochenmark angesehen (Dorshkind, 1990). Historisch finden sich erste Darstellungen der hämatopoetischen Vorläuferzellen 1958 (Donohue et al., 1958), der Begriff „Stammzellnische“ wurde 1978 von Schofield geprägt (Schofield, 1978). Osteoblasten sind bei der Erhaltung und der Differenzierung der hämatopoetischen Progenitorzellen (Taichman et al., 1996) ein entscheidender Faktor für die Entstehung der „Colony Forming Units“ (CFU), den Zellpopulationen, im Rahmen derer sich die adulten hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Insbesondere die Sekretion von SDF-1 durch Osteoblasten, Fibroblasten und Endothelzellen ist dabei entscheidend für die (Re-)Population des Knochenmarks.

Einen Hinweis auf die umfangreiche Regulation der Ansiedlung der Vorläuferzellen gibt die Untersuchung des Verhaltens transplanteder Zellen. Dabei fanden sich ein klar strukturierter Ablauf der Repopulation der Nische und eine unterschiedliche Ansiedlung der Stammzellen im Bezug auf ihre Eigenschaften. Vordifferenzierte Zellen siedeln sich

demnach vorwiegend im zentralen Knochenmark, undifferenzierte eher im Bereich des Endost an (Nilsson et al., 2001). Der direkte Kontakt zu Osteoblasten reguliert dabei die Differenzierung (Arai, 2004). Die Notwendigkeit intakter Osteoblasten ergibt sich aus der Arbeit von Visnjic et al., in der gezeigt werden konnte, dass eine induzierte Entwicklungsstörung der Osteoblasten zu einer Abnahme der Hämato- und Leukopoese führt (Visnjic, 2004). Bhatia et al., erarbeiteten hierzu die Rolle der „bone morphogenetic proteins“, Proteinen, die eine proliferationsfördernde Wirkung auf CD34⁺ Vorläuferzellen haben und zudem bei einer Subpopulation den Differenzierungsgrad nicht weiter steigern (Bhatia et al., 1999). Die Interaktion wurde insbesondere zurückgeführt auf den Zell–Zell–Kontakt, wobei die Bindungen über n-Cadherin und beta-Catenin zwischen Osteoblasten und Vorläuferzellen eine proliferative Wirkung haben können (Zhang et al., 2003). Ebenso fördert die Stimulation von Osteoblasten mittels Parathormon das Wachstum der Vorläuferzellen (Calvi et al., 2003). Als weitere Interaktionsfaktoren ist Osteopontin bekannt geworden, das von Osteoblasten sezerniert wird und sowohl für die Migration, die Adhäsion als auch die Proliferation wichtig ist (Nilsson et al., 2005). Auch die Rolle des Granulozyten – Kolonie stimulierenden Faktors G-CSF als mobilisierendem Faktor für Vorläuferzellen (Petit et al., 2002) ist bekannt, ebenso die Bedeutung der Bestrahlung des Patienten und der konsekutiven Freisetzung von Wachstumsfaktoren (Heissig et al., 2005). Auch ist eine Interaktion der CD34⁺ Stammzellen mit Endothelzellen zu beobachten (Li et al., 2004). Li et al. sahen eine häufigere Ausbildung von „Colony forming units (spleen)“, wenn die Vorläuferzellen mit Endothelzellen und Wachstumsfaktoren kokultiviert wurden.

Die Hypothese der Stammzellnische als wichtigem Ort des Wachstums der CD34⁺ Zellen nach dem Homing ist umfangreich bestätigt worden und liefert ein Modell für das Ziel der Vorläuferzellen. Zusätzlich wurde aber auch dokumentiert, dass schon im Vorfeld im Bereich der Gefäße der Zell–Zell–Kontakt zu Endothelzellen eine Rolle spielen kann.

4 Die Auswahl der Rezeptoren – Grundlagen und Zusammenfassung

Der Prozess des Homing ist eine komplexe Abfolge von einzelnen Leistungen der Zelle, die bestimmte Rezeptoren erfordern. Um beschreiben zu können, in welchem

Maße die Vorläuferzellen dazu in der Lage sind, diese Leistungen zu erbringen, wurde durch uns eine Auswahl von Rezeptoren und Faktoren getroffen, die repräsentativ für verschiedene Funktionen sind und das Leistungsvermögen der Vorläuferzelle repräsentieren. Bei der Auswahl spielten vor allem die Kenntnisse über die einzelnen Komponenten eine Rolle. Außerdem sollte ihre Funktion im Rahmen des Homing und der Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzelle möglichst genau beschrieben sein. Eine Literaturrecherche ergab die genannte Auswahl, die im Folgenden genauer erläutert wird.

4.1 Chemokinrezeptor 4 (CD184)

Der Chemokinrezeptor 4, auch unter CD184 oder CXCR4 geführt, ist ein Rezeptor, der auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird. Als einziger Ligand dient der Stromal cell derived factor 1 (SDF-1 oder CXCL12). SDF 1 ist ein Chemokin, das einen entscheidenden Einfluss auf die Migration der Stammzellen schon im Rahmen der Embryonalentwicklung hat (McGrath et al., 1999). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Rezeptor außerdem auf Zellen der Immunabwehr vorhanden ist (Rawluk, 2004). Ebenfalls ist die Funktion im Rahmen der Hämatopoese und B – Zell – Entwicklung dokumentiert. Knock-Out-Mäuse für diesen Rezeptor weisen Immundefekte auf und versterben frühzeitig (Nagasawa et al., 1996). SDF-1 wirkt dabei über einen G-Protein-gekoppelten JAK/STAT-Mechanismus auf die Zelle ein. Ca²⁺-abhängig kommt es dann zur Polarisation, Aktinpolymerisation und zur Migration der Zelle (Hesselgesser et al., 1998). Relevant ist auch die Interaktion mit Adhäsionsmolekülen, so z. B. mit dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Very late antigen 4 (CD49). So konnte gezeigt werden, dass SDF- 1 die Adhäsion an das Endothel über das Very late antigen (VLA-4) verstärken kann (Peled et al., 2000). Zusätzlich ist CD184 bei der transendothelialen Migration wichtig, hier wurde eine zellspezifische Verstärkung der Extravasation festgestellt, und ein Einfluss auf die Migration der frühen hämatopoetischen Stammzellen festgestellt (Peled et al., 2000). SDF-1 und CXCR4 haben außerdem einen positiven Einfluss auf das Überleben und das Wachstum von einigen T- und B - Zelllinien (Kijowski et al., 2001).

4.2 Interleukin 3 - Rezeptor (CD 123)

Interleukin 3 (IL-3) ist seit langem als ein „Colony Stimulating Factor“ (CSF) bekannt (Park et al., 1989; Rennick et al., 1989) und hat einen wachstumsfördernden Einfluss auch auf hämatopoetische Stammzellen. Entsprechend fand sich eine höhere Anzahl von Colony Forming Units (CFUs) nach Transplantation und ein verbessertes Überleben nach Stimulation mit IL3. Der IL3-Rezeptor wird auf hämatopoetischen Vorläuferzellen (Park et al., 1989) sowie auf hämatopoetischen Stammzellen (Broxmeyer et al., 1993) exprimiert. Es handelt sich dabei um einen Rezeptor mit 3 extrazellulären Domänen (Schofield et al., 1997). Schofield et al., untersuchten ebenfalls das Integrin VLA-4 (CD49) im Zusammenhang mit IL-3 (Schofield et al., 1997). Hierbei zeigte sich, dass IL-3 einen migrationsfördernden Einfluss auf die dort untersuchte Zelllinie hatte, indem es die Expression von CD49 verringert. Entsprechend fand sich auch in anderen Arbeiten, dass die Vorbehandlung von Knochenmark mit Interleukin 3 zu einer grösseren Anzahl an koloniebildenden Einheiten im Knochenmark nach der Transplantation führt (Tavassoli, 1991). IL-3 reduziert dabei die Adhäsionsfähigkeit der Stammzelle deutlich (Schofield et al., 1997).

4.3 Interleukin-8 – Rezeptor (CD 128)

Ähnlich dem IL-3-Rezeptor handelt es sich bei dem Interleukin-8-Rezeptor um einen G-Protein-gekoppelten transmembranen Rezeptor (Loetscher et al., 1994). Interleukin 8 (IL-8) ist bekannt als ein Chemokin, das bei Entzündungsprozessen chemotaktische Auswirkungen insbesondere auf neutrophile Granulozyten hat (Loetscher et al., 1994). Zudem bewirkt IL-8 eine Freisetzung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark im Rahmen eines Entzündungsprozesses (Lapidot und Petit, 2002). In Tierversuchen wurde demonstriert, dass die alleinige Gabe von IL-8 eine Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen verursacht (Laterveer et al., 1995). Als Grundlage für die Freisetzung wurde die vermehrte Produktion der Matrix - Metalloprotease 9 (MMP-9) benannt (Janowska-Wieczorek et al., 2000), einer entscheidenden Protease, die auch im Rahmen des Homing für die Penetration der Basalmembran wichtig ist. Die IL-8-Chemokinrezeptoren 1 und 2 wurden zudem auf Endothelzellen nachgewiesen. Diese bewirken unter anderem eine Erhöhung der Permeabilität des Gefäßendothels (Schraufstatter et al., 2001). Auch andere Liganden des IL8 – Rezeptors bewirken eine

Leukozytenmigration aus dem Knochenmark in die Peripherie, wobei auch hier MMP-9 eine zentrale Rolle spielt, welches von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird (Pelus und Fukuda, 2006). Die Auswirkungen von IL-8 auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen haben Broxmeyer et al. untersucht. Hier zeigte sich eine Hemmung der Proliferation der Stammzellen (Broxmeyer, 1993).

4.4 Stem cell factor-Rezeptor (CD117)

c-Kit (CD117) ist der Rezeptor für den „Stem Cell Factor“ (SCF), wirkt antiapoptotisch (Hassan et al., 1996) und fördert die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen (Hassan et al., 1996). Es handelt sich um einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor (Zsebo et al., 1990). Untersuchungen zeigen, dass insbesondere Stammzellen in ihrem frühen Stadium (HLA-DR⁻) vom SCF in der Apoptose gehemmt werden (Bridgell, 1992). Er wird dabei als charakteristisch angesehen für verschiedene Zellen, die im Rahmen von Leukämien auftreten (Brandt et al., 1994). Wesentlich für die frühe Entwicklung der hämatopoetischen Stammzellen ist die autokrine Wirkung über SCF und CD117 (Brandt et al., 1994). Die Expression von CD117 verändert sich im Laufe der Differenzierung. CD117 ist ein Marker für hämatopoetische Stammzellen in frühen Stadien, kommt aber auch auf differenzierten Zellen der Erythropoese vor.

4.5 Very Late Antigen 4 (CD49)

Das Very Late Antigen 4 ist ein Integrin, welches auf Leukozyten im Allgemeinen, so auch auf hämatopoetischen Stammzellen, exprimiert wird. Die Regulation wie auch die Funktion sind vielfältig, wesentlich ist unter anderem die Funktion der Adhäsion und Extravasation von Leukozyten (Ronen und Sara, 2002). Als Liganden dienen dabei das Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) und Fibronectin (Alon et al., 1995, Vermeulen et al., 1998). *In vivo* wurde gezeigt, dass VLA-4 insbesondere das Homing in das Knochenmark, nicht jedoch in die Milz, fördert (Vermeulen et al., 1998). Die Regeneration des Knochenmarks wurde mit Blick auf die Expression wichtiger Adhäsionsmarker, unter anderem VLA-4, untersucht (Gold et al., 2006). Dabei fand sich ein schnellerer Wiederanstieg der Zellen im peripheren Blut bei Probanden, deren zuvor transplantierte Stammzellen eine höhere Dichte unter anderem von VLA-4

aufwiesen. Die Regulation erfolgt dabei zu mehreren Zeitpunkten. Untersuchungen mit Antikörpern haben gezeigt (Vermeulen et al., 1998), dass die Gabe von anti-VLA-4-Antikörpern sowohl die Freisetzung positiv sowie das Homing von Stammzellen negativ beeinflusst. Darüber hinaus erwies sich bei *in vitro* Versuchen mit einer Zelllinie VLA-4 als Suppressor der Apoptose und förderte das Wachstum von Stammzellpopulationen. (Gold et al., 2006). Diese Wirkung ist sehr dynamisch und wird bei den CD34⁺ Stammzellen über Cytokine wie die Interleukine 3, 6 und 11 und SCF-1 reguliert, aber auch über das Chemokin SDF-1 (Papayannopoulou et al., 1995; Wang et al., 1998). Während VLA-4 durch die Gabe der Interleukine 3, 6 und 11 herunterreguliert wurde, fand sich bei der Gabe von SDF-1 eine Zunahme der Adhäsion. In Zellzyklusuntersuchungen ging die Reduktion der CD49-Expression einher mit dem Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus (Becker et al., 1999).

4.6 CD38

CD38 ist ein multifunktionelles Enzym, dessen Ligand PECAM-1 (CD31) ist. Es wird von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und wurde als Differenzierungsmarker früher und vordifferenzierter Stammzellen entdeckt (Hao et al., 1995; Reinherz et al., 1980). Dabei wurde festgestellt, dass CD38 während der Lymphozytenreifung bis zum prä-B-Zell-Stadium exprimiert wird, bei weiterer Ausreifung reduziert, dann aber mit der Ausreifung der B – Zellen wieder verstärkt exprimiert wird. CD38 wurde auf Leukozyten als Adhäsionsmolekül definiert (Dianzani und Malavasi, 1995). Die Signalkaskade wurde dabei umfangreich beschrieben (Shubinsky und Schlesinger, 1997) und führt demnach sowohl über eine Proteinkinase C als auch G-Protein – gekoppelt zu einer intrazellulären Messenger – Funktion. Neuere Ergebnisse bestätigen jedoch eher die häufigere Expression von CD38 auf differenzierten Zellen (McGuckin et al., 2003), die ihren pluripotenten Stammzellcharakter verlieren.

4.7 Vascular endothelial growth factor – Rezeptor 1 (flt-1)

Der Vascular endothelial growth factor - Rezeptor 1 wurde 1990 entdeckt und zunächst unter dem Begriff fms-like Tyrosinkinase (flt) bekannt (Shibuya et al., 1990). Wenig später wurde er als Rezeptor für den „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF)

benannt (de Vries et al., 1992). Es existieren mehrere hochaffine transmembrane Rezeptoren für VEGF (Cross et al., 2001). Der Wirkungsmechanismus ist komplex, wesentliche Elemente sind Dimerisierung und die Autophosphorylierung von Tyrosin (Sawano et al., 1997). Dabei haben die beiden am häufigsten gefundenen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 unterschiedliche und selbst regulierende Effekte (Shen et al., 1999). Schon in der Embryogenese wie auch bei der Neovaskularisation erfolgt die Regulation u.a. durch VEGF (Shalaby, 1995; Fong et al., 1995, 1999; Carmeliet, 1996). Für die spätere Angiogenese sind adulte CD34⁺ Stammzellen erforderlich, wobei auch CD34⁻ Zellen entdeckt wurden, die Endothelzellen ausbilden können (Harrasz et al., 2001). Dabei erweisen sich CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut weitgehend als VEGF – Rezeptor – negativ, während mit fortschreitender Differenzierung eine Erhöhung der Expression erreicht wird (Sawano et al., 2001). Der Nachweis der entsprechenden mRNA ist bei CD34⁺ Zellen nicht gelungen (Pomyje et al., 2003). Damit kann der VEGF - Rezeptor 1 als ein Marker für entsprechend vordifferenzierte Stammzellen angesehen werden, der nur zu geringen Teilen auf frühen Zellen vorkommt. Versuche haben gezeigt, dass dieser Rezeptor auf den Vorläuferzellen von Megakaryozyten und Monozyten vorkommt (Casella et al., 2003, Barleon et al., 1996). Monozyten im peripheren Blut weisen zudem eine gerichtete Migration auf, abhängig von VEGF und dem VEGF-Rezeptor-1 (Casella et al., 2003). Das Expressionsmuster ändert sich deutlich im Rahmen von hämatologischen Erkrankungen (Bellamy et al., 1999; Fiedler et al., 1997), wobei insbesondere der Ligand VEGF relevant sein kann für eine autokrine Stimulation der Leukämie – Zellen (Fiedler et al., 1997). Im Rahmen der Tumormetastasierung wird flt-1 eine Rolle zugeordnet, hier werden hämatopoetische Vorläuferzellen als wichtige Komponenten am Ort der Tumormetastasierung beschrieben (Kaplan et al., 2005).

4.8 Vascular endothelial growth factor (VEGF-A)

Der „Vascular Endothelial Growth Factor“ wurde als proliferationsförderndes Zytokin für Endothelzellen von Gefäßen entdeckt (Ferrara und Henzel, 1989). Die Funktion beschränkt sich nicht nur auf Endothelzellen. An Tumorzellen wurde eine migrationsfördernde (Clauss, 1990) wie auch direkt wachstumsfördernde Wirkung gefunden, unter anderem bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (Bonnesen et al., 2009) und Kolorektalen Karzinomen (Bendardaf et al., 2008). Entscheidend ist seine Rolle im Rahmen der Gefäßbildung, insbesondere die Entwicklung von

Megakaryozyten und die Wirkung auf Thrombozyten ist herausgearbeitet worden (Möhle et al., 1997). Dabei wird VEGF unter anderem von in der Entwicklung fortgeschrittenen hämatopoetischen Stammzellen wie z. B. Megakaryozyten sezerniert, aber auch intrazellulär gespeichert und erst im Rahmen der Blutstillung durch die Thrombozyten freigesetzt (Bautz et al., 2000). Auch durch glatte Muskelzellen und Zellen des Nierencortex werden Isoformen des VEGF freigesetzt (Neufeld et al., 1994). Die Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen ist unter verschiedenen Aspekten untersucht worden (Bautz et al., 2000). Die Sekretion von VEGF-A nahm unter Zytokin – Stimulation zu, wenn auch die Sekretion bei frisch isolierten Stammzellen gering ist. Zusätzlich wurde hier das Migrationsverhalten der hämatopoetischen Stammzellen (HPSC) unter Einfluss von VEGF untersucht und eine deutliche Erhöhung der transendothelialen Bewegung festgestellt. Hierzu konnte gezeigt werden, dass VEGF die vaskuläre Permeabilität erhöht, indem es das Endothel direkt fenestriert (Roberts et al., 1995), und wie entscheidend VEGF für die Mobilität der mononukleären Zellen wie auch die der hämatopoetischen Stammzellen ist (Gerber et al., 2002). Bei fehlender Möglichkeit der VEGF-Produktion war die Repopulation des Knochenmarkes nach Bestrahlung nicht feststellbar, auch die sonst für HPSC und ihre Differenzierung typische Bildung von Kolonien war gestört. Die Bildung von VEGF in zahlreichen hämatologischen (Dias et al., 2000; Fragoso et al., 2007) wie auch soliden Tumoren wurde untersucht. Hier fand sich eine deutliche Erhöhung von VEGF (Gerber und Ferrara, 2000).

4.9 Matrixmetalloprotease 9 (MMP9)

Matrixmetalloproteasen dienen der Veränderung extrazellulärer Matrix. Die hier untersuchte MMP 9 gehört zur Gruppe der Gelatinasen und degradiert Kollagen Typ 4 (Goetzl et al., 1996). Sie wird unter anderem von Makrophagen (Welgus et al., 1990) und T-Zellen (Leppert, 1995) produziert. Zusätzlich ist die Aktivität vergleichsweise häufig in peripher entnommenen hämatopoetischen Stammzellen gegenüber sessilen Stammzellen nachzuweisen (Janowska-Wieczorek, 1999). Deutlich reduziert war die Migration über eine Basallamina hinweg bei reduzierter MMP9 Sekretion. Eine weitere Demonstration erfolgte in einer Arbeit von Janowska-Wieczorek (Janowska-Wieczorek, 2000). Hier zeigte sich neben einer erhöhten Migration der CD34⁺ Zellen bei Gabe von SDF-1 eine Abhängigkeit der Produktion von MMP9. Dabei wurde dessen Produktion

durch SDF-1 und den Tumornekrosefaktor Alpha beziehungsweise Interleukin 8 gesteigert. Dies gilt insbesondere für Zellen aus dem Knochenmark. Dies zeigte auch eine Arbeit von Byk et al. (Byk et al., 2005). Hier wurde unter Stimulation eine Erhöhung der Produktion von MMP9 und ein verbessertes Repopulationsverhalten der Zellen gezeigt. Dies wurde grundlegend auch schon in einer früheren Arbeit an der physiologischen Reaktion der adulten hämatopoetischen Stammzellen auf Stresssignale (Kollet et al., 2003) wie auch für Stammzellen aus Nabelschnurblut gezeigt (Rao et al., 2004).

4.10 Hematopoietic stem cell antigen (CD 133)

CD133 wurde 1997 definiert als ein Protein, welches auf CD34⁺ - Zellen vorkommt (Yin et al., 1997). In der Arbeit von Yin et al. (Yin et al., 1997) wurden unterschiedliche Zelllinien und Gewebe auf die Expression von CD133 untersucht. Dabei fand sich dieses Molekül ausschließlich auf CD34⁺ Zellen und Retinoblastom bzw. Teratocarcinom - Linien. Hier wird zudem eine phänotypische Expression von 20-60 % auf den CD34⁺ Zellen genannt. Dies wurde später durch Matsumoto et al. bestätigt, hier fand sich ein Bereich von 41 - 73 % im peripheren Blut (Matsumoto et al., 2000). Auf weiter differenzierten Zellen, die hier durch CD64, CD19, CD71 und CD38 charakterisiert wurden, nahm die Expression von CD133 ab. In keiner der Arbeiten wurde die Funktion von CD133 erarbeitet, so dass diese Frage zunächst offen bleibt. Später wurde dann das proliferative Potential von CD133⁺ Zellen untersucht. Hier zeigte sich, dass CD133⁺ Zellen im Vergleich zu CD133⁻ Zellen in vitro signifikant mehr Colony forming colonies ausbilden und zudem die Vitalität der CD133⁺ Zellen auch am Tag 9 der Kultur deutlich höher ist (de Wynter et al., 1996). De Wynter et al. untersuchten ebenfalls Vorläuferzellen unterschiedlichen Ursprungs (Peripheres Blut nach der Apherese, Knochenmarkpunkate und Nabelschnurblut). In ihrer Arbeit zeigten sie auf, dass der Anteil der CD133⁺ Zellen an den CD34⁺ Zellen im peripheren Blut 75,3 % beträgt, während dieser für Knochenmarkszellen 36,3 % beträgt (de Wynter et al., 1996). Zudem war die Anzahl der Kolonie - bildenden Zellen unter den CD34⁺/CD133⁺ Zellen mit 67,1% nahezu doppelt so groß im Vergleich zu CD34⁺/CD133⁻ Zellen. Das Engraftment der CD133⁺ Zellen ist hier ebenfalls deutlich höher als das der CD133⁻ Zellen (de Wynter et al., 1996). Ergänzend ist eine Studie von Gallacher et al. zu erwähnen (Gallacher et al., 2000). Ein Ergebnis war die

Entdeckung von Kolonie - bildenden Zellen aus Nabelschnurblut, die CD133⁺/CD34⁻/CD38⁻/Lin⁻ waren.

Aufgrund dieser Ergebnisse kamen die Autoren zu dem Schluss, dass es neben den CD34⁺ Zellen weitere gibt, die zwar CD34⁻ sind, jedoch in vergleichbarer Weise die das Knochenmark repopularisierenden Eigenschaften von hämatopoetischen Stammzellen aufwiesen.

5 Materialien und Methoden

5.1 Proben

Grundlage der Untersuchung waren Proben aus kryokonservierten Stammzellapheresaten. Es handelt sich um Apheresate die in der klinischen Routine zu Transplantationszwecken gewonnen und gelagert wurden. Mit der Aufklärung über den Transplantationsprozess hatten die Patienten ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Untersuchung erteilt. Untersucht wurden im Rahmen dieser Arbeit die separat gelagerten Kontrollproben, die für eine Transplantation hergestellten Konzentrate wurden nicht verwandt. Die Lagerung erfolgte entsprechend den Leitlinien (Bundesärztekammer, 1997). Es handelte sich um Patienten mit unterschiedlichen Neoplasien (hämatologische und solide Tumore).

Es standen insgesamt 88 Proben von 32 Patienten in Form von kryokonservierten Apheresekonzentraten zur Verfügung. Aus den Patientenakten und den Begleitscheinen wurden weitere Informationen hinzugenommen, so die Grunderkrankung, das Alter und das Geschlecht der Patienten. Zusätzlich wurden die Therapie, die Mobilisierungsstrategie und die Anzahl der vorhergehenden Therapiezyklen / Mobilisierungen erfasst. Die Diagnosen waren Non Hodgkin (15) und Hodgkin Lymphom (1), Plasmozytom (7), Sarkom (14), Keimzell (11) - und Hoden-Tumore (7), Mamma-Karzinome (6), Histiozytome (3), akute myeloische Leukämien (2). 62 % der Proben stammten von männlichen Patienten (n = 41) und 38 % von weiblichen (n = 25). Im Rahmen der Untersuchungen wurde das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Apherese mit erfasst. Dabei ergab sich die folgende Verteilung (Abb. 2).

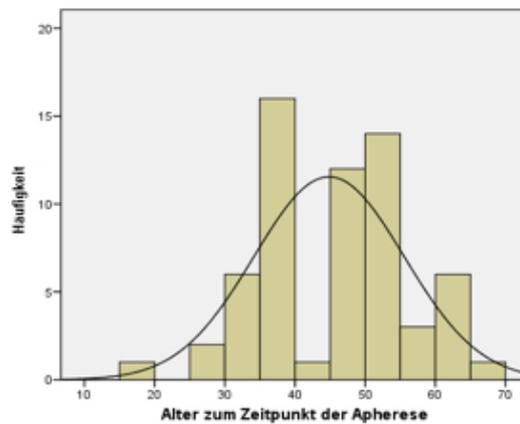


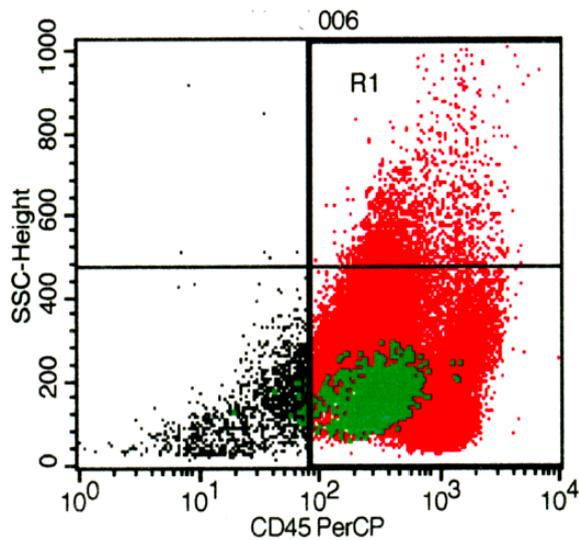
Abbildung 2: Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Apherese

5.2 Antikörper

Es wurden kommerziell hergestellte Antikörper von den Herstellern BD Biosciences, R&D Systems, BD Pharmingen und Miltenyi Biotec verwendet, die exakten Beschreibungen der verwendeten Reagenzien finden sich im Anhang.

Grundlage für die Auswahl der Antikörper war die Empfehlung der General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology, die ISHAGE Guidelines waren Grundlage für die Messauswertung (Gating). Die folgenden Darstellungen dienen der Verdeutlichung, die Arbeitsanleitung findet sich im Anhang.

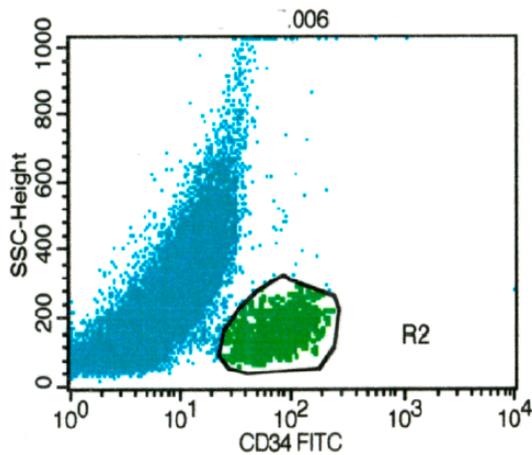
Einschlusskriterien für die folgende Selektion der Zellen waren CD45⁺ (Abb. 3), CD34⁺ (Abb. 4), SSC<400 (Abb. 5).



Patient ID:
 Gate: No Gate
 Gated Events: 50000
 Total Events: 50000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	6	0.01	0.01
UR	2364	4.73	4.73
LL	1578	3.16	3.16
LR	46052	92.10	92.10

Abbildung 3: In R1 (rot, rechter oberer und unterer Quadrant wurden alle CD45+ Zellen eingeschlossen, die grün dargestellten Signale repräsentieren CD34 (rechter unterer Quadrant, siehe hierzu auch Abb.4)



Patient ID:
 Gate: G1=R1
 Gated Events: 48536
 Total Events: 50000

Region	Events	% Gated	% Total
R1	48536	100.00	97.07
R2	960	1.98	1.92

Abbildung 4: Grün und umrandet kommen die Signale der CD34+ Zellen zur Darstellung, die über die R2 definiert wurden. Zur Darstellung kommen ausschließlich die CD45+ Zellen (R2) die wie in Abb. 3 beschrieben selektiert wurden.

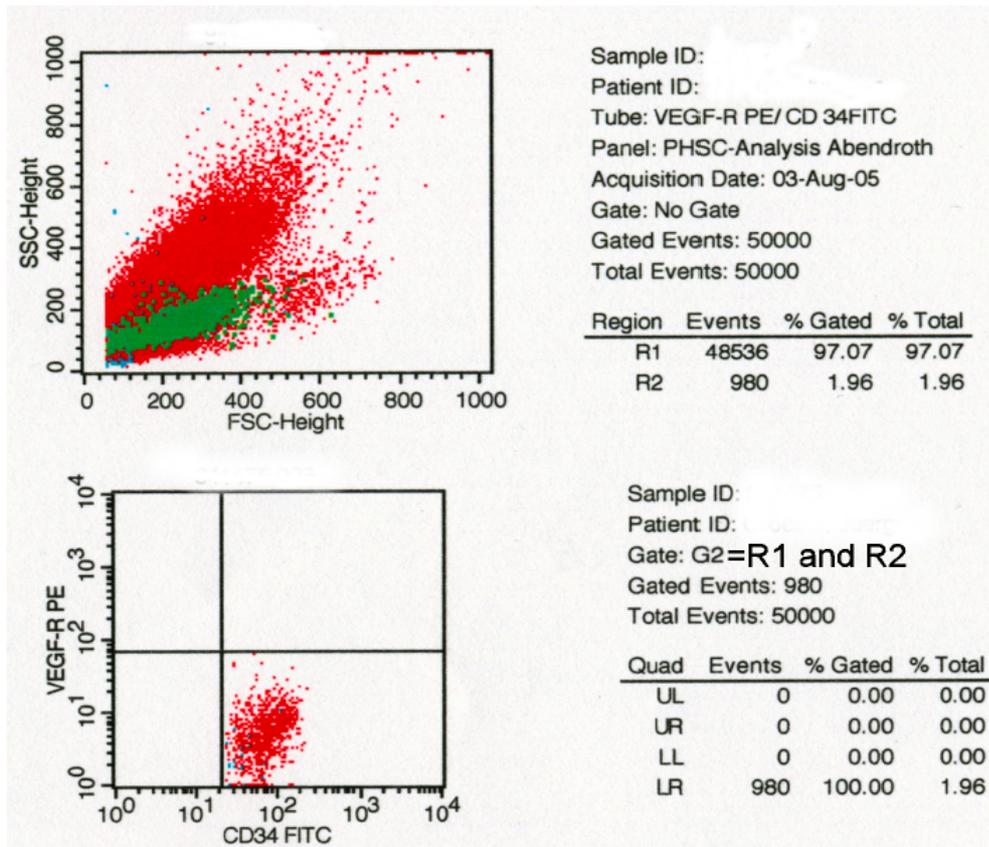


Abbildung 5: Aus den in den Abb. 3 und Abb. 4 definierten Gruppen ergibt sich hier der Anteil der CD34+/CD45+ und VEGF-R- Zellen

Hinzugefügt wurde jeweils eine Kontroll – Messung mit Maus – IgG (Isotyp – Kontrolle, Abbildungen 6,7,8).

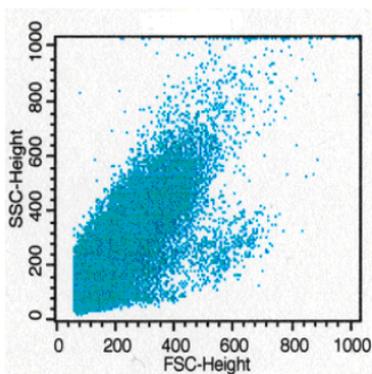


Abbildung 6: Darstellung der Maus-Kontrolle im FSC und SSC

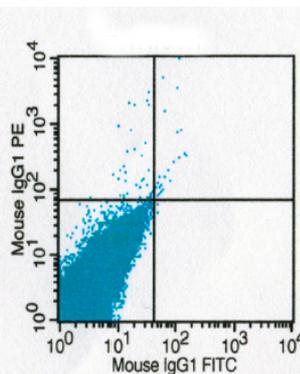


Abbildung 7: Darstellung der Kontroll-Messung für PE und FITC

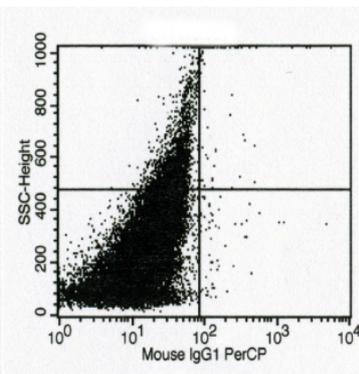


Abbildung 8: Darstellung der Kontroll-Messung für PerCP

5.3 Zur Methodik des FACS

Das „Fluorescence Activated Cell Sorting“ ist eine seit 1974 etablierte Methode zur Messung von Zelleigenschaften mittels Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Durch die vom Laser emittierte kohärente Strahlung können bestimmte Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt werden, die dann entsprechend ihrer Intensität festgestellt werden kann. Hinzu kommt die Wahrnehmung der Streuung und Ablenkung des Lichtbündels, so dass auch optische Dichte (SSC) und Größe der Zelle (FSC) wahrgenommen werden können.

Hierdurch lassen sich Aussagen nicht nur über die Morphologie, sondern auch über Oberflächenstrukturen wie auch intrazelluläre Strukturen der Zelle treffen.

Dabei ist eine Kombination der Fluorochrome Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Phycoerythrin (PE) verwendet worden. Werden diese Fluorochrome an Antikörper gebunden, kann über diese Kombination eine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit eine Zelle die entsprechende Antigenstruktur aufweist.

In dieser Arbeit wurden sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Merkmale gemessen, auch eine Vitalitätsbestimmung wurde vorgenommen.

5.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS 15.0. Dabei wurden die Verfahren der Mittelwertberechnung, der Berechnung des Medians und der Berechnung der Standardabweichung angewandt. Zusätzlich wurde ein Mittelwertvergleich durchgeführt, hierzu diente der t-Test nach Student mit $p < 0,05$.

Im Rahmen der grafischen Darstellungen wurde eine lineare Regression mit dem zugehörigen 95 % - Konfidenzintervall berechnet und mit dargestellt. Sofern ein signifikanter Zusammenhang vorlag, wurde dieser mit angegeben.

6 Ergebnisse

6.1 Analyse der Proben

Untersucht wurde die gemeinsame Expression von Strukturen durch hämatopoetische Stammzellen, die über den Rezeptor CD34 identifiziert wurden. Die untersuchte Population bestand aus Patienten unterschiedlichen Alters mit unterschiedlichen Grunderkrankungen und Vortherapien. Die Analyse der gemeinsamen Expression erfolgte mittels linearer Regression. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist die Heterogenität der Population zu berücksichtigen. Der durchschnittliche Anteil der CD34⁺ Zellen an allen Zellen in den Apheresaten betrug 0,95% (0,82 % - 1,08 %). Der Anteil der vitalen Zellen unter den CD34⁺ Zellen war im Mittel 79,63 % (66,1 % - 93,16 %).

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der statistischen Untersuchungen für die untersuchten Oberflächenstrukturen angegeben bezogen auf die CD34⁺ Zellen im Apheresat (Angabe in Prozent).

Tabelle 1: Mittelwert, Median und Standardabweichung der untersuchten Oberflächenstrukturen bezogen auf die CD34⁺ Zellen im Apheresat (Angabe in Prozent).

	Anteil CD184*/ CD34 ⁺	Anteil CD123*/ CD34 ⁺	Anteil CD128* /CD34 ⁺	Anteil CD117*/ CD34 ⁺	Anteil CD133*/ CD34 ⁺	Anteil CD49*/ CD34 ⁺	Anteil VEGF-R*/ CD34 ⁺	Anteil VEGF*/ CD34 ⁺	Anteil MMP9*/ CD34 ⁺	Anteil CD38*/ CD34 ⁺
N	82	83	84	82	84	82	82	80	79	49
Mittelwert (%)	44,69	58,89	8,06	62,17	48,56	66,55	6,43	17,07	5,05	67,26
Median (%)	42,43	63,54	3,83	69,49	56,02	81,76	2,31	5,28	2,06	71,03
Standard- abweichung (%)	27,90	28,75	12,87	30,54	28,32	33,27	14,52	27,17	12,25	21,89

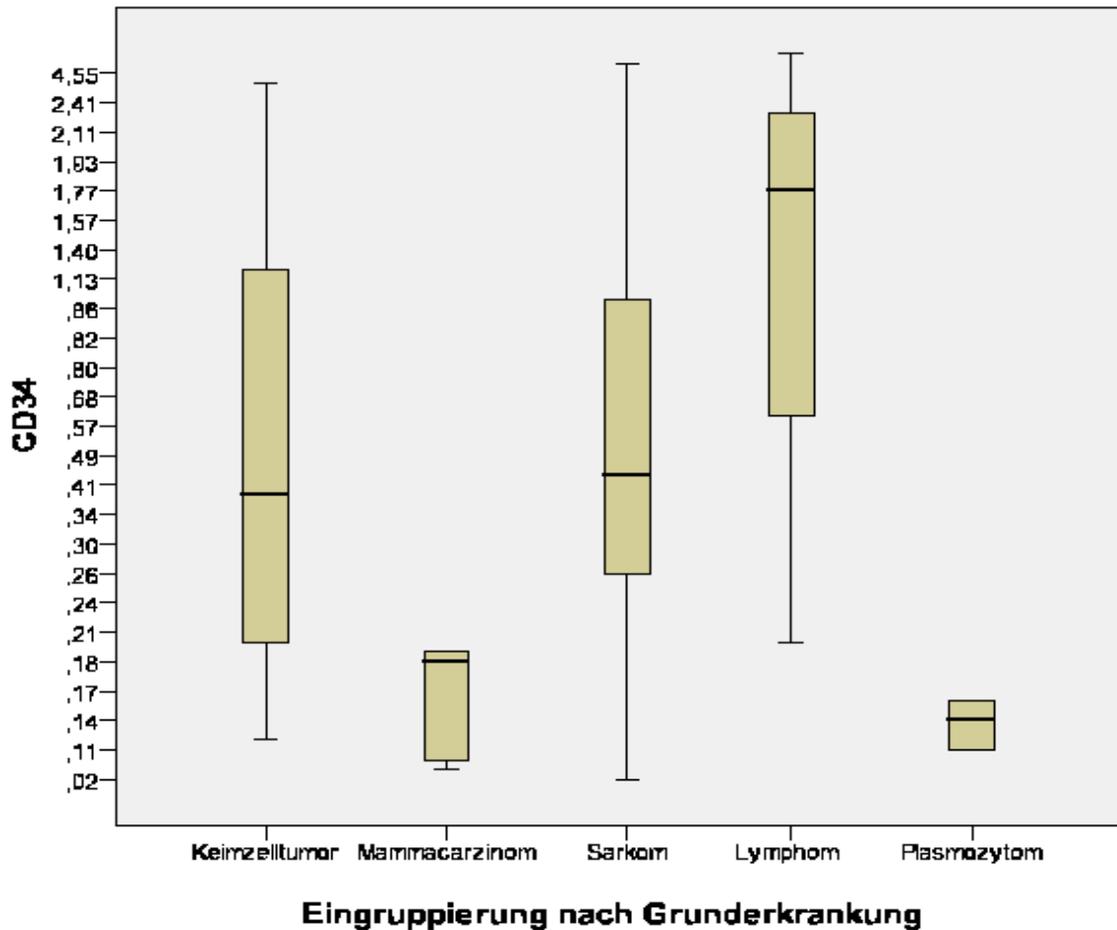


Abbildung 9: In Abbildung 9 sind in Form eines Boxplots der Median und die Verteilung der CD34+ Zellen in Abhängigkeit von der Grunderkrankung dargestellt. Der Median, hier als schwarzer Balken dargestellt, zeigt die unterschiedliche Häufigkeit des CD34 innerhalb der hier untersuchten heterogenen Population.

Die Verteilung, in Abbildung 9 dargestellt als Box um den Median, ist inhomogen und weit gestreut.

Der Anteil der CD34⁺ Zellen, die den Rezeptor des für das Homing entscheidenden Stromal Cell Derived Factors (CD184⁺) exprimieren, war mit 44,7 % (+/- 27,9 %) im Mittel gering. Die Anzahl der CD 184⁺/CD34⁺Zellen korrelierte positiv mit der Anzahl der CD117⁺/CD34⁺ Zellen.

Der Anteil der Interleukin – 3 – Rezeptor – positiven (CD123⁺) Zellen betrug 58,89 % (+/- 28,75 %).

Die Expressionsrate dieses Rezeptors weist einen signifikanten Zusammenhang mit der des Rezeptors für den Stem Cell Factor (CD117), des Markers für die frühe

Vorläuferzelle CD133, und der des Adhäsionsmoleküls CD49 auf ($p < 0,01$).

Der Interleukin – 8 - Rezeptor CD128 wird nur in geringem Maße exprimiert. Der Stem Cell Factor Rezeptor CD117 als für das Zellwachstum wichtiger Rezeptor wird auf 62 % der gemessenen CD34⁺ Zellen exprimiert. Signifikant assoziiert war die Häufigkeit der Expression des für das Homing entscheidenden Stromal – Cell – Derived - Factor – 1- Rezeptors (CD184⁺) mit der Expression des Adhäsionsmoleküls CD49 ($p < 0,01$). Je höher die Expression von CD117, desto höher ist auch die Expression von CD184 und CD49 auf den hier untersuchten Zellen. Der für die Zelladhäsion wichtige Rezeptor CD49 wird im Mittel auf 67 % (+/- 33,2 %) der hier untersuchten CD34⁺ Zellen exprimiert.

Für das Zellwachstum sind sowohl der Vascular Endothelial Growth Factor wie auch seine Rezeptoren wichtig. Der hier untersuchte Rezeptor ist der Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 1. Dieser wurde von einem nur geringen Anteil der Zellen exprimiert. Auch VEGF ließ sich nur in wenigen Zellen nachweisen.

Für die Permeabilisierung von Gefäßendothel, einem wesentlichen Teilprozess der Extravasation der hämatopoetischen Vorläuferzellen, werden Proteasen benötigt, exemplarisch wurde hier die Matrix Metalloprotease 9 untersucht. In nur einem geringen Anteil von 5 % der CD34⁺ Zellen ließ diese sich nachweisen.

CD133 wird vornehmlich auf frühen Entwicklungsstadien der hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert. Im hier untersuchten Kollektiv fand sich eine mittlere Expression auf 48 % der CD34⁺ Zellen.

6.2 Vergleich bezüglich des Alters

In der Literatur finden sich Hinweise auf die Alterung hämatopoetischer Stammzellen (Dykstra et al., 2008). Hierzu wurde eine vergleichende Untersuchung durchgeführt. Die Expression von CD49, CD117 und CD133 ist geringer in den untersuchten Apheresaten älterer Patienten (Abb. 10). Die Ursache hierfür allein im Alter der Patienten zu sehen ist aufgrund der Heterogenität von Grunderkrankung und Vortherapie jedoch nicht möglich. Es kann insgesamt eine niedrigere Expression von CD133, CD123, CD49 und CD117 mit steigendem Alter beobachtet werden. Entgegengesetzt verhält es sich bei CD38, welcher mit dem Alter vergleichsweise stark ansteigt. Ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD128, CD184, MMP9

und den VEGF-R kann in den vorliegenden Daten nicht gesehen werden.

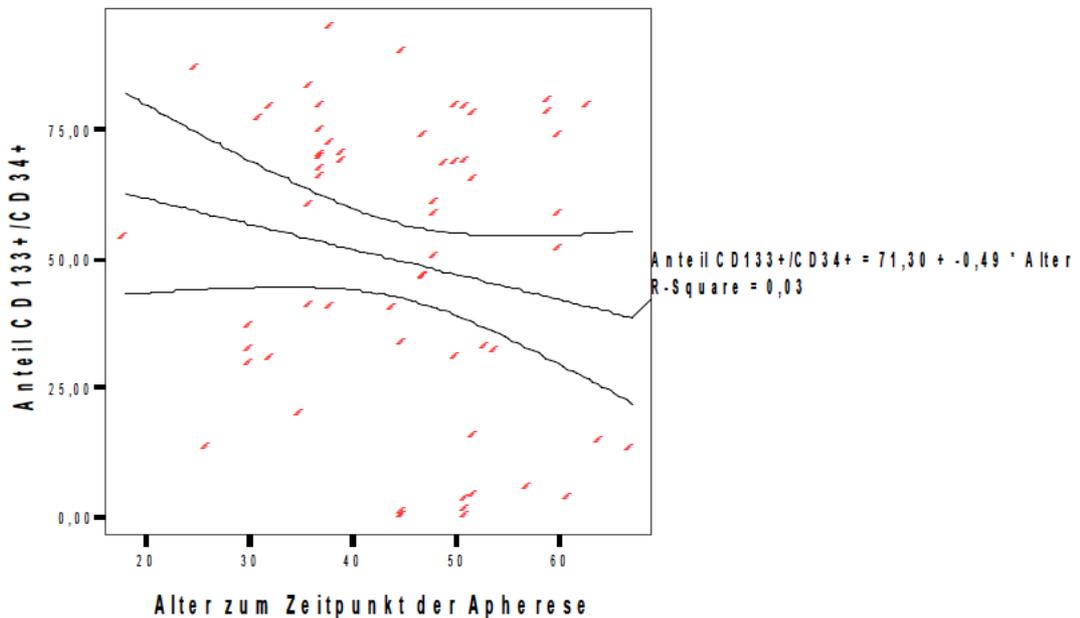


Abbildung 10: Anteil der CD133+/CD34+ Zellen in Abhängigkeit vom Alter zum Zeitpunkt der Apherese

7 Diskussion

Die hämatopoetischen Vorläuferzellen werden im Rahmen der Stammzelltransplantation inzwischen nur selten über eine Punktion des Knochenmarkraumes entnommen. Häufiger ist die Entnahme von Zellen aus dem peripheren Blut nach Mobilisierung mit Granulozyten stimulierendem Faktor (G-CSF) allein oder in Kombination mit einer Mobilisierungstherapie. Die Repopulation des Knochenmarks durch diese Zellen nach der Rückgabe wird als Homing bezeichnet. Bisher fehlten systematische Untersuchungen zur Struktur kryokonservierter peripher gewonnener hämatopoetischer Stammzellen für Homing relevante Faktoren. Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression von möglicherweise für das Homing relevanter Oberflächenantigenstrukturen und intrazellulären Parametern mittels fluoreszenzaktiviertem Zellsorting (FACS) zu überprüfen. Bei der zuvor schon beschriebenen Heterogenität des Patientenkollektivs ist eine eindeutige Kausalattribution allerdings schwierig: zum Beispiel unterscheidet sich Auswahl und Dosierung der zuvor eingesetzten Zytostatika je nach Grunderkrankung der Patienten;

auch die Anzahl der Vortherapien war nicht einheitlich.

Hinsichtlich der oberflächenassoziierten Antigenstrukturen (CD184, CD117, CD133 und CD49) ist bezüglich des für das Homing entscheidenden Chemokinrezeptors CXCR4 (CD184) festzustellen, dass er nur von 44,69 % der Vorläuferzellen exprimiert wird. CXCR4 ist wichtig für die gerichtete Migration zum Knochenmark. Hierüber folgen die Vorläuferzellen dem Stromal-Cell-Derived Factor-1-Gradienten (SDF-1-Gradient). Die reduzierte Expression erklärt sich möglicherweise zum Teil aus der Tatsache, dass im Rahmen der Stimulation eine Reduktion der Expression von CXCR4 (CD184) erfolgt. Dies scheint auch eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Mobilisierung zu sein (Gazit, Akay, 2004). Migrationsversuche haben ein geringeres Potential zur gerichteten Migration von peripher entnommenen Stammzellen gezeigt als das der Zellen, die direkt aus dem Knochenmark entnommen wurden (Aiuti et al., 1997). Die Plastizität dieses Rezeptors hat sich in Versuchen gezeigt, bei denen CD34⁺ Zellen im Rahmen eines Migration-Assays zunächst stimuliert wurden. Die vermehrte Expression von CD184 führte zu einer verstärkten Migration entlang des SDF1-Gradienten (Wysoczynski et al., 2005).

Von besonderem Interesse war für uns die Bedeutung der Coexpression von CD184 (CXCR4) und weiteren für das Homing relevanten Merkmalen auf CD34⁺ Zellen.

Zellen aus Apheresaten mit einer Coexpression von CD34 und CXCR4 (CD184) exprimierten zusätzlich den Rezeptor für den Stem Cell Factor - Rezeptor (CD 117), einen Marker für wenig differenzierte Zellen der Hämatopoese und wichtigen Rezeptor für den Wachstumsfaktor SCF. Dies bedeutet einen akkumulierten Vorteil für die Zellen, die beide Rezeptoren exprimieren.

Zellen, die eine niedrige Coexpression von CD34 und CD184 aufweisen, weisen zusätzlich in den untersuchten Apheresaten ebenfalls eine geringe Expression von CD133 auf. Dies könnte als Ausdruck einer fortgeschrittenen Differenzierung der CD184 – negativen Zellen gewertet werden. Einschränkend ist anzumerken, dass hier die Untersuchungen in unterschiedlichen Ansätzen und die Messungen nicht simultan in einem Ansatz durchgeführt wurden. Dies entspricht dem standardisierten Vorgehen in hämatologischen Routinediagnostik.

CD133 wurde nicht nur als Marker für frühe CD34⁺ Stammzellen erkannt, sondern auch von manchen Autoren sogar als Referenzmerkmal für die zu transplantierende Vorläuferzelle angesehen (Matsumoto et al., 2000; Gallacher et al., 2000). Jedoch trug nur die Hälfte aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten CD34⁺ Zellen

zusätzlich dieses Merkmal.

Ähnlich verhält sich die Expression des Rezeptors CD117. Der Ligand von CD117 ist der Stem Cell Factor. Insbesondere die autokrine Wachstumsregulierung (Ratajczak et al., 1995) und der direkte Einfluss auf den Zellzyklus (Morita et al., 2003) machen CD117 zu einem Marker für eine frühe, durch den klinischen Einsatz von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren leicht zu modifizierende Stammzelle.

Der Arrest in der G₀ – Phase dauert unter Kulturbedingungen in CD117⁻ Zellen länger an (Morita et al., 2003). Dies weist darauf hin, dass ein Großteil der hier untersuchten Zellen schon in die G₁-/ oder S - Phase eingetreten ist bzw. eintreten wird. Im Sinne der schnellen Rekonstituierung der Granulozytopoese ist dies vorteilhaft, für eine längerfristige Rekonstituierung der Hämatopoese beim Patienten können diese Zellen möglicherweise nicht entscheidend mitwirken. Im Zusammenhang mit der Literatur lässt sich postulieren, dass CD117 nicht nur als Marker für einen frühen Entwicklungszustand einer hämatopoetischen Stammzelle anzusehen ist, sondern auch als ein Indikator für die Zellproliferation. Somit sind die Zellen, die mit der Expression von CXCR4 eine gute Voraussetzung für das Homing mitbringen, möglicherweise eher zu einer schnellen Differenzierung befähigt als zur langfristigen Repopularisation des Knochenmarks.

Bei der hier durchgeführten Messung der Expression von Oberflächenmolekülen wurde neben CD133 auch CD49, ein wichtiges Adhäsionsmolekül, analysiert.

Frühe HSC mit dem Merkmal CD133 exprimieren in den hier durchgeführten Untersuchungen zusätzlich das Adhäsionsmolekül CD49 und haben damit einen Vorteil im Rahmen des Homing. Hinzu kommt eine vermehrte Expression von CD123, die bei der Ausbildung von Kolonien als Rezeptor für das Interleukin 3 von Vorteil ist. CD49 wird als ein Adhäsionsmolekül beschrieben, dessen Expression umfangreich reguliert und mit Eintritt in die S - Phase des Zellzyklus seltener exprimiert wird (Becker et al., 1999). Dieser Zusammenhang ist möglicherweise bedeutsam für die weitere Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelle.

Zusätzlich zu den Oberflächenantigenstrukturen wurden noch die intrazellulären Proteine VEGF und MMP untersucht.

Der gemessene niedrige Anteil an VEGF - produzierenden CD 34⁺ Zellen deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren (Bautz et al., 2000). Trotz der umfangreichen Stimulation der Patienten mit Wachstumsfaktoren findet sich eine nur geringe

Produktion von VEGF intrazellulär in den CD34⁺ Zellen der Apheresate. Zwar war auch im Rahmen der Untersuchungen von Bautz et al. (Bautz et al., 2000) VEGF in peripher entnommenen Stammzellen kaum nachweisbar, wurde nach Stimulation *in vitro* aber rasch heraufreguliert. Hämatopoetische Vorläuferzellen produzieren VEGF in Abhängigkeit von der Umgebung und den auf sie wirkenden Stimuli (Bautz et al., 2000). Diese Regulation ist umfangreich. Beispielhaft seien an dieser Stelle die Interaktion von Endothel und Vorläuferzellen aufgezeigt. Unter anderem über ein negatives Feedback über ein inhibierendes Molekül wird die Angiogenese gehemmt (Naito et al., 2009). Die Synthese dieser Faktoren lässt sich in hämatopoetischen Vorläuferzellen *in vitro* ebenfalls induzieren. Ein weiterer Regulationsmechanismus geht ebenfalls vom Endothel des Knochenmarkstromas aus. Über hypoxieinduzierte Faktoren wird die Synthese von VEGF gesteigert und die Mobilität der Vorläuferzellen nimmt zu (Lévesque et al., 2007). Unter pathologischen Bedingungen, wie etwa im Rahmen eines Multiplen Myeloms, korreliert die Heraufregulierung von VEGF in den Myelomzellen mit deren Mikroangiogenese, einer wichtigen Voraussetzung für die Ausbreitung des Myeloms (Markovic et al., 2008). Vergleichende Untersuchungen bezüglich der Grunderkrankung waren in der hier durchgeführten Untersuchung auf Grund der Heterogenität des Patientenkollektivs nicht möglich.

Ebenfalls gering war die hier gemessene Expression des VEGF - Rezeptors. Ganz ähnlich verhielten sich CD34⁺/CD38⁺ Zellen in einer Arbeit von Sawano et al. (Sawano et al., 2001) bezüglich des VEGF-Rezeptors. Die von dieser Arbeitsgruppe untersuchten Zellen aus Nabelschnurblut wiesen eine nur geringe Expression von VEGF-R auf, nach Stimulation mit den Cytokinen Interleukin 3 und 6, GM-CSF, M-CSF und FLT3 - Ligand steigerte sich diese jedoch auf 95 %. Dies ging einher mit einer Differenzierung der Zellen. Die fehlende Coexpression von VEGF und VEGF-R ist daher mit den Ergebnissen aus *in vitro* Versuchen zum Teil erklärbar.

Um die Gefäßwand permeieren zu können, ist auch eine Protease wie die beschriebene Matrixmetalloprotease 9 erforderlich. Auch deren Sekretion ist gering. Vorarbeiten haben jedoch gezeigt, dass eine Stimulation über die beschriebene SDF1–CD184–Achse *in vitro* zu einer Hochregulation der MMP – Produktion führt (Janowska-Wieczorek, 2000). Insofern kann von einer Veränderung ausgegangen werden, sofern die Zelle entsprechend den Chemokin Rezeptor 4 (CD184) exprimiert, was im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen an CD34⁺ peripher entnommenen Stammzellen nur in einem Teil der Fälle nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend handelt es sich in den durchgeführten Untersuchungen um Proben, die einem heterogenen Patientenkollektiv entstammen. Die niedrige Expression des CXCR4 sowie die fehlende Synthese von VEGF sowie der MMP9 weisen darauf hin, dass das Homingpotential der CD34⁺ Zellen in den verschiedenen Apheresaten sehr unterschiedlich ist. Die Ursachen hierfür sind sicherlich multifaktoriell und teilweise durch unterschiedliche Stimulation mit Wachstumsfaktoren, unterschiedliche Vitalität der Hämatopoese vor der Mobilisierungstherapie und möglicherweise auch durch die Grunderkrankung beeinflusst. Aus den gewonnenen Daten ergibt sich die Notwendigkeit einer Verlaufsuntersuchung zu einem definierten Zeitpunkt der Apherese hinsichtlich der Homingfaktoren unter Einbezug der durchgeführten Therapie, der Krankheit, der Vortherapie und der Stimulation des Knochenmarks. Die besondere Rolle des CD34 als relevantem Molekül für Adhäsion und Extravasation ist hervorzuheben (Gangenahalli et al., 2006). In Frage gestellt werden kann angesichts der Relevanz und der Variabilität in der Expression der anderen hier beschriebenen Rezeptoren die ausschließliche Selektion von CD34⁺ Zellen. Aufgrund der hier gezeigten Daten ist zu vermuten, dass innerhalb der Population der CD34⁺ Zellen unterschiedliche Reifungsstadien der Stammzellen vorliegen könnten.

Gute Parameter bei einer simultanen Untersuchung wären CD133, CD117 und CD184. In dieser Kombination können diese Parameter zu einem definierten Untersuchungszeitpunkt diskriminieren, da sie im Laufe der Zellentwicklung unterschiedlich exprimiert werden. Außerdem werden sie insbesondere von den Vorläuferzellen exprimiert, die ein hohes Homingpotential haben, da diese CD184 exprimieren. Als CD133 und CD117 – positive Zellen sind sie zudem frühe Vorläuferzellen, die eine langfristige Repopularisation des Knochenmarks ermöglichen. Alternative Mobilisierungskonzepte, die auf andere Rezeptoren fokussieren, zeigen, dass diese offenbar für den eigentlichen Homingprozess unentbehrlich sind (Pelus, 2008). Es fehlt derzeit noch die Möglichkeit einer Behandlung der Zellen *in vitro*. Mittels differenzierter Kulturbedingungen könnte versucht werden, den Zellen schon vor der Transplantation ein Milieu anzubieten, welches den Homingprozess sicherstellt und beschleunigt. Erste Versuche weisen auf mögliche Verbesserungen hin (Ohno et al., 2008), sofern Vorläuferzellen vor der Transplantation kultiviert werden.

Die Betrachtung der Vorläuferzellen im Bezug auf homing-relevante Merkmale wäre in diesem Zusammenhang unerlässlich und könnte zu einem verbesserten Verständnis für die Physiologie der Stammzelltransplantation und im Speziellen des Homing führen.

8 Literaturverzeichnis

- Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC (1997) The Chemokine SDF-1 is a Chemoattractant for Human CD34⁺ Hematopoietic Progenitor Cells and Provides a New Mechanism to Explain the Mobilization of CD34⁺ Progenitors to Peripheral Blood. *J Exp Med* 185(1):111-120.
- Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA (1995) The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 128(6): 1243-1253.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T (2004) Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche. *Cell* 118(2): 149-161.
- Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87(8): 3336-3343.
- Baumhater S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA (1993) Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262(5132): 436-438.
- Bautz F, Rafii S, Kanz L, Mohle R (2000) Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine-stimulated hematopoietic progenitor cells: Possible role in the hematopoietic microenvironment. *Experimental Hematology* 28(6): 700-706.
- Becker PS, Nilsson SK, Li Z, Berrios VM, Dooner MS, Cooper CL, Hsieh CC, Quesenberry PJ (1999) Adhesion receptor expression by hematopoietic cell lines and murine progenitors: Modulation by cytokines and cell cycle status. *Experimental Hematology* 27(3): 533-541.
- Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM (1999) Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Hematopoietic Malignancies. *Cancer Res* 59(3): 728-733.
- Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M, Laato M, Syrjänen S, Syrjänen K, Collan Y, Pyrhönen S (2008) VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival. *Anticancer Res* 28(6B):3865-70.

- Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, Dick JE (1999) Bone Morphogenetic Proteins Regulate the Developmental Program of Human Hematopoietic Stem Cells. *J Exp Med* 189(7): 1139-1148.
- Bonnesen B, Pappot H, Holmstav J, Skov BG (2009) Vascular endothelial growth factor A and vascular endothelial growth factor receptor 2 expression in non-small cell lung cancer patients: Relation to prognosis. *Lung Cancer*. Mar 24. In Press.
- Brandt JE, Bhalla K, Hoffman R (1994) Effects of interleukin-3 and c-kit ligand on the survival of various classes of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 83(6): 1507-1514.
- Briddell RA, Broudy VC, Bruno E, Brandt JE, Srouf EF, Hoffman R (1992) Further phenotypic characterization and isolation of human hematopoietic progenitor cells using a monoclonal antibody to the c-kit receptor. *Blood* 79(12): 3159-3167.
- Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, Lu L, Maze R, Beckmann MP, Cerami A, Ralph P (1993) Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells. Interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression. *J Immunol* 150(8): 3448-3458.
- Bundesärztekammer (1997) Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen. *Deutsches Ärzteblatt* 94(23): 1584 - 1592.
- Byk T, Kahn J, Kollet O, Petit I, Samira S, Shivtiel S, Ben-Hur H, Peled A, Piacibello W, Lapidot T (2005) Cycling G1 CD34⁺/CD38⁺ Cells Potentiate the Motility and Engraftment of Quiescent G0 CD34⁺/CD38^{low} Severe Combined Immunodeficiency Repopulating Cells. *Stem Cells* 23(4): 561-574.
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT (2003) Osteoblastic cells regulate the hematopoietic stem cell niche. *Nature* 425(6960): 841-846.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380(6573): 435-439.
- Casella I, Feccia T, Chelucci C, Samoggia P, Castelli G, Guerriero R, Parolini I,

- Petrucci E, Pelosi E, Morsilli O, Gabbianelli M, Testa U, Peschle C (2003) Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. *Blood* 101(4): 1316-1323.
- Civin CI, Strauss L C, Brovall C, Fackler M J, Schwartz J F, Shaper JH (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG- 1a cells. *J Immunol* 133(1): 157-165.
- Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olande, JV, Connolly DT, Stern D (1990) Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172(6): 1535-1545.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L (2001) VEGF Receptor Signal Transduction. *Trends in Biochemical Sciences* 2001(112): 488-494.
- de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 25(5047): 989-91.
- de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BI, Testa NG (1998) CD34⁺AC133⁺ Cells Isolated from Cord Blood are Highly Enriched in Long-Term Culture-Initiating Cells, NOD/SCID-Repopulating Cells and Dendritic Cell Progenitors. *Stem Cells* 16: 387-396.
- Dianzani U, Malavasi F (1995) Lymphocyte adhesion to endothelium. *Crit Rev Immunology* 15(2): 167-200.
- Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane W, Wu Y, Chadburn A, Hyjek E, Gill M, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S (2000) Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest* 106(4): 511-521.
- Donohue D, Gabrio BW, Finch CA (1958) Quantitative Measurement of Hematopoietic Cells of the Marrow. *J Clin Invest* 37(11): 1564.
- Dorshkind K (1990) Regulation of Hemopoiesis by Bone Marrow Stromal Cells and Their Products. *Annual Review of Immunology* 8(1): 111-137.
- Dykstra B, de Haan G (2008) Hematopoietic stem cell aging and self renewal. *Cell and Tissue research* 331(1): 91-101.
- Dykstra B, Ramunas J, Kent D, McCaffrey L, Szumsky E, Kelly L, Farn K, Blaylock A,

Eaves C, Jervis E (2006) High-resolution video monitoring of hematopoietic stem cells cultured in single-cell arrays identifies new features of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(21): 8185-8190.

Dzierzak E, Medvinsky A (1995) Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends in Genetics* 11(9): 359-366.

Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 161(2): 851-858.

Fiedler W, Graeven U, Ergun S, Verago S, Kilic N, Stockschlader M, Hossfeld DK (1997) Vascular Endothelial Growth Factor, a Possible Paracrine Growth Factor in Human Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 89(6): 1870-1875.

Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75(12): 2417-2426.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376(6535): 66-70.

Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J (1999) Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 126(13): 3015-3025.

Fragoso R, Elias AP, Dias S (2007) Autocrine VEGF loops, signaling pathways, and acute leukemia regulation. *Leuk Lymphoma* 48(3):481-8.

Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M (2000) Isolation and characterization of human CD34⁻Lin⁻ and CD34⁺Lin⁻ hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 95(9): 2813-2820.

Gangenahalli GU, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma RK, Chandra R, Luthra PM (2006) Hematopoietic Stem Cell Antigen CD34: Role in Adhesion or Homing. *Stem Cells and Development* 15(3): 305-313.

Gazitt Y, Akay C (2004) Mobilization of Myeloma Cells Involves SDF-1/CXCR4 Signaling and Downregulation of VLA-4. *Stem Cells* 22(1): 65-73.

Gerber HP, Ferrara N (2002) The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *Journal of Molecular Medicine* 81(1): 20-31.

Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N (2002) VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417(6892): 954-958.

Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D (1996) Commentary: Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 156(1): 1-4.

Gold J, Valinski HM, Hanks AN, Ballen KK, Hsieh CC, Becker PS (2006) Adhesion receptor expression by CD34⁺ cells from peripheral blood or bone marrow grafts: Correlation with time to engraftment. *Experimental Hematology* 34(5): 680-687.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183(4): 1797-1806.

Haar JL, Ackerman GA (1971) A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *The Anatomical Record* 170(2): 199-223.

Hao Q, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM (1995) A functional comparison of CD34⁺ CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 86(10): 3745-3753.

Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC (2001) CD34⁻ Blood-Derived Human Endothelial Cell Progenitors. *Stem Cells* 19(4): 304-312.

Hassan HT, Zander A (1996) Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. *Acta Haematol* 95(3-4): 257-62.

Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T (1995) The Stem Cell Antigen CD34 Functions as a Regulator of Hemopoietic Cell Adhesion. *PNAS* 92(26): 12240-12244.

Heissig B, Rafii S, Akiyama H, Ohki Y, Sato Y, Rafael T, Zhu Z, Hicklin DJ, Okumura K, Ogawa H, Werb Z, Hattori K (2005) Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization. *J Exp Med* 202(6): 739-750.

Hesselgesser J, Liang M, Hoxie J, Greenberg M, Brass LF, Orsini MJ, Taub D, Horuk R (1998) Identification and Characterization of the CXCR4 Chemokine Receptor in Human T Cell Lines: Ligand Binding, Biological Activity, and HIV-1 Infectivity. *The Journal of Immunology* 160: 877-883.

Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Nabholz JM, Cabuhat ML, Montano J, Chang H, Rozmus J, Russell JA, Edwards DR, Turner AR (1999) Growth Factors and Cytokines Upregulate Gelatinase Expression in Bone Marrow CD34⁺ Cells and Their Transmigration Through Reconstituted Basement Membrane. *Blood* 93(10): 3379-3390.

Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Dobrowsky A, Ratajczak MZ, Cabuhat ML (2000) Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34⁺ cells in response to chemokines. *Experimental Hematology* 28(11): 1274-1285.

Jansen J, Hank SS, Thompson JM, Dugan MJ, Akard LP (2005) Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9(1): 37-50.

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438(7069): 820-827.

Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Maika M, Reza R, Marquez LA, Christofidou-Solomidou M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ (2001) The SDF-1-CXCR4 Axis Stimulates VEGF Secretion and Activates Integrins but does not Affect Proliferation and Survival in Lymphohematopoietic Cells. *Stem Cells* 19: 453-466.

Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T (2003) HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest.* 112(2): 160-169.

Krause D, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS (1994) Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 84(3): 691-701.

Kyba M, Perlingeiro RC, Daley R, George Q (2002) HoxB4 Confers Definitive Lymphoid-Myeloid Engraftment Potential on Embryonic Stem Cell and Yolk Sac Hematopoietic Progenitors. *Cell* 109(1): 29-37.

Lapidot T, Petit I (2002) Current understanding of stem cell mobilization. *Experimental Hematology* 30(9): 973-981.

- Lapidot T, Dar A, Kollet O (2005) How do stem cells find their way home? *Blood* 106(6): 1901-1910.
- Laterveer L, Lindley IJ, Hamilton MS, Willemze R, Fibbe WE (1995) Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* 85(8): 2269-2275.
- Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL (1995) T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* 154(9): 4379-4389.
- Lévesque JP, Winkler IG, Hendy J, Williams B, Helwani F, Barbier V, Nowlan B, Nilsson SK (2007) Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. *Stem Cells* 25(8):1954-65.
- Li W, Johnson SA, Shelley WC, Yode MC (2004) Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Experimental Hematology* 32(12): 1226-1237.
- Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1994) Both interleukin-8 receptors independently mediate chemotaxis : Jurkat cells transfected with IL-8R1 or IL-8R2 migrate in response to IL-8, GRO[alpha] and NAP-2. *FEBS Letters* 341(2-3): 187-192.
- Majdic O, Stockl J, Pickl WF, Bohusla J, Strobl H, Scheinecker C, Stockinger H, Knapp W (1994) Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34. *Blood* 83(5): 1226-1234.
- Marković O, Marisavljević D, Čemerikić V, Vidović A, Peruničić M, Todorović M, Elezović I, Čolović M (2008) Expression of VEGF and microvessel density in patients with multiple myeloma: clinical and prognostic significance. *Medical Oncology* 25(4): 451-457.
- Matsumoto K, Yasui K, Yamashita N, Horie Y, Yamada T, Tani Y, Shibata H, Nakano T (2000) In Vitro Proliferation Potential of AC133 Positive Cells in Peripheral Blood. *Stem Cells* 18(3): 196-203.
- McGrath EK, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J (1999) Embryonic Expression and Function of the Chemokine SDF-1 and Its Receptor, CXCR4. *Developmental Biology* 213: 442-456.
- McGuckin CP, Pearce D, Forraz N, Tooze JA, Watt SM, Pettengell R (2003)

Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *European Journal of Haematology* 71(5): 341-350.

Möhle R, Green D, Moore MAS, Nachman RL, Rafii S (1997) Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(2): 663-668.

Morita N, Yamamoto M, Tanizawa T (2003) Correlation of c-kit expression and cell cycle regulation by transforming growth factor beta in CD34⁺ CD38⁻ human bone marrow cells. *Eur J Haematol* 71: 351–358.

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T (1996) Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382(6592): 635-638.

Naito H, Kidoya H, Sato Y, Takakura N (2009) Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population. *J Biochem* 145(5):653-9.

Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi BZ (1994) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res* 5(1):89-97

Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA (2001) Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* 97(8): 2293-2299.

Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, Bertocello I, Bendall LJ, Simmons PJ, Haylock DN (2005) Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 106(4): 1232-1239.

Ohno N, Kajiume T, Sera Y, Sato, T, Kobayashi M (2008) Short-term culture of umbilical cord blood-derived CD34 cells enhances engraftment into NOD/SCID mice through increased CXCR4 expression. *Stem cells and development*. In Print.

Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H (1996) Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273(5272): 242-5.

Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS (1995) The VLA4/VCAM-1 Adhesion Pathway Defines Contrasting Mechanisms of Lodgement of

Transplanted Murine Hemopoietic Progenitors Between Bone Marrow and Spleen. PNAS 92(21): 9647-9651.

Park LS, Friend D, Price V, Anderson D, Singer J, Prickett KS, Urdal DL (1989) Heterogeneity in human interleukin-3 receptors. A subclass that binds human granulocyte/macrophage colony stimulating factor. J Biol Chem 264(10): 5420-5427.

Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T (2000) The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34⁺ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. Blood 95(11): 3289-3296.

Pelus LM, Fukuda S (2006) Peripheral blood stem cell mobilization: The CXCR2 ligand GRO[β] rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. Experimental Hematology 34(8): 1010-1020.

Pelus LM (2008) Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. Current opinion in Hematology, 15: 285-292

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 (2002) G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. Nature 3(7): 687-694.

Pomyje J, Zivny J, Sefc L, Plasilova M, Pytlik R, Necas E (2003) Expression of genes regulating angiogenesis in human circulating hematopoietic cord blood CD34⁺/CD133⁺ cells. European Journal of Haematology 70(3): 143-150.

Rao Q, Zheng GG, Lin YM, Wu KF (2004) Production of matrix metalloproteinase-9 by cord blood CD34⁺ cells and its role in migration. Annals of Hematology 83: 409-413.

Ratajczak MZ, Kuczynski WI, Sokol DL, Moore JS, Pletcher CH Jr, Gewirtz AM (1995) Expression and physiologic significance of Kit ligand and stem cell tyrosine kinase-1 receptor ligand in normal human CD34⁺, c-Kit⁺ marrow cells. Blood 86(6): 2161-2167.

Rawluk J (2004) Untersuchungen zur Signaltransduktion des CXCR4 (CD 184) Chemokinrezeptors im Hinblick auf Vitalität und Migration humaner B-CLL-Zellen. Medizinische Fakultät Freiburg i. Br., Albert-Ludwigs-Universität: 78.

Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF (1980) Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and

leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(3): 1588-92.

Rennick D, Jackson J, Moulds C, Lee F, Yang G (1989) IL-3 and stromal cell-derived factor synergistically stimulate the growth of pre-B cell lines cloned from long-term lymphoid bone marrow cultures. *J Immunol* 142(1): 161-166.

Roberts WG, Palade GE (1995) Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 108(6): 2369-2379.

Ronen A, Sara F (2002) From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Seminars in Immunology* 14(2): 93-104.

Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Shibuya M (1997) The Phosphorylated 1169-Tyrosine Containing Region of Flt-1 Kinase (VEGFR-1) Is a Major Binding Site for PLC[gamma]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238(2): 487-491.

Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M (2001) Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97(3): 785-791.

Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV (1992) Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13(2): 204-208.

Schofield KP, Rushton G, Humphries MJ, Dexter TM, Gallagher JT (1997) Influence of Interleukin-3 and Other Growth Factors on alpha 4beta 1 Integrin-Mediated Adhesion and Migration of Human Hematopoietic Progenitor Cells. *Blood* 90(5): 1858-1866.

Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4(1-2): 7-25.

Schraufstatter IU, Chung J, Burger M (2001) IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(6): L1094-1103.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376(6535): 62-66.

Shen BQ, Lee DY, Zioncheck TF (1999) Vascular Endothelial Growth Factor Governs

Endothelial Nitric-oxide Synthase Expression via a KDR/FIk-1 Receptor and a Protein Kinase C Signaling Pathway. *J Biol Chem* 274(46): 33057-33063.

Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushima H, Sato M (1990) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5(4): 519-24.

Shubinsky G, Schlesinger M (1997) The CD38 Lymphocyte Differentiation Marker: New Insight into Its Ecto enzymatic Activity and Its Role as a Signal Transducer. *Immunity* 7(3): 315-324.

Sieburg HB, Cho RH, Dykstra B, Uchida N, Eaves C, Muller-Sieburg CE (2006) The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood* 107(6): 2311-2316.

Sutherland DR, Watt SM, Dowden G, Karhi K, Baker MA, Greaves MF, Smart JE (1988) Structural and partial amino acid sequence analysis of the human hemopoietic progenitor cell antigen CD34. *Leukemia* 2(12): 793-803.

Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG (1996) Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood* 87(2): 518-524.

Tavassoli M, Konno M, Shiota Y, Omoto E, Minguell JJ, Zanjani ED (1991) Enhancement of the Grafting Efficiency of Transplanted Marrow Cells by Preincubation With Interleukin-3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 77(7): 1599-1606.

Terskikh AV, Miyamoto T, Chang C, Diatchenko L, Weissman IL (2003) Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors. *Blood* 102(1): 94-101.

To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA (1997) The Biology and Clinical Uses of Blood Stem Cells. *Blood* 89(7): 2233-2258.

Vermeulen M, Le Pesteur F, Gagnerault MC, Mary JY, Sainteny F, Lepault F (1998) Role of Adhesion Molecules in the Homing and Mobilization of Murine Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood* 92(3): 894-900.

Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL (2004) Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 103(9): 3258-3264.

Wang MW, Consoli U, Lane CM, Durett A, Lauppe MJ, Champlin R, Andreeff M,

Deisseroth AB (1998) Rescue from apoptosis in early (CD34-selected) versus late (non-CD34-selected) human hematopoietic cells by very late antigen 4- and vascular cell adhesion molecule (VCAM) 1-dependent adhesion to bone marrow stromal cells. *Cell Growth Differ* 9(2): 105-12.

Watt SM, Karhi K, Gatter K, Furley AJ, Katz FE, Healy LE, Altass LJ, Bradley NJ, Sutherland DR, Levinsky R (1987) Distribution and epitope analysis of the cell membrane glycoprotein (HPCA-1) associated with human hemopoietic progenitor cells. *Leukemia* 1 (5): 417-426.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001) Stem and progenitor cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17(1): 387-403.

Welgus HG, Campbell EJ, Cury JD, Eisen AZ, Senior RM, Wilhelm SM, Goldberg GI (1990) Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J Clin Invest* 86(5): 1496-1502.

Wysoczynski M, Reza R, Ratajczak J, Kucia M, Shirvaikar N, Honczarenko M, Mills M, Wanzeck J, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ (2005) Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 105(1): 40-48.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997) AC133, a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood* 90(12): 5002-5012.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W G, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425(6960): 836-841.

Zsebo MZ, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, Hsu RY, Birkett NC, Okino KH, Murdock DC, Jacobsen FW, Langley KE, Smith KA, Takeishi T, Cattanch BM, Galli SJ, Suggs SV (1990) Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63(1): 213-224.

9 Anhang

9.1 Messverfahren

Als Messgerät diente das FACSCalibur Cytometer von Becton Dickinson Biosciences. Die Ausführung enthielt einen 488 nm Argon – Laser und einen 635 nm Dioden – Laser (rot). Eine Mehrfarb – Messung war so möglich, als Fluoreszenz – Farbstoffe wurden entsprechend FITC (Fluorescein Isothiocyanat), PE (Phycoerytherin) und PerCP (Peridinin-chlorophyll-protein complex) verwendet.

Die Farbstoffe emittieren Licht mit einer Wellenlänge von ca. 525 nm (FITC), 575 nm (PE) und 650 nm (PerCP).

Als Wasch- und Messpuffer diente kommerzielle verfügbare PBS (s. Tabelle 2).

Die Färbung erfolgte über 15 Minuten in kühler und dunkler Umgebung. Um Störungen während der Messung zu vermeiden, erfolgte eine Lyse der Erythrozyten über 10 Minuten in ebenfalls kühler und dunkler Umgebung.

Zur Messung der intrazellulären Marker erfolgte eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen nach der Anfärbung der Oberflächenstrukturen. Anschließend wurde in einem weiteren Schritt die intrazelluläre Struktur getrennt angefärbt.

Zusätzlich wurde bei jeder Messung die Vitalität der Zellen mittels 7-AAD überprüft, diese Methodik wurde entsprechend von Schmid et al. beschrieben (Schmid et al., 1992).

Um möglichst exakte Ergebnisse zu erhalten, wurde eine Mindestanzahl von 500 CD34⁺ Zellen definiert.

Es erfolgte eine Messung ohne Ausschlusskriterien, so dass alle Zellen registriert und beurteilt wurden.

9.2 Verzeichnis der verwendeten Reagenzien und Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

Antikörper	Herstellerinformationen
CD34	BD Biosciences, Monoclonal Mouse anti-human CD34, Clone 581, Isotype IgG1, FITC oder PE - konjugiert
CD45	BD Biosciences, Monoclonal Mouse anti-human CD45, Clone 2D1, IgG1, k, PerCP
CD184	R&D Systems, PE-conjugated mouse monoclonal anti-human, Clone: 12G5, Ig class: mouse IgG2A
CD123	BD Pharmingen R-PE-Conjugated Mouse Anti-Human Monoclonal Antibody, Clone : 7G3, Isotype : Mouse IgG2a
CD128	BD Pharmingen PE Conjugated Mouse Anti-human CD128b (IL-8RB/CXCR2), Clone: 6C6, Isotype: Mouse IgG1, λ
CD133	Miltenyi Biotec PE-conjugated CD133/1 (AC133) Antibody, Clone: AC133, Isotype: Mouse IgG1
CD117	BD Pharmingen R-PE-Conjugated Mouse Anti-Human Monoclonal Antibody, Clone : YB5.B8, Isotype : Mouse IgG1
CD49	R&D Systems Monoclonal Anti-human Integrin α 4/CD49d-Phycoerythrin, Clone: 7.2R, Isotype: mouse IgG ₁

Fortsetzung Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

CD38	BD Pharmingen FITC – Conjugated Mouse Anti-Human Monoclonal Antibody, Clone: Hit 2, Isotype: IgG1
VEFG-R1	R&D Systems, Phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal anti-human VEGF R1 (Fit-1), Clone: 49560, Isotype: mouse IgG ₁
VEGF	R&D Systems, Phycoerythrin-conjugated anti-human VEGF, Clone: 23410, Specificity: rhVEGF-A, Ig class: mouse IgG _{2A}
MMP9	R&D Systems, Anti-human MMP-9-Fluorescein Monoclonal Antibody, Clone: 56129, Isotype: mouse IgG2B
CD45 / 34	BD Biosciences, CD45FITC/34PE, Clone 2D1, 8G12, IG Class: Mouse IgG1
7-AAD	BD Pharmingen, 7-AMINO-ACTINOMYCIN D
Isotyp - Kontrollen	BD Biosciences Simultest Control IgG 1/IgG 1 FITC/PE, Clone X40Biosciences / Mouse IgG1, PerCP
Erythrozyten - Lyse	Apotheke des Universitätsklinikums Kröllwitz, Steril filtrierte Lösung zur Erythrocytenlyse (829mg Ammoniumchlorid, 100 mg Kaliumhydrogencarbonat, 3,72 Natriumedetat, Natronlauge 1 M, pH 7,3)
Fix & Perm Cell Permeabilization Kit	An Der Grub Bio Research GmbH, Fix & Perm cell permeabilization
PBS	Biochrom AG, PBS – Trockensubstanz ohne Ca ²⁺ Mg ²⁺ (Dublecco)

Thesen

- 1: Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Apherese beeinflusst die Expression von Homing – relevanten Merkmalen
- 2: Mit steigendem Alter sinkt die Fähigkeit zur langfristigen Repopularisation des Knochenmarks durch verminderte Expression des CD133
- 4: Ein großer Anteil der CD34⁺ Zellen exprimiert zusätzlich CD117 und führt zu einer kurzfristigen Repopularisation des Knochenmarks. Dies geht jedoch einher mit einer raschen Ausdifferenzierung dieser Zellen.
- 5: Die Expression von CD49 ist höher bei frühen Vorläuferzellen, die ein höheres Wachstums- und Homingpotential haben, abzulesen an der Expression von CD117 und CD133.
- 6: CD34⁺ Vorläuferzellen produzieren nach der Apherese nur in geringem Maße die Matrixmetalloprotease 9. Damit ist das Homing erschwert.
- 7: Für das Homing förderliche Eigenschaften potenzieren sich und treten gemeinsam auf.
- 8: Im Rahmen der Stammzellapherese werden verschiedene Populationen von Vorläuferzellen mit unterschiedlichen Eigenschaften freigesetzt und gesammelt.

Lebenslauf

Name: Jens Abendroth

Konfession: Evangelisch-lutherisch

Geburtsdatum: 27. Oktober 1981 in Osnabrück

Familienstand: ledig

Mutter: Dr. med. Annette Abendroth, Fachärztin für Psychiatrie

Vater: Werner Abendroth, Lehrer für Violine am Konservatorium Osnabrück

Schullaufbahn:

- 1987 – 1991 Grundschule, St.-Bernhard-Schule Rulle, Wallenhorst
- 1991 – 1993 Orientierungsstufe Dom, Osnabrück
- 1993 – 2000 Gymnasium Carolinum, Osnabrück
- Abitur am 15. Juni 2000 (Note 2,1)
- Zivildienst im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes, Landkreis Osnabrück von 2000 bis 2001
- Ausbildung zum Rettungssanitäter, Abschluss am 06.04.2001 (Note 2,0)

Hochschullaufbahn:

- Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg seit Oktober 2001
- Abschluss des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 17.09.2003 (Note 2,66)
- Famulaturen:
 - stationäre Gastroenterologie (02-03/2004)
 - stationäre Kardiologie (09/2004)
 - ambulante Psychiatrie (08/2005)
 - stationäre und ambulante Hämatologie und Onkologie (09-10/2005)
 - Intensivmedizin und Anästhesie (03/2006)
- Praktisches Jahr
 - 1. Tertial: Klinik für Gefäßchirurgie, Krankenhaus St. Elisabeth und Barbara, Halle, CA Dr. med. Wollert
 - 2. Tertial: Klinik für Innere Medizin, Internistische Aufnahmestation und

Kardiologie, Krankenhaus St. Elisabeth und Barbara, Halle,
CA Prof. Dr. med. Willenbrock

- 3. Tertial: Praxis für Allgemeinmedizin, Frau Dipl. med. Just, Nauendorf
- Abschluss des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 09.05.2008 (Note 2,5)
Approbation als Arzt am 21.05.2008
- Studium der Gesundheitsökonomie an der Fernfachhochschule Riedlingen von
2006 - 2008, Abschluss als Betriebswirt (FH/HB) am 26.04.2008
(Note 2,1)
- Seit dem 01.07.2008 Assistenzarzt an der Martin – Luther – Universität Halle -
Wittenberg, Klinik für Onkologie/ Hämatologie/ Hämostaseologie
- Zusatzqualifikationen:
 - 2002 Ausbildung zum ehrenamtlichen Sterbebegleiter im Hospiz Halle e. V.
 - Sprachen: Deutsch, Englisch (fließend),
 - Französisch, Spanisch (Grundkenntnisse)

Weitere Aktivitäten:

- 2004 - 2006 Mitglied des Fakultätsrates der medizinischen Fakultät der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 2005-2007 Mitglied des akademischen Senates der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
- 2005-2007 Mitglied des Studierendenrates der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
- seit 2003 Mitglied des Orchesters der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg
- 1987 - 2000 Unterricht im Fach Violoncello am Konservatorium Osnabrück
- 1997-1998 Teilnahme am Sozialen Seminar der katholischen
Domkirchengemeinde Osnabrück

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Publikationen:

Auszüge aus der Arbeit wurden nicht veröffentlicht.

Frühere Promotionsversuche:

Ich bestätige, dass ich bisher keine Promotionsversuche durchgeführt habe.

Halle, den 12. November 2009

Ich danke Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H. - J. Schmoll dafür , dass ich diese Arbeit an seiner Klinik ausführen durfte.

Herrn Dr. med. H. - H. Wolf danke ich für die Überlassung des Themas, die Einarbeitung in die Methodik und die fachliche Diskussion der gewonnenen Daten und für seine Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse sowie der kritischen Korrektur der Dissertation.

Für die technische Unterstützung und die freundliche Aufnahme in ihr Labor danke ich dem Team des Interdisziplinären Labors des Klinikums der Martin-Luther-Universität Halle - Wittenberg, Frau Schlesinger, Frau Muselinski und Frau Werquin.

Meiner Familie danke ich für die Möglichkeit des Studiums der Medizin, die ständige Unterstützung und das Vertrauen in mich.