

## **Dipl. Biol. Anja Köhler: Zusammenfassung der Diss. zum Thema: Intravital visualization of hematopoietic stem cell and neutrophil behavior in long bones of mice**

Hämatopoetische Stammzellen sind Vorläufer von allen im Blut vorkommenden Zellen und befinden sich vorwiegend im Knochenmark von Erwachsenen. Dort interagieren sie eng mit speziellen Knochenmarksbereichen, welche Stammzellnischen genannt werden. Diese Nischen erzeugen eine besondere Umgebung, welche die Stammzellteilung, Selbsterneuerung, Differenzierung, Mobilisierung und Wanderung von Stammzellen unterstützt. Im Knochenmark kann zwischen zwei verschiedenen Nischen differenziert werden, die so genannte endosteale Nische befindet sich nah an der Knocheninnerseite und unterstützt eher die Ruhe der Stammzellen. Die zweite Nische befindet sich an Gefäßen und wird vaskuläre Nische genannt. Diese erzeugt vorwiegend eine Umgebung in der die Stammzellen aktiver sind und sich zum Beispiel vermehrt teilen. Je älter Stammzellen, bzw. ihre Spender werden desto verminderter ist ihre Fähigkeit zur Hämatopoese, was bedeutet, dass ihre Teilungsfähigkeit eingeschränkt und somit die Blutbildung in älteren Individuen verringert ist. Kürzlich wurde die Theorie aufgestellt, dass die verminderte Hämatopoese der Stammzellen die Konsequenz einer veränderten Wechselwirkung mit der Stammzellnische sein könnte. Mit einer neu entwickelten Methode der 2-Photonen Mikroskopie wurde die Beweglichkeit und die räumliche Anordnung von jungen und alten hämatopoetischen Stammzellen in den Röhrenknochen von Mäusen analysiert, um mögliche Veränderungen in den Wechselwirkungen zwischen Nische und Stammzellen aufzudecken wobei der Focus auf die endosteale Nische gelegt wurde. Bis jetzt wurde intravitale Mikroskopie von hämatopoetischen Stammzellen ausschließlich in einem kleinen Knochenmarksareal im Schädeldach von Mäusen durchgeführt, obwohl inzwischen bekannt ist, dass dieses Gebiet nur eingeschränkte hämatopoetische Aktivität aufweist und dass die Stammzellen aus dieser Quelle nicht die gleichen Fähigkeiten besitzen wie Stammzellen aus Röhrenknochen.

In den durchgeführten Experimenten wurden gefunden, dass transplantierte hämatopoetische Vorläuferzellen und frühe hämatopoetische Vorläuferzellen in den Röhrenknochen komplett unbeweglich sind. Stattdessen zeigen sie eine ständige Bewegung ihrer Zelloberfläche, die zwischen beiden Zelltypen unterschiedlich stark ausfällt. Darüber hinaus wurden hämatopoetische Vorläuferzellen und frühe hämatopoetische Vorläuferzellen aus jungen und alten Mäusen isoliert und bezüglich Unterschieden in ihrer Beweglichkeit und ihrer Lage in den Röhrenknochen untersucht. Frühe hämatopoetische Vorläuferzellen aus alten Tieren befinden sich im Vergleich zu Zellen aus junge Tieren weiter entfernt von der Innenseite des Röhrenknochens was gleichzeitig auch mit einer höheren Aktivität in den Bewegungen ihrer Zelloberfläche korreliert. Das deutet darauf hin, dass Zellen die sich nah an der Knocheninnenseite und somit näher an ihrer Nische befinden durch den Einfluss der Nische ruhiger gehalten werden, während Zellen die weiter von ihrer Nische entfernt sind diesen Einflüssen nicht mehr so stark ausgesetzt sind und dadurch möglicherweise eine größere Aktivität erlangen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die intravitale 2-Photonen Mikroskopie verwendet um das Verhalten von reifen, ausdifferenzierten Blutzellen in den Röhrenknochen der Maus zu untersuchen. Als Beispiel dafür wurden neutrophile Granulozyten verwendet. Neutrophile sind die am meisten vorhandenen und gleichzeitig

wahrscheinlich auch die wichtigsten weißen Blutkörperchen in Wirbeltieren. Ihr Fehlen oder eine Fehlfunktion dieser Zellen ist immer mit schweren Auswirkungen für die Gesundheit verbunden. Normalerweise zirkuliert eine relativ geringe Anzahl dieser Zellen durch den Körper. In gefährlichen Situationen, zum Beispiel im Falle einer Infektion kann jedoch eine riesige Anzahl von Neutrophilen innerhalb weniger Stunden aus dem Knochenmark freigesetzt werden, welche dann über den Blutfluss zur Infektionsstelle transportiert werden. Es ist bekannt, dass der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor G-CSF eine wichtige Rolle bei diesem Vorgang spielt. Darüber hinaus weiß man außerdem, dass eine einzige Injektion mit G-CSF zu einer starken Mobilisierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark in den Blutfluss führt. Obwohl rekombinantes G-CSF schon seit mehr als 20 Jahren in Kliniken verwendet wird um die Zahl von Neutrophilen in neutropenischen Patienten, welche zum Beispiel einer Chemotherapie unterzogen wurden rasch wieder zu erhöhen, ist der molekulare Mechanismus der hinter dieser Mobilisierung steht immer noch nicht bekannt.

Neutrophile in den Röhrenknochen von Mäusen zeigen sofort nach einer G-CSF Injektion einen sehr schnell einsetzenden und starken Anstieg ihrer Beweglichkeit. Allerdings gibt es Hinweise und auch von uns konnte gezeigt werden, dass Neutrophile nicht direkt auf G-CSF reagieren können. Dafür wurde in vielen Infektionsmodellen gefunden, dass die Chemokine KC and MIP-2 während der Infektion hoch reguliert werden und eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Neutrophilen zum Infektionsherd spielen. Diese Chemokine bilden einen Gradienten aus, dem die Neutrophilen mit Hilfe ihres Rezeptors CXCR2 folgen können und so zu der Infektionsstelle geführt werden. Megakaryozyten im Knochenmark konnten als die Zellen identifiziert werden, welche KC and MIP-2 bilden und beide Chemokine nach G-CSF Stimulation freisetzen. Durch Färbungen für den G-CSF Rezeptor in Knochenmarkshistologien konnten wir zeigen, dass Megakaryozyten keine G-CSF Rezeptoren besitzen und somit auch diese Zellen nicht direkt auf G-CSF reagieren können. Als Auslöser für die Freisetzung von KC and MIP-2 konnte schließlich Thrombopoietin identifiziert werden, welches als Hauptstimulus für Megakaryozyten bei der Bildung von Blutplättchen bekannt ist. Das Thrombopoietin scheint von einer Subpopulation von F4/80 positiven Makrophagen freigesetzt zu werden. Diese Population besitzt den G-CSF Rezeptor und in Zellkultur konnten wir zeigen, dass die Zellen nach Behandlung mit G-CSF fähig sind, Thrombopoietin zu produzieren. Ob diese Zellen allerdings wirklich maßgeblich in den Mobilisierungsprozess von Neutrophilen *in vivo* beteiligt sind muss in weiteren Untersuchungen noch verifiziert werden.