

Received: 2007.03.01
Accepted: 2007.04.12
Published: 2007.06.13

Znaczenie interakcji między SDF-1 i CXCR4 w hematopoezie i mobilizacji macierzystych komórek hematopoetycznych do krwi obwodowej*

The role of the SDF-1-CXCR4 axis in hematopoiesis and the mobilization of hematopoietic stem cells to peripheral blood

Anna Giering, Katarzyna Bogunia-Kubik

Laboratorium i Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Postęp w dziedzinie transplantologii umożliwił znalezienie alternatywnego do szpiku i krwi pępowinowej źródła komórek macierzystych [62]. Udało się to, m.in. dzięki zastosowaniu czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF), który po podaniu dawcy działa jako czynnik mobilizujący komórki macierzyste ze szpiku do krwi obwodowej. Umożliwia to pozyskanie komórek progenitorowych z krwi obwodowej (PBPC). Proces mobilizacji komórek krwiotwórczych podlega regulacji wielu czynników oddziaływających w organizmie dawcy po podaniu G-CSF oraz podczas pobierania materiału przeszczepowego w procesie leukaferezy. Jednym z nich jest czynnik pochodzenia stromalnego 1 (SDF-1). SDF-1 jest chemokiną z grupy CXC (CXCL12) o szerokim zakresie działania, która wpływa na prawidłowy rozwój embrionu oraz na wiele procesów w dorosłym organizmie, w tym hematopoezy, która prowadzi do prawidłowego rozwoju komórek krwiotwórczych. Oddziaływania pomiędzy SDF-1 a jego receptorem CXCR4 wpływają na komórki macierzyste stanowiące materiał przeszczepowy. Podstawowym celem pracy jest przedstawienie wpływu SDF-1 na procesy krwiotwórcze oraz mobilizację. Oddziaływania między komórkami macierzystymi a ich otoczeniem są szczególnie ważne w całej procedurze przeszczepowej od chwili mobilizacji komórek krwiotwórczych w organizmie dawcy, poprzez leukaferezę, transplantację, zasiedlanie różnych organów po przeszczepieniu oraz podczas odnowy populacji komórek krwiotwórczych. Dlatego też, część pracy poświęcono roli, występujących na komórkach progenitorowych oraz komórkach podścieliska szpiku, molekuł adhezyjnych i ich współdziałaniu z SDF-1. Artykuł dotyczy tylko niewielkiego wycinka z całej problematyki transplantologii klinicznej. Jednakże mamy nadzieję, iż poznanie zależności między osią SDF-1-CXCR4 pozwoli na uwzględnienie tych relacji w protokole klinicznym w celu ulepszenia procedury transplantacyjnej (np. poprzez stosowanie antagonisty CXCR4 jako czynnika mobilizującego).

Słowa kluczowe:

SDF-1 • CXCR4 • hematopoeza • mobilizacja • PBPC

Summary

The treatment of donors with a granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces the mobilization of hematopoietic stem cells (HSCs) from the bone marrow to the blood circulation and

* Badania polimorfizmu genu SDF-1 finansowane były z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2PO5B 085 28).

guarantees a sufficient number of peripheral blood progenitor cells (PBPCs). This mobilization and leukopheresis are very complicated and unclear processes because of the relationships between many factors from outside and inside of the body in the course of GCS-F's action. One of these factors is stromal cell derived factor-1 (SDF-1, CXCL12), a member of the CXC chemokine family, which influences normal development of the embryo and directs many processes in mature organisms. This chemokine plays an important role in hematopoiesis leading to the normal development of hematopoietic cells. Interaction between SDF-1 and its receptor CXCR4 influences HSCs, which constitute a part of the transplantation material. This review describes SDF-1 and its effects on hematopoiesis and mobilization. Interactions between HSCs and their microenvironment are very important in all clinical transplantation procedures, starting from the mobilization of hematopoietic stem cells in donors to the process of leukopheresis and transplantation, and ending with the last step when the organism regenerates all HSC populations. For this reason, part of this article is dedicated to the role of adhesion molecules (present on the surface of stem cells, hematopoietic stem cells, and bone marrow cells) and SDF-1. This article deals with a small component of clinical transplantation. We hope that a deeper understanding of the SDF-1-CXCR4 axis will allow considering this relation in clinical practice to improve transplantation protocols (i.e. through the use of SDF-1-antagonist as a mobilization factor).

Key words: SDF-1 • CXCR4 • hematopoiesis • mobilization • PBPC

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10477.pdf

Word count: 5582

Tables: 3

Figures: 5

References: 111

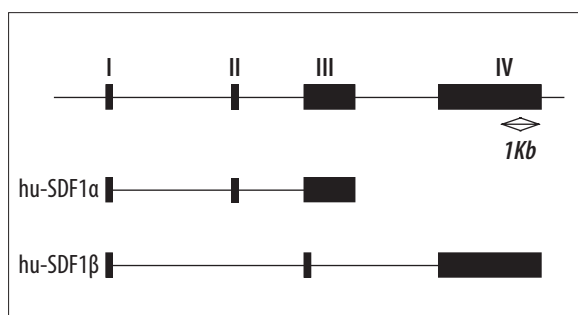
Adres autorki: mgr Anna Gieryng, Laboratorium i Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, im. Ludwika Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: gieryng@iitd.pan.wroc.pl

Hematopoeza jest procesem odpowiedzialnym za wytworzenie dojrzałych krwinek oraz innych składowych budujących układ krwionośny i odpornościowy. Nieprawidłowy rozwój komórek krwiotwórczych prowadzi do wielu chorób nowotworowych np. ostrej białaczki limfoblastycznej (acute lymphocytic leukemia – ALL), ostrej białaczki szpikowej (acute myeloid leukemia – AML), przewlekłej białaczki szpikowej (chronic myeloid leukemia – CML) oraz do chorób nienowotworowych, takich jak zaburzenia odporności, genetycznie uwarunkowane zaburzenia metabolizmu czy niedokrwistości aplastyczne. Jedną z metod leczenia tych chorób jest alotransplantacja komórek krwiotwórczych (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation – alloHSCt). Przeszczepianie komórek krwiotwórczych od dawcy jest złożonym procesem, a poszczególne jego elementy zależą od rozpoznania i zaawansowania choroby. Materiałem przeszczepowym jest zawiesina komórek zawierająca nieukierunkowane progenitory hematopoezy pobrane ze szpiku kostnego, krwi pępowinowej lub z krwi obwodowej po podaniu czynnika stymulującego powstawanie kolonii granulocytów (granulocyte colony stimulating factor – G-CSF). Po wprowadzeniu do organizmu komórki są zdolne do migracji do jam szpikowych i kontynuacji krwiotworzenia. Zastanawiające jest, w jaki sposób komórki ulegają migracji do krwi obwodowej ze szpiku po podaniu swoistych czynników mobilizujących oraz od czego zależy liczba komórek mobilizowanych do krwi. Również proces odwrotny do mobilizacji, tzw. homing, czyli zasiedlanie przeszczepionych komórek w jamach szpikowych, który odbywa się po transplantacji komórek krwiotwórczych, nie został do końca poznany i traktowany jest bar-

dzo ogólnie. Odpowiedzi na poszczególne pytania może dostarczyć przeanalizowanie hematopoezy u ssaków ze szczególnym uwzględnieniem roli czynnika pochodzenia stromalnego 1 (stromal cell derived factor 1 – SDF-1), reakcji tej chemokiny z jej receptorem, analiza immunofenotypu komórki krwiotwórczej oraz interakcji powierzchniowych molekuł adhezyjnych z wnętrzem szpiku kostnego. Badania dowodzą, że oddziaływania między SDF-1 i jego receptorem CXCR4 stanowią podstawę prawidłowego rozwoju podczas embriogenezy oraz odpowiadają za hematopoezę u zdrowych osobników i po przeszczepie u dorosłych myszy. Dane stanowią dowód na to, iż SDF-1 kieruje migracją i zasiedlaniem mysich komórek pierwotnych, a także kontroluje zakotwiczenie się odnawiających komórek pierwotnych w szpiku kostnym oraz wpływa na uwolnienie dojrzewających komórek do krwi obwodowej. Ostanie doniesienia Wrighta i wsp. przedstawiają jednoznacznie, iż komórki pierwotne u dorosłych myszy wykazują ekspresję CXCR4, a migracja odbywa się zgodnie z gradientem SDF-1 *in vitro* [109]. Procesy, w których SDF-1 odgrywa główną rolę są dodatkowo wspomagane i kontrolowane przez wiele różnych czynników, w tym molekuły adhezyjne. Poznanie ich znaczenia jest szczególnie ważne w procesach mobilizacji, zasiedlania, odnowy populacji w celu ulepszenia terapii poprzyszczepowej u pacjentów.

UDZIAŁ CHEMOKIN W HEMATOPOEZIE

Badając proces rozwoju komórek krwiotwórczych stwierdzono, że jest on zależny od wielu różnych chemokin i cytokin. Białka te mają wpływ nie tylko na komórki macierzy-



Ryc. 1. Struktura genu ludzkiego SDF-1. Diagram alternatywnego splicingu dla SDF-1 α i β

ste krwi i komórki progenitorowe, ale również na komórki pomocnicze, np. podścieliska. Chemokiny mają szeroki zakres działania, są odpowiedzialne m.in. za sekrecję, proliferację czy różnicowanie się komórek, stymulują reakcję przeżyciową a część z nich hamuje apoptozę [71,110].

Nazwa chemokiny pochodzi z języka angielskiego chemo-attractant cytokines (chemowabiące cytokiny) i nawiązuje do ich pierwotnie przypisanej funkcji chemoatraktantów. Chemokiny stanowią dużą rodzinę małowcząsteczkowych białek wydzielniczych, których aktywność jest związana z pobudzeniem swoistych dla nich receptorów błonowych [78,110]. Profil ekspresji tych receptorów decyduje o wrażliwości komórek na bodziec chemotaktyczny.

Na podstawie lokalizacji chromosomalnej genów kodujących chemokiny wyróżniono cztery podrodziny chemokin:

1. Chemokiny α są kodowane u człowieka w *locus* 4q12-21 chromosomu 4, stąd są również zwane rodziną chemokin 4q. Dwie pierwsze z czterech konserwatywnych reszt cysteinowych chemokin α są przedzielone pojedynczym aminokwasem. Dlatego powszechnie są opisywane jako CXC chemokiny.
2. Chemokiny β są kodowane na ludzkim chromosomie 17 w *locus* 17q11-32. Dwie pierwsze konserwatywne reszty cysteinowe następują bezpośrednio po sobie, dzięki czemu rodzinę tę objęto nazwą chemokin typu CC.
3. Chemokiny γ obejmują *locus* 1q23 chromosomu 1. Różnią się od pozostałych tym, że mają tylko dwie z czterech konserwatywnych cystein i są opisywane jako C chemokiny.
4. Chemokiny δ kodowane na 16 chromosomie mają trzy niekonserwatywne aminokwasy między dwiema pierwszymi resztami cysteinowymi i są nazywane chemokinami CX3C lub CXXXC. Białka te są transbłonowymi glikoproteinami z domeną chemokinową znajdującą się na szczycie wydłużonego łańcucha mucynopodobnego. W wyniku wewnątrzcytoplazmatycznej obróbki część chemokinowa jest odłączona i uwalniana w postaci rozpuszczalnej. Ta grupa chemokin jest wyjątkowo mała i obejmuje tylko jedną chemokinę CX3CL/fraktalkina.

SDF-1 (CXCL12)

SDF-1 (CXCL12) jest jednym z wielu czynników konstytutywnie [7] lub indukcyjnie wydzielanym przez komórki stromy szpiku (tabela 1). Podczas badań prowadzonych nad

wpływem czynnika wzrostu (G-CSF) na komórki krwiotwórcze oraz progenitorowe zauważono, iż jego obecność nie jest wystarczająca do prawidłowego rozwoju tych komórek. Badania te wykazały główną rolę czynnika pochodzenia stromalnego 1 (SDF-1) w procesach przeżyciowych. SDF-1 jest chemokiną z grupy CXC (CXCL12) wytwarzaną przez wieloskładnikowe komórki zrębu szpiku kostnego oraz komórki nabłonka różnych organów [33]. Jego ekspresję obserwowano w: trzustce, śledzionie, jajnikach, jelicie cienkim, niewielką ilość obserwowano w mózgu, lecz nie stwierdzono, aby SDF był wytwarzany przez obwodowe leukocyty [101]. SDF-1 jako pierwszy był identyfikowany w mysich komórkach stromalnych szpiku kostnego (ST-2). Ludzki SDF-1 wyizolowany został z komórek zrębu szpiku kostnego w 1993 r. [104], a rok później opisany przez Nagasawę jako czynnik odpowiedzialny za proliferację progenitorowych szpikowych komórek B w obecności interleukiny 7 (IL-7) przez Nagasawę [79,80]. SDF-1 odgrywa ważną rolę w neoangiogenezie poprzez zwiększanie wydzielania śródbłonowego naczyniowego czynnika wzrostu (vascular endothelial growth factor – VEGF) [72]. Ponadto Kryczek i wsp. wykazali, że pacjentki z rakiem jajnika charakteryzują się wzmożonym wydzielaniem SDF-1, a duże stężenie tej chemokiny indukuje angiogenezę *in vivo* nawet przy niewielkich ilościach VEGF [61]. SDF-1 wpływa również na enterotrombozę, jako potencjalny chemoatraktant monocytów i leukocytów, i wykazuje różne sposoby aktywacji płytek krwi [1]. Jest on bardzo efektywnym limfocytarnym i monocytarnym chemoatraktantem, konstytutywnie ekspresjonowanym o szerokim zakresie działania [9,80,101,104].

Badania nad organizacją ludzkiego genomu wykazały, że dwie postaci SDF-1 powstają podczas alternatywnego splicingu z tego samego pojedynczego genu (ryc. 1). SDF-1 α wykorzystuje pierwsze trzy eksony cDNA, podczas gdy SDF-1 β pierwszy i trzeci [7]. mRNA SDF-1 β zawiera 87 zasady trzeciego eksonu, które łączą się z eksonem czwartym (ryc. 1). W komórkach ilościowo przeważa mRNA SDF-1 α nad mRNA SDF-1 β .

Ludzki gen *SDF-1* zlokalizowano na chromosomie 10q11.1, podczas gdy geny kodujące inne chemokiny są umiejscowione na chromosomie 4q, co sugeruje wielokrotne tandemowe duplikacje pierwotnego genu CXC. Miejsce to znajduje się blisko protoonkogenu RET, który jest uważany za gen sprawczy gruczolakowatości hormonalnej typu A i B (multiple endocrine neoplasia types A, B), rdzeniowy rak tarczycy (medullary thyroid carcinoma) i choroby Hirschsprunga [32,38,52,68,76,93]. Genów innych chorób dziedzicznych nie zlokalizowano w pobliżu *locus* SDF-1.

Analiza sekwencji aminokwasowej SDF-1 między różnymi organizmami wykazała wysoką homologię i konserwatywność ewolucyjną, co jest kolejnym dowodem pełnienia ważnych funkcji w organizmie przez tę chemokinę. Homologia sekwencji aminokwasowej między modelem mysim a człowiekiem wynosi dla SDF-1 α 93% i dla SDF-1 β 92% (ryc. 2). Sekwencja aminokwasowa mysiego czynnika pochodzenia stromalnego 1 α i β jest identyczna w 89 resztach N-końca, ale różni się czterema dodatkowymi zasadami obecnymi na C-końcu postaci β . Shiroyu [101] w celu wizualizacji konserwatywności ewolucyjnej SDF-1 posłużył się metodą

human SDF1	-562	gagctctgccggcgtcgccccaagccggcgagcttgagccccacgcacagaaagcaggacccccggtgctct	
	-475	ggggccgaccgccagcggccctcccccgggactactgtttgcttttcattggttctcattcagttccgccatcgaaggccccgtccgcgac	
	-376	ttccacgcgcgccccattacgcctaagtcctcagctctccagttggggccctgtcacagggacaataagcgccctccagccgctcgtcag	
	-278	gctcggacctcactgcagaccggccagcggctgcggggcccagcggagcctgagaaggtcaaggccggagcgcactcgcctcggggagca	
	-186	cagagggagcggaggaggggcgaaggggatgggtggggggtgcccggggagtcgctcagagaccccgccacgtccagcactcgg	
	-95	ctccggggcccccctaccgcgcgcccgcccgccctgctctccctctaaagccccggcgcgctccaccgccgactttcac	
human SDF1 α/β	1 TCTCCGTCAGCCGCAATTGCCCGTCCGGCGTCCGGCCCCCGACCCGTGCT--CGTCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGCC	79
mouse SDF1 α/β		GACCAC-T---C---T---G---AC---T---TCTTG-T-T--A-CT--G-AG--T--G-G-----T-----A----	
human SDF1 α/β	80	ATG AAC GCC AAG GTC GTG GTC GTG CTG GTC CTC GTG CTG ACC GCG CTC TGC CTC AGC GAC GGG AAG CCC GTC AGC	154
	1	M N A K V V V V L V L V L T A L C L S D G K P V S	25
mouse SDF1 α/β	1	--- D --- --- --- --- C --- --- G --- --- A --- --- G --- --- --- I --- --- T --- --- T --- A --- A --- ---	25
human SDF1 α/β	155	CTG AGC TAC AGA TGC CCA TGC CGA TTC TTC GAA AGC CAT GTT GCC AGA GCC AAC GTC AAG CAT CTC AAA ATT CTC	229
	26	L S Y R C P C R F F E S H V A R A N V K H L K I L	50
mouse SDF1 α/β	26	--- --- --- C --- --- C --- --- G --- --- G --- --- C A-C --- --- --- --- --- --- G --- --- C ---	50
human SDF1 α/β	230	AAC ACT CCA AAC TGT GCC CTT CAG ATT GTA GCC CGG CTG AAG AAC AAC AAC AGA CAA GTG TGC ATT GAC CCG AAG	304
	51	N T P N C A L Q L V A R L K N N N K Q V C I D P K	75
mouse SDF1 α/β	51	--- --- --- --- --- --- --- --- --- T --- A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- A ---	75
human SDF1 α	305	CTA AAG TGG ATT CAG GAG TAC CTG GAG AAA GCT TTA AAC AAG TAA	349
	76	L K W I Q E Y L E K A L N K stop	89
mouse SDF1 α	76	T--- --- --- --C --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---	89
human SDF1 β	305	CTA AAG TGG ATT CAG GAG TAC CTG GAG AAA GCT TTA AAC AAG AGG TTC AAG ATG TGA	361
	76	L K W I Q E Y L E K A L N K R F K M stop	93
mouse SDF1 β	76	T--- --- --- --C --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- L --- --- --- C--- --- ---	93

Ryc. 2. Ludzka i mysia sekwencja nukleotydowa SDF-1 α i β cDNA oraz przewidziana sekwencja aminokwasów odpowiednich białek

hybrydyzacji, analizując sekwencje DNA królika, myszy, kurczaka i *Xenopus*. Analiza wykazała silny konserwatyzm nie tylko między człowiekiem a myszowatymi, ale również między niższymi organizmami. Sekwencja regionu kodującego SDF-1 α i β , a także dojrzały produkt jego ekspresji między człowiekiem a myszą są w przybliżeniu 90–97% identyczne (ryc. 2). Przez to możemy zaliczyć SDF-1 do wiaź rosnącej grupy czynników o konserwatywnie większym niż 90% między człowiekiem a myszą, do której należą: czynnik stymulujący proliferację β (transforming growth factor- β – TGF- β) – 96% homologii [55], neurotrofina 3 (neurotrophin-3 – NT3) – 95% [94] oraz czynnik stymulujący wzrost kodowany przez gen *fic* (growth factor-inducible gene – fic) – 99% homologii [46].

Dzięki spektroskopii MR ustalono trójwymiarową strukturę SDF-1. Jest to monomer z nieuporządkowanym regionem N-końca (1–8 zasad), który różni się od pozostałych chemokin sposobem ułożenia reszt hydrofobowych rdzenia i rozkładem ładunków powierzchniowych. Badania z analogami wykazały, iż jedynie osiem zasad N-końca tworzą miejsce wiązania receptora. Bezpośrednio z receptorem wiążą się Lys-1 i Pro-1, a ich modyfikacje prowadzą do utraty aktywności. Pozostałe 12–17 reszt pętli wiążącej określone są jako motyw RFFESH, który prawdopodobnie odpowiada za początkowe połączenie SDF-1 z receptorem [23]. Ten swoisty rozkład nukleotydów jest charakterystyczny dla genów gospodarza (tzw. housekeeping genes), które są zaliczane do najważniejszych genów

odpowiedzialnych za prawidłowy rozwój całego organizmu [100]. Gen *SDF-1* podobny jest do genów kodujących IL-8 [75], indukowane przez interferon białko 10 (interferon inducible protein 10 – IP-10) [67] i GRO α /MGSA [6] w liczbie eksonów (cztery eksony) i w długościach regionów kodujących. Analiza regionu 5' genu *SDF-1* wykazała, iż jest on bogaty w dupleksy CpG a ubogi w sekwencje TATA. Region bogaty w sekwencje CpG znajduje się w regionie 5'-nieulegającym translacji (5'UTR). Trzy sekwencje GC-box (-451 do -446; -87 do -82; -63 do -58) i jedna CAAT-box (-423 do -419) są odpowiedzialne za łączenie głównych czynników transkrypcyjnych SP1 i CTF [73]. Sekwencja miejsca łączenia czynników transkrypcyjnych jest ułożona w odwrotnej orientacji.

RECEPTORY WIĄŻĄCE SDF-1: CXCR4 I CXCR7

Receptory chemokin, podobnie jak same chemokiny, mimo dużej różnorodności, mają bardzo podobny schemat budowy i aktywacji. Tworzą siedem charakterystycznych pętli przenikających błonę komórkową, a wewnątrzcytoplazmatyczna część drugiej i trzeciej pętli jest związana z białkiem G. Związki między poszczególnymi receptorami są tworzone przez konserwatywne cysteiny, jedną w N-końcowej domenie, drugą w trzeciej zewnątrzkomórkowej pętli. Cysteiny są połączone mostkiem siarczkowym. Wiązanie to jest niezbędne w konformacji kieszeni wiążącej ligand. Dla receptorów chemokin CC przyjęto symbole CCR o odpowiednich kolejnych numerach, dla receptorów chemo-

kin CXC-CXCR, a dla chemokiny CX3C i limfocyty odpowiednio CX3CR1 oraz CXCR1.

Do niedawna uważano, że CXCR4 jest jedynym receptorem oddziaływającym z SDF-1 [58]. Tymczasem badania prowadzone nad czynnikiem pochodzenia stromalnego wykazały, że obie jego postaci, SDF-1 α i SDF-1 β , łączą się z dwoma typami receptorów wiążących chemokiny: CXCR4 i CXCR7 [7]. Oba receptory wykazują duże powinowactwo do SDF-1, receptor CXCR7 dodatkowo wiąże się z interferonem (I-TAC lub CXCL11), który jest α -chemoatraktantem komórek T [16]. Miejsce kodujące receptora CXCR7, nazywanego również RDC1, zostało zlokalizowane na chromosomie 1 u myszy i na ludzkim chromosomie 2, tak samo jak *locus* CXCR4. Receptor występuje na powierzchni limfocytów T, na aktywnych komórkach śródbłonna oraz na komórkach wątroby płodu [7,16]. Receptor CXCR7 ekspresjonowany jest na powierzchni wielu komórek nowotworowych, prawdopodobnie bierze udział w procesach nowotworzenia, wzrostu i adhezji. Receptor CXCR4 reguluje prawidłowym rozwojem neuronów, rozpoczyna rozwój serca, kontroluje angiogenezę, neoangiogenezę, apoptozę i migrację komórek macierzystych [16]. Obecne badania wskazują, iż receptor CXCR7 nie bierze udziału w procesie hematopoezy, w których główną rolę odgrywa CXCR4 i SDF-1.

Badając myszy z delecją genu *SDF-1* lub genu kodującego jego receptor wykazano, iż myszy pozbawione zarówno genu *SDF-1*, jak i genu jego swoistego receptora CXCR4 wykazują znaczne obniżenie liczby komórek macierzystych krwi w szpiku kostnym, co prowadzi do ich śmierci *in utero* [111].

CXCR4 początkowo nazywano w skrócie LESER lub „fusin”. Zidentyfikowany został na powierzchni większości populacji leukocytów, w tym limfocytów T, monocytów i komórek późniejszych [77]. W późniejszych latach rozpoznany został, jako jeden z głównych czynników wspomagających zakażenie T-troficznymi ludzkimi wirusami niedoboru odporności (human immunodeficiency virus-1, -2 – HIV-1, HIV-2) i fuzję otoczki tych wirusów z błoną komórkową limfocytów CD4⁺ [25,34]. Po odkryciu jego powinowactwa do SDF-1 został sklasyfikowany jako CXCR4. Analiza metodą Northern-blot oraz poznanie sekwencji wykazały, iż receptor ten ma dużo transkryptów różniących się między sobą pierwszymi dziewięćcioma aminokwasami na N-końcu, np. izoforma ludzkiego CXCR4-CXCR-Lo. Wydaje się, że CXCR-Lo ulega ekspresji na niższym poziomie w tkankach niż CXCR4, wyjątkiem są płuca i śledziona, gdzie jego mRNA osiąga wysoki poziom [43]. Niedawne badania wykazały, że receptor CXCR4 ulega ekspresji i jest funkcjonalny na: komórkach macierzystych krwi [50,85,95], wczesnych ukierunkowanych tkankowo komórkach macierzystych [90,91], komórkach zarodkowych [2], komórkach pigmentowych siatkówki [22], mięśniowych komórkach satelitarnych [91], wątrobowych komórkach owalnych [44], macierzystych komórkach nerwowych [9].

HEMATOPOEZA

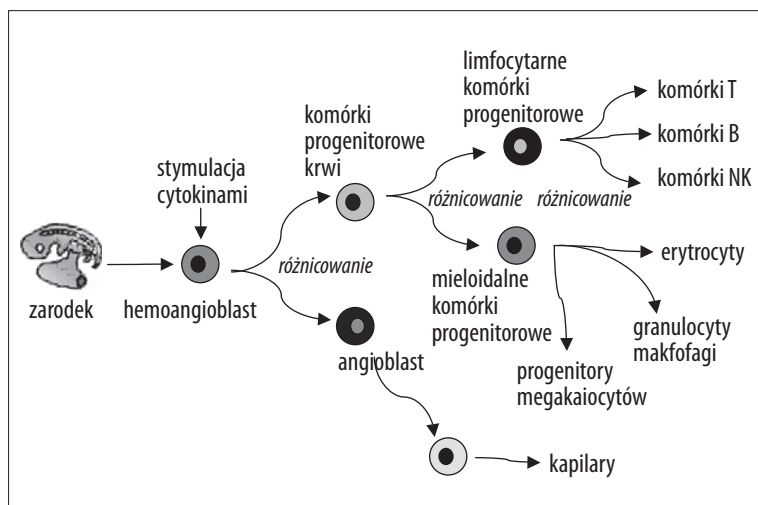
Przy omawianiu procesu hematopoezy trzeba rozróżnić proces budowy układu krążenia i tworzenia linii komórko-

wych krwi podczas embriogenezy od procesu hematopoezy i zasiedlania organów krwiotwórczych u dorosłego organizmu. Szczególnym przypadkiem dotyczącym procesu zasiedlania i odnowy linii komórek krwiotwórczych jest ich alo- i autotransplantacja. W wymienionych przypadkach komórki progenitorowe wykorzystują do zasiedlania szlak poprzez szpik kostny lub przez śledzionę [83,106].

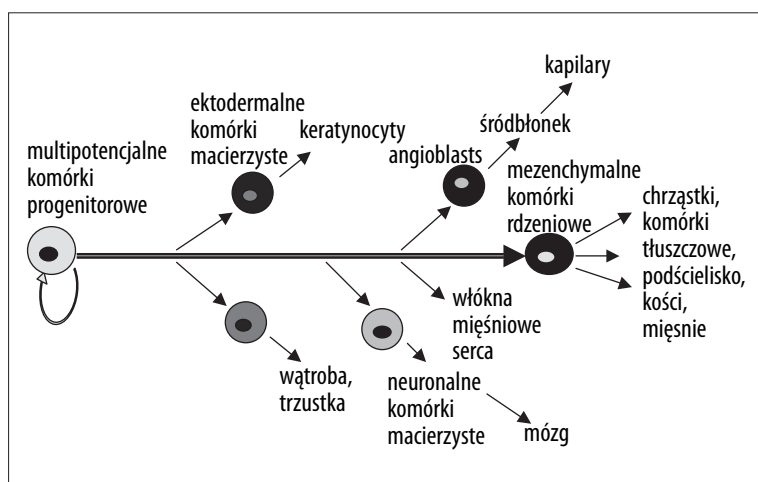
Proces budowy całego układu krwionośnego i odpornościowego, a także innych składowych różnych układów np. komórki dendrytyczne, rozpoczyna się na wczesnych etapach zarodkowych. Modelowe analizy procesu krwiotworzenia prowadzono na różnych organizmach. Dane wykazały, że hematopoeza u ssaków nie różni się znacząco od siebie, a najważniejsze etapy i czynniki nimi kierujące pokrywają się ze sobą. Informacje te stały się przyczyną szerokiego wykorzystania w badaniach nad tym procesem rodziny myszowatych i odnoszenia wyników do człowieka.

Układ krwionośny jest jedną z pochodnych mezodermy, która wchodzi w skład trzech listków zarodkowych. Komórki budujące układ krwionośny pochodzą z hemioangioblastu, który występuje w pęcherzyku żółtkowym, w nim wyróżniamy wyspy krwiotwórcze (blood island) oraz w regionie aorty gonado-pranerczy (aorta-gonad-mesonephros – AGM) i przy aorcie trzewiowo-opłucnej (para-aortic splanchnopleura) zarodka. Hemioangioblast dzieli się tworząc dwie linie komórkowe: linie angioblastu oraz linie komórek hematopoetycznych krwi (HSC). Z komórek angioblastu powstaje śródbłonek, którego dalszy rozwój prowadzi do wytworzenia naczyń krwionośnych (ryc. 3A). Powstawanie komórek krwi jest związane z rozwojem drugiej linii komórkowej – HSC [74]. Komórki hemioangioblastu w okresie mezoblastycznym hematopoezy przekształcają się w pierwotne komórki macierzyste krwi. Powstające z nich hemocytoblasty dają początek linii erytroblastycznej, mezoblastycznej, megakarioblastycznej i limfoblastycznej [10]. Komórki macierzyste krwi między 6. a 12. tygodniem (okres wątrobowy) migrują do wątroby i śledziony. W narządach tych powstają wszystkie rodzaje krwinek. W 16. tygodniu ciąży powstaje szpik kostny. W szpiku komórki krwiotwórcze odtwarzają wysoki poziom dojrzewających komórek krwi, które powtórnie zostają uwolnione do krwi, jednakże zawsze utrzymywana jest mała pula komórek niezróżnicowanych (ryc. 3B). W śledzionie i wątrobie procesy te zanikają [82].

Po urodzeniu główne postacie komórek pierwotnych krwi są przechowywane w szpiku kostnym oraz w niewielkiej liczbie występują w krwi obwodowej [63]. Szpik buduje wiele różnych linii zróżnicowanych komórek progenitorowych, wszystkie pochodzą od niezróżnicowanej komórki progenitorowej (mezenchymalnej), która ma nieskończoną zdolność samoodnowy, jak i podziałów. Wymienione komórki wraz z komórkami hematopoetycznymi, adherentnymi komórkami podścieliska o pochodzeniu niehematopoetycznym oraz z macierzą międzykomórkową tworzą mikrośrodowisko szpiku kostnego (podścielisko). Mikrośrodowisko krwiotwórcze w szpiku kostnym u zdrowego pacjenta budują komórki hematopoetyczne i niehematopoetyczne komórki zrębu szpiku, które biosyntetyzują zewnątrzkomórkowe produkty i hematopoetyczne cytokiny [20]. W skład podścieliska wchodzi: komórki śródbłonna, makrofagi, komórki tłuszczowe, fibroblasty, komórki odpowiedzialne za



Ryc. 3A. Migracja i rozwój komórek progenitorowych krwi podczas embriogenezy



Ryc. 3B. Podział i rozwój multipotencjalnej progenitorowej komórki w szpiku dorosłego osobnika

osteogenezę oraz progenitorowe komórki mezenchymalne [11]. Wymieniony wyżej układ ma na celu odnowę linii komórkowych, tkanek, różnych organów.

IDENTYFIKACJA KOMÓREK PROGENITOROWYCH KRWI (EKSPRESJA ANTYGENU CD34)

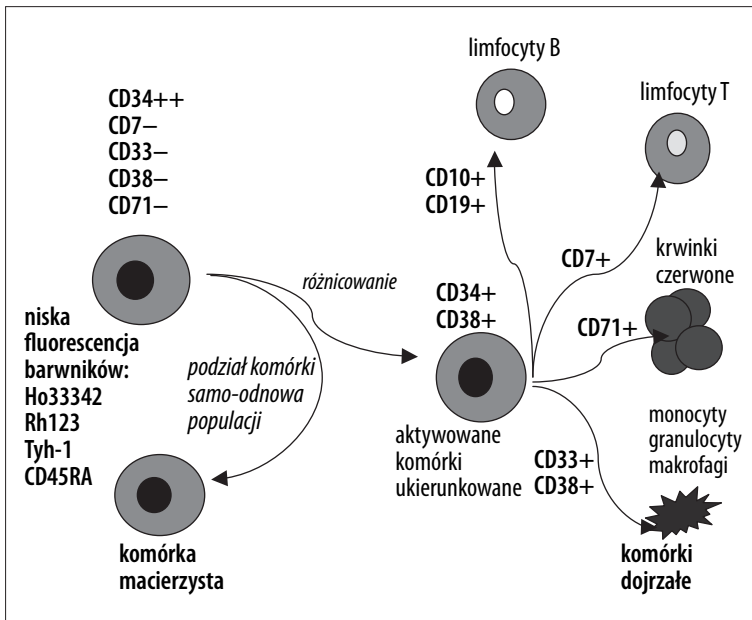
W celu identyfikacji komórek progenitorowych krwi wykorzystuje się swoisty skład prezentowanych antygenów powierzchniowych, gdyż komórki te nie mają charakterystycznych cech morfologicznych i swoim wyglądem przypominają średniej wielkości krwinki białe. Ludzka komórka macierzysta krwi wykazuje ekspresję receptora CXCR4 oraz antygeny CD34 – markera komórek progenitorowych/macierzystych (ryc. 4). Ponadto komórka ta ma na swojej powierzchni wiele molekuł adhezyjnych, których charakterystykę przedstawiono w dalszych rozdziałach pracy. Dzięki markerom możliwy jest rozdział komórek hematopoetycznych (CD34⁺) od niehematopoetycznych (CD34⁻) np. wczesnych ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych szpiku kostnego (ryc. 4) [88]. Oprócz prawidłowych komórek krwiotwórczych antygen CD34 występuje na powierzchni komórek nowotworowych, zwłaszcza wywodzących się z mało zróżnicowanych komórek krwiotwórczych [88]. W badaniu cytofluorymetrycznym (poza badaniem

obecności antygeny CD34) komórkę macierzystą można identyfikować za pomocą obniżonej fluorescencji barwnika Hoechst 33342 (Ho33342^{low}) i rodamin-123 (Rh123). Intensywność fluorescencji obu barwników informuje o małej aktywności metabolicznej komórek macierzystych.

ROLA INTERAKCJI SDF-1 I CXCR4 W HEMATOPOEZIE

Znaczenie interakcji SDF-1 i jego receptora podczas hematopoezy nie zostały jeszcze dokładnie poznane, choć wiadomo, że oś SDF-1-receptor CXCR4 ma ogromny wpływ na prawidłowy przebieg procesu hematopoezy [69,90,111]. Jednakże nie jest to jedyna relacja, która bierze udział w procesach między komórkami CD34 a podścieliskiem szpiku. Istotną rolę w tym procesie odgrywają molekularne czynniki adhezyjne [41]. Procesy zależne od SDF-1 występują podczas rozwoju embrionalnego i w dorosłym organizmie, są związane z prawidłowym rozwojem oraz odnową szpiku po przeszczepie komórek.

Oś SDF-1-CXCR4 odgrywa główną rolę w prawidłowej migracji, zasiedlaniu, odnowie (tzw. repopulacji), różnicowaniu oraz przeżyciu wielu typów komórek pochodzących z komórki krwiotwórczej lub komórek progenitorowych [10,86]. Badania prowadzone na modelach mysich potwierdzają, że



Ryc. 4. Ewolucja ekspresji głównych antygenów powierzchniowych na wczesnych komórkach krwiotwórczych

mysie embriony z delecją genu *SDF-1* lub *CXCR4* wykazują wiele defektów rozwojowych, które są letalne. Mutacje powodują niedobór limfocytów i monocytów podczas hematopoezy w szpiku kostnym [79,111]. Dodatkowo obserwowano chwilowe osłabienie procesu limfopoezy komórek B w wątrobie płodowej, co oznacza, że SDF-1 jest czynnikiem wzrostu komórek pre-B [21]. Widoczny jest również brak stymulacji rozwoju komórek T w grasicy oraz mielocytów w wątrobie płodowej [88,103]. Zaobserwowano, iż nadmierna ekspresja ludzkich receptorów CD4 i CXCR4 na komórkach T CD4⁺ transgenicznych myszy powoduje zatrzymanie migracji tych komórek do szpiku kostnego [96]. Dane wskazują, iż SDF-1 i jego receptor wpływają na migrację komórek z wątroby płodowej do szpiku kostnego oraz hematopoetyczną retencję i zasiedlenie organów podczas rozwoju embrionu [63]. Komórki wyizolowane z wątroby płodowej z embrionów mysich pozbawionych genu *CXCR4* (*CXCR4*^{null}) potrafią zasiedlić szpik dorosłych myszy o fenotypie dzikim wcześniej poddawanych napromieniowaniu. Jednak odnowa pierwotnych komórek macierzystych krwi, a także utrzymanie dojrzwających komórek hematopoetycznych wewnątrz szpiku kostnego oraz prawidłowy wzór migracji progenitorowych komórek limfocytów i mielocytów jest zaburzony i uszkodzony [58,70]. Przedstawione dane podkreślają znaczenie SDF-1 i jego receptora także w ostatecznym długoterminowej interakcjach komórek macierzystych, takich jak zasiedlenie i odnowa komórek po przeszczepieniu dorosłym myszom. Dlatego komórki progenitorowe *CXCR4*^{null} pobrane z wątroby płodowej nie kwalifikują się jako ostateczne macierzyste komórki zasiedlające. Również podanie tych komórek w pierwszej transplantacji biorcy, jak również po serii kolejnych przeszczepów liczba komórek jest niewystarczająca do osiągnięcia trwałego wzrostu poziomu wielu populacji mielocytów i limfocytów. Ponadto okazało się, że liczba tych komórek jest niewystarczająca do osiągnięcia trwałego wzrostu poziomu wielu populacji mielocytów i limfocytów, niezależnie czy podawano je w pierwszej transplantacji biorcy czy też po serii kolejnych przeszczepień. Podobne wyniki uzyskiwane są po przeszczepieniu komórek macierzystych ze szpiku kostnego myszy z delecją p21 [18].

Zauważono, że pobrane z embrionów komórki wątroby *CXCR4*^{null} nie reagują na gradient SDF-1 *in vitro*. Dalsze badania wykazały, że SDF-1 pośredniczy w procesach adhezji i migracji komórek, działając na komórki *CXCR4*^{null} poprzez oddziaływanie z trójwymiarowym kompleksem macierzy międzykomórkowej (extracellular matrix – ECM) w hodowli, co częściowo, uzupełnia brak *CXCR4* [60,63]. Wyniki tych badań wskazują, iż gradient SDF-1 występujący w organizmie u dorosłych mysich osobników dziękiego typu, do których wszczepiono komórki *CXCR4*^{null} z wątroby płodowej mogą przyspieszyć adhezję komórek do śródbłonka szpiku kostnego, ich migrację oraz spowodować odpowiedź wszczepionych płodowych komórek wątroby *CXCR4*^{null} na sygnał od SDF-1 [63]. Dlatego też procesy zasiedlania komórek szpikowych i ich repopulacji mogą być bardziej wydajne dzięki promowaniu interakcji SDF-1-*CXCR4*, np. przez krótką (24–48-godzinna) stymulację *in vitro* niedojrzałych komórek CD34⁺ z SCF (stem cell factor) i IL-6, która wzmaga ekspresję receptora *CXCR4*, a co z tym związane migrację w kierunku SDF-1 w badaniach *in vitro* oraz zasiedlanie i repopulację *in vivo* [48,107].

Wysoka homologia sekwencji cząsteczki ludzkiego i mysiego SDF-1 (różnią się one jednym aminokwasem) umożliwia badanie odpowiedzi ludzkiego receptora *CXCR4* po zadziałaniu mysiego SDF-1 i *vice versa*. Mysie komórki T, które na swojej powierzchni noszą ludzki *CXCR4* i CD4 są umiejscowione wewnątrz szpiku kostnego transgenicznych myszy. Jest to kolejny dowód potwierdzający, ogromne znaczenie SDF-1, który zatrzymuje komórki krwiotwórcze wewnątrz szpiku kostnego w podścielisku. Zrekombinowane myszy ze zmienionymi genetycznie progenitorowymi komórkami, w badaniach nad zastosowaniem nowej metody przeciwko wirusowi T-tropicznemu HIV-1, wytwarzały wewnątrzkomórkowe chemokiny (intrakiny) nie wykazywały ekspresji *CXCR4* i CCR5 na powierzchni [5,17], co przyczyniło się do uszkodzenia hematopoezy komórek T i B [81]. Późniejszy przeszczep zmodyfikowanych mysich komórek progenitorowych, które wykazywały ekspresję SDF-1 przyczynił się do wzrostu mielocytarnej i B limfocytarnej hematopoezy (rozwój limfocytów T był osła-

Tabela 1. Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej

Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej	
Proteoglikany i składniki glikozoaminoglikanów	sulfonowany heparan
	sulfonowane chondronityny
	sulfonowany dermatan
	kwas hialuronowy
Kolagen	typu I, III, IV, V, VI
Fibronektyny	
Trombosporyny	
Sialoadhezyny	
Laminy	
Tenascyna	

biony). Reakcja była prawdopodobnie spowodowana anty-apoptotycznym charakterem chemokiny [63].

MIKROŚRODOWISKO SZPIKU KOSTNEGO: INTERAKCJE POMIĘDZY MOLEKUŁAMI ADHEZYJNYMI, KOMÓRKAMI HEMATOPOETYCZNYMI I KOMÓRKAMI ZREBU SZPIKU. ICH WPŁYW NA ODDZIAŁYWANIE SDF-1/CXCR4

Mikrośrodowisko krwiotwórcze w szpiku kostnym u zdrowego człowieka budują komórki hematopoetyczne i niehematopoetyczne komórki zrebu szpiku, które biosyntetyzują zewnątrzkomórkowe produkty i cytokiny biorące udział w procesie hematopoezy [20]. Komórki wchodzące w skład mikrośrodowiska to: miofibroblasty, różne rodzaje komórek fibroblastów, komórki śródbłonna, prekursorzy kości, komórki tłuszczowe, makrofagi. Wyżej wymienione komórki wytwarzają molekuly macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix – ECM) składającej się z proteoglikanów, składników glikozoaminoglikanów, pięciu rodzajów kolagenu, fibronektyny, trombospondyny, laminy, sialoadhezyny, hemonektyny, tenascyny [59,105] (tabela 1). Komórki składające się na hematopoetyczne mikrośrodowisko są źródłem wielu hematopetycznych cytokin, również wiążą i wydzielają takie czynniki jak GM-CSF, G-CSF oraz czynniki komórek macierzystych (kit ligand) (tabela 2).

Zasadniczą rolę w interakcji pomiędzy mikrośrodowiskiem szpiku kostnego a komórkami krwiotwórczymi i macierzystymi pnia (stem cell) odgrywa wzajemne rozpoznanie receptorów adhezyjnych i ich ligandów umiejscowionych na powierzchni obu typów komórek oraz na otaczającej je macierzy zewnątrzkomórkowej (tabela 3, ryc. 5). Interakcje te regulują proces hematopoezy, wymianę wyżej wymienionych progenitorów między hemo-limfopoetyczną tkanką i krwią obwodową. Jednakże rola molekuł adhezyjnych nie ogranicza się do regulacji procesu hematopoezy. Wpływają one na migrację komórek rdzeniowych i progenitorowych podczas rozwoju embrionalnego, a także na proces zasiedlania organów i tkanek podczas całego życia [42]. Rolę tych czynników, pozytywnie lub negatywnie wpływających na mobilizację poznano badając proces zasiedlania szpiku przez wszczepione komórki krwiotwórcze po wcześniej-

Tabela 2. Czynniki indukowane lub konstytutywnie wydzielane przez komórki zębne szpiku

Czynniki indukowane lub konstytutywnie wydzielane przez komórki zębne szpiku	
G-CSF	IL-1
GM-CSF	IL-1 β
M-CSF	IL-6
Flt-3 ligand	IL-7
SCF	IL-8
LIF	IL-12
Trombopoetyna	IL-14
TNF- α	IL-15
TNF- β	IL-16
TGF- β	IL-17
HGF	IL-18
NGF	
BDNF	
SDF-1	

G-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, GM-CSF – czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów, M-CSF – czynnik pobudzający kolonie makrofagów, Flt-3 ligand – hematopoetyczny czynnik wzrostu pobudzający komórki macierzyste i komórki dendrytyczne, SCF – czynnik wzrostowy komórki pnia, LIF – czynnik hamujący białaczki, TNF – czynnik martwicy nowotworu, HGF – wątrobowy czynnik wzrostu, TGF – czynnik stymulujący proliferację, NGF – neuronalny czynnik wzrostu, BDNF – mózgowy czynnik wzrostu nerwów, SDF-1 – czynnik pochodzenia stromalnego-1, IL – interleukiny.

szym naświetlaniu myszy promieniami rentgena. Ustalono, że na zasiedlanie szpiku przez komórki progenitorowe (różne limfatyczno-hematopoetyczne komórki) wpływa wiele czynników. Jednak ze względu na wieloskładnikowy charakter tego procesu, utrudnione jest precyzyjne ustalenie miejsca działania, występowania i roli poszczególnych molekuł adhezyjnych poprzez użycie przeciwciał swoistych do wybranych molekuł adhezyjnych. Badania wykazały, że przeciwciała prawdopodobnie mogą utrudniać interakcje między komórkami progenitorowymi a śródbłonkiem, transmigracją oraz asocjacją tych komórek w zrebie [36,83,84,106]. Mimo trudności związanych z dokładną analizą wyników ustalono, że komórki oddziałują z hematopoetycznym mikrośrodowiskiem poprzez trzy różne mechanizmy:

1. Interakcje komórek krwiotwórczych z cytokinami hematopoetycznymi występującymi w macierzy zewnątrzkomórkowej, np. glikoaminoglikany.
2. Interakcje komórek krwiotwórczych z molekułami adhezyjnymi występującymi na powierzchni komórek zębnych szpiku kostnego.
3. Interakcje między molekułami adhezyjnymi na powierzchni komórek krwiotwórczych z właściwymi ligandami macierzy zewnątrzkomórkowej [41].

Tabela 3. Molekuły adhezyjne

Molekuły adhezyjne		Lokalizacja	Ligand	Lokalizacja
β_1 integryny	$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)	progenitory hematopoetyczne	fibronektyna (domena CS1)	macierz zewnątrzkomórkowa
	$\alpha_5\beta_1$ (VLA-5)	progenitory hematopoetyczne	fibronektyna (sekwencja RGD)	macierz zewnątrzkomórkowa
α_2 integryny	LFA-1	progenitory hematopoetyczne	ICAM-1	komórki zrębu szpiku, komórki śródbłonka
	Mac-1	zróżnicowane komórki hematopoetyczne	ICAM-1	macierz zewnątrzkomórkowa
Selektyny	L-selektyny	progenitory hematopoetyczne	ligandy glikoproteinowe	macierz zewnątrzkomórkowa
	E-selektyny	komórki śródbłonka	antygen Lewis X, CD 44, sialowane fragmenty cukrów	komórki szpikowe, zwłaszcza serii białokrwinkowej, komórki T
	P-selektyny	komórki śródbłonka	P selektywny glikoproteinowy ligand 1 (CD 162)	komórki szpikowe, zwłaszcza serii białokrwinkowej
CD44		progenitory hematopoetyczne	kwasy hialuronowy	macierz zewnątrzkomórkowa

Poszczególne molekuły wchodzące w skład największej rodziny komórkowych molekuł adhezyjnych (cell-adhesion molecules – CAMs), występuje zarówno na powierzchni komórki macierzystej krwi (CD34⁺), jak i w hematopoetycznym mikrośrodkowisku, zostały sklasyfikowane w sześć nadrodzin: integryny, selektyny, sialomucyny, nadgodzina immunoglobulin, CD44 proteoglikany, katheryny.

Integryny

Molekuły te są zaangażowane w interakcje między komórkami macierzystymi i komórkami zrębu. Integryny to heterodimeryczne białka zbudowane z niekowalencyjnie połączonych α i β łańcuchów. Łańcuchy łącząc się na różne sposoby tworzą 20 typów receptorów integrynowych. Receptory są strukturami transmembranowymi, które łączą się z białkami cytoplazmatycznymi, przez co modyfikują wewnątrzkomórkowe szlaki metaboliczne, fosforyzują cytoplazmatyczne białka, wpływają na proliferację komórki i aktywują białko ras. Część fragmentu cytoplazmatycznego oddziałuje z cytoplazmatycznym szkieletem, przez co wpływa na miejsca adhezyjne między komórkami a trójwymiarowym kompleksem macierzy międzykomórkowej. Wyróżniono dwie główne rodziny β integryn, które są zaangażowane w hematopoezę:

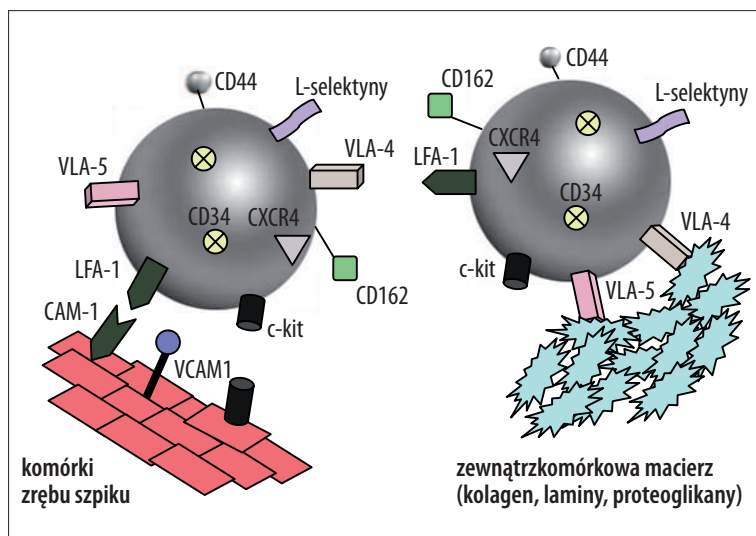
β_1 Integryny (CD29)

Integryny należące do tej rodziny są złożone z różnych kombinacji łańcuchów budujących różne molekuły VLA (very late antygen), które pośredniczą w przyleganiu komórek krwiotwórczych do komponentów ECM i ligandami zrębu szpiku i komórkami śródbłonka.

Komórki CD34⁺ mają na swojej powierzchni integrynowe receptory VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$), dla których ligandem jest VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1) występujący na komórkach zrębowych szpiku, śródbłonka, podlega on kontroli wielu cytokin, w tym IL-1 [106]. Interakcje między VLA-4/VCAM-1 są jednymi z głównych reakcji kierującymi proces zasiedlania przez komórki macierzyste [108].

Oś SDF-1/CXCR4 również kieruje procesem zasiedlania szpiku kostnego przez komórki hematopoetyczne (jak już wspomniano wcześniej). SDF-1 jest wydzielany przez komórki zrębu szpiku i podlega silnej regulacji VLA-4, który wpływa na przyleganie komórek CD34⁺ do podłoża i fibronektyny w ECM [49]. Wczesne prekursorzy na swojej powierzchni również ekspresjonują VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$) (CD49e), który wiąże komórki do fibronektyny ECM.

Przeciwciała przeciwko VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$)/VCAM-1 zapobiegają wiązaniu się komórek macierzystych do pokrywającej naczyń fibronektyny i do zrębu siateczkowego (stromal layers), co powoduje zatrzymanie wejścia komórek macierzystych do szpiku kostnego napromieniowanych myszy [83]. Dodatkowo wykazano, iż podane przeciwciała mobilizują komórki progenitorowe CFU-C do krwi obwodowej u zdrowych myszy [83,84]. Vermeulen i wsp. wykazali powiązanie między molekułami VLA-4, CD44 a zasiedlaniem szpiku i mobilizacją. Przeciwciała anty-CD44 hamują zasiedlanie szpiku komórkami CFU-S jeszcze bardziej efektywnie niż przeciwciała anty-VLA-4 [106]. Podanie napromieniowanym myszom przeciwciał anty-VLA-4 przed przeszczepem komórek progenitorowych zatrzymywało komórki krwiotwórcze na obwodzie, co powodowało znaczne obniżenie wchodzenia tych komórek do szpiku, a podwyższało ich mobilizację do krwi obwodowej. Podobne rezultaty otrzymano, gdy wstrzykiwano przeciwciała przeciwko VCAM-1, który występuje na komórkach śródbłonkowych i siateczkowych w zatoce szpiku kostnego i jest ligandem VLA-4. Przeciwciała anty-VCAM-1 obniżały znacząco proces zasiedlania szpiku, co jednocześnie zwiększało mobilizację [83]. Badania wykazały dodatkowo, że wprowadzenie przeciwciał anty-VLA-4 i anty-VCAM-1 do zdrowych myszy powodowało mobilizację komórek krwiotwórczych do krwi obwodowej [83]. Dane te potwierdzają to, że komórki hematopoetyczne przechowywane są w szpiku kostnym, a proces wejścia i wyjścia tych komórek ze szpiku może być regulowany nie tylko G-CSF, SDF-1, ale również oddziaływaniami między VLA4/VCAM-1. Podanie dwóch przeciwciał jednocześnie nie zmniejsza wejścia komórek CD34⁺ do szpiku,



Ryc. 5. Interakcje molekuł adhezyjnych występujących na komórkach macierzystych z komórkami zrębu szpiku i macierzą zewnątrzkomórkową

wyniki są porównywalne do wyników dla jednego przeciwciała. Sugeruje to udział innych molekuł adhezyjnych, które są ligandem VLA-4 i nie są czułe na działanie tych przeciwciała.

$\beta 2$ Integryny (CD18)

Najlepiej poznana $\beta 2$ integryna jest LFA-1 (lymphocyte function antigen-1) (CD11a), który jest zaangażowany w wiązanie dojrzałych leukocytów do ICAM-1 śródbłonna [106]. LFA-1 zlokalizowano na powierzchni wczesnych prekursorów hematopetycznych. Mac-1 (CD11b) również należy do rodziny $\beta 2$ integryn. Mac-1 występuje na powierzchni dojrzałych monocytów i granulocytów, nie znaleziono go na wczesnych prekursorach hematopetycznych.

CD44 proteoglikany

Rodzina CD44 jest bardzo dobrze ekspresjonowana na powierzchni komórek zrębu, wiąże niesulfonowane glikozaminoglikany kwasu hialuronowego, jednego z komponentów ECM. Dodatkowo CD44 występuje na powierzchni prekursorów hematopoezy, ale tylko mały odsetek wiąże hialurany [102] oraz inne komponenty ECM, np. fibronektyny [54]. CD44 występuje również na powierzchni komórek progenitorowych i na komórkach macierzystych. Przeciwciała przeciwko tej glikoproteinie mogą hamować lub wzmacniać hematopoezę *in vitro*.

Badając wpływ delekcji genów molekuł adhezyjnych na proces hematopoezy w szpiku i śledzionie w podczas rozwoju embrionalnego, wykazano, że myszy z delecją genów kodujących VCAM-1 i CD44 nie wykazują upośledzenia procesu hematopoezy [37,97]. Podobne dane uzyskano dla myszy z delecją genu integryny $\alpha 4$, u których multipotencjalne progenitory komórkowe prawidłowo rozwijały się w wątrobie, śledzionie i szpiku [3,4]. Dane sugerują, iż wspomniane molekuły adhezyjne są zbędne do prawidłowego zasiedlenia organów przez komórki krwiotwórcze. Natomiast u myszy z usuniętym genem integryny $\beta 1$, komórki hematopoetyczne nie były zdolne do zasiedlenia wątroby płodowej, śledziony, grasicy i szpiku. Wykazano również, że integryny $\beta 1$ odgrywają istotną rolę w zasie-

daniu wątroby i innych rozwiniętych/dojrzałych hematopetycznych organów [51,89].

Selektyny

Selektyny są rodziną trzech glikoprotein, które są zaangażowane w przekazywanie sygnałów oraz procesy przylegania. L-selektyna ekspresjonowana jest na powierzchni dojrzałych leukocytów i na wczesnych komórkach hematopetycznych. Najlepiej zbadana jest rola L-selektyny w przyleganiu leukocytów do śródbłonna. P- i E-selektyny nie zostały zlokalizowane na komórkach śródbłonna. Ich ligandy odkryto na wczesnych progenitorach krwi.

Badając wpływ P- i E-selektyny na proces zasiedlenia szpiku kostnego po transplantacji, wykazano, iż myszy z delecją genu P- i E-selektyny po naświetlaniu letalną dawką promieniowania i przeszczepie minimalnej liczby komórek progenitorowych od myszy dzikiego typu, wykazywały małą przeżywalność. Przyczyną był brak przechodzenia przeszczepionych komórek z krwi obwodowej do szpiku kostnego, który wywołany był brakiem obu selektyn [36].

Siałomucyny

Najlepiej poznana siałmucyną jest CD164, która jest ekspresjonowana na powierzchni komórek szpiku kostnego i komórkach CD34⁺ i bierze udział w przyleganiu tych komórek do siebie. Inne siałomucyny nie zostały rozpoznane w procesie hematopoezy.

Nadrodzina immunoglobulin

Nadrodzina immunoglobulin jest rodziną molekuł adhezyjnych, które mają wysoki stopień homologii sekwencji z immunoglobulinami. Do przedstawicieli tej nadrodziny biorących udział w hematopoezie należą: (1) molekuły VCAM-1, których cząsteczki ekspresjonowane są na komórkach zrębu szpiku i komórkach podścieliska, oddziałują z $\beta 1$ integrynami VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), występującymi na powierzchni progenitorowych komórek hematopetycznych; (2) wstępujące na powierzchni komórek zrębu szpiku cząsteczki ICAM, które oddziałują z $\beta 2$ integrynami, np. LFA-1, Mac-1 oraz (3)

wspomagające proces limfopozy **NCAM (CD56)**, który jest markerem komórek NK (natural killer) i odnaleziony został na tkance nerwowej, komórkach zębku szpiku.

Katheryny

Katheryny E-, N- i P- są transmembranowymi glikoproteinami, które uczestniczą w Ca^{2+} -zależnej adhezji w rozwijającym się embrionie i utrzymywaniu architektury tkanki. W hematopoizie ich rola nie została szczegółowo poznana. Wiadomo, że katheryny E- i N- są ekspresjonowane na powierzchni komórek zębku i komórkach CD34⁺ i progenitorach erytrocytów.

INTERAKCJA MIĘDZY SDF-1 I CXCR4 I JEJ ZNACZENIE W MOBILIZACJI PROGENITOROWYCH KOMÓREK HEMATOPOETYCZNYCH DO KRWI OBWODOWEJ

Badania na modelach mysich wykazały, iż progenitorowe komórki hematopoetyczne są mobilizowane do krwi obwodowej w odpowiedzi na ustalony gradient SDF-1, np. przez wprowadzenie adenowirusa ekspresjonującego SDF-1, stąd też wniosek, że podwyższone stężenia SDF-1 w krążeniu obwodowym sprzyjają indukcji mobilizacji [45]. Interakcja między SDF-1 i CXCR4 odgrywa krytyczną rolę czynnika neutralizującego indukowanej G-CSF mobilizacji komórek macierzystych, a użycie przeciwciała neutralizującego SDF-1 lub CXCR4 powoduje zatrzymanie interakcji SDF-1-CXCR4 [87]. Natomiast preinkubacja z dużymi stężeniami SDF-1 *in vitro* powoduje desensytyzację receptora CXCR4 na komórkach CD34⁺.

Stwierdzono ponadto, że regulacja oddziaływania SDF-1/CXCR4 może następować poprzez działanie enzymów proteolitycznych na SDF-1 czy też na jego receptor CXCR4. Podawanie G-CSF jest związane z jednej strony z obniżeniem ilości SDF-1 w szpiku kostnym spowodowanym degradacją SDF-1 przez elastazę neutrofilów czy katepsynę [64,87], z drugiej zaś degradacją CXCR4, ponieważ wykazano, że podanie G-CSF prowadzi do odcięcia N-końca cząsteczki białka budującej receptor CXCR4 [65]. Christopherson i wsp. zwrócili natomiast uwagę na związaną z błoną komórkową zewnątrzkomórkową peptydazę-CD26 (dipetidyllopeptidase IV-DPPIV), jako enzym biorący udział w degradacji SDF-1 w szpiku kostnym i związanym z tym procesem uwolnieniem komórek CD34⁺ do obwodu [19]. Z kolei zahamowanie aktywności CD26/DPPIV przez podanie peptydów (np. Ile-Pro-Ile lub Val-Pyr) obniża indukowaną G-CSF mobilizację komórek hematopoetycznych wzmagając zagnieżdżanie się komórek w szpiku u myszy [14].

Wyniki badań prowadzonych na zwierzętach wpłynęły na badania prowadzone u człowieka, a następnie na modyfikacje procedur stosowanych w klinice człowieka.

Proces mobilizacji komórek krwiotwórczych ze szpiku do krwi obwodowej jest klinicznie wywołany u dawcy przez podanie czynnika stymulującego kolonie granulocytarne (G-CSF) w standardowej dawce 5 µg/kg masy ciała dawcy, dwa razy dziennie, przez 5 kolejnych dni przed pierwszą leukoferezą [28,29,30]. Jak wykazano w badaniach na myszach, podanie G-CSF prawdopodobnie redukuje ilość wytwarzanego SDF-1 wewnątrz szpiku kostnego poprzez jego degradację. Proces ten powodują (jak

już wspomniano wyżej) enzymy proteolityczne wydzielane przez krwinki białe obojętnochnonne podczas mobilizacji [87]. Wcześniejsze badania u człowieka wykazały, iż komórki mobilizowane G-CSF wykazują na swojej powierzchni obniżoną liczbę i zmniejszoną gęstość receptora CXCR4 [39]. Zauważono, iż komórki CD34⁺ pobierane bezpośrednio z natywnego szpiku wykazują większą ekspresję receptora CXCR4 niż komórki pobrane z mobilizowanego szpiku i PBPC (peripheral blood progenitor cells) [28,30]. Oznacza to, że pacjenci, którym przeszczepiane są komórki PBPC otrzymują materiał uboższy w komórki CD34⁺ i CXCR4⁺ niż pacjenci otrzymujący materiał pobrany z natywnego szpiku. Wykazano bezpośredni wpływ G-CSF na odsetek komórek CD34⁺. Powoduje on wzmocniony wypływ komórek CD34⁺, których największa liczba znajduje się we krwi obwodowej, ale są to komórki pozbawione CXCR4 [28,30].

Oprócz G-CSF wyjście komórek ze szpiku powoduje cyklofosamid [13,98]. Jednakże podawanie pacjentom jedynie cytostatyku bez G-CSF powoduje zmniejszenie odsetka komórek progenitorowych wypływających ze szpiku do krwi obwodowej.

Stymulacja monocytów przez G-CSF osłabia indukcję wpływ lipopolisacharydu na wytwarzanie IL-1β, czynnika martwicy nowotworów (tumour necrosis factor-α – TNF-α), IL-12 i IL-18 [53]. Dodatkowo ekspresja mysiego SDF-1α i β nie przynosi korzyści, gdy używany jest lipopolisacharyd czy ester forbolu w komórkach stromalnych szpiku, czy ST-2, PA-6 oraz w liniach komórek fibroblastów NIH3T3 i Swiss3T3. Zaobserwowano pozytywną stymulację wzrostu DW34 preB-komórek w obecności IL-7 poprzez SDF-1 izolowany z komórek PA-6 [80]. Jest to dowód, iż w procesie mobilizacji G-CSF hamuje działanie LPS, co z kolei stymuluje wypływ komórek krwiotwórczych ze szpiku do krwi obwodowej.

Na podstawie wyników naszych ostatnich badań można przypuszczać, że różnice w liczbie komórek mobilizowanych do krwi obwodowej u zdrowych dawców, którym podano G-CSF mogą być również związane z polimorfizmem genu kodującego SDF-1 w pozycji 801 (G/A) regionu 3'UTR [11,12]. Stwierdziliśmy bowiem, że częstość komórek CD34⁺ w pierwszym preparacie leukaferezy byłaby statystycznie istotnie wyższa w dawców z allelem SDF-1-3'A. Ponadto u dawców z genotypem SDF-1-3'GG konieczne było przeprowadzenie większej liczby separacji niż u tych z allelem SDF-1-3'A. Toteż wydajność mobilizacji okazała się lepsza u zdrowych dawców z allelem SDF-1-3'A. Co ciekawe, podobne zależności obserwowaliśmy u biorców przeszczepów autologicznych. Podobnie, jak w przypadku zdrowych dawców komórek alogenicznych, również u chorych z genotypem SDF-1-3'A obserwowano podwyższony odsetek komórek CD34⁺ w pierwszym preparacie leukaferezy [40].

Najbardziej obiecującym czynnikiem mobilizującym, podanym obecnie badaniom klinicznym, jest swoisty antagonist CXCR4 (receptora SDF-1) – AMD3100. AMD3100 blokuje indukowaną SDF-1 chemotaksję [56].

AMD3100 stosowano pierwotnie w leczeniu infekcji wirusem HIV [24]. Po podaniu dożylnym pojedynczej dawki

ADM3100 obserwowano u pacjentów niewielką leukocytozę [47]. Kolejne badania wykazały, że AMD3100 może być podawane razem z G-CSF w celu podwyższenia wydajności izolacji komórek macierzystych w procesie leukaferezy. W I fazie badań klinicznych u zdrowych dawców, którym podskórnie podano pojedynczą dawkę AMD3100, obserwowano zależny od dawki wzrost odsetka komórek CD34⁺ w krwi obwodowej [66]. Najlepszy wynik, 10-krotny wzrost odsetka CD34⁺ po 9 godzinach po iniekcji, uzyskiwano po podaniu 240 µg/kg m.c. AMD3100. Co ciekawe, badania na modelach mysich wykazały, że podanie samego AMD3100 lub AMD3100 i G-CSF nie wpływa na przyjęcie się przeszczepu i funkcję limfocytów T (co pokazano w badaniach na chorobą przeszczep-przeciwko-gospodarzowi i analizie potransplantacyjnego chimeryzmu) [27].

Ponadto, badania kliniczne u chorych na nowotwory układu krwiotwórczego wykazały, że AMD3100 może być wykorzystywane do mobilizacji komórek macierzystych u biorców przeszczepów autologicznych. W I fazie badań wzięło udział 13 pacjentów ze szpiczakiem mnogim i chłoniakiem niezłazniczym, którym podawano ADM3100 w pojedynczej dawce 160 lub 240 µg/kg m.c. [26]. 6 godzin po podaniu ADM3100 obserwowano 6-krotny wzrost bezwzględnej liczby komórek CD34⁺. U pacjentów zmiany toksyczne, o ile występowały, były niewielkie (najwyżej I stopnia w skali WHO). Badania w grupie chorych ze szpiczakiem mnogim lub chłoniakiem niezłazniczym poddanych 2 mobilizacjom, samym G-CSF lub G-CSF w połączeniu z ADM3100, wy-

kazały, że użycie obu czynników było związane z lepszą wydajnością mobilizacji, niezależnie czy ADM3100 podawany był z G-CSF w pierwszej, czy w drugiej turze mobilizacji [35]. Pacjenci wymagali mniejszej liczby leukaferez dla osiągnięcia wymaganej liczby 5×10⁶ komórek CD34⁺/kg. U 11 z 12 analizowanych pacjentów, którym podano komórki CD34⁺ mobilizowane G-CSF i ADM3100 obserwowano szybkie przyjęcie się przeszczepu i u żadnego z nich przeszczep nie został odrzucony.

Kolejne badania prowadzone u pacjentów z anemią Fanconiego [14], u których właściwie nie dochodzi do mobilizacji pod wpływem samego G-CSF, wykazały, że podanie kombinacji AMD3100 z G-CSF może być korzystne dla mobilizacji komórek hematopoetycznych u tych chorych.

Wykazano również, że TGF-β może blokować desensytyzację receptora CXCR4, co mogłoby sugerować, że TGF-β lub modulacja TGF-β i/lub jego receptora może w niedalekiej przyszłości znaleźć zastosowanie kliniczne [14].

Podsumowując, znajomość interakcji między SDF-1 i jego receptorem CXCR4 oraz wewnątrzkomórkowych mechanizmów związanych z tym oddziaływaniem, a następnie ingerencja i modulowanie owych mechanizmów może mieć korzystny wpływ na manipulowanie procesami mobilizacji komórek hematopoetycznych, zadomawiania się w szpiku, przyjęcia się przeszczepu, przeżyciem komórek, ich proliferacją i samoodnową.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abi-Younes S., Sauty A., Mach F., Sukhova G.K., Libby P., Luster A.D.: The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ. Res.*, 2000; 86: 131–138
- [2] Ara T., Tokoyoda K., Sugiyama T., Egawa T., Kawabata K., Nagasawa T.: Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity*, 2003; 19: 257–267
- [3] Arroyo A.G., Yang J.T., Rayburn H., Hynes R.O.: Differential requirements for α4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell*, 1996; 85: 997–1008
- [4] Arroyo A.G., Yang J.T., Rayburn H., Hynes R.O.: α4 integrins regulate the proliferation/differentiation balance of multilineage hematopoietic progenitors *in vitro*. *Immunity*, 1999; 11: 555–566
- [5] Bai X., Chen J.D., Yang A.G., Torti F., Chen S.Y.: Genetic co-inactivation of macrophage- and T-tropic HIV-1 chemokine coreceptors CCR-5 and CXCR-4 by intrakines. *Gene Ther.*, 1998; 5: 984–994
- [6] Baker N.E., Kucera G., Richmond A.: Nucleotide sequence of the human melanoma growth stimulatory activity (MGSA) gene. *Nucleic Acids. Res.*, 1990; 18: 6453
- [7] Balabanian K., Lagane B., Infantino S., Chow K.Y., Harriague J., Moepes B., Arenzana-Seisdedos F., Thelen M., Bachelier F.: The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocyte s. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 35760–35766
- [8] Bartel H.: Embriologia, Wydawnictwo Lekarskie PZWL 1990
- [9] Bleul C.C., Fuhlbrigge R.C., Casasnovas J.M., Aiuti A., Springer T.A.: A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 1101–1109
- [10] Bleul C.C., Schultze J.L., Springer T.A.: B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J. Exp. Med.*, 1998; 187: 753–762
- [11] Bogunia-Kubik K., Gieryng A., Dłubek D., Lange A.: SDF1-3'A positive healthy HSCT donors characterise with a high mobilization potential of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *Tissue Antigens*, 2006; 67: 481–482 (abstract P-057)
- [12] Bogunia-Kubik K., Gieryng A., Dłubek D., Lange A.: The presence of the SDF1-3'A allele is associated with a higher yield of CD34⁺ mobilization in healthy donors donated PBPC for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2006; 37(suppl. 1)
- [13] Boiron J.M., Marit G., Faberes C., Cony-Makhoul P., Foures C., Ferrer A.M., Cristol G., Sarrat A., Girault D., Reiffers J.: Collection of peripheral blood stem cell in multiple myeloma following single high-dose cyclophosphamide with and without recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF). *Bone Marrow Transplant.*, 1993; 12: 49–55
- [14] Broxmeyer H.E., Basu S., Clapp D.W., Cooper S., Hangoc G., Henao Mejia J.A., Pulliam A.: Targeting surface and intracellular molecules and the chemokine pathway for mobilization and/or engraftment. 48th ASHTM Annual Meeting and Exposition, December 9–12, 2006, Orlando, Florida. http://www.hematology.org/meetings/2006/attendee/scientific_program.cfm (18.04.2007)
- [15] Burger J.A., Kipps T.J.: CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 2006; 107: 1761–1767
- [16] Burns J.M., Summers B.C., Wang Y., Melikian A., Berahovich R., Miao Z., Penfold M.E., Sunshine M.J., Littman D.R., Kuo C.J., Wei K., McMaster B.E., Wright K., Howard M.C., Schall T.J.: A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J. Exp. Med.*, 2006; 203: 2201–2213
- [17] Chen J.D., Bai X., Yang A.G., Cong Y., Chen S.Y.: Inactivation of HIV1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy. *Nat. Med.*, 1997; 3: 1110–1116
- [18] Cheng T., Rodrigues N., Shen H., Yang Y., Dombkowski D., Sykes M., Scadden D.T.: Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*, 2000; 287: 1804–1808
- [19] Christopherson K.W., Cooper S., Broxmeyer H.E.: Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells. *Blood*, 2003; 101: 4680–4686
- [20] Clark B.R., Keating A.: Biology of bone marrow stroma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1995; 770: 70–78

- [21] Coulomb-L'hermin A., Amara A., Schiff C., Durand-Gasselini I., Foussat A., Delaunay T., Chaouat G., Capron F., Ledee N., Galanau P., Arenzana-Seisdedos F., Emilie D.: Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and antenatal human B cell lymphopoiesis: expression of SDF-1 by mesothelial cells and biliary ductal plate epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 8585–8590
- [22] Crane I.J., Wallace C.A., McKillop-Smith S., Forrester J.V.: CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from the blood-retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1 alpha. *J. Immunol.*, 2000; 165: 4372–4378
- [23] Crump M.P., Gong J.H., Loetscher P., Rajarathnam K., Amara A., Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J.L., Baggiolini M., Sykes B.D., Clark-Lewis I.: Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.*, 1997; 16: 6996–7007
- [24] De Clercq E.: The bicyclam AMD3100 story. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003; 2: 581–587
- [25] Deng H., Liu R., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., Di Marzio P., Marmor S., Sutton R.E., Hill C.M., Davis C.B., Peiper S.C., Littman D.R., Landau N.R.: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 1996; 381: 661–666
- [26] Devine S.M., Flomenberg N., Vesole D.H., Liesveld J., Weisdorf D., Babel K., Calandra G., DiPersio J.F.: Rapid mobilization of CD34⁺ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 1095–1102
- [27] Devine S.M., Liu F., Holt M., Link D., DiPersio J.F.: AMD3100-mobilized murine hematopoietic stem cells and T-lymphocytes have identical capacity to induce multilineage stem cell engraftment, donor T-cell chimerism and GVHD in mice compared with G-CSF mobilized cell. *Blood*, 2003; 102: 938–939 (abstract)
- [28] Dłubek D., Drabczak-Skrzypek D., Lange A.: Low CXCR4 membrane expression on CD34⁺ cells characterizes cell mobilized to blond. *Bone Marrow Transplant.*, 2006; 37: 19–23
- [29] Dłubek D., Dybko J., Wysoczanska B., Laba A., Klimczak A., Kryczek I., Konopka L., Lange A.: Enrichment of normal progenitory in counter-flow centrifugal elutriation (CCE) fraction of fresh chronic myeloid leukemia leukapheresis products. *Eur. J. Haematol.*, 2002; 68: 281–288
- [30] Dłubek D., Pacuszko T., Suchnicki K., Lange A.: G-CSF-mobilized leukapheresis products: cellular characteristic and clinical performance in allografting. *J. Hematother.*, 1999; 8: 157–166
- [31] Dłubek D., Witkiewicz W., Lange A.: Szpikowe komórki macierzyste-identyfikacja i zastosowanie kliniczne. *Post. Biol. Kom.*, 2005; Supl. 23: 105–125
- [32] Edery P., Lyonnet S., Mulligan L.M., Pelet A., Dow E., Abel L., Holder S., Nihoul-Fékété C., Ponder B.A., Munnich A.: Mutations of the gene the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, 1994; 367: 378–380
- [33] Falkowski P., Dubinsky Z., Muscatine L., Mc-Closkey L.: Population control in symbiotic corals. *Bioscience*, 1993; 43: 606–611
- [34] Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E., Berger E.A.: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 1996; 272: 872–877
- [35] Flomenberg N., Dipersio J., Liesveld J., McCarty J., Rowley S., Vesole D., Badel K., Calandra G.: AMD3100+G-CSF haematopoietic progenitor cell (HPC) mobilization in safe, effective and superior to mobilization with G-CSF alone. *Blood*, 2003; 2: 39 (abstract)
- [36] Frenette P.S., Subbarao S., Mazo I.B., von Andrian U.H., Wagner D.D.: Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 14423–14428
- [37] Friedrich C., Cybulsky M.I., Gutierrez-Ramos J.C.: Vascular cell adhesion molecule-1 expression by hematopoiesis-supporting stromal cells is not essential for lymphoid or myeloid differentiation *in vivo* or *in vitro*. *Eur. J. Immunol.*, 1996; 26: 2773–2780
- [38] Gardner E., Papi L., Easton D.F., Cummings T., Jackson C.E., Kaplan M., Love D.R., Mole S.E., Moore J.K., Mulligan L.M., Norum R., Ponder M., Reichlin S., Stall G., Telenius H., Telenius-Berg M., Tunnacliffe A., Ponder B.: Genetic linkage studies map the multiple endocrine neoplasia type 2 loci to a small interval on chromosome 10q11.2. *Hum. Mol. Genet.*, 1993; 2: 241–246
- [39] Gazitt Y., Liu Q.: Plasma levels of SDF-1 and expression of SDF-1 receptor on CD34⁺ cells in mobilized peripheral blood of non-Hodgkin's lymphoma patients. *Stem Cells*, 2001; 19: 37–45
- [40] Gieryng A., Bogunia-Kubik K., Dłubek D., Duda D., Lange A.: The presence SDF1-3'A allele is associated with a higher mobilization yield of CD34⁺ progenitors to peripheral blood in healthy donors of allogeneic HSCT and patients undergoing autologous transplants. 21st European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Barcelona (Spain) 5–8.05.2007; *Tissue Antigens*, 2007; in press
- [41] Giles F.J., Keating A., Goldstone A.H., Avivi I., Willman C.L., Kantarjian H.M.: Acute myeloid leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2002; 73–110
- [42] Gordon M.Y.: Adhesive properties of haemopoietic stem cells. *Br. J. Haematol.*, 1988; 68: 149–151
- [43] Gupta S.K., Pillarisetti K.: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. *J. Immunol.*, 1999; 163: 2368–2372
- [44] Hatch H.M., Zheng D., Jorgensen M.L., Petersen B.E.: SDF-1alpha/CXCR4: A mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells*, 2002; 4: 339–351
- [45] Hattori K., Heissig B., Tashiro K., Honjo T., Tateno M., Shieh J.M., Hackett N.R., Quitoriano M.S., Crystal R.G., Rafii S., Moore M.A.: Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, 2001; 97: 3354–3360
- [46] Heinrich J.N., Ryseck R.P., Macdonald-Bravo H., Bravo R.: The product of a novel growth factor-activated gene, *fic*, is a biologically active „C-C“-type cytokine. *Mol. Cell Biol.*, 1993; 13: 2020–2030
- [47] Hendrix C.W., Flexner C., MacFarland R.T., Giandomenico C., Fuchs E.J., Redpath E., Bridger G., Henson G.W.: Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2000; 44: 1667–1673
- [48] Hernandez-Lopez C., Varas A., Sacedon R., Jimenez E., Munoz J.J., Zapata A.G., Vicente A.: Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood*, 2002; 99: 546–554
- [49] 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.: Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cell. *Exp. Hematol.*, 2001; 29: 345–355
- [50] Hirayama F., Yamaguchi M., Yano M., Yasui K., Matsumoto K., Nagao N., Ikebuchi K., Azuma H., Ikeda H., Tani Y.: Spontaneous and rapid reexpression of functional CXCR4 by human steady-state peripheral blood CD34⁺ cells. *Int. J. Hematol.*, 2003; 78: 48–55
- [51] Hirsch E., Iglesias A., Potocnik A.J., Hartmann U., Fassler R.: Impaired migration but not differentiation of hematopoietic stem cells in the absence of $\beta 1$ integrins. *Nature*, 1996; 380: 171–175
- [52] Hofstra R.M., Landsvater R.M., Ceccherini I., Stulp R.P., Stelwagen T., Luo Y., Pasini B., Höppener J.W., Van Amstel H.K., Romeo G., Lips C.J., Buys C.H.: A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature*, 1994; 367: 375–376
- [53] Jakimiuk B., Mroczko B., Szmítkowski M.: Czynniki stymulujący kolonię granulocytną (G-CSF) w praktyce klinicznej. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2004; 111: 227–235
- [54] Jalkanen S., Jalkanen M.: Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell Biol.*, 1992; 116: 817–825
- [55] Jones K. R., Reichardt L.F.: Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 8060–8064
- [56] Juarez J., Bradstock K.F., Gottlieb D.J., Bendall L.: Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells *in vitro*. *Leukemia*, 2003; 17: 1294–1300
- [57] Kahn J., Byk T., Jansson-Sjostrand L., Petit I., Shvitiel S., Nagler A., Hardan I., Deutsch V., Gazit Z., Gazit Z., Karlsson S., Lapidot T.: Overexpression of CXCR4 on human CD34⁺ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation. *Blood*, 2004; 103: 2942–2949
- [58] Kawabata K., Ujikawa M., Egawa T., Kawamoto H., Tachibana K., Iizasa H., Katsura Y., Kishimoto T., Nagasawa T.: A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 5663–5667
- [59] Klein G.: The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia*, 1995; 51: 914–926

- [60] Kollet O., Grabovsky V., Franitza S., Lider O., Alon R., Lapidot T.: SDF-1 induces survival, adhesion, and migration in 3D-ECM like gels of murine CXCR4 null fetal liver cells via another GPCR. *Blood*, 2000; 96: 65 (abstract)
- [61] Kryczek I., Lange A., Mottram P., Alvarez X., Cheng P., Hogan M., Moons L., Wei S., Zou L., Machelon V., Emilie D., Terrassa M., Lackner A., Curriel T.J., Carmeliet P., Zou W.: CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res.*, 2005; 65: 465-472
- [62] Lange A., Sędzimirska M.: Przeszczepianie komórek krwiotwórczych od dawców allogeniczných: wyniki leczenia na podstawie doświadczenia Dolnośląskiego Centrum Transplantacji Komórkowych z Krajowym Bankiem Dawców Szpiku. *Współczesna Onkologia*, 2006; 10: 391-394
- [63] Lapidot T., Kollet O.: The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2mnull mice. *Leukemia*, 2002; 16: 1992-2003
- [64] Lapidot T., Petit I.: Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp. Hematol.*, 2002; 30: 973-981
- [65] Levesque J.-P., Bendall L.J., Henty J., Takamatsu Y., Simmons P.J.: Neutrophil enzymes degrade CXCR4 on CD34⁺ progenitors: implications for progenitor cell mobilization. *Blood*, 2002; 100: 107 (abstract)
- [66] 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.: Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*, 2003; 15: 2728-2730
- [67] Luster A.D., Ravetch J.V.: Genomic characterization of gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. *Mol. Cell Biol.*, 1987; 7: 3723-3731
- [68] Lyonnet S., Bolino A., Pelet A., Abel L., Nihoul-Fékété C., Briard M.L., Mok-Siu V., Kááriäinen H., Martucciello G., Lerone M., Puliti A., Luo Y., Weissenbach J., Devoto M., Munnich A., Romeo G.: A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat. Genet.*, 1993; 4: 346-350
- [69] Ma Q., Jones D., Borghesani P.R., Segal R.A., Nagasawa T., Kishimoto T., Bronson R.T., Springer T.A.: Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 9448-9453
- [70] Ma Q., Jones D., Springer T.A.: The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity*, 1990; 10: 463-471
- [71] Mazur G., Jaskuła E., Kryczek I.: Udział chemokin w chorobach nowotworowych (The role of chemokines in neoplastic diseases). *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2004; 13: 315-325
- [72] Mirshahi F., Pourtau J., Li H., Muraine M., Trochon V., Legrand E., Vannier J., Soria J., Vasse M., Soria C.: SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis *in vitro* and *in vivo* models. *Thromb. Res.*, 2000; 99: 587-594
- [73] Mitchell P.J., Tjian R.: Transcriptional regulatory in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 1989; 245: 371-378
- [74] Moore M.A.: Putting the neo into neoangiogenesis. *J. Clin. Invest.*, 2002; 109: 313-315
- [75] Mukaida N., Shiroo M., Matsushima K.: Genomic structure of human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J. Immunol.*, 1989; 143: 1366-1371
- [76] Mulligan L.M., Kwok J.B., Healey C.S., Elsdon M.J., Eng C., Gardner E., Love D.R., Mole S.E., Morre J.K., Papi L., Ponder M.A., Telenius H., Tunnacliffe A., Ponder B.: Germ-line mutations of the RET proto-oncogen in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*, 1993; 363: 458-460
- [77] Murdoch C.: CXCR4 chemokine receptor extraordinaire. *Immunol. Rev.*, 2000; 177: 175-184
- [78] Murphy P.M., Baggiolini M., Charo I.F., Hebert C.A., Horuk R., Matsushima K., Miller L.H., Oppenheim J.J., Power C.A.: International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.*, 2000; 52: 145-176
- [79] Nagasawa T., Hirota S., Tachibana K., Takakura N., Nishikawa S., Kitamura Y., Yoshida N., Kikutani H., Kishimoto T.: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBS/SDF-1. *Nature*, 1996; 382: 635-638
- [80] Nagasawa T., Kikutani H., Kishimoto T.: Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 2305-2309
- [81] Onai N., Zhang Y., Yoneyama H., Kitamura T., Ishikawa S., Matsushima K.: Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakine. *Blood*, 2000; 96: 2074-2080
- [82] Ostrowski K. *Embriologia człowieka*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich 1988
- [83] Papayannopoulou T., Craddock C., Nakamoto B., Priestley G.V., Wolf N.S.: The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 9647-9651
- [84] Papayannopoulou T., Nakamoto B.: Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 9374-9378
- [85] Papayannopoulou T., Priestley G.V., Bonig H., Nakamoto B.: The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*, 2003; 101: 4739-4747
- [86] Peled A., Hardan I., Magic M., Zipori D., Lapidot T.: Enhanced engraftment by human SRC and CML cells and increased formation of primitive CFU-GEMM colonies in response to short interactions between CD34⁺ cell and BM stromal cells. *Blood*, 1999; 94: 557 (abstract)
- [87] Petit I., Szyper-Kravitz M., Nagler A., Lahav M., Peled A., Habler L., Ponomaryov T., Taichman R.S., Arenzana-Seisdedos F., Fujii N., Sandbank J., Zipori D., Lapidot T.: G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 687-694
- [88] Pojda Z., Strużyna J.: Cytometria przepływowa w badaniach komórek krwiotwórczych. *Central Eur. J. Immunol.*, 1996; 21: 114-118
- [89] Potocnik A.J., Brakebusch C., Fassler R.: Fetal and adult hematopoietic stem cells require $\beta 1$ integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity*, 2000; 12: 653-663
- [90] Ratajczak M.Z., Kucia M., Reza R., Majka M., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J.: Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells "hide out" in the bone marrow. *Leukemia*, 2004; 18: 29-40
- [91] Ratajczak M.Z., Majka M., Kucia M., Drukala J., Pietrzowski Z., Peiper S., Janowska-Wieczorek A.: Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells*, 2003; 21: 363-371
- [92] Reiss K., Mentlein R., Sievers J., Hartmann D.: Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience*, 2002; 115: 295-305
- [93] Romeo G., Ronchetto P., Luo Y., Barone V., Seri M., Ceccherini I., Pasini B., Bocciaardi R., Lerone M., Kááriäinen H., Marrucciello G.: Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, 1994; 367: 377-378
- [94] Rosenthal A., Goeddel D.V., Nguyen T., Lewis M., Shih A., Laramée G.R., Nikolics K., Winslow J.W.: Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron*, 1990; 4: 767-773
- [95] Rosu-Myles M., Bhatia M.: SDF-1 enhances the expansion and maintenance of highly purified human hematopoietic progenitors. *Hematol. J.*, 2003; 4: 137-145
- [96] Sawada S., Gowrishankar K., Kitamura R., Suzuki M., Suzuki G., Tahara S., Koito A.: Disturbed CD4⁺ T cell homeostasis and *in vitro* HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J. Exp. Med.*, 1998; 187: 1439-1449
- [97] Schmits R., Filmus J., Gerwin N., Senaldi G., Kiefer F., Kundig T., Wakeham A., Shahinian A., Catzavelos C., Rak J., Furlonger C., Zakarian A., Simard J.J., Ohashi P.S., Paige C.J., Gutierrez-Ramos J.C., Mak T.W.: CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood*, 1997; 90: 2217-2233
- [98] Schwartzberg L., Birch R., Blanco R., Wittlin F., Muscato J., Tauer K., Hazelton B., West W.: Rapid and sustained hematopoietic reconstitution by peripheral blood stem cell infusion alone following high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant.*, 1993; 11: 369-374
- [99] Sędzimirska M., Pacusko T., Klimczak A., Kichler O., Suchnicki K., Bochenska J., Mroz E., Dlubek D., Karabon L., Lange A.: Hematopoietic cell transplantation: activity and results of the BMT Unit K. Dłuski Hosp./Inst. Immun. & Exp. Therapy, Wrocław, Poland. *Bone Marrow Transplant.*, 1998; 4: S57-S59

- [100] Shibuta K., Begum N.A., Mori M., Shimoda K., Akiyoshi T., Bernard G.F.: Reduced expression of the CXC chemokine hIRH/SDF-1 α mRNA in hepatoma and digestive tract cancer. *Int. J. Cancer.*, 1997; 73: 656–662
- [101] Shirozu M., Nakano T., Inazana J., Tashiro K., Tada H., Shinohara T., Honjo T.: Structure and chromosomal localization of the human stroma cell-derived factor 1 (SDF-1) gene. *Genomics*, 1995; 28: 495–500
- [102] Smadja-Joffe F., Legras S., Girard N., Li Y., Delpech B., Bloget F., Morimoto K., Le Bousse-Kerdiles C., Clay D., Jasmin C., Levesque J.P.: CD44 and hyaluronan binding by human myeloid cell. *Leuk. Lymphoma*, 1996; 21: 407–420
- [103] Tachibana K., Hirota S., Iizasa H., Yoshida H., Kawabata K., Kataoka Y., Kitamura Y., Matsushima K., Yoshida N., Nishikawa S., Kishimoto T., Nagasawa T.: The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 1998; 393: 591–594
- [104] Tashiro K., Tada H., Heilker R., Shirozu M., Nakano T., Honjo T.: Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, 1993; 261: 600–603
- [105] Verfaillie C., Hurley R., Bhatia R., McCarthy J.B.: Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 1994; 16: 201–224
- [106] Vermeulen M., Le Pesteur F., Gagnerault M.C., Mary J.Y., Sainteny F., Lepault F.: Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 1992; 92: 894–900
- [107] Voermans C., Kooi M.I., Rodenhuis S., Van Der Lelie H., Van Der Schoot C.E., Gerritsen W.R.: *In vitro* migratory capacity of CD34⁺ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood*, 2001; 97: 799–804
- [108] Whetton A.D., Graham G.J.: Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends. Cell Biol.*, 1999; 9: 233–238
- [109] Wright D.E., Bowman E.P., Wagers A.J., Butcher E.C., Weissman I.L.: Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J. Exp. Med.*, 2002; 195: 1145–1154
- [110] Youn B.S., Mantel C., Broxmeyer H.: Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol. Rev.*, 2000; 177: 150–174
- [111] Zou Y., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D.R.: Function of the chemokine receptor CXCR4 in hematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 1998; 393: 595–599