

Mathias David Marian Johannes Lichterfeld  
Dr.med.

## **Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen durch Verminderung von Expression und Funktion des Integrins „very late antigen-4“**

Geboren am 20.09.1974 in Köln  
Reifeprüfung am 01.06.1994 in Bonn  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/95 bis SS 2000  
Physikum am 18.09.1996 an der Universität Bonn  
Klinisches Studium an der Universität Heidelberg  
Praktisches Jahr in New York (USA), Houston (USA) und Heidelberg  
Staatsexamen am 17.10.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Rainer Haas

Das Integrin VLA-4 spielt eine zentrale Rolle für Mobilisierung und „Homing“ hämatopoetischer Stammzellen. Da im Tiermodell monoklonale Antikörper gegen VLA-4 zu einer Stammzellmobilisierung führen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein gegen das Translations-Initiations-Kodon der  $\alpha 4$ -mRNA gerichtetes AS-ODN verwendet, um die Adhäsionseigenschaften von humanen CD34+ hämatopoetischen Stammzellen an Knochenmarkstroma zu hemmen. Damit böte sich eine neue Methode zur Stammzellmobilisierung für die autologe oder allogene periphere Blutstammzelltransplantation.

Dieses AS-ODN hemmte im Zellkulturversuch unter Einsatz kationischer Transfektionsreagenzien die  $\alpha 4$ -Proteinexpression in CD34+ hämatopoetischen Stammzellen um 29% (SA: 14,5) im Vergleich zu einer unbehandelten Zellprobe. Die Expression der  $\alpha 4$ -mRNA wurde durch das AS-ODN um 42% (SA: 6,5) vermindert. In funktionellen Tests zeigte sich, daß die  $\alpha 4$ -Proteinhemmung eine Verminderung der Adhäsion auf Endothelzelllayer um 27,78% (SA: 7,8) und eine Hemmung der klonogenen Wachstumsfähigkeit von Progenitorzellen um 32% (SA: 8,7) bewirkte. In einem in vitro-Mobilisierungstest mit Knochenmarklangzeitkulturen konnten durch die Transfektion des AS-ODN hämatopoetische Progenitorzellen aus dem Knochenmarkstroma in die nonadhärente Zellfraktion freigesetzt werden.

Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die klinische Erprobung des AS-ODN-Konstruktes in Phase I-Studien bei Patienten mit unzureichender Stammzellmobilisierung im Rahmen der peripheren Blutstammzelltransplantation.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde als Parameter zur Untersuchung der VLA-4- vermittelten Bindungseigenschaften von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen der Funktionszustand von VLA-4 mit einem VCAM-Ig-Fusionsprotein qualifiziert. Untersuchungen von CD34+ Zellen im Laufe der Mobilisierung mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren bei 5 Patienten zeigten, daß sich die VCAM-1-Bindungseigenschaften von CD34+ Zellen aus PB im Vergleich zu CD34+ Zellen aus KM signifikant vermindert waren und daß diese Unterschiede der Ligandenbindungsfähigkeit auf Veränderungen der Rezeptoraffinität, -avidität und der Expressionsintensität von  $\alpha 4$  zurückgeführt werden konnten. Darüberhinausgehend wurde demonstriert, daß die VCAM-1-Bindungsintensität von CD34+ Zellen aus Knochenmark mit Differenzierungs- und Proliferationseigenschaften der Zellen assoziiert war und bei einer untersuchten Stichprobe statistisch negativ mit der Anzahl zirkulierender CD34+ Zellen im peripheren Blut während der Mobilisierung korreliert war.

Anhand von in vitro-Experimenten wurde dargestellt, daß bivalente Magnesium-Kationen den Funktionszustand von  $\alpha 4$  stimulieren, während durch unterschiedliche Zytokine keine nachweisbaren Auswirkungen auf die VCAM-1-Bindungsfähigkeit von CD34+ Zellen beobachtet wurde. Eine Intensivierung der VCAM-1-Bindungsfähigkeit CD34+ Zellen fand sich nach Koinkubation mit Endothelzellen sowie im Anschluß an die transendotheliale Migration.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird in der vorliegenden Arbeit die Auffassung vertreten, daß die Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen und damit einhergehende Veränderungen ihrer Expansion und Entwicklung auf molekulare Ebene u. a. durch funktionale Veränderungen der VLA-4-Rezeptoraffinität und -avidität sowie der Expressionsintensität von  $\alpha 4$  auf der Zelloberfläche reguliert werden können.

Da funktionale Eigenschaften des VLA-4-Rezeptors auf hämatopoetischen Stammzellen im Gegensatz zu Expressionsintensität des Moleküls mit Differenzierungs- und Proliferationsveränderungen der Stammzellen assoziiert waren, zeigten die Ergebnisse, daß der Funktionszustand von VLA-4, so wie er hier qualifiziert wurde, in weit höherem Maße zur Charakterisierung der VLA-4-vermittelten Bindungseigenschaften von Stammzellen geeignet ist als die ausschließlich deskriptive Analyse der  $\alpha$ 4-Expressionsintensität.