

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin II**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Der Einfluss des CysLT<sub>1</sub> Liganden Leukotrien D<sub>4</sub>  
auf Adhäsion und Proliferation CD34<sup>+</sup>  
hämatopoetischer Progenitorzellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Lena Jaggy**

**aus**

**Mühlacker**

**2012**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Möhle

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. J. Lang

*Für meine Familie*

**Teile dieser Arbeit sind unter folgendem Titel veröffentlicht:**

Boehmler A.M., Drost A., Jaggy L., Seitz G., Wiesner T., Denzlinger C., Kanz L., Möhle R. (2009): The CysLT<sub>1</sub> ligand leukotriene D<sub>4</sub> supports  $\alpha_4\beta_1$ - and  $\alpha_5\beta_1$ -mediated adhesion and proliferation of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *The journal of Immunology* 182:6789-6798.

Drost A., Jaggy L., Boehmler A., Kanz L., Möhle R. (2009): The CysLT<sub>1</sub> ligand LTD<sub>4</sub> supports  $\alpha_4\beta_1$  and  $\alpha_5\beta_1$ -mediated adhesion and proliferation of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Onkologie* 32(suppl4):102. (Abstract)

Drost A., Jaggy L., Kanz L., Möhle R. (2008): The G Protein-Coupled Receptor cysLT<sub>1</sub> Mediates G<sub>i</sub> Protein-Dependent Chemotaxis and Adhesion of CD34<sup>+</sup> Cells in vitro Similar to CXCR4, but Not Progenitor Mobilization in Vivo. *Blood* 112(11):497. (Abstract)

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	-3-
1 Einleitung .....	1
1.1 Hämatopoese .....	1
1.2 Stammzellen .....	2
1.3 Das hämatopoetische Mikromilieu des Knochenmarks .....	4
1.3.1 Das Konzept der Stammzellnische .....	4
1.3.2 Adhäsionsmoleküle .....	4
1.3.3 Zytokine .....	6
1.3.3.1 Interleukine und Wachstumsfaktoren .....	6
1.3.3.2 Chemokine .....	6
1.4 Leukotriene .....	7
1.4.1 Biosynthese der Leukotriene .....	7
1.4.2 Funktion der Leukotriene .....	8
1.5 Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor .....	9
1.5.1 Struktur der Leukotrien-Rezeptoren .....	9
1.5.2 Eigenschaften der Leukotrien-Rezeptoren .....	9
1.6 Antagonisierung des CysLT <sub>1</sub> -Rezeptors und seines Signalweges ..	10
1.7 Stammzelltransplantation .....	12
1.8 Mobilisierung und Homing hämatopoetischer Stammzellen .....	13
1.9 Ziel der Arbeit .....	15
2 Material und Methoden .....	16
2.1 Reagenzien .....	16
2.1.1 Lipidmediatoren, Rezeptoragonisten und -antagonisten .....	16
2.1.2 Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle .....	16
2.1.3 Funktionell blockierende Antikörper .....	16
2.1.4 Chemikalien, Enzyme und Seren .....	17
2.1.5 Kits .....	17
2.2 Lösungen .....	18
2.2.1 Medien für die Zellkultur .....	18

2.2.2 Sonstige Lösungen .....	18
2.3 Gebrauchswaren .....	19
2.4 Geräte .....	20
2.5 Verwendete Zellen .....	21
2.5.1 CD34 <sup>+</sup> Zellen .....	21
2.5.2 Humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) .....	21
2.6 Methoden .....	22
2.6.1 Isolierung CD34 <sup>+</sup> Zellen aus Leukapheresat .....	22
2.6.2 Isolierung CD34 <sup>+</sup> Zellen aus kryokonserviertem Leukapheresat .....	23
2.6.3 Isolierung CD34 <sup>+</sup> Zellen aus kryokonservierten Zellen .....	23
2.6.4 Reinheitsbestimmung .....	24
2.6.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen .....	24
2.6.6 Beschichten von Zellkulturflaschen und Gewebekulturplatten mit Gelatine .....	25
2.6.7 Zelladhäsionstest .....	25
2.6.8 Zellproliferationstest .....	26
2.7 Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	26
2.8 Datenerfassung, Auswertung und statistische Verfahren .....	27
3 Ergebnisse .....	28
3.1 IL-1 $\beta$ Stimulation der HUVEC Zellen .....	28
3.2 Adhäsion CD34 <sup>+</sup> Progenitorzellen an HUVEC .....	29
3.2.1 LTD <sub>4</sub> induzierte Adhäsion .....	29
3.2.2 LTD <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> und LTE <sub>4</sub> induzierte Adhäsion .....	30
3.3 Auswirkung von CysLT <sub>1</sub> -Rezeptorantagonisten, PTX, Tyrosinkinase-und MEK/ERK/MAPK-Inhibitoren auf die LTD <sub>4</sub> induzierte Adhäsion CD34 <sup>+</sup> HPC an HUVEC .....	31
3.3.1 CysLT <sub>1</sub> -Rezeptorantagonisten und PTX .....	32
3.3.2 Tyrosinkinase-und MEK/ERK/MAPK-Inhibitoren .....	33
3.4 In vitro-Proliferation CD34 <sup>+</sup> Progenitorzellen .....	36
3.4.1 LTD <sub>4</sub> induzierte Proliferation .....	36
3.4.2 LTD <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> und LTE <sub>4</sub> induzierte Proliferation .....	37

4 Diskussion .....	39
4.1 Diskussion der Methodik .....	39
4.2 Diskussion der Ergebnisse .....	39
4.2.1 Adhäsion .....	39
4.2.2 Proliferation .....	43
4.3 Schlussfolgerung .....	46
5 Zusammenfassung .....	48
6 Verzeichnis der Abbildungen .....	50
7 Literaturverzeichnis .....	51
8 Danksagung .....	61

## Abkürzungen

ACD	Acidium citricum
Ak	Antikörper
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
CLP	Common lymphoid progenitor
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
CysLT <sub>1</sub> , CysLT <sub>2</sub>	Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor <sub>1, -2</sub>
DNAse	Desoxyribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal-growth-factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter)
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
ff	folgende Seiten
FGF	Fibroblast-growth-factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Ligand des FLT3
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
g	Gramm
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (granulocyte colony-stimulating factor)
GM-CSF	Granulozyten- und Makrophagenkoloniestimulierender Faktor (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)



---

GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure]
HGF	Hematopoetic growth factor
HLA	Humane Leukozytenantigen (Human leukocyte antigene)
HPC/HSC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle (hematopoietic stem and progenitor cell)
HUVEC	Humane Nabelschnurvenenendothelzellen (human umbilical vein endothelial cells)
ICAM	Inter-cellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I.U.	Internationale Einheiten (international units)
kDa	KiloDalton
l	Liter
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
LTC <sub>4</sub> , -D <sub>4</sub> , -E <sub>4</sub>	Leukotrien C <sub>4</sub> , -D <sub>4</sub> , -E <sub>4</sub>
m	Meter
M	Molar (Mol/Liter)
MACS	Magnetic associated cell sorting
mAk	Monoklonaler Antikörper
MEP	Megakaryozytär- erythroide Progenitoren
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MPP	Multipotente Progenitoren
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRP	Multidrug resistance related protein

---

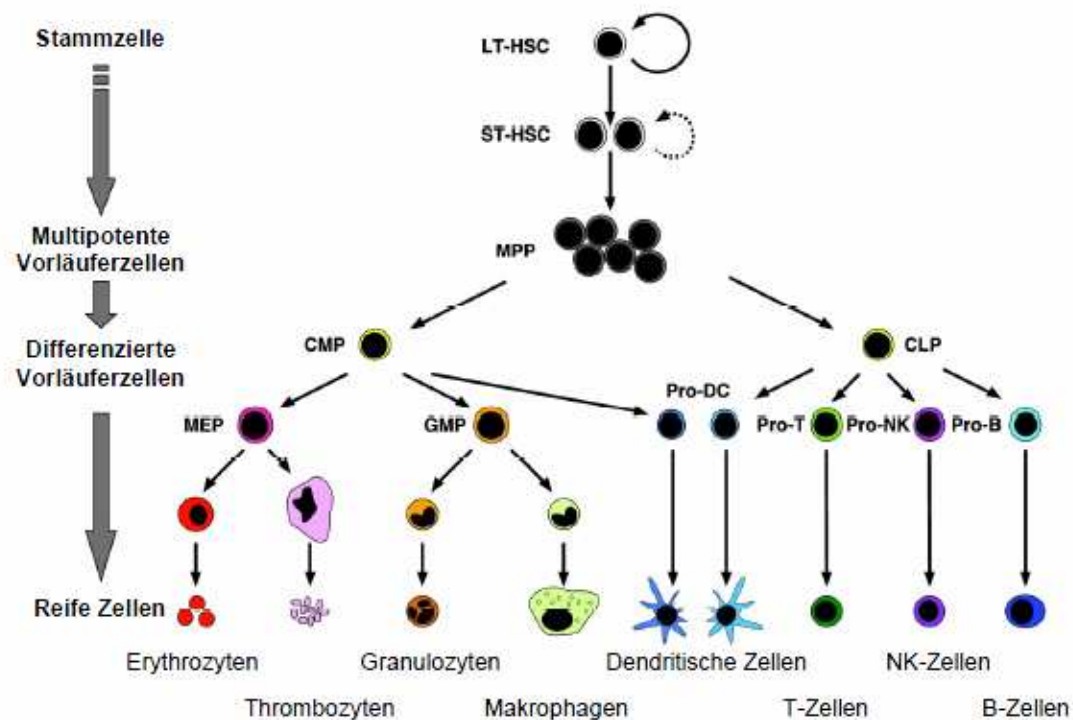
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
n	Anzahl
n/e	Nicht essentiell
ng	Nanogramm
p	Signifikanz
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PE	Phycoerythrin
RPMI	Rockwell Park Memorial Institute
PTX	Pertussistoxin
RAF	Proteinkinase (Rapidly growing fibrosarcoma)
RAS	Proto-Oncogen (Rat sarcoma)
s	Sekunde
S1P	Sphingosin 1 Phosphat
S1PR	Sphingosin 1 Phosphat-Rezeptor
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SDF-1	Stromal cell derived factor-1
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte (standard error of the mean)
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	Adhäsionsmolekül (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)
VLA	Adhäsionsmoleküle (Very Late Antigen)
Vs.	Versus
v/v	Volumen/Volumen (Mischungsverhältnis)
w/v	Gewicht/Volumen (Mischungsverhältnis)

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämatopoese

Während der Embryonalentwicklung findet die Blutbildung in den ersten sechs Wochen im Dottersack statt. Danach, mit Beginn der Leberentwicklung, wandern die hämatopoetischen Zellen in Leber und Milz aus. So übernimmt die Leber, neben Milz und Knochenmark, bis zur Geburt die Rolle des wichtigsten Organs der Hämatopoese. Beim Säugling dient zunächst das gesamte Knochenmark der Blutbildung. Mit Beginn des Knochenwachstums wandelt sich das rote blutbildende Knochenmark in gelbes, Fettgewebszellen enthaltendes Knochenmark um. Beim Erwachsenen findet die Hämatopoese in den platten Knochen des Beckens, des Schädels, der Rippen und der Wirbelkörper, sowie in den proximalen Enden von Femur und Humerus statt (Renz-Polster et al., 2008; Tavassoli, 1991). Im Rahmen unterschiedlicher Krankheiten, beispielsweise myeloproliferativer Erkrankungen, kann es zu einer extramedullären Hämatopoese kommen. Hierbei bildet sich das gelbe Knochenmark zu Gunsten des blutbildenden Marks zurück und es kann in Leber und Milz wieder Blut gebildet werden (Dempke, 2006).

Das hämatopoetische System besteht aus einer Hierarchie von Zellen, deren Basis von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet wird. Diese befinden sich im Knochenmark und zu einem geringen Anteil im peripheren Blut (Dempke, 2006). So entwickeln sich nach mehreren Zwischenschritten die myeloetischen- und lymphozytopoetischen Stammzellen. Aus diesen so genannten determinierten Stammzellen bilden sich in Abhängigkeit von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren die Vorläuferzellen der einzelnen Zellreihen. Hierbei gehen aus den lymphozytopoetischen Stammzellen T-Lymphozyten und B-Lymphozyten und aus den myeloblastischen Stammzellen Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Monozyten hervor (Dempke, 2006; Renz-Polster et al., 2008). Die Abbildung 1 bietet einen Überblick der hämatopoetischen Zellreihen.



**Abbildung 1. Hierarchisches Modell der Hämatopoese.** Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSC) werden unterteilt in Zellen, die sich unbegrenzt replizieren können (*long-term* (LT)-HSC) und Zellen, die sich nur noch begrenzt selbst erneuern können (*short-term* (ST)-HSC). Letztere differenzieren sich in multipotente Progenitoren (MPP) aus. Aus ihnen gehen die ersten liniendifferenzierten Vorläuferzellen hervor: *common myeloid progenitor* (CMP) und *common lymphoid progenitor* (CLP). Einerseits entwickeln sich aus den CMP megakaryozytär-erythroide Progenitoren (MEP), aus denen Erythrozyten und Megakaryozyten, bzw. Thrombozyten hervorgehen. Andererseits differenzieren sich die CMP in myelomonozytäre Vorläuferzellen (GMP) aus, aus denen wiederum Granulozyten und Makrophagen hervorgehen. Die CLP bringen T- und B-Lymphozyten sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) hervor. Sowohl aus CMP als auch aus CLP können sich dendritische Zellen bilden (nach Passegué et al., 2003 verändert).

## 1.2 Stammzellen

Alle hämatopoetischen Zellen gehen aus pluripotenten Stammzellen hervor, welche verschiedene funktionelle Eigenschaften aufweisen mittels derer sie charakterisiert werden können. So sind sie in der Lage sich selbst zu erneuern.

Die Tochterstammzellen können sich in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren und nach einer Transplantation sind sie in der Lage, die Hämatopoese wieder vollständig herzustellen (Verfaillie et al., 2002). Mitte der 80er Jahre beschrieben verschiedene Arbeitsgruppen (Andrews et al., 1986; Civin et al., 1984) einen Antikörper mit dessen Hilfe die Identifizierung hämatopoetischer Progenitorzellen gelang. Hierbei handelt es sich um das später als CD34 bezeichnete Antigen, ein glykosiliertes Oberflächenadhäsionsmolekül, mit einem Molekulargewicht von 115 kDa, welches von 1-4% aller mononukleären Zellen des Knochenmarks, insbesondere von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird (Andrews et al., 1986; Civin et al., 1996; Krause et al., 1996). Berenson et al. gelang es 1988 CD34<sup>+</sup> Zellen in letal bestrahlte Tiere zu transplantieren. Die Tiere überlebten lange genug, um reife hämatopoetische Stammzellen zu bilden und so die Hämatopoese wieder herzustellen. Dies wiederum zeigte, dass innerhalb der CD34<sup>+</sup> Zellfraktion pluripotente Zellen enthalten sein mussten. Ein anderer wichtiger Zellmarker ist CD38, wobei dieser für eine bereits weiter fortgeschrittene Ausdifferenzierung der Zelle steht. Die CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellpopulation besteht also aus Zellen, die in der Lage sind, die Hämatopoese langfristig wieder herzustellen, die CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>-Zellen hingegen sind bereits liniendeterminiert (Civin et al., 1996).

Damit HPC überleben, proliferieren und reifen können, sowie um die Bildung peripherer Blutzellen zu regulieren sind verschiedene hämatopoetische Wachstumsfaktoren notwendig. Unter dem Einfluss von natürlichen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren teilen sich Blutstammzellen asymmetrisch. Hierbei entsteht eine neue pluripotente Stammzelle und eine bereits als Vorstufe der einzelnen Blutzellen determinierte Stammzelle, die anschließend weiter heranreift. Abhängig von den einwirkenden Wachstumsfaktoren entstehen so die verschiedenen Blutzellen (Brümmendorf et al., 1999).

### **1.3 Das hämatopoetische Mikromilieu des Knochenmarks**

#### **1.3.1 Das Konzept der Stammzellnische**

Stammzellen befinden sich im Knochenmark in der so genannten Stammzellnische. Die Stammzellnische besteht aus bestimmten Zellpopulationen, die eine wichtige Rolle bei der Regulierung, der Selbsterneuerung und der Differenzierung der Stammzellen spielen. Osteoblasten an der Oberfläche der Knochen trabekel und hämatopoetische Zellen befinden sich dabei in engem Kontakt zueinander, was eine Interaktion der Zellen vermuten lässt. Darüber hinaus interagieren HSC auch mit anderen Stromazellen, wie zum Beispiel den Endothelzellen, die Teil der vaskulären Nische sind (Kopp et al., 2005; Yin et al., 2006). Bei der Stammzellnische handelt es sich also um eine komplexe Mikroumgebung. Diese wird von Zellen wie zum Beispiel den Fibroblasten, Adipozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Osteoblasten und extrazellulären, von diesen Zellen produzierten Komponenten gebildet (Mazo et al., 1999).

Obwohl nicht vollkommen geklärt ist, welche Zelle welche Rolle inne hat, ließ sich zeigen, dass der Kontakt zwischen Stroma- und Blutzellen, die Zytokinsynthese und die Produktion der extrazellulären Knochenmarkmatrix der Stromazellen, es den Stammzellen erlaubt zu proliferieren und sich in verschiedene hämatopoetische Zelllinien zu differenzieren (Dexter et al., 1987; Fuchs et al., 2004; Lemischka, 1997).

#### **1.3.2 Adhäsionsmoleküle**

HPC exprimieren viele verschiedene Adhäsionsmoleküle, über die sie mit ihrer Umgebung in Kontakt stehen. Dazu gehören unter anderem CD44, das an Hyaluronsäure und Fibronectin bindet. CD31, ein Heparin-bindendes Protein, das bei der transendothelialen Migration der Leukozyten und der CD34<sup>+</sup> Zellen beteiligt ist, oder auch L-Selektin (CD62L), das eine Rolle bei der Leukozytenadhäsion spielt (Chan et al., 2001; Watt et al., 1993).

L-Selektin ist ein Transmembranglykoprotein, das sich auf der Oberfläche von CD34<sup>+</sup> Zellen befindet. Außerdem exprimieren die Endothelzellen des Knochenmarks kontinuierlich E- und P-Selektin (Mazo et al., 1999). Umgekehrt findet man den E-Selektin-Liganden ESL-1 und den P-Selektin-Liganden PSGL-1 auf hämatopoetischen Vorläuferzellen. L-Selektin-Liganden werden hingegen vom Endothel des Knochenmarks sezerniert (Naiyer et al., 1999; Whetton et al., 1999). Kommt es zum Beispiel zur Blockierung von E- und P-Selektin, so führt dies zur Mobilisierung der Progenitorzellen ins Blut. Für P-Selektine konnte gezeigt werden, dass sie am Rolling von hämatopoetischen Vorläuferzellen an Endothelzellen, sowie am Homing beteiligt sind (Frenette et al., 1998, Mazo et al., 1998). Die Osteoblasten haben auch hier bei der Adhäsion und der Mobilisation eine zentrale Funktion. So adhären sie über N-cadherin und  $\beta$ -Catenin direkt mit Stammzellen, die in der Lage sind die Hämatopoese langfristig aufrecht zu erhalten.

Durch diese verschiedenen Kontakte werden die Stammzellen also in ihrer Nische gehalten. Geht der Kontakt allerdings verloren, differenzieren sich die Zellen aus und gelangen in das Blutgefäßsystem (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003).

Eine weitere wichtige Rolle spielen die Integrine, heterodimere Transmembranmoleküle, die es den Zellen ermöglichen, an der extrazellulären Matrix anzuheften (Hynes, 1992). So exprimieren hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen unter anderem das  $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin VLA-4 (CD49d/Cd29), dessen Bindungspartner VCAM-1, ein von Stromazellen exprimierter Ligand, und das extrazelluläre Protein Fibronectin sind. Vermeulen et al. konnten 1998 zeigen, dass durch Anti-VLA-4 Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisiert werden können und es so zu einer vermehrten Anzahl im Blut zirkulierender Stammzellen kommt.

### **1.3.3 Zytokine**

#### **1.3.3.1 Interleukine und Wachstumsfaktoren**

Zu den Zytokinen gehören Wachstumsfaktoren, die regulierend auf Proliferation und Differenzierung von Zellen wirken. Dabei können sie sowohl stimulierend, als auch inhibierend agieren. Sie können sich synergistisch ergänzen oder auch antagonisieren (Dempke, 2006). Diese spezifischen Mediatoren können die Differenzierung und Proliferation von Blutzellen unterschiedlicher Linien unterstützen. So wirken zum Beispiel die Interleukine IL-1, IL-3, IL-6 und IL-11 auf unspezifische Vorläuferzellen und aktivieren ein sehr breites Zellspektrum (Ogawa, 1993). Ein weiteres Beispiel für die Zytokine ist der Stammzellofaktor SCF. Dieser ist ein Ligand des c-kit-Protoonkogen-Rezeptors, der ebenfalls auf frühe hämatopoetische Vorläuferzellen wirkt und die Proliferation von Mastzellen stimuliert. FL, der Ligand des Tyrosinkinase-Rezeptor FLT3 ist ebenfalls ein auf unreife hämatopoetische Zellen wirkendes Zytokin (Turner et al., 1996). FL wird von Stromazellen des Knochenmarks freigesetzt. Durch Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors und Interaktion mit anderen Wachstumsfaktoren und Interleukinen kommt es somit zur Proliferation von Stamm- und Progenitorzellen (Rasko et al., 1995). Im Gegensatz dazu dienen Wachstumsfaktoren wie G-CSF, GM-CSF, Erythropoetin und Thrombopoetin der Regeneration linienspezifischer Zellen. So bewirken G-CSF und GM-CSF die Reifung neutrophiler Granulozyten, Erythropoetin stimuliert die Bildung von Erythrozyten, während Thrombopoetin zur Bildung von Megakaryozyten und Thrombozyten beiträgt (Dempke, 2006).

#### **1.3.3.2 Chemokine**

Bei der transendothelialen Migration von hämatopoetischen Progenitorzellen kommt es zur Überwindung physiologischer Barrieren. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Knochenmarkendothel und der Struktur entzündlicher Endothelien liegt die Annahme nahe, dass neben Adhäsionsmolekülen auch chemotaktisch wirkende Zytokine daran beteiligt sind



(Carlos et al., 1994; Mazo et al., 1998). Hierzu gehört besonders das von Stromazellen des Knochenmarks und anderer Gewebe freigesetzte Chemokin SDF-1. Dies weist strukturelle Ähnlichkeiten mit dem im Rahmen von Entzündungsvorgängen chemotaktisch wirkendem Interleukin 8 auf (Tashiro et al., 1993). SDF-1 wirkt chemotaktisch sowohl auf reife mononukleäre Leukozyten, als auch auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (Möhle et al., 2001). Die Funktion des SDF-1 wird mittels des Rezeptors CXCR4, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit Sieben-Transmembranhelices, vermittelt (siehe Kapitel 1.5.1). Die Oberflächenexpression des Rezeptors konnte in funktionell aktiver Form auf zirkulierenden CD34<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden. Somit stellt CXCR4 ein Schlüsselrezeptor, der beim Homing der HPC in das Knochenmark beteiligt ist, dar (Möhle et al., 1998; Lynch et al., 1999; Sarau et al., 1999).

## **1.4 Leukotriene**

### **1.4.1 Biosynthese der Leukotriene**

Leukotriene gehören neben den Prostaglandinen, den Prostazyklinen und den Thromboxanen zur Gruppe der Eikosanoide. Ausgangssubstanz der Eikosanoidsynthese ist die Arachidonsäure, eine vierfach ungesättigte Fettsäure mit 20 C-Atomen, die Bestandteil der Phospholipide der Zellmembran ist. Im ersten Schritt wird die Arachidonsäure durch die Phospholipase A<sub>2</sub> aus der Zellmembran herausgespalten. Die Arachidonsäure kann anschließend über 2 verschiedene Wege in die unterschiedlichen Eikosanoide metabolisiert werden. Durch die Cyclooxygenase entstehen die Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxan A. Das Schlüsselenzym der Leukotriensynthese ist die 5-Lipoxygenase. Die Lipoxygenase verstoffwechselt die Arachidonsäure zu LTA<sub>4</sub>. Anschließend kann durch die LTA<sub>4</sub>-Hydrolase LTB<sub>4</sub> bzw. durch die LTC<sub>4</sub>-Synthase das Cysteinyl-Leukotrien LTC<sub>4</sub> entstehen. Aus LTC<sub>4</sub> können weitere Mitglieder der Cysteinyl-Leukotrienfamilie hergestellt werden: Durch die Entfernung von Glutamat entsteht LTD<sub>4</sub>, bzw. durch die anschließende

Abspaltung von Glycin entsteht LTE<sub>4</sub>. LTD<sub>4</sub> hat dabei die höchste Affinität zu dem Cysteinyl-Leukotrienrezeptor CysLT<sub>1</sub> (Denzlinger 1996; Funk, 2001; Samuelsson, 1981).

#### **1.4.2 Funktion der Leukotriene**

Cysteinyl-Leukotriene stellen wichtige Lipidmediatoren in entzündlichem Gewebe dar und spielen vor allem eine bedeutende Rolle beim allergischen Asthma, aber auch bei anderen entzündlichen Prozessen (Capra et al., 2007). So werden zum Beispiel CysLT<sub>1</sub>-Antagonisten wie Montelukast (Singulair) seit vielen Jahren in der Asthmatherapie eingesetzt (Claesson et al., 1999).

In vivo sind Cysteinyl-Leukotriene instabil und werden rasch metabolisiert, sodass sie eine geringe Reichweite haben (Denzlinger et al., 1996). Durch die Interaktion mit ihrem Rezeptor CysLT<sub>1</sub>, der zum Beispiel von den Muskelzellen der Bronchien exprimiert wird, können verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden (Samuelsson, 1981). Vor allem die Pathophysiologie der Leukotriene in der Lunge ist bereits gut erforscht. Leukotriene bewirken eine wesentlich stärkere Konstriktion der Bronchialmuskulatur als beispielsweise Histamin (Barnes et al., 1984; Drazen et al., 1980). Außerdem stimulieren Leukotriene die Mukosasekretion und greifen in die mukoziliäre Clearance ein (Marom et al., 1982). Desweiteren bewirken Leukotriene eine erhöhte Permeabilität der Gefäße und führen zu einer Vasodilatation. Hierbei handelt es sich um Vorgänge die im Gewebe der Lunge zu Ödemen führen, die aber auch allgemein bei der Wanderung von Leukozyten in entzündliches Gewebe von Bedeutung sind (Drazen et al., 1980). Bautz et al. zeigten 2001, dass der Leukotrien D<sub>4</sub> Rezeptor CysLT<sub>1</sub> in aktiver Form auch von hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Da entzündliches Gewebe und das hämatopoetische Mikroenvironment Ähnlichkeiten aufweisen, vermutet man, dass auch die Vorgänge in entzündlichem Gewebe und das Homing, bzw. die Migration von Stammzellen auf ähnlichen Mechanismen beruhen (Möhle et al., 1999; Jacobsen et al., 1996; Schweitzer et al., 1996; Mazo et al., 1999).

## 1.5 Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor

### 1.5.1 Struktur der Leukotrien-Rezeptoren

Cysteinyl-Leukotriene entfalten viele ihrer Wirkungen über die 7 Transmembran G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) CysLT<sub>1</sub> und CysLT<sub>2</sub>. Hierbei handelt es sich um Rezeptoren mit sieben Transmembranhelices, welche hydrophob sind und die Lipiddoppelschicht einer Zellmembran durchspannen. Das COOH-Ende liegt auf der zytoplasmatischen Seite, das N-terminale Ende stellt extrazellulär die Bindungsstelle der Liganden dar. Da auch Chemokinrezeptoren wie der „Homing-Rezeptor“ CXCR4 zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören, könnten Cysteinyl-Leukotrienrezeptoren und ihre Liganden in gleicher Weise am Stammzellhoming beteiligt sein.

Nach Bindung des Botenstoffs erfolgt die Signaltransduktion von GPCR über die aus 3 Untereinheiten bestehenden G-Proteine. Durch die Freisetzung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> kann so zum Beispiel die Proliferation und Migration beeinflusst werden (Morris et al., 1999).

### 1.5.2 Eigenschaften der Leukotrien-Rezeptoren

Bisher konnten zwei GPCR, CysLT<sub>1</sub> und CysLT<sub>2</sub>, identifiziert werden, die Cysteinyl-Leukotriene binden können. Diese zeigen unterschiedliche Bindungsaffinitäten für die Liganden LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, und LTE<sub>4</sub>. CysLT<sub>1</sub> bindet LTD<sub>4</sub> mit einer 350-fach höheren Affinität als LTC<sub>4</sub>. LTE<sub>4</sub>, ein Partialagonist, ist das am wenigsten aktive Cysteinyl-Leukotrien. CysLT<sub>2</sub> bindet im Gegensatz dazu LTD<sub>4</sub> und LTC<sub>4</sub> mit gleicher Affinität (Capra et al., 2007; Heise et al., 2000; Mellor et al., 2001; Nothacker et al., 2000; Sarau et al., 1999).

Die CysLT<sub>1</sub> Expression von CD34<sup>+</sup> Zellen konnte 2001 von Bautz et al. nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu dem bereits bekannten „Homing Rezeptor“ CXCR4, der von HPC weniger stark exprimiert wird als von reifen mononukleären Zellen, wird der CysLT<sub>1</sub>-Rezeptor insbesondere auf

zirkulierenden, mobilisierten HPC exprimiert und scheint damit sogar Progenitorzell-spezifischer zu sein (Bautz et al., 2001; Möhle et al., 1998).

Pertussistoxin (PTX)-empfindliche  $G_{i/o}$  und PTX-unempfindliche  $G_q$  Proteine sind an  $CysLT_1$  gekoppelt und aktivieren Signalwege, die verschiedene zelluläre Aktivitäten, einschließlich Proliferation und Migration, modulieren. Aufgabe und Funktion des  $CysLT_2$  Rezeptors ist noch nicht vollständig verstanden. Dieser Rezeptor könnte den  $G_{i/o}$  Signalweg aktivieren, obwohl neue Studien vermuten lassen, dass  $CysLT_2$  mit  $CysLT_1$  auf der Zelloberfläche interagiert, was zur Bildung von Heterodimeren und eventuell zu einer Abschwächung der  $CysLT_1$  vermittelten Effekte führen könnte (Jiang et al., 2007).

Obwohl reife Leukozyten  $CysLT_1$  auf Ebene der mRNA exprimieren (Bautz et al., 2001), kommt es in diesen Zellen kaum zur intrazellulären Kalziumfreisetzung (Kanaoka et al., 2004). Zirkulierende HPC exprimieren hohe Mengen an  $CysLT_1$ . Diese Zellen reagieren auf  $LTD_4$  mit einer höheren Kalziumfreisetzung als die beobachteten Zellen, deren CXCR4 Rezeptoren mit SDF-1 stimuliert wurden (Xue et al., 2007).

## **1.6 Antagonisierung des $CysLT_1$ -Rezeptors und seines Signalweges**

Es gibt verschiedene gegen  $CysLT_1$  gerichtete Rezeptorantagonisten. Hierzu gehört unter anderem MK-571. In vivo wird vor allem Montelukast, ein Derivat des  $LTD_4$  Antagonisten MK-571, zur Blockierung  $CysLT_1$ -vermittelter Prozesse verwendet. Dessen hohe Selektivität ist besonders im Rahmen der Asthmatherapie von großer Bedeutung (Reiss et al., 1996; Young, 2001). Ein weiterer  $CysLT_1$ -Rezeptorantagonist ist LY171883 (Tomelukast).

Der glykosylierte  $CysLT_1$ -Rezeptor bindet sowohl an Pertussistoxin (PTX)-sensitive  $G_{i/o}$  als auch an PTX-insensitive  $G_q$  Proteine und aktiviert Signalwege,

die verschiedene zelluläre Aktivitäten, wie Proliferation und Migration modulieren (Jiang et al., 2007).

Des Weiteren wurde der Effekt der Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Adhäsion der mit LTD<sub>4</sub> stimulierten HPC an HUVEC untersucht. Bei der Tyrosinkinase handelt es sich um Proteine, die die Phosphorylierung von Tyrosinresten katalysieren. Als Teil eines Rezeptorsystems wirken sie bei Signalkaskaden mit und beeinflussen so Funktionen wie die Differenzierung und die Zellproliferation. Mittels Tyrosinkinase phosphorylierten Proteinen können die erzeugten Signale auf andere Signalkaskaden übertragen und dadurch Moleküle wie zum Beispiel G-Proteine beeinflusst werden (Schlessinger, 2000; Yarden et al., 1988). Durch Inhibitoren dieser Tyrosinkinase kann der Signaltransduktionsweg gehemmt und somit gezeigt werden, dass die Tyrosinkinase am CysLT<sub>1</sub> Signalweg beteiligt ist. Solch ein spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor stellt beispielsweise Genistein dar.

Daidzein gehört wie Genistein zur Gruppe der Isoflavone. Daidzein hat einige ähnliche Effekte wie Genistein. Hierzu gehören die Aktivierung des humanen Östrogenrezeptors, sowie die Induktion der Differenzierung von Leukämiezellen (Miksicek, 1994; Jing et al., 1995). Allerdings soll Daidzein im Gegensatz zu Genistein kein Tyrosinkinaseinhibitor sein und dient somit als Negativkontrolle für Genistein (Akiyama et al., 1987).

Ein anderer selektiver Tyrosinkinaseinhibitor stellt Herbimycin A dar (Fukazawa et al., 1991).

Eine weitere bekannte Signalkaskade, die bei der GPCR-Signaltransduktion involviert ist und somit eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zellproliferation, Überleben und Differenzierung von Zellen spielt ist der MAP-Kinase-Signalweg. Besonders der ERK/MAPK Signalweg bietet hierbei pharmakologische Angriffspunkte, an denen Inhibitoren ansetzen können.

Ein spezifischer Inhibitor der Aktivierung des MEK/ERK/MAPK Weges ist PD98059 (Alessi et al., 1995).

## 1.7 Stammzelltransplantation

Die Fähigkeit der Stammzellen, nach einer myeloablativen Behandlung das Knochenmark erneut zu besiedeln und die Hämatopoese wiederherzustellen, ist die Voraussetzung für die Durchführung von Knochenmarktransplantationen (To et al., 1997). Stammzellen können dabei allogene oder autolog transplantiert werden. Bei einer allogenen Transplantation sollte der Spender möglichst HLA-identisch sein. Nach der myelotoxischen Therapie werden die Zellen sofort dem Empfänger infundiert. Bei einer autologen Transplantation werden dem Patienten vor der myelotoxischen Behandlung Stammzellen entnommen, kryokonserviert und im Anschluß einer Hochdosistherapie retransfundiert (Berger, 2006). Ursprünglich erfolgte die Stammzellgewinnung mittels Knochenmarktransplantation, bei der die Stammzellen operativ aus dem Knochenmark des Patienten gewonnen wurden. Allerdings kann durch verschiedene Medikamente die Anzahl zirkulierender Stamm- und Progenitorzellen, die normalerweise sehr gering ist, auf das hundertfache gesteigert werden (Dührsen et al., 1988), sodass die Stammzellen anschließend mittels Leukapherese gesammelt werden können. Die hierfür am häufigsten verwendete Substanz ist das Zytokin G-CSF. Es wirkt dabei nicht direkt auf die Stammzellen, sondern setzt in reifen granulozytären Zellen proteolytische Enzyme, wie zum Beispiel Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3 und Gelatinase B frei, die wiederum Extrazellulärmatrix und verschiedene membranständige Rezeptoren spalten. Diese Rezeptoren sind am Homing und der Verankerung der Stammzellen in ihrer Nische beteiligt, aus der sie dann im Rahmen der Mobilisierung herausgelöst werden (Lapidot et al., 2002, Liu et al., 1997; Möhle et al., 2007).

Verschiedene Studien zeigten die Vorteile einer peripheren Blutstammzelltransplantation gegenüber einer Knochenmarktransplantation. Hierzu gehören aufgrund der erhöhten Stammzellausbeute eine kürzere Zytopeniedauer, eine verbesserte Wiederherstellung des Immunsystems und eine geringere Morbidität. Deshalb werden gegenwärtig auch meistens

periphere Stammzellen bei einer Transplantation verwendet (Beyer et al., 1995; Hartmann et al., 1997; Gratwohl et al., 2002).

### **1.8 Mobilisierung und Homing hämatopoetischer Stammzellen**

Eine erfolgreiche Transplantation setzt die Mobilisierung der Stammzellen voraus. Sie müssen das Knochenmark verlassen und frei im peripheren Blut zirkulieren. Anschließend müssen die Zellen wiederum in der Lage sein die Blutzirkulation zu verlassen und das Knochenmark zielgerichtet zu besiedeln, um dort proliferieren und die Hämatopoese wiederaufbauen zu können.

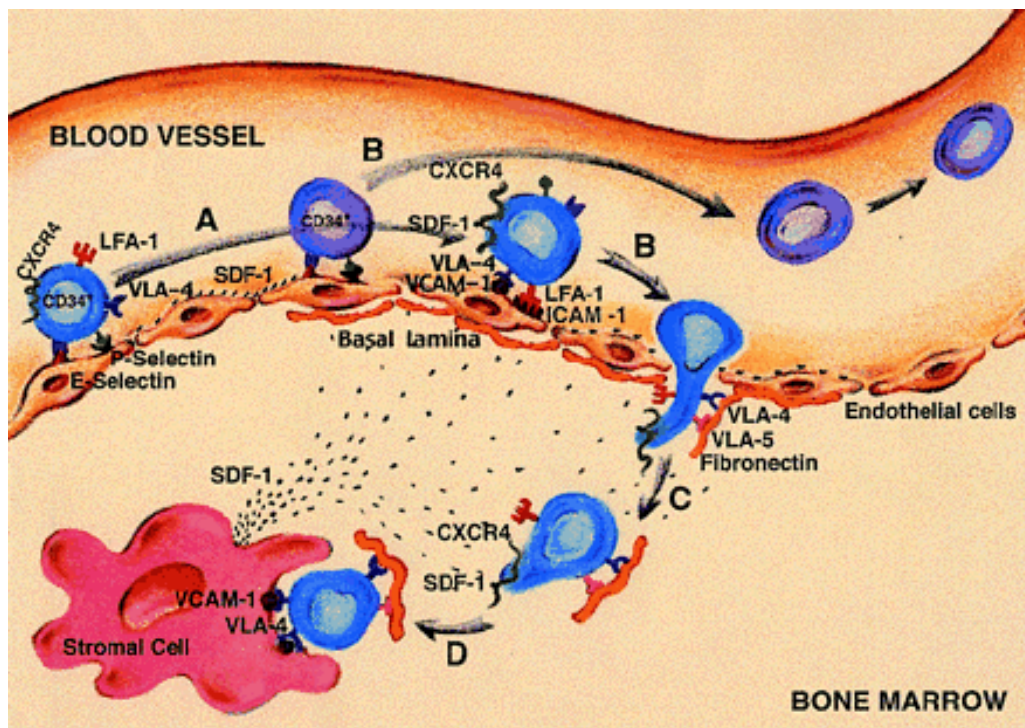
Bei der Einwanderung, dem Homing von Stamm- und Progenitorzellen in das Knochenmark und der anschließenden Migration sowie dem Überleben im Knochenmark handelt es sich um multifaktorielle Prozesse, an denen Adhäsionsmoleküle, parakrine Zytokine, Extrazellulärmatrix und chemotaktische Faktoren beteiligt sind (Lapidot et al., 2002; Lapidot et al., 2005; Lataillade et al., 2000; Möhle et al., 2001; Möhle et al., 2003; Peled et al., 2000).

Welche Rolle hierbei Lipidmediatoren, wie zum Beispiel die Leukotriene spielen, ist im Gegensatz zu ihrer Beteiligung bei allergischen und entzündlichen Reaktionen noch nicht ausreichend bekannt (Busse, 1998; Christie et al., 2002; Denzlinger, 1996). So werden zum Beispiel die von Knochenmarkendothelzellen exprimierte Adhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin und VCAM-1 sonst von Endothelzellen anderer Gewebe nur im Rahmen einer Entzündung exprimiert (Möhle et al., 1999; Jacobsen et al., 1996; Mazo et al. 1999; Schweitzer et al., 1996).

Vor allem das Migrationsverhalten von HPC weist Gemeinsamkeiten mit der Migration reifer Leukozyten in entzündliches Gewebe auf. Sowohl das Stammzellhoming als auch die Leukozytenextravasation in Entzündungsgebieten sind sequentiell ablaufende Vorgänge (Peled et al., 2000; Butcher et al., 1996). Zuerst interagieren die hämatopoetischen Stammzellen mit den Knochenmarksendothelzellen. Dem anschließenden initialen, reversiblen „Rolling“ auf dem Endothel folgen die feste Adhäsion und schließlich die

transendotheliale Migration, wie in Abbildung 2 gezeigt (Frenette et al., 1998). Hierbei handelt es sich um Vorgänge, die bereits innerhalb von Stunden, spätestens aber nach 1 bis 2 Tagen nach der Transplantation vollständig abgeschlossen sind (Lapidot et al., 2005).

Prozesse die das Homing inhibieren, etwa die Gabe von CXCR4-Antagonisten, führen zu einer Unterbrechung ihrer Adhäsion an Komponenten des Stromas und somit zur Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen in die Blutzirkulation (Liles et al., 2003). Mobilisierung und Homing von Stammzellen stellen ein antagonistisches Paar dar, das grundsätzlich von den gleichen Mechanismen gesteuert wird, nur jeweils in ihrer gegensätzlichen Ausprägung.



**Abbildung 2. Modell der transendothelialen Migration hämatopoetischer Progenitorzellen.**

**A:** Humane  $CD34^+$  Zellen, die sich im Blutkreislauf befinden nehmen über endothelexprimiertes E- und P-Selektin reversibel Kontakt mit dem Knochenmarkendothel auf („Rolling“). **B:** CXCR4-positive hämatopoetische Zellen werden durch SDF-1 stimuliert; dieses wird von Zellen der hämatopoetischen Mikroumgebung gebildet, bereits auf den Endothelzellen den „rollenden“  $CD34^+$  Zellen präsentiert und führt zur Aktivierung von Adhäsionsrezeptoren der Integrin-Familie



(VLA-4, VLA-5, LFA-1) auf den CD34<sup>+</sup> Zellen. Hierdurch wird die feste Adhäsion an die vaskulären Liganden VCAM-1 und ICAM-1 sowie an Komponenten der Extrazellulärmatrix (z.B. Fibronectin) vermittelt. Stammzellen mit zu geringer CXCR4-Expression lösen sich wieder ab und gelangen zurück in den Blutstrom. **C:** Die adhärenierten Zellen migrieren durch die Endothelschicht hindurch in das Knochenmark. **D:** Dort treten sie mit Zellen des hämatopoetischen Mikromilieus in Kontakt (nach Peled et al., 2000 verändert).

## 1.9 Ziel der Arbeit

Während die Funktion von Peptiden, wie beispielsweise SDF-1 und seinem Rezeptor CXCR4, als Mediator im hämatopoetischen Mikromilieu bereits bekannt ist, ist die Aufgabe der Lipidmediatoren wie zum Beispiel der Cysteinyl-Leukotriene weitgehend unbekannt. In Analogie zu SDF-1 und seinem Rezeptor CXCR4 sind Leukotriene möglicherweise auf Grund der Interaktion mit ihrem Rezeptor CysLT<sub>1</sub> für die ersten Schritte des Homings von Bedeutung.

In der folgenden Arbeit wird der Effekt der Cysteinyl-Leukotriene auf die Adhäsion und Proliferation von Progenitorzellen in vitro und somit auf wichtige zelluläre Funktionen die beim Homing, bei der Aufrechterhaltung, dem Überleben und der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmarkmikroenvironment beteiligt sind, untersucht. Hierdurch sollen die Grundlagen in vitro geschaffen werden, um unter anderem abschätzen zu können, ob CysLT<sub>1</sub>-Antagonisten möglicherweise klinisch zur Stammzellmobilisierung verwendet werden können. Dabei wird die Wirkung unterschiedlicher Cysteinyl-Leukotriene und die Blockierbarkeit von CysLT<sub>1</sub> durch Rezeptorantagonisten und Inhibitoren der GPR-vermittelten Signaltransduktion wie beispielsweise PTX, Tyrosinkinaseinhibitoren und MEK/ERK/MAPK-Inhibitoren genauer untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

#### 2.1.1 Lipidmediatoren, Rezeptoragonisten und -antagonisten

Daidzein	Biomol
Genistein	Biomol
Herbimycin A	Biomol
Leukotrien C <sub>4</sub>	Biomol
Leukotrien D <sub>4</sub>	Biomol
Leukotrien E <sub>4</sub>	Biomol
LY 171883	Biomol
MK-571	Biomol
PD-98059	Biomol
Pertussistoxin (PTX)	Biomol

#### 2.1.2 Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle

FLT3-Ligand (FLT3-L)	Biomol
Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	Biomol
Interleukin 3 (IL-3)	Biomol
Stammzellfaktor (SCF)	PeptoTech

#### 2.1.3 Funktionell blockierende Antikörper

CD34-PE	BD Biosciences
CD38-FITC	BD Biosciences
CD45-FITC	BD Biosciences
IgG1-PE	BD Biosciences
IgG1-FITC	BD Biosciences

### 2.1.4 Chemikalien, Enzyme und Seren

APC-Kalibrierungsbeads (CaliBRITE® Beads)	Becton-Dickinson
Aqua ad iniectabilia	Braun
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNase (1 mg/ml)	Roche
Ethanol (70%)	Merck
Ficoll (Biocoll Separating Solution, 1,077 g/ml)	Biochrom
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
Gelatine 10 mg/ml	Biochrom
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
Methanol	Merck
PBS	Lonza
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Gibco
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche
Trypanblau	Gibco
Trypsin/EDTA-Lösung (0,25%1 mM)	Gibco
X-VIVO 20	Lonza

### 2.1.5 Kits

Indirect CD34 <sup>+</sup> MicroBead Kit	Miltenyi Biotec
- FcR Blocking Reagent	
- CD34 Hapten Antibody	
- CD34 Anti-Hapten Micro Beads	

## 2.2 Lösungen

### 2.2.1 Medien für die Zellkultur

RPMI-Grundmedium	RPMI 1640 mit NaHCO <sub>3</sub> (0,195%), Glutamax-I, 25 mM HEPES (in vitrogen) 10% (v/v) FCS 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
RPMI-Vollmedium	RPMI 1640 Grundmedium 1% (v/v) MEM n/e Aminosäuren 1% (v/v) MEM Na-Pyruvat
Endothelmedium (Promo Cell)	Endothelial Cell Growth Medium 2% (v/v) FCS 0,4% (v/v) ECGS/H 0,1 µg/l EGF 1,0 µg/l bFGF 1,0 mg/l Hydrocortison 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Einfriermedium	45% (v/v) PBS Dulbecco's 40% (v/v) HSA (20%) 15% (v/v) DMSO 20 I.U./ml Heparin

### 2.2.2 Sonstige Lösungen

ACD	22,3 g/l D-(+)-Glukose 22,0 g/l Natriumzitat 8,0 g/l Zitronensäure
-----	--

	in Aqua bidest.
Auftaumedium für kryokonservierte CD34 <sup>+</sup> -Zellen	RPMI 1640 Grundmedium 20% (v/v) FCS 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,5% (v/v) MEM n/e Aminosäuren 0,5% (v/v) MEM Na-Pyruvat
Auftaupuffer Leukapheresat	74% (v/v) PBS Dulbecco's 25% (v/v) FCS 1% DNase I (1 mg/ml)
FACS-Fixierlösung	99% (v/v) PBS Dulbecco's 1% (w/v) Paraformaldehyd
FACS-Puffer	99,98% PBS Dulbecco's 0,1% (w/v) BSA 0,1% (w/v) Natrium-Azid
MACS-Puffer	94,4% (v/v) PBS Dulbecco's 5% (v/v) BSA (100 mg/ml in IMDM) 0,6% (v/v) ACD

### 2.3 Gebrauchswaren

Einfrierröhrchen 1,0 ml, 1,8 ml	Greiner, Nunc
Einmalspritzen 1 ml, 10 ml	B. Braun
FACS- Röhrchen	Greiner bioone
Gewebekulturplatten	
- 96-well, flacher Boden	Corning-Costar

- 96-well, runder Boden	Greiner bioone
- 24-well, flacher Boden	Corning-Costar
Kanülen:	
- 0,9x70 mm	B. Braun
- 1,3x8,8 mm	B. Braun
Magnetseparationssäulen 25 LS Column	Miltenyi Biotec
Parafilm	Pechiney
Pipettenspitzen	Greiner
Pipetten steril 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml	BD Falcon
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Eppendorf
Reservoir steril	BD Falcon
Serologische Pipette	BD Falcon
Sterilfilter 0,2 µm	Pall Corporation
Vorfilter	Miltenyi Biotec
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	BD Falcon
Zellsieb 70 µm	BD Falcon
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner

## 2.4 Geräte

Begasungsbrutschränke	Heraeus
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson
Einfrierbehälter (Cryo 1°C Freezing Container)	Nunc
Kühlschrank -20°C	Kirsch
Tiefkälteschrank -80°C	Heraeus
Eismaschine	Scotsman
Magnet-Separationssystem (MidiMacs)	Miltenyi Biotec
Mikroskope:	
- Inverses Mikroskop (IX51)	Olympus
- Lichtmikroskop	Optech

Pipetten:

- |   |                    |
|---|--------------------|
| - Kolbenhubpipette                          | Eppendorf          |
| - 12- Kanalpipette                          | Microone           |
| - Multipette                                | Eppendorf          |
| - elektrische Pipettierhilfe (pipetboy acu) | Integra Bioscience |

Sterilbänke

Heraeus

Ultraschall (Sonorex Super RK 255H)

Bandelin

Vakuumpumpe:

- |  |                  |
|--|------------------|
| - Speed Vac Concentrator                     | Christ Alpha RVC |
| - Kühlfalle (refrigerated condensation trap) | Christ Alpha 2-4 |
| - Drehschieber-Vakuumpumpe RD 30             | Edwards RV3      |

Vortex (Top-Mix)

Heidolph

Wasserbad

Memmert

Zählkammer

Neubauer

Zentrifugen:

- |                     |           |
|---------------------|-----------|
| - Megafuge 1,0 R    | Heraeus   |
| - Centrifuge 5417 R | Eppendorf |

## 2.5 Verwendete Zellen

### 2.5.1 CD34<sup>+</sup> Zellen

CD34<sup>+</sup> Zellen wurden mittels unterschiedlichen Methoden (siehe unten) aus Leukapheresat, bzw. peripherem Blut gewonnen. Teilweise waren die Proben bis zum Beginn der Versuche kryokonserviert. Hierbei erfolgte die Patientenaufklärung- und Einverständnis gemäß der Genehmigung der Ethikkommission der Universität Tübingen (Projekt Nr. 268/2003V).

### 2.5.2 Humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC)

Kryokonservierte HUVEC (HUVEC pooled, Promo Cell GmbH, Heidelberg) wurden wie unter 2.6.5 beschrieben aufgetaut und in Endothelmedium kultiviert.

Bei Konfluenz der Zellen, also ungefähr alle 5 Tage, wurden die Zellen passagiert. Für die Adhäsionsversuche wurden Zellen der Passage 2 bis 6 verwendet.

## **2.6 Methoden**

### **2.6.1 Isolierung CD34<sup>+</sup> Zellen aus Leukapheresat**

Das Leukapheresat, bzw. das heparinisierte Vollblut wurde zunächst mit PBS auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt und davon je 25 ml auf 15 ml Ficoll (1,077 g/ml) aufgeschichtet. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 500g ohne Bremse zentrifugiert. Zellen die eine größere Dichte als Ficoll haben befanden sich am Boden des Röhrchens. Die Leukozyten bildeten die Interphase zwischen Ficoll und thrombozytenreichem Plasma. Diese Interphase wurde abgenommen und erneut auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 220g wurde verbliebenes Ficoll herausgewaschen. Nach Abkippen des Überstandes wurden die Zellen ein zweites Mal in 50 ml PBS gewaschen. Die Leukozyten befanden sich nun in dem Pellet. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet seinem Volumen entsprechend in der doppelten Menge eiskaltem, entgastem MACS-Puffer aufgenommen. Ein Teil der Zellsuspension wurde mit Trypanblau verdünnt und mittels einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop die Zellzahl bestimmt.

Mit Hilfe des MACS-Systems und des CD34 Progenitor Cell Isolation Kits wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen aus den mononukleären Zellen isoliert.

Hierbei wurden zu jeweils  $10^8$  Zellen 300  $\mu$ l MACS-Puffer und 50  $\mu$ l FcR Blocking Reagent hinzu gegeben, so dass die unspezifischen Zellen gebunden werden konnten. Anschließend wurden noch 50  $\mu$ l CD34 Hapten Antibody dazu gefügt, um die CD34<sup>+</sup> Zellen mit einem gegen diesen Zellmarker gerichteten monoklonalen Antikörper zu markieren. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C wurde es mit MACS-Puffer auf 12 ml aufgefüllt und durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 220g und Bremse die ungebundenen Antikörper entfernt. Der Überstand wurde verworfen und im nächsten Schritt wurden zu jeweils  $10^8$



Zellen 400  $\mu$ l FACS-Puffer und 50  $\mu$ l CD34 Anti-Hapten Micro Beads zugegeben. Dieser Antikörper, der an 50 nm große Eisenpartikel gekoppelt ist, band nun an den anti-CD-34-Antikörper. Nach 15 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut in 12 ml MACS-Puffer gewaschen und zu dem Pellet je  $10^8$  Zellen 500  $\mu$ l FACS-Puffer gegeben.

Die somit markierten CD34<sup>+</sup> Zellen wurden über eine zuvor mit 3 ml MACS-Puffer equilibrierten LS-Säule mit Vorfilter gegeben. Es wurde zwei Mal mit je 5 ml MACS-Puffer gespült und anschließend die CD34 positiven Zellen aus der Säule eluiert. Um eine Reinheit der Zellen größer 95% zu erlangen wurden die Zellen über eine zweite LS-Säule ohne Vorfilter gegeben und nochmals positiv selektioniert.

### **2.6.2 Isolierung CD 34<sup>+</sup> Zellen aus kryokonserviertem Leukapheresat**

Das Leukapheresat wurde wie unter 2.6.5 beschrieben aufgetaut. Als Medium wurde der Auftaupuffer verwendet. Pro Röhrchen wurden in gleichen Teilen Auftaupuffer und Leukapheresat hinzu gegeben. Anschließend wurde es bei 220g 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut je 20 ml Auftaupuffer dazu gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Zellen 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut 5 min bei 220g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, erneut 20 ml Auftaupuffer hinzu gegeben und wie oben beschrieben gevortext, inkubiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml PBS resuspendiert. Zellklumpen wurden mittels eines Zellsiebs entfernt, die Zellen mit einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt und anschließend die benötigte Zellmenge wie beschrieben über FICOLL getrennt.

### **2.6.3 Isolierung CD 34<sup>+</sup> Zellen aus kryokonservierten Zellen**

Die Zellen wurden wie unter 2.6.5 beschrieben aufgetaut. Als Medium wurde das oben beschriebene Auftaumedium für kryokonservierte CD34<sup>+</sup> Zellen

verwendet. Anschließend wurden die Zellen wie beschrieben über FICOLL getrennt.

#### **2.6.4 Reinheitsbestimmung**

Nach der Isolierung wurde die Reinheit der Zellen durchflusszytometrisch durch Zweifachmarkierung mit anti-CD45-FITC, bzw. anti-CD38-FITC und anti-CD34-PE mAk überprüft. Unspezifische mAk desselben Isotyps dienten als Negativkontrolle. Für die Kompensationseinstellung wurden jeweils Einzelfärbungen eingesetzt. Es wurden ausschließlich Zellen verwendet, deren Anteil an CD34<sup>+</sup> Zellen größer als 95% waren.

#### **2.6.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Um die Zellen einzufrieren wurden ca.  $3 \times 10^6$  Zellen in 1000  $\mu$ l PBS resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und mit Einfriermedium auf ein Endvolumen von 1800  $\mu$ l verdünnt. Anschließend wurde das Kryoröhrchen sofort in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox überführt und so eine Abkühlung um 1°C pro Minute erreicht. Um die Zellen lange genug lagern zu können wurden sie nach mindestens 24 Stunden in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Um die Zellen aufzutauen wurde zunächst 10 ml des entsprechenden Mediums vorgelegt. Das Kryoröhrchen wurde bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend in das Medium resuspendiert und bei 220g 5 min zentrifugiert um das DMSO zu entfernen. Anschließend konnten die Zellen in der gewünschten Dichte in frisches Medium aufgenommen werden.

### **2.6.6 Beschichten von Zellkulturflaschen und Gewebekulturplatten mit Gelatine**

Da die HUVEC zur Anhaftung eine organische Matrix brauchen, mussten die Kulturflaschen und -platten mit Gelatine (0,1% in PBS) beschichtet werden. Die Gefäße wurden mit Gelatine befüllt bis der Boden vollständig bedeckt war. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnte der Überstand abgenommen werden. Anschließend mussten die Gefäße unter sterilen Bedingungen trocknen und dann bei 4°C gelagert werden.

### **2.6.7 Zelladhäsionstest**

Zur Untersuchung zellulärer Adhäsionsmechanismen wurden 48 Stunden vor dem eigentlichen Adhäsionsversuch Zellen aus humanem Nabelschnurendothel als Modellsystem eingesetzt. Hierzu wurden  $1 \times 10^4$  HUVEC in einer 96-well Platte in die mit Gelatine beschichteten flachen Vertiefungen ausgesät und bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> in Endothelmedium bis zur Konfluenz kultiviert. 4 Stunden vor dem eigentlichen Adhäsionsversuch wurden die HUVEC mit 10 ng/ml IL-1β stimuliert, um die Rezeptorexpression zu steigern. Um den IL-1β Effekt zu demonstrieren, wurde in einigen Versuchen als eine weitere Bedingung die Stimulation mit IL-1β weggelassen.

Anschließend wurde die Platte zweimal mit 200 µl/well X-VIVO20 gewaschen. Die CD34<sup>+</sup> Zellen wurden mit LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> in Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> bis 10<sup>-6</sup> M für 15 min bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das entsprechende Volumen an X-VIVO20 als eine weitere Bedingung verwendet. In einigen Experimenten wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen vor Zugabe der Leukotriene 5 Minuten mit Daidzein, Genistein, Herbimycin A, LY171883, MK-571, PD-98059 oder PTX vorinkubiert.

Die 96-well-Platte wurde pro well mit  $3 \times 10^4$  der vorinkubierten Zellen in 100 µl X-VIVO20 beschickt. Für jede Bedingung wurden Triplikate angesetzt. Die Platte wurde 15 s bei 30g an zentrifugiert und anschließend für 5 min bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die nicht-adhären Zellen wurden durch viermaliges Waschen mit je 100 µl/well vorgewärmtem X-VIVO20 entfernt. Durch Zugabe

von 10  $\mu$ l Trypsin/EDTA pro well, drei min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließende Zugabe von 150  $\mu$ l RPMI-Vollmedium konnten die adhärenen Zellen abgelöst werden.

Um die Zellen zu quantifizieren und von den ebenfalls abgelösten Endothelzellen zu differenzieren, wurden sie zwei min bei 220g zentrifugiert, das Pellet in 50  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und 20 min bei 4°C im Dunkeln mit CD34-PE mAk inkubiert. Nach Zugabe von  $3 \times 10^4$  FITC-CaliBRITE-beads zu jedem well erfolgte die Messung am FACSCalibur und die anschließende Auswertung mit der CellQuestPro Software.

### **2.6.8 Zellproliferationstest**

Um einen Effekt der Leukotriene auf die Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen festzustellen wurden isolierte CD34<sup>+</sup> Zellen in einer 24-well Zellkulturplatte ausgesät. Pro well wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in 1 ml Medium eingesetzt. Als Medium wurde X-VIVO20 verwendet, das die Leukotriene LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> oder LTE<sub>4</sub> in Konzentration von  $10^{-10}$  bis  $10^{-6}$  M und je 100 ng/ml an SCF, IL-3 und FLT3 enthielt. Die jeweiligen Kontrollen ohne Leukotriene wurden mit gleichem Volumen an X-VIVO20 versetzt. Die Zellen wurden eine Woche bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Da Leukotriene in Kultur instabil sind, erfolgte eine erneute Zugabe der Leukotriene, bzw. X-VIVO20 an den Tagen +2, +4 und +6 der Inkubationsperiode. Nach sieben Tagen wurden die Zellen durch Suspendieren aus den wells geerntet, mit Trypanblau die lebenden Zellen angefärbt und mittels einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

### **2.7 Grundlagen der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist eine Methode, mittels derer die Zellen auf Grund ihrer physikalischen Eigenschaften analysiert werden können. Sie beruht darauf, dass markierte Zellen einzeln an einem Laser vorbeigeführt und anhand ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften analysiert werden.

Ein FACS-Röhrchen wird unter einer Stahlkapillare befestigt und das Medium durch Überdruck in die Messküvette gedrückt. Die Zellen passieren einzeln den Punkt an dem der Laserstrahl auf den Flüssigkeitsstrahl trifft. Trifft der Laserstrahl auf die Zellen kommt es zur Streuung des Lichts und zur Aussendung von Fluoreszenzlicht. Durch die Messung des Side Scatters können die Zellen nach ihrer Zelldichte und Granularität analysiert werden. Der Forward Light Scatter dagegen erfasst die Zellgröße.

Durch Markieren der Zellen mit Fluorchrom gekoppelten spezifischen Antikörpern können die Oberflächenantigene der Zellen dargestellt und so charakterisiert werden.

## **2.8 Datenerfassung, Auswertung und statistische Verfahren**

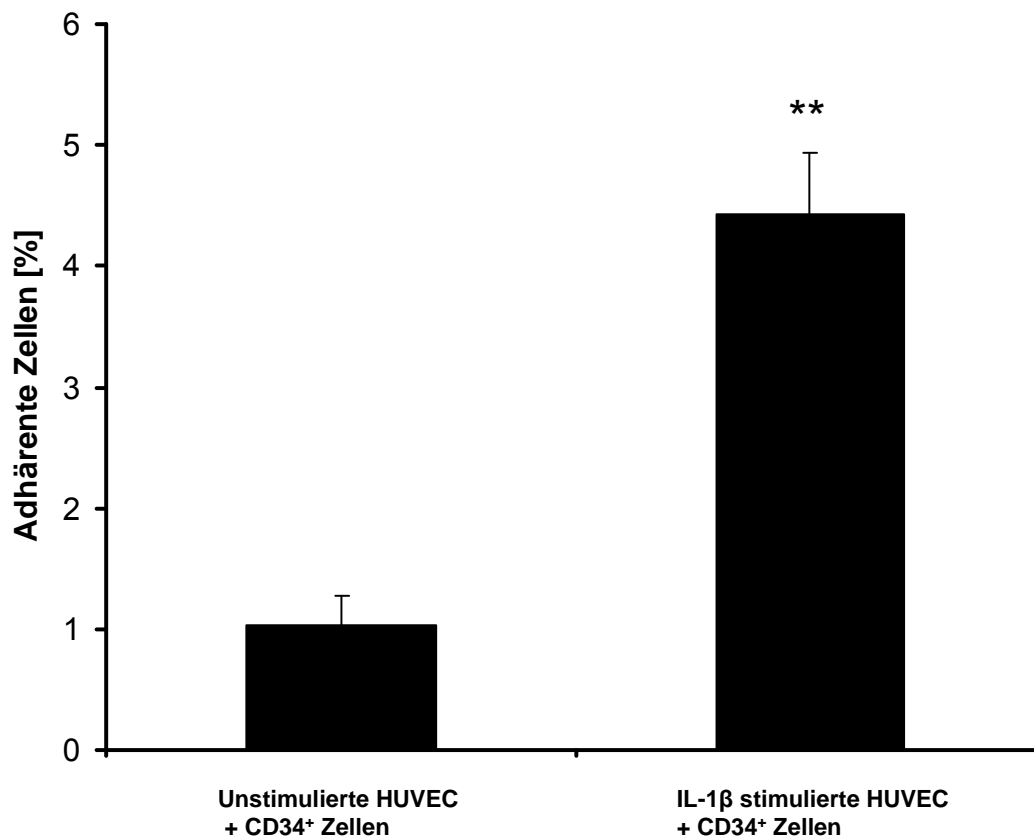
Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mithilfe der CellQuestPro Software ausgewertet und dargestellt. Bei den Zelladhäsionstests wurden FITC-beads als G1=R1 gated und die Datenaufnahme nach insgesamt 5000 aufgenommenen beads beendet. Die Anzahl der adhärenen Zellen pro well ließ sich nun aus dem Quotient  $CD34^+/FITC\text{-Beads}$  multipliziert mit der Gesamtzahl an zugegebenen Beads berechnen.

Alle statistische Auswertungen, wie die Berechnung des Mittelwerts, des Standard Error of the Mean (SEM) und die Ermittlung der Signifikanz, erfolgten mit Microsoft Excel. Die Darstellung der Diagramme und Grafiken erfolgte mittels Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM, basierend auf mindestens drei Experimenten, angegeben. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der gepaarte t-Test verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 IL-1 $\beta$ Stimulation der HUVEC Zellen



**Abbildung 3. IL-1 $\beta$  Stimulation der HUVEC.** Bevor die CD34<sup>+</sup> HPC mit den HUVEC in Kontakt gebracht wurden und somit adhären konnten, wurden die HUVEC 4 Stunden mit IL-1 $\beta$  stimuliert und aktiviert. \*\*p < 0,01 vs. unstimulierte HUVEC + CD34<sup>+</sup> Zellen; gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n = 5 Versuchen angegeben.

Um die adhäsiven Wechselwirkungen der CD34<sup>+</sup> HPC zu untersuchen wurden HUVEC als Modellsystem verwendet. Auf Grund der gemeinsamen Eigenschaften von mikrovaskulären Knochenmarksendothelzellen und

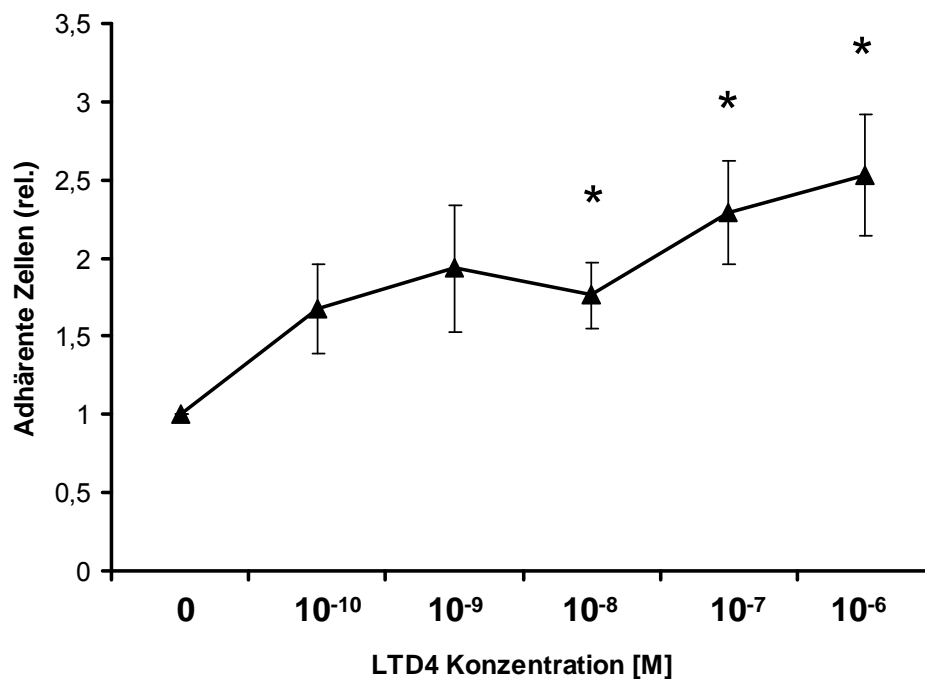
entzündlich stimulierter Endothelzellen wurden 4 Stunden vor dem eigentlichen Adhäsionsassay die als Monolayer vorliegenden HUVEC mit IL-1 $\beta$  stimuliert und somit aktiviert (Abbildung 3). Durch die Aktivierung der HUVEC mittels IL-1 $\beta$  zeigte sich eine signifikante Steigerung der adhärenen Zellen gegenüber unstimulierten HUVEC.

### **3.2 Adhäsion CD34<sup>+</sup> HPC an HUVEC**

#### **3.2.1 LTD<sub>4</sub> induzierte Adhäsion**

Nach Aktivierung der HUVEC mit IL-1 $\beta$  wurden die CD34<sup>+</sup> HPC mit LTD<sub>4</sub> in Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> bis 10<sup>-6</sup> M präinkubiert und durch kurze Zentrifugationsschritte mit den HUVEC Zellen in Kontakt gebracht. Nach mehreren Waschsritten konnten die adhärenen CD34<sup>+</sup> Zellen gesammelt und anschließend durchflusszytometrisch quantifiziert werden.

Die Präinkubation mit LTD<sub>4</sub> steigerte die Adhäsion HPC an HUVEC abhängig von der Konzentration um bis zu 253,25  $\pm$  15,74%, mit einem maximalen Effekt bei Zellen, die 15 min mit 1  $\mu$ M LTD<sub>4</sub> behandelt wurden. Eine signifikant gesteigerte Adhäsion der CD34<sup>+</sup> HPC konnte bereits bei einer LTD<sub>4</sub> Konzentration < 1 $\mu$ M festgestellt werden (Abbildung 4).



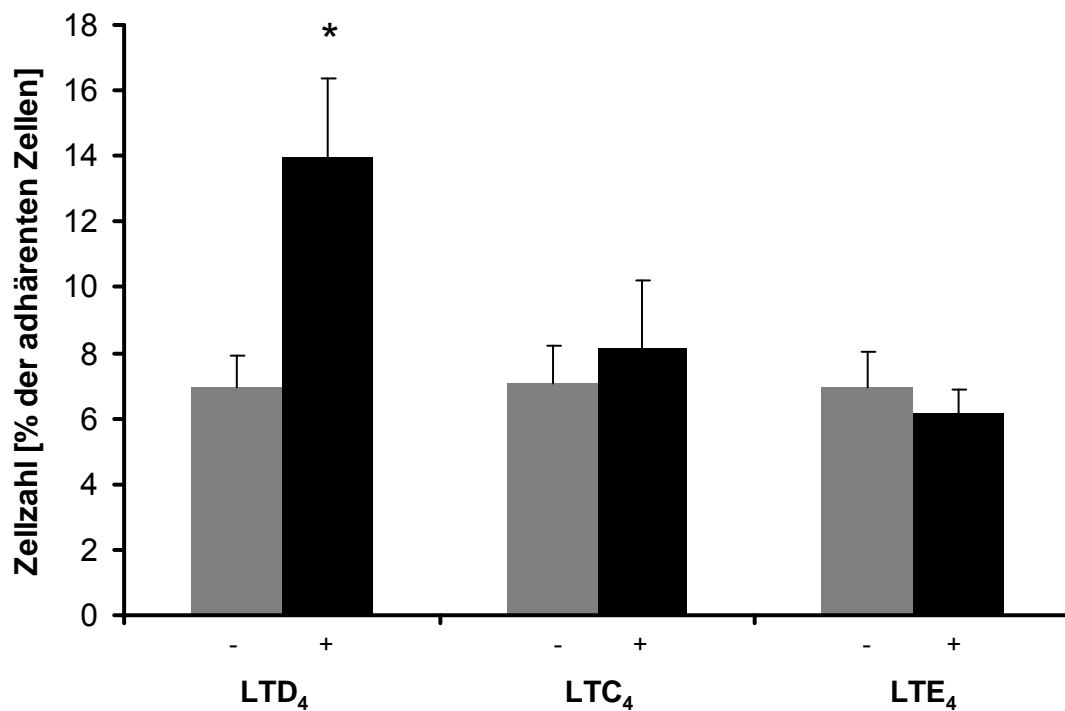
**Abbildung 4. Dosiswirkung von LTD<sub>4</sub> auf die Adhäsion CD34<sup>+</sup> HPC an HUVEC- Monolayer.** CD34<sup>+</sup> HPC wurden 15 min mit Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> bis 10<sup>-6</sup> M LTD<sub>4</sub> präinkubiert und anschließend mit den aktivierten HUVEC Zellen in Kontakt gebracht. \*p < 0,05 vs. Kontrolle (0 M LTD<sub>4</sub>); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte ± SEM aus n = 5 Versuchen angegeben.

### 3.2.2 LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> induzierte Adhäsion

Die Präinkubation CD34<sup>+</sup> HPC mit LTD<sub>4</sub> steigerte die Adhäsion HPC an HUVEC um mehr als das 2 fache. Um die Adhäsion weiterer Leukotriene zu testen wurden CD34<sup>+</sup> HPC mit LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> in Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> bis 10<sup>-6</sup> M präinkubiert. Analog der LTD<sub>4</sub> induzierten Adhäsion wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen mit den HUVEC in Kontakt gebracht und anschließend durchflusszytometrisch quantifiziert.

Im Gegensatz zu der LTD<sub>4</sub> induzierten Adhäsion zeigte sich bei der Präinkubation mit LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> bei einer Konzentration von 1 µM keine gesteigerte Adhäsion der HPC an HUVEC (Abbildung 5).





**Abbildung 5. Durch verschiedene Leukotriene induzierte Adhäsion CD34<sup>+</sup> HPC an HUVEC-Monolayer.** CD34<sup>+</sup> Zellen wurden mit (+), bzw. ohne (-) LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> oder LTE<sub>4</sub> mit Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> bis 10<sup>-6</sup> M (in der Abbildung sind die Werte bei einer Konzentration von 1 µM angegeben) für 15 min inkubiert und anschließend mit den aktivierten HUVEC in Kontakt gebracht. \*p < 0,05 vs. Kontrolle (0 M Leukotriene); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte ± SEM aus n ≥ 3 Versuchen angegeben.

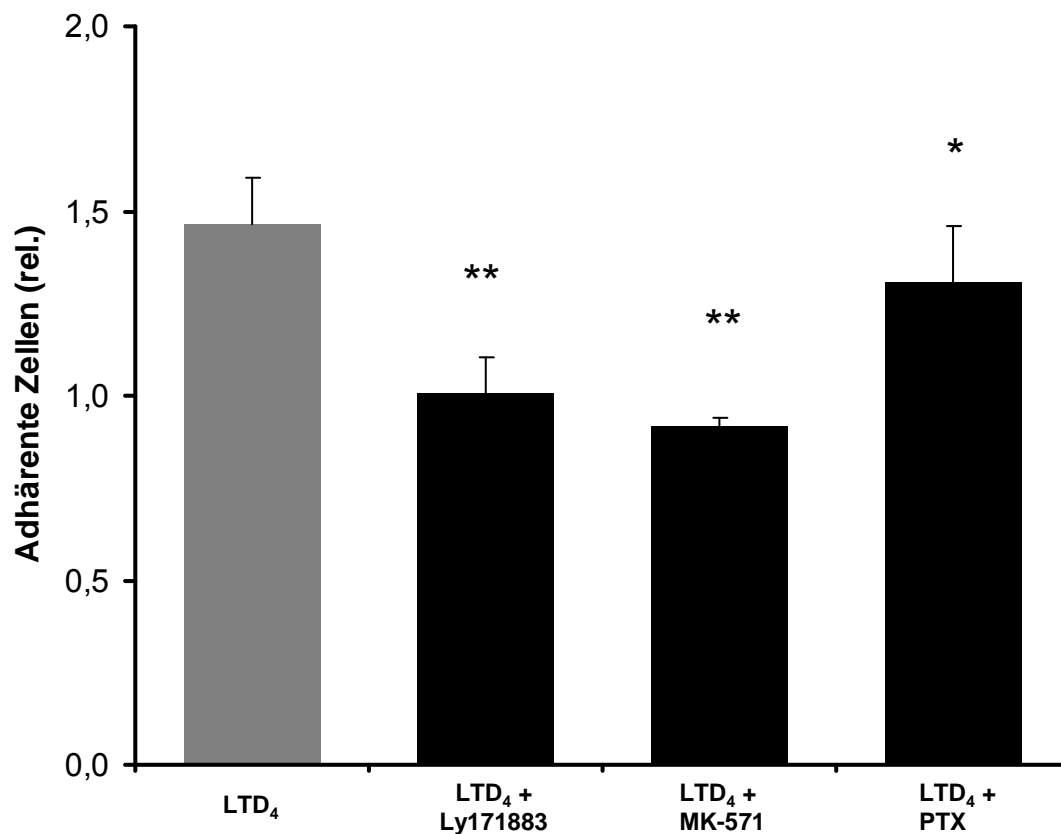
### 3.3 Auswirkung von CysLT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten, PTX, Tyrosinkinase- und MEK/ERK/MAPK-Inhibitoren auf die LTD<sub>4</sub> induzierte Adhäsion CD34<sup>+</sup> HPC an HUVEC

Aufgrund der erhaltenen Daten, die die gesteigerte Adhäsion CD34<sup>+</sup> HPC an HUVEC-Monolayer durch LTD<sub>4</sub> Präinkubation zeigten, wurde untersucht, ob umgekehrt eine Blockade des CysLT<sub>1</sub>-Rezeptors möglich ist. Hierbei wurden sowohl CysLT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten als auch Inhibitoren der GPR-vermittelten Signaltransduktion, wie beispielsweise Tyrosinkinaseinhibitoren, PTX und Inhibitoren des MAP-Kinase Signalwegs verwendet.

### 3.3.1 CysLT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten und PTX

CD34<sup>+</sup> HPC wurden 5 min mit 2 verschiedenen CysLT<sub>1</sub>-Antagonisten (Endkonzentration 10 µM) präinkubiert. Bei den CysLT<sub>1</sub>-Antagonisten handelte es sich hierbei um MK-571 sowie um LY171883. Außerdem wurden die Zellen eines anderen Ansatzes mit PTX (Endkonzentration 20 ng/ml) präinkubiert. Nach Aktivierung der HUVEC mit IL-1β wurden die CD34<sup>+</sup> HPC mit LTD<sub>4</sub> (Endkonzentration 1 µM) inkubiert und durch kurze Zentrifugationsschritte mit den HUVEC in Kontakt gebracht. Nach mehreren Waschsritten konnten die adhärenen CD34<sup>+</sup> Zellen gesammelt und anschließend durchflusszytometrisch quantifiziert werden.

Die durch LTD<sub>4</sub> vermittelte Adhäsion CD34<sup>+</sup> HPC an HUVEC konnte durch die CysLT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten MK-571 und LY171883 ( $p < 0,01$  vs. LTD<sub>4</sub>) signifikant blockiert werden. Die Inkubation mit MK-571 reduzierte die Adhäsion CD34<sup>+</sup> HPC an HUVEC um  $37,1 \pm 3,3\%$  bzw. mit LY171883 um  $31 \pm 10,9\%$ . PTX konnte die Adhäsion HPC an HUVEC nur teilweise blockieren ( $p < 0,05$  vs. LTD<sub>4</sub>). So kommt es unter Inkubation mit PTX zu einer Reduktion der adhärenen CD34<sup>+</sup> HPC an den HUVEC um  $10,7 \pm 14,6 \%$ .



**Abbildung 6. Effekt der CysLT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten und PTX auf die Adhäsion der mit LTD<sub>4</sub> stimulierten CD34<sup>+</sup> Zellen an HUVEC.** CD34<sup>+</sup> Zellen wurden mit verschiedenen CysLT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten (MK-571 und LY17183), bzw. mit PTX (G<sub>αi</sub>-Inhibitor) präinkubiert, mit 1 µM LTD<sub>4</sub> für 15 min stimuliert und anschließend zu den HUVEC gegeben. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 vs. Isotyp (LTD<sub>4</sub>); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte ± SEM aus n ≥ 3 Versuchen angegeben.

### 3.3.2 Tyrosinkinase- und MEK/ERK/MAPK-Inhibitoren

Sowohl die Tyrosinkinase als auch die MAPK sind möglicherweise an der CysLT<sub>1</sub>-vermittelten Signaltransduktion beteiligt. Dies ist bereits für andere Zellen bekannt und soll im Folgenden für CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen untersucht werden.

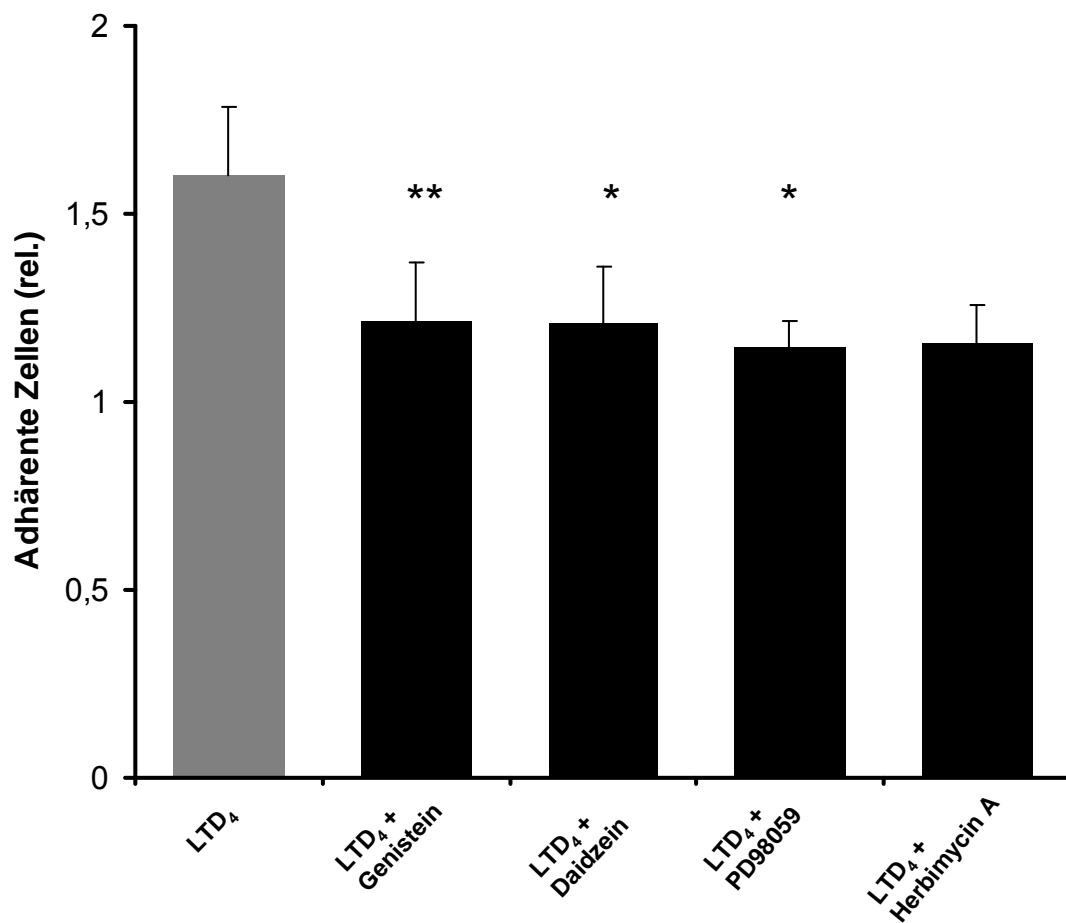
CD34<sup>+</sup> HPC wurden vor der Inkubation mit LTD<sub>4</sub> (Endkonzentration 1 µM) 5 min mit den verschiedenen Tyrosinkinaseinhibitoren bzw. MEK/ERK/MAPK Inhibitoren (Endkonzentration 10 µM) vorinkubiert. Hierbei wurden als

spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren Genistein und Herbimycin A verwendet. Daidzein, das zur selben Gruppe der Isoflavone wie Genistein gehört, allerdings kein Tyrosinkinaseinhibitor sein soll wurde als mögliche Negativkontrolle verwendet. Als spezifischer Inhibitor des MEK/ERK/MAPK Weges wurde außerdem PD98059 eingesetzt.

Nach der Vorinkubation wurden die Zellen anschließend durch kurze Zentrifugationsschritte mit den aktivierten HUVEC in Kontakt gebracht. Nach mehreren Waschsritten konnten die adhärenen Zellen gesammelt und durchflusszytometrisch bestimmt werden.

Die durch LTD<sub>4</sub> vermittelte Adhäsion CD34<sup>+</sup> HPC an HUVEC konnte durch Genistein ( $p < 0,01$  vs. LTD<sub>4</sub>) signifikant blockiert werden. Die Adhäsion verringerte sich um  $23,7 \pm 12,3\%$ . Die eigentliche Negativkontrolle mit Daidzein zeigte ebenfalls eine Signifikanz ( $p < 0,05$  vs. LTD<sub>4</sub>). Es kam zu einer reduzierten Adhäsion der HPC an HUVEC um  $24,2 \pm 12,4\%$ .

Die Inkubation mit PD98059 ( $p < 0,05$  vs. LTD<sub>4</sub>) reduzierte die Adhäsion CD34<sup>+</sup> Zellen an HUVEC um  $28,6 \pm 6,1\%$  und ist ebenfalls signifikant. Bei der Inkubation der CD34<sup>+</sup> HPC mit Herbimycin A und der anschließenden Adhäsion an HUVEC kam es ebenfalls zu einer reduzierten Adhäsion um  $27,5 \pm 8,6\%$  der CD34<sup>+</sup> HPC. Es lässt sich jedoch keine Signifikanz nachweisen (Abbildung 7).



**Abbildung 7. Effekt der Tyrosinkinase- und MEK/ERK/MAPK- Inhibitoren auf die Adhäsion der mit LTD<sub>4</sub> stimulierten CD34<sup>+</sup> Zellen an HUVEC.** CD34<sup>+</sup> Zellen wurden mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Genistein und Herbimycin A, der Negativkontrolle Daidzein sowie mit dem MEK/ERK/MAPK- Inhibitor PD98059 präinkubiert, mit 1  $\mu$ M LTD<sub>4</sub> für 15 min stimuliert und anschließend zu den HUVEC gegeben. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. Isotyp (LTD<sub>4</sub>); gepaarter t-Test. Es sind die Mittelwerte aus  $n \geq 3$  Versuchen angegeben.

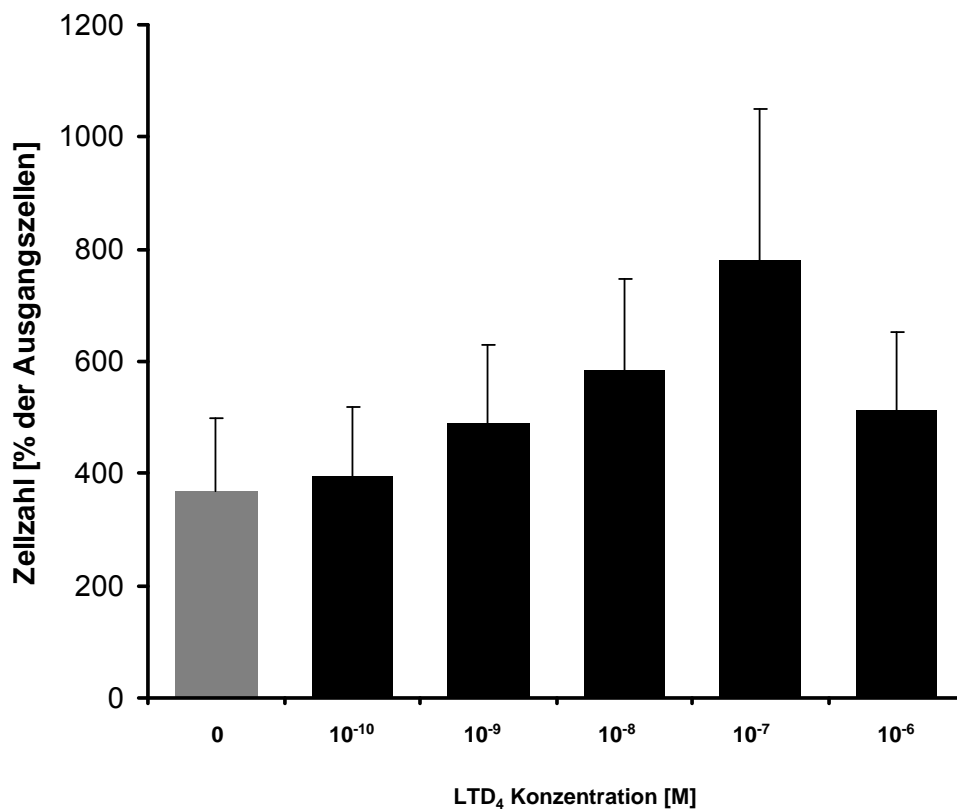
### 3.4 In vitro-Proliferation CD34<sup>+</sup> HPC

#### 3.4.1 LTD<sub>4</sub> induzierte Proliferation

Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich schließen, dass LTD<sub>4</sub> an der Adhäsion hämatopoetischer Vorläuferzellen beteiligt ist. Um die Auswirkung der Leukotriene auf die Proliferation CD34<sup>+</sup> HPC zu beurteilen wurden diese über eine Woche in serumfreiem Medium kultiviert. Zu Beginn wurden je 100 ng/ml SCF, IL-3 und FLT3 hinzugegeben. Außerdem wurde die Zellen an den Tagen 0, 2, 4 und 6 mit LTD<sub>4</sub> in Konzentrationen von 0 bis 10<sup>-6</sup> M stimuliert.

Die Auszählung von Zellen mittels Zählkammer nach ex vivo Ausdehnung von CD34<sup>+</sup> HPC zeigte, dass nach einer Woche abhängig von der LTD<sub>4</sub> Konzentration eine Proliferation der CD34<sup>+</sup> HPC stattfand. Eine LTD<sub>4</sub> Konzentration von 10<sup>-7</sup> M führte zu einer mehr als zweifachen Steigerung der proliferierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

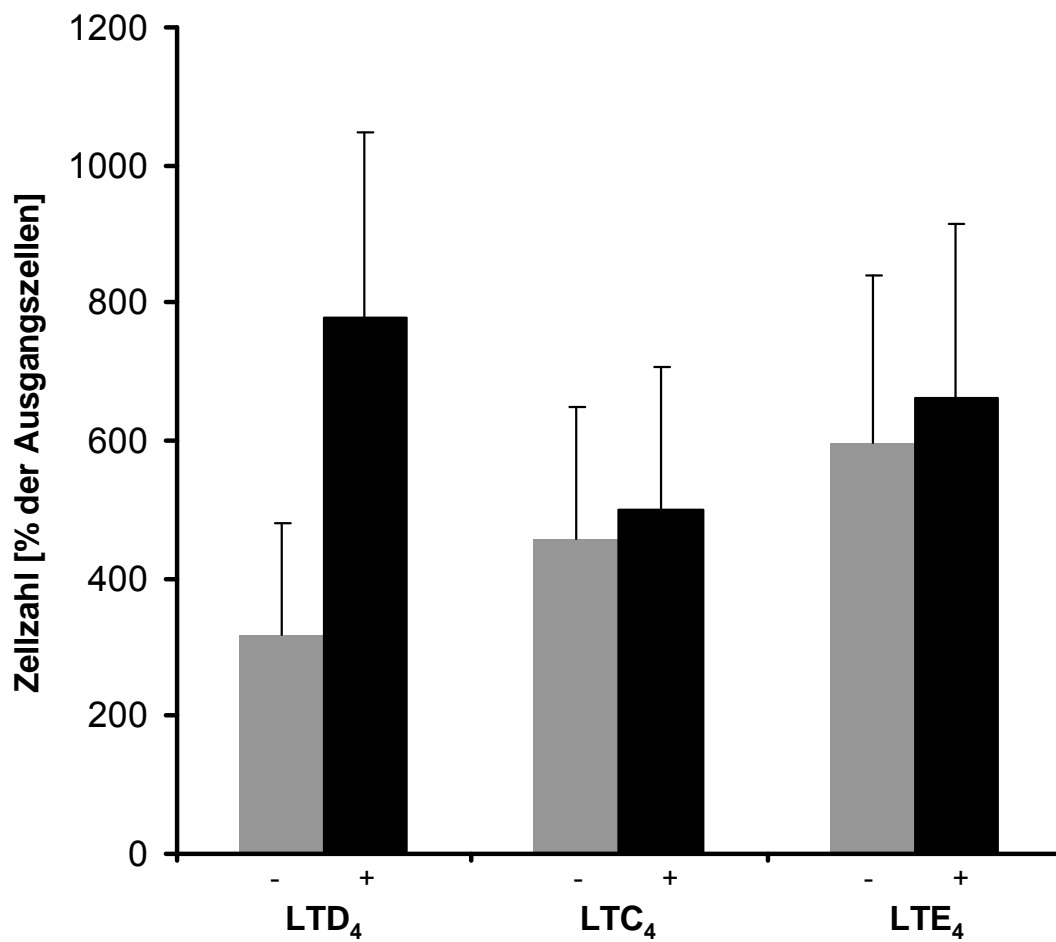
Da dieses Experiment als Pilotversuch zur Frage der Reproduzierbarkeit der schon bekannten Proliferationssteigerung (wie in Böhmler et al., 2009 beschrieben) diente, war die Fallzahl nicht darauf ausgelegt, statistische Signifikanz zu erreichen.



**Abbildung 8. LTD<sub>4</sub> induzierte in vitro-Proliferation CD34<sup>+</sup> HPC.** CD34<sup>+</sup> HPC wurden in serumfreiem, zytokinhaltigem Medium kultiviert und mit LTD<sub>4</sub> in Konzentrationen von 0 bis 10<sup>-6</sup> M, an den Tagen 0, 2, 4 und 6 stimuliert. Es sind die Mittelwerte ± SEM aus n = 3 Versuchen angegeben.

### 3.4.2 LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> induzierte Proliferation

Analog der Stimulation mit LTD<sub>4</sub> wurden in weiteren Versuchen die CD34<sup>+</sup> HPC mit LTC<sub>4</sub>, bzw. LTE<sub>4</sub> stimuliert. Im Gegensatz dazu steigerten LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> die Proliferation CD34<sup>+</sup> HPC nur sehr gering. Da sich keinerlei Trend zu einer ähnlichen Steigerung wie bei LTD<sub>4</sub> zeigte, wurde diese Versuchsserie nach n = 3 abgebrochen.



**Abbildung 9. Durch verschiedene Leukotriene induzierte in vitro-Proliferation CD34<sup>+</sup> HPC.** CD34<sup>+</sup> Zellen wurden in serumfreiem, zytokinhaltigem Medium mit (+) einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> M LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> oder LTE<sub>4</sub> und ohne (-) Leukotriene kultiviert. An den Tagen 0, 2, 4 und 6 wurden die Zellen stimuliert und am Tag 7 ausgezählt. Es sind die Mittelwerte ± SEM aus n = 3 Versuchen angegeben.



## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methodik

Bevor die CD34<sup>+</sup> Zellen mit LTD<sub>4</sub> inkubiert und zu den aktivierten HUVEC gegeben wurden, wurden sie mit verschiedenen CysLT<sub>1</sub>-Antagonisten für 5 min präinkubiert. Neben der CysLT<sub>1</sub> Hemmung haben die Inhibitoren teilweise auch andere Eigenschaften, so hemmt MK-571 beispielsweise den Leukotrientransporter MRP, weshalb 2 verschiedene CysLT<sub>1</sub> Inhibitoren verwendet wurden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proliferationstests mit LTD<sub>4</sub> zeigen einen Anstieg der Proliferation CD34<sup>+</sup> HPC. Aufgrund der komplexen Versuchsbedingungen, den instabilen Leukotrienen und der Tatsache, dass die verwendeten Substanzen, wie zum Beispiel die Cytokine, unterschiedlichen Chargen entstammen, sollte in einer Pilotserie überprüft werden, ob sich eine in der Dimension der vorbekannten Ergebnisse entsprechende Steigerung der Proliferation erzielen lässt. In dieser Arbeit wurden n = 3 Versuche durchgeführt. Fasst man die gewonnenen Ergebnisse mit den Ergebnissen von Andreas Böhmler aus derselben Arbeitsgruppe zusammen, so sieht man deutlich, dass es bei einer Stimulation mit LTD<sub>4</sub> bei einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> M zu einer signifikant gesteigerten Proliferation CD34<sup>+</sup> HPC kommt (p < 0,01 vs. Kontrolle) (Boehmler et al., 2009).

### 4.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.2.1 Adhäsion

Homing hämatopoetischer Stammzellen in das Knochenmark und die Mobilisierung aus dem Knochenmark in das periphere Blut sind multifaktorielle Prozesse, die zu einem gewissen Teil vom Knochenmarkendothel reguliert

werden (Lapidot et al., 2002; Möhle et al., 1999). Die grundsätzlichen Mechanismen der transendothelialen Migration konnten durch verschiedene in vitro und in vivo Studien gezeigt werden. So wurde festgestellt, dass es sich hierbei um einen verschiedene Schritte umfassenden Prozess handelt. Hierzu gehört das, durch Selektin-vermittelte, Rolling an Endothelzellen, gefolgt von der Integrin-vermittelten festen Adhäsion aktivierter Progenitorzellen (Frenette et al., 1998; Mazo et al., 1998; Schweitzer et al., 1996; van der Loo et al., 1998). Die Aktivierung von Zellen durch Chemokine wie zum Beispiel SDF-1 führte zu einer gesteigerten Affinität der Rezeptoren der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrin-Subfamilien. Vor allem VLA-4 und VLA-5 kommt bei den Transmigrationsprozessen und der eigentlichen Adhäsion der HPC eine wichtige Rolle zu (Peled et al., 2000, Yahata et al., 2003).

Bisher gibt es vor allem Erkenntnisse darüber, welche Auswirkungen Proteine und Peptide, wie zum Beispiel Zytokine, Chemokine und Enzyme auf die Integrin-vermittelte Adhäsion und die transendotheliale Migration hämatopoetischer Zellen haben. In früheren Arbeiten konnte von Bautz et al. gezeigt werden, dass der LTD<sub>4</sub> Rezeptor CysLT<sub>1</sub> sowohl von humanen CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen, als auch von der CD34<sup>+</sup> Zelllinie KG1a in einer funktionell aktiven Form exprimiert wird. Außerdem wurde in einem in vitro-Modell gezeigt, dass CysLT<sub>1</sub> bei der transendothelialen Migration CD34<sup>+</sup> Zellen beteiligt ist. CysLT<sub>1</sub> soll unter physiologischen Bedingungen progenitorspezifischer als der bisher bekannte „Homing-Rezeptor“ CXCR4 sein. So gelang es Bautz et al. zu zeigen, dass der Ligand LTD<sub>4</sub> bei Bindung an den Rezeptor CysLT<sub>1</sub> eine stärkere Kalziumfreisetzung bewirkt als der Ligand SDF-1 bei Bindung an den Rezeptor CXCR4 (Bautz et al., 2001).

In einer Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe, zu der auch die hier vorgestellten Ergebnisse beitragen (Böhmler et al., 2009), konnte gezeigt werden, dass die  $\beta_1$ -Integrine VLA-4 und VLA-5, die von unreifen humanen CD34<sup>+</sup> Zellen exprimiert werden, von dem Lipidmediator LTD<sub>4</sub> aktiviert werden. Dies führte zu einer signifikant gesteigerten Adhäsion von HPC an Endothel-Monolayer und Fibronectin. Speziell in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt

werden, dass der Effekt weiterer Cysteinyl-Leukotriene (LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>) auf die Adhäsion CD34<sup>+</sup> HPC an Endothel-Monolayer wesentlich geringer oder gar nicht vorhanden ist. Dies kann unter anderem mit ihrer geringeren Affinität zu CysLT<sub>1</sub> erklärt werden.

Die Auswirkung von LTD<sub>4</sub> auf die Adhäsion ist sowohl zeit-, als auch dosisabhängig und nicht auf eine bestimmte hämatopoetische Progenitorzelllinie beschränkt. In früheren Arbeiten konnte die durch Leukotrien vermittelte Aktivierung von Integrinen und damit die gesteigerte Adhäsion nur für ausgereifte Leukozyten wie zum Beispiel neutrophile und eosinophile Leukozyten gezeigt werden (Damtew et al., 1997; Fregonese et al., 2002; Friedrich et al., 2003; Nagata et al., 2002). Im Gegensatz dazu gelang es Böhmler et al. zu zeigen, dass auch primitive pluripotente Progenitoren nach Stimulation mit dem CysLT<sub>1</sub>-Liganden stärker adhärirten (Böhmler et al., 2009). Diese Ergebnisse decken sich mit Ergebnissen anderer Arbeiten, die sich mit regulierenden Effekten der Chemokine, wie zum Beispiel SDF-1, und ihrer Auswirkung auf die Integrin-vermittelte Adhäsion von Progenitorzellen befassten. Dabei kam es unter Stimulation mit SDF-1 ebenfalls sehr schnell und nur kurzzeitig zu einer gesteigerten Adhäsion von sowohl primitiven, als auch bereits determinierten Progenitorzellen (Hidalgo et al., 2001; Möhle et al., 1997). Unter Berücksichtigung dieser Daten ließen die weiteren Ergebnisse vermuten, dass LTD<sub>4</sub> über ähnliche inside-out Signal-Mechanismen funktioniert, es also zu einer Änderung der Integrin-Konformation kommt und somit das Integrin in einen aktivierten Zustand überführt wird.

Frühere Beobachtungen von Bautz et al. bestätigen, dass LTD<sub>4</sub> in humanen CD34<sup>+</sup> Zellen über einen G-Protein gekoppelten Signaltransduktionsweg wirkt (Bautz et al., 2001). Das Adhäsionsprotein Tyrosinkinase Pyk2 stellt einen Schlüsselregulator sowohl für inside-out als auch für outside-in Signalübermittlung der Integrine in myeloischen Zellen dar (Miura et al., 2000). Bei diesem Protein kam es nach CysLT<sub>1</sub> Aktivierung zur Phosphorylierung,

weshalb es eine besondere Rolle in der Leukotrien vermittelten Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen spielen könnte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie mittels Inhibition mit verschiedenen CysLT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten die LTD<sub>4</sub> induzierte Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen gehemmt werden kann. Der Effekt von LTD<sub>4</sub> auf die Adhäsion HPC an HUVEC konnte durch den CysLT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten MK-571 ( $p < 0,01$  vs. LTD<sub>4</sub>) und LY171883 ( $p < 0,01$  vs. LTD<sub>4</sub>) signifikant gehemmt werden, was die Beteiligung von CysLT<sub>1</sub> demonstriert. Die Daten schließen auch eine mögliche Beteiligung von MRP1 bei der LTD<sub>4</sub> induzierten gesteigerten Adhäsion HPC aus, da nur MK-571 und nicht LY171883 ein MRP1-Inhibitor ist.

Unter PTX ( $p < 0,05$  vs. LTD<sub>4</sub>) kam es nur teilweise zur Inhibition LTD<sub>4</sub> induzierter Adhäsion HPC an HUVEC. Ein Grund dafür könnte sein, dass CysLT<sub>1</sub> sowohl mit PTX-empfindlichen (zum Beispiel G<sub>i</sub>) als auch mit PTX-unempfindlichen (zum Beispiel G<sub>q</sub>) G-Proteinen interagiert. Im Gegensatz dazu überträgt der Chemokinrezeptor CXCR4 nur G<sub>i</sub> vermittelte Signale.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die Tyrosinkinase bei der CysLT<sub>1</sub> vermittelten Signaltransduktion, die zur Adhäsion von HPC an HUVEC führt eine Rolle spielt. Genistein, ein spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor, inhibierte die Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen an HUVEC signifikant ( $p < 0,01$  vs. LTD<sub>4</sub>). Auch bei Herbimycin A ließ sich eine moderate Inhibition der adhärenen Zellen nachweisen, allerdings zeigte sich keine Signifikanz. Daidzein, die eigentliche Negativkontrolle von Genistein, die eigentlich kein Tyrosinkinaseinhibitor ist, zeigte ebenfalls eine signifikant verringerte Adhäsion der hämatopoetischen Zellen an HUVEC ( $p < 0,05$  vs. LTD<sub>4</sub>). Genistein und Daidzein haben also einen ähnlich hemmenden Effekt auf die Adhäsion CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Progenitorzellen. Somit können unspezifische Effekte nicht eindeutig ausgeschlossen werden, weshalb nicht sicher bewiesen werden kann, ob der Effekt von Genistein auf der Inhibition der Tyrosinkinase beruht oder

unspezifisch ist. Demzufolge kann also auch nicht eindeutig bewiesen werden, ob die Tyrosinkinase bei der Signaltransduktion involviert ist.

Aber auch die spezifische Inhibition des MEK/ERK/MAPK Signalwegs hemmte die LTD<sub>4</sub> induzierte Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen. So kam es durch Inhibition mittels des MEK/ERK/MAPK Inhibitors PD98059 ebenfalls zu einer signifikant ( $p < 0,05$  vs. LTD<sub>4</sub>) verringerten Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen an HUVEC, was wiederum zeigt, dass MAPK an der CysLT<sub>1</sub> Signaltransduktion beteiligt ist. Der ERK/2-abhängige Signalweg könnte aber nicht nur bei der unmittelbar durch CysLT<sub>1</sub> vermittelten Signaltransduktion, sondern auch später bei der Aktivierung Integrin-vermittelter Adhäsion mitwirken. Eine ähnliche Rolle des ERK1/2 Signalwegs bei der Integrin-abhängigen Adhäsion wurde bei reifen hämatopoetischen, wie zum Beispiel den eosinophilen Zellen beschrieben (Zhu et al., 2002).

#### **4.2.2 Proliferation**

Auf Grund unterschiedlicher Arbeiten wurde angenommen, dass in in vitro-Systemen Leukotriene die Zellproliferation mononukleärer Zellen stimulieren können (Miller et al., 1986; Stenke et al., 1993). Da man für diese Versuche allerdings unseparierte Zellen verwendete, blieb unklar, ob die proliferativen Effekte direkt von hämatopoetischen Zellen vermittelt wurden, oder aber indirekt von reifen Leukozyten. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, zu der die hier dargestellten Ergebnisse beitragen zeigen, dass LTD<sub>4</sub> in Anwesenheit verschiedener Zytokine und in Abhängigkeit von der Dosis der Leukotriene die Proliferation hämatopoetischer CD34<sup>+</sup> HPC beeinflusst (Böhmler et al., 2009). Auf Grund der geringeren Rezeptoraffinität waren die durch LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> vermittelten Effekte wesentlich schwächer.

Viele Belege deuten auf eine Interaktion zwischen Lipidmediatoren und Peptiden, vor allem zwischen Leukotrienen und Zytokinen, wie zum Beispiel IL-3, hin (Boehmler et al., 2009). So kam es nur bei Zytokinkombinationen, die IL-3

enthielten zu einer besonders ausgeprägten Proliferationssteigerung von CD34<sup>+</sup> Zellen und einer gesteigerten Rezeptorexpression verschiedener Zelltypen (Denzlinger et al., 1993; Murakami et al., 1995), wie zum Beispiel den Monozyten, bzw. Makrophagen (Thivierge et al., 2001). Darüber hinaus führte eine Behandlung mit IL-3 bei Patienten zu einer Steigerung der endogenen Leukotrienproduktion (Denzlinger et al., 1993). Umgekehrt können Leukotriene die Zytokinproduktion beeinflussen, wie es für verschiedene Interleukine und den TNF gezeigt wurde (Gagnon et al., 1989; Mellor et al., 2002; Rola-Pleszczynski et al., 1992).

In früheren Studien konnte beobachtet werden, dass der stimulierende Effekt der Leukotriene auf myeloische Progenitorzellen nur in Anwesenheit von GM-CSF vorhanden war (Lindgren et al., 1993; Stenke et al., 1993). Die Rezeptoren für IL-3 und GM-CSF haben eine gleiche  $\beta$ -Untereinheit (Martinez-Moczygemba et al., 2003) und können deshalb ähnliche Signaltransduktionswege aktivieren. In dieser Arbeit wurden separierte CD34<sup>+</sup> Zellen verwendet. Der proliferative Effekt der Cysteinyl-Leukotriene auf hämatopoetische Progenitorzellen wurde somit vermutlich direkt durch den Rezeptor vermittelt, wobei allerdings auch die Stimulation autokriner Zytokinproduktion zur Proliferation HPC beigetragen haben könnte.

Die Produktion von Lipidmediatoren im Knochenmark konnte bereits in verschiedenen Studien festgestellt werden (Lindgren et al., 1993; Stenke et al., 1987; Stenke et al., 1991), allerdings blieb der genaue Ort der Herstellung der Cysteinyl-Leukotriene und ihre genaue Funktion im hämatopoetischen Mikroenvironment unbekannt. Böhmler et al. konnte zeigen, dass bestimmte Knochenmarkskomponenten, vor allem humane Knochenmarkstroma- und Endothelzellen, in der Lage sind, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> in biologisch signifikanter Menge herzustellen (Böhmler et al., 2009). Ein künstliches Kultursystem in vitro kann allerdings nicht mit in vivo Gewebe verglichen werden. Die Konzentration und Verteilung der Cysteinyl-Leukotriene im Mikroenvironment des Knochenmarks können deshalb unterschiedlich sein.

Analog dem Chemokin SDF-1, könnten auch die Leukotriene von Komponenten des Knochenmarkmikroenvironment produziert werden. Hierfür spricht die Beobachtung, dass Knochenmarkendothelzellen in der Lage sind Cysteinyl-Leukotriene zu bilden. In Anwesenheit von hämatopoetischen Zellen kommt es in einem Kulturüberstand allerdings zu einer Abnahme der Cysteinyl-Leukotriene. Die Tatsache, dass hämatopoetische Zellen die Menge an Leukotrienen in einem Kulturüberstand herunterregulieren unterstreicht noch einmal eine mögliche Rolle der Cysteinyl-Leukotriene als parakriner Mediator im hämatopoetischen Mikroenvironment (Böhmler et al., 2009).

So würde es zur Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen am Knochenmarkendothel und zur anschließenden chemotaktischen Migration durch die Stromatische kommen, in der die hämatopoetischen Stammzellen dann mit den Leukotrienen interagieren könnten. Das Fehlen hämatopoetischer Aktivität, beispielsweise während einer Knochenmarkaplasie, könnte dadurch zu einer gesteigerten Leukotrienproduktion der Stroma- und/oder Endothelzellen des Knochenmarks führen, was wiederum Adhäsion, Homing und Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen auslösen und somit einen negativen Feedback Mechanismus darstellen würde.

Außerdem kommt es unter einer Aplasie häufig zu Entzündungen, was zu einer erhöhten systemischen Konzentration an Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel den Cysteinyl-Leukotrienen führen kann. Dies wiederum könnte die auf den HPC exprimierten CysLT<sub>1</sub> Rezeptoren aktivieren. Befindet sich die Hämatopoese jedoch in einem Zustand des steady-states, ist die Konzentration an lokalen und systemischen Cysteinyl-Leukotrienen niedrig und trägt somit nicht signifikant zu der Funktion der Progenitorzellen bei. Dies könnte die Beobachtung erklären, dass die Behandlung mit einem CysLT<sub>1</sub> Antagonisten im Rahmen einer Asthmatherapie nicht zu einer Mobilisierung der Progenitorzellen führte (Böhmler et al., 2009). Im Gegensatz dazu kam es einige Stunden nach Verabreichung des CXCR4 Antagonisten AMD3100, zu einer deutlichen Steigerung der zirkulierenden CD34<sup>+</sup> HPC (Devine et al., 2008).

Leukotriene sind nicht die einzigen Lipidmediatoren die mittels, auf HPC exprimierten, GPCR agieren. Es wurde festgestellt, dass die Fettsäure Anandamid, die einen natürlichen Liganden des peripheren Cannabinoid-Rezeptors darstellt, als Wachstumsfaktor hämatopoetischer Zellen wirkt (Valk et al., 1997). Außerdem konnte in murinen Knochenmarkkulturen beobachtet werden, dass das Migrationsverhalten hämatopoetischer Progenitorzellen von dem Phospholipid Sphingosin 1-Phosphat abhängig ist (Yanai et al., 2000). So konnte die Expression des S1P-Rezeptors auf humanen HPC gezeigt werden. Die Aktivierung des S1PR führte sowohl in vitro als auch in vivo zu einem gesteigerten Homing primitiver CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> HPC (Kimura et al., 2004). Insgesamt spielen neben den Zytokinen und anderen Peptid-Verbindungen Cysteinyl-Leukotriene aber auch verschiedene andere Lipid-Mediatoren eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen HPC und anderen Komponenten des Knochenmark Mikroenvironments und modulieren somit Homing, Proliferation und Migration der hämatopoetischen Stammzellen.

### 4.3 Schlussfolgerung

Neben den bereits bekannten Auswirkungen von Zytokinen und Chemokinen auf Adhäsion, Migration und Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen konnte durch diese Arbeit vorherige Arbeiten von zum Beispiel Bautz et al. bestätigt werden. So ist der von HPC in aktiver Form exprimierte LTD<sub>4</sub>-Rezeptor CysLT<sub>1</sub> bei der Proliferation und Adhäsion von Bedeutung. Unter LTD<sub>4</sub>-Stimulation der CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen kam es zu einer signifikant gesteigerten Anzahl adhärenter Zellen. Bei den in vitro-Proliferationsversuchen zeigte sich ebenfalls eine gesteigerte Proliferation der HPC unter LTD<sub>4</sub>-Stimulation. Der Effekt von LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> war sowohl bei den Adhäsions-, als auch bei den Proliferationsversuchen wesentlich schwächer und zeigt somit, dass die Affinität dieser Leukotriene zu dem CysLT<sub>1</sub>-Rezeptor wesentlich geringer ist, woraus sich schließen lässt, dass LTD<sub>4</sub> der Hauptmediator für Progenitorzellen ist und als sehr potentes und zugleich



fragiles Cysteinyl-Leukotrien eine bedeutende Rolle im Mikromilieu spielt. Peptide und Lipidmediatoren agieren allerdings nicht nur separat. So sind zum Beispiel Interaktionen zwischen Zytokinen und Leukotrienen bekannt, die vermuten lassen dass es durch die Zytokine zu einer gesteigerten Leukotrien-Produktion und Rezeptorexpression kommt.

Durch verschiedene Tyrosinkinaseinhibitoren und CysLT<sub>1</sub>-Antagonisten konnte die Adhäsion CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Progenitorzellen signifikant reduziert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Signalkaskade der Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen verschiedene Rezeptoren und Signalwege von Bedeutung sind.

Sowohl die Inhibition des CysLT<sub>1</sub>-Rezeptor, der Tyrosinkinase als auch die spezifische Inhibition des MEK/ERK/MAPK Signalwegs führte zu einer verringerten Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen, sodass wir davon ausgehen können, dass diese Rezeptoren und Proteine bei der LTD4 induzierten Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen eine wichtige Funktion inne haben.

## 5 Zusammenfassung

Die Fähigkeit der Stammzellen das Knochenmark zu verlassen und es anschließend zielgerichtet wiederzubesiedeln, zu proliferieren und somit die Hämatopoese wiederherzustellen, stellt die Voraussetzung einer erfolgreichen Transplantation dar.

Im Gegensatz zu der bereits bekannten Rolle die hierbei Proteine und Peptide spielen, ist die Funktion von Lipidmediatoren noch nicht vollständig geklärt.

Bei den Cysteinyl-Leukotrienen handelt es sich um Lipidmediatoren, die über G-Protein gekoppelte Rezeptoren wirken. Besonders der CysLT<sub>1</sub>-Rezeptor, dessen Liganden Mediatoren der Leukotrienfamilie sind, wird von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert.

Um die Wirkung der Cysteinyl-Leukotriene zu untersuchen, wurde der CysLT<sub>1</sub>-Rezeptor mit verschiedenen Liganden (LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> und LTC<sub>4</sub>) in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. LTD<sub>4</sub> stellte sich als CysLT<sub>1</sub>-Ligand mit dem stärksten Effekt heraus. So kam es zu einer signifikanten Steigerung der adhärenen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen unter Stimulation mit LTD<sub>4</sub>. Der Effekt der anderen CysLT<sub>1</sub>-Liganden war sehr gering (LTC<sub>4</sub>), bzw. nicht vorhanden (LTE<sub>4</sub>).

Die durch Leukotrien induzierte Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen konnte in anschließenden Versuchen inhibiert werden. Hierbei zeigte sich die Beteiligung verschiedener Rezeptoren und Signalwege in der Signalkaskade der Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen. Durch Inhibition der Adhäsion mittels dem Tyrosinkinaseinhibitor Genistein konnte die mögliche Beteiligung der Proteinkinase gezeigt werden, wobei hier ein unspezifischer Effekt nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann. Verschiedene CysLT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten, wie Ly171883 oder MK-571 demonstrierten die Beteiligung des CysLT<sub>1</sub>-Rezeptors bei der LTD<sub>4</sub> induzierten Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen. Außerdem konnte durch PD98059 die

Beteiligung des MEK/ERK/MAPK Signalwegs an der CysLT<sub>1</sub> Signaltransduktion gezeigt werde.

In serumfreiem, mit hämatopoetischen Zytokinen angereichertem Medium konnte gezeigt werden, dass LTD<sub>4</sub> die Proliferation CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Zellen, abhängig von der Konzentration, deutlich steigert. Auch hier zeigten LTC<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> eine wesentlich geringere Wirkung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nicht nur Peptide wie Zytokine und Chemokine, sondern auch Lipidmediatoren, wie zum Beispiel die Leukotriene und somit der von CD34<sup>+</sup> HPC exprimierte CysLT<sub>1</sub> Rezeptor, sowohl bei der Adhäsion als auch bei der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen eine wichtige Rolle spielen.

## 6 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1. Hierarchisches Modell der Hämatopoese .....	2
Abbildung 2. Modell der transendothelialen Migration hämatopoetischer Progenitorzellen .....	14
Abbildung 3. IL-1 $\beta$ Stimulation der HUVEV .....	28
Abbildung 4. Dosiseffekt von LTD $_4$ auf die Adhäsion CD34 $^+$ HPC an HUVEC-Monolayer .....	30
Abbildung 5. Durch verschiedene Leukotriene induzierte Adhäsion CD34 $^+$ HPC an HUVEC-Monolayer .....	31
Abbildung 6. Effekt der CysLT $_1$ -Rezeptorantagonisten und PTX auf die Adhäsion der mit LTD $_4$ stimulierten CD34 $^+$ Zellen an HUVEC ...	33
Abbildung 7. Effekt der Tyrosinkinase- und MEK/ERK/MAPK- Inhibitoren auf die Adhäsion der mit LTD $_4$ stimulierten CD34 $^+$ Zellen an HUVEC .....	35
Abbildung 8. LTD $_4$ induzierte in vitro-Proliferation CD34 $^+$ HPC .....	37
Abbildung 9. Durch verschiedene Leukotriene induzierte in vitro-Proliferation CD34 $^+$ HPC .....	38

## 7 Literaturverzeichnis

Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. (1987): Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific kinases. *J. Biol. Chem.* 262:5592-5595.

Alessi D.R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D.T., Saltiel A.R. (2007): PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 2701:27489-27494.

Andrews R.G., Singer J.W., Bernstein I.D. (1986): Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 67:842-845.

Barnes N.C., Piper P.J., Costello J.F. (1984): Comparative actions of inhaled leukotriene C<sub>4</sub>, leukotriene D<sub>4</sub> and histamine in normal human subjects. *Thorax* 39:500-504.

Bautz F., Denzlinger C., Kanz L., Möhle R. (2001): Chemotaxis and transendothelial migration of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D<sub>4</sub> are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT<sub>1</sub>. *Blood* 97:3433-3440.

Berenson R.J., Andrews R.G., Bensinger W.I., Kalamasz D., Knitter G., Buckner C.D., Bernstein I.D. (1988): Antigen CD34<sup>+</sup> marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J. Clin. Invest.* 81:951-955.

Berger D.P., Engelhardt R., Mertelsmann R. (2006): Das Rote Buch. Hämatologie und Internistische Onkologie. 3. Auflage, ecomed Medizin Verlag Landsberg/Lech, S.342 ff.

Beyer J., Schwella N., Zingsem J., Strohscheer I., Schwaner I., Oettle H., Serke S., Huhn D., Stieger W. (1995): Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison. *J. Clin. Oncol.* 13:1328-1335.

Böhmler A.M., Drost A., Jaggy L., Seitz G., Wiesner T., Denzlinger C., Kanz L., Möhle R. (2009): The CysLT<sub>1</sub> ligand leukotriene D<sub>4</sub> supports  $\alpha_4\beta_1$ - and  $\alpha_5\beta_1$ -mediated adhesion and proliferation of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *The journal of Immunology* 182:6789-6798.

Brümmendorf T.H., Dragowska W., Lansdorp P.M. (1999): Asymmetric cell divisions in hematopoietic stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 872:265-272.

Busse W. W. (1998): Leukotrienes and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:S210-S213.

Butcher E.C., Picker L.J. (1996): Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60-66.

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

Capra V., Thompson M.D., Sala A., Cole D.E., Folco G., Rovati G.E. (2007). Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: Critical update and emerging trends. *Med. Res. Rev.* 27:469-527.

Carlos T.M., Harlan J.M. (1994): Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101.

Chan J.Y., Watt S.M. (2001): Adhesion receptors on haematopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* 112:541-557.

Civin C.I., Almeida-Porada G., Lee M.J., Olweus J., Terstappen L.W., Zanjani E.D. (1996): Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 88:4102-4109.

Civin C.I., Strauss L.C., Brovall C., Fackler M.J., Schwartz J.F., Shaper J.H. (1984): Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* 133:157-165.

Civin C.I., Trischmann T., Kadan N.S., Davis J., Noga S., Cohen K., Duffy B., Groenewegen I., Wiley J., Law P., Hardick A., Oldham F., Gee A. (1996): Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J. Clin. Oncol.* 14(8):2224-2233.

Christie P.E., Henderson W.R. (2002): Lipid inflammatory mediators: Leukotrienes, prostaglandins, platelet-activating factor. *Clin. Allergy Immunol.* 16: 233-254.

Claesson H.E., Dahlén S.E. (1999): Asthma and leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs. *Journal of Internal Medicine* 245(3):205-227.

Damtew B., Spagnuolo P.J. (1997): Leukotriene C<sub>4</sub> from vascular endothelium enhances neutrophil adhesiveness. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 56:111-116.

Dempke, W. (2006): Lehrbuch Hämato-Onkologie. Hämatologie-Onkologie-Hämostaseologie. 1. Auflage, Verlag Hans Huber Bern, S.44ff.

Denzlinger C. (1996): Biology and pathophysiology of leukotrienes. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 23:167-223.

Denzlinger C., Haberl C., Wilmanns W. (1995): Cysteinyl leukotriene production in anaphylactic reactions. *Int. Arch Allergy Immunol* 108:158-164.

Denzlinger C., Walther J., Wilmanns W., Gerhartz H.H. (1993): Interleukin-3 enhances the endogenous leukotriene production. *Blood* 81:2466-2468.

Devine S.M., Vij R., Rettig M., Todt L., McGlauchlen K., Fisher N., Devine H., Link D.C., Calandra G., Bridger G., Westervelt P., Dipersio J.F. (2008): Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood* 112:990-998.

Dexter T.M., Spooncer E. (1987): Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:432-441.

Drazen J.M., Austen J.M., Lewis R.A., Clark D.A., Goto G., Marfat A., Corey E.J. (1980): Comparative airway and vascular activity of leukotriene C-1 and D in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 77:4345-4358.

Dührsen U., Villeval J.L., Boyd J., Kannourakis G., Morstyn G., Metcalf D. (1988): Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 72:2074-2081.

Fregonese L., Silvestri M., Sabatini F., Rossi G.A. (2002): Cysteinyl leukotrienes induce human eosinophil locomotion and adhesion molecule expression via a CysLT<sub>1</sub> receptor-mediated mechanism. *Clin. Exp. Allergy* 32:745-750.

Frenette P.S., Subbarao S., Mazo I.B., von Andrian U.H., Wagner D.D. (1998): Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14423-14428.

Friedrich E.B., Tager A.M., Liu E., Pettersson A., Owman C., Munn L., Luster A.D., Gerszten R.E. (2003): Mechanisms of leukotriene B<sub>4</sub>-triggered monocyte adhesion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:1761-1767.

Fuchs E., Tumber T., Guasch G. (2004): Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116:769-778.

Fukazawa H., Li P.M., Yamamoto C., Murakami Y., Mizuno S., Uehara Y. (1991): Specific inhibition of cytoplasmic protein tyrosine kinases by herbimycin A in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 42:1661-1671.

Funk C.D. (2001): Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294(5548):1871-1875.

Gagnon L., Filion L.G., Dubois C., Rola-Pleszczynski M. (1989). Leukotrienes and macrophage activation: augmented cytotoxic activity and enhanced interleukin 1, tumor necrosis factor and hydrogen peroxide production. *Agents Actions* 26:141-147.

Gratwohl A., Baldomero H., Horisberger B., Schmid C., Passweg J., Urbano-Ispizua A. (2002): Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* 100:2374-2386.

Hartmann O., Le Corroller A.G., Blaise D., Michon J., Philip I., Norol F., Janvier M., Pico J.L., Baranzelli M.C., Rubie H., Coze C., Pinna A., Méresse V., Benhamou E. (1997): Peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for solid tumors and lymphomas: hematologic recovery and costs: a randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 126:600-607.

Heise C.E., O'Dowd B.F., Figueroa D.J., Sawyer N., Nguyen T., Im D.S., Stocco R., Bellefeuille J.N., Abramovitz M., Cheng R., Williams D.L.Jr., Zeng Z., Liu Q., Ma L., Clements M.K., Coulombe N., Liu Y., Austin C.P. George S.R., O'Neill G.P., Metters K.M., Lynch K.R., Evans J.F. (2000): Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J. Biol. Chem.* 275:30531-30536.

Hidalgo A., Sanz-Rodriguez F., Rodriguez-Fernandez J.L., Albella B., Blaya C., Wright N., Cabanas C., Prosper F., Gutierrez-Ramos J.C., Teixido J. (2001): Chemokine stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 29:345-355.

Hynes R.O. (1992): Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.

Jacobsen K., Kravitz J., Kincade P.W., Osmond D.G. (1996): Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and  $\gamma$ -irradiated mice. *Blood* 87:73-82.

Jiang Y., Borrelli L.A., Kanaoka Y., Bacskai B.J., Boyce J.A. (2007): CysLT2 receptors interact with CysLT1 receptors and down-modulate cysteinyl leukotriene dependent mitogenic responses of mast cells. *Blood* 110:3263-3270.

Jing Y., Waxman S. (1995): Structural requirement for differentiation-induction and growth-inhibition of mouse erythroleukemia cells by isoflavones. *Anticancer Res.* 15:1147-1152.

Kanaoka Y., Boyce J.A. (2004): Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J. Immunol.* 173:1503-1510.



Kimura T., Boehmler A.M., Seitz G., Kuçi S., Wiesner T., Brinkmann V., Kanz L., Mühle R. (2004): The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34<sup>+</sup> progenitor cells. *Blood* 103:4478-86.

Kopp H.G., Avecilla S.T., Hooper A.T., Rafii S. (2005): The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology* 20:349-356.

Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I., May W.S. (1996): CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87:1-13.

Lapidot T., Dar A., Kollet O. (2005): How do stem cells find their way home? *Blood* 106:1901-1910.

Lapidot T., Petit I. (2002): Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp. Hematol.* 30:973-981.

Lataillade J.J., Clay D., Dupuy C., Rigal S., Jasmin C., Bourin P., Bousse-Kerdilès M. (2000): Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34<sup>+</sup> cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* 95:756-768.

Liles W.C., Broxmeyer H.E., Rodger E., Wood B., Hubel K., Cooper S., Hangoc G., Bridger G.J., Henson G.W., Calandra G., Dale D.C. (2003): Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 102:2728-2730.

Lemischka I.R. (1997): Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 15:63-68.

Lindgren J. A., Stenke L., Mansour M., Edenius C., Lauren L., Nasman-Glaser B., Ericsson I., Reizenstein P. (1993): Formation and effects of leukotrienes and lipoxins in human bone marrow. *J. Lipid Mediat.* 6:313-320.

Liu F., Poursine-Laurent J., Link D.C. (1997): The granulocyte colony-stimulating factor receptor is required for the mobilization of murine hematopoietic progenitors into peripheral blood by cyclophosphamide or interleukin-8 but not flt-3 ligand. *Blood* 90:2522-2528.

Lynch K.R., O'Neill G.P., Liu Q., Im D.S., Sawyer N., Metters K.M., Coulombe N., Abramovitz M., Figueroa D.J., Zeng Z., Connolly B.M., Bai C., Austin C.P., Chateauneuf A., Stocco R., Greig G.M., Kargman S., Hooks S.B., Hosfield E., Williams D.L.Jr., Ford-Hutchinson, A.W., Caskey, C.T., Evans J.F. (1999): Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399:789-793.

Marom Z., Shelhamer J.H., Bach M.K., Morton D.R., Kaliner M. (1982): Slow-reacting substances, leukotriene C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub>, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:449-451.

Martinez-Moczygemba M., Huston D.P. (2003): Biology of common  $\beta$  receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:653-665.

Mazo I.B., Gutierrez-Ramos J.C., Frenette P.S., Hynes R.O., Wagner D.D., von Andrian U.H. (1998): Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: Parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 188:465-474.

Mazo I. B., von Andrian U.H. (1999): Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels. *J. Leukoc. Biol.* 66:25-32.

Mellor E.A., Austen K.F., Boyce J.A. (2002): Cysteinyl leukotrienes and uridine diphosphate induce cytokine generation by human mast cells through an interleukin 4-regulated pathway that is inhibited by leukotriene receptor antagonists. *J. Exp. Med.* 195:583-592.

Mellor E.A., Maekawa A., Austen K.F., Boyce J.A. (2001): Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinerbic receptor and is expressed by human mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7964-7969.

Miksicek R.J. (1994): Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with recombinant human estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 49:153-160.

Miller A.M., Weiner R.S., Ziboh V.A. (1986): Evidence for the role of leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> as essential intermediates in CSF-stimulated human myeloid colony formation. *Exp. Hematol.* 14:760-765.

Miura Y., Tohyama Y., Hishita T., Lala A., De Nardin E., Yoshida Y., Yamamura H., Uchiyama T., Tohyama K. (2000): Pyk2 and Syk participate in functional activation of granulocytic HL-60 cells in a different manner. *Blood* 96:1733-1739.

Morris A.J., Malbon C.C. (1999): Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol. Rev.* 79:1373-430.

Möhle R., Bautz F., Denzlinger C., Kanz L. (2001): Transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells. Role of chemotactic factors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 938:26-34.

Möhle R., Bautz F., Rafii S., Moore M.A., Brugger W., Kanz L. (1998): The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 91:4523-4530.

Möhle R., Bautz F., Rafii S., Moore M.A., Brugger W., Kanz L. (1999): Regulation of transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 872:176-185.

Möhle R., Boehmler A.M., Denzlinger C., Kanz L. (2003): Nonpeptide mediators in the hematopoietic microenvironment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 996:61-66.

Möhle R., Kanz L. (2007): Hematopoietic Growth Factors for Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Expansion. *Semin Hematol* 44:193-202.

Möhle R., Moore R.L., Nachman R.L., Rafii S. (1997): Transendothelial migration of CD34<sup>+</sup> and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line. *Blood* 89:72-80.

Murakami M., Austen K.F., Bingham C.O. 3<sup>rd</sup>, Friend D.S, Penrose J.F., Arm J.P. (1995): Interleukin-3 regulates development of the 5-lipoxygenase/leukotriene C<sub>4</sub> synthase pathway in mouse mast cells. *J. Biol. Chem.* 270:22653-22656.

Nagata M., Saito K., Tsuchiya K., Sakamoto Y. (2002): Leukotriene D<sub>4</sub> upregulates eosinophil adhesion via the cysteinyl leukotriene 1 receptor. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109:676-680.

Naiyer A.J., Jo D.Y., Ahn J., Möhle R., Peichev M., Lam G., Silverstein R.L., Moore M.A.S., Rafii S. (1999): Stromal derived factor-1-induced chemokinesis of cord blood CD34<sup>+</sup> cells (long-term culture-initiating cells) through endothelial cells is mediated by E-selectin. *Blood* 94:4011-4019.

Nothacker H.P., Wang Z., Zhu Y., Reinscheid R.K., Lin S.H., Civelli O.(2000): Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol. Pharmacol.* 58:1601-1608.

Ogawa M. (1993): Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81:2844-2853.

Passegué E., Jamieson C.H., Ailles L.E., Weissman I.L. (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1:11842-11849.

Peled A., Kollet O., Ponomaryov O., Petit I., Franitza S., Grabovsky V., Slav M.M., 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<sup>+</sup> cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95: 3289-3296.

Rasko J.E., Metcalf D., Rossner M.T., Begley C.G., Nicola N.A (1995): The flt3/flk-2 ligand: receptor distribution and action on murine haemopoietic cell survival and proliferation. *Leukemia* 9:2058-2066.

Reiss T.F., Altman L.C., Chervinsky P., Bewtra A., Stricker W.E., Noonan G.P., Kundu S., Zhang J. (1996): Effects of montelukast (MK-0476), a new potent cysteinyl leukotriene (LTD<sub>4</sub>) receptor antagonist, in patients with chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:528-534.

Renz-Polster H., Krautzig S. (2008): Basislehrbuch Innere Medizin. 4.Auflage, Urban & Fischer Verlag München Jena, S. 268ff.

Rola-Pleszczynski M., Stankova J. (1992): Leukotriene B<sub>4</sub> enhances interleukin-6 (IL-6) production and IL-6 messenger RNA accumulation in human monocytes in vitro: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Blood.* 80:1004-1011.

Samuelsson B. (1981): Leukotrienes: a novel group of compounds including SRS-A. *Prog. Lipid Res.* 20:23-30.

Sarau H.M., Ames R.S., Chambers J., Ellis C., Elshourbagy N., Foley J.J., Schmidt D.B, Muccitelli R.M., Jenkins O., Murdock P.R., Herrity N.C., Halsey W., Sathe G., Muir A.I., Nuthulaganti P., Dytko G.M., Buckley P.T., Wilson S., Bergsma D.J., Hay D.W. (1999): Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol. Pharmacol.* 56:657-663.

Schlessinger J. (2000): Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211-225.

Schweitzer K.M., Dräger A.M., van der Valk P., Thijsen S.F.T., Zevenbergen A., Theijssmeijer A.P., van der Schoot E., Langenhuijsen M.M.A.C. (1996): Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am. J. Pathol.* 148:165-175.

Stenke L., Lauren L., Reizenstein P., Lindgren J.A. (1987). Leukotriene production by fresh human bone marrow cells: evidence of altered lipoxygenase activity in chronic myelocytic leukemia. *Exp. Hematol.* 15:203-207.

Stenke L., Mansour M., Edenius C., Reizenstein P., Lindgren J.A. (1991): Formation and proliferative effects of lipoxins in human bone marrow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:255-261.

Stenke L., Mansour M., Reizenstein P., Lindgren J.A. (1993): Stimulation of human myelopoiesis by leukotrienes B<sub>4</sub> and C<sub>4</sub>: interactions with granulocytemacrophage colony-stimulating factor. *Blood* 81:352-356.

Tashiro K., Tada H., Heilker R., Shirozu M., Nakano T., Honjo T. (1993): Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261:600-603.

Tavassoli M. (1991). Embryonic and fetal hematopoiesis: an overview. *Blood Cells* 1:269-281.

Thivierge M., Stankova J., Rola-Pleszczynski M. (2001): IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 167:2855-2860.

To L.B., Haylock D.N., Simmons P.J., Juttner C.A. (1997): The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89: 2233-2258.

Turner A.M., Lin N.L., Issarachai S., Lyman S.D., Broudy V.C. (1996): FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood* 88:3383-3390.

Valk P., Verbakel S., Vankan Y., Hol S., Mancham S., Ploemacher R., Mayen A., Löwenberg B., Delwel R. (1997): Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells. *Blood* 90:1448-1457.

Van der Loo J.C., Xiao X., McMillin D., Hashino K., Kato I., Williams D.A. (1998): VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. *J. Clin. Invest.* 102:1051-1061.

Verfaillie C.M., Pera M.F., Lansdorp P.M. (2002): Stem cells: hype and reality. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*:369-391.

Vermeulen M., Le Pesteur F., Gagnerault M.C., Mary J.Y., Sainteny F., Lepault F. (1998): Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 92:894-900.

Watt S.M., Williamson J., Geneviev H., Fawcett J., Simmons D.L., Hatzfeld A., Nesbitt S.A., Coombe D.R. (1993): The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood* 82:2649-2663.

Whetton A.D., Graham G.J. (1999): Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biology* 9:233-238.

Xue X., Cai Z., Seitz G., Kanz L., Weisel K.C., Möhle R. (2007): Differential effects of G protein coupled receptors on hematopoietic progenitor cell growth depend on their signaling capacities. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1106:180-189.

Yahata T., Ando K., Sato T., Miyatake H., Nakamura Y., Muguruma Y., Kato S., Hotta T. (2003): A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 101: 2905-2913.

Yanai N., Matsui N., Furusawa T., Okubo T., Obinata M. (2000): Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid trigger invasion of primitive hematopoietic cells into stromal cell layers. *Blood* 96:139-144.

Yarden Y., Ullrich A. (1988): Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem.* 57:443-78.

Yin T., Li L. (2006): The stem cell niches in bone. *J. Clin. Invest.* 116:1195-1201.

Yoder M.C., Palis J. (2001): Ventral (yolk sac) hematopoiesis in the mouse. *In: Hematopoiesis: a developmental approach* (L. I. Zon, Hrsg.). Oxford University Press, New York; S. 180-191.

Young R.N. (2001): Discovery of montelukast: a once-a-day oral antagonist of leukotriene D4 for the treatment of chronic asthma. *Prog. Med. Chem.* 38:249-277.

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

Zhu X., Jacobs B., Boetticher E., Myou S., Meliton A., Sano H., Lambertino A.T., Munoz N.M., Leff A.R. (2002): IL-5-induced integrin adhesion of human eosinophils caused by ERK1/2-mediated activation of cPLA2. *J. Leukocyte Biol.* 72:1046-1053.

## 8 Danksagung

*Ich danke...*

*... Professor Dr. Robert Möhle für die freundliche Bereitstellung des Themas, die sehr gute Betreuung und die hilfreichen Anmerkungen beim Verfassen der Dissertation;*

*Dr. Adriana Drohst für die tolle Einarbeitung und gute Betreuung im Labor, die vielen freundschaftlichen Aufmunterungen und ihre Geduld;*

*Sibylle Weng dafür, dass sie die viele gemeinsam im Labor verbrachte Stunden soviel angenehmer machte;*

*und schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen für all die Unterstützung besonders bei meiner Familie und bei Oli bedanken.*