

# **Rainer Haas, Ralf Kronenwett, Guido Kobbe und Ulrich Steidl**

## **Adulte Blutstammzellen – Genetisches Programm und therapeutisches Potenzial**

### **Einleitung**

In unserem Beitrag zu diesem Jahrbuch möchten wir neben einem generellen Überblick zur aktuellen Stammzellforschung im Besonderen unsere Forschungsschwerpunkte auf diesem Sektor vorstellen. Dabei erlaubt die ontogenetische Betrachtung der Blutbildung ein besseres Verständnis der unterschiedlichen Formen von Stammzellen (Abb. 1). Am Anfang, nach der Verschmelzung einer Ei- und Samenzelle, entstehen die totipotenten embryonalen Stammzellen, die in die drei Keimblätter, das Ektoderm, Endoderm und Mesoderm, ausdifferenzieren. Ausgehend vom Mesoderm beginnt die Blutbildung beim Menschen in der dritten Embryonalwoche im Dottersack mit der Formation kleiner Blutzellinseln, aus denen Gefäßkapillaren und pluripotente Stammzellen entstehen. Durch Verschmelzung der Blutzellinseln zu einem kommunizierenden Netzwerk bildet sich das Gefäßsystem aus, das in die einzelnen Organanlagen einspricht. Zum Zeitpunkt der Entstehung hämatopoetischer Knospen in der fetalen Leber beginnt die erste ortsständige Blutbildung. Von dort migrieren Stammzellen in die Milz und ab der 20. Woche in das Osteoid der Knochenanlage, wo sich das Knochenmark entwickelt. Auch noch perinatal sind hämatopoetische Stammzellen auf Wanderschaft und lassen sich in hoher Konzentration in Nabelschnurvenenblut nachweisen. In ausreichender Menge gewonnen, lassen sich auch diese ersten adulten Blutstammzellen für eine Zelltherapie nutzen. Hierfür befindet sich am Düsseldorfer Universitätsklinikum im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika die größte europäische Nabelschnurblutbank, die Zellen weltweit an Transplantationszentren verschickt. Selbst beim Erwachsenen sind noch geringe Mengen an Blutstammzellen im peripheren Blut, in der Leber und in der Milz nachweisbar. So ließen sich nach orthotoper Lebertransplantation von verstorbenen allogenen Spendern bei den Empfängern CD34-Zellen des Spenders im Knochenmark nachweisen, was auf eine Übertragung von Blutstammzellen mit der Leber hinweist.<sup>1</sup> Auch bei bestimmten hämatologischen Erkrankungen, wie der Osteomyelofibrose, findet die Blutbildung wieder überwiegend in Leber und Milz statt, weil durch eine Überwucherung des Knochenmarks mit Bindegewebe eine normale Reifung von Blutzellen nicht mehr möglich ist.

### **Charakterisierung der adulten Stammzellen**

Hämatopoetische Stammzellen und deren nachgeordnete Vorläuferzellen lassen sich mit unterschiedlichen Methoden nachweisen. Bis Mitte der 1980er Jahre bediente man sich

---

<sup>1</sup> Vgl. Nierhoff *et al.* (2000).

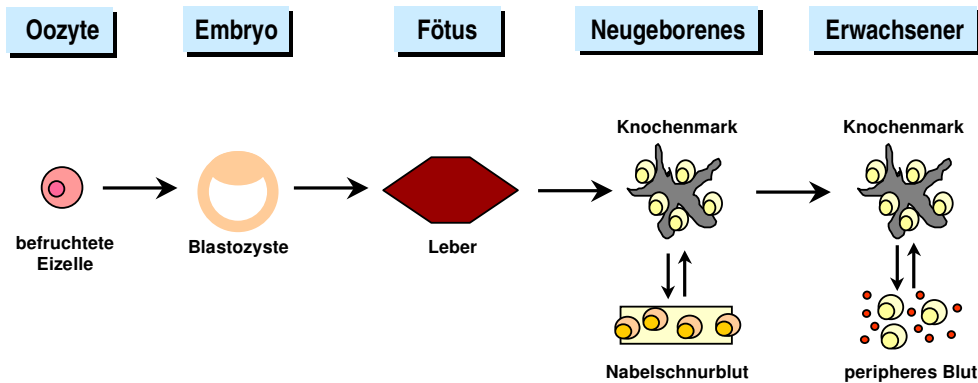


Abb. 1: Orte der Blutbildung während der Ontogenese.

semisolider Kulturassays, um die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut oder Knochenmark unter Zugabe von Wachstumsfaktoren in Methylzellulose oder Agar bei 37° C zu bebrüten. Unter diesen Kulturbedingungen entstehen nach zwei Wochen reife Blutzellkolonien, die sich aus einer einzigen Vorläuferzelle ableiten. Die Erstbeschreiber einer derartigen Kulturmethode für menschliche Vorläuferzellen waren Fauser und Messner (1978).

Eine entscheidende Verbesserung für die Transplantationsmedizin eröffnete die Möglichkeit, Blut bildende Stammzellen über das Oberflächenantigen CD34<sup>2</sup> zu bestimmen, das ansonsten nur noch auf Gefäßwandzellen anzutreffen ist. Bei dem CD34-Molekül handelt es sich um ein stark glykosiliertes, d. h. mit Kohlenhydratresten versehenes Oberflächenantigen mit einem Molekulargewicht von 115 kDa. Durchschnittlich tragen etwa 0,5 bis drei Prozent der mononukleären Zellen im Knochenmark das CD34-Antigen auf ihrer Zellmembran.

Die Population der hämatopoetischen CD34-Zellen ist sehr heterogen, und nur ein kleiner Teil der CD34-Zellen von ca. ein bis zwei Prozent sind frühe, pluripotente Stammzellen mit der Fähigkeit, alle Formen reifer Blutzellen zu bilden. Den größten Teil der CD34-Zellen stellen reifere, liniendeterminierte Vorläuferzellen dar, die in ihrer Entwicklung bereits auf eine bestimmte Zelllinie, wie z. B. die erythropoetische Reihe, beschränkt sind (Abb. 2). Über den immunzytologischen Nachweis einzelner gut charakterisierter Proteine auf der Oberfläche der CD34-Zellen lassen sich Linienzugehörigkeit und Entwicklungsstadium dieser Zellen definieren. Die pluripotenten CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen zeigen eine niedrige oder fehlende Expression des HLA-DR- und des CD38-Antigens und eine starke Expression des Thy-1-Antigens. Das Antigen-Profil der weiterentwickelten hämatopoetischen Vorläuferzellen ist durch eine starke Expression von CD38, HLA-DR und durch linienspezifische Marker charakterisiert. So findet sich CD33 beispielsweise auf CD34-Zellen, die in Granulozyten oder Monozyten ausreifen können, während CD71 für erythropoetische Vorläuferzellen typisch ist.

Mit Hilfe einer immunzytologischen „Drei-Farben-Analyse“ unter Einschluss des Thy-1-Antigens konnten wir zeigen, dass der Anteil pluripotenter CD34-Zellen innerhalb der im peripheren Blut zirkulierenden CD34-Zellen größer ist als innerhalb der CD34-Zellen

<sup>2</sup> Vgl. Civin *et al.* (1984).

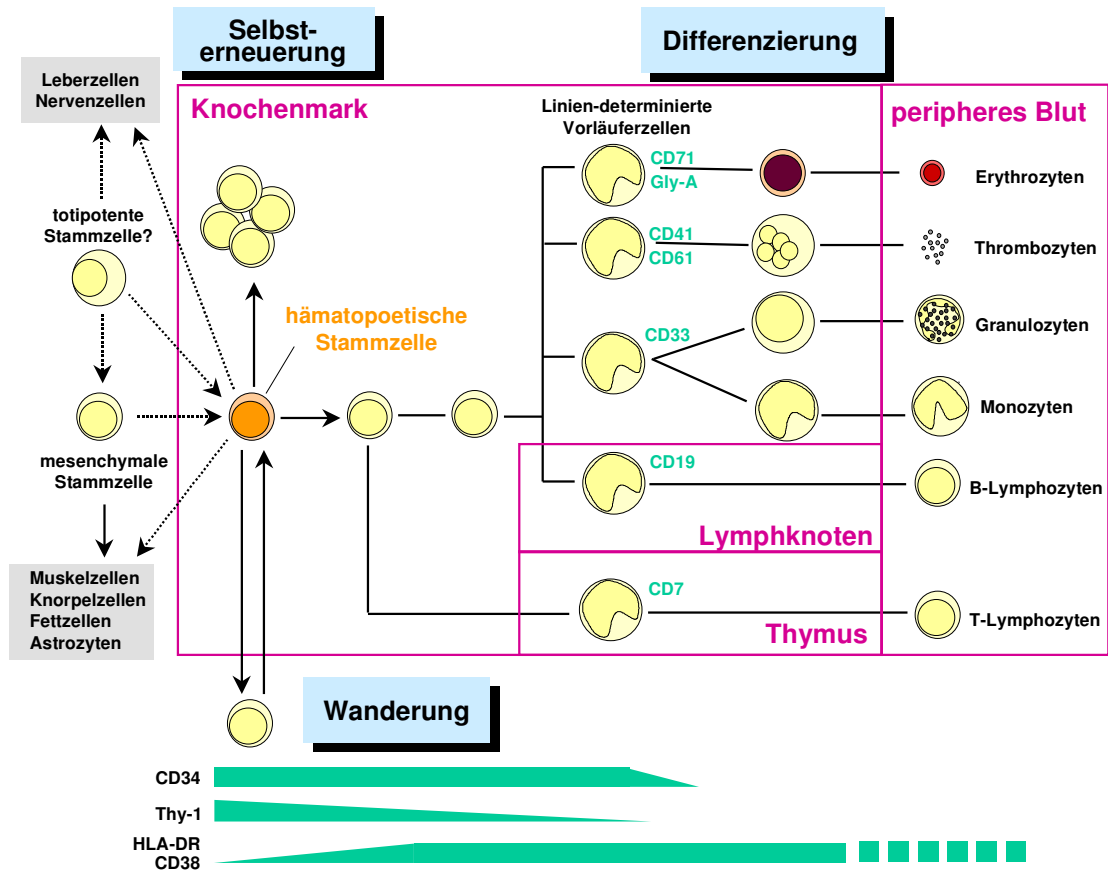


Abb. 2: Eigenschaften und Differenzierungswege hämatopoetischer Stammzellen. Die differenzierungsabhängige Expression der Oberflächenproteine CD34, Thy-1, HLA-DR und CD38 ist durch grüne Balken dargestellt. Die Dicke des jeweiligen Balkens spiegelt die Expressionsstärke wider. Gestrichelte Pfeile symbolisieren bisher nicht sicher nachgewiesene Differenzierungswege.

aus dem Knochenmark.<sup>3</sup> Diese Beobachtung erklärt möglicherweise die schnellere Rekonstitution der Blutbildung nach Transplantation von Stammzellen aus dem peripheren Blut im Vergleich zu Stammzellen aus dem Knochenmark.

Die Entdeckung des stammzellspezifischen CD34-Antigens ermöglicht auch eine immunmagnetische Anreicherung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark und peripheren Blut. Bei dem Verfahren werden CD34-positive Zellen nach Beladung mit eisengekoppelten Antikörpern mit Hilfe eines Magneten aus der mononukleären Zellfraktion isoliert. Somit war es möglich, CD34-Zellpräparate von einer Reinheit bis zu 98 Prozent für die autologe Transplantation zu verwenden.<sup>4</sup> Außerdem waren wir dadurch in der Lage, zell- und molekularbiologische Experimente mit angereicherten CD34-Zellen sowie Untersuchungen zum Transfer therapeutischer Nukleinsäuren durch virale und nicht-virale Vektorsysteme in CD34-Zellen durchzuführen.<sup>5</sup>

<sup>3</sup> Vgl. Haas *et al.* (1995a).

<sup>4</sup> Vgl. Hohaus *et al.* (1997).

<sup>5</sup> Vgl. Kronenwett *et al.* (1998) und Rohr *et al.* (2002).

## Migrationseigenschaften der adulten Stammzellen

Wir widmen uns nun dem Phänomen der Mobilität von hämatopoetischen Stammzellen, einer Eigenschaft, auf die wir bereits während unserer ontogenetischen Betrachtung gestoßen waren. Bei der Immuntypisierung von CD34-positiven Stammzellen aus dem Knochenmark und peripheren Blut zeigte sich sehr bald, dass die für Leukozytenmigration und -adhäsion verantwortlichen Selektine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie auch auf CD34-Zellen nachzuweisen sind. Die für die Wandereigenschaft der Leukozyten verantwortlichen Oberflächenstrukturen spielen offensichtlich auch bei der Mobilisierung und der Einnistung (*Homing*) von hämatopoetischen Stammzellen eine Rolle. Was verbirgt sich also hinter dieser Wandereigenschaft und der Möglichkeit, die Stammzellen zu mobilisieren?

Unter Ruhebedingungen, also im *steady state* der Hämatopoese, ist die Konzentration an Blut bildenden Stammzellen im Knochenmark etwa 10- bis 50fach höher als im peripheren Blut. In der Regenerationsphase nach einer Chemotherapie hingegen kommt es während der Leukozytenerholung zu einem Anstieg der im Blut zirkulierenden Stammzellen. Dieser überschießende Anstieg lässt sich durch Gabe hämatopoetischer Wachstumsfaktoren, wie z. B. den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), erhöhen, wodurch eine im Vergleich zur Ruhehämatopoese bis zu 400-mal höhere Konzentration an Vorläufer- und Stammzellen im peripheren Blut erzielt wird. Dieses auf dem Einsatz hämatopoetischer Wachstumsfaktoren fußende Mobilisierungsprinzip macht man sich bei der Gewinnung von Stammzellen für die autologe Transplantation bei Patienten mit malignen Erkrankungen der Blutbildung zunutze.<sup>6</sup> Auch durch die Gabe von G-CSF allein lassen sich bei gesunden Spendern ausreichende Mengen an Stammzellen für eine allogene Transplantation gewinnen.

Bei der Frage nach den Mechanismen der Stammzellmobilisierung stand das Adhäsionsmolekül VLA-4, das zur Gruppe der  $\beta$ 1-Integrine gehört, im Zentrum unseres Interesses. VLA-4 ist ein zweigliedriges Protein, das aus der  $\alpha$ 4- und der  $\beta$ 1-Kette besteht und dessen Bindungspartner das extrazelluläre Protein Fibronectin sowie das endotheliale Protein VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) sind. Wir konnten zeigen, dass wandernde CD34-Zellen im peripheren Blut weniger VLA-4 an ihrer Oberfläche tragen als ortsständige CD34-Zellen im Knochenmark.<sup>7</sup> Außerdem führte die Herunterregulation von VLA-4 auf CD34-Zellen durch Antisense-Oligonukleotide in der Zellkultur zu einer reduzierten Haftung an Gefäßwandzellen sowie zu einer Freisetzung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmarkstroma.<sup>8</sup> Die Freisetzung von CD34-Zellen und ihre Fähigkeit zu wandern wird also zumindest teilweise über die Expressionsstärke von VLA-4 reguliert, was durch Tierexperimente, die wir in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Zöller am Deutschen Krebsforschungszentrum durchführten, untermauert werden konnte. So ließ sich bei Mäusen durch systemische Gabe von Antikörpern gegen das VLA-4-Protein eine Mobilisierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark erreichen.<sup>9</sup> Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine andere Arbeitsgruppe bei

<sup>6</sup> Vgl. Haas *et al.* (1990) und Haas *et al.* (1995b).

<sup>7</sup> Vgl. Möhle *et al.* (1995).

<sup>8</sup> Vgl. Kronenwett und Haas (1998) und Kronenwett und Haas (2002).

<sup>9</sup> Vgl. Christ *et al.* (2001a).

Experimenten mit Affen,<sup>10</sup> während die Untersucher nach einer systemischen Gabe von VLA-4-Antikörpern eine Hemmung des Wiederanwachsens von Blutstammzellen nach Transplantation beobachteten. Diese Befunde sprechen ganz klar für eine Rolle von VLA-4 für die Mobilisierung und für das Einnisten einer Stammzelle im Knochenmark (Abb. 3).

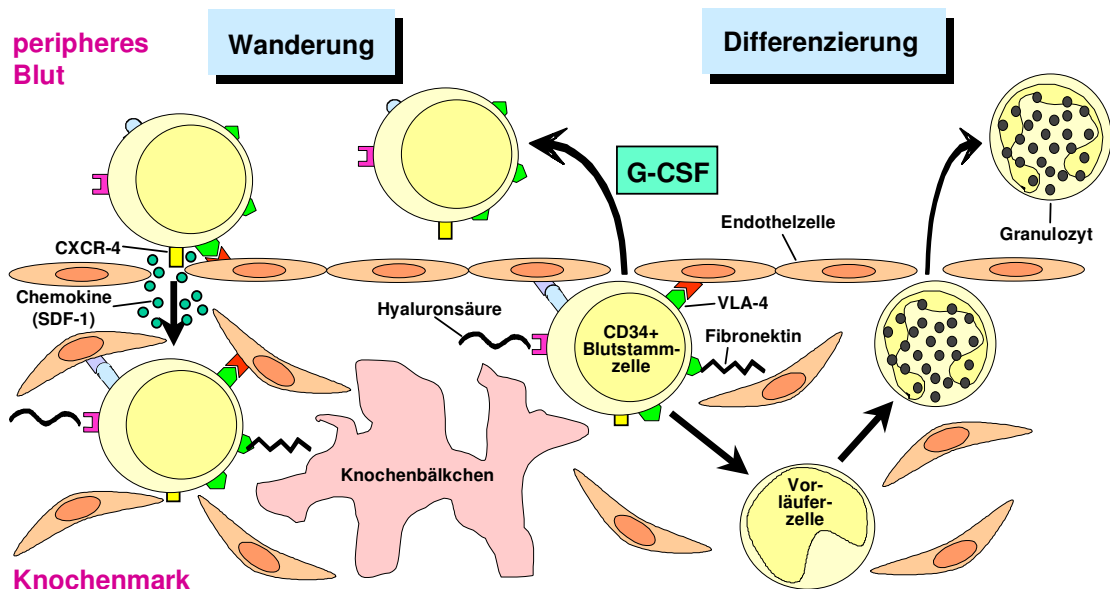


Abb. 3: Die Bedeutung des Knochenmarkstromas für die Differenzierung und Wanderung hämatopoetischer Stammzellen.

Da die Funktion von Integrinen wie des VLA-4 nicht nur über die Expressionsstärke, sondern auch über Veränderungen der Struktur reguliert wird, untersuchten wir den Aktivitätszustand von VLA-4 auf CD34-Zellen. Auf wandernden CD34-Zellen im peripheren Blut fanden wir VLA-4 in einem funktionell inaktiven Zustand, während es auf ortsständigen Zellen im Knochenmark seine volle Funktionsfähigkeit aufwies.<sup>11</sup> Somit wird die Mobilisierung von CD34-Zellen nicht nur durch die Expressionsstärke von VLA-4, sondern auch durch dessen Funktionszustand gesteuert. Auf der anderen Seite wird das *Homing* nach Transplantation durch direkten Kontakt der CD34-Zellen mit der Gefäßinnenwand über eine Aktivierung von VLA-4 eingeleitet.

Weitere Adhäsionsmoleküle, die eine Rolle für Migration und Blutbildung spielen, sind das Integrin LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*), L-Selektin und CD44.<sup>12</sup> So ließen sich bei Mäusen durch die Gabe von CD44-Antikörpern hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mobilisieren.<sup>13</sup> Die adhäsiven Wechselwirkungen zwischen Blutstammzellen und ihrer Umgebung ähneln also denen beim Einwandern von Leukozyten in Entzündungsherde,<sup>14</sup> was für gemeinsame molekulare Mechanismen bei der Wanderung von Leukozyten und Blutstammzellen spricht.

<sup>10</sup> Vgl. Papayannopoulou und Nakamoto (1993).

<sup>11</sup> Vgl. Lichterfeld *et al.* (2000).

<sup>12</sup> Vgl. Kronenwett *et al.* (2000), Möhle *et al.* (1995) und Christ *et al.* (2001b).

<sup>13</sup> Vgl. Christ *et al.* (2001b).

<sup>14</sup> Vgl. Steidl *et al.* (2000).

Darüber hinaus konnten wir 1997 erstmals die Expression von CXCR-4 auf hämatopoetischen Vorläuferzellen nachweisen.<sup>15</sup> Dabei handelt es sich um einen Chemokin-Rezeptor, dessen Wechselwirkung mit seinem Bindungspartner, dem SDF-1 (*stromal-derived factor-1*), eine Rolle für Migration und Blutbildung spielt (Abb. 3). Wir fanden außerdem eine entwicklungsabhängige CXCR-4-Expression auf CD34-Zellen, mit starker Expression auf reiferen CD38-positiven Vorläuferzellen, während frühe CD38-negative CD34-Zellen wenig CXCR-4-Expression aufwiesen.<sup>16</sup> Bis zur Entdeckung seiner Rolle für die Stammzellwanderung war CXCR-4 lediglich als Korezeptor neben CD4 für HIV-1 auf T-Lymphozyten bekannt. Der Nachweis von CXCR-4 auf CD34-Zellen war somit ein Hinweis darauf, dass auch hämatopoetische Stammzellen durch HIV-1 infiziert werden können.

Unsere neuesten Ergebnisse lassen vermuten, dass der Thrombinrezeptor, ein Molekül, das für die Wanderung von Monozyten eine Rolle spielt, auch an der Stammzellwanderung beteiligt ist. Wir fanden eine dreifach höhere Expression dieses Proteins auf wandernden CD34-Zellen als auf ortsständigen Zellen des Knochenmarks.<sup>17</sup> Möglicherweise lockt freies Thrombin, das bei der Blutgerinnung nach einer Verletzung gebildet wird, wandernde Blutstammzellen an den Ort eines Zellschadens.

## Genexpressionsanalyse von CD34-Zellen aus Knochenmark und peripherem Blut

Nach unserer bis dahin eher zellbiologisch und phänotypisch ausgerichteten Stammzellforschung war es an der Zeit, sich den Fragen nach den molekularen Mechanismen der Regulation von Selbsterneuerung, Differenzierung und Migration zu widmen. Zur Erforschung dieser Fragenkomplexe bedienten wir uns der cDNA-Array-Technologie, mit der es möglich ist, die Expression und damit die Aktivität mehrerer Tausend Gene gleichzeitig zu messen. In unseren Experimenten untersuchten wir immunmagnetisch angereicherte CD34-Zellen aus Knochenmark oder peripherem Blut.<sup>18</sup> Mit Hilfe dieser Technologie fanden wir in CD34-Zellen aus dem Knochenmark im Vergleich zu CD34-Zellen aus dem peripheren Blut eine höhere Expression von Genen, die für DNA-Synthese und Fortschreiten des Zellzyklus verantwortlich sind (Abb. 4 und 5). Beide Vorgänge sind entscheidende Voraussetzung für eine Zellvermehrung. Dieser molekulare Befund spiegelt die größere Zellzyklusaktivität ortsständiger hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen im Vergleich zu wandernden Zellen wider.

Neben den Zellzyklus-Kontrollgenen spielen die Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle bei der Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen. Bei unseren Genexpressionsanalysen mit den cDNA-Arrays fanden wir in wandernden CD34-Zellen die Hochregulation von neun Transkriptionsfaktoren, die hämatopoetische Zellen im undifferenzierten Stadium halten und eine Reifung verzögern können. Dieses molekulare Profil spiegelt die schon länger bekannte Tatsache wider, dass sich im peripheren Blut ein größerer Anteil an unreifen Blutstammzellen findet.<sup>19</sup>

<sup>15</sup> Vgl. Deichmann *et al.* (1997).

<sup>16</sup> Vgl. Viardot *et al.* (1998).

<sup>17</sup> Vgl. Steidl *et al.* (2002).

<sup>18</sup> Vgl. Steidl *et al.* (2002) und Steidl *et al.* (2003b).

<sup>19</sup> Vgl. Haas *et al.* (1995a).

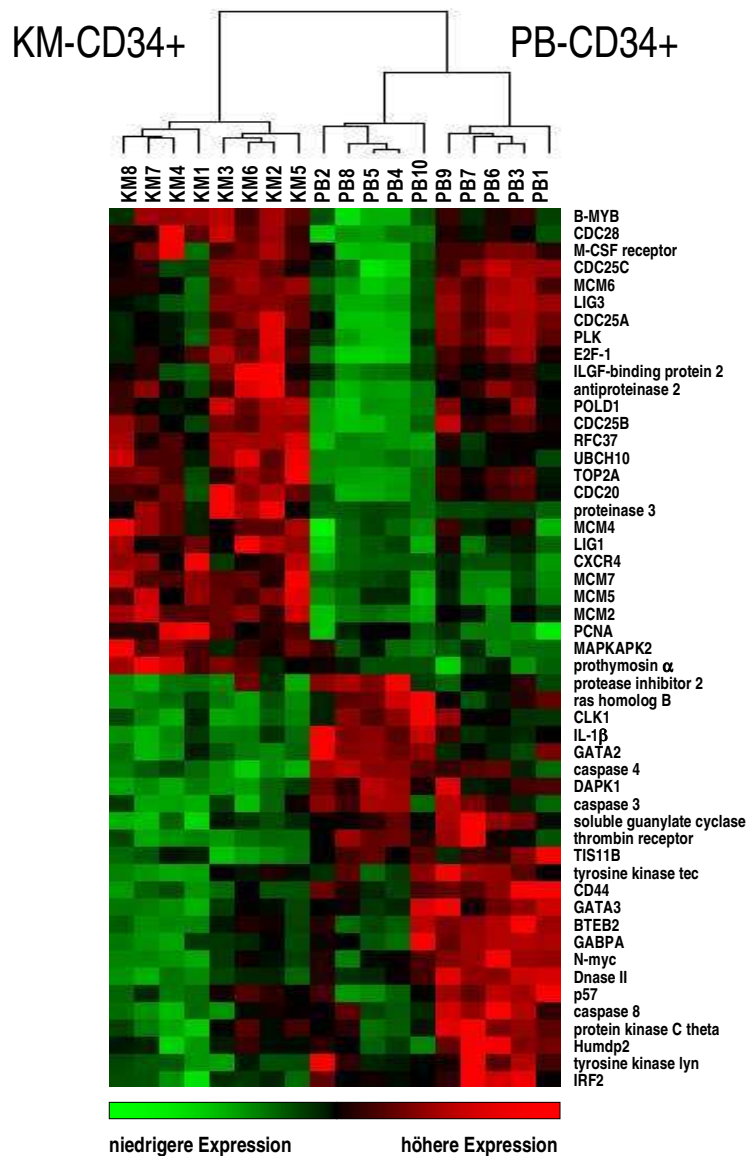


Abb. 4: Farbkodierte Genexpressionsprofile von CD34-Zellen aus Knochenmark (KM) und peripherem Blut (PB). Dargestellt sind Gene, die in beiden Gruppen unterschiedlich (differenziell) exprimiert werden. Die so genannte „Cluster-Analyse“ führt zur Erstellung eines Stammbaumes, der eine Unterscheidung zwischen KM-CD34-Zellen und PB-CD34-Zellen ermöglicht.

Somit können eher unreife, sich langsam teilende Blutstammzellen das Knochenmark verlassen, um sich in anderen Organen anzusiedeln.

In unseren Untersuchungen der Genexpressionsprofile von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen beobachteten wir auch erstmals auf menschlichen Blutstammzellen die Expression von Oberflächenproteinen, die bis dahin typischerweise nur im Nervensystem gefunden wurden.<sup>20</sup> Beispiele hierfür sind der so genannte GABA B- und der Ephrin A1-Rezeptor (Abb. 6). Diese Befunde veranlassten uns, spezialisierte cDNA-Arrays zu verwenden, mit denen man nach der Expression von Genen suchen kann, die bei neurobiologischen Funktionen eine Rolle spielen. Tatsächlich fanden wir noch zahlreiche

<sup>20</sup> Vgl. Steidl *et al.* (2002) und Steidl *et al.* (2003a).

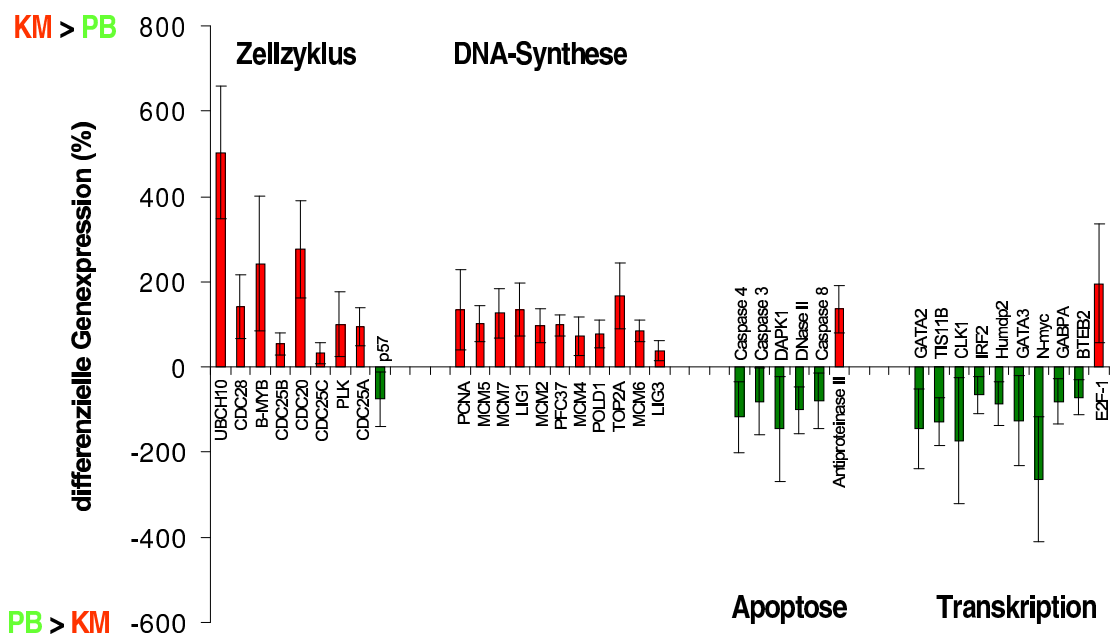


Abb. 5: Differenziell exprimierte Gene in CD34-Zellen aus dem peripheren Blut (PB) oder Knochenmark (KM). Die Gene sind nach funktionellen Gruppen sortiert.

weitere Gene, die bis dahin lediglich für Zellen des Nervensystems beschrieben wurden. So exprimieren humane CD34-Zellen zahlreiche neurobiologische Rezeptoren und Ionenkanäle, über die Spannungsänderungen an der Zellmembran gesteuert werden. Darüber hinaus waren Gene exprimiert, die für Proteine kodieren, die an der Bildung von intrazellulären Vesikeln für neurobiologische Signalstoffe beteiligt sind. Mit Hilfe von immunologischen Verfahren konnten wir die neurobiologischen Oberflächenrezeptoren auch auf Proteinebene und Einzelzellniveau nachweisen. Hierbei zeigten sich diese Rezeptoren bevorzugt auf unreifen CD34-Zellen, was für eine entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft zwischen hämatopoetischen und neuronalen Stammzellen spricht. Diese Vermutung wird durch eine Publikation unterstützt, in der die Entdeckung einer neuro-hämatopoetischen menschlichen Stammzelle beschrieben wird.<sup>21</sup>

Einige experimentelle Daten lassen vermuten, dass sich adulte hämatopoetische Stammzellen nicht nur in reife Blutzellen, sondern auch in reife Zellen anderer Gewebe, wie z. B. Herzmuskel oder Leber, entwickeln können – ein Phänomen, das als Transdifferenzierung bezeichnet wird.<sup>22</sup> So reiften im Mausmodell humane Knochenmarkszellen sowie angereicherte hämatopoetische Stammzellen in funktionsfähige Leberzellen aus. Des Weiteren entwickelten sich bei Mäusen Knochenmarkszellen in Herzmuskelzellen und verbesserten die Herzfunktion und die Überlebenswahrscheinlichkeit nach einem künstlich gesetztem Herzinfarkt. Auch die Transplantation von Knochenmark in verletzte Gehirne von Ratten führte zu einer im Vergleich zu Kontrolltieren verbesserten Wiederherstellung der Gehirnfunktion. Diese Ergebnisse wecken selbstverständlich Erwartungen mit Blick auf neue Zelltherapien mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark beim Menschen zur Behandlung des Herzinfarkts oder von Stoffwechselkrankheiten der Leber bzw. degenerati-

<sup>21</sup> Vgl. Shih *et al.* (2001).

<sup>22</sup> Vgl. zur Übersicht: Steidl *et al.* (2003a).

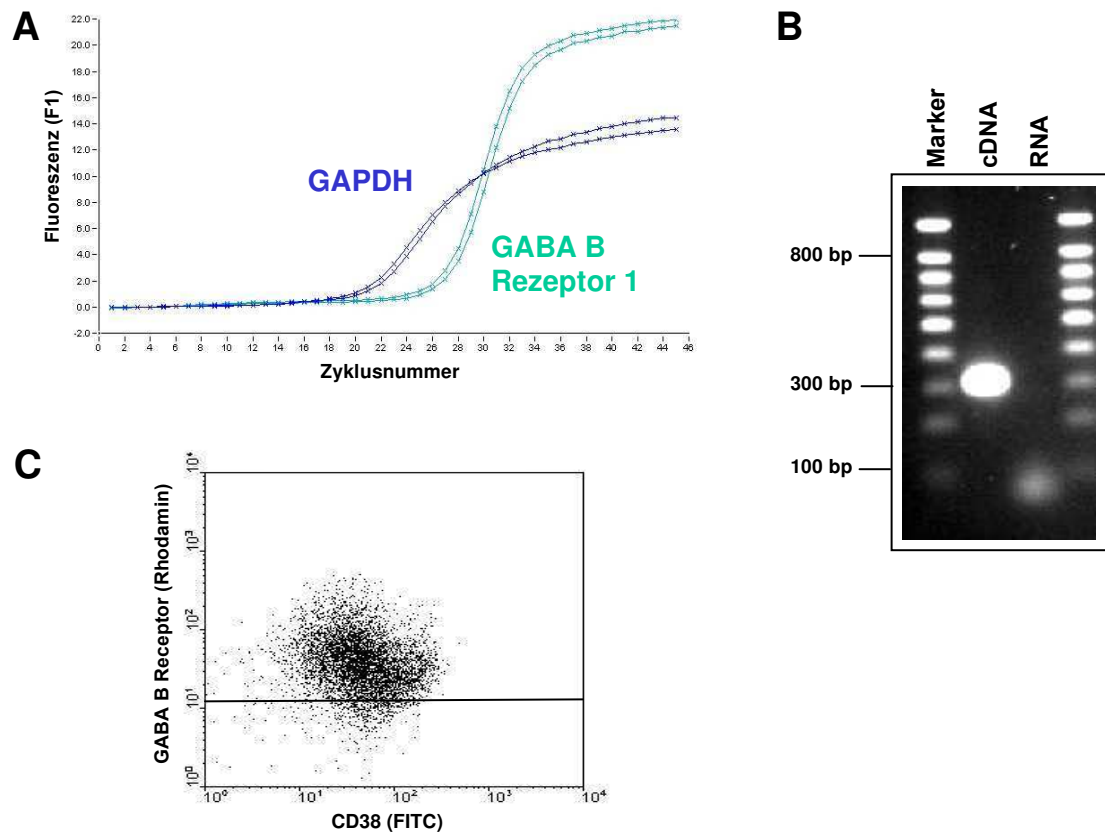


Abb. 6: Expression des GABA B-Rezeptors in CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. (A) Quantitativer Nachweis der GABA B-mRNA durch *real-time*-RT-PCR. (B) Nachweis der GABA B-mRNA durch qualitative RT-PCR. (C) Durchflusszytometrischer Nachweis der GABA B-Proteinexpression auf der Zelloberfläche durch indirekte Immunfluoreszenz. Stärkere GABA B-Expression fand sich auf unreifen CD34-Zellen mit niedriger CD38-Expression.

ven Erkrankungen des Nervensystems, wie z. B. M. Parkinson oder M. Alzheimer. Ergebnisse aus Publikationen des vergangenen Jahres stellen die Transdifferenzierungsfähigkeit von Blutstammzellen allerdings wieder in Frage. So wird möglicherweise eine Transdifferenzierung durch eine Fusion der Blutstammzelle mit einer reifen, gewebständigen Zelle vorgetäuscht.<sup>23</sup> Ein anderer Einwand ist, dass selbst in hochangereicherten CD34-Zellen eine CD34-negative pluripotente Stammzelle vorhanden sein kann, die sich in einen nicht-hämatopoetischen Gewebstyp differenzieren kann.

## Therapie mit adulten Stammzellen für Patienten mit bösartigen Erkrankungen des Blut bildenden Systems

Bei der klassischen Form der Transplantation, der allogenen Knochenmarktransplantation, erhält der Patient nach einer das Knochenmark und die bösartigen Zellen zerstörenden Hochdosistherapie Stammzellen aus dem Knochenmark oder – seit Anfang der 1990er Jahre – aus dem peripheren Blut eines passenden Geschwister-, Familien- oder Fremdspenders (Abb. 7). Grundlage für die Spenderauswahl ist die Gewebeverträglichkeit, die

<sup>23</sup> Vgl. Terada *et al.* (2002).

durch das Muster der Histokompatibilitäts-Leukozyten-Antigene (HLA) bestimmt wird. Bei der autologen Transplantation werden die hämatopoetischen Stammzellen des Patienten benutzt, die in der Remissionsphase entnommen und nach Einfrieren bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

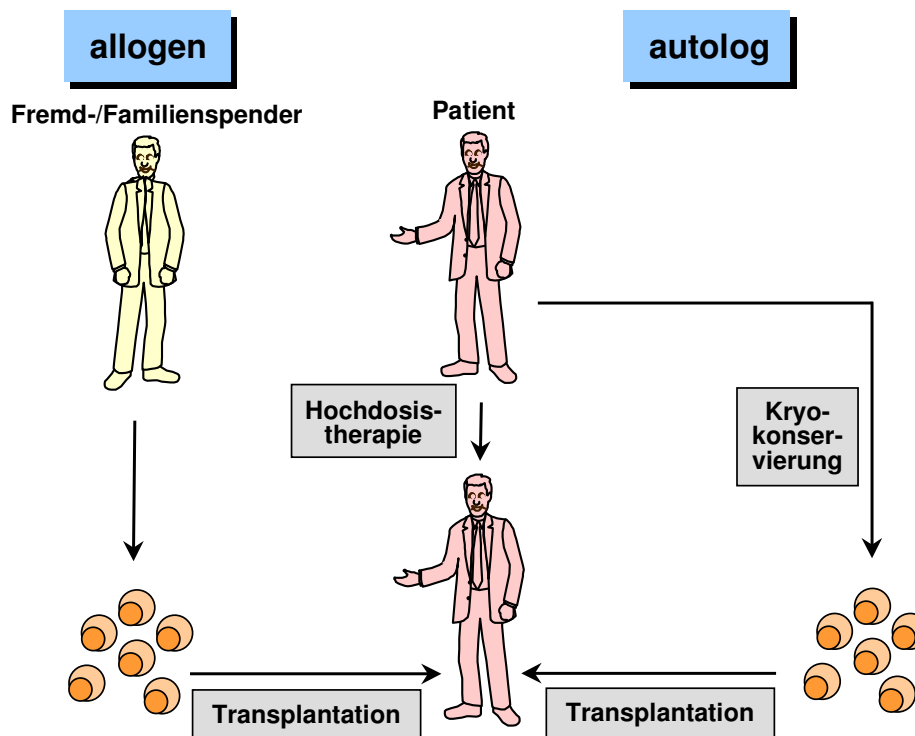


Abb. 7: Das Prinzip der allogenen und autologen Blutstammzelltransplantation.

Die Hochdosistherapie bei Patienten mit Leukämie, malignem Lymphom oder multiplen Myelom besteht zumeist aus einer Kombination von alkylierenden Substanzen wie Cyclophosphamid oder Melphalan mit oder ohne Ganzkörperbestrahlung. Diese Form von Hochdosistherapien führt zu einer völligen Zerstörung des Knochenmarks und gilt daher als myeloablativ. Eine autochthone Regeneration der Blutbildung aus überlebenden Stammzellen ist nach derartigen hochdosierten Therapien nicht möglich und macht für die Wiederherstellung der Blutbildung eine Transplantation mit normalen Stammzellen erforderlich.

Morbidität und Mortalität nach einer Hochdosisbehandlung und Stammzellübertragung hängen sehr stark von der Transplantationsart ab. Bei der autologen Knochenmarktransplantation sind insbesondere Infektionen gefürchtet, während bei der allogenen Transplantation vor allem die *Graft-versus-Host-Reaktion* (GvH, Transplantat-gegen-Wirt) das Spektrum der Komplikationen bestimmt. Diese pathologische Immunreaktion verläuft akut oder chronisch und wird in erster Linie durch zytotoxische T-Zellen des Spenders ausgelöst. Klinisch imponieren eine Schädigung der Haut, der Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes sowie der Leber. Gleichzeitig erhöht die GvH-Reaktion das Risiko einer Zytomegalievirus-Pneumonitis (ZMV-Pneumonitis).

Seit Beginn der Transplantationsära 1988 an unserer Klinik, als deren Wegbereiter der damalige Direktor der Klinik, Univ.-Prof. Dr. Schneider, und sein Oberarzt, Univ.-Prof. Dr. Heyll, zu nennen sind, wurden in Düsseldorf 300 allogene und 500 autologe

Transplantationen durchgeführt. Bei 88 Prozent der Transplantationen wurden Stammzellen verwendet, die aus dem peripheren Blut gewonnen wurden.

Zwei besonders innovative Transplantationsprojekte möchten wir Ihnen im Folgenden genauer vorstellen.

Da der Erfolg einer allogenen Transplantation ganz wesentlich auf die *Graft-versus-Leukaemia*-Reaktion (GvL, Transplantat-gegen-Leukämie) zurückzuführen ist, haben wir Patienten, die altersbedingt oder wegen schwerer Begleiterkrankungen für eine konventionelle Transplantation nicht in Frage kamen, mit einer dosisreduzierten Konditionierung behandelt.<sup>24</sup> Anschließend erhielten die Patienten periphere Blutstammzellen eines HLA-identischen Geschwister- oder Fremdspenders. Der Erfolg dieser so genannten nicht-myeoablatischen Transplantation spiegelt sich darin wider, dass während der ersten sechs Monate nach der Therapie trotz des hohen Risikos eines Rückfalles noch 60 Prozent der Patienten krankheitsfrei waren und die Rate an ernsten GvH-bedingten Komplikationen relativ gering war.

In einer weiteren klinischen Studie konnten wir zeigen, dass sich auch die Therapieergebnisse bei jungen Patienten nach einer myeloablatischen allogenen Transplantation verbessern lassen. Um das Ausmaß einer GvH-Reaktion zu mildern, benutzten wir nach der Hochdosistherapie CD34-Zellen, die durch immunmagnetische Anreicherung einen Reinheitsgrad von ca. 90 Prozent erreichten und somit nahezu frei von den für die GvH-Reaktion verantwortlichen zytotoxischen T-Zellen waren. Dadurch ließ sich die Rate an schweren akuten GvH-Erkrankungen signifikant auf 13 Prozent reduzieren. Um jedoch auch den durch die T-Zellen vermittelten GvL-Effekt zu nutzen, erhielten die Patienten abhängig vom individuellen Verlauf nach der Transplantation definierte Mengen an Sponderlymphozyten, die nicht nur gegen mögliche residuale Leukämiezellen gerichtet sind, sondern auch zu einer Stärkung der Infektabwehr beitragen.

## Ausblick

In der Zusammenschau lässt sich festhalten, dass hämatopoetische Stammzellen bei der Therapie hämatologischer Neoplasien eine zentrale Rolle einnehmen. Einige Studien lassen außerdem ein Entwicklungspotenzial vermuten, das weit über die Differenzierungsfähigkeit in reife Blutzellen hinausgeht. Falls sich diese Vermutungen bestätigten, böten sich neue Wege in der Behandlung degenerativer Erkrankungen unterschiedlicher Gewebe. Der Weg zu einer sicheren und zielgerichteten therapeutischen Nutzung adulter Blutstammzellen im Rahmen einer Zellersatztherapie ist dabei jedoch noch weit.

## Bibliographie

CHRIST, O., R. KRONENWETT, R. HAAS und M. ZÖLLER. „Combining G-CSF with a blockade of adhesion strongly improves the reconstitutive capacity of mobilized hematopoietic progenitor cells“, *Experimental Hematology* 29 (2001a), 380-390.

CHRIST, O., U. GÜNTHER, R. HAAS und M. ZÖLLER. „Importance of CD44v7 isoforms for homing and seeding of hematopoietic progenitor cells“, *Journal of Leukocyte Biology* 69 (2001b), 343-354.

---

<sup>24</sup> Vgl. Kobbe *et al.* (2002a) und Kobbe *et al.* (2002b).

- CIVIN, C. I., L. C. STRAUSS, C. BROVALL, M. J. FACKLER, J. F. SCHWARTZ und J. H. SHAPER. „Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells“, *Journal of Immunology* 133 (1984), 157-165.
- DEICHMANN, M., R. KRONENWETT und R. HAAS. „Expression of the Human Immunodeficiency Virus Type-1 Coreceptors CXCR-4 (fusin, LESTR) and CKR-5 in CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells“, *Blood* 89 (1997), 3522-3528.
- FAUSER A. A. und H. A. MESSNER. „Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood“, *Blood* 52 (1978), 1243-1248.
- HAAS, R., A. D. HO, U. BREDTHAUER, S. CAYEUX, G. EGERER, W. KNAUF und W. HUNSTEIN. „Successful autologous transplantation of blood stem cells mobilized with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“, *Experimental Hematology* 18 (1990), 94-98.
- HAAS, R., R. MÖHLE, M. PFÖRSICH, S. FRÜHAUF, B. WITT, H. GOLDSCHMIDT und W. HUNSTEIN. „Blood-derived autografts collected during G-CSF-enhanced recovery are enriched with early Thy-1+ hematopoietic progenitor cells“, *Blood* 85 (1995a), 1936-1943.
- HAAS, R., B. WITT, R. MÖHLE, H. GOLDSCHMIDT, S. HOHAUS, S. FRUEHAUF, M. WANNENMACHER und W. HUNSTEIN. „Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support“, *Blood* 85 (1995b), 3754-3761.
- HOHAUS, S., M. PFÖRSICH, S. MUREA, A. ABDALLAH, Y. S. LIN, L. FUNK, M. T. VOSO, S. KAUL, H. SCHMID, D. WALLWIENER und R. HAAS. „Immunomagnetic selection of CD34+ peripheral blood stem cells for autografting in patients with breast cancer“, *British Journal of Haematology* 97 (1997), 881-888.
- KOBBE, G., P. SCHNEIDER, M. AIVADO, F. ZOHREN, D. SCHUBERT, R. FENK, F. NEUMANN, R. KRONENWETT, H. PAPE, A. RONG, B. ROYER-POKORA, B. HILDEBRANDT, U. GERMING, N. GATTERMANN, A. HEYLL und R. HAAS. „Reliable engraftment, low toxicity and durable remissions following allogeneic blood stem cell transplantation with minimal conditioning“, *Experimental Hematology* 30 (2002a), 1346-1353.
- KOBBE, G., U. GERMING, M. AIVADO, F. ZOHREN, D. SCHUBERT, C. STRUPP, H. PAPE, G. TENDERICH, R. KORFER, R. STORB, R. HAAS und P. SCHNEIDER. „Treatment of secondary myelodysplastic syndrome after heart transplantation with chemotherapy and nonmyeloablative stem-cell transplantation“, *Transplantation* 74 (2002b), 1198-1200.
- KRONENWETT, R. und R. HAAS. „Antisense strategies for the treatment of hematological malignancies and solid tumors“, *Annals of Hematology* 77 (1998), 1-12.
- KRONENWETT, R., U. STEIDL, M. KIRSCH, G. SCZAKIEL und R. HAAS. „Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset“, *Blood* 91 (1998), 852-862.
- KRONENWETT, R., S. MARTIN und R. HAAS. „The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells“, *Stem Cells* 18 (2000), 320-330.
- KRONENWETT, R. und R. HAAS. „Adhesion Molecules as Targets for Novel Therapeutic Approaches Using Antisense Oligonucleotides“, in: W. SCHULTZE (Hrsg.). *High-Dose Therapy and Transplantation of Hematopoietic Stem Cells*. Berlin und Wien 2002, 132-139.
- LICHTERFELD, M., S. MARTIN, L. BURKLY, R. HAAS und R. KRONENWETT. „Mobilization of CD34+ haematopoietic stem cells is associated with a functional inactivation of the integrin very late antigen-4“, *British Journal of Haematology* 110 (2000), 71-81.

- MÖHLE, R., S. MUREA, M. KIRSCH und R. HAAS. „Differential expression of L-selection, VLA-4 and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery“, *Experimental Hematology* 23 (1995), 1535-1542.
- NIERHOFF, D., H. C. HORVATH, J. MYTILINEOS, M. GOLLING, O. BUD, E. KLAR, G. OPELZ, M. T. VOSO, A. D. HO, R. HAAS R und S. HOHAUS. „Microchimerism in bone marrow-derived CD34(+) cells of patients after liver transplantation“, *Blood* 96 (2000), 763-767.
- PAPAYANNOPOULOU, T. und B. NAKAMOTO. „Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin“, *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 90 (1993), 9374-9378.
- ROHR, U.-P., R. KRONENWETT, D. GRIMM, J. KLEINSCHMIDT und R. HAAS. „Primary human cells differ in their susceptibility to rAAV-2-mediated gene transfer and duration of reporter gene expression“, *Journal of Virological Methods* 105 (2002), 265-275.
- SHIH, C. C., Y. WENIG, A. MAMELAK, T. LEBON, M. C. HU und S. J. FORMAN. „Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population“, *Blood* 98 (2001), 2412-2422.
- STEIDL, U., R. HAAS and R. KRONENWETT. „ICAM-1 on monocytes mediates adhesion as well as transendothelial migration and can be downregulated using antisense oligonucleotides“, *Annals of Hematology* 79 (2000), 414-423.
- STEIDL, U., R. KRONENWETT, U.-P. ROHR, R. FENK, S. KLISZEWSKI, C. MAERCKER, P. NEUBERT, M. AIVADO, J. KOCH, O. MODLICH, H. BOJAR, N. GATTERMANN und R. HAAS. „Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells“, *Blood* 99 (2002), 2037-2044.
- STEIDL, U., R. KRONENWETT, S. MARTIN und R. HAAS. „Molecular biology of hematopoietic stem cells“, *Vitamines and Hormones* 66 (2003a), 1-28.
- STEIDL, U., R. KRONENWETT und R. HAAS. „Differential gene expression underlying the functional distinctions of primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells from peripheral blood and bone marrow“, *Annals of the New York Academy of Science* 996 (2003b), 1-12.
- TERADA, N., T. HAMAZAKI, M. OKA, M. HOKI, D. M. MASTALERZ, Y. NAKANO, E. M. MEYER, L. MOREL, B. E. PETERSEN und E. W. SCOTT. „Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion“, *Nature* 416 (2002), 542-545.
- VIARDOT, A., R. KRONENWETT, M. DEICHMANN und R. HAAS. „The human immunodeficiency virus (HIV) type-1 coreceptor CXCR-4 (fusin, LESTR) is preferentially expressed on the more immature CD34+ hematopoietic stem cells“, *Annals of Hematology* 77 (1998), 193-197.