

Simon Renders

Dr. med.

## **Netrin-1 and its receptor Neogenin-1 regulate self-renewal and dormancy of hematopoietic stem cells**

Fach/ Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Christof von Kalle

Blutstammzellen erneuern das hämatopoietische System während des ganzen Lebens und überdauern während steady-state Situationen in einem Ruhestatus, der essentiell für den Erhalt ihrer Stammzeleigenschaften ist. In Situationen von erhöhtem zellulären Bedarf wie Infektionen oder Blutverlust werden Blutstammzellen temporär aktiviert und beteiligen sich aktiv an der Blutbildung. Wie dieser Ruhestatus in vivo reguliert ist, ist daher essentiell für das Verständnis hämatologischer Erkrankungen oder der Verschlechterung des Immunsystems im Alter.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Regulatoren von Blutstammzellfunktionen sowie des Ruhezustandes zu identifizieren und zu analysieren. Hierfür führte ich initial eine Literaturrecherche durch und konnte Rezeptoren identifizieren, die nur in den unreifsten, potentesten Zellen des hämatopoietischen Systems, den Blutstammzellen exprimiert werden. Der Rezeptor Neo1, der als Modulator für neurales Auswachsen der Ligandenfamilien der Netrine sowie RGMa-c bekannt ist, war spezifisch und ausschließlich in Blutstammzellen und am stärksten in Blutstammzellen im Ruhestatus exprimiert wird. Zusätzlich konnte ich zeigen, dass die Aktivierung von Blutstammzellen in Stresssituationen die Expression von Neo1 deutlich reduziert, was auf eine funktionelle Verbindung von Neo1 mit dem Ruhezustand von Blutstammzellen hindeutete. Anschließend analysierte ich das Blutsystem eines Mausmodells, in welchem es durch „gene-trapping“ zu einem Verlust der Neo1 Expression kommt, mittels verschiedener Transplantationsexperimente. Hier zeigte sich das Neo1 mutiertes Knochenmark initial einen kompetitiven Vorteil hatte und in diesem die Zahl der Blutstammzellen in den ersten Monaten nach Transplantation wuchs. Jedoch war dies verbunden mit einem Verlust des Blutstammzellruhezustandes. Langfristig zeigte sich daher in alten Chimären mit Neo1 mutiertem Blutsystem der vorzeitige Verbrauch von Blutstammzellen. Dies betraf Anzahl und Funktionsfähigkeit der Stammzellen. In von mir generierten RNA-Sequenzierungsdaten fanden sich dazu passend Signaturen die auf ein Voraltern sowie den Verlust von Stammzeleigenschaften hindeuteten.

Zusätzlich identifizierten wir hier *Egr1* als Zielgen des Neo1-Signalweges und fanden Hinweise darauf, dass der Ntn1-Signalweg in Neo1 mutierten Blutstammzellen weniger aktiv ist. Im Folgenden konnte ich zeigen, dass nur Ntn1 die *Egr1* Expression in Blutstammzellen erhöht. Dieser Effekt war von der Neo1 Expression abhängig. Als nächstes konnte ich herausfinden, dass Ntn1 über Neo1 *in vitro* den Ruhezustand von Blutstammzellen erhöht. Gleichzeitig verbesserte Ntn1 im Kulturmedium das Anwachsen von Blutstammzellen in Transplantationsexperimenten. Im Anschluss wollte ich den Effekt von Ntn1 auf Blutstammzellen *in vivo* analysieren. Hierfür nutzte ich Mausmodelle, in denen jederzeit der Ntn1 Verlust in erwachsenen Tieren induziert werden kann. Nach Ntn1 Verlust zeigten diese Tiere eine Aktivierung sowie einen Verlust von Blutstammzellen. In einem weiteren Mausmodell, in dem eine induzierbare Überproduktion von Ntn1 möglich ist, ließen sich dem gegenüber Blutstammzellen in einem vertieften Ruhezustand nachweisen. Ntn1 defizientes Knochenmark wuchs in Transplantationsexperimenten deutlich schlechter an als Kontrollen, während Ntn1 überexprimierende Zellen keine Veränderungen nach Transplantation aufwiesen. Im Folgenden sollten die Zellen die im normalen Knochenmark Ntn1 produzieren, identifiziert werden. Ich isolierte smooth muscle actin (SMA) produzierende Perizyten und Endothelzellen von Arteriolen als mögliche Quelle. Nachdem ich mit einem zusätzlichen, induzierbaren genetischen Mausmodell Ntn1 in diesen Perizyten deletierte, zeigte sich erneut ein Verlust von Blutstammzellen. Abschließend konnte ich zeigen, dass Ntn1 im hohen Alter im Mausknochenmark deutlich weniger produziert wird und gleichzeitig die Level von Neo1 in Blutstammzellen kompensatorisch deutlich anstiegen. Wenn alte Blutstammzellen wieder in einer Ntn1 reichen Umgebung anwachsen, reduzierten sich die Neo1 Levels deutlich. Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass die Neo1-Ntn1 Interaktion einen neuen Signalweg darstellt, der den Ruhestatus sowie die Stammzeleigenschaften von Blutstammzellen reguliert. Im normalen, physiologischen Alterungsprozess wird dieser Signalweg unterbrochen, was zur Verschlechterung der Stammzellfunktion im Alter beiträgt.