

“Die Bedeutung der Stammzellnische bei myeloproliferativen Erkrankungen”

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Isabelle Leisten
aus Würselen

Berichter:
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Martin Zenke
Universitätsprofessorin Dr. med. Ruth Knüchel-Clarke

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einleitung	1
1.1 Die Stammzellnische des Knochenmarks	1
1.2 Mesenchymale Stromazellen	4
1.3 Komponenten der Knochenmarks-nische	6
1.3.1 Zelluläre Komponenten	6
1.3.2 Extrazelluläre Matrix und nichtzelluläre Komponenten	9
1.4 Myeloproliferative Neoplasien	11
1.5 Bedeutung der Stammzellnische für myeloproliferative Neoplasien	16
1.6 Modelle der Knochenmarks-nische in vitro und in vivo	19
2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	22
3. Material und Methoden	31
Materialien	24
3.1.1 Geräte	24
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	25
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	25
3.1.4 Gebrauchslösungen	27
3.1.5 Antikörper	27
3.1.6 Kits	29
3.1.7 Medien	29
3.1.8 Primer	31
3.1.9 Software	31
3.2 Methoden	31
3.2.1 Zellkultur	31
3.2.1.1 Isolation von humanen mesenchymalen Stromazellen aus Aspirat und Spongiosa	31
3.2.1.2 Isolation von humanen mesenchymalen Stromazellen aus der Nabelschnur	32
3.2.1.3 Kultivierung und Expansion von humanen mesenchymalen Stromazellen	32
3.2.1.4 Osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stromazellen	33
3.2.1.5 Isolation von murinen mesenchymalen Stromazellen	33
3.2.1.6 Isolation von humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut	34
3.2.1.7 Kultivierung von humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	34

3.2.1.8 Ko-Kultur von humanen mesenchymalen Stromazellen und hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	34
3.2.2 Dreidimensionale Kultivierungssysteme	35
3.2.2.1 Herstellung der Kollagengele	35
3.2.2.1.1 Versuchsaufbau zur Etablierung des dreidimensionalen Ko-Kultursystems	35
3.2.2.1.2 Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen von Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien in Kollagengelen	36
3.2.2.2 β -Tri-Kalziumphosphat-Scaffolds	37
3.2.2.2.1 Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen auf β -TCP-Scaffolds	38
3.2.2.2.2 Subkutane Transplantation der β -TCP-Scaffolds in C57BL/6 Mäuse	38
3.2.3 Histologische Analysen	39
3.2.3.1 Aufarbeitung der Proben	39
3.2.3.2 Histologische Analyse der explantierten β -TCP-Scaffolds	39
3.2.3.3 Erstellung eines Tissue Microarray	40
3.2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	40
3.2.3.5 Kalknachweis nach Kossa	40
3.2.3.6 Naphthol AS-D Chloro-Esterase Färbung	41
3.2.3.7 Retikulinfärbung	41
3.2.3.8 Immunhistochemie	42
3.2.3.9 Immunhistochemie an explantierten β -TCP-Scaffolds	43
3.2.3.10 Immunofluoreszenzfärbung	43
3.2.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	44
3.2.5 Bestimmung der Kalzium- und Phosphatkonzentration	44
3.2.6 Durchflusszytometrie	45
3.2.6.1 Bestimmung der Proliferationsrate von humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	45
3.2.6.2 Bestimmung des Phänotyps der humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	45
3.2.6.3 Bestimmung der Apoptoserate	46
3.2.6.4 Durchflusszytometrische Analyse der hämatopoetischen Zellen in explantierten β -TCP-Scaffolds	46
3.2.7 Molekularbiologische Methoden	47
3.2.7.1 RNA Isolation aus Kollagengelen	47
3.2.7.2 copyDNA Synthese	48

3.2.7.3 quantitative realtime Polymerasekettenrektion	49
3.2.8 Statistische Auswertung	49
4. Ergebnisse	50
4.1 Etablierung eines dreidimensionalen Kultivierungssystems zur Kokultivierung für mesenchymalen Stroma- und hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen	50
4.1.1 Migrationsverhalten der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	51
4.1.2 Proliferationsverhalten der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	52
4.1.3 Erhalt des CD34+ Phänotyps der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	56
4.1.4 Differenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	57
4.1.5 Apoptoserate der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	59
4.1.6 Einfluss osteogen differenzierter mesenchymaler Stromazellen im dreidimensionalen Kultivierungssystem	61
4.1.6.1 Matrixremodellierung im dreidimensionalen Kollagengel	63
4.1.6.2 Einfluss der osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen auf das Proliferationsverhalten der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	65
4.1.6.3 Einfluss der osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen auf den Erhalt der CD34+ CD38- Subpopulation	66
4.2 Die Bedeutung der Stammzellnische bei myeloproliferativen Erkrankungen	69
4.2.1 Vergleichende Analysen von MSC von MPN-Patienten hinsichtlich ECM-Remodellierung	69
4.2.2 Vergleichende Analysen von Knochenmarksstanzen	74
4.2.3 Analyse zur Ko-Lokalisation von CD271+ Stromazellen und Fibronectin	77
4.2.4 Vergleichende Analysen von Knochenmarksstanzen mittels Tissue Microarray	81
4.2.5 Hämatopoetischer Support durch MSC von CML-Patienten	88
4.3 Einfluss einer dreidimensionalen Kalzium/Phosphatstruktur auf Extrazellulärmatrixremodellierung und osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen als Implikation für eine extramedulläre Knochenmarks-nische	94
4.3.1 Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen auf β Tri-Kalziumphosphat-Scaffolds in vitro	94
4.3.2 Subkutane Transplantation der Kalziumphosphat-Scaffolds im Mausmodell	102

5. Diskussion	115
5.1. Das dreidimensionale kollagenbasierte Ko-Kultursystem als Modell der Knochenmarksnische in vitro	115
5.1.1. Einfluss der dreidimensionalen Ko-Kultivierung auf die CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen	115
5.1.2 Einfluss osteogener Differenzierung im Dreidimensionalen Kultivierungssystem	118
5.2. Die Bedeutung der Stammzellnische bei myeloproliferativen Neoplasien	120
5.2.1. Die Rolle des Stromas bei der ECM-Remodellierung	120
5.2.2. Hämatopoese-unterstützende Funktion eines veränderten Extrazellulärmatrix- Mikromilieus	123
5.3. β -Tri-Kalziumphosphat-Scaffolds als ektope Knochenmarksnische	126
6. Zusammenfassung	131
7. Abstract	132
8. Literaturverzeichnis	133
Anhang	145

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin
ABL	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog
ALP	Alkalische Phosphatase
AML	akute myeloische Leukämie
Angpt1	Angiopoetin 1
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin (APC) Cyanin 7 (Cy7)
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
β	beta
β- TCP	β- Tri- Calcium- Phosphat
BCR	breakpoint cluster region
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
C57BL/6 Maus	C57 black 6-Maus
Ca	Kalzium
CAE	Chloracetat-Esterase
CaR	Kalziumrezeptor
CAR-Zellen	CXCL12- abundant reticular Zellen
cDNA	copy DNA
CFSE	Carboxyfluorescein- Diacetat N- succinimidyl- Ester
CML	chronisch myeloische Leukämie
CT	Cycle Threshold
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12,
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
3D	3-dimensional

DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DABCO	1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbeccos modified eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-Methyltransferase 3 ^a
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	energiedispersiven Röntgenspektroskopie
ET	Essentielle Thrombozythämie
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calfserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLT-3-Ligand	Fms-related tyrosine kinase 3 Ligand
G	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GvHD	Graft-versus-Host-Reaktion (Graft-versus-Host-Disease)
HCl	Hydrogenchlorid
HE	Hämatoxilin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)

HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle
Hüft-TEP	Totale Endoprothese des Hüftgelenks
IL	Interleukin
ITP	Idiopathische Thrombozytopenie
JAK	Januskinase
Kitl	Kit-Ligand
KM	Knochenmark
L	Liter
LDH	L-Lactatdehydrogenase
LKC	leukämische Stammzelle
LSK	lineage- Sca1+ ckit+ Zellen
LT-HSC	long-term hämatopoetische Stammzelle
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
m	Milli (1×10^{-3})
M	Molar
μ	Mikro (1×10^{-6})
min	Minute
Mio	Million
Morb. Hodgk.	Morbus Hodgkin
MPL-Gen	Myeloproliferatives-Leukämie-Virus-Onkogen
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MPP	multi potente Progenitoren

MSC	Mesenchymale Stromazelle
n	Nano (1×10^{-9})
NaOH	Natronlauge
NGS	Normal Goat Serum
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
NOD/SCID-Maus	Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient Maus
OD	optische Dichte
P	Phosphat
PB	Pacific Blue
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase- Ketten- Reaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PerCp-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll Protein (PerCp) Cyanin 5.5 (Cy5.5)
PE-Cy7	Phycoerythrin (Pe) Cyanin 7 (Cy7)
PMF	Primäre Myelofibrose
PTH	Parathroidhormon
PV	Polyzythämia vera
rpm	rounds per minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	real time PCR
RunX2	Runt-related Transcription Factor 2
SCF	Stammzellfaktor (Stem Cell Factor)
SDF-1	stromal cell-derived factor 1

Sec	Sekunde
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
ST-HSC	short-term hämatopoetische Stammzelle
TCPS	Tissue culture plastic (Gewebekulturplastik)
TET2-Gen	Tet methylcytosine dioxygenase 2-Gen
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TMA	Tissue Microarray
TPO	Thrombopoetin
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA	Very Late Activation Antigen

1. Einleitung

1.1 Die Stammzellnische des Knochenmarks

Stammzellen sind charakterisiert durch ihr Selbsterneuerungs (durch Mitose)- und Differenzierungspotential, das durch das umliegende Mikromilieu, die sogenannte Stammzellnische reguliert wird (Ehninger und Trumpp, 2011). Somatische Stammzellen im adulten Organismus sind als multipotente Vorläuferzellen in hoch regenerativen Geweben, wie dem Gastrointestinaltrakt, der Haut und dem Blut verantwortlich für die kontinuierliche Produktion von neu ausdifferenzierenden Zellen und spielen eine entscheidende Rolle bei Selbsterneuerungsprozessen sowie bei Reparaturprozessen nach Gewebsverletzung.

Die hämatopoetische Stammzelle, die im Knochenmark lokalisiert ist, kann durch ihre Fähigkeit in alle Zelllinien des Blutes auszdifferenzieren die Hämatopoese ein Leben lang aufrechterhalten. Nach letaler Bestrahlung des Knochenmarks können hämatopoetische Stammzellen die Hämatopoese vollständig rekonstruieren und sie sind seriell transplantierbar, was ein Nachweis für die Selbsterneuerungskapazität der Stammzellen ist (Ehninger und Trumpp, 2010; Purton und Scadden, 2007).

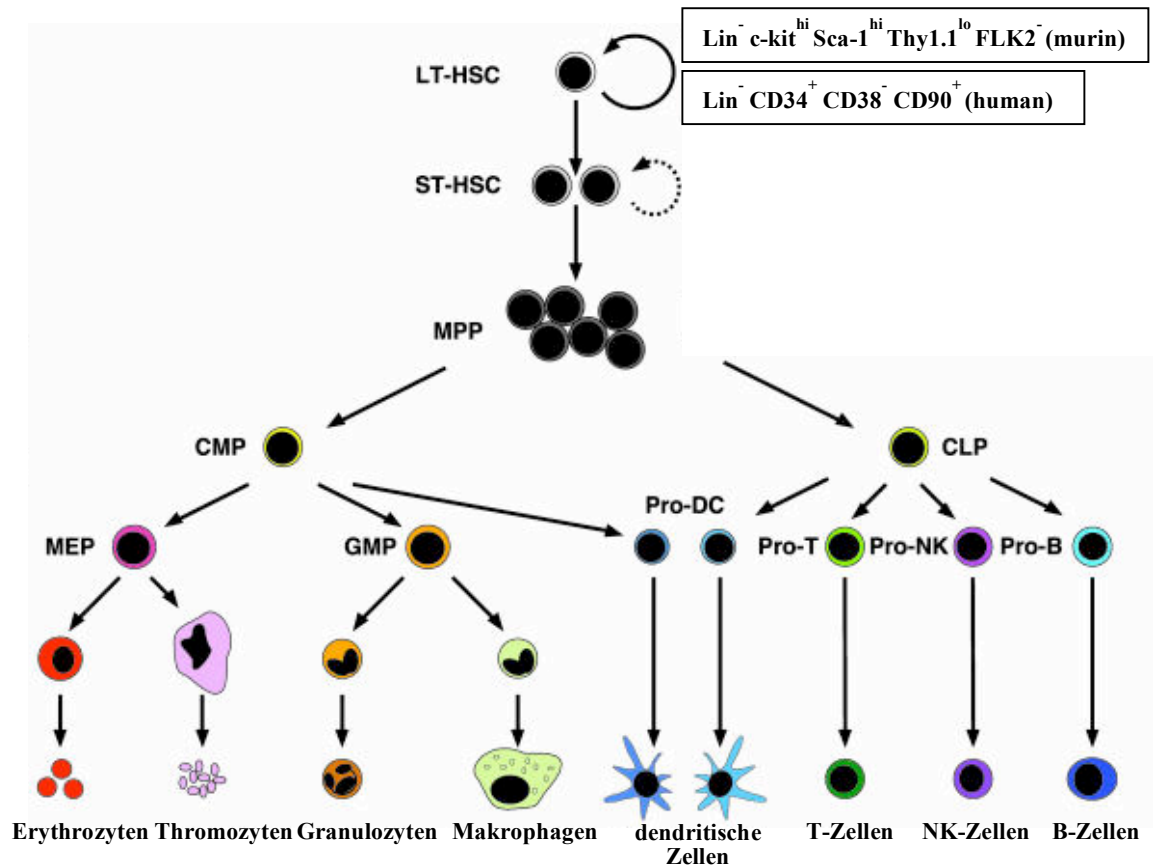


Abbildung 1: Bei hämatopoetischen Stammzellen werden *long-term* hämatopoetische Stammzellen (LT-HSC) und *short-term* hämatopoetische Stammzellen (ST-HSC) unterschieden. LT-HSC zeichnen sich durch ihr hohes Selbsterneuerungspotential aus und können die Hämatopoese über die gesamte Lebenszeit eines Organismus aufrechterhalten. Bei ST-HSC ist diese Fähigkeit hingegen auf einen kurzen Zeitraum begrenzt. Aus ihnen gehen die multipotenten Progenitorzellen (MPP) hervor, die wiederum in myeloide oder lymphoide Progenitorzellen differenzieren können und aus denen schließlich die reifen hämatopoetischen Zellen der myeloiden und lymphoiden Reihe hervorgehen (Passegue, 2003; Abbildung modifiziert nach Passegue, 2003).

Ontogenetisch stammt die hämatopoetische Stammzelle aus dem embryonalen Mesoderm. Dorsal in der embryonalen Aorta ist die sogenannte Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (aorta-gonad-mesonephros, AGM-Region) gelegen, wo die erste definitive Hämatopoese ab Tag 27 der Embryogenese zu finden ist. Ab Tag 40 migrieren die hämatopoetischen Stammzellen in die Leber. Von dort aus wandern die HSC schon während der Bildung der Knochenkavitäten in das Knochenmark, jedoch erst nachdem die Mineralisierung der extrazellulären Matrix durch die Osteoblasten eingeleitet wurde (Medvinsky und Dzierzak, 1996, Dzierzak, 1999). Dieser Zusammenhang lässt vermuten, dass verschiedene Komponenten eines komplexen Mikromilieus, der sogenannten Stammzellnische, an den regulatorischen Vorgängen der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark beteiligt sind (Adams und Scadden, 2006). Stammzellnischen des Knochenmarks sind funktionell als spezialisierte, zelluläre Strukturen definiert, die essentiell sind für die langfristige

Aufrechterhaltung des adulten hämatopoetischen Stammzellpools (Trumpp *et. al.*, 2010). Das Konzept einer Stammzellnische des Knochenmarks wurde erstmalig 1978 von Schofield beschrieben (Schofield *et. al.*, 1978). Schofield stellte die Hypothese auf, dass hämatopoetische Stammzellen nur im Knochenmark ihre Stammzeleigenschaften aufrechterhalten können. Stammzellen, die das Knochenmark verlassen verlieren dagegen ihre Fähigkeit die Hämatopoese aufrechtzuerhalten und sind gekennzeichnet durch fortschreitende Differenzierung. In den darauffolgenden Jahren lieferten vor allem bildgebende Studien neue Erkenntnisse zur Stammzellnische des Knochenmarks. So wurde beispielsweise in Arbeiten von Lord, Nilsson, Kiel, Haylock und Lo Celso die genaue Lokalisation der HSC und damit der Stammzellnische im Knochenmark untersucht. HSC konnten dabei sowohl in Assoziation zu den am Knochentrabekel anliegenden Osteoblasten in der sogenannten endostalen Region, als auch perivaskulär in Nähe der Sinusoide in der hochvaskularisierten Region zentral im Knochenmark identifiziert werden (Lord, 1990; Nilsson *et. al.*, 2001, Kiel *et. al.*, 2005; Haylock *et. al.*, 2007, Lo Celso *et. al.*, 2009). Die Arbeiten zeigten weiterhin, dass die Verteilung der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark nicht statisch ist, sondern vielmehr einem dynamischen Prozess unterliegt, bei dem verschiedene Subpopulationen von hämatopoetischen Zellen jeweils mit einem einzigartigen Mikromilieu assoziiert sind. Hämatopoetische Stammzellen in der G0 Phase, das heißt der Ruhephase des Zellzyklus, werden in Assoziation zur endostalen Nische beschrieben. Die perivaskuläre Nische hingegen scheint ein Mikromilieu für zirkulierende, aktive HSC zu bieten. Da Sinusoide auch nahe der endostalen Region zu finden sind, geht man davon aus, dass die unterschiedlichen Nischen in Verbindung stehen (Trumpp *et. al.*, 2010, Ehninger und Trumpp, 2011). Hämatopoetische Stammzellen können so als Antwort auf Stress und Verletzung oder auch durch Zytokinstimulation mobilisiert werden und in die Zirkulation eintreten. Im umgekehrten, als *Homing* bezeichneten Prozess werden die hämatopoetischen Stammzellen aus der Zirkulation in das Knochenmark rekrutiert. Sowohl bei der Mobilisation als auch beim *Homing* müssen die hämatopoetischen Stammzellen an den Endothelzellen der Sinusoide adhären und die Endothel-Extrazellulärmatrix-Barriere überschreiten. Eine bedeutende Rolle für diese bidirektionale Motilität der HSC spielt neben der Interaktion von $\beta 1$ -Integrinen mit extrazellulären Matrix-Proteinen und VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) auch die CXCL12/ CXCR4-Achse (Möhle *et. al.*, 1998; Petit *et. al.*, 2002; Lo Celso und Scadden, 2011). CXCL12 (SDF-1) wird von

verschiedenen mesenchymalen Zelltypen der Knochenmarksnische exprimiert und spielt außerdem eine entscheidende Rolle in der Regulation der hämatopoetischen Stammzellen, deren Selbsterneuerung und der Aufrechterhaltung des Stammzellpools (Wright, *et. al.*, 2001; Lapidot *et. al.*, 2005; Vagima *et. al.*, 2011, Greenbaum *et. al.*, 2013).

1.2 Mesenchymale Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen wurden erstmalig von Friedenstein und Mitarbeitern als Subpopulation von Zellen des Knochenmarks mit osteogenem Differenzierungspotential beschrieben (Friedenstein *et. al.*, 1968). 1991 führte Caplan den Begriff der mesenchymalen Stammzelle ein, der eine nicht-hämatopoetische Progenitorzelle des Knochenmarks mit Selbsterneuerungspotential beschreibt, die als Vorläuferzelle für Knochen, Knorpel und andere mesodermale Gewebe fungiert (Caplan *et. al.*, 1991; Frenette *et. al.*, 2013). Da es keinen spezifischen Marker für mesenchymale Stamm-/Stromazellen gibt und sie eine sehr heterogene Population darstellen, wurden von der internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) folgende Kriterien zur Identifizierung von mesenchymalen Stammzellen definiert: (1) MSC sind plastikadhärent und müssen (2) die Oberflächenmarker CD105, CD90 und CD73 exprimieren jedoch nicht die hämatopoetischen Marker CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 oder HLA-DR Oberflächenmoleküle. Desweiteren müssen MSC (3) *in vitro* in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenziert werden können (Dominici *et. al.*, 2006). Da das Differenzierungspotential und auch die Selbsterneuerungsfähigkeit der mesenchymalen Stromazellen abnehmen, wird der Terminus Stromazelle anstelle von Stammzelle bevorzugt. Laut der internationalen Gesellschaft für Zelltherapie können jedoch beide Termini verwendet werden.

Mesenchymale Stromazellen können aus verschiedenen Geweben gewonnen werden: Adulte mesenchymale Stromazellen können zum Beispiel aus Femurköpfen und Knochenmarksaspirat (Neuss *et. al.* 2004, 2008) oder auch aus Fettgewebe isoliert werden (Zuk *et. al.*, 2002). Eine Quelle für fetale MSC ist zum Beispiel das Wharton`s Jelly der Nabelschnur oder Plazentagewebe (Wang *et. al.* 2004; Kim *et. al.*, 2011), Amnionflüssigkeit (Nadri and Soleimani, 2007) oder Nabelschnurblut (Erices *et al.*, 2000). Die Isolation der mesenchymalen Stromazellen erfolgt konventionell über die Plastikadhärenz der Zellen. Eine alternative Methode ist die Isolation mittels Oberflächenmarkern, wobei verschiedene Marker (meist in Kombination, da es keinen

spezifischen Marker gibt) genutzt werden können: unter anderem STRO-1, CD146, CD105, ALP, CD49a und CD271 bei humanen mesenchymalen Stromazellen sowie Nestin, CD105, VCAM1 und CD90 in der Maus (Bianco *et. al.*, 2013)

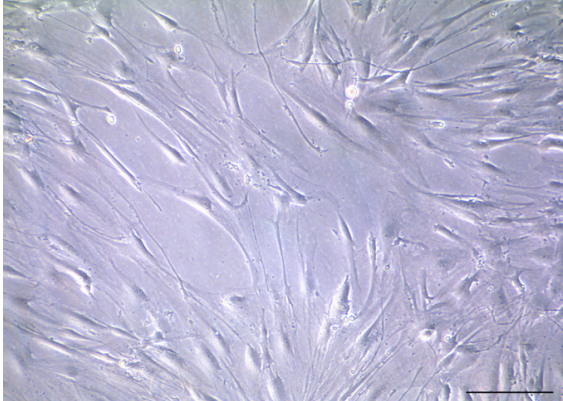


Abbildung 2: Mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks in Kultur. Die plastikadhärenten Zellen zeigen die typische spindelige Morphologie. Skala: 200µm.

Aufgrund ihres Differenzierungspotentials und ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften sind mesenchymale Stromazellen von großem Interesse für die regenerative Medizin oder auch für die Transplantationsmedizin (Frenette *et. al.*, 2013). Zur Zeit sind 352 klinische Studien auf der Seite des U.S. National Institutes of Health aufgeführt (<http://clinicaltrials.gov>, Stand September 2013), zum Beispiel zu MSC als Therapiemöglichkeit bei GvHD (*graft versus host disease*), Knochendefekten oder Myokardinfarkt (Le Blanc *et. al.*, 2004; Horwitz *et. al.*, 2002; Yang *et. al.*, 2010)

Werden mesenchymale Stromazellen *in vivo* transplantiert, können sie als skeletale Progenitoren einen heterotopen Knochen bilden, in dem extramedulläre Hämatopoese des Empfängertieres stattfindet. MSC haben zwei Funktionen: Zum einen schaffen sie das hämatopoetische Mikromilieu, zum anderen haben sie selbst regulatorische Funktionen in der hämatopoetischen Nische (Bianco *et. al.*, 2013).

Mesenchymale Zellen haben eine essentielle Bedeutung in der Knochenmarksnische und der Regulation der hämatopoetischen Stammzellen. So konnte *in vitro* der positive Einfluss der MSC auf die Erhaltung des primitiven Phänotyp der HSC und deren Expansion in Kultur gezeigt werden (Kadereit *et. al.*, 2002; Wagner *et. al.*, 2007). Die Ko-Kultivierung von hämatopoetischen Stammzellen mit mesenchymalen Stromazellen vor der hämatopoetischen Stammzell-Transplantation kann zu einem signifikant verbesserten *Engraftment* führen und auch die gleichzeitige Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen und mesenchymalen Stromazellen scheint das *Engraftment* des Transplantats und die Regeneration der Hämatopoese zu beschleunigen (Walenda *et. al.*, 2011;

Carrancio *et. al.*, 2012). Dieser positive Effekt der mesenchymalen Stammzellen bei Stammzelltransplantationen wird mittlerweile auch in klinischen Studien genutzt (Ball *et. al.*, 2007; Ning *et. al.*, 2008)

1.3 Komponenten der Knochenmarksnische

1.3.1 Zelluläre Komponenten

Seit der Definition der Stammzellnische durch Schofield (Schofield *et. al.*, 1978) ist es das Ziel zahlreicher Studien die entscheidenden Komponenten der Knochenmarksnische aufzuklären. Adams und Scadden beschreiben drei Hauptkomponenten, die das Knochenmark von anderen mesenchymalen Geweben unterscheidet: 1. einen nur im Knochen zu findenden mesenchymalen Zelltyp: die Osteoblasten, 2. die verschiedenen Bestandteile der extrazellulären Matrix und 3. der Kalziummineralgehalt des Knochens (Adams und Scadden, 2006). Die Lokalisation der hämatopoetischen Stammzellen in der Nähe zur endostalen Oberfläche und damit zu den Osteoblasten läßt eine essentielle Rolle dieses Zelltypes in der Nische vermuten. Die Bedeutung der Osteoblasten als wichtiger Bestandteil der Nische wurde erstmals *in vitro* durch Studien von Taichmann und Mitarbeitern bestätigt (Taichmann und Emerson, 1994, Taichmann *et al.*, 1996). Ihre Bedeutung für die hämatopoetische Stammzell-Nische wurde in den folgenden Jahren in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien weiter belegt (Calvi *et. al.*, 2003, Visnjic *et. al.*, 2004, Soki *et. al.*, 2013). Calvi *et. al.* konnten so im transgenen Mausmodell mit konstitutiv aktiven Parathyroid Hormon Rezeptor zeigen, dass vermehrte Knochen trabekel und trabekuläre Osteoblasten mit einer Erhöhung der HSC Zahl einhergehen. Eine Verringerung der Osteoblastenzahl hingegen führte zur Reduktion der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen sowie einer Hypozellularität des Knochenmarks und kompensatorischer extramedullärer Hämatopoese in der Milz (Visnjic *et. al.*, 2004). Eine Veränderung der Osteoblastenzahl hat jedoch nicht in jedem Fall einen Einfluss auf die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellen und deren Funktion (Frenette *et. al.*, 2013, Kiehl *et. al.*, 2007). Kiehl und Mitarbeiter verwendeten für ihre Studie Biglycan-defiziente Mäuse, deren Phänotyp durch eine fortschreitende Abnahme der Osteoblasten gekennzeichnet ist. Hierbei konnte keine Korrelation zwischen Osteoblastenzahl und Anzahl der HSC festgestellt werden. Mittlerweile geht man davon aus, dass auch Osteoblasten in verschiedenen Differenzierungsstadien vorliegen und vor allem die frühen osteogenen Progenitoren Einfluss auf die Regulation der hämatopoetischen Stammzellen

nehmen (Hogatt und Scadden, 2012).

In den letzten Jahren wurden weitere mesenchymale Zelltypen beschrieben, die eine Bedeutung in der Regulation der hämatopoetischen Stammzellen und der Aufrechterhaltung des Stammzellpools haben. In einer Studie aus dem Jahr 2010 konnten Méndez-Ferrer *et. al.* eine neue Gruppe von Nestin positiven MSC in der Maus identifizieren, die sowohl perivaskulär als auch in direkter Nähe zur endostalen Region zu finden sind und deren Ko-Lokalisation mit hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gezeigt werden konnte. Nestin-positive mesenchymale Stromazellen exprimieren verstärkt CXCL12, SCF, Angiopoetin-1 (Ang-1), IL-7, VCAM1 und Osteopontin, die alle essentielle Faktoren für die Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Stammzell-Pools sind (Mendez-Ferrer, 2010a). Neben den Nestin-positiven mesenchymalen Stromazellen wurden in Mäusen, in denen GFP vom endogenen *CXCL12* Locus aus exprimiert wird, die CAR (*CXCL12- abundant reticular*) Zellen als mesenchymale Vorläuferzellen mit adipo-osteogenem Differenzierungspotential identifiziert. Diese Zellen zeigen eine hohe Expression von CXCL12 und SCF und sind genau wie Nestin-positive mesenchymale Stromazellen vor allem zentral im Knochenmark aber auch in Assoziation zu Sinosoiden in der endostalen Region zu finden sind. CAR Zellen scheinen essentiell für die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen sowie lymphoiden und erythroiden Progenitoren und für die Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Stammzell-Pools zu sein (Sugiyama *et. al.*, 2006; Omatsu *et. al.*, 2010; Ehninger und Trumpp, 2011).

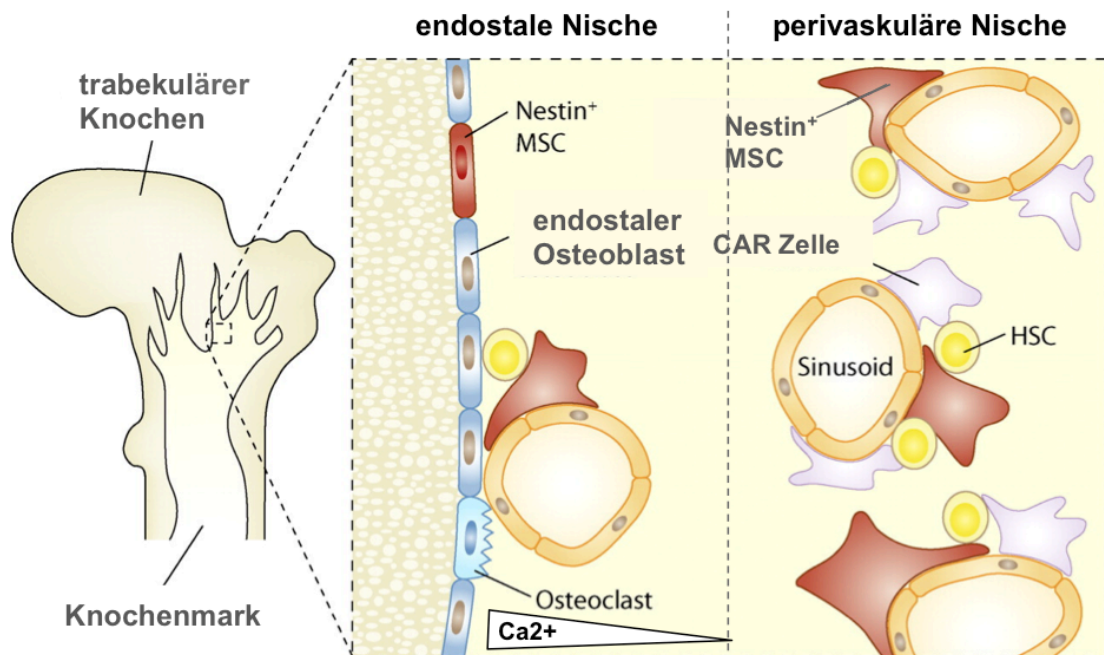


Abbildung 2: Die Stammzellnische des Knochenmarks. Hämatopoetische Stammzellen in der Ruhephase des Zellzyklus finden sich in der endostalen Region in Assoziation zu den Osteoblasten, die gekennzeichnet sind durch erhöhte Ca^{2+} Konzentrationen aufgrund von Knochenremodellierungsprozessen. Aktive hämatopoetische Stammzellen sind in der perivaskulären Region an den Sinusoiden zentral im Knochenmark lokalisiert, wo sie unter anderem mit den CAR-Zellen assoziiert sind, die die Selbsterneuerung und das Eintreten der HSC in die Zirkulation regulieren. Nestin⁺ mesenchymale Stromazellen sind sowohl in der endostalen Region als auch in der perivaskulären Nische zu finden und exprimieren wichtige Faktoren der Knochenmarksnische wie CXCL12 und SCF (Ehninger und Trumpp, 2012, Abbildung modifiziert nach Ehninger und Trumpp, 2012).

In einer Arbeit aus dem Jahr 2011 beschrieben Tormin und Mitarbeiter CD271 (*nerve growth factor receptor*) und CD146 (*melanoma cell adhesion molecule*) als Marker für humane mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks, die in Assoziation zu CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu finden sind. CD271⁺ CD45⁻ CD146⁺ mesenchymale Stromazellen sind perivaskulär im Knochenmark lokalisiert und CD271⁺ CD45⁻ CD146^{-/low} mesenchymale Stromazellen in der endostalen Region. Beide Zellfraktionen können *in vitro* als typische Stromazellen kultiviert werden und *in vivo* Knochen und die Hämatopoese unterstützendes Stroma bilden (Tormin *et. al.*, 2011).

Verschiedene mesenchymale Zelltypen spielen also eine bedeutende Rolle in der Knochenmarksnische und sind sowohl in der endostalen Region als auch perivaskulär zu finden. Jedoch nicht nur die mesenchymalen Zelltypen des Knochenmarks sondern auch andere zelluläre Komponenten wie Endothelzellen, sympathische Nerven und auch reife hämatopoetische Zellen ihrerseits haben regulierende Funktionen in der

Knochenmarksnische: So exprimieren auch Endothelzellen SCF, einen entscheidenden Faktor zur Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellen (Ding, *et. al.*, 2012; Broudy, 1997). Das sympathische Nervensystem reguliert die hämatopoetische Stammzell-Nische durch beta-Adrenerge Signale, die die CXCL12 Expression mesenchymaler Zellen beeinflussen (Hogatt und Scadden, 2013, Méndez-Ferrer *et. al.*, 2010b). Wie verschiedene Arbeiten gezeigt haben, ist die Regulation der Nische bidirektional, das heißt hämatopoetische Zellen nehmen ihrerseits Einfluss auf das sie umgebende Mikromilieu. So konnten Chow *et. al.* zeigen, dass eine Reduktion der Monozyten- und Makrophagenzahl zu einer verringerten Expression von CXCL12 sowie Angpt1, Kitl, und VCAM1 durch Nestin-positive Zellen im Knochenmark führt. Damit einhergehend konnte ein verstärktes Eintreten der HSC in die Zirkulation beobachtet werden. (Chow *et. al.*, 2010). Auch Megakaryozyten scheinen in direkten Kontakt mit Osteoblasten an der endostalen Oberfläche zu treten. Eine vermehrte Anzahl an Megakaryozyten führt zur Expansion der osteogenen Zellen (Dominici *et. al.*, 2009; Kacena *et. al.*, 2004). Diese bidirektionale Regulation zwischen nicht-hämatopoetischen und hämatopoetischen Zellen ist vor allem von großem Interesse, wenn es um hämatologische Erkrankungen geht und die Frage welchen Einfluss maligne hämatopoetische Zellen auf das Mikromilieu des Knochenmarks nehmen können und umgekehrt.

1.3.2 Extrazelluläre Matrix und nichtzelluläre Komponenten

Neben den zellulären Komponenten der Knochenmarksnische tragen auch die Bestandteile der extrazellulären Matrix und der Kalziummineralgehalt zum einzigartigen Mikromilieu des Knochenmarks bei (Adams und Scadden, 2006). Charakteristisch für die endostale Oberfläche sind die erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentrationen durch die dort stattfindenden Knochenremodellierungsprozesse. Hämatopoetische Zellen exprimieren den G-Protein gekoppelten Kalziumrezeptor (CaR), über den sie auf Änderungen der Ca⁺ Konzentration reagieren können und dessen Aktivierung die Migration *in vitro* und *in vivo* induziert. CaR^{-/-} hämatopoetische Stammzellen zeigen eine deutliche Defizienz in der endostalen Region zu lokalisieren, was mit einer defekten Adhäsion an das extrazelluläre Matrixprotein Kollagen I korreliert (Adams *et. al.*, 2006). Kollagen I ist im Knochenmark in der endostalen Region an den Trabekeln zu finden. Weitere wichtige Extrazellulärmatrix-Proteine der Knochenmarksnische sind Fibronectin, Kollagen IV, Laminin und Osteopontin. Fibronectin wird vor allem in der endostalen Region und auch

im zentralen Knochenmark exprimiert während Kollagen IV und Laminin an den Gefäßen im Knochenmark zu finden sind (Lam und Adams, 2010; Nilsson, 1998). Das Glycoprotein Osteopontin wird in hohen Konzentrationen von Osteoblasten an der endostalen Oberfläche exprimiert (Nilsson *et. al.*, 2005). Verschiedene Studien konnten die Bedeutung von beta-Integrinen, vor allem VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ Integrin) und VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$ Integrin) bei der Interaktion von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und zellulären Komponenten sowie Extrazellulärmatrix-Proteinen im Knochenmark zeigen. So exprimieren sowohl murine als auch humane hämatopoetische Stammzellen VLA-5 worüber sie an Fibronectin binden. Wurde die Bindestelle durch rekombinante Proteine oder einen anti-VLA-5 Antikörper geblockt, so führte dies zu einer verringerten Anzahl hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark (van der Loo *et. al.*, 1998; Lam und Adams, 2010). Zudem hat Fibronectin *in vitro* einen positiven Einfluss auf die Vitalität und Expansion von $CD34^+$ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und Megakaryozyten-Progenitoren (Deutsch *et. al.*, 2010). Auch die Interaktion von hämatopoetischen Stammzellen und Osteopontin ist essentiell für die Migration der hämatopoetischen Stammzellen zur endostalen Oberfläche. Osteopontin ist zudem ein negativer Regulator der hämatopoetischen Stammzell-Proliferation. So konnten Nilsson *et. al.* in OPN defizienten Knockout-Mäusen eine deutlich verringerte Anzahl von hämatopoetischen Stammzellen (lin-, Sca1+, kkit+, LSK) in der endostalen Region zeigen und eine erhöhte Anzahl von primitiven hämatopoetischen Progenitorzellen in der Zirkulation (Nilsson *et. al.*, 2005). Vor allem die durch Thrombin gespaltene Form von Osteopontin (trOPN) ist im murinen und humanen Knochenmark zu finden. Das N-terminale Fragment bindet an die Integrine $\alpha_9\beta_1$ und $\alpha_4\beta_1$, die beide von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen exprimiert werden (Grassinger *et. al.*, 2009). Zusammenfassend spielt Osteopontin eine bedeutende Rolle bei der Migration, Lokalisation und Retention der hämatopoetischen Stammzellen in der endostalen Nische. Die nichtzellulären Komponenten sind somit ein entscheidender Bestandteil des Mikromileus im Knochenmark. Sie geben der Knochenmarksnische ihre dreidimensionale Struktur und sind essentiell für die Regulation der hämatopoetischen Stammzellen sowie für Migration und *Homing* der hämatopoetischen Stammzellen in die Knochenmarksnische (Celebi *et. al.*, 2011)

1.4 Myeloproliferative Neoplasien

Myeloproliferative Neoplasien (MPN) wurden erstmals 1951 von dem Hämatologen William Dameshek beschrieben und bezeichnen eine Gruppe von Erkrankungen, die die hämatopoetischen Stammzellen betreffen. Sie sind charakterisiert durch die klonale Expansion von terminal differenzierten myeloiden Zellen. Nach der WHO Klassifikation aus dem Jahr 2008 werden folgende Entitäten unter dem Begriff MPN zusammengefasst: die chronisch myeloische Leukämie (CML), Polyzythämia vera (PV), essentielle Thrombozytämie (ET), primäre Myelofibrose (PMF), die chronisch neutrophile Leukämie, die chronisch eosinophile Leukämie, die Mastozytose sowie weitere nicht klassifizierbare MPN (Milosevic und Kralovics, 2012; Vardiman *et. al.*, 2009). CML, PV, ET und PMF werden auch als klassische MPN bezeichnet, wobei die CML charakterisiert ist durch das Vorliegen des BCR-ABL Fusionsgen und sich dadurch von den BCR-ABL negativen MPN unterscheidet (Vannucchi *et. al.*, 2009). Das BCR-ABL-Fusionsgen entsteht durch die Translokation (t9;22)(q34q11), auch bekannt als Philadelphia Chromosom. Durch die Translokation kommt es zur Fusion des *ABL*-Gens auf Chromosom 9 mit dem *BCL*-Gen auf Chromosom 22. Das Fusionsgen codiert eine konstitutiv aktive Thyrosinkinase, die eine aberrante Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in die myeloide Richtung induziert und ohne Behandlung schließlich zur Blastenkrise führt (Rice and Jamieson, 2010). Mit der Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms als Ursache der CML durch Nowell und Hungerford im Jahr 1960 wurde erstmals eine cytogenetische Aberration in Assoziation mit einer neoplastischen Erkrankung beschrieben (Nowell und Hungerford, 1960). Dies war die Grundlage für die Entwicklung einer gezielten Therapie (targeted therapy) von CML-Patienten in der chronischen Phase mit dem Thyrosinkinase-Inhibitor Imatinib. Bei einem großen Anteil von Patienten führt diese Therapie zur kompletten zytogenetischen Remission und molekularen Remission mit nicht oder kaum detektierbaren Mengen an BCR-ABL-Transkripten (Hehlmann *et. al.*, 2007).

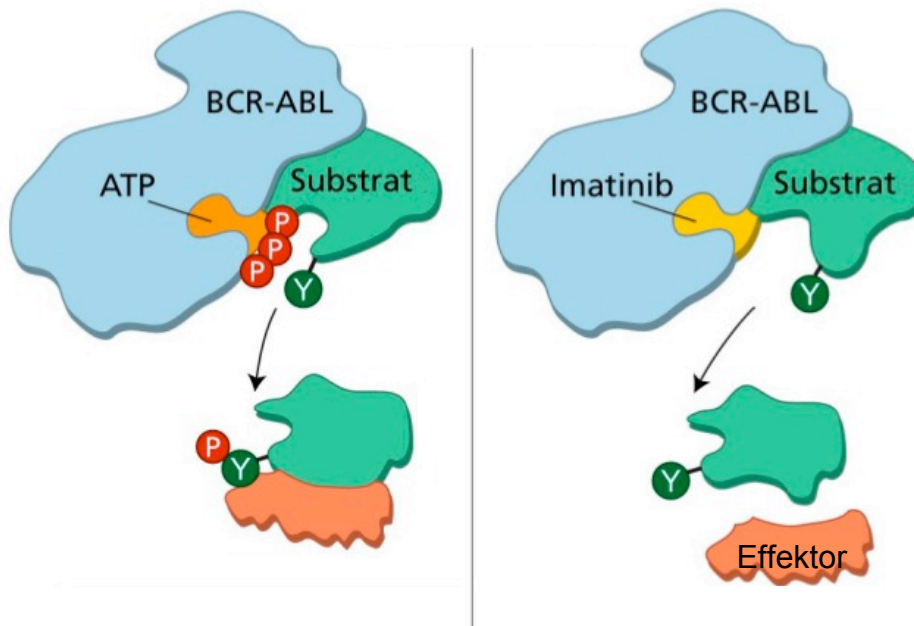


Abbildung 3: Wirkungsweise des Thyrosinkinase-Inhibitor Imatinib. Die konstitutiv aktive BCR-ABL Tyrosinkinase überträgt Phosphatreste von ATP auf Tyrosinreste verschiedener Substrate, was zu übermäßiger Proliferation von myeloiden Zellen führt. Imatinib blockiert die ATP-Bindestelle der BCR-ABL-Kinase und inhibiert so die Kinaseaktivität (Druker, 2008, Abbildung modifiziert nach Mughal und Goldman, 2006).

Bei Imatinib handelt es sich im Gegensatz zur allogenen Stammzelltransplantation nicht um eine kurative Therapie. Bei einigen Patienten stellt sich keine signifikante zytogenetische oder molekulare Remission ein und im fortgeschrittenen Stadium ist eine Resistenzentwicklung möglich. Nach Absetzen entwickelt ein großer Teil der Patienten ein Rezidiv (61% nach einer klinischen Studie von Mahon *et. al.*, 2010). Eine Hypothese für Rezidive ist die Therapieresistenz der sogenannten leukämischen Stammzellen (leukemic stem cell, LKC). Hierbei handelt es sich um eine Subpopulation von leukämischen Zellen mit Eigenschaften von hämatopoetischen Stammzellen. Leukämische Stammzellen haben die Fähigkeit der Apoptose oder dem angeborenen Immunsystem zu entgehen, sich selbst zu erneuern und sie können, nach Transplantation in NOD/SCID-Mäuse, die Erkrankung rekapitulieren, was ein Goldstandard zur Identifikation von leukämischen Stammzellen geworden ist (Rice and Jamieson, 2010).

Bei den BCR-ABL negativen MPN blieb der genetische Hintergrund lange Zeit unklar bis 2005 von verschiedenen Arbeitsgruppen die somatische Punktmutation V617F im *JAK2*-Gen (*JAK2V617F*) entdeckt wurde, die bei 95% der Patienten mit Polyzythämia vera und ca. 60% der Patienten mit essentieller Thrombozythämie und primärer Myelofibrose zu finden ist. Auch die Mutation *JAK2V617F* sowie weitere in Zusammenhang mit MPN beschriebene Mutationen im *JAK2*- oder im *MPL*-Gen, führen zur konstitutiven

Aktivierung von Thyrosinkinase abhängigen Signalwegen (Vannucchi *et. al.* 2009; Levine *et. al.*, 2005, Kralovics *et. al.*, 2005, Scott *et. al.*, 2007, Pardanani *et. al.*, 2006; Mullally *et. al.* 2010)

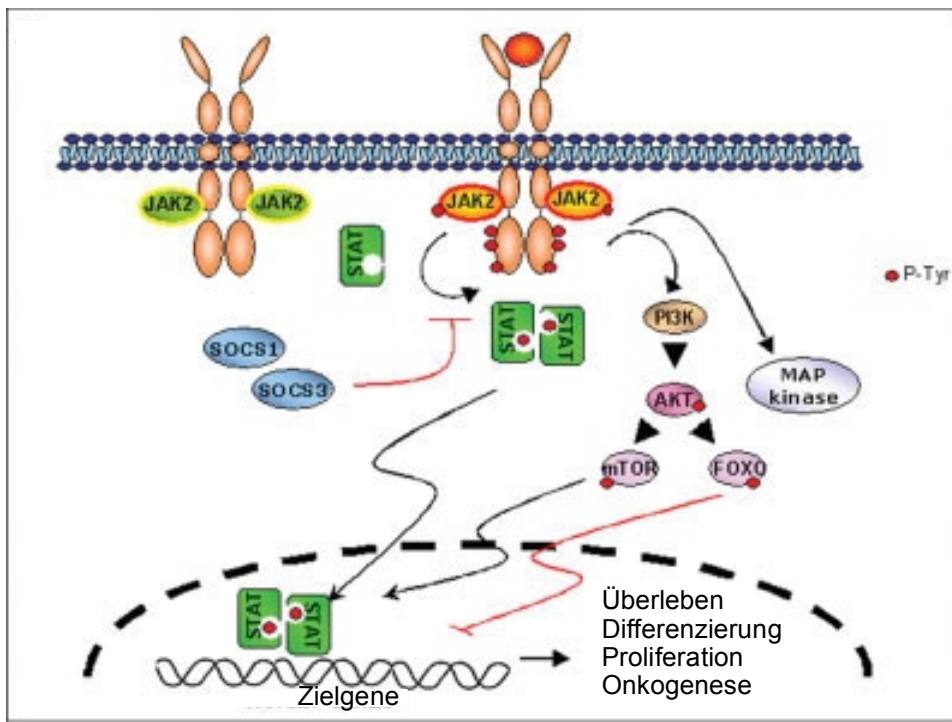


Abbildung 4: JAK-STAT Signalweg: Die Mitglieder der Januskinasen JAK1, JAK2, JAK3 und 2-Tyk2 besitzen 2 symmetrische Kinase-ähnliche Domänen: Die C terminale JH1 Domäne mit Tyrosinkinase Funktion und die enzymatisch inaktive JH2 Domäne. Im inaktiven Status sind Januskinasen mit dem cytoplasmatischen Ende von Typ 1 und 2 Zytokinrezeptoren assoziiert (z. B. Erythropoetinrezeptor oder Thrombopoetinrezeptor). Nach Binden eines Liganden an den Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung der JAK und Aktivierung durch Phosphorylierung von Tyrosinresten an der zytoplasmatischen Domäne. Im Gegenzug phosphorylieren die aktivierten JAKs Tyrosinreste an der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren, was zur Rekrutierung von inaktiven STAT Monomeren führt. Nach Phosphorylierung durch JAK dimerisieren die STAT Monomere und werden so aktiviert. Nach Translokation der STAT-Dimere in den Nukleolus binden sie an spezifische DNA-Sequenzen in der Promotorregion von Zielgenen und induzieren deren Expression. Aktivierung von JAK2 führt außerdem zur Aktivierung von MAP-Kinasen und dem AKT/mTOR/FOXO Signalweg, der eine Rolle spielt bei Überleben, Proliferation und Differenzierung der Zelle (Vannucchi *et. al.*, 2009, Abbildung modifiziert nach Vannucchi *et. al.*, 2009).

Die gezielte Therapie mit JAK2-Inhibitoren zeigte jedoch weniger Effekt im Vergleich zur Therapie der CML mit Imatinib, was möglicherweise auch auf die Heterogenität der BCR-ABL negativen MPN zurückzuführen ist (Hubbeling *et. al.*, 2012). So sind mittlerweile zahlreiche weitere Mutationen in Zusammenhang mit ET, PV und PMF beschrieben worden wie Mutationen im *TET2*- und *DNMT3A*-Gen, die in Zusammenhang mit aberranter DNA-Methylierung stehen (Abdel-Wahab *et. al.*, 2012). Zudem ist immer

noch nicht genau geklärt wie die Mutation JAK2V617F zu unterschiedlichen klinischen Phänotypen wie ET, PV oder PMF führen kann.

Chen *et. al.* konnten zeigen, dass die *JAK2* Mutation bei Patienten mit ET zu einer Aktivierung von STAT1 führt im Gegensatz zu mutiertem *JAK2* bei PV-Patienten. Möglicherweise ist also ein Grund für die unterschiedlichen klinischen Phänotypen die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege *downstream* von JAK2 (Abdel-Wahab *et. al.*, 2012, Chen *et. al.*, 2010).

Patienten mit ET und PV haben aufgrund des relativ milden klinischen Krankheitsbildes zunächst eine nur moderate Einschränkung der Lebenserwartung, leiden jedoch häufig unter schweren Komplikationen in Zusammenhang mit der Erkrankung, wie Thrombosen oder schweren Blutungen. Zudem besteht die Gefahr der Entwicklung einer post-PV oder post-ET Myelofibrose oder der Transformation in eine akute myeloische Leukämie (AML). Patienten mit primärer Myelofibrose haben im Gegensatz dazu von vorneherein eine deutlich schlechtere Prognose mit einem medianen Überleben von 5 Jahren nach Diagnosestellung. Haupttodesursachen sind hier unter anderem Leber- und Milz-Thrombosen, Herzinsuffizienz, Infektionen aufgrund der Knochenmarksinsuffizienz, Blutungen durch Thrombozythopenie und die Transformation zur AML (Vannucchi *et. al.*, 2009).

Tabelle 1: Diagnosekriterien der WHO aus dem Jahr 2008 (modifiziert nach Vannucchi et. al., 2009)

	Polyzythämie vera	Essentielle Thrombozythämie	Primäre Myelofibrose
Hauptkriterien	<p>1. Hämoglobin >18,5 g/dL (Männer) oder >16,5 g/dL (Frauen) oder Hämoglobin oder Hämatokrit >99th Perzentile oder Hämoglobin >17g/dL (Männer) oder >15g/dL (Frauen) wenn eine fortwährende Zunahme dokumentiert ist und nicht in Zusammenhang mit der Aufnahme eines Eisenpräparates steht oder erhöhte Menge Erythrozyten >25% über dem Durchschnitt 2. Vorliegen einer JAK2V617F Mutation oder JAK2 Exon 12 Mutationen</p>	<p>1. erhöhte Thrombozythenzahl $\geq 450 \times 10^9 / L$ 2. Vermehrte Anzahl vergrößerter, reifer Megakaryozythen im Knochenmark. Keine Vermehrung oder Linksverschiebung der neutrophilen Granulopoiese oder Erythropoiese 3. erfüllt nicht die Diagnosekriterien für PV, PMF, CML, MDS oder andere myeloide Neoplasien 4. Nachweis der JAKV617F Mutation oder anderer klonaler Marker oder kein Hinweis auf eine reaktive Thrombozytose</p>	<p>1. Vermehrte Anzahl atypischer Megakaryozyten begleitet von einer Retikulin- und/ oder Kollagenfibrose oder wenn keine Fibrose vorliegt: Veränderungen der Megakarozyten zusammen mit erhöhter Knochenmarkszellularität, granulozytärer Proliferation und oft verringerte Erythropoiese (prefibrotische Phase) 2. entspricht nicht den Kriterien für CML, PV, MDS oder anderer myeloider Neoplasie 3. Nachweis einer JAK2V617F Mutation oder anderem klonalem Marker oder kein Nachweis einer reaktiven Knochenmarksfibrose</p>
Nebenkriterien	<p>1. dem Alter entsprechend hyperzelluläres Knochenmark mit erhöhter Anzahl aller drei Reihen 2. Erythropoietin-Spiegel im Serum unterhalb des Normbereichs 3. Wachstum endogener erythroider Kolonien <i>in vitro</i></p>		<p>1. Leukoerythroblastose 2. erhöhtes Serum LDH 3. Anämie 4. Tastbare Splenomegalie</p>

Bei der Myelofibrose kommt es zur verstärkten Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix in den Markräumen des Knochenmarks und damit zu einer Verödung des Knochenmarks. Man geht davon aus, dass eine veränderte Produktion von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF (*platelet-derived growth factor*), TGF- β (*transforming growth factor beta*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) durch maligne hämatopoetische Zellen, vor allem durch Megakaryozyten, mesenchymale Zellen im Knochenmark aktiviert und so zur Myelofibrose führt (Lataillade *et. al.*, 2008). In der Routinediagnostik wird zur Bestimmung des Myelofibrosegrades von Knochenmarksbiopsien eine Silberfärbung (Retikulinfärbung) oder Trichrom-Färbung (Färbung von Kollagen Typ I Fasern) durchgeführt. Eine Retikulinfibrose kann in Zusammenhang mit verschiedenen benignen und malignen Erkrankungen auftreten, während eine Vermehrung von Kollagen Typ I Fasern vor allem bei Knochenmarksmetastasen und späten Stadien von myeloproliferativen Erkrankungen detektiert wird und im Gegensatz zur Retikulinfibrose nicht reversibel ist (Kuter *et. al.*, 2007).

Barbui *et. al.* konnten zeigen, dass beginnende Retikulinfibrose bei PV-Patienten bei Erstdiagnose von prognostischer Relevanz für den weiteren Krankheitsverlauf ist. Patienten mit Retikulinfibrose entwickelten deutlich häufiger eine Splenomegalie und post-PV-Myelofibrose (Barbui *et. al.*, 2012). Auch in der CML ist Fibrose des Knochenmarks mit einer schlechteren Prognose verbunden, auch wenn die Fibrose unter Imatinibtherapie zunächst reversibel ist (Thiele, J. und Kvasnicka, 2006; Buesche *et. al.*, 2007). Bei Patienten mit anfänglicher Fibrose kann deutlich seltener eine zytogenetische Remission erzielt werden und es kommt signifikant häufiger zu Therapieversagen und Fortschreiten der Erkrankung in die akzelerierte Phase. Veränderungen des Stroma haben also eine wichtige prognostische Bedeutung für myeloproliferative Neoplasien und sind verbunden mit der Progression der Erkrankung (Tripodo *et. al.*, 2011)

1.5 Bedeutung der Stammzellnische für myeloproliferative Neoplasien

Die feinabgestimmten Interaktionen zwischen den verschiedenen zellulären und nicht-zellulären Komponenten der Knochenmarksnische sind essentiell für die Regulation der hämatopoetischen Stammzellen und die Aufrechterhaltung des Stammzellpools. Verschiedene Studien geben Hinweise darauf, dass Alterationen der komplexen bidirektionalen Interaktionen im Mikromilieu des Knochenmarks bei der Entstehung, Progression und Therapieresistenz von hämatologischen Erkrankungen entscheidend sind

(Walkley *et. al.*, 2007, Lane *et. al.*, 2009). Auch bei den myeloproliferativen Neoplasien scheint eine Beteiligung des Mikromilieus, vor allem des Stromas am pathophysiologischen Prozess wahrscheinlich. Dies wird vor allem am Krankheitsbild der primären Myelofibrose deutlich, die geprägt ist durch extramedulläre Hämatopoese mit fortschreitender Hepatosplenomegalie aufgrund der Mobilisation von hämatopoetischen Progenitorzellen aus dem Knochenmark in die Milz und Leber. Dies ist assoziiert mit signifikanten Veränderungen des Stroma in Knochenmark und Milz, gekennzeichnet durch die Entwicklung von Myelofibrose, Osteosklerose und Neoangiogenese im Verlauf der Erkrankung (Teman, *et. al.*, 2010; Lataillade *et. al.*, 2008). Mitverantwortlich für die verringerte Retention der hämatopoetischen Stammzellen in der Knochenmarksnische und die Stammzellmobilisation zu Milz und Leber scheinen Alterationen der CXCR4/CXCL12 Achse zu sein. Hämatopoetische Stammzellen von PMF-Patienten exprimieren verringerte Mengen an CXCR4 und aktives CXCL12 liegt in geringeren Mengen im Knochenmark vor aufgrund der vermehrten Aufnahme durch dysplastische Megakaryozyten und der Wirkung von Metalloproteinasen (Tripodo *et. al.*, 2011).

Daten aus einer Studie von Tripodo *et. al.* legen zudem eine Beteiligung von CD146+ Osteoprogenitoren an den pathophysiologischen Veränderungen des Stromas bei PMF-Patienten nahe. In fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung korreliert ein Fortschreiten der Fibrose und eine vermehrte Mikrovaskularisierung des Knochenmarks mit einer signifikant erhöhten Anzahl an CD146+ Zellen. Durch Sekretion von Kollagen und Retikulin könnten diese Osteoprogenitoren direkt am Prozess der Myelofibrose beteiligt sein und über den Angiopoitin/Tie2 Signalweg die Neoangiogenese unterstützen (Tripodo *et. al.*, 2009).

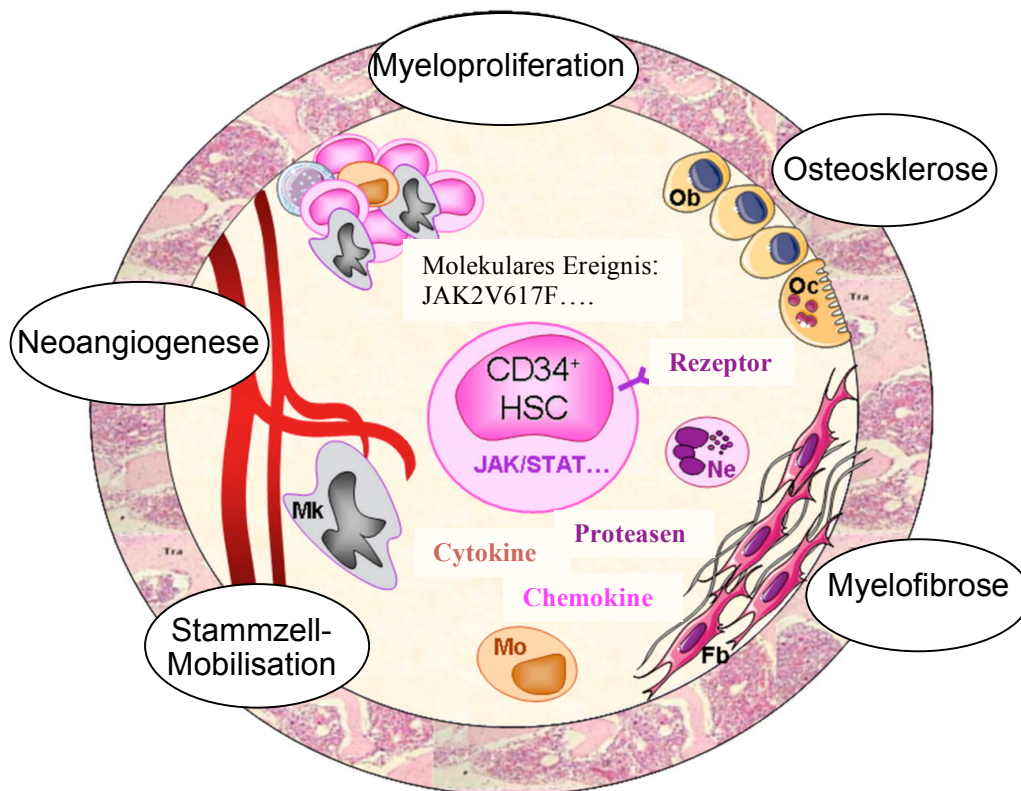


Abbildung 5: Mögliche Mechanismen bei der Pathogenese der MPN: Veränderte Interaktionen zwischen hämatopoetischen Zellen und Stroma führen zu einer veränderten Zytokinproduktion durch den malignen hämatopoetischen Klon. Dadurch werden Stromazellen und Endothelzellen aktiviert, was zur Entstehung von Myelofibrose, Osteosklerose und Neoangiogenese führt. Eine verringerte Adhäsion zum Stroma durch eine veränderte Produktion von Proteasen begünstigt das Eintreten von hämatopoetischen Stammzellen in die Zirkulation und Migration in Leber und Milz. Maligne hämatopoetische Zellen scheinen einerseits das sie umgebende Mikromillieu zu beeinflussen und verändern, andererseits spielt jedoch auch das Mikromillieu selber eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des malignen Klons (Lataillade *et. al.*, 2008, Abbildung modifiziert nach Lataillade *et. al.*, 2008).

Im Mausmodell konnten Raajmakers und Mitarbeiter erstmalig zeigen, dass Aberrationen in Osteoprogenitoren einen signifikanten Krankheitsphänotyp induzieren können. In dem Mausmodell wurde die Endonuklease *Dicer1* durch Verpaarung mit *Osterix-Cre*-Mäusen gezielt in Osteoprogenitoren deletiert. Die hämatologische Aufarbeitung zeigte Dysplasien, insbesondere in der myeloiden Reihe und in Einzelfällen eine akute myeloide Leukämie mit myeloiden Blasten, im Sinne eines myelodysplastischen Syndroms (Raajmakers *et. al.*, 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *VEGF* in osteochondrogenen Progenitoren zu einem der PMF sehr ähnlichen Phänotyp im Mausmodell mit Knochenmarksfibrose, erhöhter Anzahl an zirkulierenden hämatopoetischen Progenitoren, Splenomegalie und Megakaryozytose führt (Maes *et. al.*, 2010).

Auch in mesenchymalen Stromazellen von Leukämiepatienten konnten genetische Aberrationen nachgewiesen werden, was einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung des Stromas am pathophysiologischen Prozess gibt. Die in den Stromazellen detektierten Aberrationen unterschieden sich jedoch von denen in den hämatopoetischen Stammzellen. Die für die Erkrankungen charakteristischen Aberrationen wurden in den Stromazellen nicht nachgewiesen (Blau *et. al.*, 2011; Zhao *et. al.*, 2006; Pieri *et. al.*, 2008). Veränderungen des Stroma sind also nicht ursächlich für die Erkrankungen sondern als reaktive Veränderung zu sehen, die jedoch zum malignen Mikromilieu beitragen können. Erst kürzlich konnten Passegue und Mitarbeiter die bidirektionalen Veränderungen zwischen Stromazellen und hämatopoetischen Zellen in der leukämischen endostalen Stammzellnische weiter aufklären. In dieser Studie konnte im transgenen Mausmodell gezeigt werden, dass leukämische myeloide Zellen die multipotenten Stromazellen stimulieren funktionell veränderte Osteoblasten vermehrt zu bilden, die zur Entstehung einer Knochenmarksfibrose beitragen. Zudem zeigten diese veränderten Osteoblasten eine eingeschränkte Fähigkeit die normale Hämatopoese zu unterstützen. Leukämische hämatopoetische Stammzellen schienen dagegen nicht durch die negativen Effekte der Osteoblasten beeinflusst zu werden (Schepers *et. al.*, 2013).

Die angeführten Studien belegen das pathogene Potential von Veränderungen des Stromas des Knochenmarks und machen die nicht-hämatopoetischen Komponenten der Knochenmarks-nische zu interessanten Zielen für neue Therapieansätze. Die Frage nach der eigentlichen Ursache der Myelofibrose bleibt jedoch immer noch offen und könnte sowohl die hämatopoetischen Zellen als auch das sie regulierende Mikromilieu betreffen.

1.6 Modelle der Knochenmarks-nische *in vitro* und *in vivo*

Aufgrund der komplexen Interaktionen in der Knochenmarks-nische ist es eine große Herausforderung diese Prozesse *in vitro* zu untersuchen. Um hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen *in vitro* zu kultivieren und analysieren zu können, müssen die regulierenden Komponenten der Knochenmarks-nische auch *in vitro* gegeben sein. Dexter *et. al.* beschrieben erstmalig die Möglichkeit Stromazellen des Knochenmarks als Feederlayer zu verwenden, um die Hämatopoese in einem *ex vivo* System zu unterstützen (Dexter *et. al.*, 1973; 1977) Doch diese zweidimensionale Kultivierung lässt die dreidimensionale Struktur der Knochenmarks-nische als wichtige Eigenschaft außer Acht (Bianco *et. al.*, 2011). Dreidimensionale Kultivierungssysteme kommen der komplexen *in*

in vivo Situation dagegen deutlich näher als eine konventionelle zweidimensionale Ko-Kultur von Stromazellen und hämatopoetischen Zellen. Mittlerweile wurden verschiedene Ansätze beschrieben, um in dreidimensionalen Kultursystemen vor allem den Erhalt und die Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen *in vitro* zu verbessern. Eine Möglichkeit der dreidimensionalen Kultivierung ist die Formierung von MSC-Agregaten unter nicht-adhärenenten Kultivierungsbedingungen, die dann zur Ko-Kultivierung mit hämatopoetischen Stammzellen genutzt werden können (de Barros *et. al.*, 2010). Cook *et. al.* konnten zeigen, dass diese Form der Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen zu einer signifikant höheren Expression von wichtigen Faktoren der Knochenmarksnische wie von Angiopoietin 1, SCF, jagged-1 und SDF-1 führt verglichen mit einer konventionellen zweidimensionalen Kultivierung der MSC auf Zellkulturplastik. In Ko-Kultur mit murinen hämatopoetischen Stammzellen (LSK) konnte so zudem ein deutlich höherer Anteil hämatopoetischer Stammzellen erhalten bleiben (Cook *et. al.*, 2012).

Eine weitere Möglichkeit der dreidimensionalen Kultivierung bietet die Verwendung von Scaffolds mit definierter Struktur und Porosität aus unterschiedlichen Materialien wie zum Beispiel synthetischen Polymeren wie PET (Polyethylen Terephthalat), PCL (Polycaprolacton) oder PLGA (Polylactid-co-Glycolid) oder biologischen Materialien wie Kollagen oder Fibrin. Feng *et. al.* koppelten PET (Polyethylen Terephthalat)-Scaffolds mit dem Extrazellulärmatrixprotein Fibronectin. So war ein wichtiger Bestandteil der ECM-Matrix der Knochenmarksnische in einem dreidimensionalen Modell gegeben, was zu einem verbesserten Erhalt an CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen führte (Feng *et. al.*, 2006). Ferreira *et. al.* verglichen verschiedene dreidimensionale Scaffolds in Hinblick auf die Expansion von CD34+ Progenitoren und Transplantationseffizienz der expandierten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Mausmodell. Hierbei zeigte sich vor allem der positive Effekt von dreidimensionalen Fibringelen (Ferreira *et. al.*, 2012).

Soll die Rolle des Mikromilieu *in vivo* untersucht werden, stellt sich das Problem, dass das Mikromilieu des Knochenmarks nicht transplantierbar ist und auch die direkte Transplantation von mesenchymalen Stromazellen nach Injektion in das Knochenmark nicht effizient ist (Chen *et al.* 2012). Um dieses Problem zu umgehen kann durch subkutane Transplantation von Scaffolds zusammen mit zum Beispiel mesenchymalen Stromazellen eine ektope Knochenmarksnische geschaffen werden in der extramedulläre

Hämatopoese stattfindet (Sacchetti *et. al.*, 2007, Groen *et. al.*, 2012, Chen *et. al.*, 2012). Groen *et. al.* verwendeten beispielsweise mit mesenchymalen Stromazellen besiedelte biphasische Kalziumphosphat-Scaffolds zur subkutanen Transplantation im Mausmodell. So konnte eine ektope Knochenmarksnische geschaffen werden, in der extramedulläre Hämatopoese unterstützt wird. Solche ektopen Knochenmarksnischen bieten die Möglichkeit potentielle Komponenten des Knochenmarksmikromilieu auf ihre Funktion in der Nische zu untersuchen und pathophysiologische Vorgänge *in vivo* zu analysieren.

2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Um die regulatorischen Prozesse der Knochenmarksnische sowie pathophysiologische Prozesse *in vitro* in einem definierten System untersuchen zu können, ist die konventionelle Kultur von Stromazellen und hämatopoetischen Zellen eher ungeeignet, da hierbei die Dreidimensionalität und die nichtzellulären Komponenten der Nische außer Acht gelassen werden. Erkrankungen wie die myeloproliferativen Neoplasien sind oft verbunden mit Veränderungen des Mikromilieus wie der Entwicklung einer Myelofibrose, Osteosklerose oder Neoangiogenese. In der vorliegenden Arbeit wird ein dreidimensionales Ko-Kultursystem für mesenchymale Stromazellen und hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen etabliert, welches die entscheidenden Komponenten der Knochenmarksnische darstellt und geeignet ist, Veränderungen des Knochenmarkmikromilieus bei pathophysiologischen Prozessen zu untersuchen (Leisten *et. al.*, 2012). Dazu wird ein schon zuvor für die dreidimensionale Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen entwickeltes kollagenbasiertes Modell verwendet, welches zu einem großen Anteil aus Kollagen I, einem Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des Knochenmarks besteht (Schneider *et. al.*, 2010a, Schneider *et. al.*, 2010b).

Bezüglich des kollagenbasierten, dreidimensionalen Kultivierungssystems ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Kann mit dem dreidimensionalen Kollagengel ein geeignetes Ko-Kultursystem für mesenchymale Stromazellen und CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen geschaffen werden?
2. Welchen Einfluss hat die dreidimensionale Kultivierung auf die CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Bezug auf Proliferation, den Erhalt des primitiven Phänotyp, Liniendifferenzierung und Apoptose?
3. Wird durch die mesenchymalen Stromazellen das ECM-basierte Mikromilieu der Knochenmarksnische *in vitro* wiedergegeben?

Das dreidimensionale Modell der Knochenmarksnische *in vitro* wurde anschließend angewendet, um Veränderungen des Mikromilieus bei myeloproliferativen Erkrankungen zu untersuchen.

Hierbei sollen die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

1. Zeigen mesenchymale Stromazellen von Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien ein verändertes Potential hinsichtlich der Extrazellulärmatrix-Remodellierung im Hinblick auf die Myelofibroseeentstehung?
2. Welche Bedeutung haben die gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Entstehung und der Diagnose der Myelofibrosee?
3. Welchen Einfluss hat ein verändertes Mikromilieu auf die Hämatopoese?

Abschließend wurde in Hinblick auf spätere *in vivo* Versuche unter Verwendung einer Kalziumphosphatkomponente ein Modell der Knochenmarksnische etabliert, welches sich für die subkutane Transplantation eignet.

Dabei lag der Fokus auf folgender Fragestellung:

1. Sind die Kalziumphosphat-Scaffolds geeignet zur Besiedlung mit mesenchymalen Stromazellen?
2. Kann durch subkutane Transplantation im Mausmodell eine ektope Knochenmarksnische geschaffen werden, in der extramedulläre Hämatopoese stattfindet?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Ausgießstation Histocentre™	ThermoScientific, Waltham, USA
Autoklav	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Dako Autostainer Plus	Dakocytomation, Fort Collins, USA
Durchflusszytometer FACSCanto™ II	Becton Dickinson, San Diego, USA
Einbettautomat Pathcentre	ThermoScientific, Waltham, USA
Eindeckelautomat Tissue Tek Prisma	Sakura, Torrance, USA
Elektronenmikroskop (EDAX Falcon Genesis)	FEI Philips, Eindhoven, Niederlande
Heizblock DRI-BLOCK DB-2A	Techne, Burkhardtsdorf, Deutschland
Inkubator 20% O ₂ , 5% CO ₂ , 37°C	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Konfokalmikroskop mit Argon Ionen Laser	Zeiss, Jena, Deutschland
MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop Axioplan 2	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
pH-Elektrode	Knick, Reutlingen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Köln, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Reinraumwerkbank Herasafe	Heraeus/Kendro, Düsseldorf, Deutschland
Rotationsmikrotom RM2145	Leica, Wetzlar, Deutschland
Rührer/Heizplatten	IKA, Staufen, Deutschland
Tecan Reader infinite M200	Crailsheim, Deutschland
TMArrayer	Pathology Devices, Inc, Westminster, USA
Vacunsafe comfort Absaugsystem	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Vortex Minishaker MS2	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Waage Feinwaage A120S	Satorius Analytic, Göttingen, Deutschland
Wärmeschrank 37°C	Heraeus /Kendro, Düsseldorf, Deutschland
Wasserbad SWB 20	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Zellzahlbestimmung CASY 1	Schärfe System Reutlingen, Deutschland

Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus/Kendro, Düsseldorf, Deutschland
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus/Kendro, Düsseldorf, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Biopsiekassetten	Leica, Wetzlar, Deutschland
Deckgläser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entnahmebeutel Für Nabelschnurblut	Vita 34 AG Leipzig, Deutschland
Eppendorf Zentrifugenröhrchen 1,5ml & 2ml	Eppendorf, Köln Deutschland
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz, , Deutschland
Falcon Zentrifugenröhrchen 15 ml & 50 ml	Falcon, Franklin Lakes, USA
MACS® Separationssäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, USA
Multiwellplatten	BD Falcon, San Diego, USA
Nitrilhandschuhe	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Objektträger Flex IHC Microscope Slides	Dako, Hamburg, Deutschland
Parafilm “M”	Pechiney, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Perfusionsbesteck 50ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Pinzetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	BD Falcon, San Diego, USA
Pipettenspitzen 10, 200, 500 µl	Nerbe Plus, Winsen, Deutschland
Scheren	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Sterilfilter (0.22 µm)	Millipore, Carrigtwohill, Irland
Zellsieb (70µm)	BD Biosciences, Bedford, USA
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Antibody Diluent	Dako, Hamburg, Deutschland
Avidin und Biotin	Vector Laboratories, Burlingame, USA
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Carboxyfluorescein diacetate Nsuccinimidyl-ester (CFSE)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

CASYTON	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Dabco	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	Abbott Molecular Inc, USA
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNase I	Biochemika, Düsseldorf, Deutschland
Dulbecco´s MEM (10x)	Biochrom, Berlin, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formalin 4%	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Kalialaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagen G (3mg/ml Kollagen I/III in 12mM HCL)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Kollagenase I	Serva, Heidelberg, Deutschland
Kollagenase II	Invitrogen, Carlsbad, USA
Lymphozyten Separationsmedium (Dichte 1,077g/ml)	PAA, Cölbe, Deutschland
Hämatoxylin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin (Autostainer)	Dako, Hamburg, Deutschland
Matrigel	BD Biosciences, San Jose, USA
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Leica, Wetzlar, Deutschland
FCS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Formalin 4%	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
PBS-Tabletten	Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland
Peroxidase Blocking Solution (Autostainer)	Dako, Hamburg, Deutschland
2-Propanol	Sigma, Steinheim, Deutschland
RNAse freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland

Roti-Immunoblock	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Stammzelltrypsin	Lonza, Köln, Deutschland
TriPure Isolations Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Waschpuffer 10x (Autostainer)	Dako, Hamburg, Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.4 Gebrauchslösungen

Citrat-Puffer

Lösung A: 21,01g Zitronensäure in 1000ml A. dest. lösen

Lösung B: 29,41g Natrium-Citrat in 1000ml A. dest. lösen

36ml Lösung A und 164 ml Lösung B auf 2000ml mit A. dest. auffüllen.

Eosin

1 g Eosin in 100ml A. dest. lösen.

Hämalaun nach P. Mayer

1g Hämatoxylin in 1l A. dest. lösen und 0,2g Natriumjodat sowie 50g Kalialaun hinzufügen und bei Raumtemperatur rühren. 50g Chloralhydrat und 1g Zitronensäure zugeben.

MACS-Puffer

2,5g BSA und 0,3723g EDTA in 500ml PBS auf dem Magnetrührer lösen. Anschließend den pH-Wert auf 7,2 einstellen.

Silbernitratlösung

3g Silbernitrat in 100ml A. dest. lösen.

3.1.5 Antikörper

Durchflusszytometrie:

APC–Mouse IgG1κ Isotyp Kontrolle

BD Pharmingen, San Diego, USA

FITC–Mouse IgG1κ Isotyp Kontrolle	BD Pharmingen, San Diego, USA
PE–Mouse IgG1κ Isotyp Kontrolle	BD Pharmingen, San Diego, USA
Pe-Cy7–Mouse IgG1κ Isotyp Kontrolle	BD Pharmingen, San Diego, USA
PerCP-Cy5.5–Mouse IgG1κ Isotyp Kontrolle	BD Pharmingen, San Diego, USA
B220-PB (Ratte anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
CD3-PE (Hamster anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
CD3-PB (Hamster anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
CD11b-APC (Ratte anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
CD11b-PB (Ratte anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
CD13-APC (Maus anti human)	BD Pharmingen, San Diego, USA
CD19-PE-Cy7 (Ratte anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
CD34-FITC (Maus anti human)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD34-APC (Maus anti human)	BD Pharmingen, San Diego, USA
CD38-PE (Maus anti human)	BD Pharmingen, San Diego, USA
CD45-PerCp-Cy5.5 (Maus anti human)	BD Pharmingen, San Diego, USA
CD56-PE-Cy7 (Maus anti human)	BD Pharmingen, San Diego, USA
ckit-APC (Ratte anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
Gr1-APC-Cy7 (Ratte anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
Gr1-PB (Ratte anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
Sca-1-PE (Ratte anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
Ter119-FITC (Ratte anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA
Ter119-PB (Ratte anti Maus)	Biolegend, San Diego, USA

Immunhistochemie:

Primärantikörper:

CD13 (Maus anti human, monoklonal)	Abcam, Cambridge, UK
CD31 (Kaninchen anti Maus, polyklonal)	Abcam, Cambridge, USA
CD34 (Maus anti human, monoclonal)	Dako, Hamburg, Deutschland
CD38 (Maus anti human, monoklonal)	Abcam, Cambridge, UK
CD45 (Maus anti human, monoklonal)	Dako, Hamburg, Deutschland
CD45 (Kaninchen anti Maus, polyklonal)	Abcam, Cambridge, USA
CD56 (Maus anti human, monoklonal)	Novo Castra, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
CD271 (Maus anti human, monoklonal)	Biolegend/ Biozol, Eching, Deutschland

cleaved Caspase 3 (Kaninchen anti human, polyclonal)	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Fibronektin (Kaninchen anti human, polyklonal)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Ki-67 (Maus anti human, monoclonal)	Dako, Hamburg, Deutschland
Kollagen I (Maus anti human, monoclonal)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Kollagen IV (Maus anti human, monoclonal)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Laminin (Maus anti human, monoclonal)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Osteopontin (Maus anti human, monoclonal)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg Deutschland
SDF-1 (Kaninchen anti Maus, polyklonal)	Abcam, Cambridge, USA

Sekundärantikörper:

biotinylierter Sekundärantikörper (Ziege anti Kaninchen)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
--	--------------------------------------

3.1.6 Kits

APC Apoptosis Detection Kit	BD Pharmingen, San Diego, USA
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
CD34 MicroBead Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
3D Collagen Culture Kit	EMD Millipore, Billerica, USA
K5001 Dako REAL™ Detection System	Dako, Hamburg, Deutschland
Power SYBRGreen PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
RANDOX Ca	Randox Laboratories, Krefeld, Deutschland
Reticulin Stain Kit	Polysciences, Inc., Warrington, USA
VECTASTAIN Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

3.1.7 Medien

Standardmedium für humane mesenchymale Stammzellen

Mesenpan MSC Medium + Supplemente	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
2% FCS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
1x Penicillin-Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland

Osteogenes Induktionsmedium

DMEM low Glukose	PAA, Cölbe, Deutschland
100 nM Dexamethason	Sigma, Steinheim, Deutschland
10 mM Natrium- β -glycerophosphat	Sigma, Steinheim, Deutschland
0,05 mM Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma, Steinheim, Deutschland
10% FCS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
1x Penicillin-Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland

Standardmedium für murine mesenchymale Stammzellen

alphaMEM mit Glutamin (Glutamax)	Life Technologies, Carlsbad, USA
10% FSC	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
2% Penicillin Streptomycin	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
1ng/ml Maus FGF	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Standardmedium für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen

StemSpan Serum-freies Medium	Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Kanada
50ng Rekombinantes FLT-3-Ligand	Peptotech, London, Großbritannien
10ng Rekombinantes Interleukin-6	Peptotech, London, Großbritannien
50ng Rekombinanter Stammzellfaktor	Peptotech, London, Großbritannien
20ng Rekombinantes humanes Thrombopoitin	Peptotech, London, Großbritannien
1x Penicillin-Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland

3.1.8 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Primerbezeichnung	Sequenz
GAPDH	forward: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3' reverse: 5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3'
Kollagen Typ 1	forward: 5'-TGACCTCAAGATGTGCCACT-3' reverse: 5'-ACCAGACATGCCTCTTGTC-3'
Kollagen Typ 4	forward: 5'-GGATCGGCTACTCTTTCGTGATG-3' reverse: 5'-AAGCGTTTGCCTAGTAATTGCA-3'
Fibronectin	forward: 5'-TGACCTTTTCTGGCTCGTCT-3' reverse: 3'-GTTTCAGCACAAAGGGCTCTC-3'
Laminin	forward: 5'-TGACCTTTTCTGGCTCGTCT-3' reverse: 5'-GTTTCAGCACAAAGGGCTCTC-3'
Osteopontin	forward: 5'-AATTGCAGTGATTTGCTTTTGC-3' reverse: 5'-CAGAACTTCCAGAATCAGCCTGTT-3'

3.1.9 Software

Adobe Photoshop 7.0	Adobe, San Jose, USA
analySIS®	Soft Imaging System, Münster, Deutschland
FACSDiva software	Becton Dickinson, San Diego, USA
FlowJo software	Tree Star Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Isolation von humanen mesenchymalen Stromazellen aus Aspirat und Spongiosa

Humane mesenchymale Stromazellen (hMSC) aus Knochenmark werden aus Aspirat und Spongiosa von Patienten isoliert, bei denen eine Hüft-TEP Operation durchgeführt wird. Das bei der Operation anfallende Material wird nach Einwilligung der Patienten von der Klinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Aachen zur Verfügung gestellt.

Das Aspirat wird in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und auf 20ml mit Mesenpan MSC Medium aufgefüllt und für 8min bei 1200rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand

dekantiert, das Zellsediment in Mesenpan MSC Medium resuspendiert und in eine T75er Zellkulturflasche überführt.

Die Spongiosa wird mit 5-10ml Mesenpan MSC Medium bedeckt und nun mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle durchspült, sodass sich das Knochenmark herauslöst. Das Medium mit dem herausgelösten Knochenmark wird in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Der Vorgang wird so lange wiederholt, bis sich das Knochenmark vollständig aus der Spongiosa gelöst hat und die Spongiosa auf Grund dessen weiß erscheint. Das in Medium gelöste Knochenmark wird bei 1200rpm für 8min zentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert. Das Zellsediment wird in Mesenpan MSC Medium resuspendiert und in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Die mesenchymalen Stromazellen zeigen eine Plastikadhärenz während die übrigen Zellen des Knochenmarks in Suspension verbleiben und durch einen Mediumwechsel nach 24h entfernt werden.

3.2.1.2 Isolation von humanen mesenchymalen Stromazellen aus der Nabelschnur

Humane mesenchymale Stromazellen der Nabelschnur werden in Kooperation mit der Frauenklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Aachen und nach Zustimmung der Patienten aus dem Wharton's jelly der Nabelschnur isoliert.

Die Isolation erfolgt nach einem von Wang *et al.* beschriebenen Protokoll (Wang *et al.*, 2004). Die Nabelschnur wird dazu geteilt und der Länge nach geöffnet. Das Wharton's jelly wird nun mit einem Skalpell aus der Nabelschnur entfernt ohne die Gefäße zu verletzen. Anschließend wird das Whartons jelly über Nacht in 10ml Collagenase I bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1200rpm für 5 min wird der Überstand verworfen und das Zellsediment in 10ml Trypsin (Lonza, Köln) resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Stammzellmedium gestoppt. Nach Zentrifugation bei 1200rpm für 8 bis 10 min wird der Überstand verworfen, das Zellsediment in 5 ml Mesenpan MSC Medium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Nach 2 Tagen werden nicht adhärenente Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und so die mesenchymalen Stromazellen mittels Plastikadhärenz isoliert.

3.2.1.3 Kultivierung und Expansion von humanen mesenchymalen Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen werden in Mesenpan MSC Medium mit, Wachstumsfaktoren (PAN Biotech) 1x Penicillin und Streptomycin (PAA, Cölbe) und 2% FCS (PAN Biotech) in einem Inkubator bei 37°C, 20% O₂ und 5% CO₂ kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgt alle 3 bis 4 Tage. Sobald die T75 Zellkulturflasche konfluent ist, werden die Zellen passagiert. Dazu

werden die mesenchymalen Stromazellen mit 4 ml Trypsin/EDTA (Lonza, Köln) abgelöst und je 5×10^5 mesenchymale Stromazellen in neue T75 Zellkulturflaschen überführt. Für die im Folgenden beschriebenen Versuchsansätze werden mesenchymale Stromazellen der Passagen 2 bis 4 verwendet.

3.2.1.4 Osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stromazellen

Um mesenchymale Stromazellen osteogen zu differenzieren, werden die Zellen in einer Dichte von 3.1×10^4 Zellen/cm² in Mesenpan MSC Medium ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium durch Osteoblasten-Induktionsmedium ersetzt. Der Mediumwechsel erfolgt nun alle 3 bis 4 Tage. In Kollagengel eingebettete mesenchymale Stromazellen werden auf die gleiche Weise osteogen differenziert. Die Zellzahl entspricht hierbei 100.000 Zellen pro ml Kollagengel. Die osteogene Differenzierung ist im Lichtmikroskop durch Kalziumablagerungen zu erkennen.

3.2.1.5 Isolation von murinen mesenchymalen Stromazellen

Murine mesenchymale Stromazellen werden aus Tibia und Femur von C57BL/6 Mäusen isoliert. Die Isolation erfolgt nach einem nach Zhu *et. al.* modifizierten Protokoll (Zhu *et. al.*, 2010). Die Knochen werden zunächst in PBS mit 2% FCS mit einem Mörser zerkleinert und das hämatopoetische Mark herausgewaschen. Die Knochenfragmente werden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Kollagenase II (Invitrogen, 1mg/ml) überführt und für 90 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden die Knochenfragmente durch Hinzufügen von 30 ml alphaMEM (GlutaMAX, Life Technologies) mit 10% FBS und 1% Penicillin Streptomycin gewaschen. Hierzu lässt man die Knochenfragmente absinken und dekantiert dann vorsichtig den Überstand. Anschließend werden die Knochenfragmente in eine 15cm Kulturschale für adhärente Zellen transferiert und 35ml murines MSC-Medium hinzugefügt. Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel. An Tag 3 nach Isolation wird das Medium vorsichtig abgenommen und die Knochenfragmente in PBS gewaschen und auf eine neue 15cm Kulturschale transferiert. Die vorherige Platte wird verworfen, da sie einen hohen Anteil an Makrophagen und Endothelzellen enthält. Nach 4 Tagen wird das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und die adhärenen Zellen mit 45ml 25% Trypsin/EDTA abgelöst. Die Trypsinisierung wird mit Medium gestoppt und die Zellsuspension durch einen 100µm Filter gegeben. Nach Zentrifugation für 6 min bei 1400 rpm werden die Zellen in murinem MSC-Medium resuspendiert und in einer dichte von 1,3 Millionen Zellen pro 15cm Kulturschale ausgesät.

3.2.1.6 Isolation von humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut

Die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) werden nach schriftlicher Einwilligung der Mutter nach den Richtlinien der Ethikkommission der RWTH (EK187/08) aus Nabelschnurblut gewonnen. Die Aufklärung der Patienten erfolgt in Zusammenarbeit mit der Frauenklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Aachen.

Zunächst werden die mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque-Lösung (Dichte: 1.077 g/ml) (PAA, Cölbe) von den restlichen Blutbestandteilen abgetrennt. Die weitere Aufreinigung der CD34 positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen erfolgt mittels immunomagnetischer Aufreinigung unter Verwendung des MACS CD34 Progenitorzell-Isolations-Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach). Hierbei werden die mononukleären Zellen mit FcR Blocking Reagenz und den mit anti-humanen CD34 Antikörper konjugierten Microbeads inkubiert und anschließend immunomagnetisch aufgereinigt. Um eine hohe Reinheit der CD34 positiven Stamm- und Progenitorzellen zu gewährleisten erfolgen zwei Durchgänge der immunomagnetischen Aufreinigung.

3.2.1.7 Kultivierung von humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen werden in serumfreien StemSpan Medium (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada) mit 1x Penicillin und Streptomycin und den folgenden rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren (Peprotech, London, UK) kultiviert: (Peprotech, London, UK) kultiviert: 50 ng Stammzellfaktor, 20 ng Thrombopoetin, 50 ng Flt3-Ligand und 10 ng Interleukin 6. Für einen Mediumwechsel wird die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

3.2.1.8 Ko-Kultur von humanen mesenchymalen Stromazellen und hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Für die Ko-Kultur von mesenchymalen Stromazellen und hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen werden die mesenchymalen Stromazellen 5 bis 7 Tage in Kollagengelen oder als Monolayer auf Zellkulturplastik in einer 24 Well Platte in Mesenpan MSC Medium vorkultiviert. mesenchymale Stromazellen, die für die Ko-Kultur osteogen differenziert werden sollen, werden 21 Tage in Osteoblasten-Induktionsmedium vorkultiviert. Nach der Vorkultivierung wird das MSC Medium abgenommen und die aus Nabelschnurblut frisch isolierten CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in StemSpan Medium auf den Monolayer aus mesenchymalen Stromazellen bzw. auf die Kollagengele gegeben.

3.2.2 Dreidimensionale Kultivierungssysteme

3.2.2.1 Herstellung der Kollagengele

Drei-dimensionale Kollagengele werden nach einem zuvor etablierten Protokoll (Schneider *et al.*, 2010a; Schneider *et al.*, 2010b) wie folgt hergestellt: 8 Volumeneinheiten saures Kollagen G (3 mg/ml Kollagen I/III in 12 mM HCl) (Biochrom, Berlin) wird mit 1 Volumeneinheit Dulbecco's MEM (4,5g/l D – Glucose) (Biochrom, Berlin) gemischt und mit 2M NaOH neutralisiert. Um mesenchymale Stromazellen in die Kollagengele einzubetten wird 1 Volumeneinheit Zellsuspension (1×10^6 Zellen/ ml) zu der neutralisierten Kollagenlösung gegeben. Für die Herstellung zellfreier Kollagengele wird statt der Zellsuspension 1 Volumeneinheit Mesenpan MSC Medium hinzugegeben. Je 0,5ml der Kollagenlösung werden nun in eine 24-Well-Platte pipettiert. Die Polymerisierung der Kollagengele erfolgt durch Inkubation bei 37°C für 1 Stunde im Inkubator. Anschließend wird je 0,5ml Mesenpan MSC Medium auf die Kollagengele gegeben.

3.2.2.1.1 Versuchsaufbau zur Etablierung des dreidimensionalen Ko-Kultursystems

Um die Interaktionen von mesenchymalen Stromazellen und hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen werden die beiden Zelltypen in Ko-Kultur kultiviert. Dabei werden sowohl Ko-Kultur-Experimente mit mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark als auch mit mesenchymalen Stromazellen aus der Nabelschnur durchgeführt, um den Einfluss der beiden Stromazell-Typen zu vergleichen. Desweiteren werden die CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in jedem Versuchsansatz auch ohne mesenchymale Stromazellen in einer Monokultur kultiviert. Die Kultur (jeweils Mono- und Ko-Kultur) erfolgt im 24-Well-Format sowohl auf Zellkulturplastik (TCPS, *Tissue culture Polystyrene*), als auch im dreidimensionalen Kollagengel.

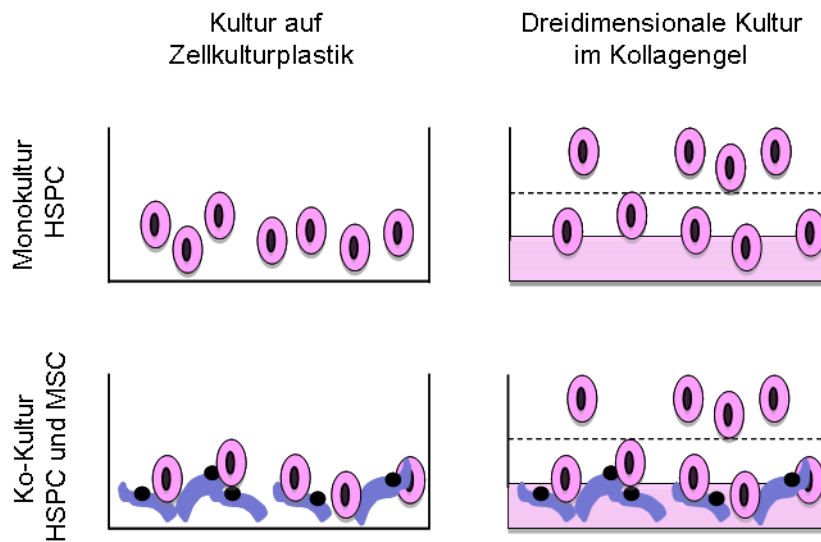


Abbildung 7.: Experimentelle Kultivierungsbedingungen. Aus Nabelschnurblut isolierte HSPC werden sowohl in Monokultur als auch in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen kultiviert. Desweiteren wird die konventionelle Kultur auf Zellkulturplastik mit der dreidimensionalen Kultur im Kollagengel verglichen. Im dreidimensionalen Kultivierungssystem werden mesenchymale Stromazellen in das Kollagengel eingebettet und CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen in Suspension auf das Gel gegeben. Das Kultivierungssystem ermöglicht die Unterscheidung von zwei Kompartimenten: I. hämatopoetische Zellen in Suspension über dem Kollagengel und II. in das Kollagengel migrierte Zellen. HSPC = hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen. MSC = mesenchymale Stromazellen.

Im dreidimensionalen Kultivierungssystem können zwei Subpopulationen von hämatopoetischen Zellen unterschieden und analysiert werden: Zum einen die in Suspension über dem Kollagengel verbleibenden Zellen und zum Anderen die in das Kollagengel migrierten Zellen.

3.2.2.1.2 Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen von Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien in Kollagelen

Das dreidimensionale Kultivierungssystem wird in einem Kooperationsprojekt mit der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Aachen genutzt um die Extrazellulärmatrix-Remodellierung durch mesenchymale Stromazellen von Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien (MPN) und nicht-MPN-Patienten zu vergleichen. Dazu werden mesenchymale Stromazellen von Patienten mit essentieller Thrombozythämie, Polyzythämie vera und chronischer myeloische Leukämie in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation aus Knochenmarksaspirat isoliert expandiert. Anschließend werden die mesenchymalen Stromazellen wie zuvor beschrieben in Kollagengel eingebettet und 21 bis 28 Tage lang kultiviert. Als Kontrolle werden mesenchymale Stromazellen aus Hüftkopf und mesenchymale Stromazellen aus

Knochenmarksaspirat von Patienten mit Morbus Hodgkin ohne Knochenmarksinfiltration verwendet, die ebenfalls in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation isoliert und expandiert werden.

3.2.2.2 β -Tri-Kalziumphosphat-Scaffolds

Die β -Tri-Kalziumphosphat (β -TCP) -Scaffolds werden im Institut für Zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung der RWTH Aachen hergestellt. Verwendet werden poröse β -TCP-Scaffolds mit unterschiedlichen Poren: 500 μ m und 800 μ m Kanäle, sowie 500 μ m Kanäle, die an den Verbindungspunkten der Kanäle einen Durchmesser von 1mm aufweisen (Kavernenstruktur). Das Design der β -TCP-Scaffolds erfolgt mit dem Programm *Three Matrix* (Materialise, Leuven, Belgien). Die Negativformen der β -TCP-Scaffolds werden zunächst am 3D- Wachsdrucker (76 plus, Solidscape, Merrimack, USA) gedruckt. Das Wachsmo­dell wird nun von einer keramischen Suspension aus β - Tri-Kalziumphosphat (β - TCP), dem Schlicker, umschlossen und bildet den sogenannten Grünkörper. Anschließend erfolgt die Sinterung des Grünkörpers.

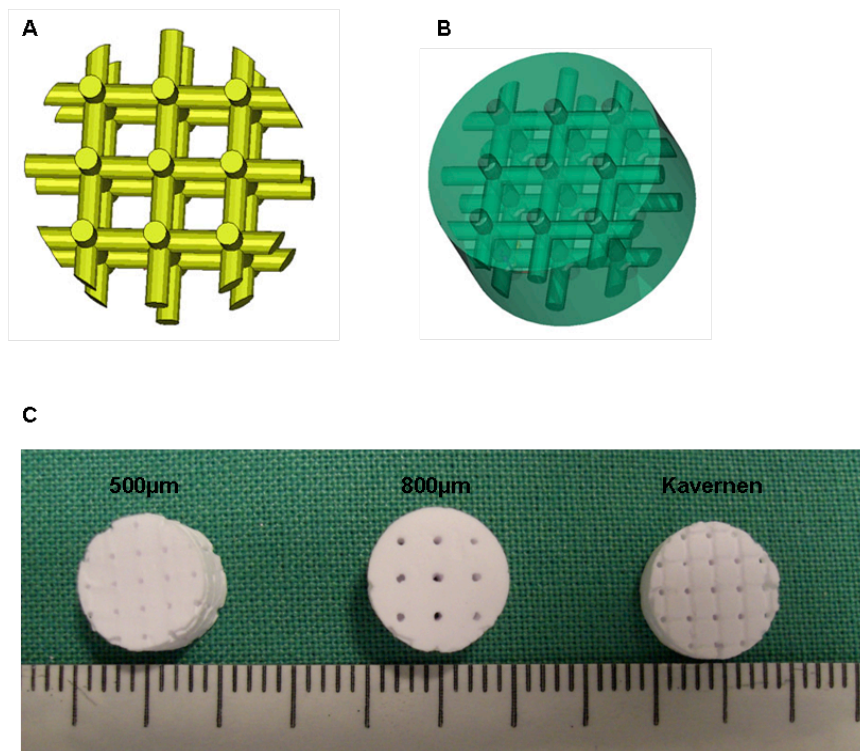


Abbildung 8: (A) Negativform eines β -TCP-Scaffolds. Die Negativform stellt die sich kreuzenden Kanäle des späteren β -TCP-Scaffolds dar. (B) Virtuelles Modell eines β -TCP-Scaffolds mit Kanälen. (C) β -TCP-Scaffolds für die Zellkultur. Verwendet werden β -TCP-Scaffolds mit Poren in Kanalstruktur mit einem Durchmesser von 500 μ m und 800 μ m und Poren in Kavernenstruktur mit Kanälen mit 500 μ m Durchmesser, die an den Überkreuzungspunkten in Kavernen mit 1mm Durchmesser münden.

3.2.2.2.1 Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen auf β -TCP-Scaffolds

Die β -tri-Kalziumphosphat (β -TCP)-Scaffolds sollen als stabile Kalziumkomponente für die Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen etabliert werden. Humane mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks werden für 21 Tage auf β -TCP-Scaffolds in Standardmedium kultiviert. Es werden β -TCP-Scaffolds mit Porendurchmesser von 500 μ m und 800 μ m sowie Kavernenstruktur verwendet. Für die direkte Besiedlung werden 50.000 MSC in 50 μ ml Medium auf den Scaffold gegeben. Nachdem die Zellsuspension in den Scaffold eingezogen ist wird 1ml Medium auf den Scaffold gegeben. Außerdem werden die β -TCP-Scaffolds mit dem zuvor beschriebenen Kollagengel als Matrix kombiniert. Hierzu werden die mesenchymalen Stromazellen in einer Konzentration von 100.000 Zellen/ml in flüssigem Kollagengel auf den Scaffold gegeben, welches anschließend bei 37°C auspolymerisiert. Anschließend wird 1ml Medium über die Scaffold-Kollagen-Kombination gegeben. Der Mediumwechsel erfolgt alle 3 bis 4 Tage. Um den Einfluss der β -TCP-Komponente zu untersuchen werden zum Vergleich mesenchymale Stromazellen in Kollagengel ohne β -TCP-Scaffold kultiviert. Da die mesenchymalen Stromazellen auf den β -TCP-Scaffolds auch auf spontane osteogene Differenzierung hin untersucht werden sollen, wird zudem eine osteogen differenzierte Kontrolle benötigt. Hierzu werden mesenchymale Stromazellen im Kollagengel 21 Tage unter Verwendung von osteogenem Induktionsmedium differenziert.

3.2.2.2.2 Subkutane Transplantation der β -TCP-Scaffolds in C57BL/6 Mäuse

Um die Eignung der β -TCP-Scaffolds als ektope Knochenmarksnische im Mausmodell zu testen werden β -TCP-Scaffold subkutan in C57BL/6 Mäuse transplantiert und nach 4 und 8 Wochen hinsichtlich extramedullärer Hämatopoese untersucht.

Die Versuche im Mausmodell wurden im Labor von Professor Benjamin L. Ebert am Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA durchgeführt.

Für die subkutane Transplantation werden β -TCP-Scaffolds mit einem Porendurchmesser von 500 μ m und 800 μ m verwendet. 1 bis 2 Tage vor Transplantation werden die β -TCP-Scaffolds mit murinen mesenchymalen Stromazellen besiedelt. Pro Scaffold werden 2 Mio murine mesenchymale Stromazellen verwendet. Die Stromazellen werden entweder direkt auf den β -TCP Scaffolds ausgesät oder in 200 μ l Kollagengel (3D Collagen Culture Kit, EMD Millipore, Billerica, USA) oder Matrigel (BD Biosciences, San Jose, USA) auf den Scaffold gegeben. Die Polymerisierung des Kollagengels bzw. Matrigels erfolgt bei 37°C im Inkubator. Anschließend wird 1ml murines MSC-Medium auf die Scaffolds gegeben.

Die subkutane Transplantation der β -TCP-Scaffolds wurde von Frau PD Dr. med. Schneider-Kramann und Dr. rer. nat. Dirk Heckl durchgeführt nach den Regularien der Versuchstierkunde des Children's Hospital, Boston, MA, USA.

3.2.3 Histologische Analysen

3.2.3.1 Aufarbeitung der Proben

Proben für histologische Analysen werden für mindestens 24 Stunden in 4% Formalin fixiert. HPSC in Suspension werden dazu zunächst in ein Eppendorf Tube überführt und bei 3000rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und Formalin auf das Zellsediment gegeben. Die Kollagengele werden ebenfalls in Formalin gegeben.

Nach der Fixierung werden die Kollagengele für die weitere Aufarbeitung mit 3% Agarose in PBS stabilisiert. Die fixierten Zellsedimente werden ebenfalls in 3% Agarose eingebettet.

Die Proben werden nun im Einbettautomaten der Pathologie in Paraffin überführt. Anschließend werden die paraffinierten Proben an der Ausgießstation in Paraffinblöcke gegossen. Dazu werden die Kollagengele mit einem Skalpell geteilt und so orientiert, dass bei der histologischen Analyse der Querschnitt betrachtet werden kann.

Nach Aushärten der Paraffinblöcke werden am Leica RM2145 Rotationsmikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland) Schnitte von 3 μ m hergestellt. Die Paraffinschnitte werden in einem 37°C Wasserbad ausgebreitet und anschließend auf Objekträger gezogen.

Schnitte von Knochenmarksbiopsien wurden von Norina Labude und Patrick Kühl (Routinelabor, Institut für Pathologie) erstellten Schnitte des MPN-Tissue micro Array wurden von Daniela Smeets (Routinelabor, Institut für Pathologie) angefertigt.

Vor dem Färben werden die Schnitte im Brutschrank bei 60°C für ca. 30min getrocknet und anschließend für 30min in Xylol entparaffiniert und durch die absteigende Alkoholreihe bis hin zu A. dest. einem wässrigen Milieu zugeführt. Anschließend können die Schnitte gefärbt werden.

3.2.3.2 Histologische Analyse der explantierten β -TCP-Scaffolds

Die explantierten β -TCP-Scaffolds werden mit Hilfe einer Rasierklinge halbiert und eine Hälfte zur histologischen Aufarbeitung in 4% Formalin über Nacht fixiert und anschließend in 70% Ethanol überführt. Das Einbetten der Proben in Paraffin und die Anfertigung der Schnitte sowie die Hämalaun-Eosin-Färbung erfolgt in der Pathologie des Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA.

3.2.3.3 Erstellung eines Tissue Microarray.

Um die *in vitro* Ergebnisse bezüglich der Extrazellulärmatrix-Remodellierung bei myeloproliferativen Neoplasien (MPN) an Knochenmarksstanzen zu bestätigen wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation ein Tissue micro Array erstellt. Dazu wurden Knochenmarksstanzen von Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen (15 essentieller Thrombozythämie, 16 Polycythämie vera, 12 Primäre Myelofibrose) und als Kontrollen 19 Knochenmarksstanzen von Patienten mit non-Hodgkin Lymphom ohne Knochenmarksinfiltration aus dem Archiv des Institutes für Pathologie verwendet. Für die Erstellung des TMA werden anhand der aus der Routinediagnostik vorhandenen HE-Färbungen Bereiche in der Nähe eines Knochenstrabekels ausgewählt und auf dem Paraffinblock markiert. Die Erstellung des TMA erfolgte mit Hilfe des TMArrayer™ (Pathology Devices, Inc., Westminster, USA) unter Anleitung durch Dr. med. Till Braunschweig, Institut für Pathologie und Unterstützung von Valeska Wiehle (Klinik für Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation). Dabei werden die markierten Stellen aus den jeweiligen Paraffinblöcken ausgestochen und in einen neuen Paraffinblock eingestanzt.

Zudem wurden zwei weitere im Institut für Pathologie schon vorhandene TMAs mit Proben von CML-Patienten verwendet.

3.2.3.4 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbung dient dazu eine Übersicht über die erstellten Schnitte zu gewinnen und die Migration der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in das Kollagengel zu untersuchen. Hämalan färbt hierbei die Zellkerne blau, wohingegen Eosin das Zytoplasma und auch die Kollagenfasern rot färbt.

Die entparaffinierten Schnitte werden für 10 min in Hämalan gefärbt und anschließend in Leitungswasser durch die Erhöhung des pH-Wertes gebläut. Nun folgt die Gegenfärbung mit Eosin für 45 Sekunden. Die Schnitte werden anschließend durch die aufsteigende Alkoholreihe bis hin zu Xylol entwässert und mit Vitro Clud (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) unter einem Deckglas versiegelt.

3.2.3.5 Kalknachweis nach Kossa

Mittels van Kossa Färbung können Kalkablagerungen nachgewiesen werden, die ein Hinweis auf die osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen sind. Hierzu werden die entparaffinierten Schnitte in 5% Silbernitrat 30-60 min unter UV-Licht inkubiert, bis sich eine

bräunlich-schwarze Färbung zeigt. Anschließend werden die Schnitte in A. dest. gespült und 1 min in Natriumthiosulfat fixiert. Nach erneutem Waschen in A. dest. werden die Kerne mit Kernechtrot 5 min gefärbt. Die Schnitte werden nun durch die aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol entwässert und versiegelt.

3.2.3.6 Naphthol AS-D Chloro-Esterase Färbung

Um die Anzahl der CD34+ hämatopoetischen Zellen in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen zu bestimmen, die in die myeloide Richtung differenzieren, wird eine Naphthol AS-D Chloro-Esterase (CAE) Färbung durchgeführt. Die Paraffinschnitte werden für 80 min in ASDCL-Lösung unter Schütteln inkubiert und anschließend für 5 min mit Hämatoxylin gefärbt und in Wasser mit Kalziumcarbonat gebläut. Die Schnitte werden mit Glycerin Gelatine unter einem Deckglas eingedeckt.

Die Färbung wurde von Roswitha Schwarz, Routinefärbelabor des Institutes für Pathologie, nach einem Routineprotokoll durchgeführt. Die Quantifizierung der CAE positiven Zellen erfolgte am Lichtmikroskop durch zwei verblindete Untersucher (PD Dr. med. Rebekka Schneider-Kramann, Dipl.-Biol. Isabelle Leisten).

3.2.3.7 Retikulinfärbung

Die Retikulin (Gitter)-Färbung dient dem Nachweis der retikulären Fasern. Die Fasern lassen sich mit Silbersalzen nachweisen, da sich metallisches Silber an den Retikulinfasern niederschlägt. Die Färbung wird an den entparaffinierten Schnitten der explantierten β -TCP-Scaffolds mit Hilfe des Reticulin Stain Kit (Polysciences, Inc., Warrington, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wird dabei mit Kaliumpermanganat oxidiert und mit Oxalsäure entfärbt. Anschließend werden die Schnitte in Ammoniumeisen (III)-sulfat-Lösung und ammoniakalischer Silbernitrat-Lösung inkubiert. Hierbei bildet sich metallisches Silber, welches sich an den Zielstrukturen ablagert. Danach erfolgt die Reduktion mit Formaldehyd, was den Prozess beschleunigt. Mit Goldchlorid wird die Färbung intensiviert, indem das metallische Silber in eine stabilere Goldverbindung umgewandelt wird. Überschüssiges Silber wird durch die Inkubation in Natriumthiosulfat gebunden. Mit Kernechtrot werden die Zellkerne rot gefärbt. Die Schnitte werden anschließend entwässert und versiegelt.

3.2.3.8 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie wird die Extrazellulärmatrix-Remodellierung der in den Kollagegelen eingebetteten mesenchymalen Stromazellen untersucht und die Differenzierung der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen durch Färbung verschiedener linienspezifischer Oberflächenmarker, sowie der Proliferationsgrad und Apoptose der hämatopoetischen Zellen. Desweiteren werden an Schnitten von Knochenmarksbiopsien von Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien (essentielle Thrombozythämie, Polycythämie vera, chronisch myeloische Leukämie) Veränderungen der extrazellulären Matrix untersucht im Vergleich zu Biopsien von Knochenmarksstanzen von nicht-MPN-Patienten. Folgende Primärantikörper wurden verwendet: Kollagen Typ I (1:2000, Maus, monoklonal, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), Kollagen Typ IV (1:250, Maus monoklonal, Sigma-Aldrich), Fibronectin (1:200, Kaninchen, polyklonal, Sigma-Aldrich), Laminin (1:1000, Maus monoklonal, Sigma), Osteopontin (1:500, Maus monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), CD271 (1:100, Maus monoclonal, BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland), CD13 (1:80, Maus monoklonal, Abcam, Cambridge, UK), CD34 (1:25, Maus monoklonal, Dako), CD38 (1:100, Maus monoklonal, Abcam), CD45 (1:2000, Maus monoklonal, Dako) CD56 (1:100, Maus, monoklonal, NovoCastra, Leica Microsystems, Wetzlar), Ki-67 (1:1000, Maus, monoklonal, Dako), cleaved Caspase 3 (1:250, Kaninchen, polyklonal, Cell Signaling Technology, Beverly, USA).

Die entparaffinierten Schnitte werden vor der immunhistochemischen Färbung zunächst nach den Herstellerangaben der verwendeten Antikörper vorbehandelt, um die Antigendemaskierung im formalinfixierten Gewebe zu erreichen. Dazu werden die Schnitte entweder für 10min im Dampfkochtopf mit Zitratpuffer pH6 oder Dako Target Retrieval Solution pH9 aufgekocht oder 10min in PBS mit Proteinase K (Dako) bei 37°C inkubiert.

Die immunhistochemischen Färbungen werden mit Hilfe des Dako Autostainer Plus Färbeautomaten (Dakocytomation, Fort Collins, USA) durchgeführt unter Verwendung des Dako REAL™ Detection System (K5001, Peroxidase/DAB+, rabbit/mouse).

Die Primärantikörper werden entsprechend der Herstellerangaben in Dako antibody diluent verdünnt und 25 min inkubiert. Anschließend wird der biotinylierte Sekundärantikörper (rabbit/mouse, Dako) inkubiert gefolgt von der Farbentwicklung durch Streptivin Peroxidase (HRP) und 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB+). Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgt durch Hämatoxilin (Dako). Die gefärbten Schnitte werden nun durch die

aufsteigende Alkoholreihe entwässert und anschließend im Eindeckautomaten (Tissue Tek Prisma, Sakura, Torrance, USA) des Routinelabors des Institutes für Pathologie versiegelt.

3.2.3.9 Immunhistochemie an explantierten β -TCP-Scaffolds

Die Immunhistochemie an Paraffinschnitten der explantierten β -TCP-Scaffolds wird händisch durchgeführt. Die entparaffinierten Schnitte werden zunächst zur Antigendemaskierung im Schnellkochtopf mit Citratpuffer gekocht. Anschließend erfolgt das Blocken der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid (3% verdünnt in A. dest.). Nach 3 Waschschritten in PBS mit 0,5% Tween für je 5 min erfolgt das Blocken mit Avidin und Biotin (Vector Laboratories, Burlingame, USA) für je 10 min zur Vermeidung unspezifischer Bindungen. Anschließend wird der Primärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Folgende Primärantikörper werden verwendet: CD45 (1:100, Kaninchen, polyklonal, Abcam), CD31 (1:100, Kaninchen, polyklonal, Abcam) und SDF-1 (1:100, Kaninchen, polyklonal, Abcam). Die Primärantikörper werden in PBST mit 1% NGS verdünnt. Nach einem Waschschriff in PBST für 10 min und 2 Waschschriffen in PBS für je 10 min folgt die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers (Ziege anti Kaninchen, 1:200, Vector Laboratories) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. 30 min vor Ende der Inkubation wird die ABC-Lösung mit Peroxidase (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories) vorbereitet. Die Inkubation mit dem ABC-Komplex erfolgt anschließend für 30 min. Nach 3 Waschschriffen wird die Farbentwicklung mit DAB (DAB Peroxidase Substrat Kit, Vector Laboratories) für 5 bis 10 min durchgeführt. Die Gegenfärbung erfolgt mit Hämatoxilin. Die Schnitte werden nun in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und versiegelt.

3.2.3.10 Immunofluoreszenzfärbung

Um die Ko-Lokalisation von Fibronectin-Akkumulationen und dem Stromazellmarker CD271 in Knochenmarksbiopsien von Patienten mit essentieller Thrombozythämie zu untersuchen werden Immunofluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt nach einem von der Arbeitsgruppe molekulare intestinale Pathologie zu Verfügung gestellten Protokoll.

Die entparaffinierten Schnitte der Knochenmarksbiopsien werden zunächst entsprechend der Herstellerangaben der verwendeten Antikörper vorbehandelt, um die Antigendemaskierung zu erreichen. Nach Blockierung mit 10% Roti-Immunoblock (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS mit 0,05% Tween für 30 min erfolgt die Inkubation mit den Primärantikörpern CD271 (1:100, Maus monoclonal, BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland) und Fibronectin (1:200, Kaninchen, Sigma-Aldrich) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Antikörper werden in

PBST mit 1% Roti-Immunoblock verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST werden die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 30 min inkubiert. Folgende Sekundärantikörper werden verwendet: Alexa Fluor 555 (Ziege anti Kaninchen,1:200) und Alexa Fluor 488 (Ziege anti Maus,1:200) (beide Invitrogen). Die Zellkerne werden mit TO-PRO 3 (Invitrogen) angefärbt. Die Schnitte werden mit Mowiol 4-88 (Roth) mit zugesetztem DABCO (1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan), welches ein Ausbleichen der Proben verhindert, versiegelt.

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgt am Zeiss LSM 510 Konfokalmikroskop mit Argon Ionen Laser (Zeiss, Jena, Germany) am Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikum Aachen in Kooperation mit Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Müller-Newen und Dipl.-Biol. Dirk Fahrenkamp.

3.2.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen werden die Proben für mindestens 24 Stunden in 3% Glutaraldehyd fixiert. Die anschließende Aufarbeitung der Proben erfolgt in der Elektronenmikroskopischen Einrichtung des Instituts für Pathologie. Die zu untersuchenden Kollagengele werden hierbei vor der Goldbeschichtung halbiert, um in der Rasterlektronenmikroskopie die Gele im Querschnitt betrachten zu können. Für die energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX) wird keine Goldbeschichtung der Proben durchgeführt.

3.2.5 Bestimmung der Kalzium- und Phosphatkonzentration

Der Kalziumgehalt im Überstand der Kulturen von mesenchymalen Stromazellen auf β -TCP-Scaffolds wird nach 1, 2 und 3 Wochen bestimmt. Der Kalziumgehalt wird mit Hilfe des RANDOX-Kits (Randox Laboratories, Krefeld) nach den Angaben des Herstellers kolorimetrisch bestimmt. Dazu werden 25 μ l von jeder zu messenden Probe mit je 500 μ l der Lösungen R1 und R2 gemischt. Als Standard wird eine im Kit enthaltene Kalzium-Lösung verwendet. Die Messung erfolgt im Tecan-Reader bei 578nm. Die Bestimmung des Kalziumgehalts mittels RANDOX-Kit wurde von Frau Kristina Peuckert durchgeführt.

Weiterhin wird der Kalziumgehalt und Phosphatgehalt der Überstände in der Versuchstierkunde des Universitätsklinikums Aachen bestimmt.

3.2.6 Durchflusszytometrie

3.2.6.1 Bestimmung der Proliferationsrate von humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Zur Bestimmung der Proliferationsrate der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen werden die Zellen vor Kulturbeginn mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) (Sigma-Aldrich) gefärbt. CFSE wird von den Zellen aufgenommen und bindet kovalent an zytoplasmatische Proteine. Mit jeder Zellteilung reduziert sich die Fluoreszenzintensität um 50%, sodass mittels Durchflusszytometrie über die verminderte Fluoreszenz die Proliferationsrate der Zellen bestimmt werden kann.

Die Färbung wird wie zuvor beschrieben durchgeführt (Walenda *et al.*, 2010, Walenda *et al.*, 2011). Frisch isolierte CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen werden in PBS mit 0,1% FCS resuspendiert und CFSE in einer Konzentration von 2,5µM hinzugefügt. Nun folgt die Inkubation für 10 min bei 37°C im Inkubator. Die Färbung wird durch Zufügen von mindestens 6ml eiskaltem PBS mit 10% FCS und 5 min Inkubation auf Eis gestoppt gefolgt von einem Waschschrift mit PSB.

Die Proliferationsrate der Zellen in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen wird nach 3 und 5 Tagen Kultur bestimmt. Um dabei auch den CD34+ Phänotyp der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu bestimmen, werden die CFSE gefärbten Zellen vor der durchflusszytometrischen Analyse mit einem APC gekoppelten anti-CD34 Antikörper gefärbt (BD Pharmingen, San Diego, USA).

Es werden sowohl die Zellen in Suspension als auch die in die Kollagengele migrierten Zellen untersucht. Dazu werden die Kollagengele 1 Stunde bei 37°C im Inkubator mit Kollagenase I verdaut.

Die Messung wird am FACSCanto™ II (Becton Dickinson, San Diego, USA) des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung IZKF Biomat, Universitätsklinikum Aachen durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Programm FlowJo 5.7.2 (Tree Star Inc., Ashland, USA).

3.2.6.2 Bestimmung des Phänotyps der humanen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Der Phänotyp der hämatopoetischen Zellen in Suspension und der in die Kollagengele migrierten Zellen wird mittels 5 Farben Durchflusszytometrie am FACSCanto™ II nach 7 und 14 Tagen Kultur analysiert. Die Zellen werden dazu einmal in PBS gewaschen, in 100µl

PBS resuspendiert und 30 min auf Eis mit den folgenden Antikörpern gefärbt: CD34-FITC (Miltenyi Biotech), CD38-PE, CD45-PerCP-Cy5.5, CD13-APC und CD56-PE-Cy7 (alle BD Pharmingen). Anschließend werden die Zellen gewaschen, in 100µl PBS resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Programm FlowJo 5.7.2 (Tree Star Inc., Ashland, USA).

3.2.6.3 Bestimmung der Apoptoserate

An Tag 14 der Kultivierung wird die Apoptoserate der hämatopoetischen Zellen in Suspension und in den Kollagengelen mittels AnnexinV/7-AAD-Färbung (APC Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen) am Durchflusszytometer bestimmt. AnnexinV ist ein *Ca²⁺ phospholipid-binding protein* mit hoher Affinität für Phosphatidylserin. Schon im frühen Stadium der Apoptose wird Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran an die Außenseite transloziert. Mit APC konjugiertes Annexin V bindet an Zellen mit transloziertem Phosphatidylserin und kann mittels Durchflusszytometrie detektiert werden. Um außerdem tote Zellen detektieren zu können wird eine Doppelfärbung mit dem Farbstoff 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) durchgeführt. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff 7-AAD nicht auf wohingegen die Membran von toten und beschädigten Zellen permeabel für 7-AAD wird. Somit kann durch die Annexin V/7-AAD Doppelfärbung zwischen vitalen (Annexin V negativen und 7-AAD negativen) Zellen, früh apoptotischen (AnnexinV positiven und 7-AAD negativen) Zellen und toten (AnnexinV positiven und 7-AAD positiven) Zellen unterschieden werden.

Die Zellen werden für die Färbung gewaschen und in 100µl PBS resuspendiert. Nun werden 5µl APC-AnnexinV und 2,5µl 7-AAD zu den Proben gegeben und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen gewaschen und in 100µl PBS resuspendiert und am FACSCanto™ II Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Programm FlowJo 5.7.2 (Tree Star Inc., Ashland, USA).

3.2.6.4 Durchflusszytometrische Analyse der hämatopoetischen Zellen in explantierten β -TCP-Scaffolds

Für die durchflusszytometrische Analyse werden die explantierten β TCP Scaffolds mit einer Rasierklinge geteilt. Eine Hälfte wird für die durchflusszytometrische Analyse verwendet. Mit Hilfe einer Spritze werden die Poren der Scaffolds mit PBS und 2% FCS durchgespült um die Zellen herauszuspülen. Nun wird die Scaffold-Hälfte weiter mit einer Rasierklinge zerteilt

und in 1 ml Kollagenase II (Invitrogen) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert um das Gewebe in den Poren zu verdauen. Der Scaffold wird anschließend erneut durchspült um weitere Zellen herauszulösen. Die Zellsuspension wird bei 1500rpm für 5 min zentrifugiert und das Zellsediment in 100µl PBS mit 2% FCS resuspendiert. Anschließend werden die Zellen mit Antikörpern für linienspezifische Oberflächenmarker und für LSK (lin- sca-1+ ckit+)-Zellen 25 min auf Eis gefärbt. Zur Analyse der linienspezifischen Oberflächenmarker werden folgende Antikörper verwendet: Gr-1-APC-Cy7 und CD11b-APC für die myeloide Reihe, CD3-PE und CD19-PE Cy7 für die lymphoide Reihe sowie Ter119-FITC als Marker für erythroide Progenitoren (alle Antikörper von Biolegend, San Diego, USA). Um das Vorhandensein von LSK-Zellen zu untersuchen werden die Zellen mit Antikörpern für die linienspezifischen Oberflächenmarker CD3-PB, B220-PB, CD11b-PB, Gr-1-PB und Ter119-PB gefärbt, sowie mit Sca-1-PE und ckit-APC (alle Antikörper von Biolegend, San Diego, USA). Die LSK-Zellen sind negativ für die linienspezifischen Oberflächenmarker und positiv für Sca-1 und ckit. Nach dem Färben werden die Zellen in PBS mit 2% FCS gewaschen und in 300µl PBS mit 2% FCS resuspendiert und am FACSCanto™ II Durchflusszytometer analysiert. Um in die Analyse nur die vitalen Zellen einzuschließen, werden die Zellen kurz vor der durchflusszytometrischen Analyse mit DAPI gefärbt. Der Farbstoff kann nur von Zellen aufgenommen werden, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist.

3.2.7 Molekularbiologische Methoden

3.2.7.1 RNA Isolation aus Kollagengelen

Die gesamt-RNA von dreidimensional in Kollagengelen kultivierten mesenchymalen Stammzellen von Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen und gesunden Kontrollen wird nach der Methode von Chomczynski und Sacchi isoliert. Dabei werden die MSC in den Kollagengelen mit Hilfe des phenolhaltigen TriPure Isolations Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) lysiert und die Kollagengele aufgelöst. Durch anschließende Zugabe von Chloroform (Sigma-Aldrich) erfolgt die Phasentrennung: Die obere wässrige Phase enthält RNA, in der Interphase befindet sich die DNA und die untere chloroformhaltige Phase enthält die Proteine. Die wässrige RNA Phase wird abpipettiert und in einen neuen Eppendorf Tube überführt. Nun wird die RNA mit 2-Propanol (Sigma-Aldrich) präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in 20µl RNase freiem Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland) gelöst. Die RNA Konzentration wird photometrisch mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (PEQLab Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Dabei wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Um die Reinheit

der RNA zu messen wird zusätzlich die optische Dichte bei 280nm bestimmt, dem Absorptionsmaximum von Proteinen und der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ ermittelt. Eine Verunreinigung mit aromatischen Substanzen wird über den Quotienten von OD₂₆₀ und OD₂₃₀ berechnet.

Anschließend an die RNA Isolation wird ein Verdau mit DNase I (Biochemika, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt um eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA zu beseitigen. Dazu werden 30µl DNase 1 zu der RNA-Probe gegeben und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert.

Die Proben können anschließend bei -80°C aufbewahrt werden.

3.2.7.2 copyDNA Synthese

Um die Genexpression verschiedener Extrazellulärmatrixproteine in den dreidimensional kultivierten mesenchymalen Stromazellen von Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien sowie nicht-MPN-Patienten zu vergleichen wird die isolierte RNA zunächst in *copyDNA* (cDNA) umgeschrieben. So können die Genexpressionslevel anschließend mittels *real time* quantitativer Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) bestimmt werden.

In die cDNA-Synthese Reaktion wird 1µg RNA eingesetzt und durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierzu wird eine rekombinante *Moloney murine leukemia virus* (rMoMuLV) reverse Transkriptase (Applied Biosystems) verwendet. Dabei handelt es sich um eine RNA abhängige DNA Polymerase, die die einzelsträngige RNA als Template nutzt um komplementäre DNA zu synthetisieren. Diese cDNA kann dann anschließend in die RT-PCR eingesetzt werden.

Die für die cDNA-Synthese benötigten Reagenzien (alle Applied Biosystems) sind in der folgenden Tabelle angegeben:

RT-Puffer	2µl
rMoMuLV reverse Transkriptase	1µl
RNAse Inhibitor	1µl
random Primer	2µl
dNTPs	0,8µl

Die cDNA-Synthese Reaktion wird bei 37°C im Heizblock für 2 Stunden durchgeführt. Die Reaktion wird durch 5sec bei 85°C gestoppt. Anschließend kann die cDNA bei -20°C aufbewahrt werden.

3.2.7.3 quantitative *realtime* Polymerasekettenreaktion

Die Genexpressionslevel der zu untersuchenden Extrazellulärmatrixproteine können nun mittels quantitativer *realtime* Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) bestimmt werden. Für die rt-PCR wird der Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) wie folgt verwendet:

Power SYBRGreen PCR Master Mix	10µl
Primer forward	1µl
Primer reverse	1µl
DEPC Wasser	6,8µl
cDNA	1,2µl

SYBRGreen ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert mit der Amplifikation der Target-DNA. Die Amplifikation wird mit dem ABI Prism 7300 des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung IZKF Biomat, Universitätsklinikum Aachen detektiert. Dabei wird der CT-Wert (Cycle Threshold) bestimmt. Dieser gibt an in welchem Zyklus der PCR die Fluoreszenz erstmalig signifikant ansteigt. Die Expressionlevel der untersuchten Gene werden gegen die Expression des *Housekeeping*-Gen Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert und die relative Genexpression mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnet. Die cDNA von dreidimensional kultivierten mesenchymalen Stromazellen von nicht-MPN-Patienten wird dabei als relativer Standard verwendet.

Die rt-PCRs zur ECM-Protein-Expression von MSC auf β -TCP-Scaffolds wurden von Frau Kristina Peuckert durchgeführt.

3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten und der RT-PCR Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung eines dreidimensionalen Kultivierungssystems zur Kokultivierung für mesenchymalen Stroma- und hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen

Als Hauptkomponenten der Knochenmarksnische wurde (i) die komplexe dreidimensionale spongiöse, knöcherne Struktur, (ii) die Komponenten der extrazellulären Matrix sowie (iii) mesenchymale Stromazellen beschrieben (Bianco *et. al.*, 2011; Adams und Scadden, 2006). Um diese Gegebenheiten *in vitro* in vereinfachter Form wiederzuspiegeln, wurde in der vorliegenden Arbeit ein dreidimensionales Ko-Kultursystem für mesenchymale Stromazellen und hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen etabliert. Hierzu wurden Kollagengele verwendet, die hauptsächlich aus Kollagen I bestehen. Kollagen I ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des Knochenmarks. Wie schon zuvor gezeigt werden konnte, eignen sich Kollagengele, die aus acidem Kollagen nach Neutralisierung und Polymerisierung hergestellt werden, zur Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen (Schneider *et. al.*, 2010a, Schneider *et. al.*, 2010b). Die mesenchymalen Stromazellen können daher vor der Polymerisierung in das Kollagengel eingebettet werden. Aus Nabelschnurblut isolierte CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen wurden in Suspension auf die Kollagengele gegeben. Der Einfluss der dreidimensionalen Kultivierung wurde auf die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Vergleich zur konventionellen Kultivierung auf Zellkulturplastik analysiert. Die charakteristischen Eigenschaften von mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks und der Nabelschnur wurden in ihrer Hämatopoese-unterstützenden Funktion als Stromakomponente verglichen. Als Kontrolle wurden zudem Kollagengele ohne eingebettete mesenchymale Stromazellen verwendet.

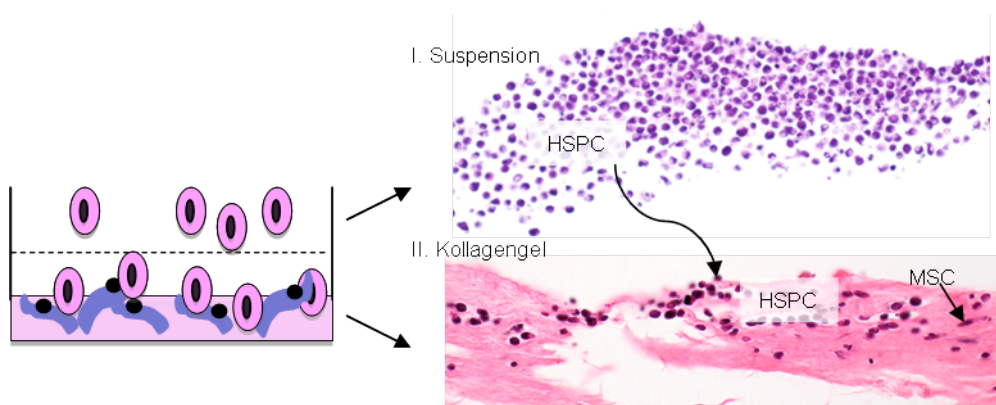


Abbildung 9: Dreidimensionales kollagenbasiertes Kultivierungssystem. In das dreidimensionale Kollagengel wurden mesenchymale Stromazellen eingebettet. CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut wurden in Suspension auf das Kollagengel gegeben. Das Kultivierungssystem ermöglichte die Analyse zweier Kompartimente: (i) Zellen in Suspension über dem Kollagengel und (ii) Zellen im Kollagengel. HSPC = hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen. MSC = mesenchymale Stromazellen.

4.1.1 Migrationsverhalten der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Mittels histologischer und elektronenmikroskopischer Analysen wurde untersucht, ob die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in die Kollagengele migrieren. Hierzu wurden Hämalan-Eosin (HE)-Färbungen der Kollagengele nach 7 und 14 Tagen Kultur angefertigt (Abbildung 10). Verglichen wurden Kollagengele ohne Stromakomponente, sowie Kollagengele mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks oder der Nabelschnur. Nach 7 Tagen Kultur waren in Kollagengelen mit eingebetteten MSC des Knochenmarks und der Nabelschnur zahlreiche hämatopoetische Zellen zu erkennen (ii, iii), während in Kollagengelen ohne MSC nur vereinzelt hämatopoetische Zellen zu finden waren (i). Keinen morphologischen Unterschied gab es zwischen mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks oder der Nabelschnur.

Nach 14 Tagen Kultur war auch in Kollagengelen ohne Stromakomponente (iv) eine ähnliche Anzahl an hämatopoetischen Zellen zu erkennen (v, vi). In Ko-Kultur mit MSC des Knochenmarks und der Nabelschnur waren in Gruppen gelagerte hämatopoetische Zellen zu sehen.

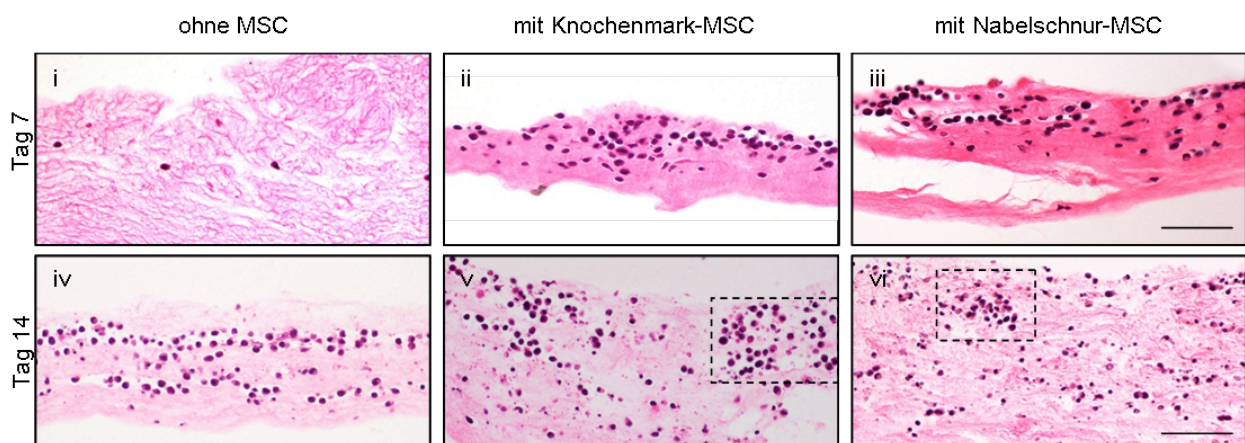


Abbildung 10: Migrationsverhalten der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in die Kollagengele: Hämalan-Eosin (HE)-Färbung der Kollagengele im Querschnitt nach 7 und 14 Tagen Kultivierung. In der HE Färbung sind in die Kollagengele migrierte CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen zu sehen. Nach 7 Tagen Kultur ist der Anteil der migrierten Zellen deutlich höher in Gelen mit eingebetteten mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks (ii) oder der Nabelschnur (iii) im Vergleich zu Kollagengelen ohne mesenchymale Stromazellen (i). Nach 14 Tagen ist kein Unterschied in der Anzahl der migrierten hämatopoetischen Zellen zu erkennen. In Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen lagern sich die hämatopoetischen Zellen in Gruppen zusammen (v, vi). Skala: 100µm. MSC = mesenchymale Stromazellen

Die Kollagengele wurden weiterhin in der Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert (Abbildung 11). Wie schon zuvor beschrieben, ist das Kollagengel gekennzeichnet durch eine Faserartige Struktur. Auch in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten die hämatopoetischen Zellen im Fasernetzwerk der Kollagengele visualisiert werden. In Ko-

Kultur fanden sich die hämatopoetischen Zellen in Assoziation zu den MSC (ii, iii, v, vi). In Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks waren Gruppen von hämatopoetischen Zellen mit mehr als 10 Zellen zu erkennen (ii).

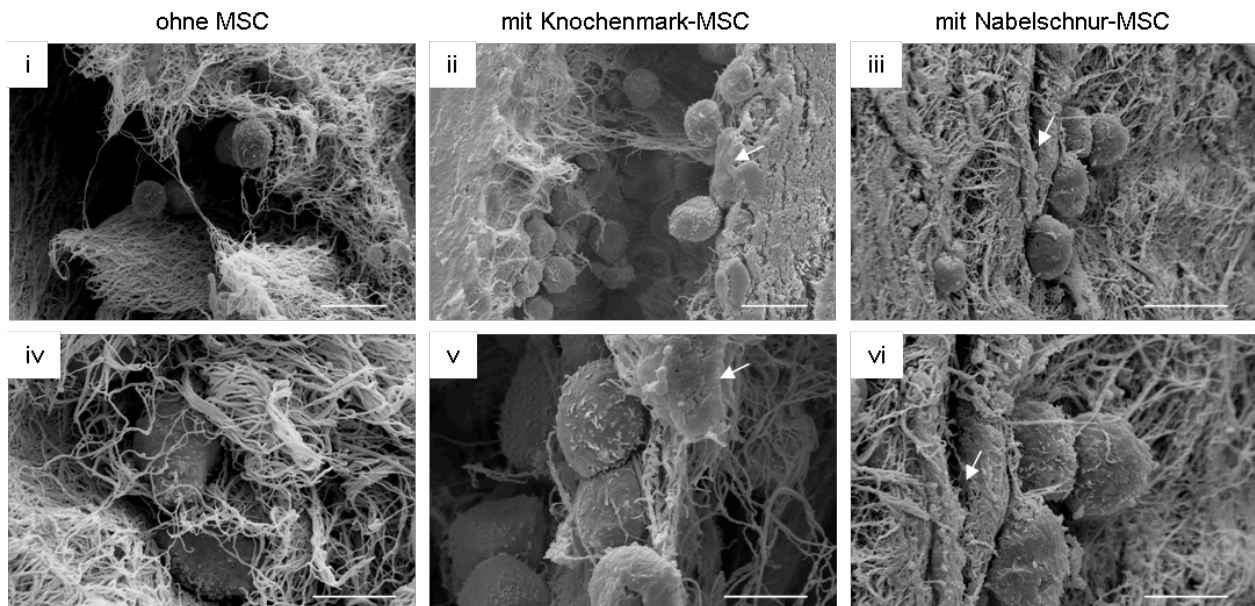


Abbildung 11: Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Kollagengele: In der Elektronenmikroskopie der Kollagengele im Querschnitt nach 14 Tagen Kultur sind die hämatopoetischen Zellen im Fasernetzwerk der Kollagengele zu erkennen. In Ko-Kultur finden sich die hämatopoetischen Zellen in Assoziation zu den mesenchymalen Stromazellen (ii, iii, v, vi: Pfeile). In Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks sind hämatopoetische Zellen in Gruppen von mehr als 10 Zellen zu erkennen (ii). Skalen: i, ii, iii: 10 μ m; iv, v, vi: 5 μ m. MSC = mesenchymale Stromazellen.

4.1.2 Proliferationsverhalten der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Das Proliferationsverhalten der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wurde mittels Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)-Färbung und durchflusszytometrischer Messung der Fluoreszenz an Tag 3 und 5 analysiert (Abbildung 12 (A), (B)). Bestimmt wurde der Anteil an schnell proliferierenden Zellen, die gekennzeichnet sind durch einen schnellen Verlust des Fluoreszenzsignals. Analysiert wurden die hämatopoetischen Zellen im Kollagengel, sowie die in Suspension verbliebenen Zellen. Außerdem wurde das dreidimensionale Kultivierungssystem mit der konventionellen Kultivierung auf Zellkulturplastik verglichen. Sowohl im dreidimensionalen Kultivierungssystem als auch in der konventionellen Kultur wurde zudem der Einfluss von MSC des Knochenmarks und der Nabelschnur auf das Proliferationsverhalten der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen untersucht.

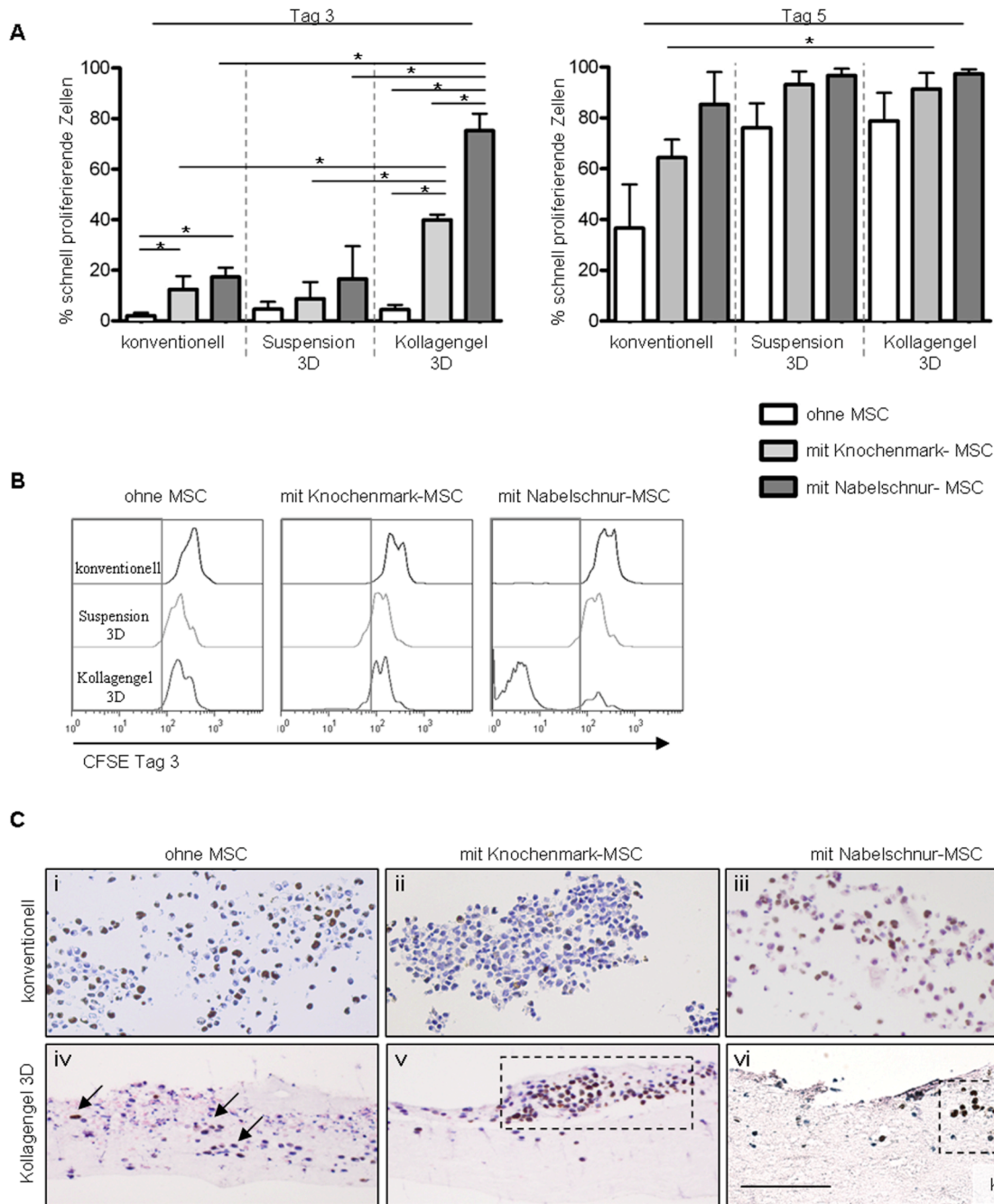


Abbildung 12: Proliferationsverhalten der CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen. (A) Quantifizierung der schnellproliferierenden hämatopoetischen - und Progenitorzellen unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Die Abnahme der Fluoreszenz der mit CFSE gefärbten hämatopoetischen - und Progenitorzellen wurde mittels Durchflusszytometrie an Tag 3 und 5 bestimmt. Bestimmt wurde der Anteil an schnell proliferierenden Zellen, die gekennzeichnet sind durch einen schnellen Verlust des Fluoreszenzsignals. * $p = < 0,05$. $n = 3$. (B) Repräsentative Darstellung der CFSE-Fluoreszenz-Analyse an Tag 3 im Histogramm. Die Umrandung markiert den Anteil der Zellen mit hoher Teilungsrate, die gekennzeichnet sind durch einen schnellen Verlust der Fluoreszenz. (C) Immunhistochemie für den Proliferationsmarker Ki-67 in konventioneller Kultur (i, ii, iii) und in den Kollagengelen (iv, v, vi). In den Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks und der Nabelschnur sind die Ki-67 positiven Zellen in Gruppen gelagert (Umrandungen). In Kollagengelen ohne mesenchymale Stromazellen sind Ki-67 positive Zellen sporadisch in der kollagenen Matrix verteilt (Pfeile). Skala: 100 μ m. MSC = mesenchymale Stromazellen.

An Tag 3 nach Kulturstart war der Anteil an schnell proliferierenden hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Kollagengelen mit MSC der Nabelschnur mit durchschnittlich 75% signifikant höher ($p=0,0076$) als in Kollagengelen mit MSC des Knochenmarks mit durchschnittlich 40% oder in Kollagengelen ohne mesenchymale Stromazellen mit durchschnittlich 4%. Der Anteil der schnell proliferierenden Zellen war zudem in den Gelen mit MSC des Knochenmarks und der Nabelschnur signifikant höher im Vergleich zur Suspension über den Kollagengelen oder in konventioneller Kultivierung ($<20\%$, $p\leq 0,016$). Der positive Einfluss der MSC auf das Proliferationsverhalten der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wurde auch in der konventionellen Kultivierung deutlich: Der Anteil der schnell proliferierenden Zellen war hier signifikant höher in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks ($\approx 12\%$, $p=0,0303$) und der Nabelschnur ($\approx 17\%$, $p=0,0012$) verglichen mit der konventionellen Kultivierung mit durchschnittlich nur 2% an schnellproliferierenden Zellen.

An Tag 5 war mit einem durchschnittlichen Anteil von $>75\%$ der größte Teil der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Kollagengelen mit und ohne MSC sowie in Suspension schnell proliferierend. In konventioneller Kultur war der Anteil an schnell proliferierenden Zellen in Ko-Kultur mit MSC der Nabelschnur ähnlich hoch wie in dreidimensionaler Kultur. In konventioneller Ko-Kultur mit MSC des Knochenmarks hatte der Anteil an schnell proliferierenden Zellen mit durchschnittlich 64% im Vergleich zu Tag 3 deutlich zugenommen, war jedoch signifikant geringer verglichen mit dem dreidimensionalen Kultivierungssystem ($\approx 91\%$, $p=0,0465$). In konventioneller Kultur ohne MSC war der Anteil schnell proliferierender Zellen mit durchschnittlich 37% am geringsten.

In der Immunhistochemie für den Proliferationsmarker Ki-67 an Tag 14 konnte die Verteilung der proliferierenden Zellen in der kollagenen Matrix dargestellt werden (Abbildung 12 B). In Ko-Kultur mit MSC waren Ki-67 positive Zellen zu Gruppen zusammengelagert. In Kollagengelen ohne mesenchymale Stromazellen war die Verteilung der Ki-67 positiven Zellen sporadisch. Zudem waren deutlich weniger positiv gefärbte Zellen sichtbar. In der konventionellen Kultur wurde vor allen der positive Einfluss der MSC der Nabelschnur auf die Proliferation deutlich. Hier war nach 14 Tagen Kultur ein großer Teil der Zellen positiv für den Proliferationsmarker Ki-67 (Abbildung 12 (C,iii)).

Da hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen generell im Rahmen der Proliferation differenzieren, wurde untersucht, ob die schnell proliferierenden Zellen noch positiv für den

Stammzell- und Progenitormarker CD34 sind (Tag 3 und 5) (Abbildung 13).

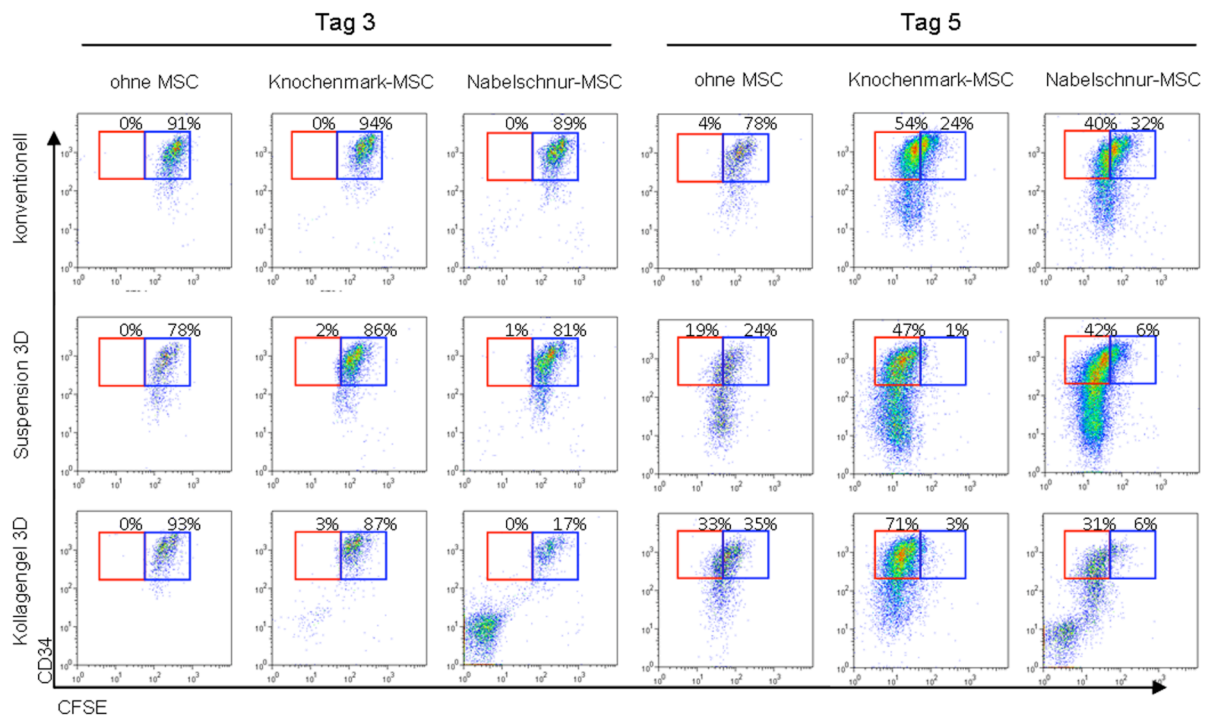


Abbildung 13: CD34+ Phänotyp in Zusammenhang zum Proliferationsverhalten. Exemplarische Darstellung der FACS-Plots. Blau umrandet sind die langsam proliferierenden CD34 positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, rot umrandet die schnell proliferierenden CD34 positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen. An Tag 5 ist der Anteil an CD34 positiven schnell proliferierenden Zellen am höchsten in Kollagenjelen mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks während in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen der Nabelschnur die Proliferation einhergeht mit einer Abnahme der CD34 Expression. MSC = mesenchymale Stromazellen.

An Tag 3 war ein Großteil der hämatopoetischen Zellen in Kollagenjelen mit MSC der Nabelschnur schnell proliferierend, was – wie bereits beschrieben- einhergeht mit einem Verlust der CD34 Expression. Nur eine kleinere Subpopulation zeigte einen langsam proliferierenden CD34+ Phänotyp. In Kollagenjelen mit MSC des Knochenmarks sowie in Kollagenjelen ohne MSC war ein Hauptteil der hämatopoetischen Zellen an Tag 3 langsam proliferierend und weiterhin CD34+. Auch die in Suspension über den Kollagenjelen verbliebenen Zellen sowie hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen in konventioneller Kultur waren an Tag 3 zum größten Teil langsam proliferierend und CD34+. An Tag 5 war auch ein Hauptteil der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in den Kollagenjelen mit MSC des Knochenmarks schnell proliferierend. Im Gegensatz zu Zellen in Kollagenjelen mit MSC der Nabelschnur zeigte jedoch ein Großteil dieser schnell proliferierenden Subpopulation einen CD34+ Phänotyp. Im Vergleich von konventioneller Kultur, den in Suspension verbliebenen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen sowie den in die Kollagenjele migrierten Zellen war der Anteil der CD34+ schnell proliferierenden Zellen im

Kollagengel mit MSC des Knochenmarks am höchsten ($\approx 70\%$). Die Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks führte also zu einer erhöhten Proliferationsrate der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, aber zugleich wurde auch der Erhalt des CD34+ Phänotyps gefördert. Im Gegensatz dazu führte die erhöhte Proliferationsrate in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen der Nabelschnur zugleich zu einer Abnahme der CD34-Expression.

4.1.3 Erhalt des CD34+ Phänotyps der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil der primitiven CD34+ CD38- Subpopulation innerhalb der isolierten CD34+ Zellen in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen nach 7 und 14 Tagen bestimmt. Nach 7 Tagen Kultur war der Anteil der CD34+ CD38- hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Ko-Kultur mit MSC des Knochenmarks sowohl in konventioneller Kultur ($p=0,0444$) als auch in dreidimensionaler Kultur in Suspension ($p=0,0314$) und im Kollagengel ($p=0,0224$) signifikant höher als in Ko-Kultur mit MSC der Nabelschnur (Abbildung 14. (A)).

Nach 14 Tagen Kultur war der Erhalt der primitiven Subpopulation der CD34+ CD38- Zellen in Kollagengelen mit MSC des Knochenmarks mit durchschnittlich 43% signifikant am höchsten. In Kollagengelen ohne MSC ($p= 0,0479$) oder mit MSC der Nabelschnur ($p=0,0043$) war der Anteil der CD34+ CD38- Zellen mit $\leq 20\%$ deutlich geringer. Zudem war der Erhalt des primitiven Phänotyps auch in konventioneller Kultur und in den Suspensionen über den Gelen durch Ko-Kultur mit MSC des Knochenmarks signifikant erhöht im Vergleich zur Ko-Kultur mit Nabelschnur-MSC oder Monokultur. Weiterhin zeigt sich in Ko-Kultur mit MSC des Knochenmarks auch der positive Einfluss des Kollagengels. Im Vergleich zur konventionellen Kultur mit MSC des Knochenmarks und zur Suspension über den Kollagengelen wurden in dieser Kulturbedingung signifikant mehr CD34+ CD38- hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen gemessen. Die Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks förderte also den Erhalt der primitiven Subpopulation der CD34+ CD38- Zellen verglichen zur Kultur ohne mesenchymale Stromazellen oder mesenchymale Stromazellen der Nabelschnur. Hierbei war vor allem die dreidimensionale Kultur im Kollagengel von Vorteil.

Nach 14 Tagen Kultur wurde weiterhin immunhistochemisch die Verteilung der CD34 positiven Zellen beurteilen zu können (Abbildung 14 (B)). In Kollagengelen mit MSC des Knochenmarks wurden vermehrt CD34+ Zellen sichtbar, die in Gruppen gelagert waren (v). Im Vergleich dazu waren in Gelen ohne mesenchymale Stromazellen oder mit

mesenchymalen Stromazellen der Nabelschnur nur vereinzelt positiv gefärbte Zellen zu erkennen, die sporadisch verteilt in der kollagenen Matrix waren (iv, vi). In konventioneller Kultur waren vor allem in Ko-Kultur mit MSC der Nabelschnur nur wenige CD34 positive Zellen zu sehen (iii).

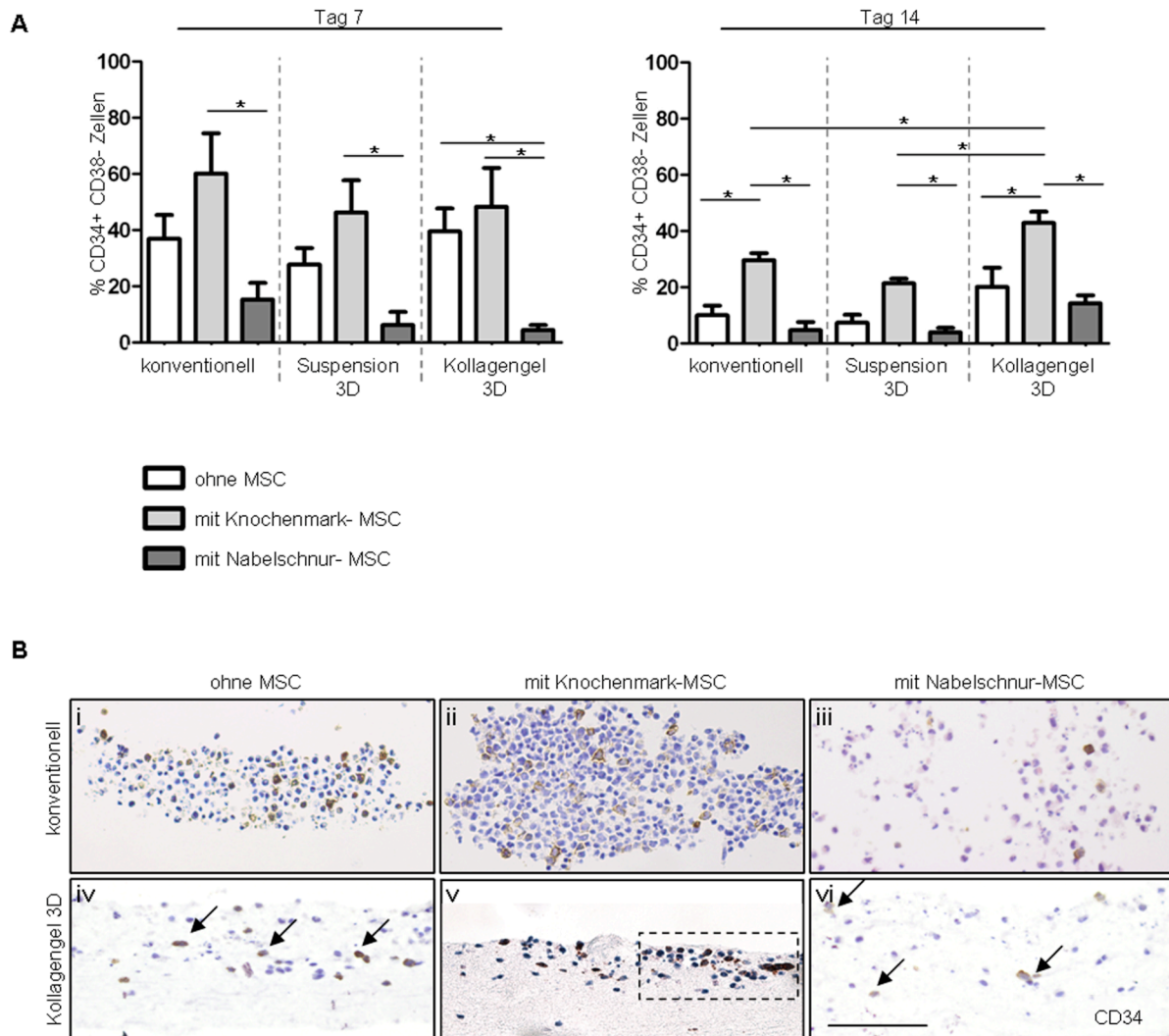


Abbildung 14: (A) Erhalt des primitiven CD34+ CD38- Phänotyps in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach 7 und 14 Tagen Kultur der Anteil an hämatopoetischen Zellen mit primitiven CD34+ CD38- Phänotyp bestimmt. * $p < 0,05$. $n = 3$. (B) Immunhistochemie für CD34 von Zellen in konventioneller Kultur (i, ii, iii) und den Kollagengelen (iv, v, vi) In Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks sind CD34+ Zellen in Gruppen gelagert (Umrandung). In Kollagengelen ohne mesenchymale Stromazellen sowie mit mesenchymalen Stromazellen der Nabelschnur waren dagegen vereinzelt liegende CD34+ Zellen zu erkennen (Pfeile). Skala: 100µm. MSC = mesenchymale Stromazellen.

4.1.4 Differenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie wurde die hämatopoetische Liniendifferenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in konventioneller Kultur und dreidimensionalen Kultur nach 14-tägiger Kultivierung analysiert. Die

durchflusszytometrische Analyse für den Monozytenmarker CD13 zeigte in den Kollagengelen eine verstärkte Differenzierung in die myeloide Richtung im Vergleich zur konventionellen Kultur und zu den in Suspension verbliebenen Zellen (Abbildung 15 (A)). Vor allem in Monokultur wurde der positive Einfluss des Kollagens auf die myeloide Differenzierung sichtbar: Für Kollagengele ohne MSC war die Anzahl CD13+ Zellen mit durchschnittlich 73% signifikant höher im Vergleich zur Suspension mit durchschnittlich 54% ($p=0,0234$) und konventionellen Kultur mit 50% CD13+ Zellen ($p=0,0051$).

In der Chloracetatesterase (CAE)-Färbung, welche Zellen der myeloiden Reihe färbt, wurde eine verstärkte myeloide Differenzierung in Ko-Kultur mit MSC sichtbar, sowohl in konventioneller Kultur als auch im Kollagengel (Abbildung 15 (C)).

Die durchflusszytometrische Analyse für den NK-Zell-Marker CD56 zeigte eine weitere Differenzierung der hämatopoetischen Zellen in konventioneller Kultur und Suspension im Vergleich zu den in die Kollagengele migrierten Zellen (Abbildung 15 (B)). Die Anzahl CD13+ CD56+ Zellen war mit durchschnittlich 31% signifikant erhöht in konventioneller Kultur ohne mesenchymale Stromazellen ($p<0,0001$) und in Suspension (25%) ($p=0,0037$) verglichen zum Kollagengel mit durchschnittlich 8% doppelt positiver Zellen.

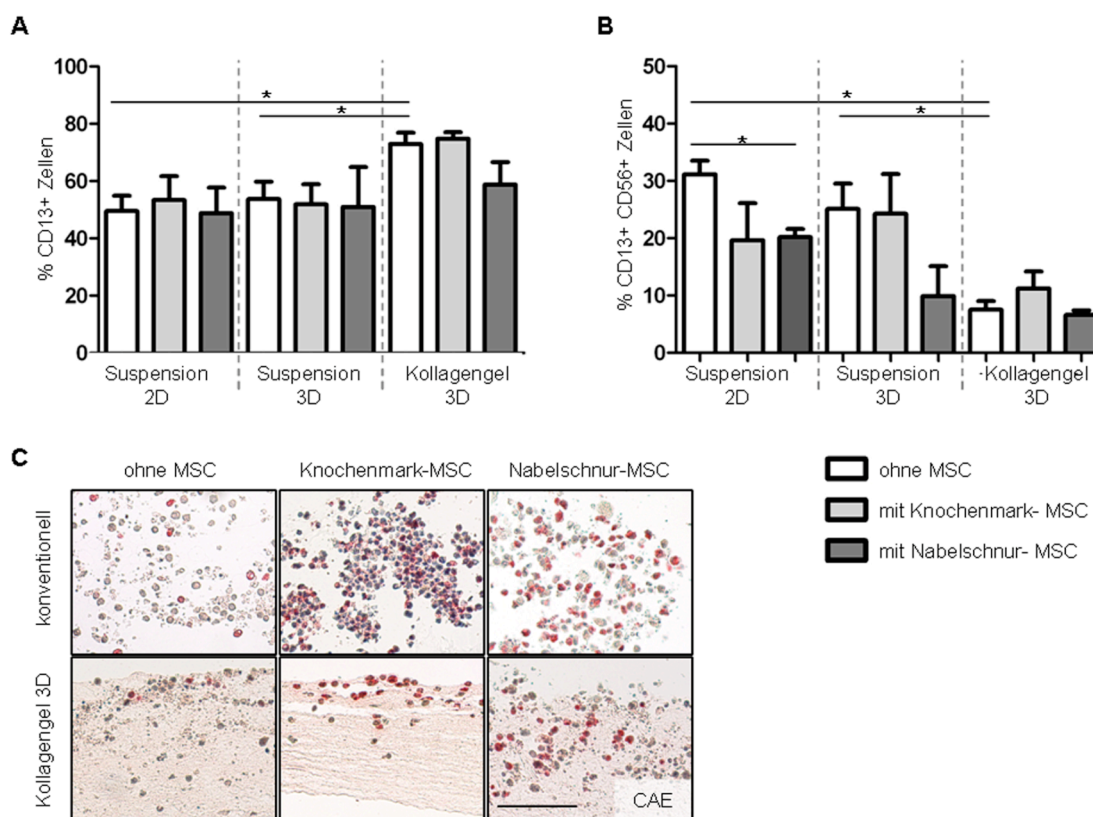


Abbildung 15: Liniendifferenzierung der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen nach 14 Tagen Kultur: (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD13+ und (B) CD13+ CD56+ Population in konventioneller und dreidimensionaler Kultur. $*p<0,05$ (C) Chloracetatesterase Färbung zur Darstellung myeloid differenzierter Zellen in konventioneller Kultur und im Kollagengel. Skala: 100µm. MSC = mesenchymale Stromazellen.

Die Immunhistochemie zeigte die Expression des pan-Leukozytenmarkers CD45 in konventioneller und dreidimensionaler Kultur sowohl in Monokultur als auch in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen (Abbildung 16 (i-vi)). Weiterhin konnte die Verteilung der CD13+ hämatopoetischen Zellen in der kollagenen Matrix visualisiert werden. In Kollagengelen mit eingebetteten MSC des Knochenmarks (viii) und der Nabelschnur (ix) waren die CD13+ Zellen in Gruppen gelagert, während in Gelen ohne MSC eine sporadische Verteilung zu beobachten war (vii). In der Immunhistochemie waren in den Kollagengelen kaum CD56+ Zellen zu sehen (x-xii), was das Ergebnis der Durchflusszytometrie bestätigte.

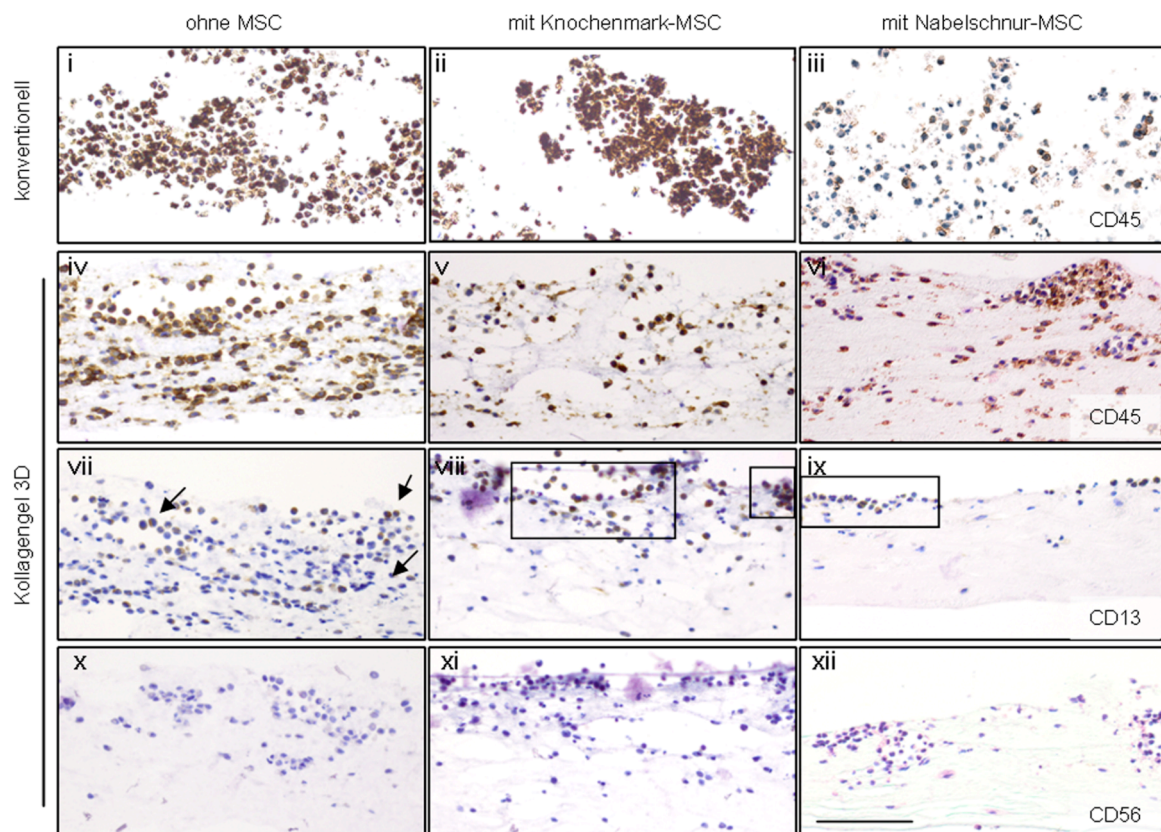


Abbildung 16: Immunhistochemie für die Oberflächenmarker CD45, CD13 und CD56. Die Immunhistochemie zeigt die Expression des pan-Leukozytenmarker CD45 sowohl in konventioneller Kultur als auch im dreidimensionalen Kollagengel (i-vi). CD13+ Zellen sind in Kokultur mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks und der Nabelschnur im Kollagengel in Gruppen gelagert (viii, ix: Umrandungen), während die CD13+ Zellen in Kollagengelen ohne mesenchymale Stromazellen sporadisch in der Matrix verteilt sind (vii: Pfeile). Skala: 100µm. MSC = mesenchymale Stromazellen.

4.1.5 Apoptoserate der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Die Vitalität der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in der dreidimensionalen Kultivierung im Vergleich zur konventionellen Kultivierung wurde beurteilt, indem der Anteil an apoptotischen und toten Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurde. Hierzu wurde nach 14 Tagen Kultur eine Annexin V/ 7AAD Färbung durchgeführt.

AnnexinV+/7AAD-Zellen sind apoptotisch und doppelpositive Annexin V+/7AAD+ Zellen tot. In der durchflusszytometrischen Analyse lag der Anteil an apoptotischen Zellen in allen Kultivierungsbedingungen bei <2% und der Anteil toter Zellen bei <10% (Abbildung 17 (A)).

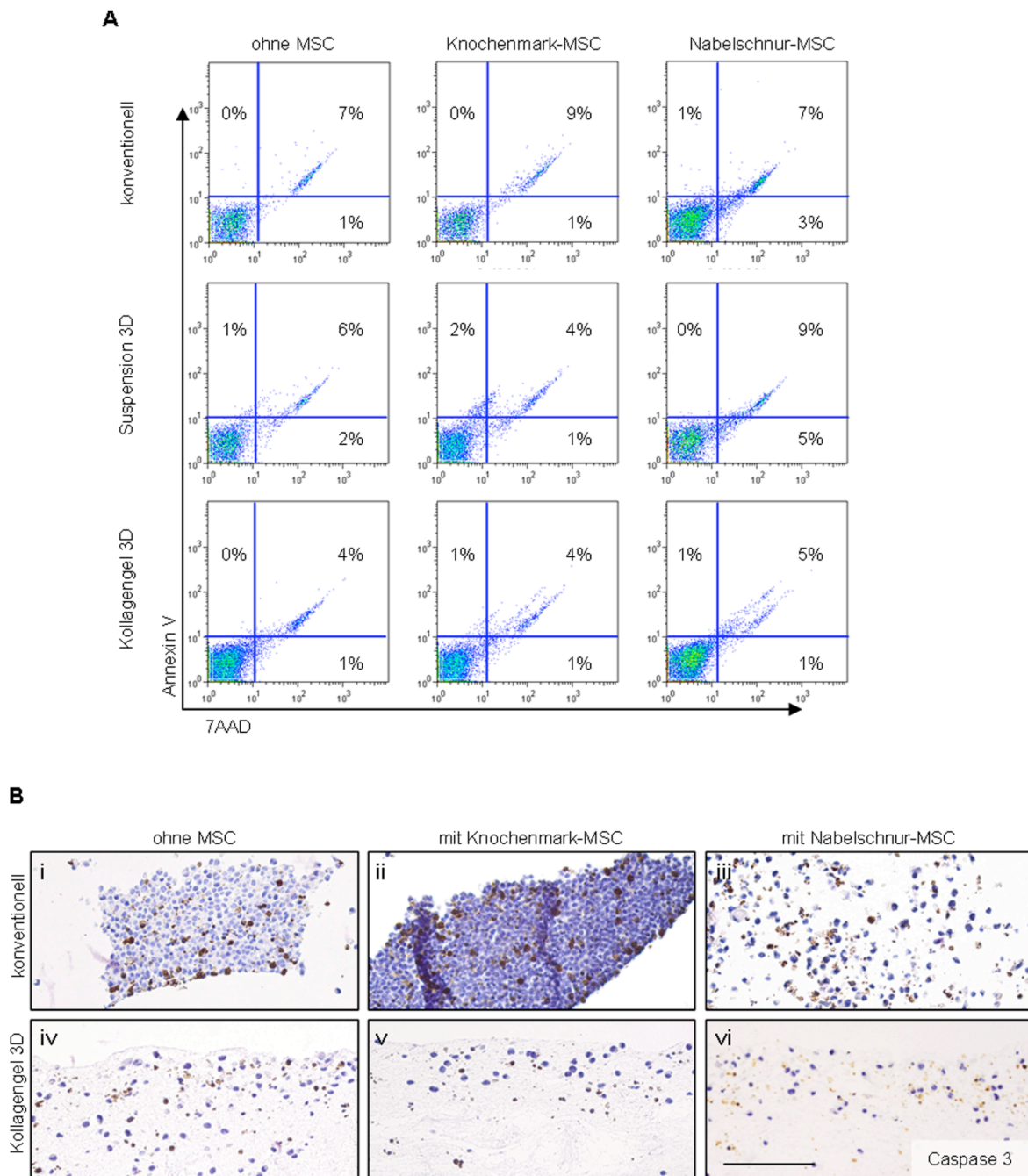


Abbildung 17: Bestimmung der Apoptoserate der hämatopoetischen Zellen unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen. (A) Bestimmung der Apoptoserate mittels Annexin V/ 7AAD Färbung und durchflusszytometrischer Analyse. Repräsentative Darstellung der Durchflusszytometrie nach 14 Tagen Kultur. Bestimmt wird der Anteil vitaler Zellen (Annexin V-/ 7AAD-), apoptotischer Zellen (Annexin V+/ 7AAD-) und toter Zellen (Annexin V+/ 7AAD+). (B) Immunhistochemische Färbung des frühen apoptotischen Markers Caspase 3 in konventioneller Kultur (i, ii, iii) sowie in Kollagen 3D (iv, v, vi) nach 14 Tagen Kultur. Skala: 100µm. MSC = mesenchymale Stromazellen.

Die Immunhistochemie für den frühen apoptotischen Marker Caspase 3 bestätigte das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse und zeigte keine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in den Kollagengelen (Abbildung 17. (B)).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das kollagenbasierte dreidimensionale Kultivierungssystem geeignet war zur Ko-Kultivierung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen sowie von mesenchymalen Stromazellen. Das System ermöglichte die Analyse von zwei Kompartimenten: (i) Zellen in Suspension und (ii) migrierte Zellen. In den Kollagengelen migrierte Zellen zeigten in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen ein Wachstum in Clustern, welches ein Hinweis für klonale Expansion ist. Die Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks im Kollagengel förderte signifikant den Erhalt der primitiven Subpopulation der CD34⁺ CD38⁻ Zellen. Mesenchymale Stromazellen der Nabelschnur förderten dagegen vor allem die Proliferation der ursprünglich CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, die mit der Differenzierung der Zellen einherging.

4.1.6 Einfluss osteogen differenzierter mesenchymaler Stromazellen im dreidimensionalen Kultivierungssystem

In der Knochenmarksnische spielen mesenchymale Stromazellen vor allem als Vorläuferzellen von osteogenen Zellen eine bedeutende Rolle in der endostalen Nische des Knochenmarks. Daher wurden mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks vor Start der Ko-Kultur mit CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im dreidimensionalen Kollagengel osteogen differenziert. Die osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen wurden analysiert mit dem Schwerpunkt Matrixremodellierung und supportiver Einfluss auf Proliferation und Erhalt der CD34⁺ Subpopulation verglichen undifferenzierten mesenchymalen Stromazellen.

Die Kollagengele mit osteogen differenzierten MSC wurden nach 14 Tagen Ko-Kultur mit CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen elektronenmikroskopisch analysiert (Abbildung 18 (A)). In der Rasterelektronenmikroskopie zeigten sich deutliche Kalkablagerungen in der kollagenen Matrix. In dem verkalkten Kollagengel war eine große Anzahl hämatopoetischer Zellen zu sehen (Abbildung 18 (i)). Weiterhin fanden sich MSC, auf deren Oberfläche die Kalkablagerungen als Zeichen der osteogenen Differenzierung zu erkennen waren. In direkter Nähe zu diesen osteogen differenzierten Zellen befanden sich die hämatopoetischen Zellen (Abbildung 18 (ii)). In der energiedispersiven Röntgenspektroskopie

(EDX) konnte die Zusammensetzung der Kalkablagerungen aus Kalzium und Phosphat bestätigt werden (iii, iv). Weiterhin konnte die osteogene Differenzierung auch immunhistochemisch mittels van Kossa Färbung nachgewiesen werden. In Kollagengelen mit osteogen differenzierten MSC waren braun gefärbte Kalkablagerungen zu sehen (Abbildung 18 (B, ii)).

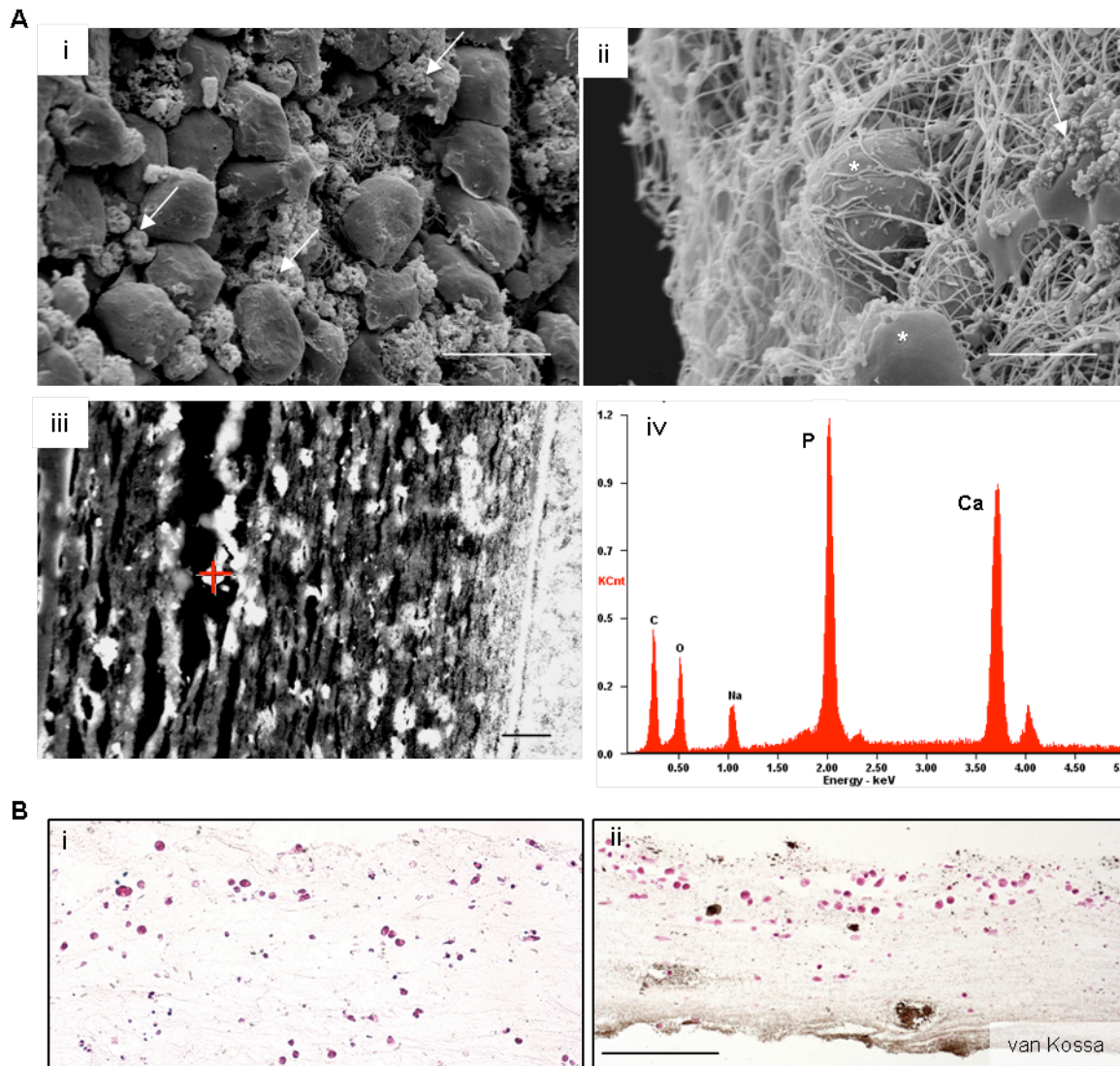


Abbildung 18: Osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen im dreidimensionalen Ko-Kultursystem: (A) Elektronenmikroskopische Analyse eines Kollagengels mit eingebetteten osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks nach 14 tägiger Ko-Kultur mit hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen. In der rasterelektronischen Aufnahme sind hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in der verkalkten kollagenen Matrix zu erkennen (i). Die Kalkablagerungen sind zudem auf der Oberfläche der mesenchymalen Zellen zu finden. Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (*) liegen in direkter Nähe zu den osteogen differenzierten mesenchymalen Zellen (Pfeilen) eingebettet in das verkalkte Fasernetzwerk (ii). In der EDX-Analyse konnte die Zusammensetzung der Kalkablagerungen aus Kalzium (Ca) und Phosphat (P) bestätigt werden (iii, iv). Skalen: i, iii: 10µm, ii: 5µm.

(B) In der Van Kossa Färbung sind braun gefärbte Kalkablagerungen im Kollagengel mit osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen zu sehen (ii). Im Kollagengel mit undifferenzierten mesenchymalen Stromazellen ist keine Färbung zu erkennen (i).

4.1.6.1 Matrixremodellierung im dreidimensionalen Kollagengel

Mittels Immunhistochemie wurde überprüft, ob die in die Kollagengele eingebetteten mesenchymalen Stromazellen die entscheidenden Komponenten der extrazellulären Matrix des Knochenmarks exprimieren (Abbildung Nr 19). Verglichen wurden Kollagengele mit MSC des Knochenmarks, die in Standardmedium kultiviert wurden und Kollagengele in denen die MSC osteogen differenziert wurden. Als Negativkontrolle dienten Kollagengele ohne mesenchymale Stromazellen. In der Immunhistochemie wurde die Sezernierung der Matrixproteine Kollagen I, Fibronectin und Osteopontin als Hauptproteine der Knochenmarksnische analysiert. Die Immunhistochemie von Knochenmarksstanzen zeigte die physiologische Lokalisation der Extrazellulärmatrix Proteine im Knochenmark. Kollagen 1 wird vor allen in der endostalen Region an den Knochentrabekeln exprimiert. Fibronectin findet sich sowohl in der endostalen Region als auch perivaskulär in Assoziation zu den Sinusoiden. Das Glycoprotein Osteopontin wird in der endostalen Nische sezerniert.

Das verwendete Kollagengel besteht zu einem großen Anteil aus Kollagen 1. Somit zeigte auch die Negativkontrolle eine positive Färbung für dieses Matrixprotein. Eine verstärkte Färbung konnte in Kollagengelen mit eingebetteten undifferenzierten und osteogen differenzierten MSC festgestellt werden.

Fibronectin wurde sowohl von undifferenzierten MSC als auch osteogen differenzierten Zellen exprimiert. Das Glycoprotein Osteopontin wurde als typisches Produkt der Osteoblasten lediglich in Kollagengelen mit osteogen differenzierten MSC sezerniert.

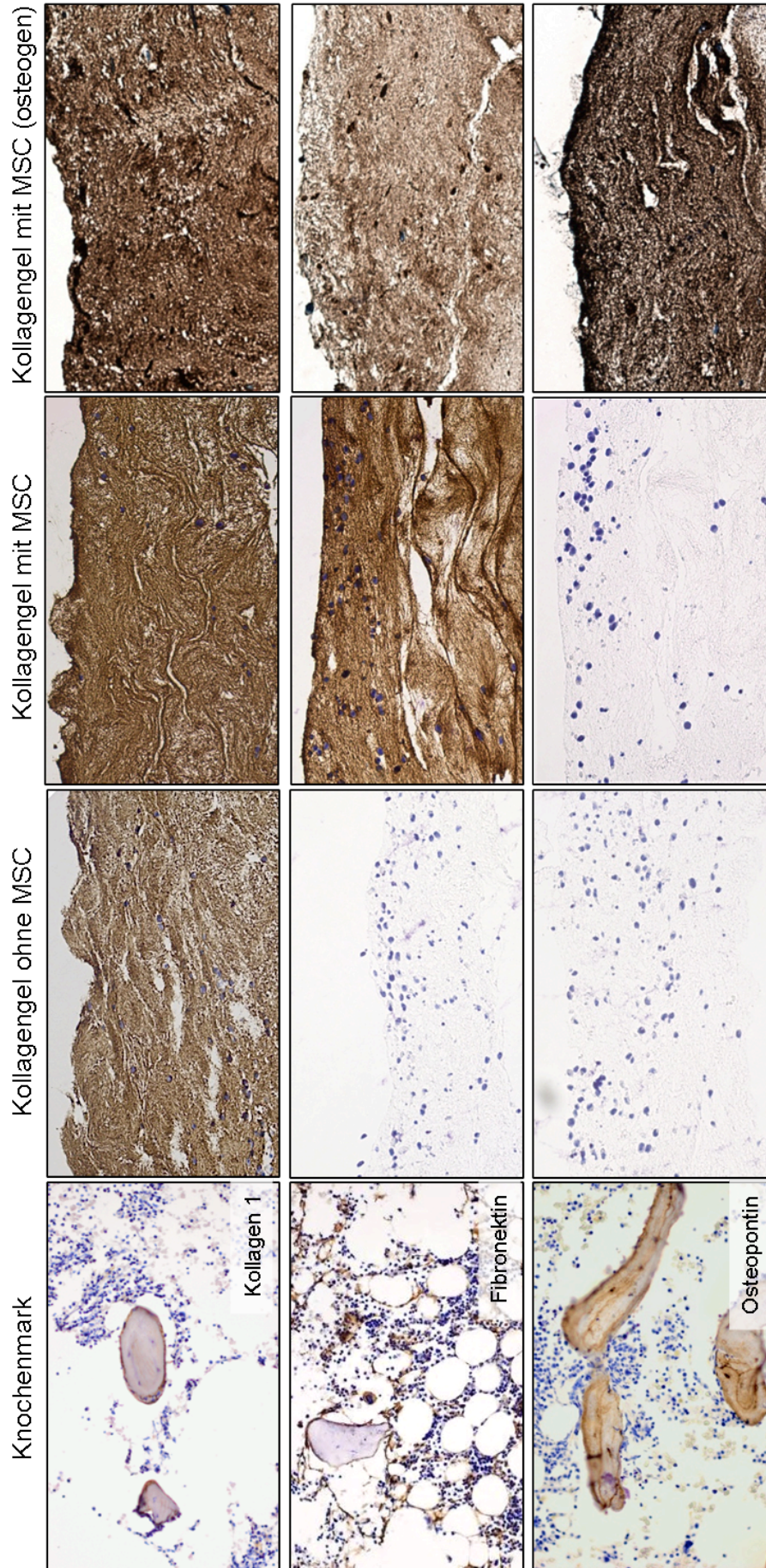


Abbildung 19: Immunhistochemie der Extrazellulärmatrixproteine Kollagen 1, Fibronektin und Osteopontin. Kollagengele mit undifferenzierten MSC und osteogen differenzierten MSC nach 14 Tagen Ko-Kultur im Vergleich zu Kollagenen ohne MSC. Die Immunhistochemie der Knochenmarksstanzen zeigt die Lokalisation der Extrazellulärmatrixproteine in der Knochenmarksnische: Kollagen 1 findet sich vor allem in der endostalen Region an den Knochenrabelehn, Fibronektin wird sowohl in der endostalen Region als auch perivaskulär exprimiert und Osteopontin in der endostalen Region. MSC = mesenchymale Stromazellen.

4.1.6.2 Einfluss der osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen auf das Proliferationsverhalten der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

In konventioneller und dreidimensionaler Kultur wurde der Einfluss osteogen differenzierter MSC auf das Proliferationsverhalten der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen analysiert. Die CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wurden vor Kulturstart mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE gefärbt, um ihre Teilungsrate nach zu vollziehen. Der Anteil an schnell proliferierenden hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, welche aufgrund des schnellen Verlustes der Fluoreszenz bestimmt werden können, wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abbildung 20 (A)). Die Ko-Kultur mit osteogen differenzierten MSC im Kollagengel führte schon an Tag 3 nach Kulturstart mit durchschnittlich 80% zu einer signifikant erhöhten Anzahl schnell proliferierender hämatopoetischer Zellen im Vergleich zur Kultur mit undifferenzierten MSC (40%, $p=0,0099$) und zur Monokultur (4%, $p<0,0001$). Weiterhin war der Anteil schnell proliferierender Zellen in dreidimensionaler Ko-Kultur mit osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen signifikant erhöht gegenüber der konventionellen Kultur (13%, $p=0,0043$). An Tag 5 waren in Ko-Kultur mit osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen auch in konventioneller Kultur mit durchschnittlich 79% und Suspension mit 93% der größte Anteil an hämatopoetischen Zellen schnell-proliferierend. Ein signifikanter Unterschied zur Ko-Kultur mit undifferenzierten MSC zeigte sich nicht.

In der Immunhistochemie für den Proliferationsmarker Ki-67 waren in konventioneller Kultur sowohl in Monokultur als auch Ko-Kultur Ki-67 positive Zellen zu sehen. In den Kollagengelen waren auch in Ko-Kultur mit osteogen differenzierten MSC die Ki-67 positiven hämatopoetischen Zellen in Gruppen gelagert (Abbildung 20 (B)).

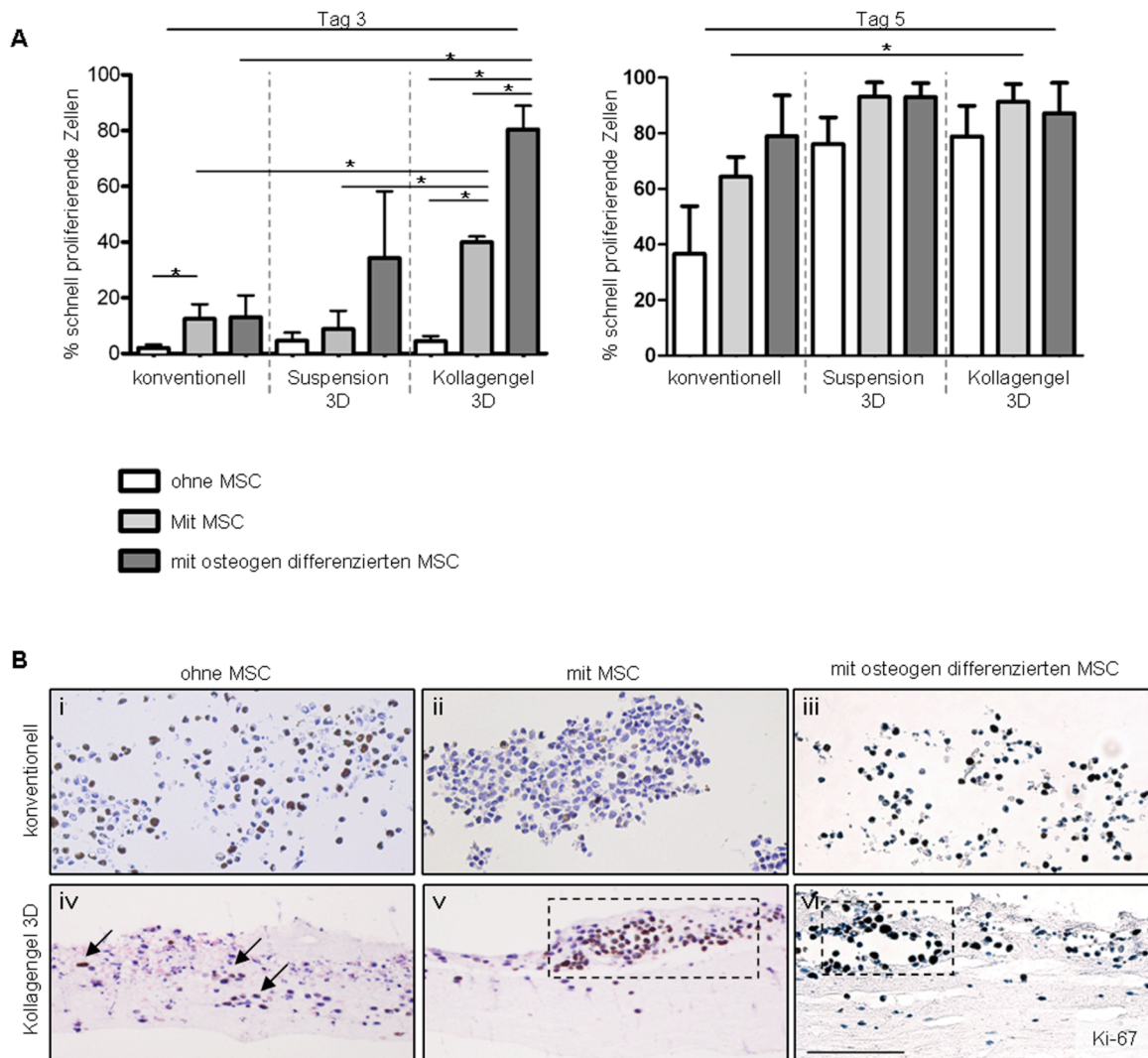


Abbildung 20: Proliferationsverhalten von CD34+hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Ko-Kultur mit undifferenzierten und osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks sowie in Monokultur. (A) Quantifizierung der schnellproliferierenden hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Die Abnahme der Fluoreszenz der mit CFSE gefärbten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wurde mittels Durchflusszytometrie an Tag 3 und 5 bestimmt. Bestimmt wurde der Anteil an schnell proliferierenden Zellen, die gekennzeichnet sind durch einen schnellen Verlust des Fluoreszenzsignals. * $p < 0,05$. $n = 3$.

(B) Immunhistochemie für den Proliferationsmarker Ki-67 in konventioneller Kultur (i, ii, iii) und in den Kollagengelen (iv, v, vi). In den Kollagengelen mit undifferenzierten und osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks sind die Ki-67 positiven Zellen in Gruppen gelagert (Umrandungen). In Kollagengelen ohne mesenchymale Stromazellen sind Ki-67 positive Zellen sporadisch in der kollagenen Matrix verteilt (Pfeile). Skala: 100 μ m. MSC = mesenchymale Stromazellen.

4.1.6.3 Einfluss der osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen auf den Erhalt der CD34+ CD38- Subpopulation

In konventioneller und dreidimensionaler Kultur wurde der Einfluss der osteogen differenzierten MSC auf den Erhalt der primitiven Subpopulation der CD34+ CD38- Zellen

analysiert. Der Anteil der CD34+ CD38- Population wurde an Tag 7 und Tag 14 mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. An Tag 7 war der Anteil an CD34+ CD38- Zellen tendenziell (nicht-signifikant) in Ko-Kultur mit undifferenzierten und osteogen differenzierten MSC in konventioneller Kultur und Suspension erhöht gegenüber der Monokultur (Abbildung 21 (A)).

An Tag 14 zeigte die Ko-Kultur mit undifferenzierten MSC in Kollagengelen einen signifikant höheren Erhalt der primitiven Subpopulation (43%, $p=0,0324$) im Vergleich zu osteogen differenzierten MSC und zur Monokultur mit. In Kokultur mit osteogen differenzierten MSC war der Anteil CD34+ CD38- hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen mit durchschnittlich 20% vergleichbar mit der Monokultur der hämatopoetischen Zellen (Abbildung 21 (A)). Auch in Suspension ($p=0,0227$) und in konventioneller Kultur ($p=0,0203$) konnte in Ko-Kultur mit undifferenzierten MSC ein signifikant verbesserter Erhalt der primitiven Subpopulation CD34+ CD38- Zellen gegenüber osteogen differenzierten MSC erreicht werden.

In der Immunhistochemie wurde die Verteilung der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Kollagengel visualisiert. Auch in Ko-Kultur mit osteogenen mesenchymalen Stromazellen waren die CD34+ Zellen in Gruppen zusammen gelagert (Abbildung 21 (B)). In konventioneller Kultur zeigte die Immunhistochemie keinen feststellbaren Unterschied in der Anzahl CD34+ Zellen.

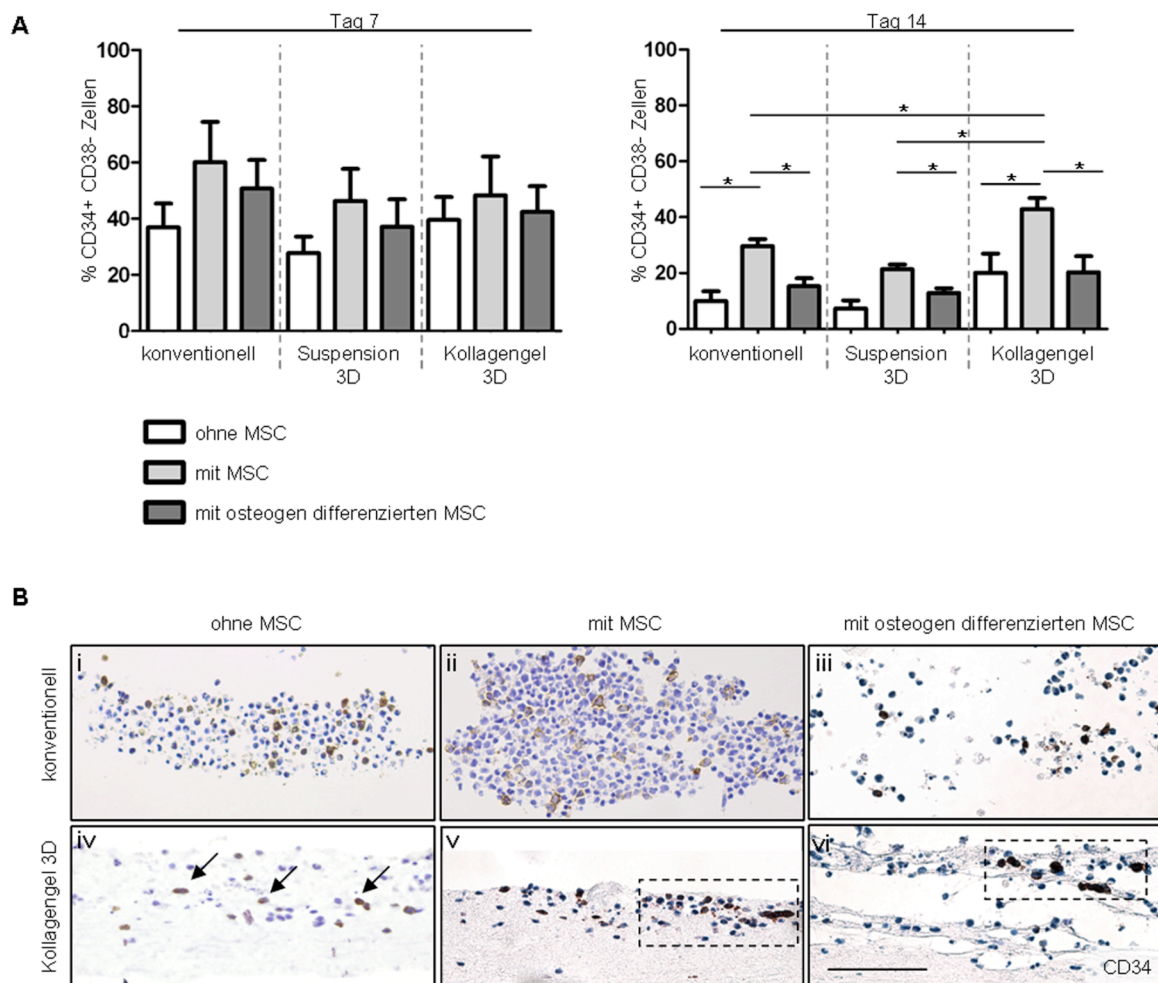


Abbildung 21: (A) Erhalt des primitiven CD34+ CD38- Phänotyps unter dem Einfluss von osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen im Vergleich zu undifferenzierten mesenchymalen Stromazellen und zur Monokultur. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach 7 und 14 Tagen Kultur der Anteil an hämatopoetischen Zellen mit primitiven CD34+ CD38- Phänotyp in konventioneller und dreidimensionaler Kultur bestimmt. * $p \leq 0,05$. $n = 3$. (B) Immunhistochemie für den Oberflächenmarker CD34 von Zellen in konventioneller Kultur (i, ii, iii) und den Kollagengelen (iv, v, vi) In Kollagengelen mit undifferenzierten und osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks sind CD34+ Zellen in Gruppen gelagert (v, vi: Umrandung). In Kollagengelen ohne mesenchymale Stromazellen waren die CD34+ Zellen sporadisch in der kollagenen Matrix verteilt (iv: Pfeile). Skala: 100 μ m. MSC = mesenchymale Stromazellen

Zusammenfassend konnte den beschriebenen Versuchen die osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen in den dreidimensionalen Kollagengelen gezeigt werden. Die osteogene Differenzierung führte zu Ablagerungen von Kalziumphosphat in der kollagenen Matrix. Weiterhin konnten durch die im Kollagengel eingebetteten mesenchymalen Stromazellen die Haupt-Extrazellulärmatrix Proteine des Knochenmarks sezerniert werden. Während undifferenzierte MSC Kollagen 1 und Fibronectin sezernierten, wurde durch die osteogene Differenzierung zusätzlich auch Osteopontin exprimiert.

Die osteogen differenzierten MSC hatten einen verstärkenden Einfluss auf das Proliferationsverhalten der hämatopoetischen Zellen. Der Erhalt der CD34+ CD38-Subpopulation war mit osteogen differenzierten MSC geringer im Vergleich zur Ko-Kultur mit undifferenzierten MSC.

4.2 Die Bedeutung der Stammzellnische bei myeloproliferativen Erkrankungen

Veränderungen des Stroma spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Myelofibrose bei myeloproliferativen Neoplasien. Die Myelofibrose ist gekennzeichnet durch die massive Ablagerung von ECM-Proteinen, was zur Verdrängung der Hämatopoese führt.

In den folgenden Versuchen wurden mesenchymale Stromazellen von Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien hinsichtlich der Extrazellulärmatrixremodellierung verglichen mit mesenchymalen Stromazellen von nicht-MPN-Patienten. Hierzu wurde das zuvor etablierte dreidimensionale kollagenbasierte Kultivierungssystem genutzt. Durch die Kultivierung der mesenchymalen Stromazellen in den Kollagengelen konnte das ECM-basierte Mikromilieu des Knochenmarks *in vitro* imitiert werden. Somit war dieses System geeignet für vergleichende Analysen bezüglich der ECM-Remodellierung bei MPN. Untersucht wurden mesenchymale Stromazellen von Patienten mit essentieller Thrombozytämie (ET), Polyzythämie vera (PV), chronisch myeloischer Leukämie (CML) und nicht MPN-Patienten (Morbus Hodgkin ohne Knochenmarksbeteiligung bzw. Patienten die sich einer Hüft-TEP unterzogen haben).

4.2.1 Vergleichende Analysen von MSC von MPN-Patienten hinsichtlich ECM-Remodellierung

Wie bereits zuvor gezeigt wurde, können in Kollagengele eingebettete mesenchymale Stromazellen die kollagene Matrix durch Sekretion von ECM-Proteinen remodellieren (Schneider *et. al.*, 2010a; Schneider *et. al.*, 2010b; Kramann *et. al.*, 2011). Aufgrund der Remodellierungsprozesse kommt es zur zellmedierten Kontraktion der Kollagengele. Die Kontraktion der Gele gibt somit einen ersten Hinweis auf die Remodellierungsaktivität der eingebetteten mesenchymalen Stromazellen.

Nach 21 Tagen Kultur wurden die Kollagengele mit eingebetteten MSC von MPN-Patienten sowie Kontroll-MSC hinsichtlich der Kontraktion analysiert (Abbildung 22). Dabei wurde die Reduktion der ursprünglichen Fläche der Gele berechnet. Auffallend war die starke Kontraktion der Kollagengele mit eingebetteten mesenchymalen Stromazellen von ET-Patienten und auch CML-Patienten. Die Reduktion der Fläche war hier in beiden Fällen

signifikant stärker im Vergleich zu Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von nicht-MPN-Patienten (Kontrolle). Bei Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von ET-Patienten war der Flächeninhalt der Kollagengele auf durchschnittlich $23\% \pm 13$ ($p=0,0002$) reduziert. Bei Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten war die Gesamtfläche nach 21 Tagen Kultur durchschnittlich nur noch $40\% \pm 13$ der ursprünglichen Fläche ($p=0,0099$). Mesenchymale Stromazellen von PV-Patienten induzierten im Vergleich zu mesenchymale Stromazellen von nicht-MPN-Patienten keine signifikant stärkere Kontraktion der Kollagengele. Der Flächeninhalt der Kollagengele hatte sich nach 21 Tagen Kultur auf $47\% \pm 13$ verringert. Damit induzierten die mesenchymalen Stromazellen von PV-Patienten immer noch eine um 12% stärkere Kontraktion im Vergleich zu Gelen mit mesenchymalen Stromazellen von nicht-MPN-Patienten ($59\% \pm 6$), wenn auch nicht signifikant.

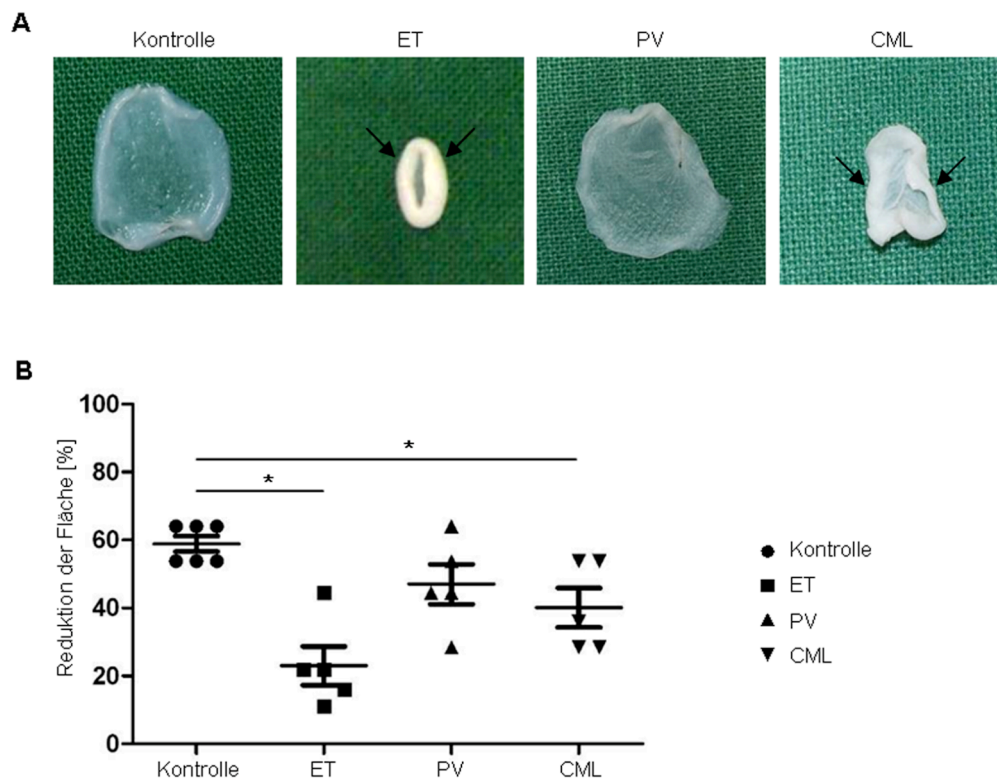


Abbildung 22: Zellmedierte Kontraktion der Kollagengele nach 21 Tagen Kultur. Die Gele mit MSC von Patienten mit ET (n=5), PV (n=5), CML (n=5) und MSC von nicht-MPN Patienten (n=6) wurden 21 Tage eingebettet im dreidimensionalen Kollagengel kultiviert. (A) Repräsentative Darstellung der Kollagengele nach 21 Tagen Kultur. Kollagengele mit MSC von ET-Patienten und CML-Patienten zeigten eine Kontraktion des Kollagengels (Pfeile). (B) Berechnet wurde der Prozentanteil, um den der Flächeninhalt des Kollagengels nach 21 Tagen Kultur verringert war. $*p<0,05$.

Mittels quantitativer *realtime* PCR wurde die Expression der ECM-Proteine Fibronectin, Kollagen 1, Kollagen IV, Laminin und Osteopontin auf mRNA-Ebene nach 28 Tagen Kultur untersucht (Abbildung 23). Verglichen wurden die Expressionslevel von mesenchymalen

Stromazellen von ET-, PV- und CML-Patienten mit mesenchymalen Stromazellen von nicht-MPN-Patienten als Kontrolle. Bezüglich des ECM-Proteins Fibronectin war die relative Expression von mesenchymalen Stromazellen von ET-Patienten 74 ± 85 -fach höher im Vergleich zur Kontrolle (9 ± 12). Mesenchymale Stromazellen von CML-Patienten induziertem eine verstärkte Fibronectinexpression im Vergleich zur Kontrolle (125 ± 234 -fach). Die Fibronectinexpression von mesenchymalen Stromazellen von PV-Patienten (7 ± 10) war vergleichbar mit der Expression der mesenchymalen Stromazellen von nicht-MPN. Die relative Kollagen I-Expression der mesenchymalen Stromazellen von ET-Patienten war heraufreguliert (8 ± 10 fach) im Vergleich zu dem der mesenchymalen Stromazellen von nicht-MPN-Patienten (2 ± 5).

Die relative Kollagen I Expression der mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten lag auf einem vergleichbaren Niveau mit der Kontrolle (7 ± 8). Mesenchymale Stromazellen von PV-Patienten zeigten keine erhöhte Kollagen I-Expression im Vergleich zur Kontrolle.

Hinsichtlich Kollagen IV war insgesamt keine erhöhte Expression bei mesenchymalen Stromazellen von MPN-Patienten festzustellen. Lediglich der Wert eines ET-Patienten lag als Ausreißer mit einer relativen Expression von 100 deutlich über den Werten der anderen Proben im Bereich von <1 .

Das relative Expressionslevel von Laminin lag für mesenchymale Stromazellen von ET-Patienten (13 ± 29) über dem der Kontrolle (5 ± 11). Bei mesenchymalen Stromazellen von Patienten mit PV und CML lag die Lamininexpression sogar noch unterhalb der Kontrolle (<1).

Das Glycoprotein Osteopontin, welches hauptsächlich von Osteoblasten exprimiert wird, wurde von Kontroll-MSCs, PV- und CML-Patienten nicht exprimiert. Lediglich mesenchymale Stromazellen von ET-Patienten zeigten eine erhöhte Expression mit durchschnittlich 17 ± 36 .

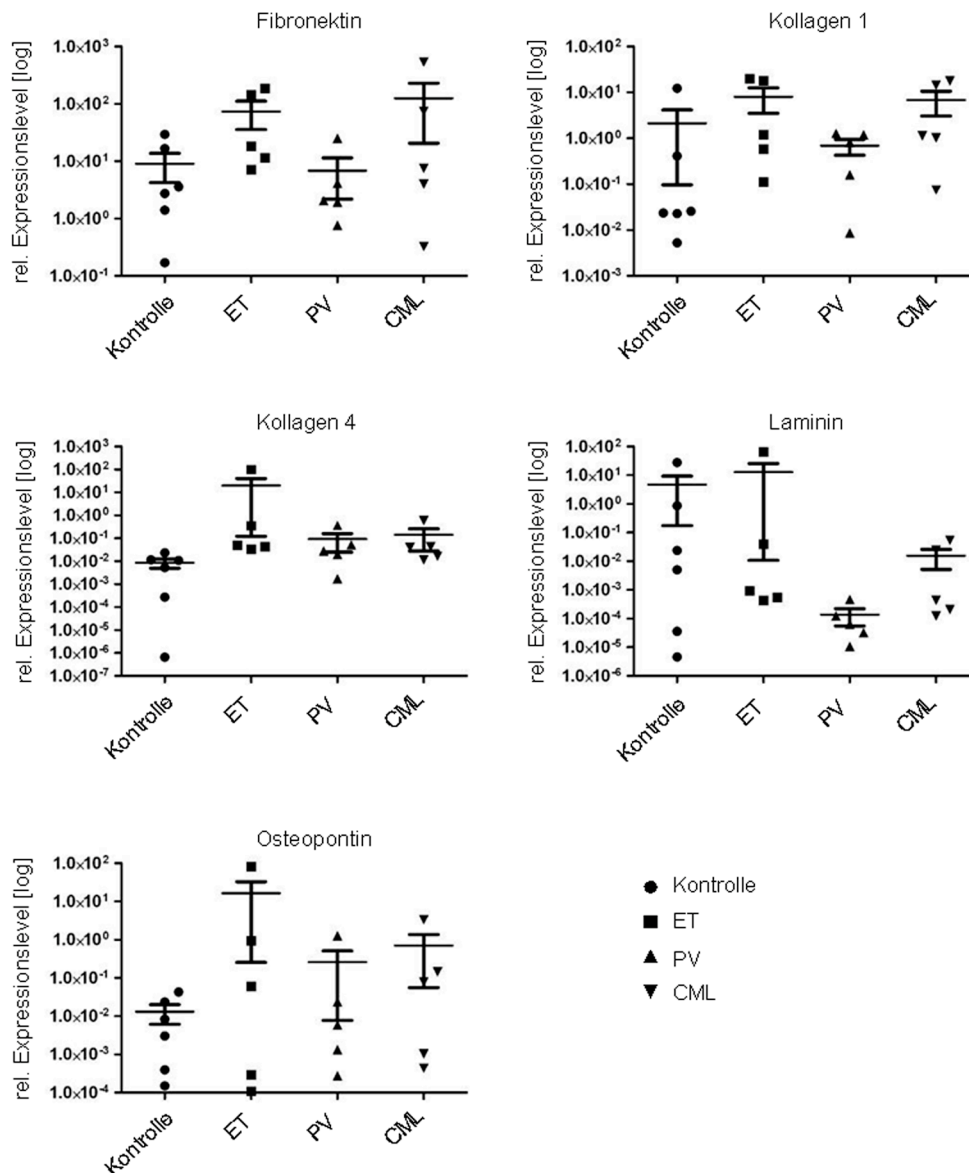


Abbildung 23: Expression der ECM-Proteine Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV, Laminin und Osteopontin nach 28 Tagen Kultur im dreidimensionalen Kultivierungssystem. Verglichen wurden die Expressionslevel von mesenchymalen Stromazellen von Patienten mit ET (n=5), PV (n=5), CML (n=5) sowie nicht-MPN-Patienten.

Zur Bestätigung der quantitativen *realtime* PCR-Ergebnisse wurde die Expression der ECM-Proteine durch die in die Kollagengele eingebetteten mesenchymalen Stromazellen auch immunhistochemisch auf Proteinebene untersucht. Um die ECM-Remodellierung durch mesenchymalen Stromazellen von MPN- und nicht-MPN-Patienten vergleichen zu können, wurde die Färbeintensität nach dem in Abbildung 24 gezeigten Scoring-System bestimmt und quantifiziert. Kollagengele mit mesenchymalen Stromazellen von ET- und CML-Patienten zeigten eine signifikant verstärkte Färbung für Fibronectin im Vergleich zu Gelen mit mesenchymalen Stromazellen von nicht-MPN-Patienten ($p \leq 0,0114$). Für Gele mit eingebetteten mesenchymalen Stromazellen von PV-Patienten war eine leicht erhöhte

Expression gegenüber der Kontrolle festzustellen, die jedoch nicht signifikant war. Die Immunhistochemie bestätigte also das Ergebnis der *realtime* PCR bezüglich der Fibronektinexpression.

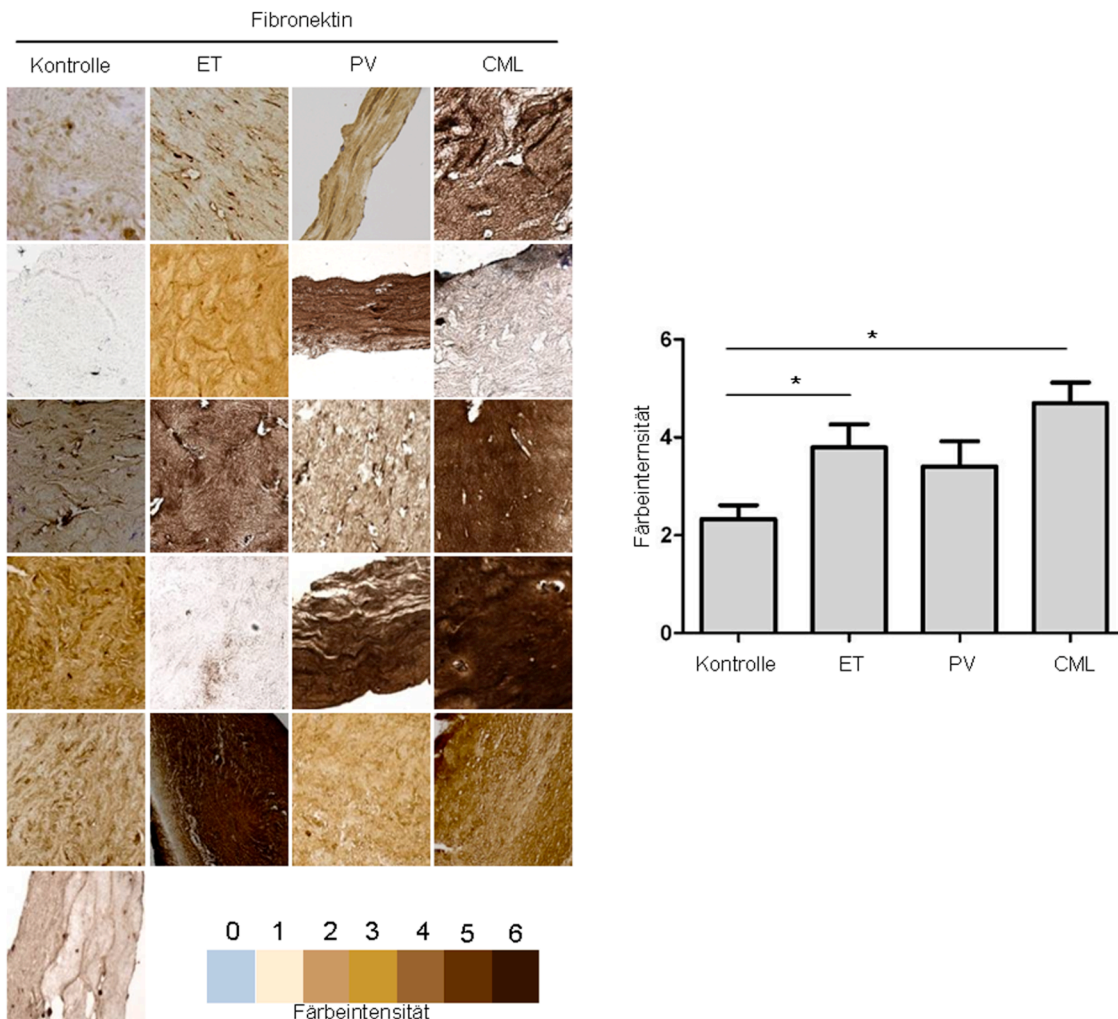


Abbildung 24: Vergleichende Analyse der Fibronektinexpression mittels Immunhistochemie nach 28 Tagen Kultur. Verglichen wurden Kollagengele mit mesenchymalen Stromazellen von ET-Patienten (n=5), PV-Patienten (n=5), CML-Patienten (n=5) und von nicht-MPN-Patienten (n=6). Die Färbeintensität wurde durch zwei verblindete, unabhängige Untersucher nach dem gezeigten Scoring-System bestimmt. * $p < 0,05$.

Für Kollagen I (Abbildung 25) war bei Kollagengelen mit eingebetteten mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu mesenchymalen Stromazellen von nicht MPN-Patienten zu beobachten ($p < 0,05$), entsprechend des Ergebnis der mittels *realtime* PCR bestimmten Genexpression. Bei Gelen mit mesenchymalen Stromazellen von ET- und PV-Patienten war keine verstärkte Expression für Kollagen I auf Proteinebene zu erkennen verglichen mit der Kontrolle.

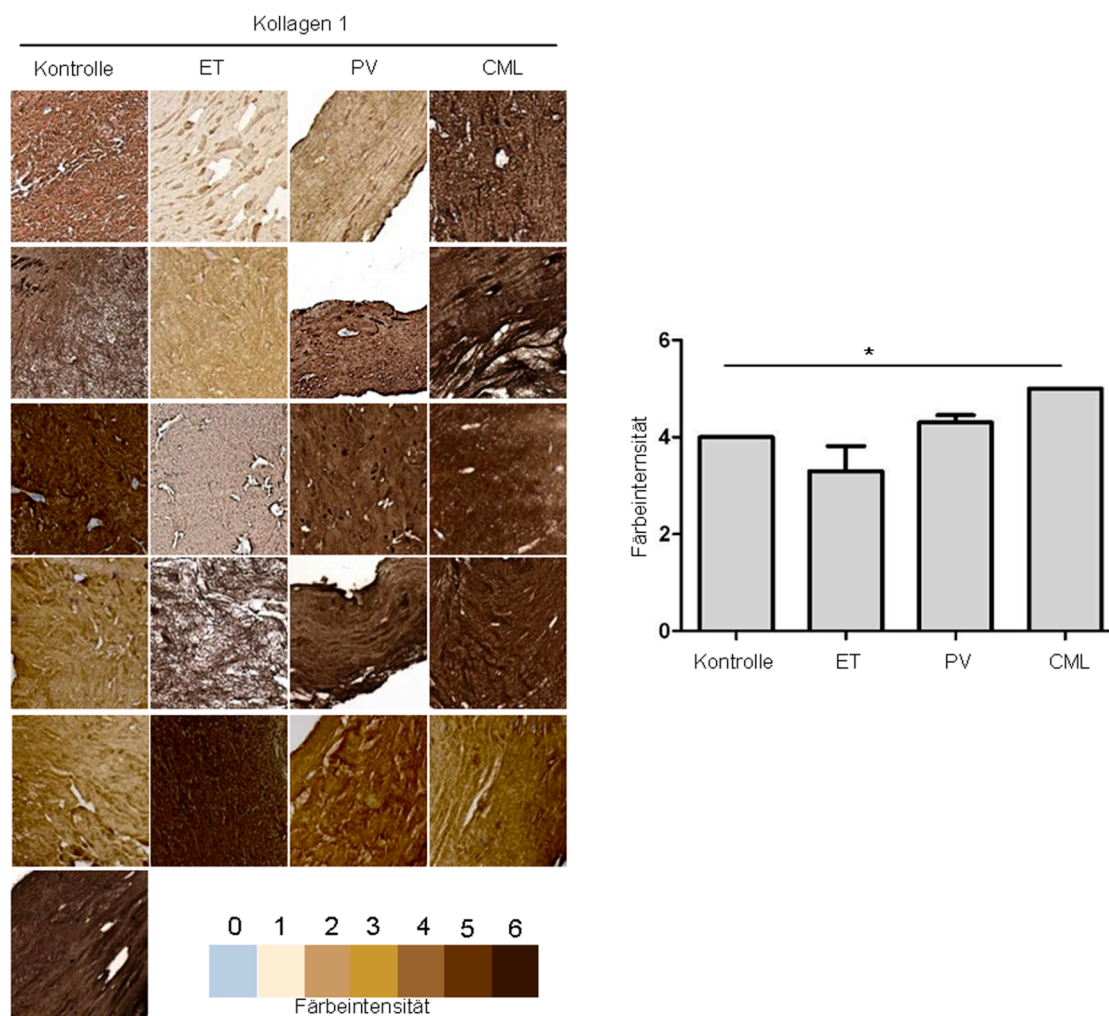


Abbildung 25: Vergleichende Analyse der Kollagenexpression mittels Immunhistochemie nach 28 Tagen Kultur. Analog zur Fibronectinexpression wurden auch hier Kollagengele mit MSC von ET-Patienten (n=5), PV-Patienten (n=5), CML-Patienten (n=5) und MSC von nicht-MPN-Patienten (n=6) verglichen. Die Färbintensität wurde durch zwei verblindete Untersucher nach dem gezeigten Scoring-System bestimmt. * $p < 0,05$.

Die Expression der ECM-Proteine Kollagen 4, Laminin und Osteopontin konnte in der Immunhistochemie nicht oder kaum nachgewiesen werden, was den geringen relativen Expressionsleveln in der *realtime* PCR entsprach.

4.2.2 Vergleichende Analysen von Knochenmarksstanzen

Um die *in vitro* Ergebnisse hinsichtlich der ECM-Remodellierung durch mesenchymale Stromazellen von MPN-Patienten auch *in vivo* zu überprüfen, wurden vergleichende Analysen an den korrespondierenden Knochenmarksstanzen der MSC-Spender durchgeführt. Bei allen Spendern handelte es sich um Patienten mit Myelofibrosegrad 0, das heißt, in der Routinediagnostik wurde keine Retikulin- oder Kollagenfibrose diagnostiziert.

Die Immunhistochemie für Kollagen I zeigte in den Knochenmarksbiopsien der MPN-Patienten keine Veränderungen im Vergleich zu Kontroll-Knochenmarksstanzen von nicht-

MPN Patienten. Eine positive Färbung war in allen Stanzten – wie in der knöchernen Substanz zu erwarten- trabekulär zu erkennen (Abbildung 26 (i-iv)).

In der immunhistochemischen Färbung für Fibronectin zeigten sich Unterschiede im Verteilungsmuster bei den MPN-Patienten im Vergleich zu den Kontrollstanzen. Während Fibronectin im gesunden Knochenmark vor allem in der endostalen Region am Knochentrabekel und perivaskulär exprimiert wurde (Abbildung 26 (v)), zeigten sich in den Biopsien von MPN-Patienten zusätzlich zur trabekulären und perivaskulären Expression auch Akkumulationen von Fibronectin im hämatopoetischen Mark (Abbildung Nr. (vi-viii)). In Knochenmarksstanzen von ET-Patienten und PV-Patienten war die Fibronectinexpression auch in Assoziation zu den für die Erkrankung typischen dysplastischen Megakaryozyten zu erkennen.

In Zusammenhang mit den Veränderungen der Fibronectin-Expression im Knochenmark von MPN-Patienten wurde auch die Verteilung Stromazellen untersucht. Dazu wurde der Oberflächenmarker CD271 benutzt. CD271 wurde als Marker für humane mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks beschrieben, die sowohl in der perivaskulären als auch in der endostalen Nische zu finden sind (Tormin *et. al.*, 2011). In Kontrollbiopsien waren CD271+ Stromazellen vor allem in der endostalen Region an den Knochentrabekeln und in Assoziation zu den Adipozyten zu erkennen. Im Gegensatz dazu fanden sich CD271+ Stromazellen in Knochenmarksstanzen von MPN-Patienten auch außerhalb dieser typischen Stromazellnischen diffus im hämatopoetischen Mark.

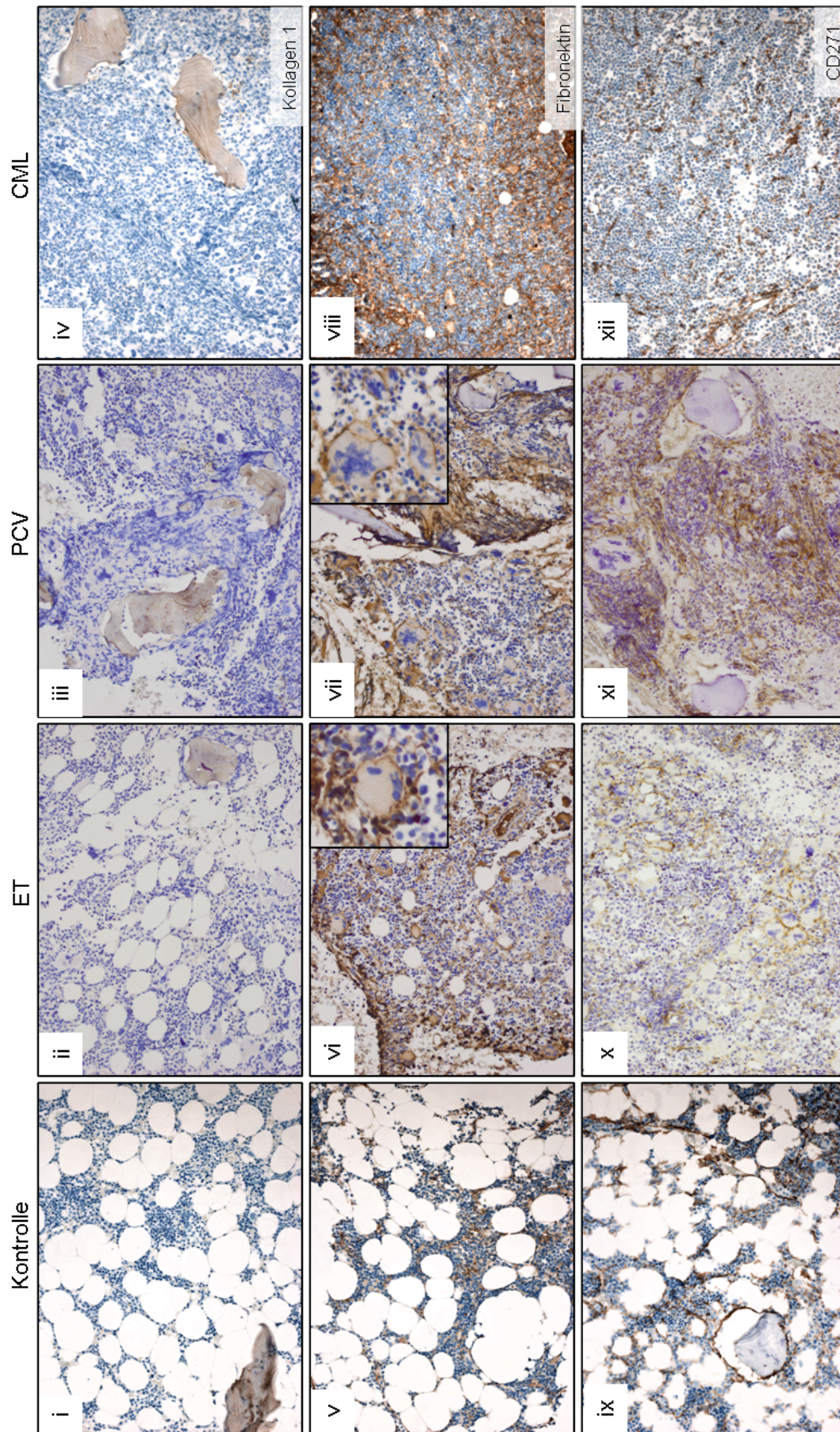


Abbildung 26: Vergleichende Analysen der Expression der ECM-Proteine Kollagen 1 und Fibronectin und des Stromazellmarkers CD271 an Knochenmarksanstanzen von MPN-Patienten (ET, PV und CML) und nicht MPN-Patienten als Kontrolle. repräsentative Darstellung der Immunhistochemie.

Auffallend waren die CD271+ Stromazellen in Assoziation zu den dysplastischen Megakaryozyten in den Stanzen der MPN-Patienten, hier gezeigt für einen ET-Patienten (Abbildung 27). Dies korrelierte mit den Fibronectin-Ablagerungen in Nähe der Megakaryozyten.

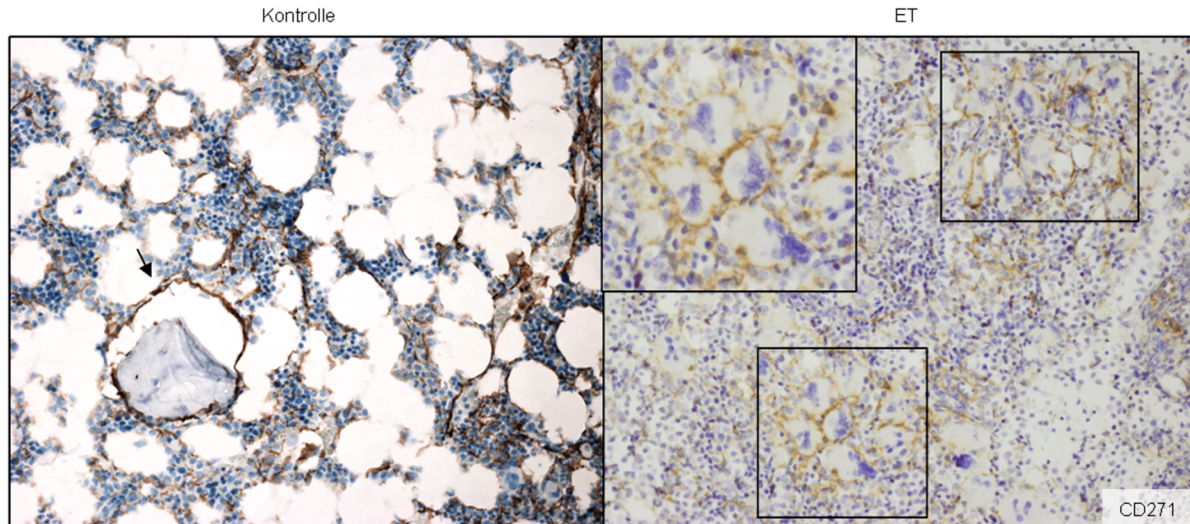


Abbildung 27: Immunhistochemie für den Stromazellmarker CD271 an Knochenmarksstanzen von einem nicht-MPN-Patienten (Kontrolle) und einem Patienten mit essentieller Thrombozytämie im Vergleich. In der Kontroll-Knochenmarksstanze sind CD271 positive Zellen vor allem in Assoziation zum Knochenstrahlens (Pfeil) und in Nähe der Adipozyten. In der Knochenmarksstanze des ET-Patienten finden sich Ansammlungen von CD271 positiven Zellen im hämatopoetischen Mark in direkter Nähe zu den dysplastischen Megakaryozyten (Umrandungen).

4.2.3 Analyse zur Ko-Lokalisation von CD271+ Stromazellen und Fibronectin

Um eine Ko-Lokalisation zwischen CD271+ Stromazellen und den Fibronectinablagerungen zu analysieren wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen für CD271 und Fibronectin an Knochenmarksstanzen durchgeführt. Verglichen wurde die Knochenmarksstanze eines ET-Patienten mit den Stanzen zweier nicht-MPN Patienten (Morbus Hodgkin sowie idiopathische Thrombozytopenie). Eine Knochenmarksstanze eines Patienten mit idiopathischer Thrombozytopenie (ITP) wurde als zusätzliche Kontrolle verwendet, da hier eine reaktive Vermehrung der Megakaryozyten vorliegt.

In der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zeigten sich die CD271+ Stromazellen in ihrer typischen Nische angelagert an die Knochenstrahlens in der endostalen Region (Abbildung 28). In der Knochenmarksstanze des ET-Patienten war in der endostalen Region eine verstärkte Fibronectinexpression gegenüber den Kontrollstanzen zu erkennen. Die Doppelfärbung zeigte deutlich die Ko-Lokalisation von Fibronectin und dem Stromazellmarker CD271 am Knochenstrahlens (Abbildung 28 ix). Eine leichte Fibronectinexpression in Nähe der endostalen Region war auch in den Kontrollstanzen zu erkennen, jedoch keine Ko-Lokalisation von CD271 mit Fibronectin vor.

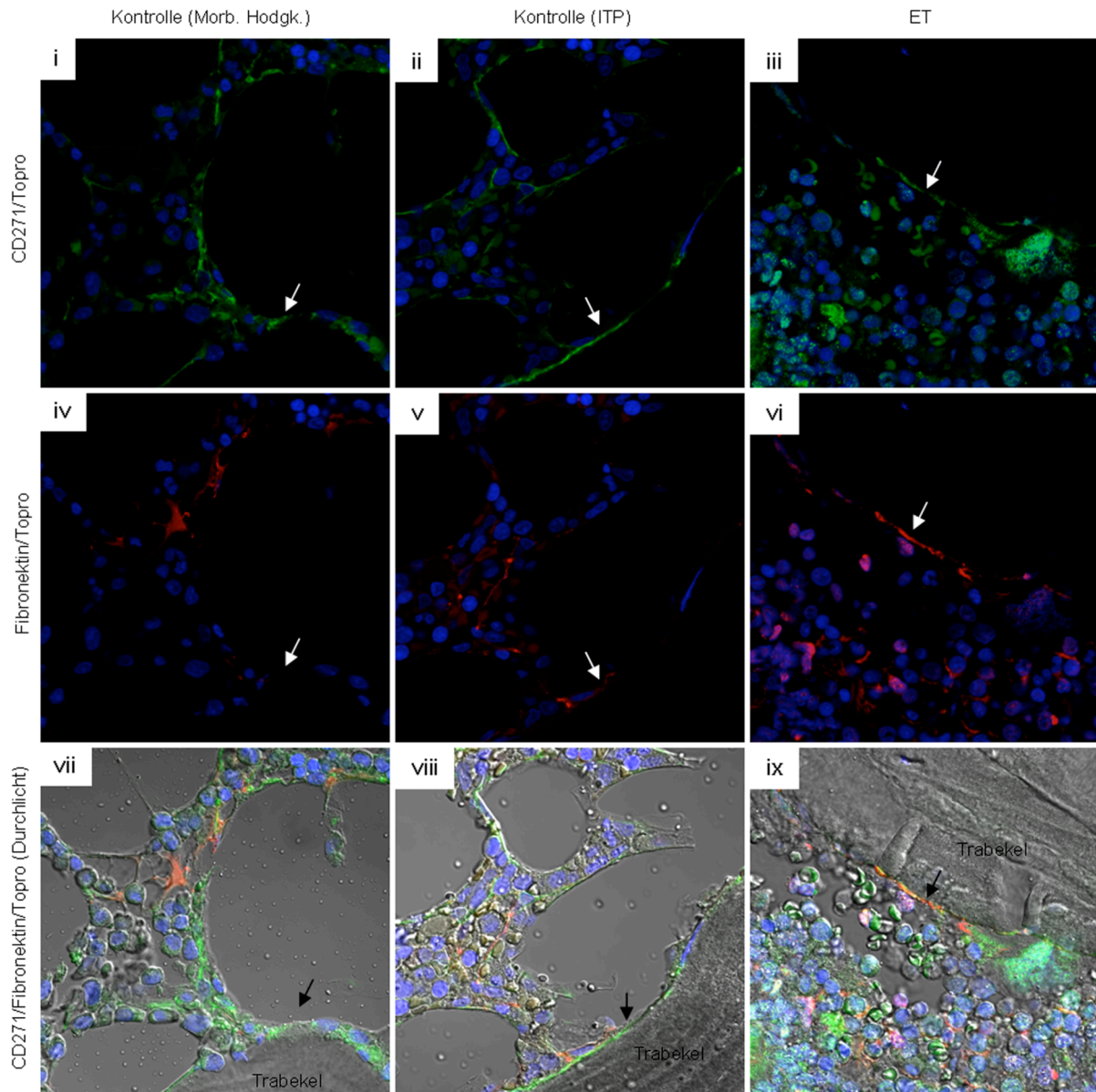


Abbildung 28: Fibronectin- und CD271-Expression in der endostalen Region in Knochenmarksstanzen von nicht MPN-Patienten (Morb. Hdgk., ITP) und einem MPN-Patienten (ET). Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für CD271 (grün) und Fibronectin (rot). Als Kernfarbstoff wurde To-Pro-3 (blau) verwendet. An den Knochen trabekeln angelagert sind in allen Stanzen CD271+ Stromazellen zu erkennen (i, ii, iii: Pfeile). Eine verstärkte Fibronectinexpression in der endostalen Region ist in der Knochenmarksstanze des ET-Patienten zu beobachten (vi, Pfeil). In den zusammengeführten Bildern zeigte sich die Ko-Lokalisation von CD271 und Fibronectin (ix, Pfeil).

In der Immunfluoreszenzdoppelfärbung war die perivaskuläre Region in Assoziation zu den Sinusoiden als typische Nische der CD271+ Stromazellen zu erkennen (Abbildung 29). Eine Fibronectinexpression als Saum um die Sinusoide war in Kontrollstanzen sowie den ET-Stanzen zu erkennen, jedoch betont und vermehrt bei dem ET-Patienten. Im Kontrollknochenmark war Fibronectinablagerungen zwar in der Nähe der CD271+ Stromazellen. Eine Überlagerung ist jedoch im Gegensatz zur Stanze des ET-Patienten nicht zu erkennen. Die Doppelfärbung zeigte in der Knochenmarksstanze des ET-Patienten die

Fibronektinexpression der CD271+ Stromazellen (ix), wie auch schon zuvor in der endostalen Region zu sehen.

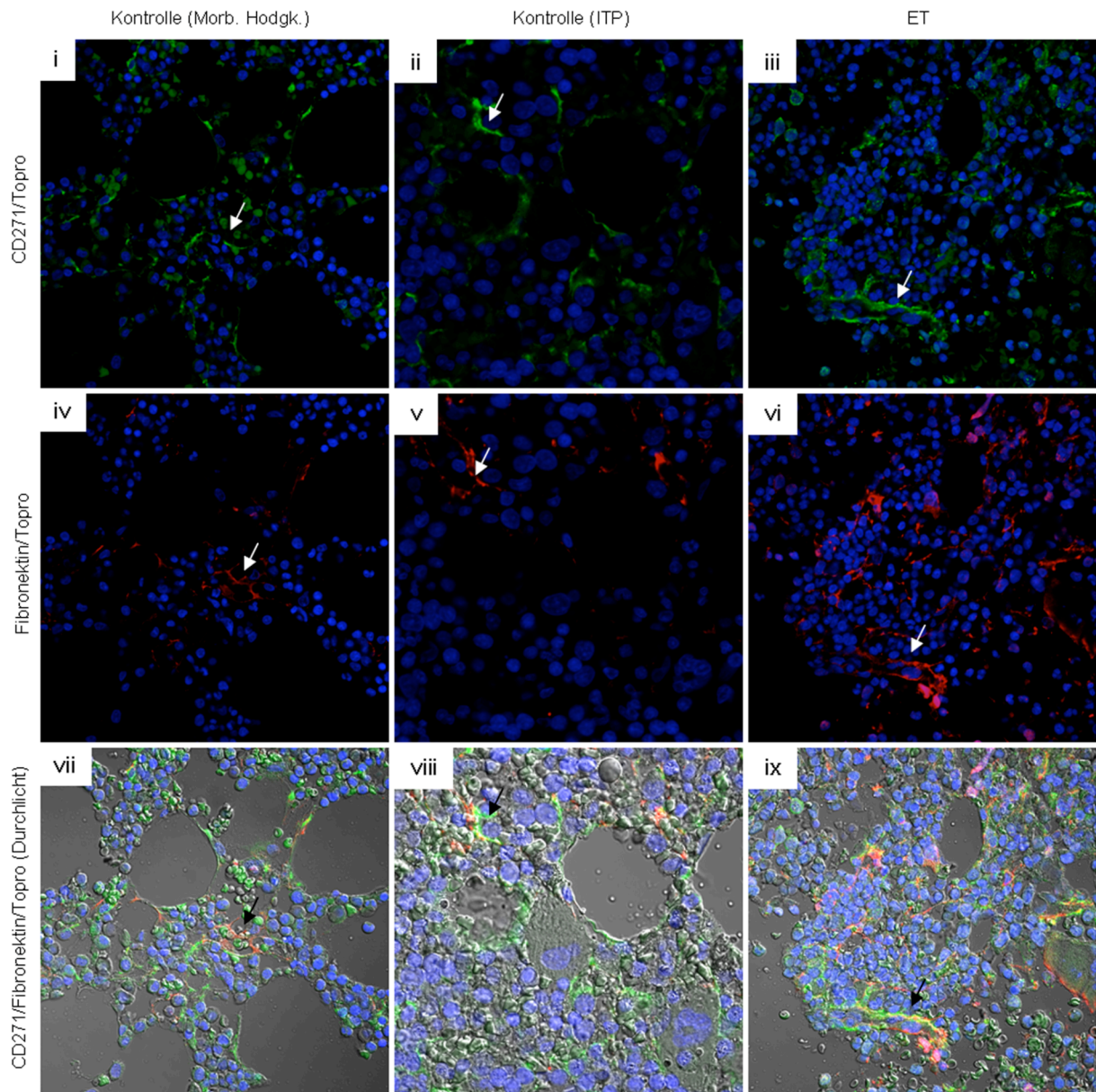


Abbildung 29: Fibronektin- und CD271-Expression in der perivaskulären Region in Knochenmarksstanzen von nicht MPN-Patienten (Morb. Hdgk., ITP) und einem MPN-Patienten (ET). Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für CD271 (grün) und Fibronektin (rot). Als Kernfarbstoff wurde To-Pro-3 (blau) verwendet. In Assoziation zu den Sinusoiden sind CD271+ Stromazellen zu erkennen (i, ii, iii: Pfeile) sowie Fibronektinablagerungen (iv, v, vi: Pfeile). In der Knochenmarkstanz des ET-Patienten ist eine verstärkte Fibronektinexpression in der perivaskulären Region zu sehen, die in das hämatopoetische Mark ausstrahlt (vi). In der Überlagerung zeigt sich die Ko-Lokalisation von CD271+ Stromazellen und Fibronektin (vii, viii, ix).

Entsprechend zu den Beobachtungen in der konventionellen Immunhistochemie zeigten sich in der Knochenmarkstanz des ET-Patienten auch im hämatopoetischen Mark CD271+ Stromazellen sowie deutliche Fibronektin-Akkumulationen (Abbildung 30). Deutlich zeigten sich CD271+ Stromazellen in direkter Assoziation zu dysplastischen Megakaryozyten (iii).

Die Doppelfärbung verdeutlichte zudem die Fibronektinexpression durch CD271+ Stromazellen, die an die Megakaryozyten angelagert sind (ix). Im Vergleich dazu waren in den Stanzeln der Patienten mit Morbus Hodgkin und ITP-Patienten keine CD271+ Stromazellen in Assoziation zu Megakaryozyten zu erkennen und auch keine Fibronektin-Akkumulationen im hämatopoetischen Mark (vii, viii).

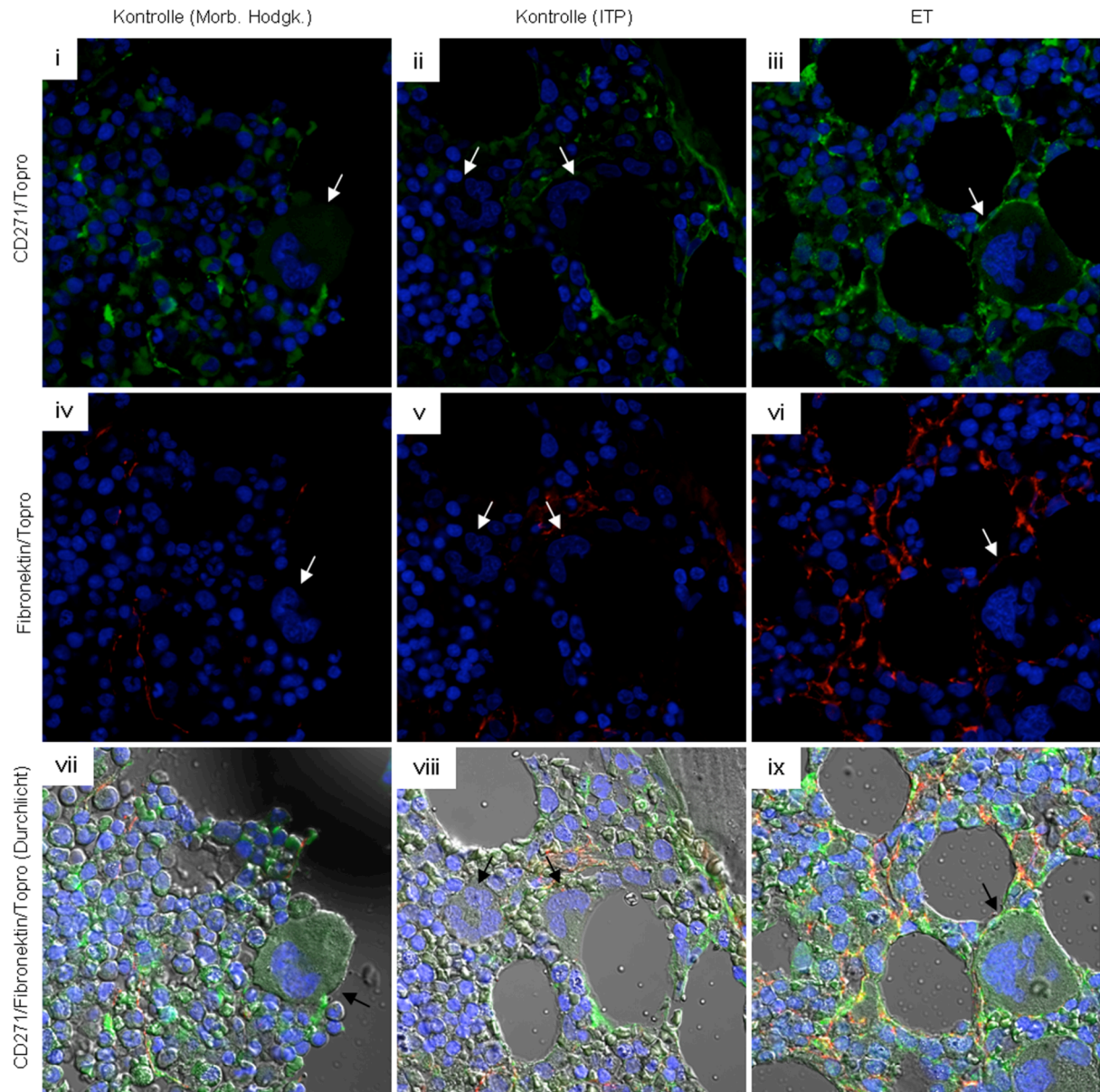


Abbildung 30: Fibronektin- und CD271-Expression in Assoziation zu Megakaryozyten in Knochenmarksstanzen von nicht MPN-Patienten (Morb. Hdgk., ITP) und einem MPN-Patienten (ET). Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für CD271 (grün) und Fibronektin (rot). Als Kernfärbestoff wurde To-Pro-3 (blau) verwendet. Im Vergleich zu den nicht-MPN-Patienten (i, ii) sind in der Knochenmarksstanzel der ET-Patienten CD271+ Stromazellen angelagert an Megakaryozyten zu erkennen (iii, Pfeil). Fibronektin wird in direkter Nähe zu dem dysplastischen Megakaryozyten exprimiert (vi: Pfeil), während bei nicht-MPN-Patienten keine Fibronektinexpression an Megakaryozyten zu erkennen ist (iv, v: Pfeil). In der Überlagerung ist die Ko-Lokalisation von Fibronektin und CD271 in Assoziation zum Megakaryozyten zu sehen (ix: Pfeil).

Zusammenfassend konnte mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung die Ko-Lokalisation von CD271+ Stromazellen und Fibronectin nachgewiesen in MPN gezeigt werden. In den Knochenmarksstanzen von nicht-MPN-Patienten waren CD271+ Stromazellen in ihren typischen Nischen in der endostalen Region an den Trabekeln sowie in der perivaskulären Region in Assoziation zu den Sinusoiden zu erkennen. In der Knochenmarksstanze des ET-Patienten zeigte sich in der endostalen und perivaskulären Region eine verstärkte Fibronectinexpression. In der Knochenmarksstanze des ET-Patienten konnten CD271+ Stromazellen in Ko-Lokalisation zu den Fibronectinablagerungen außerhalb der typischen Nischen im hämatopoetischen Mark beobachtet werden. Wie schon in der konventionellen Immunhistochemie konnten CD271+ Stromazellen in Assoziation zu den dysplastischen Megakaryozyten im Knochenmark des ET-Patienten nachgewiesen werden. In der Doppelfärbung wurde bestätigt, dass die Fibronectinexpression um die dysplastischen Megakaryozyten von CD271+ Stromazellen ausgeht.

4.2.4 Vergleichende Analysen von Knochenmarksstanzen mittels Tissue Microarray

Um eine höhere Anzahl von Patientenproben immunhistochemisch untersuchen zu können und so die bisherigen Ergebnisse in einer größeren Patientengruppe zu bestätigen, wurden Tissue Microarrays (TMA) von Knochenmarksstanzen von nicht-MPN (Kontrollen) und MPN-Patienten angefertigt. Die immunhistochemischen Färbungen für Kollagen I, Fibronectin und CD271 wurden von Frau PD Dr. med. Schneider-Kramann als Pathologin klassifiziert, angelehnt an das Grading-System für Myelofibrose (Thiele *et. al.*, 2005). Die Klassifizierung der Immunhistochemie für Kollagen I, Fibronectin und CD271 wurde entsprechend nach den folgenden Kriterien bewertet: Knochenmarksstanzen mit unauffälliger Färbung beschränkt auf die endostale Region am Knochen trabekel sowie die perivaskuläre Region wurden als Grad 0 eingestuft. Waren feine Kollagen I- oder Fibronectin-Fasern mit wenigen Überkreuzungen vor allem in Nähe der perivaskulären Region zu sehen bzw. CD271+ Zellen, die von ihren typischen Nischen in das hämatopoetische Mark ausstrahlten, so entsprach dies einer Grad I Klassifizierung. Knochenmarksstanzen wurden als Grad II klassifiziert, wenn im Knochenmark ein diffuses Fasernetzwerk von Kollagen I- oder Fibronectin- Fasern mit zahlreichen Überkreuzungen zu erkennen waren bzw. eine diffuse CD271-Expression im hämatopoetischen Mark. Die ECM-Fasern oder CD271+ Stromazellen fanden sich hierbei vor allem in Nähe zu den dysplastischen Megakaryozyten. Ein dichtes und diffuses Fasernetzwerk einhergehend mit einer Osteosklerose entsprach einer Grad III-Klassifizierung. In Bezug auf die CD271-Expression wurden Stanzen in denen in mehr als

30% des hämatopoetischen Marks diffus verteilte CD271+ Stromazellen zu finden waren als Grad III eingestuft.

Insgesamt wurden die Knochenmarksstanzen von 18 nicht-MPN Patienten, und jeweils 14 Patienten mit ET, PV, und CML sowie 11 Patienten mit PMF (primäre Myelofibrose) untersucht.

In der Immunhistochemie für Kollagen I (Abbildung 31) wurden alle Knochenmarksstanzen von nicht-MPN-Patienten sowie von CML-Patienten als Grad 0 eingestuft. Eine positive Kollagen I-Färbung ließ sich als Hauptsubstanz des trabekulären Knochen erkennen. Im hämatopoetischen Mark fanden sich nur wenige Kollagen I-positive Fasern, insbesondere um Gefäße. Auch bei einem Großteil der Knochenmarksstanzen von ET-Patienten (64%) und PV-Patienten (89%) war die Kollagen I-Färbung unauffällig. An einigen Stanzen der ET-Patienten (36%) und PV-Patienten (11%) war lediglich eine dem Grad I entsprechende leichte Vermehrung der Kollagen I positiven Fasern zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Knochenmarksstanzen der PMF-Patienten entsprechend dem Krankheitsbild bei der Hälfte der Stanzen eine deutliche Zunahme der Kollagen I positiven Fasern nach Grad II (36%) oder Grad III (18%).

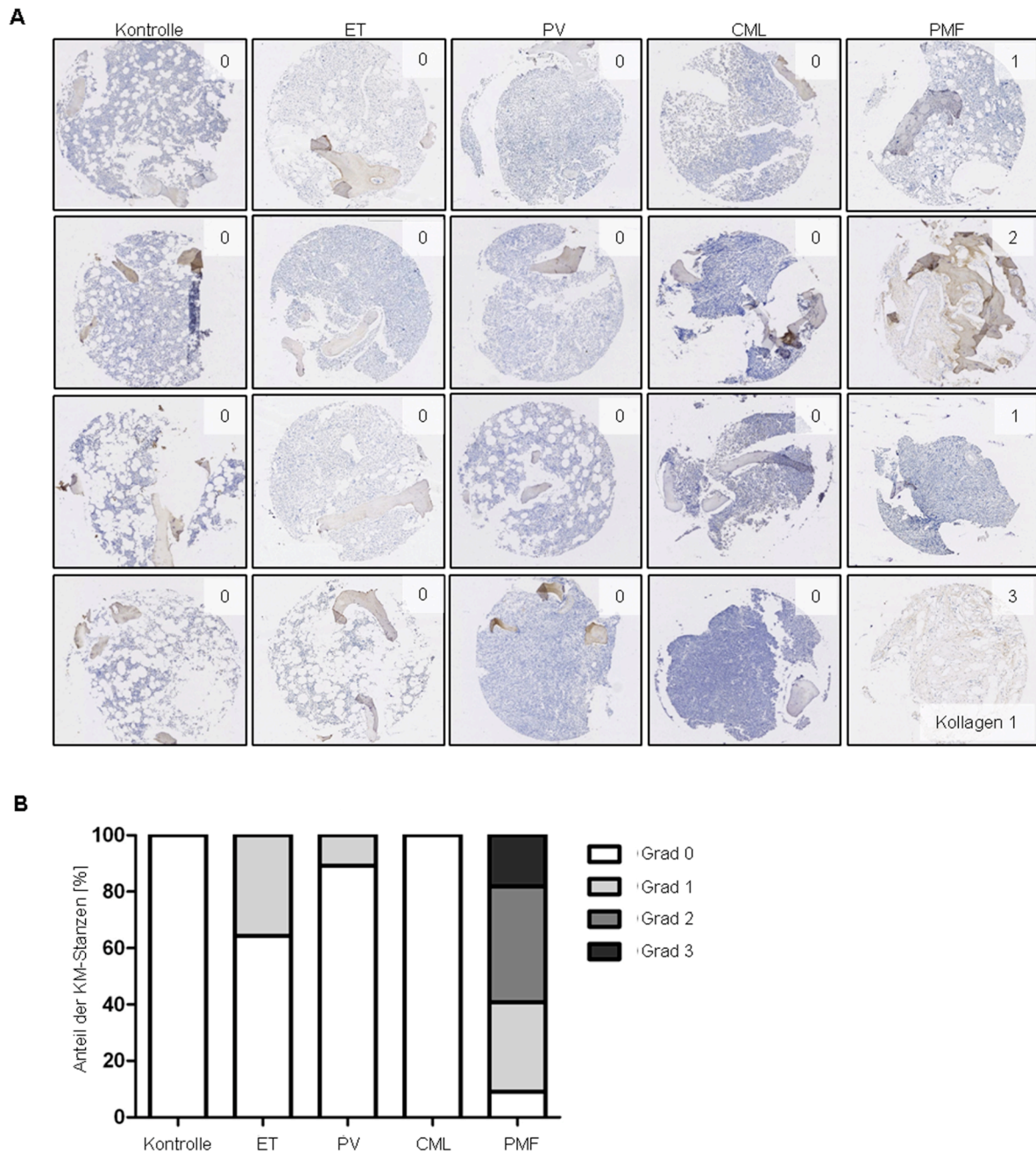


Abbildung 31: Immunhistochemische Färbung des Tissue Microarray für Kollagen I und Klassifizierung: (A) Je vier beispielhafte Spots zu den untersuchten Entitäten mit entsprechendem Grading. (B) Prozentueller Anteil der Patienten mit Grad 0-3 in den verschiedenen Patientengruppen.

In der Immunhistochemie für Fibronectin zeigte der Großteil der Knochenmarksstanzen von nicht-MPN-Patienten eine unauffällige Fibronectinexpression vom Grad 0 (89%) (Abbildung 32). Die übrigen Stanzen (11%) wurden als Grad I eingestuft. Obwohl an Knochenmarksstanzen von ET-, PV- und CML-Patienten keine auffällig verstärkte Kollagen I Expression beobachtet wurde, konnte bei einem Teil der Stanzen eine deutliche Vermehrung der Fibronectinfasern entsprechend Grad II oder III festgestellt werden. Besonders auffällig war dies bei Knochenmarksstanzen von CML-Patienten. Hier zeigte die Hälfte der Stanzen

ein Fibronectin-Fasernetzwerk entsprechend Grad II (40%) und Grad III (10%). Aber auch bei ca. 20% der Stanzeln von ET- und PV-Patienten konnten diffus vermehrte Fibronectin-Fasern in Assoziation zu den dysplastischen Megakaryozyten beobachtet werden. Auch bei Stanzeln von PMF-Patienten war durch die Fibronectinfärbung bei einem größeren Anteil der Stanzeln ein stark vermehrtes Fasernetzwerk zu finden verglichen mit der Kollagen I-Färbung. In fast allen Stanzeln der PMF-Patienten war eine Fibronectinexpression entsprechend Grad II (38%) oder Grad III (57%) zu sehen.

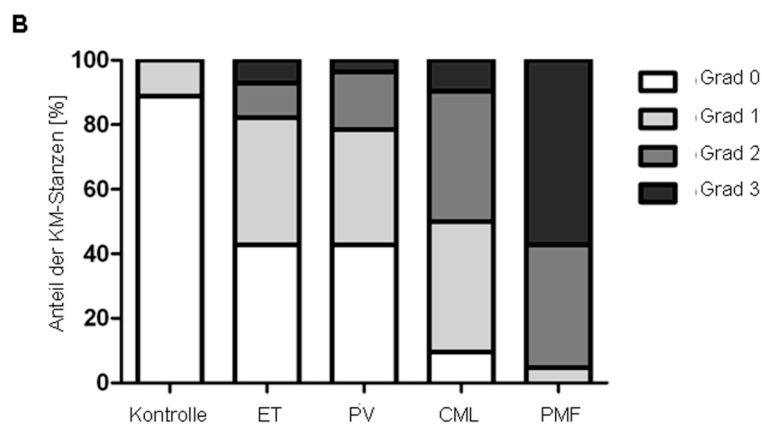
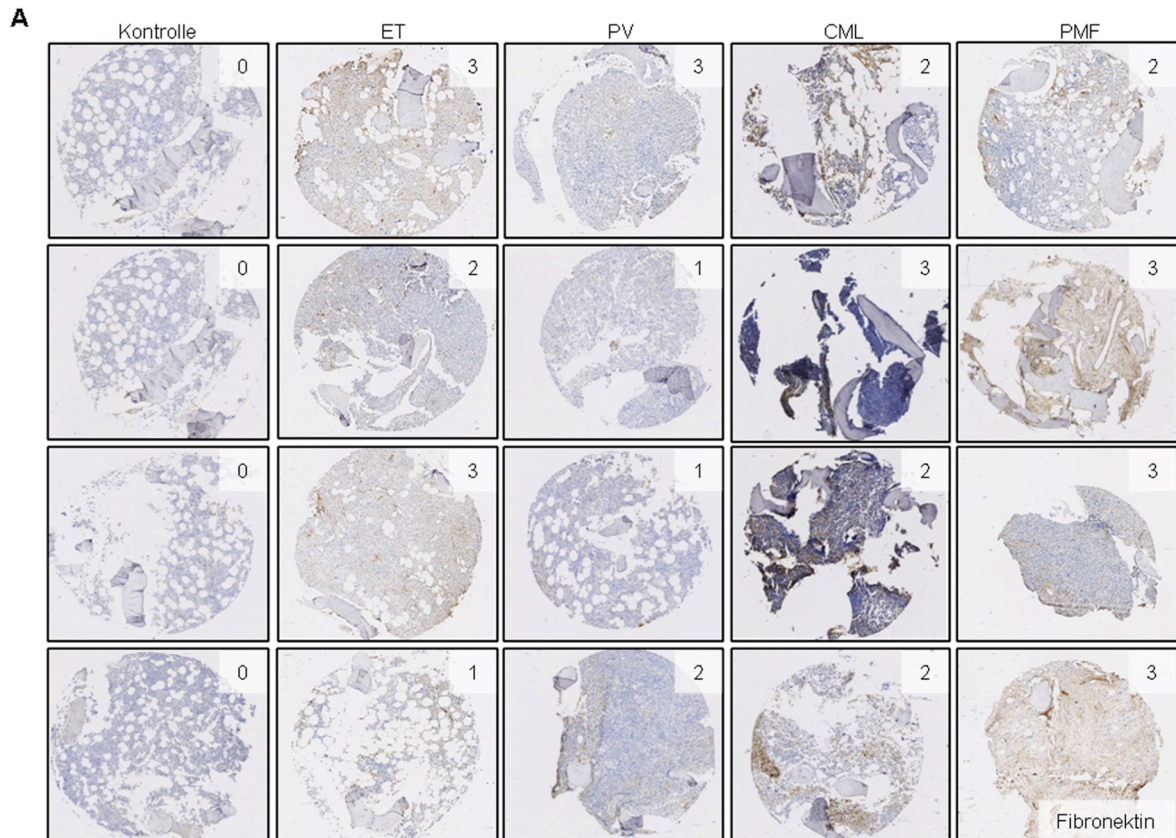


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung des Tissue Micro Array für Fibronectin und Klassifizierung: (A) Je vier beispielhafte Spots zu den untersuchten Entitäten mit entsprechendem Grading. (B) Prozentueller Anteil der Patienten mit Grad 0-3 in den verschiedenen Patientengruppen.

In der Immunfluoreszenz wurde der Zusammenhang zwischen den vermehrten Fibronektin-Akkumulationen im Knochenmark der MPN-Patienten und den CD271+ Stromazellen gezeigt. Fast alle Knochenmarksstanzen von nicht-MPN-Patienten (94%) zeigten eine unauffällige CD271-Färbung (Grad 0), bei den restlichen 6% der Stanzen war lediglich eine leichte Vermehrung der CD271+ Stromazellen zu beobachten (Abbildung 33). Bei einem Teil der Stanzen von MPN-Patienten zeigte sich im Gegensatz dazu eine deutlich verstärkte Färbung für den Stromazellmarker CD271. So konnte bei je 7% der Knochenmarksstanzen von ET-Patienten eine diffuse Vermehrung CD271+ Stromazellen im hämatopoetischen Mark entsprechend der Grad II oder III festgestellt werden. Bei Knochenmarksstanzen von PV-Patienten lag der Anteil mit auffallend vermehrter CD271-Expression noch etwas höher (18% Grad II, 4% Grad III). Entsprechend der Tendenz in der Fibronektinfärbung war die Anzahl an Stanzen von CML-Patienten mit deutlich verstärkter CD271-Expression (19% Grad II, 14% Grad III) größer als in der Gruppe der ET- und PV-Patienten. Dieser Zusammenhang wurde auch bei den PMF-Patienten deutlich: Mehr als die Hälfte der Knochenmarksstanzen wiesen eine diffus vermehrte CD271-Expression im hämatopoetischen Mark auf (25% Grad II, 35% Grad III). Die Tendenzen des CD271 Gradings entsprachen den Ergebnissen der Immunhistochemie für Fibronektin und bestätigten so noch einmal eine Korrelation zwischen vermehrter CD271- und Fibronektin-Expression bei MPN-Patienten.

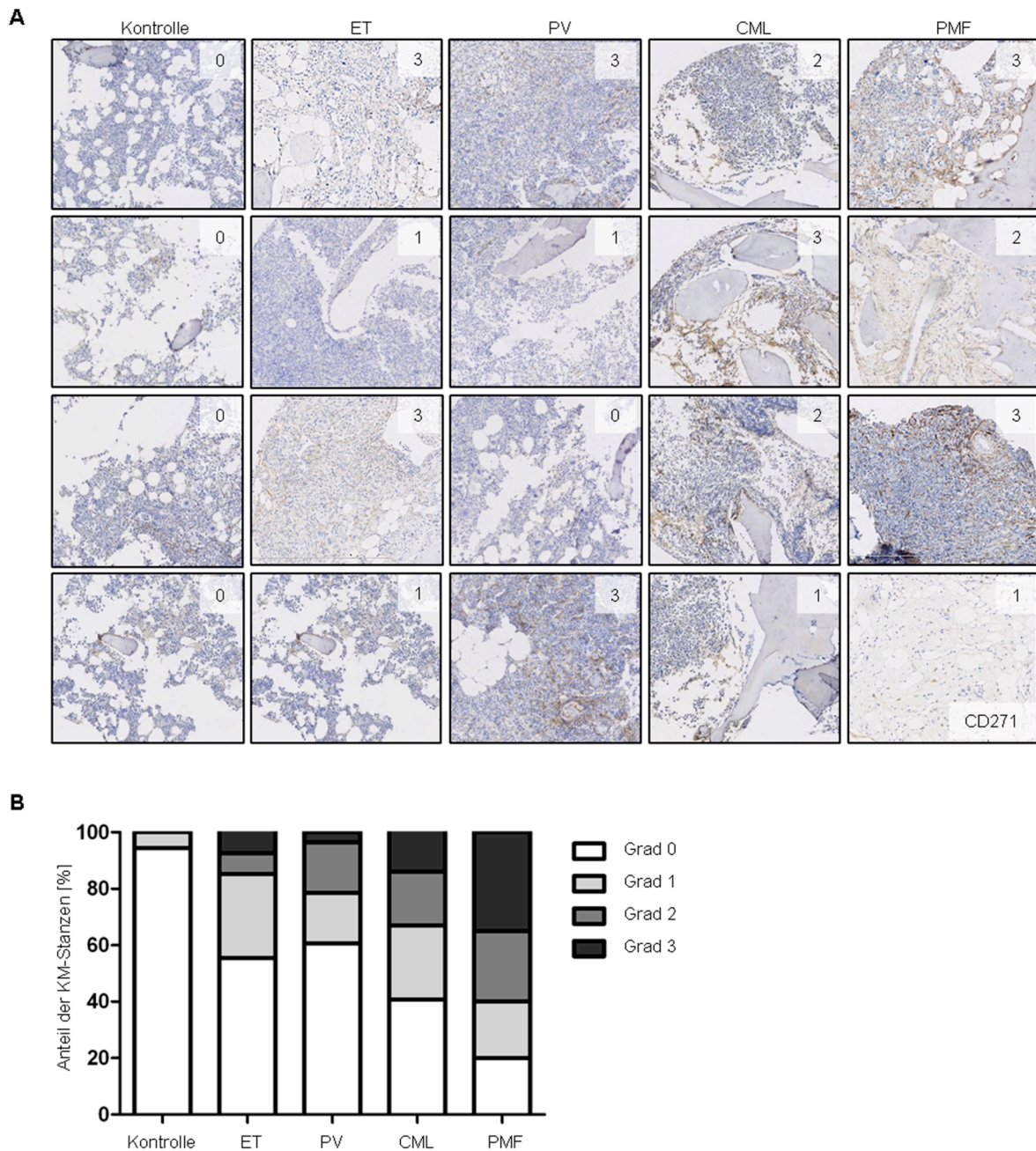


Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung des Tissue Micro Array für CD271 und Klassifizierung: (A) Je vier beispielhafte Spots zu den untersuchten Entitäten mit entsprechendem Grading. (B) Prozentueller Anteil der Patienten mit Grad 0-3 in den verschiedenen Patientengruppen.

Eine vermehrte Fibronektinexpression war auch bei MPN-Patienten zu beobachten, die in der Routinediagnostik basierend auf der Retikulinfärbung als Myelofibrofibrosegrad 0 eingestuft wurden. Möglicherweise könnte Fibronektin also ein früherer Marker für eine beginnende Myelofibrose sein. In der im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführten Retikulinfärbung wurden alle auf dem TMA verwendeten Knochenmarksstanzen der nicht-MPN- und der CML-Patienten als Retikulin negativ (Grad 0) eingestuft (Abbildung 34). Auch

in der Gruppe der ET- und PV-Patienten war der größte Teil der mittels TMA untersuchten Proben Retikulin negativ (64% bzw. 71%). Bei je 29% der Knochenmarksstanzen von ET- und PV-Patienten wurde die Retikulinfärbung als Grad I klassifiziert mit leicht vermehrten Retikulinfasern. Lediglich bei einem geringen Anteil (7%) der Stanzen von ET-Patienten wurde die Retikulinfärbung als Grad II eingestuft. In der Gruppe der PMF-Patienten wurde entsprechend dem Krankheitsbild bei einem Großteil der Stanzen eine Myelofibrose des Grades II (45%) oder III (36%) diagnostiziert: Die restlichen Stanzen (18%) zeigten eine leichte Vermehrung der Retikulinfasern entsprechend Grad I.

Im Folgenden wurde nun das Fibronectin-Grading der Stanzen von Patienten bestimmt, die als Retikulin negativ eingestuft wurden (Abbildung 34). Für die Stanzen von nicht-MPN-Patienten zeigte sich dabei in der Fibronectin-Färbung bei einem Großteil (89%) keine vermehrte Expression und lediglich bei 11% eine geringfügig verstärkte Fibronectinfärbung (Grad I). Bei Stanzen der Retikulin-negativen ET- und PV-Patienten war nur bei der Hälfte der Stanzen eine unauffällige Fibronectinfärbung zu beobachten. Verglichen mit den Stanzen der nicht-MPN-Patienten wurde bei einem deutlich größeren Anteil der ET- und PV-Patienten (39% bzw. 45%) eine leichte Vermehrung der Fibronectinfasern entsprechend Grad I festgestellt. Ein geringer Anteil der Stanzen zeigte sogar eine verstärkte Fibronectin-Expression mit diffusem Fasernetzwerk vom Grad II (6% der ET-Patienten, 5% der PV-Patienten). Bei Retikulin-negativen Knochenmarksstanzen von CML-Patienten fiel das Ergebnis des Fibronectingradings noch deutlicher aus: Fast an allen Stanzen (90%) waren Auffälligkeiten in der Fibronectinfärbung zu beobachten. Bei je 40% der Knochenmarksstanzen wurde die Vermehrung der Fibronectinfasern als Grad I oder Grad II eingestuft. Ein kleinerer Anteil (10%) zeigte sogar ein dichtes und diffuses Fibronectin-Fasernetzwerk entsprechend Grad III, obwohl keine Veränderung der Retikulin positiven Fasern festzustellen war. Damit konnte mittels Fibronectinfärbung bei einem erheblichen Anteil der Knochenmarksstanzen von MPN-Patienten Auffälligkeiten bezüglich der Extrazellulären Matrix festgestellt werden, obwohl aufgrund der Retikulinfärbung noch keine Myelofibrose vorlag.

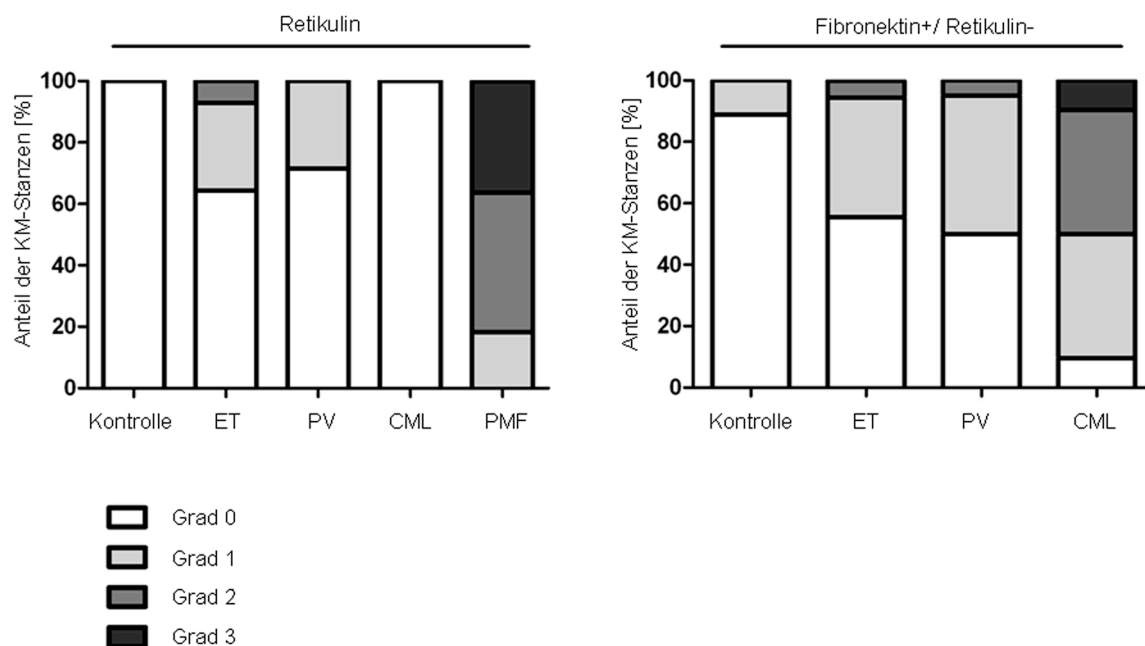


Abbildung 34: Fibronektin-Klassifizierung von Retikulin-negativen Patienten: In der Routinediagnostik wird der Myelofibrosegade der Patienten mittels Retikulinfärbung bestimmt. Mit den Ergebnissen des Tissue Micro Arrays wurde das Fibronektin-Grading von Retikulin-negativen Patienten analysiert.

4.2.5 Hämatopoetischer Support durch MSC von CML-Patienten

Mesenchymale Stromazellen zeigen deutliche Veränderungen hinsichtlich der Extrazellulärmatrix-Remodellierung im Vergleich zu Zellen von nicht-MPN-Patienten auf. Um das Potential der MSC von MPN-Patienten hinsichtlich der Hämatopoese-unterstützenden Funktion zu untersuchen, wurde das zuvor etablierte dreidimensionale kollagenbasierte Ko-Kultursystem verwendet. Da in den Kollagengelen das ECM-basierte Mikromilieu des Knochenmarks in vereinfachter Weise wiedergegeben wird, eignet sich dieses System besonders, um den Einfluss eines veränderten Mikromilieus auf CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen zu analysieren. Zusammengefasst wurden mesenchymale Stromazellen von nicht-MPN-Patienten (Hüft-TEP) und CML-Patienten in die Kollagengele eingebettet. Zudem wurden auch Kollagengele ohne eingebettete mesenchymale Stromazellen als Kontrolle verwendet. Nach einer Woche Vorkultivierung wurden CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut in Suspension auf die Kollagengele gegeben.

Zunächst wurde der Erhalt des CD34+ Phänotyps im Zeitverlauf an Tag 3, 5, 7 und 14 mittels Durchflusszytometrie analysiert. (Abbildung 35). Nach 3 und 5 Tagen Kultur konnten noch keine Unterschiede zwischen mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten und CML-Patienten in Bezug auf den Erhalt der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und

Progenitorzellen beobachtet werden. Der Anteil der CD34+ Zellen war an diesen frühen Zeitpunkten in allen Kulturbedingungen hoch (>92% an Tag3, >85% an Tag 5). Nach 7 Tagen wurde der positive Einfluss der mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten auf den Erhalt der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen deutlich verglichen mit den mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten. Diese Tendenz war sowohl in Suspension über den Kollagengelen (58% ±16 verglichen zu 47% ± 9) zu beobachten als auch in den Kollagengelen (67% ± 15 verglichen zu 55% ± 12). Ohne Stromazellen war der Anteil an CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen am geringsten (38% ± 15 in Suspension, 50% ± 17 im Kollagengel). Diese Tendenz war in den Kollagengelen auch nach 14-tägiger Kultur festzustellen. Während die Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten den Erhalt der CD34+ hämatopoetischen Zellen positiv beeinflusste im Vergleich zur Kultur ohne Stromazellen (35% ± 17 verglichen zu 27% ±11), so zeigten die mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten keinen zusätzlichen Support der CD34+ Subpopulation (24% ± 10 verglichen zu 27% ±11). In Suspension über den Kollagengelen war kein Unterschied im Erhalt des CD34+ Phänotyp festzustellen. Insgesamt zeigte sich im Zeitverlauf somit ein verringerter Erhalt des CD34+ Phänotyps in den Kollagengelen in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten.

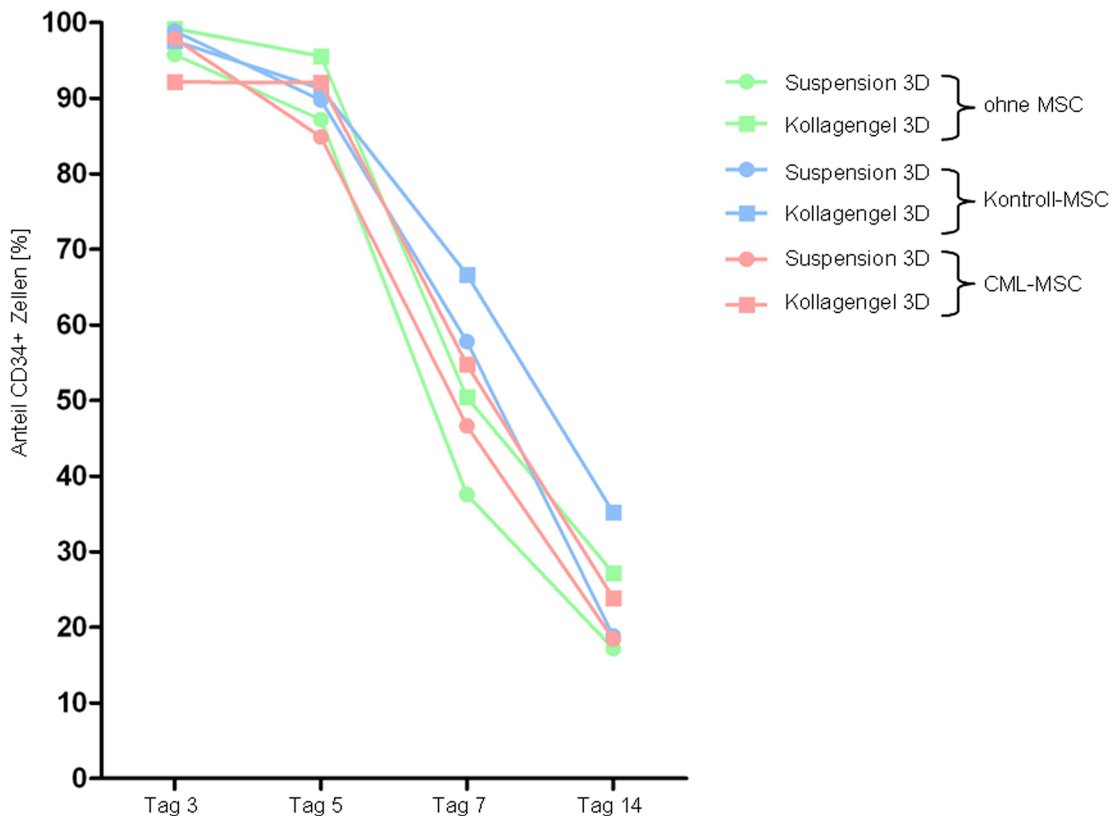


Abbildung 35: Erhalt des CD34+ Phänotyp im Zeitverlauf. Verglichen wurde die Ko-Kultur mit MSC von nicht-MPN-Patienten (Hüft-TEP) sowie CML-Patienten. Außerdem wurden CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen ohne MSC kultiviert. Der CD34 Erhalt wurde sowohl in konventioneller Kultur auf Zellkulturplastik als auch im dreidimensionalen Kultivierungssystem analysiert. CML-MSC: n=7, nicht-MPN-MSC: n=4. MSC = mesenchymale Stromazellen

Zusätzlich zum CD34+ Phänotyp wurde nach 7- und 14-tägiger Kultur die Anzahl primitiver CD34+ CD38- hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten und CML-Patienten sowie ohne mesenchymale Stromazellen mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 36 (A)). Nach 7 Tagen Kultur war kein signifikanter Unterschied im Erhalt der primitiven Subpopulation zu erkennen. Nach 14 Tagen Kultur zeigte sich in den Kollagengelen der positive Einfluss der mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten auf den Erhalt der primitiven CD34+ CD38- Zellen ($37\% \pm 13$ im Vergleich zu $19\% \pm 11$ ohne Stromazellen). In Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten war der Anteil der primitiven CD34+ CD38- Subpopulation signifikant ($p = 0,039$) geringer ($21\% \pm 9$). Verglichen mit Kollagengelen ohne Stromazellen zeigten mesenchymale Stromazellen von CML-Patienten keinen zusätzlichen hämatopoetischen Support in Bezug auf die CD34+ CD38- hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen ($19\% \pm 11$ verglichen zu $21\% \pm 9$). In Suspension über den Kollagengelen konnte kein signifikanter Unterschied im Erhalt der

primitiven Subpopulation mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll- oder CML-Patienten festgestellt werden ($20\% \pm 4$ verglichen zu $17\% \pm 8$).

In der Immunhistochemie für CD34 war die Verteilung CD34+ Zellen in der kollagenen Matrix zu erkennen (Abbildung 36 (B)). In Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten schienen weniger CD34+ Zellen in Gruppen zusammengelagert verglichen zu Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten.

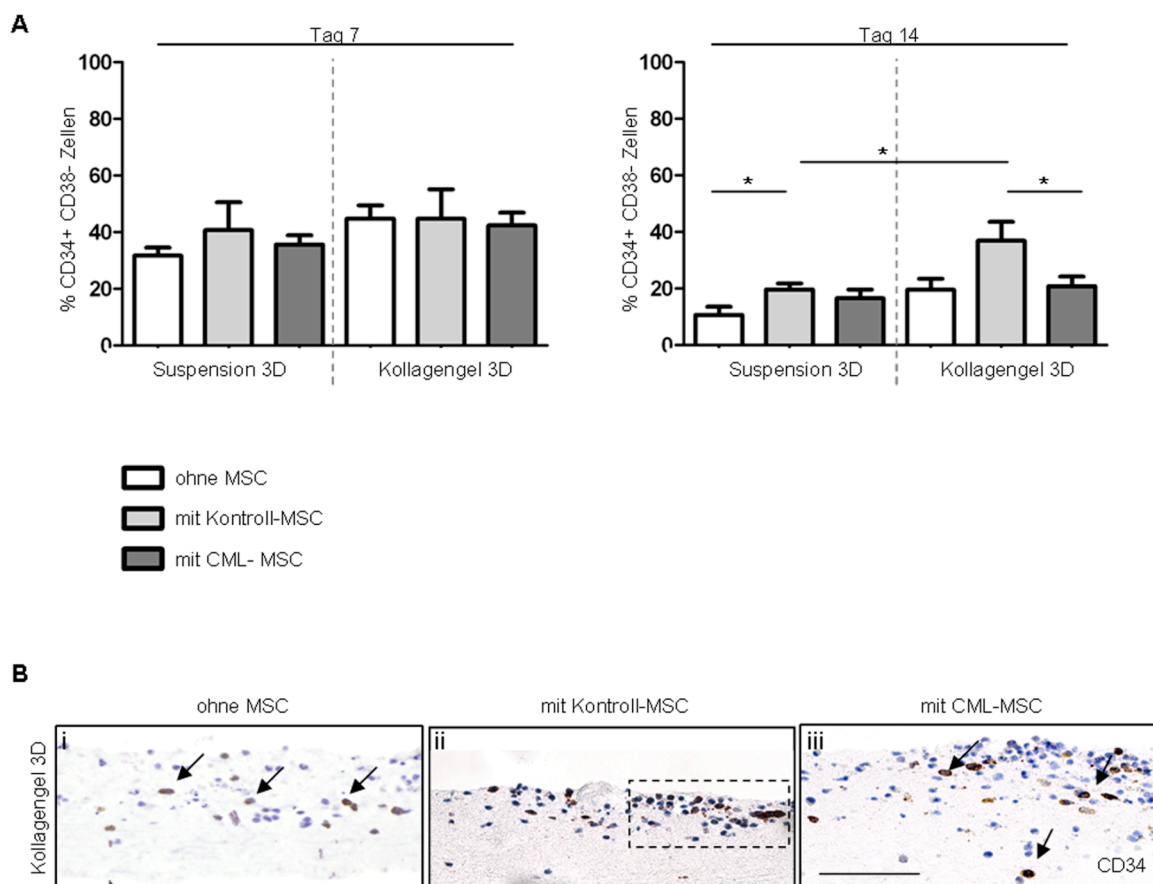


Abbildung 36: (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD34+ CD38- hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen an Tag 7 und 14. Verglichen wurde der Erhalt der primitiven Subpopulation der CD34+ CD38- hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Ko-Kultur mit MSC von nicht MPN-Patienten (Kontroll-MSC) (n=4) und MSC von CML-Patienten (n=7) sowie Kulturen ohne MSC (n=7). (B) Die Immunhistochemie für CD34 zeigt die Verteilung der CD34+ Zellen in der Kollagenmatrix. In Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten sind die CD34+ Zellen in Gruppen gelagert (ii: Umrandung), während die CD34+ Zellen in Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten und in stromazellfreien Gelen vereinzelt liegen (i, iii: Pfeile) Skala= 100µm. MSC = mesenchymale Stromazellen

An Tag 14 nach Ko-Kulturstart wurde weiterhin die Differenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte in den Kollagengelen einen signifikant geringeren Anteil an myeloiden CD13+ Zellen in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten ($45\% \pm 17$) verglichen mit

mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten ($68\% \pm 14$, $p= 0,0442$) oder auch stromazellfreien Kollagengelen ($66\% \pm 15$, $p=0,0277$) ((Abbildung 37 (A)). In Suspension über den Kollagengelen zeigte sich eine ähnliche Tendenz, wenn auch hier nicht signifikant.

In der Immunhistochemie zeigte sich die Verteilung der CD13+ Zellen in der kollagenen Matrix (Abbildung 37 (B)). In den Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten waren die CD13+ Zellen in Gruppen zusammengelagert (ii: Umrandung). In Gelen mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten lagen die CD13+ Zellen dagegen vereinzelt in der kollagenen Matrix (iii: Pfeile), ähnlich wie in stromazellfreien Kollagengelen (i: Pfeile).

Die durchflusszytometrische Analyse für den NK-Zell-Marker CD56 zeigte eine verstärkte weitere Differenzierung der hämatopoetischen Zellen in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten (Abbildung 37 (A)). Der Anteil an CD13+ CD56+ Zellen war in Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten signifikant ($p= 0,493$) erhöht gegenüber Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten ($26\% \pm 11$ verglichen zu $12\% \pm 4$). Während mesenchymale Stromazellen die fortschreitende Differenzierung der myeloiden Zellen verglichen mit stromazellfreien Kollagengelen ($18\% \pm 13$) stärker unterdrückten, so führte die Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten zu einer verstärkten weiteren Differenzierung. In Suspension über den Kollagengelen zeigte sich eine ähnliche Tendenz, auch wenn die Werte hier nicht signifikant waren.

In der Immunhistochemie für CD56 waren nur in stromazellfreien Gelen und Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten keine oder kaum CD56+ Zellen zu finden (Abbildung 37 (B i, ii)). In Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten waren vereinzelt CD56+ Zellen zu sehen (iii, Pfeile).

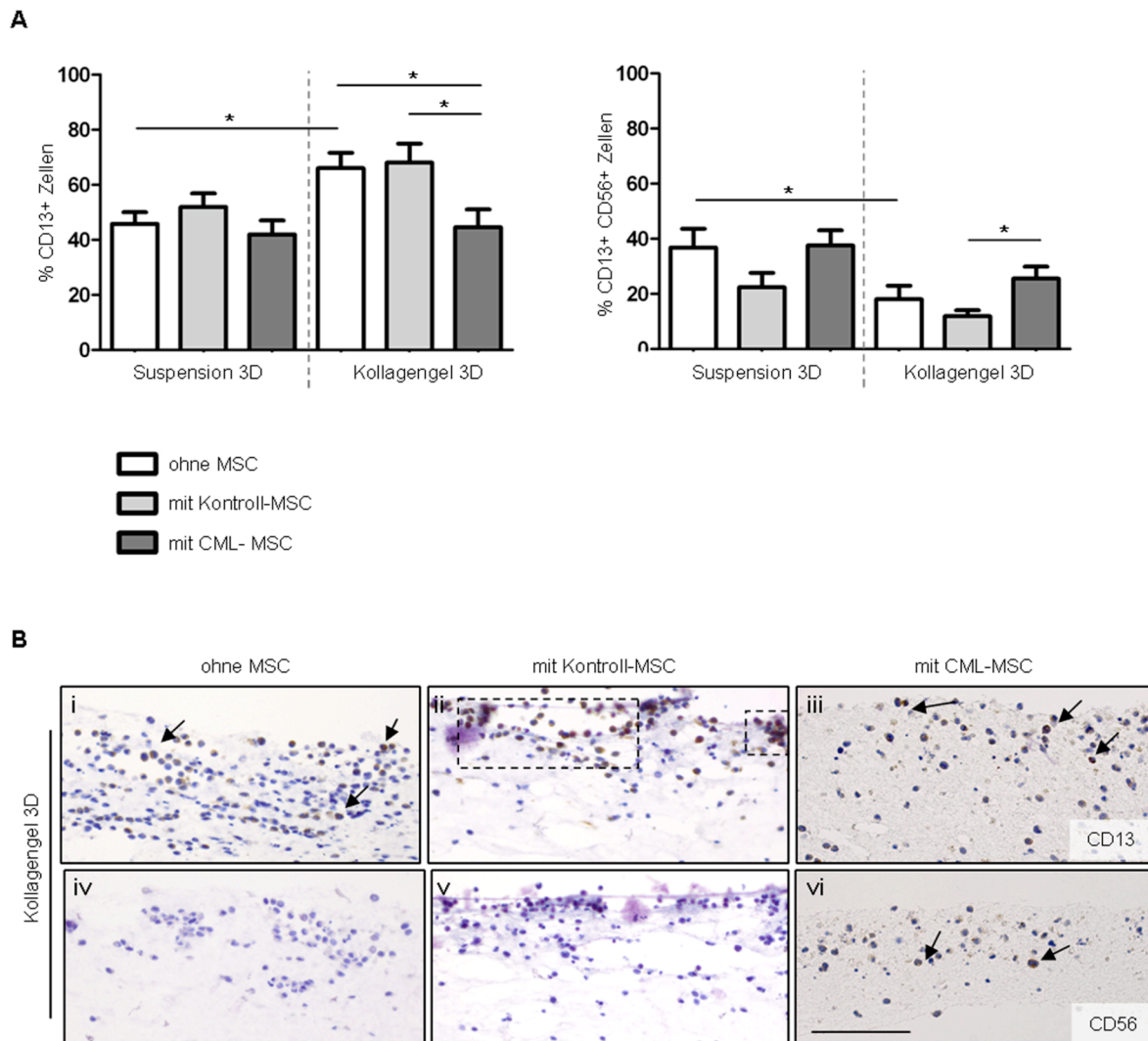


Abbildung 37: Differenzierung der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in die myeloide Richtung: (A) Durchflusszytometrische Analyse des Monozytenmarkers CD13 nach 14 Tagen Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten (n=4) und CML-Patienten (n=7) sowie ohne mesenchymale Stromazellen (n=7). * $p < 0,05$.

(B) Immunhistochemie für den Monozytenmarker CD13 nach 14 Tagen Kultur. Während im Kollagengel mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten die CD13+ Zellen in Gruppen gelagert sind (v: Umrandung), liegen die CD13+ Zellen in Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten und ohne mesenchymale Stromazellen vereinzelt in der kollagenen Matrix (iv, vi: Pfeile). Skala= 100 μ m. MSC = mesenchymale Stromazellen.

Zusammenfassend konnte im dreidimensionalen System gezeigt werden, dass die Ko-Kultur von CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten zu einem verringerten Erhalt der primitiven CD34+ CD38-Subpopulation führte verglichen mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten. Mesenchymale Stromazellen von CML-Patienten induzierten dagegen verstärkt die weitere Differenzierung der hämatopoetischen Zellen. Der hämatopoetische Support der primitiven Subpopulation, der in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen im dreidimensionalen Kultivierungssystem gezeigt werden konnte, war so mit mesenchymalen Stromazellen von

CML-Patienten nicht mehr gegeben. Dieser Effekt war verstärkt bei den in die Kollagengele migrierten Zellen zu beobachten.

Insgesamt konnte somit sowohl eine Beteiligung der Stromazellen von MPN-Patienten an einem veränderten ECM-basierten Mikromilieu gezeigt werden, als auch ein eingeschränkter hämatopoetischer Support der primitiven CD34⁺ CD38⁻ Subpopulation.

4.3 Einfluss einer dreidimensionalen Kalzium/Phosphatstruktur auf Extrazellulärmatrixremodellierung und osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen als Implikation für eine extramedulläre Knochenmarksnische

Um die Rolle von Veränderungen des Stroma im Knochenmark auch *in vivo* im Mausmodell untersuchen zu können, besteht die Notwendigkeit eines stabilen Scaffolds, mit dem die Stromakomponente transplantiert werden kann. Das Mikromilieu des Knochenmarks ist nicht transplantierbar. Durch die Verwendung von Scaffolds kann jedoch durch subkutane Transplantation eine ektope Knochenmarksnische geschaffen werden, in der extramedulläre Hämatopoese stattfinden kann (Groen *et. al.*, 2012, Chen *et. al.*, 2012). So kann der Einfluss von Veränderungen des Mikromilieu auf die Hämatopoese beispielsweise in Hinblick auf die Pathogenese myeloproliferativer Neoplasien *in vivo* untersucht werden.

Für diesen Zweck wurden in Kooperation mit dem Institut für zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung geeignete β -tri-Kalziumphosphat (β -TCP)-Scaffolds etabliert. Die Scaffolds sollten dabei (i) die dreidimensionale, poröse Struktur der Spongiosa widerspiegeln, (ii) stabil in Langzeitversuchen sein, (iii) geeignet für die Besiedelung mit mesenchymalen Stromazellen sein und (iv) *in vivo* eine extramedulläre Hämatopoese ermöglichen.

4.3.1 Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen auf β Tri-Kalziumphosphat-Scaffolds *in vitro*

Zunächst erfolgte die Etablierung der Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen auf β -TCP-Scaffolds *in vitro* unter besonderer Berücksichtigung von Extrazellulärmatrixremodellierung und osteogener Differenzierung. Hierzu wurden β -TCP-Scaffolds mit unterschiedlicher Porengröße (500 μ m, 800 μ m und Kavernenform) verwendet, um eine Matrix mit Ähnlichkeit zur Trabekularstruktur des Knochens zu bieten. Die Scaffolds wurden entweder direkt mit Knochenmark-MSCs besiedelt oder in Kombination mit dem zuvor beschriebenen Kollagengel als zusätzlicher Matrixkomponente (Abbildung 38).

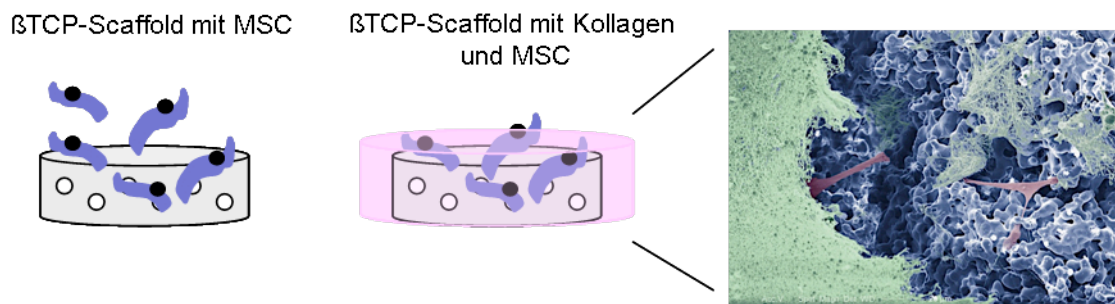


Abbildung 38: Versuchsansatz: Die mesenchymalen Stromazellen wurden direkt auf den Kalziumphosphat-Scaffolds ausgesät oder in flüssigem Kollagengel resuspendiert, das anschließend bei 37°C auspolymerisierte und die Poren der Scaffolds ausfüllte. In der Rasterelektronenmikroskopie der Scaffolds im Querschnitt waren MSC (rot) auf der β -TCP-Oberfläche (blau) in den Poren zu sehen sowie die kollagene Matrix (grün). Die Herstellung der Scaffolds erfolgte in Kooperation mit dem Institut für zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung. Nachbearbeitung der REM-Aufnahme: Dipl.-Ing. Armin Kirsten (Institut für zahnärztliche Werkstoffkunde und Biomaterialforschung)

Nach zwei Wochen Kultivierung auf den β -TCP-Scaffolds wurde zunächst die Morphologie der MSC mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) analysiert. Die Scaffolds wurden im Querschnitt untersucht, um die in die Poren migrierten MSC zu visualisieren. In den REM-Aufnahmen zeigten sich in die Poren der Scaffolds migrierte MSC die direkt auf der Kalziumphosphatoberfläche adhärten und lange Pseudopodien ausbildeten. Die MSC waren in allen Scaffoldtypen unabhängig von der Porengröße zu erkennen. Wurden die MSC direkt auf den β -TCP-Scaffolds ohne Kollagengel ausgesät, so bildeten sie ein dichtes zelluläres Netzwerk auf der β -TCP-Oberfläche aus (Abbildung 39 (i, ii, iii)). In Kombination mit Kollagengel war in den Poren das Kollagen zu erkennen, das auf der β -TCP-Oberfläche auflag. An Stellen, die nicht von Kollagen bedeckt waren, wurden vereinzelt liegende MSC sichtbar. Die vereinzelt wachsenden MSC zeigten die für diesen Zelltyp charakteristische spindelförmige Morphologie. Ein dichtes Netzwerk aus Zellen war hier im Vergleich zu Scaffolds ohne Kollagen nicht zu erkennen (Abbildung 39 (iv, v, vi)).

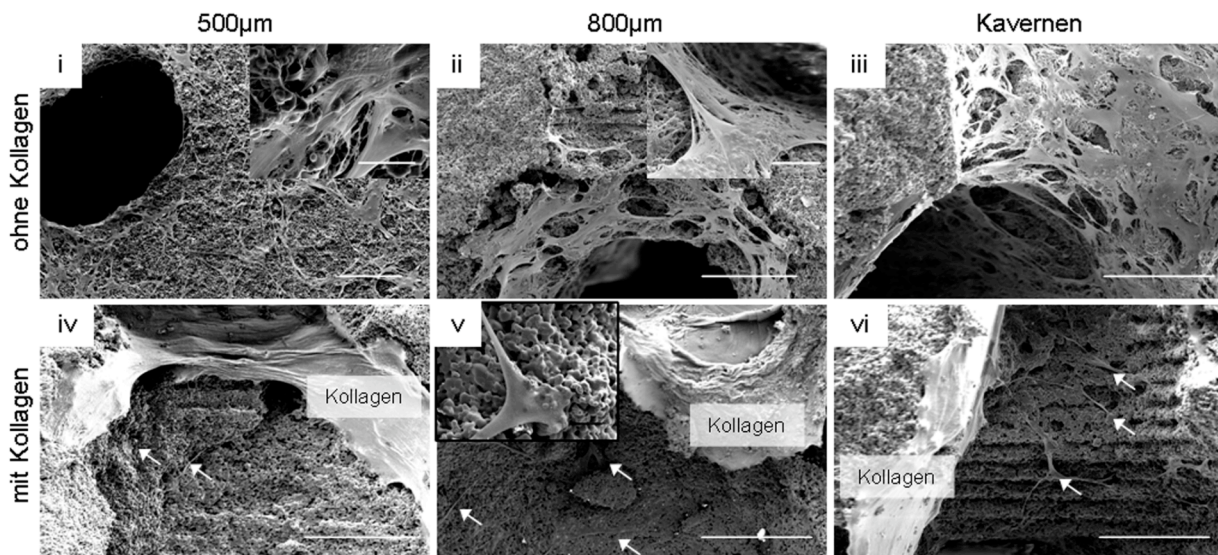


Abbildung 39: Rasterelektronenmikroskopie der mit MSC besiedelten β -TCP-Scaffolds nach 14 Tagen Kultur. Untersucht wurden Scaffolds mit einem Porendurchmesser von $500\mu\text{m}$ und $800\mu\text{m}$, sowie mit Poren in Kavernenstruktur. Die Scaffolds wurden entweder direkt mit MSC besiedelt (i, ii, iii) oder in Kombination mit Kollagen (iv, v, vi). Die MSC adhärten auf der β -TCP-Oberfläche und bildeten lange Pseudopodien. Ohne Zusatz von Kollagen bildeten die MSC ein dichtes zelluläres Netzwerk in den Poren der Scaffolds (i, ii, iii). Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie in Kooperation mit der Elektronenmikroskopischen Einrichtung (EME), Universitätsklinikum Aachen (Skalen: $200\mu\text{m}$, Ausschnitt i und v $20\mu\text{m}$, Ausschnitt ii $50\mu\text{m}$).

Die Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) des Knochenmarks bilden einen bedeutenden Bestandteil der Knochenmarksnische und spielen eine wichtige Rolle bei Migration und Homing von HSC (Celebi *et. al.*, 2011). Hinsichtlich der Möglichkeit die β -TCP-Scaffolds *in vivo* als ektope Knochenmarksnische anzuwenden, wurde der Einfluss der β -TCP-Scaffolds auf die Expression der Haupt-ECM-Proteine des Knochenmarks durch die MSC untersucht. Nach drei Wochen Kultur wurde mittels quantitativer *realtime*-PCR die Expression von Kollagen I und IV, Fibronectin und Osteopontin durch die MSC analysiert (Abbildung 40). Die Expressionslevel wurden verglichen mit denen von in Kollagen gel kultivierten MSC sowie von in Kollagen gel osteogen differenzierten MSC. Die Kalziumphosphatkomponente induzierte in allen Konditionen eine Heraufregulation extrazellulärer Matrixproteine. Insgesamt gab es Versuchs- und MSC-spenderabhängige Variationen in der Expression, sodass die Ergebnisse nicht ein Signifikanzniveau erreichten. Jedoch zeigte sich bei allen Versuchen ($n=5$) dieselbe Tendenz.

In Bezug auf die Fibronectinexpression (Abbildung 40 (A)) induzierte die osteogene Differenzierung eine $2 (\pm 1)$ -fache, allerdings nicht signifikante Heraufregulation. Diese konnte noch gesteigert werden durch die Verwendung der Kalziumphosphatkomponenten. Für β -TCP-Scaffolds mit einem Porendurchmesser von $500\mu\text{m}$ ergab sich eine $3(\pm 5)$ fache Hochregulation der Fibronectinexpression und durch die zusätzliche Verwendung der

Kollagenkomponente wurde das Expressionslevel 16 (± 28)-fach erhöht. Mit β -TCP-Scaffolds mit einem Porendurchmesser von 800 μ m wurde die Expression lediglich in Kombination mit Kollagen um das 13 (± 27)-fache gesteigert. Ohne Kollagen konnte die Fibronectinexpression nicht gesteigert werden. Die Verwendung von Scaffolds mit Poren in Kavernenstruktur führte zu keiner Steigerung der Fibronectinexpression im Vergleich zur osteogenen Differenzierung. In Kombination mit Kollagen war bei dieser Porenstruktur eine leichte Abnahme der Fibronectinexpression gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Äquivalent zur Fibronectinexpression zeigte sich auch für Kollagen I eine 2 (± 3)-fache Steigerung des Expressionslevels durch osteogene Differenzierung der MSC im Kollagengel. Auch für Kollagen I (Abbildung 40 (B)) führte die Verwendung der Kalziumphosphatkomponente zur Erhöhung der Kollagen I Expression. Für β -TCP Scaffolds mit einem Porendurchmesser von 500 μ m ohne Kollagenkomponente war eine 2 (± 2)-fache Heraufregulation der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Durch die zusätzliche Verwendung von Kollagengel kam es zu einer 9 (± 10)-fachen Steigerung der Kollagen I Expression. Die MSC-Kultivierung auf β -TCP-Scaffolds mit 800 μ m Porendurchmesser führte ohne Kollagen zu einer 23 (± 30)-fachen Erhöhung der Expression, während die zusätzliche Verwendung von Kollagengel lediglich eine 4 (± 5)-fache Hochregulation der Kollagen I Expression bewirkte. Die Kultivierung auf Scaffolds mit Poren in Kavernenstruktur induzierte eine 32 (± 37)-fachen Steigerung der Expression von Kollagen I. Auch bei diesem Porendurchmesser führte die zusätzliche Verwendung von Kollagengel nicht zu einer weiteren Erhöhung des Expressionslevel. Die Kollagenexpression war hier 4 (± 5)-fach gegenüber der Kontrolle erhöht.

Kollagen IV ist insbesondere im Rahmen einer adipogenen Differenzierung herauf reguliert. Es zeigte sich jedoch auch durch die osteogene Differenzierung der MSC eine 5 (± 4)-fache Heraufregulation der Expression von Kollagen IV (Abbildung 40 C)). Unter Verwendung von β -TCP Scaffolds mit einem 500 μ m Porendurchmesser wurde das Expressionslevel von Kollagen IV um das 63 (± 80)-fache gesteigert. Die Kombination mit Kollagengel führte zu einer weiteren Erhöhung der Expression um das 206 (± 445)-fache im Vergleich zur Kontrolle. Mit β -TCP-Scaffolds mit einem Porendurchmesser von 800 μ m wurde die Kollagen IV Expression um das 221-fache (± 321) erhöht. Die Kultur auf Scaffolds mit Poren in Kavernenstruktur induzierte eine 22 (± 27)-fache Induktion der Kollagen IV Expression und war damit geringer im Gesamtvergleich zu Porengrößen von 500 μ m und 800 μ m. Auch hier führte die Kombination mit Kollagengel zu keiner weiteren Erhöhung der Expression.

Das Glycoprotein Osteopontin wird von Osteoblasten exprimiert und ist ein essentielles Matrixprotein des Knochenmarks und charakteristisch für die endostale Region. Die osteogene Differenzierung bewirkte eine $20 (\pm 35)$ -fache Steigerung der Osteopontinexpression (Abbildung 40 D). Auch für Osteopontin konnte die Expression durch die Verwendung der Kalziumphosphatkomponente erhöht werden. Für Scaffolds mit einem Porendurchmesser von $500\mu\text{m}$ war eine Steigerung der Expression um das $547 (\pm 1109)$ -fache zu beobachten. Die Kombination mit Kollagengel bewirkte eine weitere Steigerung der Osteopontinexpression (922 ± 2025). Durch Kultivierung auf Scaffolds mit $800\mu\text{m}$ Porendurchmesser wurde das Osteopontinexpressionslevel um das $200 (\pm 419)$ -fache erhöht. Die zusätzliche Verwendung von Kollagengel steigerte die Expression um das $171 (\pm 357)$ -fache im Vergleich zur Kontrolle. Scaffolds mit Poren in Kavernenstruktur induzierten dagegen keine Steigerung der Osteopontinexpression im Vergleich zu osteogen differenzierten MSC.

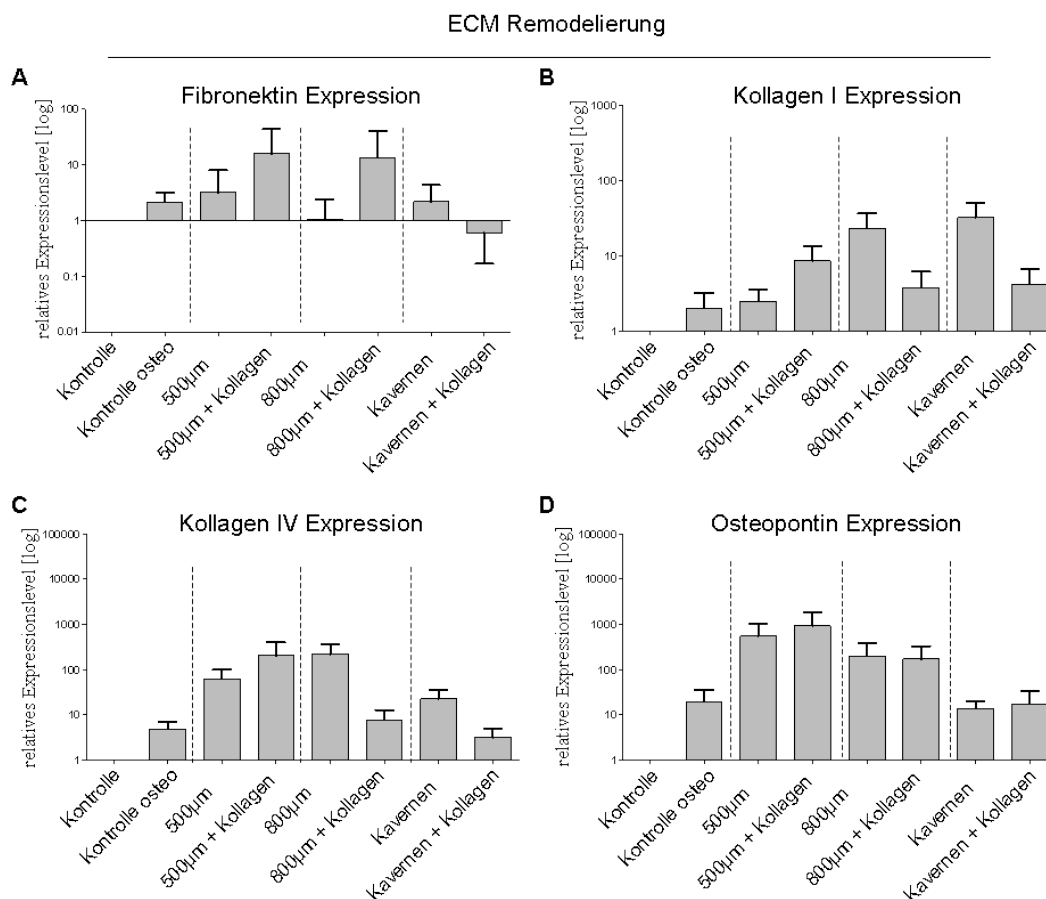


Abbildung 40: Expression der Extrazellulärmatrix-Proteine Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin und Osteopontin. Die Expression der ECM Proteine wurde gegen die Expression des *housekeeping*-Gens GAPDH normalisiert. Die Expression der in Kollagengel ohne β -TCP-Komponente kultivierten MSC wurde als Kontrolle verwendet und die Expression dieser Kontrolle gleich 1 gesetzt. Die Expressionslevel der auf β -TCP-Scaffolds kultivierten MSC wurden außerdem mit in Kollagengelen osteogen differenzierten MSC verglichen (Kontrolle osteo). $n = 5$

Osteoblasten, deren Vorläuferzellen mesenchymale Stromazellen sind, wurden als eine der Hauptkomponenten der Knochenmarksnische beschrieben und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Größe des HSC-Pools (Calvi et. al., 2003). Die osteogene Differenzierung von Knochenmark-MSK wird sowohl durch Hormone wie dem Parathroidhormon (PTH) als auch durch Wachstumsfaktoren zum Beispiel aus der BMP (*bone morphogenic protein*)-Familie reguliert. Diese Faktoren aktivieren spezifische intrazelluläre Transkriptionsfaktoren, die zu osteogener Differenzierung der MSC führen. Eine essentielle Rolle in der osteogenen Differenzierung von MSC spielt der Transkriptionsfaktor RunX2 (*runx-related transcription factor 2*). Die Aktivierung von RunX2 führt zur Expression von charakteristischen Genen wie Kollagen I, Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin (Giuliani et. al., 2013; Deng et. al., 2008; Otto et. al., 1997). Um eine spontane, osteogene Differenzierung von MSC auf β -TCP-Scaffolds ohne Zusatz von osteogenem Differenzierungsmedium nachzuweisen, wurde zunächst nach 3 Wochen Kultivierung die Expression der osteogenen Marker BMP2 (Abbildung 41 (A)) und RunX2 (Abbildung 41 (B)) mittels quantitativer *realtime*-PCR bestimmt. Verglichen wurden die Expressionslevel der auf den β -TCP-Scaffolds kultivierten MSC mit MSC, die in dem zuvor etablierten Kollagengel kultiviert wurden. MSC im Kollagengel wurden sowohl in Standard-Medium (Kontrolle) als auch unter Verwendung von osteogenem Differenzierungsmedium (Kontrolle osteo) kultiviert. Die in osteogenem Differenzierungsmedium kultivierten MSC dienten als Positivkontrolle. Die osteogene Differenzierung der MSC führte nach 21 Tagen Kultur zu einer $6 (\pm 7)$ -fachen Steigerung der BMP2 Expression. Die Expressionslevel konnten durch Kultur auf der Kalziumphosphatkomponente ohne Verwendung von osteogenem Differenzierungsmedium weiter erhöht werden. Eine Steigerung der BMP2 Expression um das $582 (\pm 1286)$ -fache wurde mit β -TCP-Scaffolds mit einem Porendurchmesser von $500\mu\text{m}$ beobachtet. Die Kombination mit Kollagengel führte zu einer weiteren Heraufregulation (3696 ± 8257). Auch β -TCP-Scaffolds mit $800\mu\text{m}$ Porendurchmesser induzierten eine Steigerung der BMP2 Expression sowohl ohne Kollagen (554 ± 1131) als auch mit Kollagengel (386 ± 856). Durch die Verwendung der Scaffolds mit Poren in Kavernenstruktur konnte das Expressionslevel von BMP2 im Vergleich zu Scaffolds mit $500\mu\text{m}$ und $800\mu\text{m}$ Poren weniger gesteigert werden (92 ± 176). In Kombination mit Kollagengel lag das Expressionslevel mit einer $4 (\pm 5)$ -fachen Erhöhung im Bereich der osteogen differenzierten MSC.

Die Expression des Transkriptionsfaktors RunX2 wurde durch osteogene Differenzierung der MSC um das $12 (\pm 12)$ -fache gesteigert. Die Kultur auf β -TCP-Scaffolds mit $500\mu\text{m}$ Porendurchmesser führte zu einer weiteren Steigerung der RunX2 Expression um das 30

(± 67) -fache ohne Kollagen und mit Kollagengel um das 193(± 424)-fache. Mit β -TCP-Scaffolds mit der Porengröße 800 μm konnte lediglich ohne Kollagengel eine Erhöhung der RunX2-Expression (70 ± 99) gegenüber den osteogen differenzierten MSC beobachtet werden. In Kombination mit Kollagengel lag das Expressionslevel unterhalb der osteogen differenzierten Kontrolle. Die Kultur auf Scaffolds mit Poren in Kavernenstruktur führte zu keiner Hochregulation der RunX2-Expression im Vergleich zu osteogen differenzierten MSC.

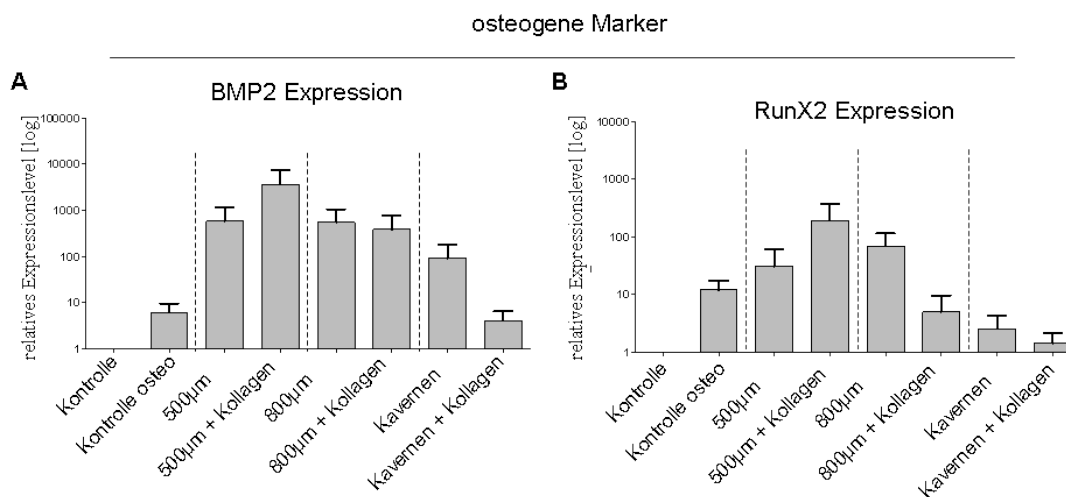


Abbildung 41: Die Expression der osteogenen Marker BMP2 (A) und RunX2 (B) wurde gegen das *housekeeping*-Gen GAPDH normalisiert. Die Expression der in Kollagengel ohne β TCP-Komponente kultivierten MSC wurde als Kontrolle verwendet und die Expression dieser Kontrolle gleich 1 gesetzt. n = 5

Die osteogene Differenzierung kann funktionell über den Anstieg des Phosphatgehaltes im Medium aufgrund der alkalischen Phosphatase Aktivität nachgewiesen werden. Der Phosphatgehalt im Mediumüberstand wurde nach 1, 2 und 3 Wochen Kultivierung im Institut für Versuchstierkunde bestimmt. Im Mediumüberstand von osteogen differenzierten MSC im Kollagengel unter Verwendung von osteogenem Differenzierungsmedium war über den Zeitraum von 3 Wochen ein konstanter Anstieg des Phosphatgehalts zu beobachten. Nach drei Wochen war die Phosphatkonzentration im Medium signifikant erhöht im Vergleich zur ersten Messung ($p < 0,001$). Im Mediumüberstand der MSC in Standardmedium und der MSC auf β -TCP-Scaffolds zeigte der Phosphatgehalt im Medium keine signifikanten Änderungen über den gesamten Kultivierungszeitraum (Abbildung 42 (A)). Der finale Nachweis für eine spontane osteogene Differenzierung der MSC auf β -TCP-Scaffolds konnte somit nicht erbracht werden.

Weiterhin wurde der Gehalt an freiem Kalzium im Mediumüberstand über einen Kultivierungszeitraum von 3 Wochen bestimmt, um einen Hinweis auf die Stabilität der β -TCP-Scaffolds zu erhalten. Der Kalziumgehalt wurde sowohl im Institut für

Versuchstierkunde als auch mit Hilfe des RANDOX Assays colorimetrisch bestimmt. Der Kalziumgehalt des Mediumüberstandes blieb über den gesamten Kultivierungszeitraum konstant. Die β -TCP-Scaffolds blieben somit in Kultur stabil und setzten kein Kalzium frei. Bei osteogen differenzierten MSC im Kollagengel ohne β -TCP-Scaffold war über 3 Wochen eine Abnahme des freien Kalziums im Medium zu beobachten. Dies ist zu erklären durch die Bindung von freiem Kalzium in Kalziumphosphatkomplexen im Rahmen der osteogenen Differenzierung. Die colorimetrische Bestimmung des Kalzium-Gehalts im Mediumüberstand im RANDOX-Assay zeigte ebenfalls keine signifikante Änderung des Kalziumgehalts (Abbildung 42 (B)).

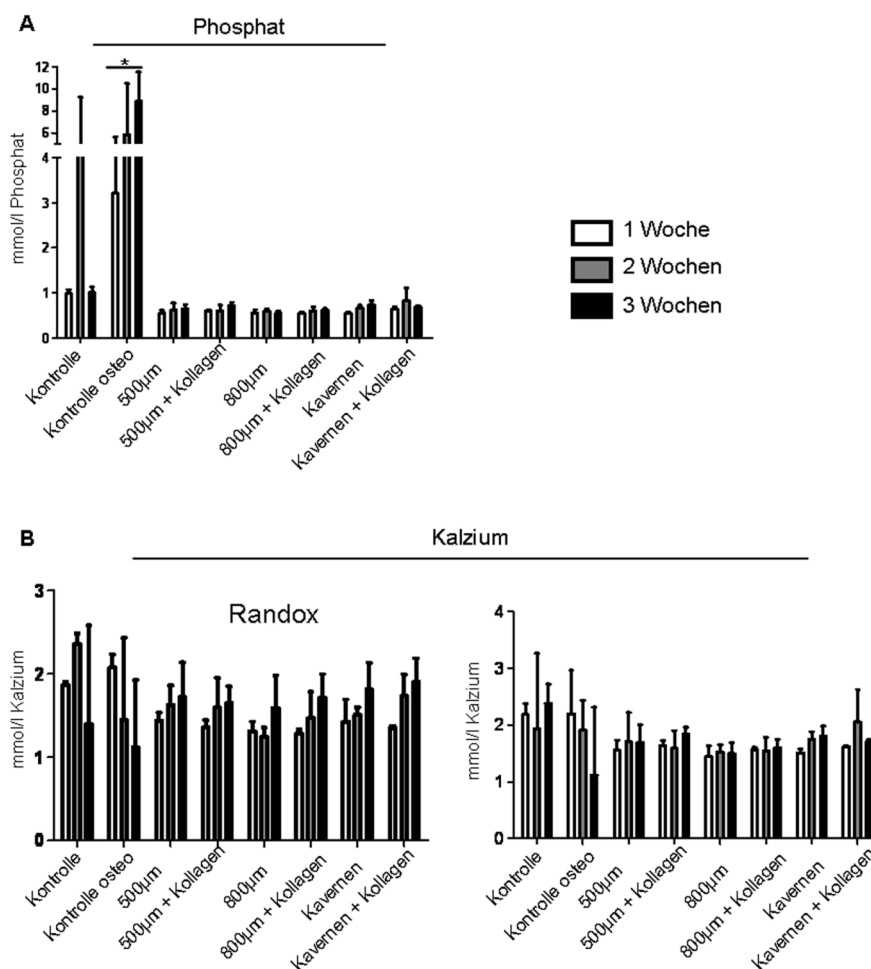


Abbildung 42: Bestimmung des Gehaltes an freiem Phosphat (A) und Kalzium (B) im Mediumüberstand von MSC auf β TCP-Scaffolds mit und ohne Kollagengel und MSC in Kollagengelen. Der Kalziumgehalt und Phosphatgehalt wurde im Institut für Versuchstierkunde bestimmt. Der Kalziumgehalt wurde zusätzlich auch mittels RANDOX-Assay. * $p < 0,001$

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die β -TCP-Scaffolds (i) geeignet sind zur Besiedlung mit MSC und (ii) einen positiven Einfluss auf die Expression von ECM-Proteinen hatten. Zudem wurde die Expression der osteogenen Marker BMP2 und RunX2 auch ohne Zugabe von osteogenem Induktionsmedium verstärkt. Funktionell konnte jedoch keine finale

osteogene Differenzierung nachgewiesen werden. Vor allem die Verwendung von β -TCP-Scaffolds mit einem Porendurchmesser von $500\mu\text{m}$ und $800\mu\text{m}$ führte zu einer Heraufregulation der Expression von Fibronectin, Kollagen IV und Osteopontin im Vergleich zu β -TCP-Scaffolds mit Kavernenstruktur. Auch die Expression der osteogenen Marker BMP2 und RunX2 wurde durch Scaffolds mit $500\mu\text{m}$ und $800\mu\text{m}$ Poren stärker gesteigert verglichen zu Scaffolds mit Kavernenstruktur. In den im Folgenden beschriebenen *in vivo* Experimenten wurden aufgrund dessen β -TCP-Scaffolds mit einem Porendurchmesser von $500\mu\text{m}$ und $800\mu\text{m}$ verwendet.

4.3.2 Subkutane Transplantation der Kalziumphosphat-Scaffolds im Mausmodell

Um die Eignung von Scaffolds für eine extramedulläre, ektope Knochenmarksnische zu testen, können diese (i) subkutan oder (ii) unter die Nierenkapsel transplantiert werden. Eine extramedulläre Hämatopoese kann dann nach Explantation mittels FACS- und histologischer Aufarbeitung beurteilt werden. Da die β -TCP Scaffolds von fester Textur sind, wurden sie subkutan in C57Bl/6 Mäuse transplantiert.

Scaffolds mit $500\mu\text{m}$ und $800\mu\text{m}$ Durchmesser wurden vor der Transplantation entweder direkt mit murinen MSC besiedelt oder zusammen mit Kollagengel oder Matrigel als zusätzliche Matrixkomponente. Die Scaffolds wurden anschließend subkutan in C57BL/6 Mäuse transplantiert und nach 4 bzw. 8 Wochen explantiert und auf extramedulläre Hämatopoese hin untersucht. Die folgenden Versuche wurden im Labor von Professor Benjamin L. Ebert, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA durchgeführt.

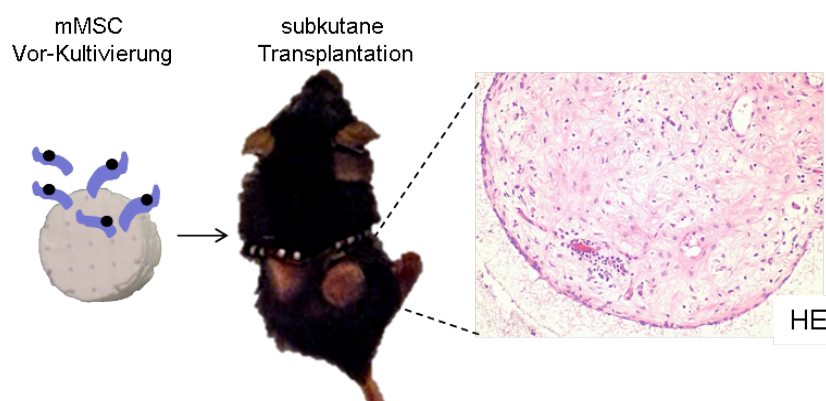


Abbildung 43: Vor der Transplantation wurden die β -TCP-Scaffolds mit murinen MSC besiedelt, entweder direkt oder in Kombination mit Kollagengel oder Matrigel. Anschließend erfolgte die subkutane Transplantation der Scaffolds in C57BL/6 Mäuse. Nach 4 bzw. 8 Wochen wurden die Scaffolds explantiert und hinsichtlich extramedullärer Hämatopoese analysiert. Die subkutanen Transplantationen wurden von Frau PD Dr. med. Schneider-Kramann und Dr. rer. nat. Dirk Heckl durchgeführt. mMSC= murine mesenchymale Stromazellen.

Die Explantate wurden zunächst histologisch mittels Hämalaun-Eosin (HE) Färbung untersucht. Analysiert wurden β -TCP-Scaffolds nach 4 Wochen und 8 Wochen Transplantation. Histologisch zeigte sich schon 4 Wochen nach Transplantation hämatopoetisches Gewebe in den Poren der β -TCP-Scaffolds mit 500 μ m und 800 μ m Porendurchmesser sowohl ohne als auch mit einer Matrixkomponente (Abbildung 44 (i-iv)). An hämatopoetischen Zellen waren vor allem Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und erythroide Progenitoren zu erkennen. Das Gewebe in den β -TCP-Scaffolds war gut vaskularisiert mit zahlreichen Kapillaren. Eine besonders gute Vaskularisation war nach 4 Wochen in den β -TCP-Scaffolds mit 500 μ m Porendurchmesser ohne Matrixkomponente zu erkennen. Hier waren in den Poren größere Kapillaren zu finden im Vergleich zu 500 μ m Scaffolds in Kombination mit Matrigel oder 800 μ m Porendurchmesser. An die β -TCP-Oberfläche der Poren angelagert war eine Schicht von spindeligen Stromazellen. Weiterhin waren an der β -TCP-Oberfläche mehrkernige Osteoklasten zu erkennen. Zudem fanden sich Areale mit univaskulärem Fettgewebe, wobei dieses entweder von der Maus stammen kann oder als adipogene Differenzierung der transplantierten MSC zu sehen ist. Hinsichtlich der Histologie gab es insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Porengrößen oder der zusätzlichen Verwendung einer Matrixkomponente.

Um Veränderungen in der Histologie nach einem längeren Transplantationszeitraum beurteilen zu können, wurden außerdem β -TCP-Scaffolds nach 8 Wochen analysiert (Abbildung 44 (v-viii)). Auch nach einem längeren Transplantationszeitraum setzten sich die hämatopoetischen Zellen in den Scaffolds hauptsächlich aus Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten sowie erythroiden Progenitoren zusammen. Sowohl Scaffolds mit 500 μ m als auch 800 μ m Porendurchmesser waren nach 8 Wochen gut vaskularisiert. Vor allem in β -TCP-Scaffolds ohne zusätzliche Matrixkomponente war eine deutlich ausgeprägte Schicht von Stromazellen sowie Osteoklasten an der Porenoberfläche zu erkennen. Zeichen für einen Abbau der Ca/P Komponente zeigten sich jedoch nicht. In der feingranulären Struktur der Ca/P Scaffolds fanden sich z.T. in Bündeln gelagerte spindelförmige Zellen, der Morphologie nach a.e. Osteoblasten entsprechend.

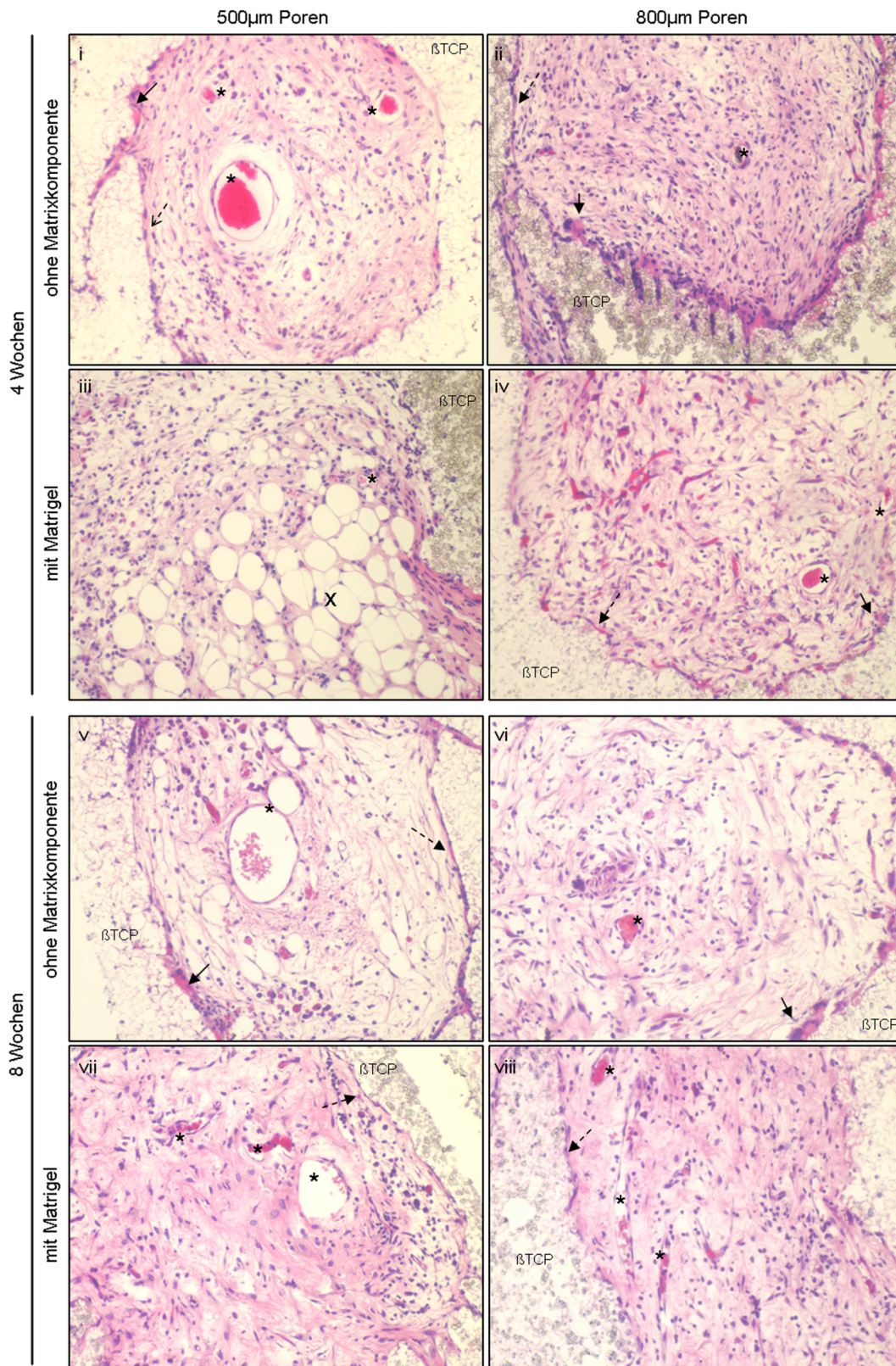


Abbildung 44: Hämalan-Eosin (HE) Färbung der nach 4 Wochen (i,ii,iii,iv) und 8 Wochen (v,vi,vii,viii) explantierten β TCP-Scaffolds: In den Poren sind vereinzelte hämatopoetische Zellen zu erkennen, insbesondere neutrophile Granulozyten, erythroide Vorläuferzellen und Lymphozyten. Zentral finden sich zahlreiche kleine, dünnlumige Kapillaren, i.S. einer ausreichenden Vaskularisierung, (*). An die β -TCP-Oberfläche angelagert finden sich spindelige Stromazellen (--->) und mehrkernige Osteoklasten (→). Zudem ist univakuäres Fettgewebe zu erkennen, das entweder von der Maus stammen kann oder im Sinne einer adipogenen Differenzierung der MSC zu sehen ist (x).

Weiterhin wurden die Scaffolds nach 4 Wochen Transplantation rasterelektronenmikroskopisch analysiert (Abbildung 45 (A)). In den Poren der Scaffolds waren hierbei vor allem Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten sowie Lymphozyten zu erkennen. Auch in der Rasterelektronenmikroskopie waren morphologisch keine Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung der hämatopoetischen Zellen bei unterschiedlicher Porengröße oder der Verwendung einer Matrixkomponente zu festzustellen. Entsprechend der histomorphologischen Untersuchung zeigten sich in der Rasterelektronenmikroskopie Zellen, die aufgrund ihrer Morphologie als Osteoklasten bezeichnet werden können. Charakteristisch für Osteoklasten ist die in Struktur eines Bürstensaumes stark aufgefaltete Zelloberfläche, die in der elektronenmikroskopischen Aufnahme deutlich zu erkennen ist (Abbildung 45 (B)).

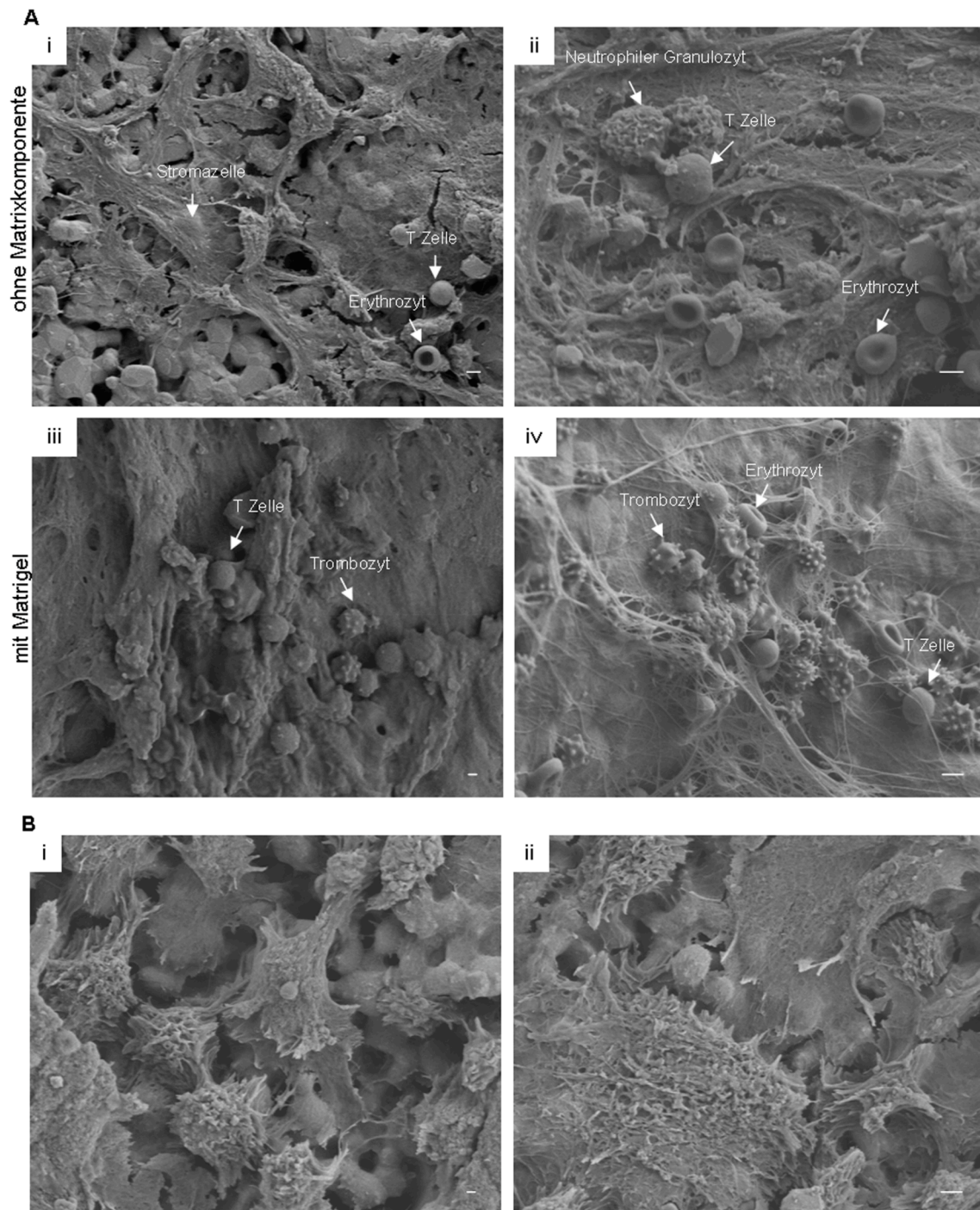


Abbildung 45: Rasterelektronenmikroskopie der explantierten β -TCP-Scaffolds: Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die Zusammensetzung der hämatopoetischen Zellen in den Poren des β TCP-Scaffolds: Zu sehen sind vor allem Erythrozyten, Thrombozyten, T-Lymphozyten und vereinzelt neutrophile Granulozyten. Auf der Oberfläche des 500 μ m Scaffold ohne Matrixkomponente ist eine spindelige Stromazelle zu sehen (i). Skalen: i, ii, iv: 2 μ m; iii: 1 μ m. (B) Zudem sind Zellen zu erkennen, die aufgrund ihrer Morphologie als Osteoklasten beschrieben werden können. Deutlich zu sehen ist die für Osteoklasten charakteristische stark aufgefaltete Zelloberfläche. Skalen: i: 1 μ m, ii: 2 μ m.

Zur Beurteilung der β -TCP-Scaffolds als geeignete ektipe Knochenmarksnische wurde weiterhin überprüft, ob alle essentiellen Bestandteile einer Knochenmarksnische in den β -TCP-Scaffolds gegeben sind. Hierzu wurden an den Explantaten nach 8 Wochen

Transplantation immunhistochemische Färbungen durchführt. Die Immunhistochemie für den pan-Leukozytenmarker CD45 zeigte zahlreiche hämatopoetische Zellen in den Poren der Scaffolds (Abbildung 46). Die CD45+ Zellen waren zum Teil in Gruppen gelagert, wie in der Immunhistochemie des 500µm Poren Scaffold ohne Matrixkomponente und dem 800µm Scaffold mit Matrigel zu erkennen ist. Diese in Gruppen gelagerten hämatopoetischen Zellen fanden sich in direkter Nähe zur Grenzfläche von Gewebe und β -TCP.

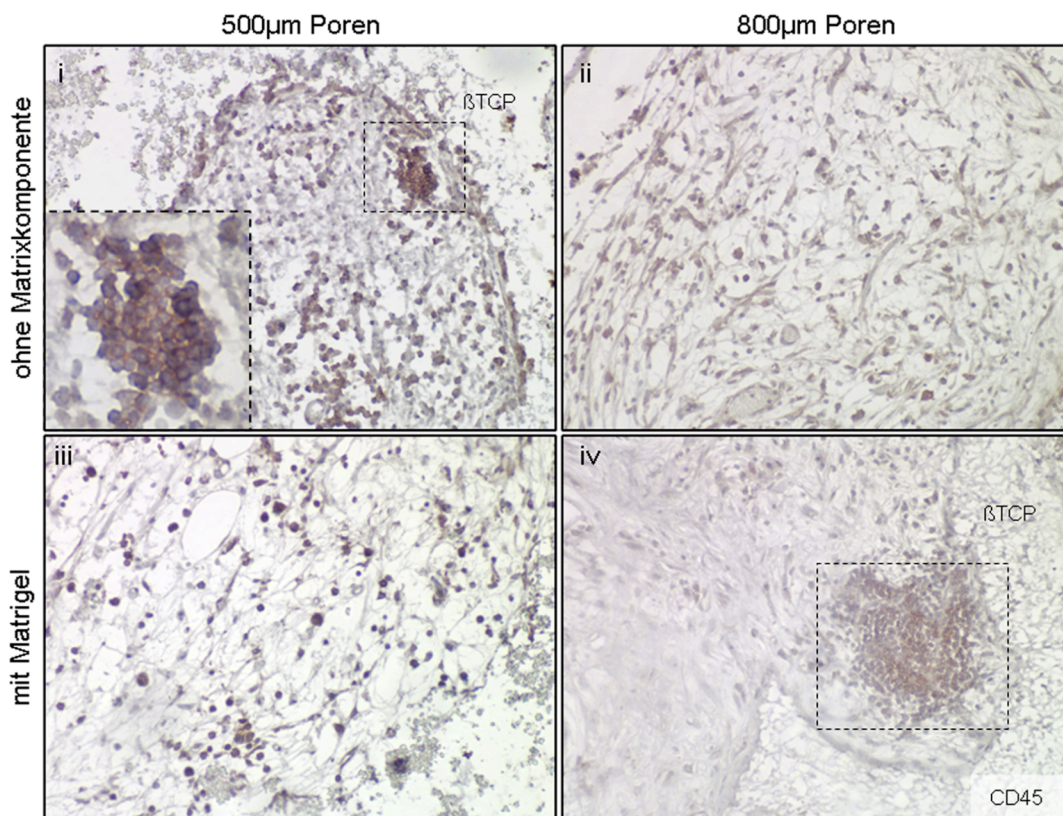


Abbildung 46: Immunhistochemische Färbung der nach 8 Wochen explantierten Scaffolds für den pan-Leukozytenmarker CD45. CD45+ Zellen sind teilweise in Gruppen von zahlreichen Zellen zusammengelagert an der Grenzfläche von Gewebe und β -TCP (Umrandung).

Weiterhin konnten CD31 positive Endothelzellen in der Immunhistochemie nachgewiesen werden, die die Gefäße auskleideten (Abbildung 47). Vor allem in β -TCP-Scaffolds mit einer Porengröße von 500µm ohne Matrixkomponente war eine deutliche positive Färbung für CD31 an den Gefäßen zu sehen. Die Gefäße waren vor allem zentral in den Poren der Scaffolds zu finden. Ansammlungen von CD31+ Endothelzellen fanden sich jedoch auch im Grenzbereich von Gewebe und β -TCP-Oberfläche (Abbildung Nr. (i), Pfeile).

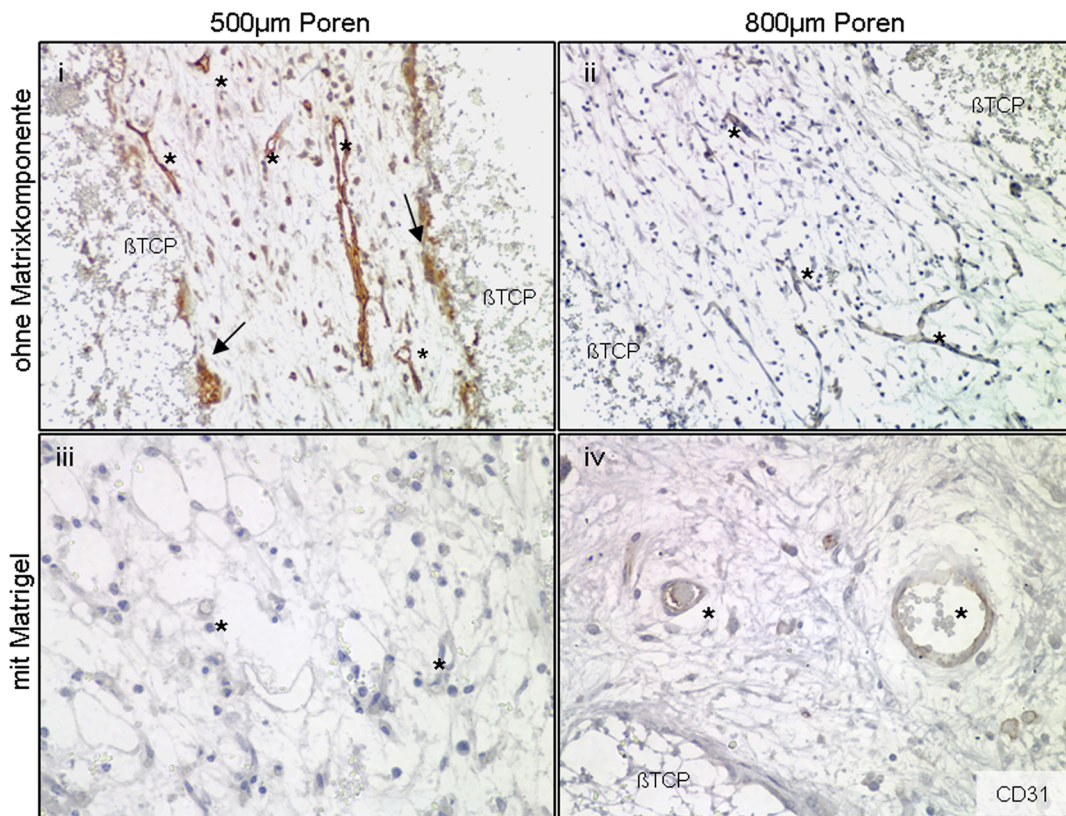


Abbildung 47: Immunhistochemie für den Endothelzellmarker CD31 an nach 8 Wochen explantierten Scaffolds. In der Immunhistochemie sind Gefäße zu erkennen, die mit CD31+ Endothelzellen ausgekleidet sind (*). Zudem finden sich CD31+ Zellen am Übergang von Gewebe und βTCP (i, Pfeile)

Mittels Retikulinfärbung wurde das Vorhandensein von Kollagenfasern als Bestandteil der extrazellulären Matrix nachgewiesen (Abbildung 48). In den Scaffolds beider Porengrößen waren positiv gefärbte Kollagenfasern zu erkennen, unabhängig von der Verwendung der Matrixkomponente. Die Kollagenfasern waren gleichmäßig im Gewebe in den Poren verteilt.

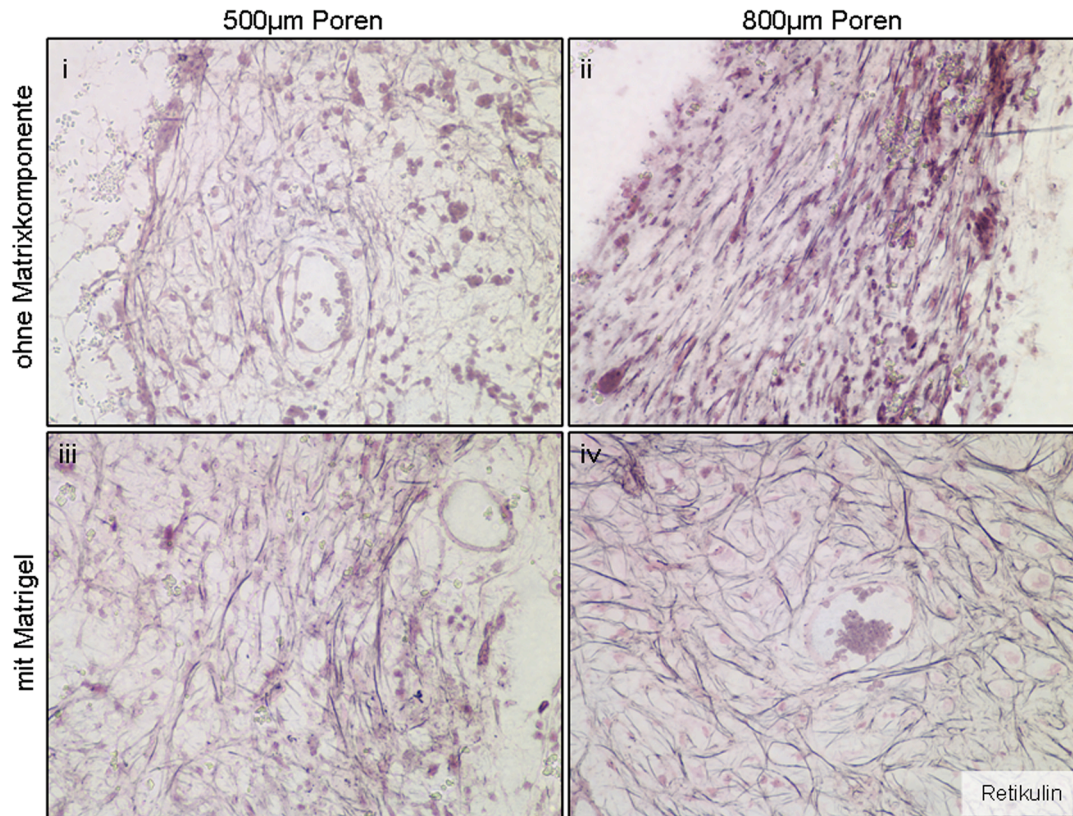


Abbildung 48: Retikulinfärbung an den nach 8 Wochen explantierten β TCP Scaffolds. In Der Retikulinfärbung sind schwarz gefärbt die Kollagenfasern als Bestandteil der extrazellulären Matrix in den Poren der Scaffolds zu erkennen.

Als bedeutenden Faktor der Stammzellnische konnte die Expression von des *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1, CXCL12) gezeigt werden (Abbildung 49). SDF-1 wurde vor allem an der mit Stromazellen besetzten Grenzschicht von β TCP und Gewebe exprimiert. Vereinzelt fanden sich auch SDF-1 exprimierende Zellen verteilt im Gewebe. Besonders ausgeprägt war die SDF-1 Expression in Scaffolds mit einem Porendurchmesser von 500 μ m ohne Matrixkomponente. Hier war auch eine perivaskuläre Expression von SDF-1 festzustellen.

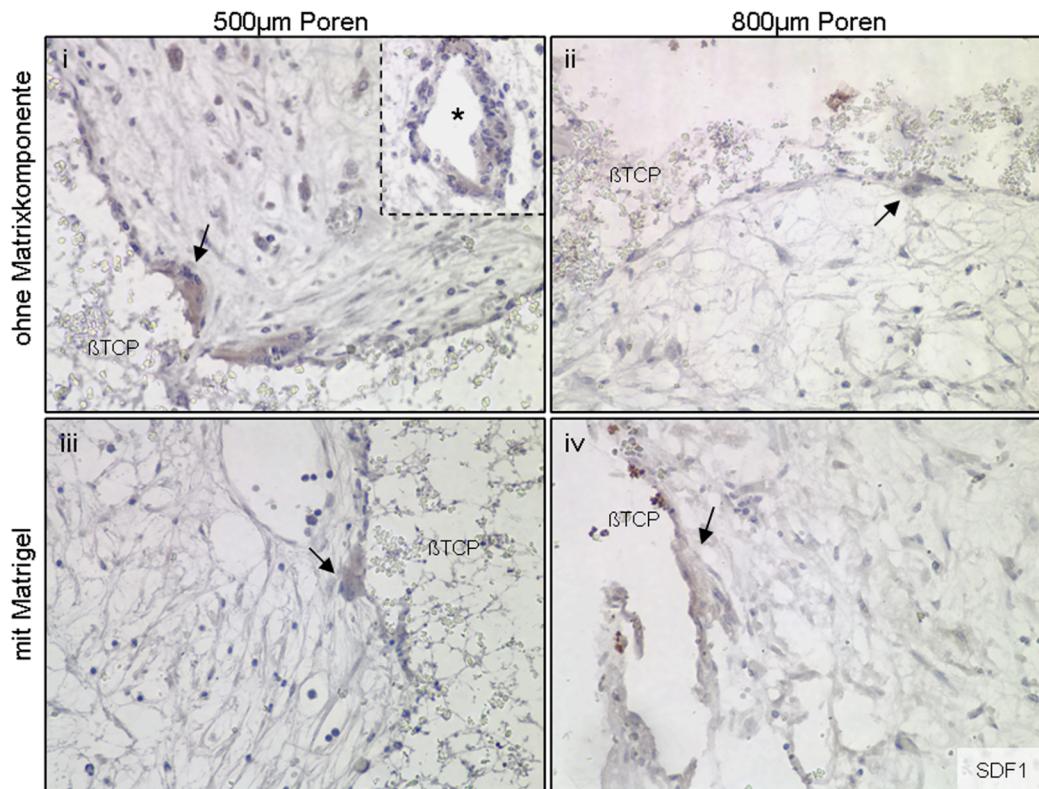


Abbildung 49: Immunhistochemischer Nachweis der SDF-1 Expression in den nach 8 Wochen explantierten Scaffolds. Vor allem an der Grenzfläche von β -TCP und Gewebe werden in allen Scaffolds SDF-1 exprimierende Zellen sichtbar (Pfeile). In Scaffolds mit 500 μ m Porendurchmesser ohne Matrixkomponente ist auch eine perivaskuläre SDF-1 Expression zu erkennen (i,*).

Mittels Durchflusszytometrie wurden die explantierten Scaffolds nach 4 (Abbildung 50 (A)) und 8 Wochen (Abbildung 50 (B)) auf das Vorhandensein hämatopoetischer Zellen der myeloiden Reihe (CD11b, Gr-1), lymphoiden Reihe (CD3, CD19) sowie erythroide Progenitoren (Ter119) untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte 4 Wochen nach Transplantation hämatopoetische Zellen aller Linien in den explantierten β -TCP-Scaffolds, vergleichbar mit der relativen Zusammensetzung im Knochenmark. Einen Hauptanteil der Zellpopulation machten die T-Zellen (CD3+ CD19-) aus. Tendenziell war der Anteil an T-Zellen mit einem durchschnittlichen Anteil von 27 (\pm 19)% in 800 μ m-Scaffolds ohne Matrixkomponente am geringsten. In Kombination mit Kollagen gel oder Matrigel und in 500 μ m-Scaffolds lag der Anteil der T-Zellen zwischen 40% und 50% an der Gesamtpopulation vitaler (DAPI-) Zellen. Mit einem durchschnittlichen Anteil von unter 2% machten B-Zellen (CD19+ CD3-) nur einen geringen Anteil an der Gesamtpopulation aus. Tendenziell war die Anzahl an B-Zellen in Kombination mit Kollagen gel sowohl bei Scaffolds mit 500 μ m Porengröße als auch 800 μ m Porengröße geringer als in Kombination mit Matrigel oder ohne Matrixkomponente. Granulozyten (CD11b+ Gr-1^{high}) waren mit einem Anteil von 10% - 20% in β -TCP-Scaffolds ohne Matrixkomponente oder in Kombination mit

Kollagen häufiger im Vergleich zu β -TCP-Scaffolds mit Matrigel. Die Anzahl der Monozyten war mit einem Anteil von 6% (± 3) in 500 μ m Scaffolds in Kombination mit Kollagengel nach 4 Wochen signifikant erhöht im Vergleich zu 500 μ m Scaffolds mit Matrigel ($p = 0,0026$) und direkt besiedelten Scaffolds ($p = 0,0074$). In 500 μ m Scaffolds ohne Matrixkomponente und in Kombination mit Matrigel lag der Anteil der Monozyten bei 2% (± 1). In β -TCP-Scaffolds mit einem Porendurchmesser mit 800 μ m war dieser Unterschied in Kombination mit Kollagengel nicht zu beobachten. Der Anteil der Monozyten in 800 μ m Scaffolds betrug in allen Konditionen 1-2%. Erythroide Progenitoren waren zu einem geringen Anteil um 1% in allen β -TCP-Scaffolds vorhanden. In Scaffolds mit einem Porendurchmesser von 800 μ m ohne Matrixkomponente war der Anteil der erythroiden Progenitoren mit durchschnittlich 4% höher. Um eine Änderung in der Zusammensetzung der Zellpopulation durch einen längeren Transplantationszeitraum zu analysieren wurden β -TCP-Scaffolds auch nach 8 Wochen durchflusszytometrisch untersucht. Eine Änderung in der Zusammensetzung der Zellen war jedoch nicht zu beobachten. Auch nach 8 Wochen machten die T-Zellen den größten Anteil der Zellen in den Scaffolds aus, gefolgt von den Granulozyten. Der Anteil an B-Zellen, Monozyten und erythroiden Progenitoren war mit jeweils $<5\%$ der Gesamtpopulation ähnlich im Vergleich zum Knochenmark. Die Anzahl an T-Zellen war verglichen mit dem Knochenmark erhöht. Eventuell könnte ein Grund für die erhöhte T-Zell-Zahl eine durch die transplantierten Scaffolds hervorgerufene Entzündungsreaktion sein.

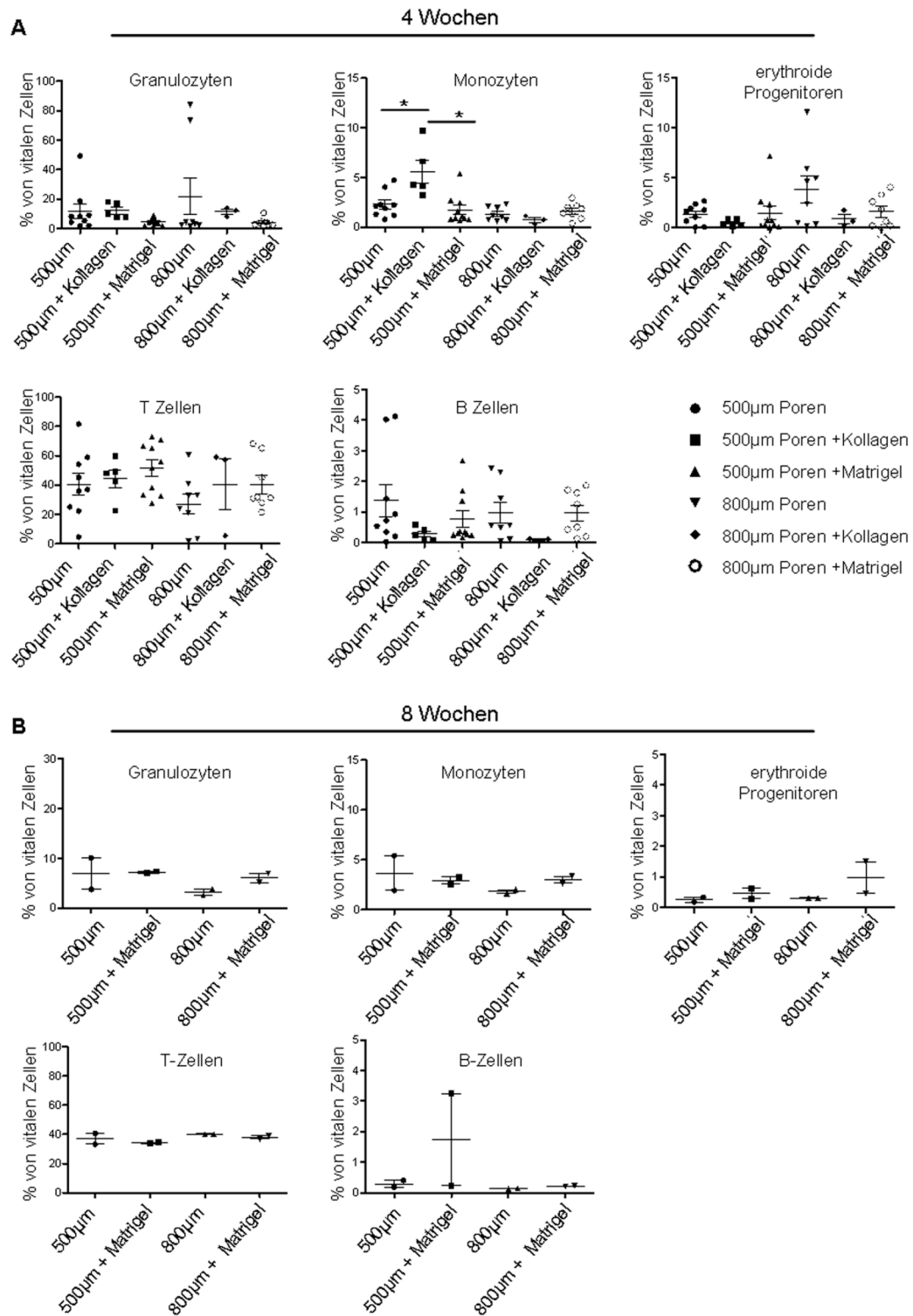


Abbildung (50): Durchflusszytometrische Analyse der hämatopoetischen Zellen in den β TCP Scaffolds nach 4 Wochen (A) und 8 Wochen (B) Transplantation. Analysiert wurde das Vorhandensein von Zellen der lymphoiden und myeloiden Reihen, d.h. Granulozyten, Monozyten, B-Zellen, T-Zellen sowie erythroide Progenitoren.

Zur Beantwortung der Frage, ob die reifen hämatopoetischen Zellen in die extramedullären Scaffolds eingewandert sind oder ob es sich um eine in situ Hämatopoese handelt, wurde analysiert ob hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen in den Scaffolds vorhanden sind,

aus denen eine vollständige Hämatopoese hervorgehen kann (Abbildung 51). In der Durchflusszytometrie waren nach einer Transplantationszeit von 4 bis 8 Wochen noch keine LSK (lin- sca-1+ ckit+, angereichert an hämatopoetischen Stamm)-Zellen oder LK (lin- sca-1- ckit+) Zellen, im Sinne von myeloiden Progenitoren nachweisbar. In der durchflusszytometrischen Analyse konnte in allen explantierten β -TCP-Scaffolds die Population der Sca-1+ Stromazellen identifiziert werden, mit denen die Scaffolds vor der Transplantation besiedelt wurden.

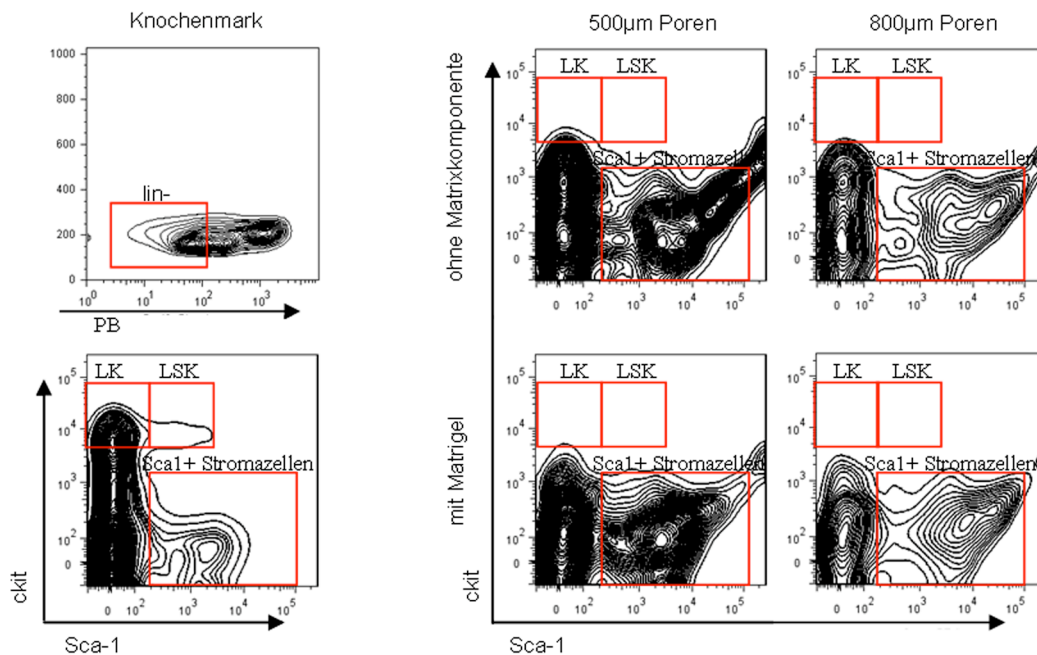


Abbildung 51: Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der nach 8 Wochen explantierten β TCP-Scaffolds. Untersucht wurde auf das Vorhandensein von LSK (lin- sca-1+ ckit+) Zellen bzw. LK (lin- sca-1- ckit+) Zellen. Hierzu wurde zunächst auf vitale, für die linienspezifischen Oberflächenmarker negative (lin-) Zellen gated. In der Population der vitalen lin- Zellen wurde der Anteil an LK und LSK Zellen bestimmt. Weiterhin konnte die Population der sca-1+ Stromazellen identifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels subkutaner Transplantation im Mausmodell nachgewiesen werden konnte, dass (i) in den β -TCP-Scaffolds hämatopoetische Zellen der myeloiden und lymphoiden Linie vorhanden sind sowie erythroide Progenitoren und Monozyten als Vorläuferzellen. Die relative Zellzusammensetzung war in den Linien vergleichbar mit dem Knochenmark. (ii) Das Gewebe in den Scaffolds war zudem gut vaskularisiert. Die CD31 positiven Endothelzellen konnten in der Immunhistochemie nachgewiesen werden. (iii) An die β -TCP-Oberfläche angelagert war eine Schicht aus Stromazellen sowie Osteoklasten. (iv) SDF-1 wurde als entscheidender Faktor der Stammzellnische exprimiert. (v) Weiterhin zeigte die Retikulinfärbung das Vorhandensein von Kollagenfasern als Bestandteil der extrazellulären Matrix. Das Vorhandensein von LSK-

Zellen im Sinn einer vollständigen in situ Hämatopoese konnte nach einem Transplantationszeitraum von 8 Wochen noch nicht nachgewiesen werden.

5. Diskussion

5.1. Das dreidimensionale kollagenbasierte Ko-Kultursystem als Modell der Knochenmarksnische *in vitro*

Die wechselseitigen Interaktionen zwischen den zellulären und nicht-zellulären Bestandteilen des Knochenmarkmikromilieus und den hämatopoetischen Zellen regulieren die Hämatopoese und die Aufrechterhaltung des Stammzellpools (Adams und Scadden, 2006). Um die Interaktionen in der Knochenmarksnische *in vitro* in einem definierten System untersuchen zu können, besteht die Notwendigkeit eines geeigneten Kultivierungssystems. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein dreidimensionales Modell der Knochenmarksnische *in vitro* entwickelt. In dem kollagenbasierten Ko-Kultursystem waren die wichtigsten Charakteristika der Knochenmarksnische gegeben: die (i) dreidimensionale Struktur, (ii) eine Stromakomponente mit osteogenem Differenzierungspotential sowie (iii) eine extrazelluläre Matrixkomponente. Das Modell wurde hinsichtlich seiner Eignung als artifizielle Knochenmarksnische evaluiert. Dabei wurde der Einfluss auf CD34+ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen hinsichtlich (i) Migration, (ii) Proliferation, (iii) CD34+ Erhalt, (iv) Liniendifferenzierung und (v) Apoptose untersucht (Leisten *et. al.*, 2012).

5.1.1. Einfluss der dreidimensionalen Ko-Kultivierung auf die CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Die endostale Region an den Knochen trabekeln ist als Nische der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark beschrieben. Hier residieren die hämatopoetischen Stammzellen in Nähe zu mesenchymalen Stromazellen und den Matrixproteinen des trabekulären Netzwerks. Hämatopoetische Stammzellen migrieren aktiv -z.B. nach einer Knochenmarkstransplantation- in einem als *Homing* bezeichneten Prozess in die endostale Region und adhären dort (Nilsson *et. al.*, 2001, Xie *et. al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden gegebenen CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Suspension auf das zuvor bereits beschriebene dreidimensionale Kollagensystem gegeben (Schneider *et al.* 2010a; Schneider *et. al.*, 2010b). Die CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen migrierten in die kollagene Matrix und siedelten sich im Fasernetzwerk an. Der Migrationsprozess wurde durch in die Kollagengele eingebettete mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks und der Nabelschnur deutlich unterstützt. Dieser positive Einfluss der Stromazellen zeigte sich auch in der Verteilung der hämatopoetischen Zellen im kollagenen Fasernetzwerk: In Assoziation zu den mesenchymalen Stromazellen konnten in den histologischen Untersuchungen und der

Elektronenmikroskopie in Gruppen gelagerte hämatopoetische Zellen beobachtet werden. Ohne Stromakomponente war die Verteilung der hämatopoetischen Zellen dagegen sporadisch. Die mesenchymalen Stromazellen schienen die Migration der hämatopoetischen Zellen also zu dirigieren. Mesenchymale Stromazellen spielen im Prozess des *Homing* von hämatopoetischen Stammzellen eine essentielle Rolle. Sie exprimieren das migrationsaktive Chemokin CXCL12 (SDF-1), während hämatopoetische Stammzellen den CXCL12-Rezeptor CXCR4 exprimieren. Hämatopoetische Stammzellen wandern entlang der CXCL12-CXCR4 Achse in die endostale Region des Knochenmarks und lokalisieren dort (Lapidot und Petit, 2002; Vagima *et. al.*, 2011). Diese geleitete Migration war auch in den dreidimensionalen Kollagengelen gegeben. Das Kultursystem erfüllte hiermit einen wichtigen Aspekt einer Knochenmarksnische *in vitro*.

Die zellulären und nicht-zellulären Komponenten des Knochenmarkmikromilieus sind essentiell, um die Stammzeleigenschaften aufrechtzuerhalten. Verlassen hämatopoetische Stammzellen die Knochenmarksnische, so ist dies verbunden mit einer fortschreitenden Differenzierung und einem Verlust des Selbsterneuerungspotential (Arai *et. al.*, 2004; Lo Celso und Scadden, 2011). Eine besondere Herausforderung an *in vitro* Systeme ist es deshalb die primitive Stammzellpopulation in Kultur aufrechtzuerhalten. Ein *Feederlayer* aus Stromazellen sowie der Zusatz von Zytokinen wurde in zahlreichen Studien beschrieben, um die *in vitro* Kultivierung von CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu verbessern (Kadereit *et. al.*, 2002; Walenda *et. al.*, 2011). Aber auch Extrazellulärmatrix-Proteine können zur Aufrechterhaltung des primitiven CD34+ Phänotyps *in vitro* beitragen. Vor allem für Kollagen I wurde hierbei eine essentielle Rolle beschrieben (Celebi *et. al.*, 2011). Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Kultivierungssystem kombinierte eine Stromakomponente mit einer kollagenen Matrix (<90 % Kollagen I). Die dreidimensionale Kultur im Kollagengel mit eingebetteten mesenchymalen Stromazellen führte zu einer erhöhten Proliferationsrate der CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Gegensatz zu einer konventionellen Kultivierung. Zudem wurde gleichzeitig auch der Erhalt des primitiven CD34+ CD38- Phänotyps der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen durch Kultivierung im Kollagengel mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks unterstützt. Der positive Effekt der mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks auf den Erhalt der primitiven CD34+ CD38- Subpopulation war auch in konventioneller zweidimensionaler Kultur zu beobachten, wurde im dreidimensionalen Kollagengel jedoch noch signifikant verstärkt. Die ECM-Proteine spielen neben den Stromazellen eine entscheidende Rolle beim *Homing* und der Retention der hämatopoetischen Stammzellen in

der endostalen Nische, indem die hämatopoetischen Stammzellen über Integrine an den ECM-Proteinen adhären können (Lam und Adams, 2010). Durch das Vorhandensein einer Stromakomponente und der kollagenen Matrix wurden zwei Hauptkomponenten der endostalen Nische *in vitro* wiedergegeben. Die synergistische Wirkung in Bezug auf den Erhalt der primitiven Subpopulation der CD34⁺ CD38⁻ Zellen wurde im Vergleich zur konventionellen Ko-Kultivierung (Fehlen der kollagenen Matrix) und zu Kollagengelen ohne Stromakomponente deutlich. Die Zusammenlagerung der CD34⁺ Zellen in Gruppen in der kollagenen Matrix mit Stromazellen spricht zudem für eine klonale Expansion der Zellen.

Da mesenchymale Stromazellen der Nabelschnur den physiologischen Gegenpart zu den CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut darstellen, wurden auch die Eigenschaften dieser Zellen als geeignete Stromakomponente untersucht. Es zeigte sich, dass mesenchymale Stromazellen der Nabelschnur zwar die Proliferationsrate der hämatopoetischen Zellen erhöhen, jedoch nicht geeignet sind den Erhalt des primitiven CD34⁺ CD38⁻ Phänotyps zu unterstützen. Die physiologische Herkunft der Stromazellen ist also entscheidend für die primitive Hämatopoese-unterstützenden Eigenschaften. Dies konnte auch bezüglich Stromazellen aus Fettgewebe gezeigt werden (Wagner *et. al.*, 2007).

Hämatopoetische Stammzellen zeichnen sich durch die Eigenschaft aus in alle Linien der Blutzellen differenzieren zu können. Die Ko-Kultur mit Stromazellen unterstützt die Liniendifferenzierung der CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in die myeloide Richtung (da Silva *et. al.*, 2005). Dieser Effekt konnte auch im dreidimensionalen System beobachtet werden. Eine vermehrte Anzahl Chloracetatesterase (CAE)⁺ Zellen war in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen zu beobachten. Auch die kollagene Matrix selber schien einen positiven Einfluss auf die Differenzierung in die myeloide Richtung zu haben, was deutlich wurde anhand der erhöhten Expression des Monozytenmarkers CD13. Für reifere myeloide Zellen wurde zudem die weitere Differenzierung in NK-Zellen beschrieben (Grzywacz *et. al.*, 2011). Solch eine fortschreitende Differenzierung wurde in den Kollagengelen im Vergleich zur konventionellen Kultivierung unterdrückt. Hämatopoetische Zellen in der kollagenen Matrix zeigten also eine beginnende myeloide Differenzierung, während die konventionelle Ko-Kultur ohne eine Kollagenmatrix zu einer weiteren Ausdifferenzierung der Zellen führte.

Das dreidimensionale Kultivierungssystem ermöglichte die Analyse von hämatopoetischen Zellen in zwei Kompartimenten: (i) In die Kollagengele migrierte Zellen in engem Kontakt zu den Stromazellen und der kollagenen Matrix und (ii) hämatopoetische Zellen in Suspension über den Kollagengelen. Während die Subpopulation der migrierten Zellen gekennzeichnet

war durch einen verstärkten Erhalt der primitiven CD34⁺ CD38⁻ hämatopoetischen Zellen, sowie eine beginnende myeloide Differenzierung, so zeigten Zellen in Suspension einen geringeren Erhalt der primitiven Subpopulation und eine weitere Differenzierung der hämatopoetischen Zellen. Die zwei Kompartimente der dreidimensionalen Kultivierungssysteme spiegelten so das Vorhandensein unterschiedlicher Nischen im Knochenmark wieder. Auch im Knochenmark sind unterschiedliche Subpopulationen von hämatopoetischen Zellen mit verschiedenen Mikromilieus assoziiert. Während die endostale Nische an den Knochen trabekeln ein Mikromilieu für quiescente hämatopoetische Stammzellen mit hohem Selbsterneuerungspotential darstellt, so finden sich aktive, zirkulierende und auch differenzierende hämatopoetische Zellen zentral im Knochenmark in Assoziation zu den Sinusoiden (Trumpp *et. al.*, 2010).

5.1.2 Einfluss osteogener Differenzierung im Dreidimensionalen Kultivierungssystem

Die Bedeutung von Osteoblasten als einzigartigem mesenchymalem Zelltyp des Knochens in der hämatopoetischen Nische wurde in zahlreichen Studien *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Taichmann und Emerson, 1994; Calvi *et. al.*, 2003; Visnjic *et. al.*, 2004). Auch von Osteoblasten produzierte Faktoren wie das Glycoprotein Osteopontin oder extrazelluläres Kalzium haben regulierende Eigenschaften in der Knochenmarksnische (Nilsson *et. al.*, 2005, Adams *et. al.*, 2006). In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen auch in den Kollagengelen möglich ist (Schneider *et. al.*, 2010a). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine osteogene Differenzierung der in das Kollagengel eingebetteten mesenchymalen Stromazellen erreicht werden, was zu einer Kalzifizierung der kollagenen Matrix führte. Der erhöhte Kalziummineralgehalt an den Knochen trabekeln im Knochenmark spielt eine bedeutende Rolle bei der Migration und dem Anwachsen/*Engraftment* der hämatopoetischen Stammzellen in der endostalen Nische. Hämatopoetische Stammzellen exprimieren einen Kalziumrezeptor und wandern entlang des Kalziumgradienten in die endostale Nische (Adams *et. al.*, 2006). In den kalzifizierten Kollagengelen waren Ansammlungen zahlreicher hämatopoetischer Zellen in Assoziation zu den Kalziumphosphat-Akkumulationen zu sehen.

Das Glycoprotein Osteopontin wird im Knochenmark an den Knochen trabekeln durch die Osteoblasten exprimiert und ist beteiligt bei der Regulation der Größe des Stammzellpools sowie dem Anwachsen/*Engraftment* der hämatopoetischen Stammzellen in der endostalen Nische (Nilsson *et. al.*, 2005). Durch osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen konnte die Osteopontinexpression in den Kollagengelen induziert werden.

Zudem exprimierten sowohl undifferenzierte als auch osteogen differenzierte mesenchymale Stromazellen die Matrixproteine Kollagen I und Fibronectin. Kollagen I, der Hauptbestandteil des Kollagengels, wird im Knochenmark vor allem im trabekulären Netzwerk exprimiert und Fibronectin zusätzlich auch in der perivaskulären Region. Wie auch Osteopontin spielen Kollagen I und Fibronectin eine wichtige Rolle beim *Homing* und *Engraftment* sowie der Regulation der hämatopoetischen Stammzellen in der Knochenmarksnische (Lam und Adams, 2010, Deutsch *et. al.*, 2010). In verschiedenen Arbeiten wurde der Einfluss verschiedener ECM-Proteine in der *in vitro* Kultur von CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen untersucht. So konnten Feng *et. al.* durch die Expansion von CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen auf Fibronectin beschichteten PET (Polyethylenterephthalat)- Scaffolds ein deutlich verbessertes Transplantationsergebnis in NOD/SCID-Mäusen erzielen (Feng *et. al.*, 2008). Celebi *et. al.* untersuchten die synergistische Wirkung der ECM-Proteine Kollagen I, Fibronectin, Laminin und Kollagen IV auf den Erhalt des primitiven CD34+ Phänotyp *in vitro*. Hierbei wurde der Vorteil einer Kombination aus allen vier ECM-Proteinen gegenüber der Verwendung der einzelnen ECM-Proteine deutlich (Celebi *et. al.*, 2011). Das in dieser Arbeit verwendete Kultivierungssystem bietet den Vorteil, dass die Haupt-Extrazellulärmatrixproteine durch die mesenchymalen Stromazellen direkt in das Kollagengel sezerniert werden. So kann in dem *in vitro* Modell das ECM-basierte Mikromilieu des Knochenmarks zumindest partiell wiedergegeben werden.

In verschiedenen Studien wurde der Einfluss der Osteoblasten auf die Regulation des Stammzell-Pools gezeigt (Calvi *et. al.*, 2003, Visnjic *et. al.*, 2004, Soki *et. al.*, 2013).

Die Ko-Kultur mit osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen führte in der vorliegenden Arbeit zwar zu einer gesteigerten Proliferationsrate der hämatopoetischen Zellen, jedoch auch zu einem geringeren Erhalt der primitiven CD34+ CD38- Subpopulation im Vergleich zur Ko-Kultur mit undifferenzierten mesenchymalen Stromazellen. Zum jetzigen Stand der Forschung geht man davon aus, dass vor allem frühe Osteoprogenitoren eine Rolle in der Regulation der Hämatopoese spielen. Chitteti *et. al.* untersuchten den hämatopoetischen Support von Osteoblasten in Abhängigkeit ihres Differenzierungsstatus. Hierzu wurde der Einfluss der Osteoblasten auf hämatopoetische Zellen nach unterschiedlich langer Vorkultivierung in Osteoblastenmedium untersucht. So konnte gezeigt werden, dass weniger reife Osteoblasten, die gekennzeichnet waren durch eine hohe RunX2-Expression und geringere alkalische Phosphatase-Expression, die Funktion der hämatopoetischen Stammzellen positiv beeinflussten im Gegensatz zu „reifen Osteoblasten“ nach längerer Vorkultivierung. „Reife Osteoblasten“ wurden in dieser Studie über die Zunahme an

Kalziumphosphatablagerungen über einen Kultivierungszeitraum von 3 Wochen charakterisiert. Zudem zeigten die „reifen Osteoblasten“ eine geringere RunX2-Expression. (Chitteti *et. al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden mesenchymale Stromazellen über einen Zeitraum von 3 Wochen mit osteogenem Induktionsmedium vorkultiviert. Es ist davon auszugehen, dass hier vor allem reife Osteoblasten vorlagen, wofür auch die deutlichen Kalziumphosphat-Ablagerungen sprechen. Dies erklärt den geringeren Erhalt an CD34+ CD38- hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen verglichen mit undifferenzierten mesenchymalen Stromazellen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit ein dreidimensionales *in vitro* Kultivierungssystem etabliert werden, welches essentielle Komponenten der Knochenmarksnische widerspiegelt: Durch das kollagene Fasernetzwerk war eine dreidimensionale Struktur gegeben. Als Stromakomponente eigneten sich mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks für den hämatopoetischen Support. Zudem wurden die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix des Knochenmarks durch die eingebetteten mesenchymalen Stromazellen in das Kollagengel sezerniert, sodass das ECM-basierte Mikromilieu der Knochenmarksnische wiedergegeben werden konnte. Das Kultivierungssystem spiegelte zudem mit seinen zwei Kompartimenten unterschiedliche Nischen des Knochenmarks wieder. Im Kollagengel waren die Charakteristika der endostalen Nische gegeben. Die Suspension über den Kollagengelen bot dagegen ein Mikromilieu für differenzierende hämatopoetische Zellen.

5.2. Die Bedeutung der Stammzellnische bei myeloproliferativen Neoplasien

5.2.1. Die Rolle des Stromas bei der ECM-Remodellierung

Im Krankheitsverlauf von myeloproliferativen Erkrankungen kommt es häufig zu signifikanten Veränderungen des Knochenmarkmikromilieus gekennzeichnet durch die Entstehung einer Myelofibrose, Osteosklerose und Neoangiogenese. Verschiedene Studien haben bereits Hinweise auf eine Beteiligung des Stromas an diesen pathophysiologischen Prozessen gegeben (Walkley *et. al.*, 2007, Tripodo *et. al.*, 2011, Schepers *et. al.*, 2013). Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen von mesenchymalen Stromazellen hinsichtlich der Extrazellulärmatrix-Remodellierung bei Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien zu untersuchen.

In zuvor beschriebenen Vorarbeiten der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das dreidimensionale kollagenbasierte Kultivierungssystem geeignet ist, das ECM-basierte

Mikromilieu des Knochenmarks wiederzuspiegeln. Somit war dieses System optimal, um Veränderungen der ECM-Remodellierung durch mesenchymale Stromazellen von Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen zu analysieren.

Die *in vitro* Versuche konnten deutliche Veränderungen in der Sezernierung von ECM-Proteinen durch mesenchymale Stromazellen von MPN-Patienten, insbesondere von ET (essentielle Thrombozythämie)-Patienten und CML (chronisch myeloische Leukämie)-Patienten zeigen. Einen ersten Hinweis auf eine veränderte Aktivität der mesenchymalen Stromazellen gab die verstärkte Kontraktion der Kollagengele. Sowohl in der Immunhistochemie als auch in der quantitativen *realtime* PCR zeigte sich eine verstärkte Sezernierung von ECM-Proteinen, insbesondere durch mesenchymale Stromazellen von ET- und CML-Patienten. Hierbei war vor allem die übermäßige Expression des ECM-Proteins Fibronectin auffallend. Die Kultur der mesenchymalen Stromazellen *in vitro* zeigte, dass eine veränderte Aktivität auch außerhalb der Knochenmarksnische zu beobachten war, das heißt ohne den weiteren Einfluss maligner hämatopoetischer Zellen. Auch eine am CML-Mausmodell durchgeführte Arbeit von Schepers *et. al.* beschreibt die Aufrechterhaltung einer veränderten Aktivität von Osteoblasten *ex vivo* (Schepers *et. al.*, 2013). Dies gibt einen Hinweis auf mögliche genetische Aberrationen in den mesenchymalen Stromazellen. Es ist zudem bekannt, dass eine Knochenmarksfibrose reversibel ist. Dies ist beschrieben bei MPN-Patienten mit ausgeprägter Knochenmarksfibrose, die eine Stammzelltransplantation erhalten (Hubbeling *et. al.*, 2012). Diese Beobachtungen legen eine epigenetische Veränderung des Stromas nahe.

Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche bezüglich der veränderten ECM-Remodellierung wurden auch an Knochenmarksstanzen der MPN-Patienten (korrespondierende Stenzen zu den Spendern der mesenchymalen Stromazellen) bestätigt. In der Immunhistochemie waren ausgeprägte Fibronectin-Akkumulationen im Knochenmark von MPN-Patienten erkennbar. Die Beobachtungen im dreidimensionalen Kultivierungssystem gaben die *in vivo* Situation wieder. Eine Hypothese für die pathophysiologischen Veränderungen des Knochenmarkmikromilieu bei myeloproliferativen Erkrankungen sind veränderte bidirektionale Interaktionen zwischen malignen hämatopoetischen Zellen und Stromazellen: Eine veränderte Produktion von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise TGF- β oder PDGF führt zur Aktivierung der Stromazellen. Dies führt wiederum zur Entstehung eines veränderten Mikromilieus, was die Aufrechterhaltung des malignen Klons begünstigt (Ciurea *et. al.*, 2007; Lataillade *et. al.*, 2008; Bedekovics *et. al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die vermehrten Fibronectin-Akkumulationen zum einen von

CD271+ Stromazellen ausgingen und die CD271+ Stromazellen zum anderen in Assoziation zu den dysplastischen Megakaryozyten im hämatopoetischen Mark von MPN-Patienten zu finden waren. Normalerweise sind CD271+ Stromazellen im Knochenmark in den typischen Stammzellnischen lokalisiert: Sie sind angelagert an die Knochentrabekel in der endostalen Region zu finden, sowie in der perivaskulären Region (Tormin *et. al.*, 2011). Die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass CD271+ Stromazellen von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren, die von dysplastischen Megakaryozyten sezerniert werden aus ihren typischen Nischen rekrutiert werden. Die mesenchymalen Stromazellen scheinen zudem aktiviert zu werden und vermehrt ECM-Proteine zu bilden. Durch die verstärkte Expression von ECM-Proteinen -durch die aus ihren Nischen rekrutierten Stromazellen- kommt es zur Akkumulation der ECM-Proteine, wie z.B. Fibronectin, im hämatopoetischen Mark. Dies wiederum trägt zu einem veränderten ECM-basierten Mikromilieu bei und letztendlich auch zur Fibrosierung des Knochenmarks durch die verstärkten Ablagerungen der extrazellulären Matrixproteine.

Auch für andere Erkrankungen wurde eine wechselseitige Interaktion zwischen den malignen Zellen und dem umgebenden Stroma beschrieben. So beschreiben Frassanito *et. al.* in einer aktuellen Arbeit Ansammlungen von Tumor-assoziierten Fibroblasten in Assoziation zu malignen Zellen beim multiplen Myelom. Die malignen Zellen scheinen hierbei eine supportive Nische für die Fibroblasten zu schaffen. Zugleich scheinen die Fibroblasten die multiplen Myelom-Zellen hinsichtlich Adhäsion, Proliferation und Apoptose-Resistenz zu beeinflussen (Frassanito *et. al.*, 2013). Auch beim triple-negativen Mammakarzinom (d.h. Tumoren ohne Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren und ohne Überexpression von HER2) wurden Tumor-assoziierte Fibroblasten beschrieben, die über eine veränderte Expression von CXCL12 zur Selektion von Tumorzellen beitragen, die migratorisches Potential im Sinne eines metastatischen Potentials haben und in diesem Fall die Knochenmarksmetastasierung begünstigen (Zhang *et. al.*, 2013). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse eine essentielle Rolle des Stromas bei der Aufrechterhaltung und Progression von malignen Erkrankungen vermuten.

Die Entwicklung einer Retikulinfibrose bei myeloproliferativen Neoplasien hat eine wichtige prognostische Relevanz für den Krankheitsverlauf der Patienten. Eine beginnende Fibrose geht mit einer schlechteren Prognose und einem höheren Risiko für die Entwicklung einer ausgeprägten Myelofibrose im weiteren Krankheitsverlauf einher (Thiele, J. und Kvasnicka, 2006; Buesche *et. al.*, 2007; Barbui *et. al.*, 2012). Bei den immunhistochemischen Analysen

eines in der vorliegenden Arbeit erstellten Tissue Microarray konnten bei einem erheblichen Anteil der MPN-Patienten mit diagnostizierter negativer Retikulin-Färbung (Myelofibrose Grad 0) vermehrte Fibronektin-Ablagerungen festgestellt werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden dass die vermehrten Fibronektin-Akkumulationen von CD271+ Stromazellen ausgingen, die außerhalb ihrer typischen Nischen in Assoziation zu den malignen hämatopoetischen Zellen lokalisiert waren. Die atypischen Fibronektin-Akkumulationen können also als Hinweis auf ein verändertes stromales und ECM-basiertes Mikromilieu gesehen werden. Möglicherweise ist Fibronektin damit von diagnostischer Bedeutung als früher Marker bevor eine Retikulinfibrose festgestellt werden kann. Zudem konnte bei ein Abgleich der klinischen Daten durch die Klinik für Onkologie, Hämatologie und Stammzelltransplantation (Medizinische Klinik IV) auch eine Korrelation des Fibronektingradings zu den Hämoglobinwerten der Patienten festgestellt werden. Der Hämoglobinwert ist bei MPN-Patienten von Bedeutung bei der Einteilung in Risikogruppen (Hubbeling *et. al.*, 2012). Vermehrte Fibronektinablagerungen korrelierten bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit niedrigeren Hämoglobinwerten. Dieser Zusammenhang gibt einen weiteren Hinweis auf die prognostische Bedeutung von Fibronektin für den Krankheitsverlauf.

5.2.2. Hämatopoese-unterstützende Funktion eines veränderten Extrazellulärmatrix-Mikromilieus

Charakteristisch für Erkrankungen wie die myeloproliferativen Neoplasien ist der Verlust der normalen Hämatopoese. Die Ursache hierfür ist noch weitgehend ungeklärt. Man geht jedoch davon aus, dass das veränderte nicht-hämatopoetische Mikromilieu und veränderte Zytokine/Wachstumsfaktoren zur Aufrechterhaltung bzw. zum Vorherrschen des malignen Klons und Verdrängung der normalen Hämatopoese beitragen (Lataillade *et. al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde das etablierte dreidimensionale Ko-Kultursystem verwendet, um die Hämatopoese-unterstützende Funktion von mesenchymalen Stromazellen isoliert von CML-Patienten zu analysieren. In vorangehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich das kollagenbasierte System als Modell der Knochenmarksnische *in vitro* eignet und die normale Hämatopoese unterstützt. In der Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten war dieser hämatopoetische Support jedoch eingeschränkt. Im Vergleich zu mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten unterstützten die mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten nur eingeschränkt den Erhalt der CD34+ CD38-Subpopulation. Dieser Effekt war nicht in Suspension über den Kollagengelen zu beobachten.

In Suspension über den Kollagengelen zeigte sich kein Unterschied zwischen mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten und Kontroll-Patienten im Support der primitiven Subpopulation CD34⁺ CD38⁻ hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen. In diesem Kompartiment standen die hämatopoetischen Zellen nicht in direktem Kontakt zur Stromakomponente. Unter anderem spielt auch der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen Stromazellen und hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen eine Rolle bei der Hämatopoese-unterstützenden Funktion des Stromas. So zeigt die Subpopulation der CD34⁺ bzw. CD34⁺ CD38⁻ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen eine verstärkte Adhäsion an mesenchymale Stromazellen (Wagner *et. al.*, 2008). Die Ergebnisse aus dem dreidimensionalen Kultivierungssystem lassen vermuten, dass möglicherweise Veränderungen im direkten Zellkontakt der Stromazellen zu den hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zum verringerten Support der primitiven CD34⁺ CD38⁻ Subpopulation führen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum veränderten hämatopoetischen Support durch mesenchymale Stromazellen von CML-Patienten stimmen mit den Beobachtungen aus einer kürzlich erschienenen Studie aus der Arbeitsgruppe um Passegue überein (Schepers *et. al.*, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten von transgenen Mäusen mit induzierbarer BCR-ABL-Expression eine eingeschränkte Fähigkeit zeigten die normale Hämatopoese zu unterstützen. Dies ließ sich zurückführen auf die veränderte Expression verschiedener für die Aufrechterhaltung der Hämatopoese essentieller Faktoren wie CXCL12, Angiopoitin-1, oder SCF. Leukämische Zellen blieben von den veränderten Bedingungen unbeeinflusst. Die Autoren interpretierten dies als eine sich selbst-selbstverstärkende leukämischen Nische. Das bedeutet, dass zum einen stromale Zellen durch die malignen hämatopoetischen Zellen aktiviert werden und zu einem veränderten Mikromilieu beitragen. Zum anderen zeigen die konditionierten Stromazellen wiederum eine verringerte Unterstützung der normalen Hämatopoese, während der Support der leukämischen Hämatopoese nicht negativ beeinflusst wird (Schepers *et. al.*, 2013).

Zhang *et. al.* beschrieben eine verminderte CXCL12 Expression durch Stromazellen von CML-Patienten. Als Ursache für eine reduzierte CXCL12-Expression wurde in dieser Studie eine erhöhte G-CSF-Produktion durch die leukämischen Zellen beschrieben (Zhang *et. al.*, 2012). Zum einen werden durch G-CSF proteolytische Enzyme wie Elastase aktiviert, die CXCL12 spalten, zum anderen scheint eine erhöhte G-CSF-Produktion aber auch einen direkten Einfluss auf die CXCL12-Expression auf mRNA-Ebene zu haben (Petit *et. al.*, 2002; Zhang *et. al.*, 2012). Dies verdeutlicht noch einmal die bidirektionalen Einflüsse in der

Knochenmarksnische. Gerade eine veränderte CXCL12/CXCR4-Achse scheint eine bedeutende Rolle in der leukämischen Nische zu spielen. CXCL12 ist ein essentieller Faktor für das *Homing* und *Engraftment* hämatopoetischer Stammzellen in der endostalen Nische und trägt zudem zur Aufrechterhaltung des Stammzellpools bei (Lataillade *et. al.*, 2000; Vagima *et. al.*, 2011; Greenbaum *et. al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit war neben einem verringerten Erhalt der CD34⁺ CD38⁻ Subpopulation in Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten eine sporadische Verteilung der Zellen in den Kollagengelen zu beobachten. In Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von Kontrollpatienten war dagegen eine Gruppenbildung der hämatopoetischen Zellen in Nähe der Stromazellen zu sehen. Dies spricht für einen fehlenden Einfluss der mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten auf das Migrationsverhalten der hämatopoetischen Zellen. Auch hier könnte eine veränderte Expression des migrationsaktiven Faktors CXCL12 eine Rolle spielen.

Zudem war eine verstärkte, fortschreitende Differenzierung der hämatopoetischen Zellen in der Präsenz der CML-MSK zu beobachten. Während in Kollagengelen mit mesenchymalen Stromazellen von Kontroll-Patienten eine beginnende myeloide Differenzierung zu beobachten war, so konnte in Ko-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen von CML-Patienten eine fortschreitende Differenzierung der myeloiden Zellen in CD56⁺ Zellen beobachtet werden. Diese vermehrte Differenzierung der hämatopoetischen Zellen spricht noch einmal für eine verringerte Unterstützung der primitiven Hämatopoese durch die Stromazellen der CML-Patienten. Die beschriebenen Veränderungen im hämatopoetischen Support durch Stromazellen von CML-Patienten geben so einen möglichen Erklärungsansatz für die Erschöpfung des normalen Stammzellpools. Wie von Schepers *et. al.* beschrieben werden die leukämischen hämatopoetischen Zellen nicht negativ durch die veränderten Bedingungen beeinflusst und hätten somit einen Wachstumsvorteil in der leukämischen Knochenmarksnische (Schepers *et. al.*, 2013). Eine mögliche Hypothese für den Pathomechanismus wäre also, dass die Stromazellen der CML-Patienten nicht nur aktiviert werden, vermehrt ECM-Proteine zu sezernieren, sondern auch dahingehend konditioniert sind, die normale Hämatopoese in verringertem Maße zu unterstützen. Die *in vitro* Versuche im dreidimensionalen kollagenbasierten Ko-Kultursystem legen die Vermutung nahe, dass hierbei möglicherweise auch Veränderungen im direkten Kontakt von mesenchymalen Stromazellen und hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen eine Rolle spielen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Situation *in vitro* beschreiben, welche die Gegebenheiten in der Knochenmarksnische lediglich in vereinfachter

Form widerspiegeln. Es ist daher notwendig den Mechanismus, der zur Verdrängung der normalen Hämatopoese und zum Vorherrschen des malignen hämatopoetischen Klon führt auch *in vivo* zu analysieren. Interessant wäre hierbei den Einfluss von mesenchymalen Stromazellen von MPN-Patienten auf die Hämatopoese im Mausmodell in einer ektopen Knochenmarksnische zu untersuchen, vor allem im Hinblick auf die Rekrutierung und das *Engraftment* hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen und die Unterstützung der primitiven Hämatopoese.

5.3. β -Tri-Kalziumphosphat-Scaffolds als ektipe Knochenmarksnische

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass myeloproliferative Erkrankungen mit Veränderungen des Stromalen und ECM-basierten Mikromilieus einhergehen. Um die zugrunde liegenden Mechanismen auch in der komplexen *in vivo* Situation weiter aufklären zu können, müssen Mausmodelle Einsatz finden. Die Transplantation und *Engraftment* von Stromazellen im Knochenmark des Empfängers ist jedoch ineffizient. So konnte festgestellt werden, dass die Stromazellen im Knochenmark von transplantierten Patienten immer vom Empfänger stammen. Auch im Mausmodell konnte kein effizientes *Engraftment* von transplantierten Stromazellen beobachtet werden. (Bartsch *et. al.*, 2009, Chen *et. al.*, 2012) Eine Alternative bieten jedoch Scaffold-basierte ektipe Knochenmarksnischen (Chen *et. al.*, 2012). Scaffolds, mit denen zum Beispiel die Stromazellen ins Tiermodell transplantiert werden können, müssen vor allem stabil und biokompatibel sein sowie die Bildung einer extramedullären Nische durch gute Gewebsintegrität und Vaskularisierung unterstützen. Zudem sollten die Scaffolds den anatomischen Gegebenheiten des spongiösen Knochens möglichst nahe kommen, um die charakteristische dreidimensionale Struktur der Knochenmarksnische widerzugeben (Lee *et. al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden dreidimensionale, poröse Scaffolds aus β -Tri-Kalziumphosphat (β -TCP) eingesetzt, um die trabekuläre Struktur des Knochens nachzuahmen. Das biokompatible β -TCP wurde in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien vor allem als Knochenersatzmaterial beschrieben (Cao *et. al.*, 2010; Kondo *et. al.*, 2005). Die β -TCP-Scaffolds mit definierten Porengrößen und Kanälen wurden in Zusammenarbeit mit Ingenieuren entwickelt und sollten durch ihre Struktur die Spongiosa widerspiegeln. Die Porengröße in der Spongiosa beträgt durchschnittlich ca. 1mm (Keaveny *et. al.*, 2001). Für Scaffolds zur Knochenbildung werden Porendurchmesser $<300\mu\text{m}$ empfohlen. Bei dieser Porengröße wird die Knochenformierung und Vaskularisierung unterstützt (Karageorgiou und Kaplan, 2005). Die in dieser Arbeit verwendeten Porengrößen von $500\mu\text{m}$, $800\mu\text{m}$ und 1mm

(Kavernen: 1mm Poren verbunden mit 500µm Kanälen) lagen im Bereich der empfohlenen Porengröße für Scaffolds und der tatsächlichen Porengröße der Spongiosa. Die β -TCP-Scaffolds konnten zudem mit dem zuvor schon verwendeten Kollagengel kombiniert werden, sodass neben der stabilen und formgebenden Kalziumphosphatkomponente auch eine Matrixkomponente gegeben war.

Die *in vitro*-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks bestätigte die gute Biokompatibilität der β -TCP-Scaffolds mit und ohne zusätzliche Kollagenkomponente. Ein dichtes Wachstum der Stromazellen -wie es in der vorliegenden Arbeit in den Poren der Scaffolds zu sehen war- wurde zudem als förderlich für die osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen beschrieben (Karageorgiou und Kaplan, 2005). In der quantitativen *realtime* PCR zeigte sich eine spontane Heraufregulation der osteogenen Marker BMP2 und RunX2 bei Kultivierung der mesenchymalen Stromazellen auf β -TCP-Scaffolds, vor allem bei Porengrößen von 500µm und 800µm. Aufgrund spenderabhängiger Schwankungen, die zu hohen Standardabweichungen führten, waren die *realtime* PCR Ergebnisse nicht signifikant. Auch konnte eine spontane osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen auf den β -TCP-Scaffolds funktionell durch erhöhte Phosphatwerte aufgrund der alkalischen Phosphatase-Aktivität nicht nachgewiesen werden. Somit kann nur von einer allenfalls beginnenden osteogenen Differenzierung auf Expressionsebene gesprochen werden. Im Hinblick auf die Verwendung der β -TCP-Scaffolds als artifizielle Knochenmarksnische könnte die erhöhte Expression des frühen osteogenen Markers RunX2 jedoch einen positiven Effekt haben, da gerade frühe RunX2 exprimierende Osteoprogenitoren eine Rolle in der Knochenmarksnische zu spielen scheinen (Chitteti *et al.*, 2010). Bei den durch osteogenes Induktionsmedium differenzierten mesenchymalen Stromazellen im Kollagengel war auch funktionell eine osteogene Differenzierung nachweisbar. Die im Vergleich zu den mesenchymalen Stromazellen auf den β -TCP-Scaffolds niedrigeren Expressionswerte für die frühen osteogenen Marker BMP2 und RunX2 lassen sich durch die schon weiter fortgeschrittene Differenzierung nach 3 Wochen Kultur mit osteogenem Induktionsmedium erklären.

Die im Knochenmark essentiellen Matrixproteine Kollagen I, Fibronectin und Osteopontin wurden von mesenchymalen Stromazellen auf β -TCP verstärkt exprimiert. Die Expression dieser ECM-Proteine wird auch im Rahmen der osteogenen Differenzierung durch den Transkriptionsfaktor RunX2 reguliert (Shui *et al.*, 2003; Komori 2010). Die gesteigerte Expression von Kollagen I, Fibronectin und Osteopontin lässt sich demnach in Zusammenhang mit der gesteigerten Expression des Transkriptionsfaktors RunX2 in

mesenchymalen Stromazellen auf β -TCP-Scaffolds sehen. Auch bezüglich der ECM-Protein-Expression schienen die Poren mit 500 μ m und 800 μ m vorteilhaft gegenüber der Kavernenstruktur. Für unterschiedliche Porengeometrie wurde der Einfluss auf beispielsweise das Zellwachstum und die Differenzierung sowie Vaskularisierung und Knochenformierung beschrieben (Jin *et. al.*, 2000). Dieser Effekt wurde in den Expressionsanalysen für die osteogenen Marker und die ECM-Proteine im Vergleich von Kavernenstruktur und Kanalstruktur deutlich. Die geraden Kanäle ohne Ausbuchtungen an den Verbindungspunkten schienen hierbei vorteilhaft und wurden somit für die darauf folgenden *in vivo* Versuche gewählt.

Durch subkutane Transplantation in C57Bl/6-Mäuse konnte die Eignung der β -TCP-Scaffolds als ektope Knochenmarksnische gezeigt werden. In den transplantierten β -TCP-Scaffolds waren die essentiellen Bestandteile einer Knochenmarksnische gegeben. An die β -TCP-Oberfläche angelagert fanden sich mesenchymale Stromazellen sowie Osteoblasten und Osteoklasten. Wie Mansour *et. al.* zeigen konnten sind auch Osteoklasten essentiell für die Nischenbildung. In *oc/oc* Mäusen führt die fehlende Osteoklasten-Aktivität zu einem hypozellulären Knochenmark mit dramatischer Reduktion der hämatopoetischen Stammzellen. Damit einhergehen war die Osteoblastenbildung weitgehend gestört (Mansour *et. al.*, 2012). Osteoblasten und Osteoklasten sind weiterhin beteiligt an den Knochenremodellierungsprozessen, die zu den erhöhten Kalziumphosphatwerten in der endostalen Nische führen. Hämatopoetische Stammzellen exprimieren einen Kalziumrezeptor und migrieren entlang des Kalziumgradienten in die endostale Nische (Adams *et. al.*, 2006). In der histologischen Aufarbeitung der Scaffolds nach Explantation konnte jedoch mikroskopisch noch kein Abbau der Kalziumphosphatkomponente festgestellt werden.

Als essentieller Faktor der Nische wurde CXCL12 (SDF-1) in den Arbeiten der vorliegenden Arbeit vor allem von den an der Kalziumphosphatoberfläche angelagerten Stromazellen exprimiert. In Nähe zu den an die Kalziumphosphatoberfläche angelagerten Stromazellen fanden sich in Gruppen gelagert hämatopoetische Zellen, die sich in Bereichen mit erhöhter CXCL12-Expression zu sammeln schienen. Die Gegebenheiten in Nähe der Kalziumoberfläche ähnelten somit der endostalen Region des Knochenmarks (Ehninger und Trumpp, 2011).

Die β -TCP-Scaffolds waren als weitere wichtige Voraussetzung für die Nischenbildung gut vaskularisiert. Die für den Endothelzellmarker CD31 positiven Gefäße waren vor allem zentral in den Poren der Scaffolds lokalisiert. Teilweise konnte an den Gefäßen die Expression von CXCL12 nachgewiesen werden. Durch die ausgeprägte Vaskularisierung

konnten hämatopoetische Zellen aus der Zirkulation in die Scaffolds rekrutiert werden. Die zentrale Region in den Poren spiegelte hierbei die perivaskuläre Nische wieder. Die perivaskuläre und endostale Nische im Knochenmark stehen in engem Kontakt und bilden ein dynamisches System, in dem hämatopoetische Zellen aus der endostalen Region mobilisiert werden und in die Zirkulation eintreten und umgekehrt auch aus der Zirkulation in die endostale Region einwandern (*Homing*) (Wright *et. al.*, 2001; Lapidot und Petit, 2002). Beide Nischen waren in den β -TCP-Scaffolds gegeben.

Vereinzelt fanden sich auch CD31 positive Zellen in Nähe der Grenzfläche von Gewebe und Kalziumphosphat. Dies kann möglicherweise als Reaktion auf eine chronische Entzündungsreaktion gesehen werden (Pober und Sessa, 2007).

In den β -TCP-Scaffolds fanden sich hämatopoetische Zellen der myeloiden und lymphoiden Reihe sowie erythroide Progenitoren. Der erhöhte Anteil an T-Zellen in den explantierten β -TCP-Scaffolds kann durch eine lokale Fremdreaktion an den transplantierten Scaffolds erklärt werden. Da sich jedoch keine Fremdkörperriesenzellen oder eine floride Entzündung fanden, ist die Reaktion als gering einzuschätzen. Die Lymphozyten könnten daher auch einfach Ausdruck des Einwachsens und einer lokalen Reizung nach chirurgischem Eingriff sein.

Eine vollständige Hämatopoese ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen konnte in den β -TCP-Scaffolds nach 4 und 8 Wochen Transplantation nicht nachgewiesen werden. Murine hämatopoetische Stammzellen sind in der Subpopulation der LSK (lineage- Sca-1+ ckit+)-Zellen angereichert (Passegue *et. al.*, 2003). Diese Population macht lediglich 1-2% des Gesamtknochenmarks aus. Da die Gesamtzellzahl in den transplantierten β -TCP-Scaffolds deutlich geringer ist, konnten die LSK-Zellen möglicherweise in der durchflusszytometrischen Analyse nicht erfasst werden. Da mit den erythroiden Progenitoren und Monozyten auch Verläuferzellen (insbesondere myeloide Progenitoren) in den β -TCP-Scaffolds vorhanden waren sowie Zellen aller Linien, kann dennoch von extramedullärer Hämatopoese in den Scaffolds gesprochen werden.

Ein Aspekt bei der Etablierung einer ektopen Knochenmarksnische im Mausmodell war außerdem der Vergleich der unterschiedlichen Porengrößen 500 μ m und 800 μ m und der zusätzlichen Verwendung einer Matrixkomponente. Hier konnten in dieser Arbeit entgegen anderer Studien keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Vaskularisierung, Gewebsinteraktion und Zellzusammensetzung beobachtet werden. In verschiedenen Arbeiten konnten Unterschiede in der Vaskularisierung oder auch dem Zellwachstum zwischen Porendurchmessern kleiner und größer 300 μ m beobachtet werden (Lee *et. al.*, 2012, Karageorgiou und Kaplan, 2005). In einem Bereich von Porendurchmessern zwischen 500 μ m

und 800µm schienen diese Unterschiede nicht zu bestehen. Die zusätzliche Verwendung einer Matrixkomponente war bei den β -TCP-Scaffolds nicht notwendig. Tendenziell zeigten Scaffolds ohne Matrixkomponente sogar eine ausgeprägtere Vaskularisierung. Möglicherweise wird die Angiogenese durch freie Poren begünstigt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von β -TCP-Scaffolds als strukturgebender Komponente mit Ähnlichkeit zum spongiösen Knochen ein Modell für eine ektope Knochenmarksnische entwickelt werden, das zukünftig ermöglicht, Veränderungen des Stromas bei myeloproliferativen Neoplasien auch *in vivo* zu analysieren.

6. Zusammenfassung

Das Mikromilieu des Knochenmarks spielt eine essentielle Rolle in der Regulation Hämatopoese und Alterationen scheinen bei der Pathogenese von hämatologischen Erkrankungen entscheidend zu sein. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Interaktion von mesenchymalen Stromazellen -als einer Hauptkomponente der hämatopoetischen Nische- mit hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (i) *in vitro* in einem kollagenbasierten System und (ii) *in vivo* in einer extramedullären Nische nach subkutaner Transplantation der kollagenen Matrix in Kombination mit β -Tri-Kalziumphosphat-Scaffolds mit definierter Porengröße. Das *in vitro* System wurde zudem angewendet, um die Rolle der mesenchymalen Stromazellen an der extensiven Matrixremodellierung bei der Entstehung der Myelofibrose in MPN-Patienten zu untersuchen.

Das kollagen-basierte Ko-Kultursystem für mesenchymale Stromazellen und hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen zur vereinfachten Nachahmung der hämatopoetischen Nische gab das ECM-basierte Mikromilieu des Knochenmarks durch Expression der essentiellen Matrixproteine Kollagen I, Fibronectin und Osteopontin wieder und unterstützte den Erhalt sowie die myeloide Differenzierung der primitiven CD34⁺ CD38⁻ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen. Mesenchymale Stromazellen von MPN-Patienten zeigten eine vermehrte Produktion von Extrazellulärmatrix-Proteinen, vor allem von Fibronectin, und induzierten eine signifikante Kontraktion der Kollagengele als Ausdruck einer vermehrten Matrix-Remodellierung. In korrespondierenden Knochenmarksstanzen der MPN-Patienten konnte korrelierend dazu eine vermehrte Fibronectin-Expression im hämatopoetischen Mark festgestellt werden, obwohl keine Myelofibrose vorlag. Die atypischen Fibronectinablagerungen gingen von CD271⁺ Stromazellen aus, die in Assoziation zu pathognomonischen dysplastischen Megakaryozyten lokalisiert waren. Mesenchymale Stromazellen scheinen somit aktiv an der überschießenden Matrixremodellierung im Rahmen der Myelofibrose bei MPN beteiligt zu sein. Um die Bedeutung von Alterationen der Knochenmarksnische auch in der komplexen *in vivo* Situation analysieren zu können, und da die Transplantation von Stromazellen ineffizient bzw. unmöglich ist, wurden β -Tri-Kalziumphosphat-Scaffolds subkutan -i.S. einer ektopen Knochenmarksnische- in C57BL/6 Mäuse transplantiert. Nach Explantation und histologischer sowie durchflusszytometrischer Analyse, wiesen die Scaffolds eine extramedulläre Hämatopoese mit myeloiden und erythroiden Progenitorzellen auf. Das ektopy Knochenmarkssystem stellt somit ein optimales System zur Dissektion von hämatopoetischen-mesenchymalen Interaktionen dar.

7. Abstract

The bone marrow microenvironment plays an essential role in regulating hematopoiesis and any disturbance in the stem cell niche seems to be of particular importance in the pathogenesis of hematological disease. This study analyzed the interaction of mesenchymal stromal cells –a main component of the hematopoietic niche- and hematopoietic stem and progenitor cells (i) in a collagen-based culture system *in vitro* and (ii) *in vivo* in an extramedullary niche by subcutaneous transplantation of the collagenous matrix in combination with beta-tri-calciumphosphate-scaffolds with defined pore sizes. In addition, the *in vitro* system was applied to evaluate the role of mesenchymal stromal cells in the extensive matrixremodelling in the context of myelofibrosis in patients with myeloproliferative neoplasms (MPN).

The collagen-based co-culture system for mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem and progenitor cells resembled the extracellular matrix (ECM)-based microenvironment of the bone marrow by expression of the essential matrix proteins collagen I, fibronectin and osteopontin and supported the maintenance of primitive CD34⁺ CD38⁻ hematopoietic stem and progenitor cells as well as their myeloid differentiation. Stromal cells from MPN-patients showed increased production of extracellular matrix proteins, e.g. fibronectin, and induced significant contraction of the collagengels, indicating excessive matrix remodelling. Bone marrow biopsies from correlating MPN-patients confirmed increased fibronectin expression in the hematopoietic marrow, even in the absence of myelofibrosis (reticulin fibrosis). The atypical fibronectin deposits were found in close association to pathognomonic dysplastic megakaryocytes and CD271⁺ mesenchymal stromal cells even stained double-positive for fibronectin. This observation leads to the conclusion that, mesenchymal stromal cells actively participate in excessive matrixremodelling in the contrext of myelofibrosis in MPN-patients. To elucidate the relevance of alterations in the bone marrow microenvironment in the complex *in vivo* situation, beta-tri-calciumphosphate scaffolds in combination with a collagen-based matrix were transplanted subcutaneously in C57BL/6 mice -in terms of an ectopic bone marrow niche. After explantation, scaffolds revealed extramedullary hematopoiesis with myeloid and erythroid progenitors by flow cytometry and histological analysis. Therefore, the ectopic bone marrow system represents an optimal platform for dissecting hematopoietic-mesenchymal interactions.

8. Literaturverzeichnis

Abdel-Wahab O, Pardanani A, Bernard O, Finazzi G, Crispino JD, Gisslinger H, Kralovics R, Odenike O, Bhalla K, Gupta V, Barosi G, Gotlib J, Guglielmelli P, Kiladjian J, Noel P, Cazzola M, Vannucchi AM, Hoffman R, Barbui T, Thiele J, Van Etten RA, Mughal TI, Tefferi A. Unraveling the genetic underpinnings of myeloproliferative neoplasms and understanding their effect on disease course and response to therapy: Proceedings from the 6th International Post-ASH Symposium. *Am J Hematol.* 2012; 87(5): 562–568.

Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, Kos CH, Pollak MR, Brown EM, Scadden DT. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature.* 2006;439(7076):599-603.

Adams GB und Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol.* 2006;7(4):333-7.

Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 2004;118(2):149-61.

Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2007. 110(7):2764-2767.

Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Randi ML, Bertozzi I, Marino F, Vannucchi AM, Pieri L, Rotunno G, Gisslinger H, Gisslinger B, Müllauer L, Finazzi G, Carobbio A, Gianatti A, Ruggeri M, Nichele I, D'Amore E, Rambaldi A, Tefferi A. Initial bone marrow reticulin fibrosis in polycythemia vera exerts an impact on clinical outcome. *Blood.* 2012;119(10):2239-41.

Bartsch K, Al-Ali H, Reinhardt A, et al. Mesenchymal stem cells remain host-derived independent of the source of the stem-cell graft and conditioning regimen used. *Transplantation.* 2009;87(2): 217-221.

Bedekovics J, Kiss A, Beke L, Károlyi K, Méhes G. Platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR β) expression is limited to activated stromal cells in the bone marrow and shows a strong correlation with the grade of myelofibrosis. *Virchows Arch.* 2013;463(1):57-65.

Bianco P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood.* 2011;117(20):5281-8.

Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, Wang CY. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* 2013;19(1):35-42.

- Blau O, Baldus CD, Hofmann WK, Thiel G, Nolte F, Burmeister T, Türkmen S, Benlasfer O, Schümann E, Sindram A, Molkentin M, Mundlos S, Keilholz U, Thiel E, Blau IW. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood*. 2011;118(20):5583-92.
- Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997;90(4):1345-1364.
- Buesche G, Ganser A, Schlegelberger B, von Neuhoff N, Gadzicki D, Hecker H, Bock O, Frye B, Kreipe H. Marrow fibrosis and its relevance during imatinib treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2007;21(12):2420-7.
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT: Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-6.
- Cao H, Kuboyama N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering. *Bone*. 2010;46(2):386-95.
- Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991;9(5), 641–650.
- Carrancio S, Romo C, Ramos T, Lopez-Holgado N, Muntion S, Prins HJ, Martens AC, Briñón JG, San Miguel JF, Del Cañizo MC, Sanchez-Guijo F. Effects of MSC coadministration and route of delivery on cord blood hematopoietic stem cell engraftment. *Cell Transplant*. 2013;22(7):1171-83.
- Celebi B, Mantovani D, Pineault N. Effects of extracellular matrix proteins on the growth of haematopoietic progenitor cells. *Biomed Mater*. 2011;6(5):055011.
- Chen E, Beer PA, Godfrey AL, Ortmann CA, Li J, Costa-Pereira AP, Ingle CE, Dermitzakis ET, Campbell PJ, Green AR. Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. *Cancer Cell*. 2010; 18(5):524–535.
- Chen Y, Jacamo R, Shi YX, Wang RY, Battula VL, Konoplev S, Strunk D, Hofmann NA, Reinisch A, Konopleva M, Andreeff M. Human extramedullary bone marrow in mice: a novel in vivo model of genetically controlled hematopoietic microenvironment. *Blood*. 2012;119(21):4971-80.
- Chitteti BR, Cheng YH, Streicher DA, Rodriguez-Rodriguez S, Carlesso N, Srouf EF, Kacena MA. Osteoblast lineage cells expressing high levels of Runx2 enhance hematopoietic progenitor cell proliferation and function. *J Cell Biochem*. 2010;111(2):284-94.
- Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N, Tanaka M, Merad M, Frenette PS. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*. 2011;208(2):261–271.
- Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, Ishii T, Zhao Y, Hu W, Bruno E, Barosi G, Xu M, Hoffman R: Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007; 110(3):986-993

Cook MM, Futrega K, Osiecki M, Kabiri M, Kul B, Rice A, Atkinson K, Brooke G, Doran M. Micromarrows--three-dimensional coculture of hematopoietic stem cells and mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(5):319-28.

da Silva, CL, Goncalves R, Crapnell KB, Cabral JM, Zanjani ED, Meida-Porada G. A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp. Hematol*. 2005; 33(7):828-835.

de Barros AP, Takiya CM, Garzoni LR, Leal-Ferreira ML, Dutra HS, Chiarini LB, Meirelles MN, Borojevic R, Rossi MI. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model. *PLoS One*. 2010;5(2):e9093.

Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, Bennett E, Reid R, Manning D, Xue A, Montag AG, Luu HH, Haydon RC, He TC. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci*. 2008;13:2001-21.

Deutsch V, Hubel E, Kay S, Ohayon T, Katz BZ, Many A, Zander A, Naparstek E, Grisaru D. Mimicking the haematopoietic niche microenvironment provides a novel strategy for expansion of haematopoietic and megakaryocyte-progenitor cells from cord blood. *Br J Haematol*. 2010;149(1):137-49.

Dexter, T.M. Allen, T.D. Lajtha, L.G. Schofield, R. Lord, B.I. Stimulation of differentiation and proliferation of haemopoietic cells in vitro. *J Cell Physiol*. 1973; 82(3): 461–473

Dexter, T.M. Allen, T.D. Lajtha, L.G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977; 91(3): 335–344.

Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 2012;481(7382):457-62.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

Dominici M, Rasini V, Bussolari R, Chen X, Hofmann TJ, Spano C, Bernabei D, Veronesi E, Bertoni F, Paolucci P, Conte P, Horwitz EM. Restoration and reversible expansion of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation. *Blood*. 2009;114(11):2333–2343.

Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*. 2008;112(13):4808-17.

Dzierzak E. Embryonic beginnings of definitive hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;872:256-262; discussion 262-254

Ehninger A, Trumpp A: The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J. Exp. Med*. 2011;208(3):421-428

- Erices, A., Conget, P., and Minguell, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 2000;109(1), 235–242.
- Feng Q, Chai C, Jiang XS, Leong KW, Mao HQ. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin. *J Biomed Mater Res A.* 2006;78(4):781-91.
- Ferreira MS, Jahnke-Dechent W, Labude N, Bovi M, Hieronymus T, Zenke M, Schneider RK, Neuss S. Cord blood-hematopoietic stem cell expansion in 3D fibrin scaffolds with stromal support. *Biomaterials.* 2012;33(29):6987-97.
- Frassanito MA, Rao L, Moschetta M, Ria R, Di Marzo L, De Luisi A, Racanelli V, Catacchio I, Berardi S, Basile A, Menu E, Ruggieri S, Nico B, Ribatti D, Fumarulo R, Dammacco F, Vanderkerken K, Vacca A. Bone marrow fibroblasts parallel multiple myeloma progression in patients and mice: in vitro and in vivo studies. *Leukemia.* 2013 [Epub ahead of print]
- Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:285-316.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI and Frolova GP. "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." *Transplantation.* 1968;6(2): 230-47.
- Grassinger J, Haylock DN, Storan MJ, Haines GO, Williams B, Whitty GA, Vinson AR, Be CL, Li S, Sørensen ES, Tam PP, Denhardt DT, Sheppard D, Choong PF, Nilsson SK. Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with alpha9beta1 and alpha4beta1 integrins. *Blood.* 2009;114(1):49-59.
- Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, Nagasawa T, Link DC. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature.* 2013;495(7440):227-30.
- Groen RW, Noort WA, Raymakers RA, Prins HJ, Aalders L, Hofhuis FM, Moerer P, van Velzen JF, Bloem AC, van Kessel B, Rozemuller H, van Binsbergen E, Buijs A, Yuan H, de Bruijn JD, de Weers M, Parren PW, Schuringa JJ, Lokhorst HM, Mutis T, Martens AC. Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood.* 2012;120(3): e9-e16.
- Grzywacz B, Kataria N, Kataria N, Blazar BR, Miller JS, Verneris MR. Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood.* 2011;117(13): 3548-58.
- Giuliani N, Lisignoli G, Magnani M, Racano C, Bolzoni M, Dalla Palma B, Spolzino A, Manfredini C, Abati C, Toscani D, Facchini A, Aversa F. New insights into osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and their potential clinical applications for bone regeneration in pediatric orthopaedics. *Stem Cells Int.* 2013;2013:312501.

- Haylock D. N., Williams B, Johnston H. M., Liu M. C. P., Rutherford K. E., Whitty G. A., Simmons P. J., Van Bertoncello I., Nilsson S. K. Hemopoietic stem cells with higher hemopoietic potential reside at the bone marrow endosteum. *Stem Cells* 2007;25(4):1062–1069
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M; European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007;370(9584):342-50.
- Hogatt, Jonathan, Scadden, David T., The stem cell niche: tissue physiology at a single cell level; *J Clin Invest*. 2012;122(9):3029–3034
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(13):8932-8937.
- Hubbeling HG, Frank DM, Hexner EO. Myelofibrosis 2012: it's complicated. *Ther Adv Hematol*. 2012;3(3):131-46.
- Jin QM, Takita H, Kohgo T, Atsumi K, Itoh H, Kuboki Y. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(4):491-9.
- Kacena MA, Shivdasani RA, Wilson K, Xi Y, Troiano N, Nazarian A, Gundberg CM, Boussein ML, Lorenzo JA, Horowitz MC. Megakaryocyte-osteoblast interaction revealed in mice deficient in transcription factors GATA-1 and NF-E2. *J Bone Miner Res*. 2004;19(4):652–660
- Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth SE, Koc ON, Kozik MM, Szekely E, Daum-Woods K, Goetchius GW, Fu P, Welniak LA, Murphy WJ, Laughlin MJ Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/ CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. *Stem Cells*. 2002;20(6):573–582.
- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474-91.
- Keaveny TM, Morgan EF, Niebur GL, Yeh OC. Biomechanics of trabecular bone. *Annu Rev Biomed Eng*. 2001;3:307–33.
- Kiel, M.J., O.H. Yilmaz, T. Iwashita, O.H. Yilmaz, C. Terhorst, and S.J. Morrison. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109–1121.
- Kiel, Mark J., Radice, Glenn L., Morrison, Sean J.; Lack of Evidence that Hematopoietic Stem Cells Depend on N-Cadherin-Mediated Adhesion to Osteoblasts for Their Maintenance, *Cell Stem Cell* 2007; 1(2):204-17.
- Kim MJ, Shin KS, Jeon JH, Lee DR, Shim SH, Kim JK, Cha DH, Yoon TK, Kim GJ. Human chorionic-plate-derived mesenchymal stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a comparative analysis of their potential as placenta-derived stem cells. *Cell Tissue Res*. 2011;346(1):53-64.

- Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):189-95.
- Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Kudo N, Inoue H, Irie H, Endo N. Bone formation and resorption of highly purified beta-tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. *Biomaterials.* 2005;26(28):5600-8.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005;352(17):1779-90.
- Kramann R, Couson SK, Neuss S, Kunter U, Bovi M, Bornemann J, Knüchel R, Jahnen-Dechent W, Floege J, Schneider RK. Exposure to uremic serum induces a procalcific phenotype in human mesenchymal stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(9):e45-54.
- Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol.* 2007;139(3):351-62.
- Lam BS, Adams GB. Hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow stem cell niche. *Int J Lab Hematol.* 2010;32(6 Pt 2):551-8.
- Lane SW, Scadden DT and Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood.* 2009; 114(6):1150-7.
- 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(9):973-81.
- Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood.* 2005;106(6):1901-10.
- Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, Le Bousse-Kerdilès MC. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood.* 2000;95(3):756-68.
- Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, Uzan G, Jasmin C, Martyré MC, Le Bousse-Kerdilès MC; Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood.* 2008;112(8):3026-35.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363:1439-1441.
- Lee J, Li M, Milwid J, Dunham J, Vinegoni C, Gorbato R, Iwamoto Y, Wang F, Shen K, Hatfield K, Enger M, Shafiee S, McCormack E, Ebert BL, Weissleder R, Yarmush ML, Parekkadan B. Implantable microenvironments to attract hematopoietic stem/cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(48):19638-43.

- Leisten I, Kramann R, Ventura Ferreira MS, Bovi M, Neuss S, Ziegler P, Wagner W, Knüchel R, Schneider RK. 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials*. 2012;33(6):1736-47.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-397.
- Lo Celso C, H.E. Fleming, J.W. Wu, C.X. Zhao, S. Miake-Lye, J. Fujisaki, D. Côté, D.W. Rowe, C.P. Lin, and D.T. Scadden. Live animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*. 2009; 457(7225):92-96.
- Lo Celso C, Scadden DT. The haematopoietic stem cell niche at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 21):3529-35.
- Lord B.I. The architecture of bone marrow cell populations. *International Journal of Cell Cloning*. 1990; 8(5):317-331.
- Maes C, Goossens S, Bartunkova S, Drogat B, Coenegrachts L, Stockmans I, Moermans K, Nyabi O, Haigh K, Naessens M, Haenebalcke L, Tuckermann JP, Tjwa M, Carmeliet P, Mandic V, David JP, Behrens A, Nagy A, Carmeliet G, Haigh JJ. Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. *EMBO J*. 2010;29(2):424-41.
- Mahon FX, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousselot P; Intergroupe Français des Leucémies Myéloïdes Chroniques. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1029-35.
- Mansour A, Abou-Ezzi G, Sitnicka E, Jacobsen SE, Wakkach A, Blin-Wakkach C. Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *J Exp Med*. 2012;209(3):537-49.
- Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*. 1996 Sep 20;86(6):897-906.
- Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010a;466(7308):829-34.
- Méndez-Ferrer S, Battista M, Frenette PS. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci*. 2010b;1192:139-144.

- Milosevic JD, Kralovics R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int J Hematol.* 2013; 97(2):183–197
- Möhle R, Bautz F, Raffi S, Moore MAS, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34⁺ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood.* 1998;91(12):4523-30.
- Mughal TI, Goldman JM. Molecularly targeted treatment of chronic myeloid leukemia: beyond the imatinib era. *Frontiers in Bioscience.* 2006;11, 209-220.
- Mullally A, Lane SW, Ball B, Megerdichian C, Okabe R, Al-Shahrour F, Paktinat M, Haydu JE, Housman E, Lord AM, Wernig G, Kharas MG, Mercher T, Kutok JL, Gilliland DG, Ebert BL. Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. *Cancer Cell.* 2010;17(6):584-96.
- Nadri S, Soleimani M. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. *Cytotherapy.* 2007; 9(8),729–737.
- Neuss S, Becher E, Wöltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells.* 2004;22(3):405-14.
- Neuss S, Stainforth R, Salber J, Schenck P, Bovi M, Knüchel R, Perez-Bouza A. Long-term survival and bipotent terminal differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC) in combination with a commercially available three-dimensional collagen scaffold; *Cell Transplant.* 2008;17(8):977-86.
- Nilsson SK, Debatis ME, Dooner MS, Madri JA, Quesenberry PJ, Becker PS. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1998; 46(3): 371–377.
- Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood.* 2001; 97(8): 2293-2299
- Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, Bertocello I, Bendall LJ, Simmons PJ, Haylock DN. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2005;106(4):1232-9.
- Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 2008;22(3):593- 599.
- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497–501
- Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T. The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche, Immunity. 2010;33(3), 387–399.

- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997;89(5):765-71.
- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108(10):3472–3476.
- Passegué E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100 Suppl 1:11842-9.
- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, 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(7): 687-694.
- Pieri L, Guglielmelli P, Bogani C, Bosi A, Vannucchi AM. Mesenchymal stem cells from *JAK2*V617F mutant patients with primary myelofibrosis do not harbor *JAK2* mutant allele. *Leukemia Research* 2008; 32(3): 516-517.
- Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):803-15.
- Purton LE, Scadden DT. Limiting Factors in Murine Hematopoietic Stem Cell Assays. *Stem Cell Cell*. 2007;1(3):263-70.
- Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, Aung Z, Matza M, Merckenschlager M, Lin C, Rommens JM, Scadden DT. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852–7.
- Rice KN, Jamieson CHM. Molecular pathways to CML stem cells. *Int J Hematol*. 2010; 91(5):748–752.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-36.
- Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, Flach J, Binnewies M, Garg T, Wagers AJ, Hsiao EC, Passegué E. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*. 2013;13(3):285-99.
- Schneider RK, Puellen A, Kramann R, Raupach K, Bornemann J, Knuechel R, Pérez-Bouza A, Neuss S. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials*. 2010a;31(3):467-80.

- Schneider RK, Anraths J, Kramann R, Bornemann J, Bovi M, Knuchel R, Neuss S. The role of biomaterials in the direction of mesenchymal stem cell properties and extracellular matrix remodelling in dermal tissue engineering. *Biomaterials*. 2010b;31(31):7948-59.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4(1-2): 7-25.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356(5):459–468.
- Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2003;18(2):213-21.
- Smith JNP und Calvi LM. Current Concepts in Bone Marrow Microenvironmental Regulation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells*, 2013; 31(6):1044-50.
- Soki FN, Li X, Berry J, Koh A, Sinder BP, Xu Q, Kozloff KM, Taichman RS, McCauley LK. The Effects of Zoledronic Acid in the Bone and Vasculature Support of Hematopoietic Stem Cell Niches, *J Cell Biochem*. 2013;114(1): 67–78.
- Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grunewald E, Cheng T, Dombkowski D, Calvi LM, Rittling SR, Scadden DT. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 2005; 201(11):1781–1791.
- Sugiyama, T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977–988.
- Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1994;179(5):1677–1682.
- Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood*. 1996;87(2):518–524.
- Temam CJ, Wilson AR, Perkins SL, Hickman K, Prchal JT, Salama ME, Quantification of Fibrosis and Osteosclerosis in Myeloproliferative Neoplasms: A Computer-Assisted Image Study *Leuk Res*. 2010 ; 34(7): 871–876.
- Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005; 90(8): 1128-1132.
- Thiele, J. und Kvasnicka, HM. Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders-dynamics and clinical impact. *Histol. Histopathol*. 2006; 21(12):1367–1378.

- Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Schütz B, Ehinger M, Ditzel N, Kassem M, Scheduling S. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood*. 2011;117(19):5067-77.
- Tripodo C, Di Bernardo A, Ternullo MP, Guarnotta C, Porcasi R, Ingrao S, Gianelli U, Boveri E, Iannitto E, Franco G, Florena AM. CD146(+) bone marrow osteoprogenitors increase in the advanced stages of primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2009;94(1):127-30.
- Tripodo C, Sangaletti S, Piccaluga PP, Prakash S, Franco G, Borrello I, Orazi A, Colombo MP, Pileri SA. The bone marrow stroma in hematological neoplasms-a guilty bystander. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(8):456-66.
- Trumpp, A., Essers, M., Wilson, A., Awakening dormant hematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*. 2010 10(3):201-9.
- Vagima Y, Lapid K, Kollet O, Goichberg P, Alon R, Lapidot T. Pathways Implicated in Stem Cell Migration: The SDF-1/CXCR4 Axis. *Stem Cell Migration: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2011;750:277-89.
- van der Loo J.C., Xiao X., McMillin D., Hashino K., Kato I. & Williams D.A. VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. *Journal of Clinical Investigation*. 1998; 102(5), 1051–1061.
- Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(3):171-191
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
- Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 2004; 103(9):3258-64.
- Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, Eckstein V, Ho AD. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 2007;25(10):2638-47.
- Wagner W, Saffrich R, Ho AD. The stromal activity of mesenchymal stromal cells. *Transfus Med Hem other*. 2008;35(3):185e93.
- Walenda T, Bork S, Horn P, Wein F, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, Ho AD, Wagner W. Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2010;14(1-2):337-50.
- Walenda T, Bokermann G, Ventura Ferreira MS, Piroth DM, Hieronymus T, Neuss S, Zenke M, Ho AD, Müller AM, Wagner W. Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol*. 2011;39(6):617-28.

Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, Fabb SA, Swann J, McArthur GA, Westmoreland SV, Chambon P, Scadden DT, Purton LE. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell*. 2007;129(6):1097-110.

Wang, H.S., Hung, S.C., Peng, S.T., Huang, C.C., Wei, H.M., Guo, Y.J., Fu, Y.S., Lai, M.C., and Chen, C.C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004; 22(7), 1330–1337.

Wright, DE, Wagers, AJ, Gulati, AP, Johnson, FL & Weissman, IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001;294(5548), 1933–1936.

Yang Z, Zhang F, Ma W, Chen B, Zhou F, Xu Z, Zhang Y, Zhang D, Zhu T, Wang L, Wang H, Ding Z, Zhang Y. A novel approach to transplanting bone marrow stem cells to repair human myocardial infarction: delivery via a noninfarct-related artery. *Cardiovasc Ther*. 2010;28(6):380-385.

Xie Y, Yin T, Wiegraeb W, He XC, Miller D, Stark D, Perko K, Alexander R, Schwartz J, Grindley JC, Park J, Haug JS, Wunderlich JP, Li H, Zhang S, Johnson T, Feldman RA, Li L. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature*. 2009;457(7225):97-101.

Zhang B, Ho YW, Huang Q, Maeda T, Lin A, Lee SU, Hair A, Holyoake TL, Huettner C, Bhatia R. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell*. 2012;21(4):577-92.

Zhang XH, Jin X, Malladi S, Zou Y, Wen YH, Brogi E, Smid M, Foekens JA, Massagué J. Selection of bone metastasis seeds by mesenchymal signals in the primary tumor stroma. *Cell*. 2013;154(5):1060-73.

Zhao Z, Tang X, You Y, Li W, Liu F, Zou P. Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hemopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2006; 30: 993-1003.

Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, Li H, Wang XY, Yao HY, Zhang Y, Mao N. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc*. 2010;5(3):550-60.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell*. 2002;13(12), 4279–4295.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei...

... Frau Univ.-Prof. Dr. med. Ruth Knüchel-Clarke für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Institut für Pathologie anzufertigen und die Übernahme des Gutachtens sowie die freundliche Aufnahme am Institut für Pathologie. Zudem möchte ich mich herzlich bedanken für die Unterstützung, einen Forschungsaufenthalt in Boston im Rahmen meiner Promotion durchführen zu können.

... Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat Martin Zenke für die Übernahme des Gutachtens sowie die freundliche Unterstützung bei der Realisierung des Forschungsaufenthaltes in Boston.

... Frau PD Dr. med. Rebekka Schneider-Kramann ganz besonders für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung während der gesamten Zeit meiner Promotion sowie die stetige Motivation und Unterstützung. Weiterhin möchte ich mich herzlich bedanken für die Ermöglichung eines Forschungsaufenthaltes in Boston und die große Hilfe diesen zu realisieren.

... Frau PD Dr. rer. nat. Sabine Neuß-Stein für die nette Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die immer motivierenden Worte und Unterstützung.

... meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Neuß-Stein für die stets angenehme Atmosphäre, den Zusammenhalt und ihre Hilfsbereitschaft.

... dem gesamten Laborteam des Instituts für Pathologie für die stetige Hilfsbereitschaft.

... den Mitarbeitern der Elektronenmikroskopischen Einrichtung für die Bearbeitung vieler Proben.

... Dr. rer. nat. Patrick Ziegler und Dr. rer. nat. Susanne Ziegler für die sehr gute Zusammenarbeit und Univ.-Prof. Dr, med. Tim Brümmendorf für die Ermöglichung des MPN-Kooperationsprojektes.

...Univ.-Prof Dr. Ing. Horst Fischer und Dipl.-Ing. Christian Bergman für die sehr gute Kooperation und die Herstellung der β -TCP-Scaffolds.

... Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Müller-Newen und Dipl.-Biol. Dirk Fahrenkamp für die gute Unterstützung am Konfokalmikroskop.

... dem Ebert Lab für die freundliche Aufnahme in das Team während meines Aufenthalts in Boston und die lehrreiche Zeit.

... Den Ärzten und Hebammen der Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin und den Ärzten der orthopädischen Klinik sowie den Patienten für die Bereitstellung von Nabelschnurblutproben, Nabelschnüren und Aspirat und Spongiosa.

... meinen Eltern ganz besonders dafür, dass sie mir immer zur Seite stehen und mich unterstützen, für ihre motivierenden Worte und ihr Interesse.

... meinem Freund Reinhard für die liebevolle Unterstützung, die stetige Motivation und sein positives Denken.

...meinen Freunden und meinem Bruder für die vielen motivierenden Worte und ihr Verständnis.

Eigene Veröffentlichungen

Kramann R, Kunter U, Brandenburg VM, Leisten I, Ehling J, Klinkhammer BM, Knüchel R, Floege J, Schneider RK. Osteogenesis of heterotopically transplanted mesenchymal stromal cells in rat models of chronic kidney disease. *J Bone Miner Res.* 2013 May [Epub ahead of print]

Kramann R, Brandenburg V M, Schurgers L J, Ketteler M, Westphal S, Leisten I, Bovi M, Jahnen-Dechent W, Knüchel R, Floege J, Schneider RK. Novel insights into osteogenesis and matrix remodelling associated with calcific uraemic arteriolopathy. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2012 Dec; (0) 1-12

Leisten I, Kramann R, Ventura Ferreira MS, Bovi M, Neuss S, Ziegler P, Wagner W, Knüchel R, Schneider RK. 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials.* 2012 Feb; 33(6):1736-47.

Begemann M, Leisten I, Soellner L, Zerres K, Eggermann T and Spengler S. Use of multilocus methylation-specific single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) technology in diagnostic testing for human imprinted loci. *Epigenetics* 2012 May; 7(5): 473-481

Eggermann T, Leisten I, Binder G, Begemann M, Spengler S. Disturbed methylation at multiple imprinted loci: an increasing observation in imprinting disorders. *Epigenomics* 2011 Oct; 3(5):625-37.

Begemann M, Spengler S, Kanber D, Haake A, Baudis M, Leisten I, Binder G, Markus S, Rupprecht T, Segerer H, Fricke-Otto S, Mühlenberg R, Siebert R, Buiting K, Eggermann T. Silver-Russell patients showing a broad range of ICR1 and ICR2 hypomethylation in different tissues. *Clinical Genetics* 2011 July; 80(1):83-8.

Gogiel M, Spengler S, Leisten I, Schönherr N, Schwanitz G, Midro A T, Binder G, Eggermann T. Molecular Analysis of the BORIS Gene in children with Silver-Russell Syndrom. *Int J Hum Genet.* 2009 Jan; 9:3-4

In Vorbereitung:

Schneider RK, Leisten I, Ziegler S, Schumacher A, Rath B, Ferreira MSV, Fahrenkamp D, Mueller-Newen G, Chrysandt M, Wilop S, Jost E, Knuechel R, Brümmendorf TH, Ziegler P. Sustained alterations in BMSC from patients with myeloproliferative neoplasms (MPN) point to significant alterations of the bone marrow microenvironment prior to the manifestation of myelofibrosis.

Qin J, Sontag S, Leisten I, Schneider RK, Wang X, Jauch A, Peitz M, Brüstle O, Wagner W, Zhao RC, Zenke M. Cell Fusion Assisted Differentiation of human iPS cells. Submitted.

Vorträge/ veröffentlichte Kongressbeiträge

Leisten I, Ferreira M, Neuß S, Wagner W, Knüchel R, Schneider RK. Interaction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells in an in vitro bone marrow microenvironment, *Pathologie* 2011 April; 32 Suppl 1:19

Vortrag, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie 2011

Leisten I, Ferreira M, Neuß S, Wagner W, Knüchel R, Schneider RK. Hematopoietic-mesenchymal stem cell interactions in a three-dimensional culture system of the bone marrow niche.

Vortrag, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung 2011

Leisten I, Kramann R, Ferreira M, Bovi M, Neuss S, Ziegler P, Wagner W, Knüchel R, Zenke M and Schneider RK. Mimicking the Hematopoietic Stem Cell Niche in Three-dimensional Collagen Gels

Vortrag, Stammzellkompetenznetzwerk NRW, annual retreat 2012

Leisten I, Schumacher A, Ziegler S, Fahrenkamp D, Müller-Newen G, Brümmendorf TH, Jost E, Knüchel R, Ziegler P, Schneider RK. Mesenchymal stem cells – key players in myelofibrosis?, *Pathologie* 2012 May; 33 Suppl 1:25

Vortrag, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie 2012

Poster

Leisten I, Ferreira M., Wagner W., Knüchel R., Neuss S., Schneider RK. Mesenchymal stem cells of the umbilical cord provide stromal support for cord blood hematopoietic stem cells in a three-dimensional, tissue-engineered stem cell niche

Stammzellkompetenznetzwerk NRW, International Meeting 2011

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Leisten Isabelle
Geburtsdatum: 09.01.1985
Geburtsort: Würselen
Anschrift: Rahrfeldweg 6a
52068 Aachen

Hochschulstudium und Schulausbildung

Seit 10 / 2010 Promotion
RWTH Aachen Universitätsklinikum, Institut für Pathologie
“Die Bedeutung der Stammzellnische bei myeloproliferativen
Erkrankungen”

04 / 2013 – 06 / 2013 Doktorandenkurzstipendium des DAAD
Forschungsaufenthalt am Brigham and Women’s Hospital,
Boston, USA

10 / 2005 - 09 / 2010 Studium Biologie
RWTH Aachen
Diplomarbeit: „Entwicklung quantifizierender Verfahren zum
Nachweis humaner Epimutationen“
Abschluss: Diplom-Biologin

10 / 2004 - 09 / 2005 Studium Mathematik und Biologie (Lehramt)
RWTH Aachen

1995 - 2004 St. Ursula Gymnasium, Aachen
Abschluss:Abitur

1991 – 1995 Grundschule Horbach, Aachen

Weitere Tätigkeiten

08 / 2009 - 09 / 2010 Studentische Hilfskraft
Universitätsklinikum Aachen, Institut für Pathologie

01 / 2009 – 03/ 2009 Forschungspraktikum
Universitätsklinikum Aachen, Institut für Humangenetik

01 / 2009 - 07 / 2009 Studentische Hilfskraft
Aixtema GmbH, Aachen

