

# **Humane hämatopoetische Stammzellen – Einflüsse von Proteinase, Inhibitoren und dreidimensionalen Kulturbedingungen**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Olga Schmal  
aus Andreewka/Russland

Tübingen  
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	09.11.2015
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gerd Klein
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

## Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerd Klein für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und das Ermöglichen der Durchführung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe bedanken. Außerdem danke ich Prof. Klein für die umfangreiche Betreuung, hilfreichen Anregungen und Anstöße sowie uneingeschränkte Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee danke ich für die freundliche Bereitschaft, die Aufgabe des zweiten Berichterstatters zu übernehmen.

Der Sektionsleiterin Frau Prof. Dr. Claudia Müller danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Der Landesstiftung Baden-Württemberg möchte ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Bärbel Spring von der Neonatologie, Herrn Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher von der Urologie und Herrn PD Dr. Bernd Rolauffs von der BG Unfallklinik in Tübingen sowie ihren Arbeitsgruppen für die regelmäßige Bereitstellung humanen Probenmaterials.

Ein herzliches Dankeschön an Herrn Dr. Hubert Kalbacher, Andreas Maurer, Ilona Hagelstein und Lisa Kraft für das Ermöglichen der biochemischen Studien und die Hilfestellung bei den MALDI-TOF-Analysen und spektrofluorometrischen Messungen.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Tilman E. Schäffer, Jan Seifert und Eva Lohmann vom Institut für Angewandte Physik sowie Frau Birgit Fehrenbacher und Frau Renate Nordin von der Hautklinik für die Unterstützung bei den raster- bzw. transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Graham Pawelec bedanke ich mich für die Einweisung in die Benutzung des Durchflusszytometers.

Vielen herzlichen Dank an alle meine derzeitigen und ehemaligen Kollegen in der Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie, insbesondere an Subasty Baskaran, Astrid Beerlage, Konstanze Geiger, Tatjana Kaiser, Sabine Rieber, David Schmutzler, Tanja Seeger, Carolin Steinl, Christina Walter und Jan Zieger. Danke für die hilfreichen Tipps in vielen technischen und inhaltlichen Fragen. Die freundschaftliche Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima waren eine besonders schöne Erfahrung.

Mein größter Dank gilt an dieser Stelle meiner Familie – für ihre Liebe, uneingeschränkte Unterstützung und ihren Glauben an mich und meine Fähigkeiten.

Und nicht zuletzt danke ich Dir, Andrej, für alles. Du bist meine größte Stütze.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung .....</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hämatopoetische Stammzellen .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Stammzellnische(n) im Knochenmark .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Zelluläre Komponenten der Nische .....	6
1.2.2 Rezeptoren und sezernierte Faktoren .....	9
1.2.3 ECM der Stammzellnische .....	10
1.2.4 Biomechanische Einflüsse .....	12
<b>1.3 Mobilisierung der Stammzellen .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Matrixmetalloproteinase(n) und ihre Inhibitoren .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Cathepsine .....</b>	<b>20</b>
<b>1.6 Cystatine .....</b>	<b>22</b>
<b>1.7 Vom Monolayer zur 3D Kultur .....</b>	<b>27</b>
<b>1.8 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>29</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Chemikalien .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Geräte .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3 Rekombinante und native Proteine .....</b>	<b>32</b>
<b>2.4 Isolierung humaner Zellen und Zellkultur .....</b>	<b>33</b>
2.4.1 Aufreinigung humaner CD34 <sup>+</sup> hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut .....	33
2.4.2 Isolierung humaner mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspiraten .....	33
2.4.3 Isolierung humaner Osteoblasten aus Hüftkopfknochen .....	34
2.4.4 Kultivierung humaner Zellen und Zelllinien .....	35
2.4.5 Herstellung von Zellpellets, Zelllysaten und konditionierten Medien .....	36

<b>2.5 Dreidimensionale Zellkultur .....</b>	<b>37</b>
2.5.1 Kultivierung humaner mesenchymaler Stromazellen in Hanging-Drop-Platten .....	37
2.5.1.1 Vergleich der Proliferation mesenchymaler Stromazellen in 3D und 2D Kulturen .....	38
2.5.1.2 Einfluss funktionsblockierender anti-Cadherin-Antikörper auf die Sphäroidbildung .....	39
2.5.2 Kokultur hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen mit mesenchymalen Stromazellen in HDA-Platten .....	39
2.5.3 Herstellung und HE-Färbung von Sphäroidkryoschnitten .....	40
2.5.4 Analyse der 3D Sphäroide mittels Rasterelektronenmikroskopie .....	41
2.5.5 Analyse der 3D Sphäroide mittels Transmissionselektronenmikroskopie .....	42
<b>2.6 Zellfunktionsanalysen .....</b>	<b>43</b>
2.6.1 Zellproliferationsassay .....	43
2.6.2 Differenzierungsassay (CFU) .....	44
2.6.3 Zell-Zelladhäsionsassay .....	45
2.6.4 Transwell-Invasionsassay .....	46
<b>2.7 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>47</b>
2.7.1 Primerherstellung .....	47
2.7.2 RNA-Aufreinigung aus humanen Zellen .....	49
2.7.3 RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese .....	50
2.7.4 Herunterregulierung der Cystatin C-Expression mittels siRNA .....	52
<b>2.8 Immunologische Methoden .....</b>	<b>53</b>
2.8.1 SDS-PAGE und Western Blot .....	53
2.8.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	56
2.8.3 Cystatin C-ELISA .....	58
2.8.4 FACS-Analyse der CD34-Expression der HSPCs .....	59
<b>2.9 Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>59</b>
2.9.1 Proteolytischer <i>in vitro</i> -Verdau rekombinanter Proteine .....	59
2.9.2 Silberfärbung (nach Shevchenko) .....	60
2.9.3 MALDI-TOF-Analyse .....	61
2.9.4 Aktivitätsmessungen von Cystatin C-inhibierten Cathepsinen .....	62
<b>2.10 Statistische Auswertung .....</b>	<b>63</b>

<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
<b>3.1 Matrixmetalloproteinasen im humanen Knochenmark .....</b>	<b>64</b>
3.1.1 Expression sezernierter MMPs durch Nischenzellen .....	64
3.1.2 Prozessierung des Chemokins SDF-1 $\alpha$ durch Matrixmetalloproteinasen .....	71
<b>3.2 Analysen zur Expression und Funktion von Cystatinen in Knochenmarkzellen ...</b>	<b>75</b>
3.2.1 Expression von Cystatinen durch Nischenzellen .....	75
3.2.2 Einfluss mobilisierender Faktoren auf die Sekretion von Cystatin C .....	79
3.2.3 Prozessierung von Cystatin C durch Matrixmetalloproteinasen .....	81
3.2.3.1 Silbergele und MALDI-TOF .....	81
3.2.3.2 Inhibitorische Aktivität der degradierten Form von Cystatin C .....	84
3.2.4 Funktionelle Analysen der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in Abhängigkeit von Cystatin C .....	88
3.2.4.1 Cystatin C-Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der HSPCs .....	88
3.2.4.2 HSPC-Adhäsion und -Invasion nach Herunterregulierung der Cystatin C- Expression in MSCs .....	91
3.2.4.3 Einfluss eines Cystatin C-Überschusses auf die HSPC-Adhäsion und -Invasion .....	95
<b>3.3 Etablierung einer 3D Kokultur mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und mesenchymalen Stromazellen mit Hilfe der Hanging-Drop-Methode .....</b>	<b>97</b>
3.3.1 Sphäroidbildung aus MSCs .....	97
3.3.2 Evaluierung der optimalen Bedingungen für die HSPC-MSK-Kokultur .....	106
3.3.3 Charakterisierung der 3D Sphäroide in der Kokultur .....	109
3.3.4 Expansion der HSPCs in 3D und Vergleich ihrer Qualität zur konventionellen 2D Kokultur mit MSCs .....	115
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>124</b>
<b>4.1 Mögliche Beteiligung weiterer Matrixmetalloproteinasen am proteolytischen Geschehen im Zuge der Stammzellmobilisierung .....</b>	<b>125</b>
<b>4.2 Ubiquitär exprimiertes Cystatin C und seine Funktion in der Stammzellnische des humanen Knochenmarks .....</b>	<b>130</b>
4.2.1 Cystatin C wird in hohen Konzentrationen von Nischenzellen ausgeschieden .....	131

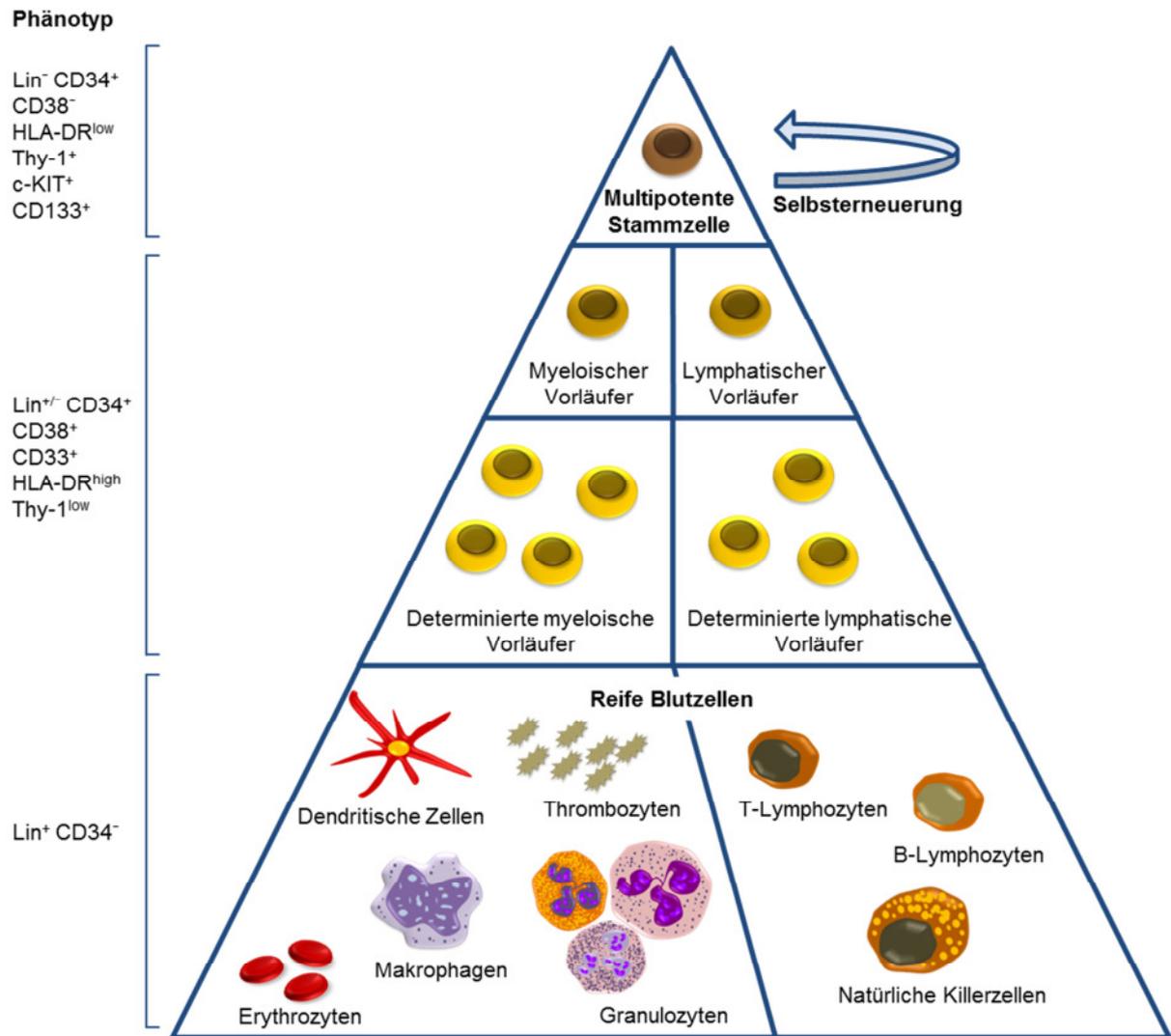
4.2.2 Inhibitorisches Potential von Cystatin C wird von nischenspezifischen MMPs kaum beeinflusst .....	133
4.2.3 Hohe Cystatin C-Konzentrationen beeinträchtigen die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit der HSPCs .....	137
<b>4.3 Effizientere Expansion hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen unter 2D Kulturbedingungen im Vergleich zum 3D Hanging-Drop-Modell .....</b>	<b>142</b>
4.3.1 Etablierung des 3D Hanging-Drop-Modells .....	143
4.3.2 MSCs und HSPCs segregieren in der frühen Phase der 3D Kokultur .....	147
4.3.3 HSPCs expandieren effizienter und mit höherer Qualität unter 2D Bedingungen als in der 3D Kokultur .....	151
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>155</b>
<b>Summary .....</b>	<b>156</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>157</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>175</b>
<b>Wissenschaftliche Beiträge .....</b>	<b>179</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>180</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämatopoetische Stammzellen

In den frühen 1960er Jahren transplantierte die Forschergruppe um Till und McCulloch murines Knochenmark in Mäuse, die zuvor mit einer letalen Dosis bestrahlt wurden, und entdeckte somit die hämatopoetischen Stammzellen, die zur Wiederherstellung des gesamten Blutsystems in den bestrahlten Mäusen fähig waren. Till und McCulloch schlugen daraufhin eine Definition für diese neu entdeckte Zellpopulation vor (Till et al., 1964). Danach sind Stammzellen durch drei besondere Eigenschaften charakterisiert: Sie haben eine hohe Proliferationsfähigkeit, sind einerseits in der Lage, sich selbst durch Zellteilung zu erneuern und dabei undifferenziert zu bleiben, und können andererseits bei Vorhandensein der richtigen Signale in diverse spezialisierte Zelltypen differenzieren. Das größte Differenzierungspotenzial besitzen pluripotente embryonale Stammzellen, denn sie können Abkömmlinge der drei Keimblätter Ekto-, Endo- und Mesoderm bilden (McCall et al., 2010). Im Gegensatz dazu sind adulte Stammzellen, die postnatal in diversen Organen zu finden sind, in ihrer Fähigkeit zur Differenzierung deutlich beschränkt und fungieren als Reservoir zur Wiederherstellung von senescentem und beschädigtem Gewebe.

Multipotente hämatopoetische Stammzellen (HSCs, hematopoietic stem cells) stellen die Quelle für alle blutbildenden Zellen im adulten Organismus dar. Über mehrere Vorläuferstufen (HPCs, hematopoietic progenitor cells), darunter gemeinsame myeloische und lymphatische Vorläufer sowie stärker determinierte Progenitoren wie Granulozyten-Makrophagen- oder erythroide Vorläufer, entstehen im Knochenmark, Thymus und den peripheren lymphatischen Organen reife Blutzellen (Kondo et al., 2003; Orkin and Zon, 2008). Der Reifegrad der Stammzellen und der Vorläufer kann phänotypisch anhand der Expression eines charakteristischen Musters an Oberflächenmolekülen bestimmt werden. Besonders hilfreich ist dabei das Expressionsmuster der membrangebundenen Glykoproteine der CD-Gruppe (cluster of differentiation). So stellt zum Beispiel CD45 einen pan-hämatopoetischen Marker dar. Sehr frühe ruhende humane HSCs sind  $CD34^+CD38^-$ . Vorläuferzellen sind  $CD34^+$ , exprimieren CD38 und bereits einige der für die jeweiligen hämatopoetischen Linien spezifischen Marker. In reifen Blutzellen kann die Expression von CD34 nicht mehr nachgewiesen werden. Abbildung 1-1 gibt einen groben Überblick über den hierarchischen Aufbau des hämatopoetischen Systems mit den für verschiedene Stufen charakteristischen Phänotypen.



**Abbildung 1-1. Die Hierarchie des hämatopoetischen Systems im adulten Organismus.** Multipotente Stammzellen an der Spitze der hierarchischen Pyramide werden durch spezifische Signale zur Differenzierung in myeloische und lymphatische Progenitoren angeregt. Gleichzeitig sorgen sie durch Selbsterneuerung für die Aufrechterhaltung des Stammzellreservoirs. Über weitere Differenzierungsstufen mit stärker determinierten Vorläufern entstehen schließlich reife Blutzellen. Am linken Rand sind die Phänotypen der Zellen mit den für die jeweiligen Reifestufen charakteristischen Mustern an Oberflächenmarkern wiedergegeben.

Obwohl diese Art der Blutbildung bereits nach der Geburt einsetzt, wird sie als adult bezeichnet, um eine deutliche Abgrenzung zur embryonalen Hämatopoese zu ermöglichen. Während der humanen Embryonalentwicklung sind hämatopoetische Vorgänge in mehreren anatomischen Bereichen lokalisiert, wobei diese mit fortschreitender Embryogenese wechseln (Aggarwal et al., 2012). Die einfache Blutbildung beginnt im extraembryonalen Dottersack durch Entstehung von Blutinseln. Anschließend wandern Blutzellen in den intraembryonalen Bereich, wo in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region ein erstes Stammzellreservoir ange-

legt wird (Aggarwal et al., 2012). Parallel dazu nimmt mit Einsetzen der Zirkulation auch die Anzahl der HSCs in der fötalen Leber zu. Im letzten Schwangerschaftstrimester erfolgt die Verlagerung der Hämatopoese ins Knochenmark, den Ort der adulten Blutbildung (Orkin and Zon, 2008; Wang and Wagers, 2011). Hierfür müssen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs, hematopoietic stem and progenitor cells) aus der fötalen Leber in den Blutkreislauf mobilisiert werden. Dieses Phänomen ermöglicht auf nicht invasive Weise die Isolierung größerer Mengen CD34<sup>+</sup> HSPCs aus Nabelschnurblut für experimentelle Zwecke.

Wie viele andere Zellen mit hohem Teilungspotential können auch HSPCs entarten und bösartige Neoplasien entwickeln. Dabei unterscheidet man zwischen myeloischen und lymphatischen Leukämien, die dementsprechend aus entarteten Zellen der verschiedenen Stufen der myeloischen und lymphatischen Hämatopoese hervorgehen und die Bildung reifer, funktionsfähiger Blutzellen beeinträchtigen ([www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/leukaemien/index.php](http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/leukaemien/index.php)). Aus ätiologischer Sicht stellen virale Infektionen, toxische Chemikalien sowie schädliche Strahlung neben spontanen Mutationen und Chromosomenaberrationen die häufigsten Ursachen für Blutkrebs dar. In besonders schweren Fällen, wenn herkömmliche Behandlungsmethoden wie Chemo- oder Strahlentherapie keine ausreichende Wirkung zeigen, ist für viele Patienten eine Stammzelltransplantation die letzte rettende Maßnahme. Als Ursache für Therapieresistenzen bzw. für ein sehr hohes Rückfallrisiko wird die Existenz leukämischer Stammzellen, die mit den gesunden HSPCs um die Knochenmarknischen konkurrieren, angenommen (Schepers et al., 2015).

## **1.2 Stammzellnische(n) im Knochenmark**

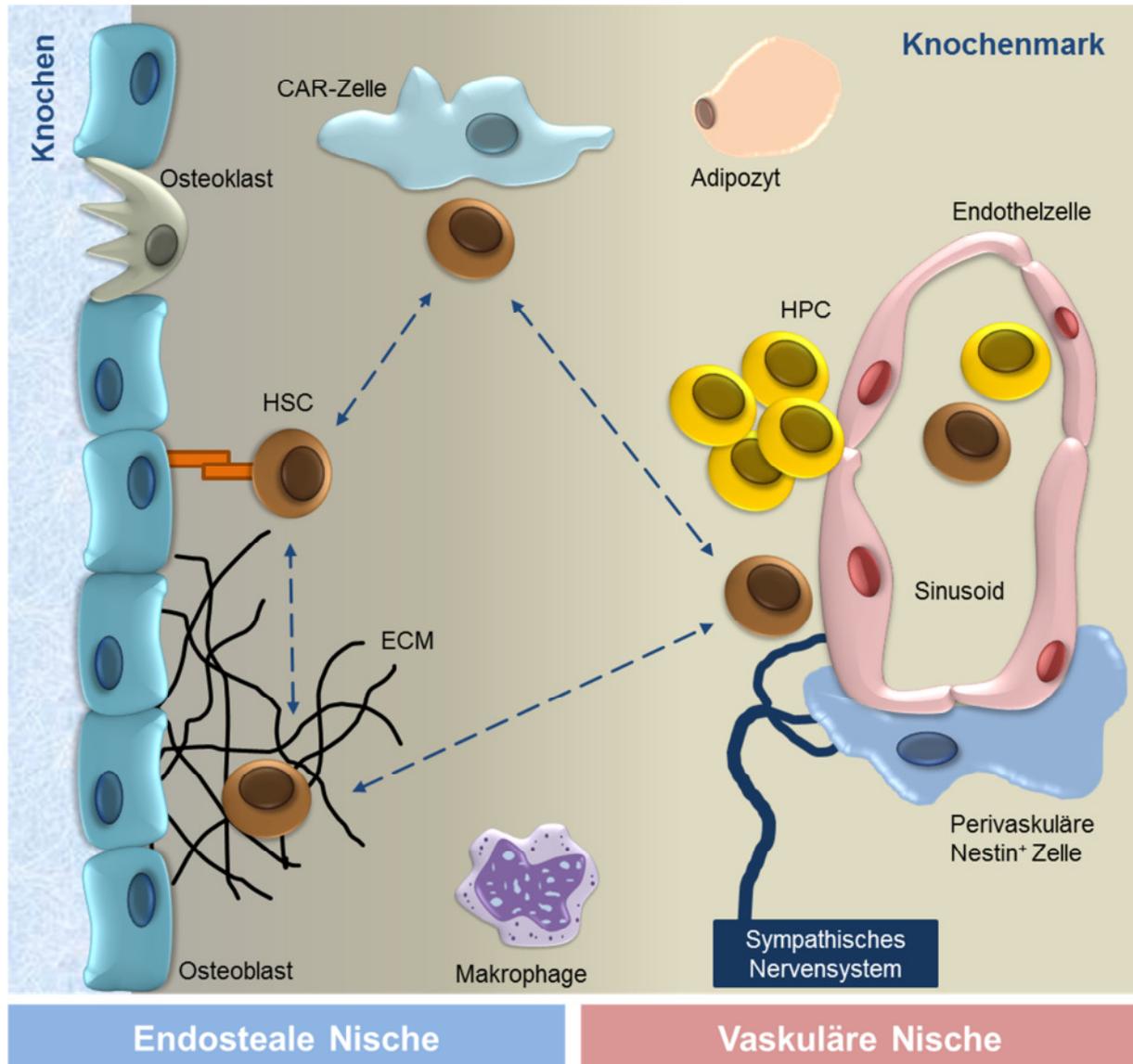
Hämatopoetische Stammzellen müssen über die gesamte Lebensspanne eines Individuums die Fähigkeit zur Blutbildung beibehalten. Dies wird durch die Lokalisation der Zellen in einer spezialisierten Mikroumgebung des Knochenmarks, der Stammzellnische, gewährleistet. Das Konzept einer Stammzellnische wurde zum ersten Mal 1978 von Raymond Schofield beschrieben (Schofield, 1978). Mit Hilfe des Nerven- und des Hormonsystems sorgt die Nische durch eine strenge Regulierung der Zellerneuerung, -differenzierung und -migration für die hämatopoetische Homöostase (Mendez-Ferrer et al., 2009; 2010b; Mercier et al., 2012). Dabei werden durch symmetrische und asymmetrische Teilungen der HSCs die Aufrechterhaltung des Stammzellpools gesichert bzw. der Bedarf an Vorläufern für reife Blutzellen gedeckt (Wilson and Trumpp, 2006).

Der menschliche Röhrenknochen, der unter anderem den Oberarm- und Oberschenkelknochen bildet, ist aus einem Schaft, der Diaphyse, und zwei Enden, den Epiphysen, aufgebaut. Die Epiphysen bestehen aus trabekulärem Knochen – einem Netzwerk von Knochenbälkchen, die Trabekel genannt werden (Clarke, 2008). Das Knochenmark im trabekulären Knochen ist durch einen hohen Grad an Vaskularisierung charakterisiert und beherbergt die Mehrzahl der hämatopoetischen Stammzellnischen. Bei diesen unterscheidet man zwischen zwei Haupttypen – der endostealen und der vaskulären Nische, wobei die Frage nach der genauen Lokalisation der primitiven HSCs (LT-HSCs, long-term repopulating HSCs) noch nicht endgültig beantwortet wurde (Bianco, 2011; Boulais and Frenette, 2015; Ehninger and Trumpp, 2011; Morrison and Scadden, 2014). Als sehr wahrscheinlich wird ein dynamisches Gleichgewicht mit mehreren nischenähnlichen Bereichen, zwischen denen HSPCs je nach Differenzierungsgrad wandern und durch verschiedene Zelltypen, sezernierte Faktoren, Matrix-Komponenten sowie biomechanische Parameter reguliert werden, angenommen (Abbildung 1-2).

Die Existenz der endostealen Nische am Endosteum, der inneren Knochenhaut, wurde vorgeschlagen, als man infolge einer Überexpression des Parathormonrezeptors 1 oder einer Inaktivierung des BMP-Rezeptors I und des damit verbundenen Anstiegs an osteoblastischen Zellen eine auffällige Erhöhung der HSC-Mengen im Knochenmark detektierte (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003). Der gegensätzliche Versuchsansatz mit induzierter Depletion der osteoblastischen Zellen führte zum Rückgang der HSC-Population und zur Verlagerung der Hämatopoese in extramedulläre Bereiche (Visnjic et al., 2004). Diesen Studien gegenüber stehen neuere Erkenntnisse, die die Bedeutung der endostealen Nische in Frage stellen. Mäuse mit einem Osteoporose-ähnlichen Phänotyp haben eine deutliche Abnahme an trabekulärem Knochen und Osteoblasten, zeigen allerdings weder Defekte in der Hämatopoese noch Veränderungen in der HSC-Frequenz oder -Funktion (Kiel et al., 2007). Umgekehrt hatte eine erhöhte Osteoblastenzahl, die bei Mäusen durch eine Strontiumbehandlung hervorgerufen wurde, nicht zwingend eine Erhöhung der HSC-Mengen zur Folge (Ma et al., 2009).

Wenig Zweifel besteht dagegen an der Bedeutung der vaskulären Einheiten des Knochenmarks und der damit assoziierten Stammzellnischen. Zentrale longitudinale Arterien im Röhrenknochen verzweigen sich in kleinere Arterien und weiter in Arteriolen. Diese feinen Blutgefäße gehen nahe des Endosteums in venöse Sinusoide über. Das sinusoidale Netzwerk umfasst ungefähr  $30 \pm 5$  % des gesamten Knochenmarkvolumens (Nombela-Arrieta et al., 2013). Auf diese Weise wird die schnelle Zuführung der differenzierenden HSPCs dem Blutkreislauf gewährleistet. In einer Transplantationsstudie konnte außerdem gezeigt werden, dass HSPCs im Knochenmark nicht weiter als drei Zelldurchmesser von einem Blutgefäß entfernt sind

(Ellis et al., 2011). Angesichts der Tatsache, dass die Sinusoiddichte am Endosteum besonders hoch ist, sprechen diese Beobachtungen vielmehr für die Existenz einer umfassenderen gemeinsamen Nische als für mehrere, räumlich und funktionell getrennte Nischen.



**Abbildung 1-2. Hämatopoetische Stammzellnischen.** Knochenbildende Osteoblasten befinden sich am Endosteum und sind zusammen mit den knochenabbauenden Osteoklasten maßgeblich an der Bildung der endostealen Nische beteiligt. Die vaskuläre Nische ist nahe der Blutgefäße lokalisiert und setzt sich aus Endothelzellen und Nestin<sup>+</sup> perivaskulären Zellen zusammen. Makrophagen, Adipozyten und CXCL12-abundante retikuläre Zellen (CAR-Zellen) sind weitere regulatorische Einheiten im Knochenmark. Das sympathische Nervensystem nimmt Einfluss auf die Aktivität diverser Nischenzellen. Eine spezifische extrazelluläre Matrix (ECM) wird von den zellulären Nischenkomponenten synthetisiert. Das genaue Verhältnis der HSCs aus den jeweiligen Nischen zueinander ist noch nicht völlig entschlüsselt, was durch die gestrichelten Pfeile symbolisiert werden soll.

### 1.2.1 Zelluläre Komponenten der Nische

Obwohl der Aufbau der hämatopoetischen Stammzellnischen äußerst komplex ist und die Funktionen vieler Zelltypen noch lange nicht vollständig aufgeschlüsselt sind, wurden in den vergangenen 15 Jahren große Fortschritte auf diesem Gebiet gemacht. In Ermangelung geeigneter humaner Modellsysteme wurden hauptsächlich durch intensive Erforschung des murinen Knochenmarks Zellen osteoblastischen, endothelialen, mesenchymalen sowie hämatopoetischen Ursprungs als Nischenbestandteile identifiziert (Morrison and Scadden, 2014).

Als Hauptkomponenten der endostealen Nische werden die aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehenden knochenbildenden Osteoblasten angesehen (Calvi et al., 2003). Diese Zellen sind epithelartig auf der Knochenoberfläche angeordnet und sezernieren verschiedene, für den Knochenaufbau erforderliche Matrixproteine, darunter Kollagen Typ I, Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin sowie diverse Proteoglykane (Clarke, 2008; Nakamura et al., 2009; Yamaguchi et al., 2000). Zudem sind Osteoblasten zusammen mit Osteozyten und Stromazellen durch Sekretion des Faktors RANKL für die Reifung der Osteoklasten verantwortlich (Boyce et al., 2007; Clarke, 2008). Osteoklasten sind große mehrkernige Zellen hämatopoetischen Ursprungs und in der Lage, die Knochensubstanz abzubauen.

Die Bedeutung der Osteoblasten für die Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellen wurde durch Nachweis der Sekretion des HSC-regulierenden Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktors (G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor) gezeigt (Taichman and Emerson, 1994). Zudem exprimieren Osteoblasten SDF-1 $\alpha$  (stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ ), eines der wichtigsten Moleküle für den Erhalt der Stammzellen (Mercier et al., 2012; Wilson and Trumpp, 2006). In funktionellen Studien führte die Transplantation von murinen CD45<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> Osteoprogenitoren unter die Nierenkapsel bei den Empfängermäusen zur ektopischen Ossifikation und zum Aufbau eines funktionsfähigen Knochenmarkmilieus, in das HSCs einwanderten (Chan et al., 2009). Osteoklasten können auf zwei Wegen zur HSC-Steuerung beitragen. Zunächst wurde ihre direkte Involvierung in das Nischengeschehen anhand der ausgeprägten proteolytischen Aktivität nachgewiesen, als die spezifische Stimulation mit RANKL zur Mobilisierung von frühen Progenitoren aus der Nische in den Blutkreislauf führte (Kollet et al., 2006). Zusätzlichen Einfluss können Osteoklasten auf indirekte Weise über Osteoblasten nehmen. Fehlende Osteoklasten-Aktivität war bei Mäusen mit Nischendefekten und einer Anreicherung an mesenchymalen Vorläufern mit gleichzeitiger Hemmung der Osteoblastenreifung assoziiert. Diese Defekte konnten durch Wiederherstellung der Osteoklasten-Funktionsfähigkeit rückgängig gemacht werden (Mansour et al., 2012).

Eine deutlich gewichtigere Bedeutung wird seit Kurzem den mesenchymalen Stammzellen (MSCs) beigemessen. Nicht lange nach der Entdeckung der HSCs wurde man auf eine weitere Knochenmarkzellpopulation, die in Kultur Fibroblasten-ähnliche Kolonien (CFU-F, colony-forming unit-fibroblast) und Knochen bildete sowie zur Rekonstitution einer hämatopoetischen Mikroumgebung nach subkutaner Transplantation fähig war, aufmerksam (Friedenstein et al., 1968; 1970; 1976; 1982). Diese heterogene multipotente Zellpopulation ist in der Lage, in verschiedene mesenchymale Linien, darunter die osteogene, chondrogene, adipogene sowie myogene, zu differenzieren und birgt somit ein enormes Potential zur Anwendung in der regenerativen Medizin und im Tissue Engineering (Kfoury and Scadden, 2015). Ihre Präsenz wurde unter anderem auch in Fettgewebe, Nabelschnur, Plazenta und Skelettmuskeln nachgewiesen (Via et al., 2012). Eine einfache Isolierung durch Sortierung anhand phänotypischer Oberflächenmarker, was bei HSPCs eine gängige Prozedur darstellt, erwies sich bei der heterogenen MSC-Mischung jedoch als schwierig (Kfoury and Scadden, 2015). Kontroverse Diskussionen darüber, dass es keine echten mesenchymalen Stammzellen sind, haben dazu geführt, dass die Bezeichnungen „mesenchymale Stromazellen“ oder „skelettale Stammzellen“ ebenso gebräuchlich wurden (Bianco and Robey, 2015; Frenette et al., 2013; Kfoury and Scadden, 2015).

Im Knochenmark wurden bereits zahlreiche MSC-Populationen identifiziert und im Hinblick auf HSC-Regulation untersucht, wobei die genaue Beziehung einzelner Populationen zueinander in vielen Fällen nicht eindeutig geklärt ist und Speziesunterschiede zwischen murinem und humanem Knochenmark zusätzlich an Komplexität beitragen. Eine der wichtigsten Quellen für SDF-1 $\alpha$ , das auch unter dem Namen CXCL12 (C-X-C motif chemokine 12) bekannt ist, stellt eine Gruppe retikulärer Zellen dar. CAR-Zellen (CXCL12 abundant reticular cells) sind über das gesamte Knochenmark verteilt und *in vitro* zur adipogenen und osteogenen Differenzierung fähig (Kiel and Morrison, 2008). Ihre selektive Depletion führte bei Mäusen zu einem drastischen Rückgang hämatopoetischer Progenitoren und man nimmt an, dass sie den CD146<sup>+</sup> subendothelialen Zellen im humanen Knochenmark entsprechen (Nagasawa et al., 2011). Wurden humane CD146<sup>+</sup> Zellen subkutan in Mäuse transplantiert, so wurde ektopisch die Errichtung einer hämatopoetischen Mikroumgebung initiiert (Sacchetti et al., 2007). Nestin ist ein Intermediärfilament, das als spezifisch für Stammzellen des Neuroektoderms gilt. Eine HSC-regulierende Nestin-exprimierende Zellpopulation konnte sowohl im murinen als auch im fötalen und adulten humanen Knochenmark identifiziert werden (Isern et al., 2013; Mendez-Ferrer et al., 2010b). Die Depletion der Nestin<sup>+</sup> MSCs in der Maus hatte eine deutliche Verringerung der HSC-Anzahl im Knochenmark zur Folge. Sie zeigen eine Perizyten-

ähnliche Morphologie, sind vorwiegend in perivaskulären Bereichen lokalisiert und stellen offensichtlich eine Subpopulation der CAR-Zellen dar (Mendez-Ferrer et al., 2010b). PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>CD51<sup>+</sup> Stromazellen, die aus dem humanen Knochenmark isoliert wurden, bildeten sogenannte „Mesospheres“, die sich selbst erneuerten und die Erhaltung und Expansion humaner HPCs dosisabhängig förderten (Isern et al., 2013). Durch gezielte Deletion eines wichtigen HSC-regulierenden Faktors in perivaskulären Stromazellen, die den Leptin-Rezeptor exprimieren, konnte im murinen Knochenmark eine weitere Nischenkomponente nachgewiesen werden (Ding et al., 2012).

Die Bedeutung der Endothelzellen für die Nische wurde erkannt, nachdem man bei topographischen Analysen murine HSCs vorwiegend in der Nähe des sinusoidalen Endothels lokalisierte (Kiel et al., 2005). Eine tödliche Strahlendosis führte bei Mäusen zu einer beträchtlichen Schädigung der sinusoidalen Endothelzellen und wurde die Expression des VEGF-Rezeptors-2 in den Endothelzellen gehemmt, so konnte in Folge einer fehlenden Regeneration dieser Zellen auch die Hämatopoese nicht wiederhergestellt werden (Hooper et al., 2009).

Lange Zeit wurden Adipozyten im Knochenmark als passive Komponenten, die keinen Einfluss auf die hämatopoetische Aktivität haben, betrachtet. Diese Ansicht änderte sich, als man fettreiche und -arme Bereiche des murinen Knochenmarks verglich und deutlich kleinere HSPC-Mengen im fettreichen Knochenmark fand. In Mausmodellen mit beeinträchtigter Fettsynthese war die Repopulation des Knochenmarks nach Bestrahlung erheblich beschleunigt im Vergleich zum Wildtyp, was auf eine negative Regulation durch Adipozyten hinweist (Naveiras et al., 2009). Phagozytische Zellen haben einen gegenteiligen Einfluss auf das Nischengeschehen. Die Depletion der CD169<sup>+</sup> Makrophagen in Mäusen reduzierte die SDF-1 $\alpha$ -Konzentration im Knochenmark und löste die Mobilisierung von HSPCs in den Blutkreislauf aus (Chow et al., 2011). Dieser Effekt wurde unter anderem durch eine veränderte Genexpression in Nestin<sup>+</sup> Zellen vermittelt. Endosteale Makrophagen tragen zur HSC-Regulierung durch ihre Osteoblasten unterstützende Funktion bei (Winkler et al., 2010).

Darüber hinaus steuert das sympathische Nervensystem (SNS) zahlreiche zelluläre Komponenten der Nische. Nestin<sup>+</sup> Zellen exprimieren  $\beta$ 2- und  $\beta$ 3-adrenerge Rezeptoren, werden durch das SNS innerviert und in ihrer Proliferationsrate und HSC-regulierenden Fähigkeit beeinflusst (Mendez-Ferrer et al., 2008; 2010a). SNS-Signale haben ferner eine Osteoblasten hemmende Wirkung und können auch direkt auf HSPCs übertragen werden, da beide Zelltypen ebenfalls  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren exprimieren (Eleftheriou et al., 2005; Hoggatt and Pelus, 2011; Katayama et al., 2006; Spiegel et al., 2007).

### 1.2.2 Rezeptoren und sezernierte Faktoren

Die zellulären Bestandteile der Stammzellnische synthetisieren eine Kombination an Rezeptoren und löslichen Faktoren, die über den Ruhezustand, die Proliferation, Differenzierung oder Mobilisierung der HSPCs entscheidet. Der membranständige CXC-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und wird von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert (Zou et al., 1998). Das Chemokin SDF-1 $\alpha$  (CXCL12) ist der bisher einzige bekannte Ligand von CXCR4 (Bleul et al., 1996). Der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Signalweg steuert einige wichtige physiologische Prozesse und seine Fehlregulierung wird mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter mehrere Krebsformen (Müller et al., 2001). CAR-Zellen, Osteoblasten, Endothelzellen, Nestin<sup>+</sup> MSCs und andere MSC-Subpopulationen exprimieren SDF-1 $\alpha$  in großen Mengen und sorgen dadurch für den Verbleib der hämatopoetischen Stammzellen in ihrer Nische bzw. für deren Rückkehr ins Knochenmark und Wiederbesiedlung der Nische nach Mobilisierung und Transplantation (Greenbaum et al., 2013; Peled et al., 1999; Petit et al., 2002). Somit ist SDF-1 $\alpha$  der wichtigste HSC-Retentionsfaktor, der zudem die Größe des Stammzellreservoirs kontrolliert (Sugiyama et al., 2006).

Ein zweites wichtiges Ligand-Rezeptor-Paar im Knochenmark setzt sich aus Angiopoietin 1, das von osteoblastischen und Nestin-exprimierenden Zellen sowie Megakariozyten sezerniert wird, und seinem Rezeptor Tie2 zusammen (Li et al., 2001; Sacchetti et al., 2007). Diese Wechselwirkung reguliert die Erhaltung der ganz frühen LT-HSCs durch Förderung ihres Ruhezustands und wurde durch Deletion von Tie2 mit daraus resultierenden Defekten der HSCs nachgewiesen (Arai et al., 2004; Puri and Bernstein, 2003). Ebenso essentiell für die Steuerung der HSCs ist der von Endothelzellen, Osteoblasten und verschiedenen MSC-Subpopulationen exprimierte Stammzellfaktor (SCF, stem cell factor; auch als Kit-Ligand bekannt), denn eine Deletion von SCF als auch von seinem Rezeptor c-Kit hatte bei Mäusen eine verringerte Zahl und Funktion der Stammzellen zur Folge (Kiel and Morrison, 2008; Mercier et al., 2012). Leber und Niere sind die Hauptquellen für ein weiteres regulierendes Molekül, das Thrombopoietin, welches vermutlich über den Blutkreislauf ins Knochenmark gelangt, wobei Knochenmarkstromazellen bei hämatopoetischem Stress ebenfalls zur Thrombopoietin-Synthese in der Lage sind (Guerriero et al., 1997; Sungaran et al., 1997). Dieser Faktor ist wichtig für den HSC-Ruhezustand. Die Deletion von Thrombopoietin oder seinem Rezeptor MPL in der Maus führte zu einer drastischen Abnahme der HSCs im Knochenmark (Kimura et al., 1998; Qian et al., 2007; Yoshihara et al., 2007).

Als essentieller Bestandteil der mineralisierten Knochenmatrix kommen Kalziumionen in sehr hohen Konzentration im endostealen Bereich des Knochenmarks vor und können von HSPCs durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen Rezeptor auf ihrer Oberfläche wahrgenommen werden (Adams et al., 2006). Mäuse ohne diesen Rezeptor fallen durch eine verringerte Zellularität und Abnahme der HSCs im Knochenmark sowie durch eine gesteigerte HPC-Mobilisierung in den Blutkreislauf und in die Milz auf (Adams et al., 2006). HSCs exprimieren darüber hinaus den Oberflächenrezeptor Notch1, dessen Ligand Jagged1 hauptsächlich von Osteoblasten und Endothelzellen synthetisiert wird und die Selbsterneuerung der Stammzellen steuert (Butler et al., 2010; Reya et al., 2003; Varnum-Finney et al., 1998). Allerdings hatte die Deletion dieser Faktoren keine auffälligen Folgen für die Hämatopoese, sodass sie vermutlich für das normale physiologische Gleichgewicht im Knochenmark von geringerer Bedeutung sind und erst bei bestimmten Stresssituationen ins Spiel kommen (Mancini et al., 2005). Ebenso kontrovers ist die Diskussion über die Bedeutung des Adhäsionsmoleküls N-Cadherin, das zwar von mehreren Nischenzelltypen exprimiert wird, dessen Deletion jedoch keinen Einfluss auf die Menge, Mobilisierung, Proliferation oder Repopulationsfähigkeit der HSCs hatte (Arai et al., 2012; Bromberg et al., 2012; Greenbaum et al., 2012; Hosokawa et al., 2010; Kiel et al., 2009; Li and Zon, 2010).

Eindeutig belegt ist dagegen die Funktion des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), das auf der Oberfläche von Endothelzellen sowie Zellen der osteoblastischen Linie zu finden ist und über das Integrin  $\alpha 4\beta 1$  (auch als VLA4, very late antigen 4, bekannt) mit den HSPCs reagiert und ihren Verbleib in der Nische sichert (Jiang et al., 2009; Ulyanova et al., 2007). E-Selektin, ein endothelspezifisches Oberflächenprotein, reguliert einerseits die Einwanderung von HPCs ins Knochenmark aus dem Blut und fördert andererseits die HSC-Proliferation, während eine E-Selektin-Deletion oder eine Blockade durch Antagonisten zum Ruhezustand der HSCs führen (Frenette et al., 1998; Winkler et al., 2012). Adipozyten vermitteln ihre expansionshemmende Wirkung gegenüber HSCs durch erhöhte Expression des Semaphorin-Rezeptors Neuropilin 1, der unter anderem eine Funktion bei der Angiogenese hat (Chitteti et al., 2010).

### **1.2.3 ECM der Stammzellnische**

Nicht minder wichtig bei der Regulation der HSCs ist die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM), die für die Einbettung der Nischenzellen und ihre adhäsiven und migratorischen Eigenschaften, aber auch für die Speicherung und Freisetzung wichtiger löslicher Fak-

toren sowie für die Vermittlung biomechanischer Einflüsse entscheidend ist. In der Regel wird die HSC-ECM-Interaktion durch Rezeptoren auf der Oberfläche der Stammzellen, die Integrine, vermittelt. Im Gegensatz zu den zahlreichen Studien zur Funktion der zellulären Nischenbestandteile, ist die Bedeutung einzelner ECM-Komponenten noch wenig untersucht. Das Knochenmark ist besonders reich an fibrillärem Kollagen Typ I, dessen Hauptproduzenten die osteoblastischen Zelllinien sind. Wird in der Maus die Expression des  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen Rezeptors in den HSCs gehemmt, so sind sie nicht mehr in der Lage, den endostealen Bereich durch Bindung an Kollagen Typ I zu besiedeln (Adams et al., 2006). Das mikrofibrilläre Kollagen Typ VI wird ebenfalls im humanen Knochenmark exprimiert und zeigt einen stark adhäsiven Charakter gegenüber mononukleären Knochenmarkzellen *in vitro* (Klein et al., 1995b). Auch das Fibrillen-assoziierte Kollagen Typ XIV konnte in humanem Knochenmark detektiert werden (Klein et al., 1998). In *in vitro*-Adhäsionsstudien bindet es vorwiegend Zellen lymphatischen und myeloischen Ursprungs. Ob es aber eine direkte Rolle bei der HSC-Retention spielt oder nur für die Adhäsion von Progenitoren essentiell ist, muss noch untersucht werden.

Adhäsive und proliferationsfördernde Eigenschaften gegenüber HSPCs wurden für das Glykoprotein Tenascin-C nachgewiesen (Ekblom et al., 1993; Klein et al., 1993; Seiffert et al., 1998). Die Bindung der Stammzellen an Tenascin-C wird über das Integrin  $\alpha 9\beta 1$  vermittelt, was durch eine deutliche Abnahme der HSPC-Proliferation und ihrer Adhäsion an Osteoblasten *in vitro* nach Blockierung des Rezeptors mit einem spezifischen Antikörper gezeigt wurde (Schreiber et al., 2009). *In vivo* hatte die Depletion von Tenascin-C in der Maus zwar keinen Einfluss auf die Leukozyten-Zahl im Knochenmark und im peripheren Blut, jedoch war die Menge der hämatopoetischen Vorläufer auffällig reduziert (Ohta et al., 1998). Ein weiteres ECM-Glykoprotein, das Osteopontin, wird vorwiegend im endostealen Bereich durch osteoblastische Zellen synthetisiert und ist ein negativer Regulator des Stammzellreservoirs in der Nische, denn der Osteopontin-Knockout bei der Maus hatte eine erhöhte HSC-Zahl im Knochenmark zur Folge (Nilsson et al., 2005; Stier et al., 2005). Die Interaktion mit dieser Matrixkomponente erfolgt über die Integrine  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 9\beta 1$  (Grassinger et al., 2009).

Dagegen zeigen Mitglieder der Fibulin-Familie, einer Gruppe Kalzium-bindender Glykoproteine, anti-adhäsive und anti-proliferative Eigenschaften gegenüber  $\text{CD}34^+$  hämatopoetischen Zellen *in vitro* (Hergeth et al., 2008). Das Heparansulfat-Proteoglykan Perlecan wirkte *in vitro* ebenfalls anti-adhäsiv, konnte aber den exogen zugefügten Wachstumsfaktor GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) binden und den Zellen zur Verfügung stellen (Klein et al., 1995a). Ein weiteres nischenspezifisches Proteoglykan ist das durch MSCs und

Osteoblasten hergestellte Agrin, das von den HSPCs durch den Oberflächenrezeptor  $\alpha$ -Dystroglykan wahrgenommen wird (Mazzon et al., 2011). Das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure ist ebenfalls mit HSCs assoziiert und stellt nicht nur eine physikalische Stütze zur erleichterten Einbettung der Zellen ins Knochenmark dar, sondern sichert auch deren Verbleib in der Nische durch Wechselwirkung mit dem Rezeptor CD44 auf der Stammzelloberfläche (Avigdor et al., 2004; Haylock and Nilsson, 2006; Lee et al., 2000).

Besonders zu erwähnen bei der Funktion der Nischenmatrix sind auf jeden Fall die Laminine (LM). Diese heterotrimeren Glykoproteine setzen sich aus je einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette zusammen und ergeben auf diese Weise 16 verschiedene LM-Isoformen mit unterschiedlichen Funktionen und einer gewebespezifischen Verbreitung (Scheele et al., 2007). Im Knochenmark bilden sinusoidale Zellen eine lamininreiche Basalmembran. Jedoch synthetisieren auch Zellen ohne Basalmembran, wie Osteoblasten und Stromazellen, größere Mengen der LM-Isoformen mit  $\alpha$ 4- und  $\alpha$ 5-Ketten (Gu et al., 1999; Gu et al., 2003; Siler et al., 2000). Dabei ist LM-511 die Isoform mit den stärksten adhäsiven Eigenschaften gegenüber HSPCs und zeigt zudem eine mitogene Wirkung und Beeinflussung der Differenzierung und Migration dieser Zellen *in vitro* (Siler et al., 2000). Vermittelt werden diese Funktionen hauptsächlich durch Integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 (Gu et al., 2003; Siler et al., 2000). LM-411 ist ebenfalls über Integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 an der Adhäsion und Migration der HSPCs beteiligt (Gu et al., 2003).

#### **1.2.4 Biomechanische Einflüsse**

Seit kurzem ist bekannt, dass die physikalische Beschaffenheit der Mikroumgebung, in der die Zellen sich befinden, ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung sowohl adulter als auch embryonaler Stammzellen hat (Engler et al., 2006; Evans et al., 2009; Gilbert et al., 2010; Holst et al., 2010; Huebsch et al., 2010). Auch HSCs werden in ihrer Nische durch biomechanische Parameter wie Substratelastizität oder Steifigkeit und Form der Zellen reguliert. Murine und humane HSPCs können *in vitro* die Elastizität ihres Untergrunds detektieren und im Falle eines weichen Substrats darauf unmittelbar mit gesteigerter Expansion reagieren (Holst et al., 2010). Bei der pharmakologisch induzierten Mobilisierung von Stammzellen konnte als morphologische Besonderheit eine Abflachung der Osteoblasten als Reaktion auf SNS-Signale in der endostealen Nische beobachtet werden (Katayama et al., 2006). Dieser Effekt kann *in vitro* durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation hervorgerufen werden und geht mit einer erhöhten Steifigkeit der Osteoblasten einher. HSPCs haben die Fähigkeit, solche Elastizitätsänderungen über Mechanotransduktion wahrzunehmen, und passen daraufhin

ihr adhäsives und migratorisches Verhalten an (Lee-Thedieck et al., 2012). Darüber hinaus zeigen Knochenmark-MSCs eine starke Abhängigkeit ihres Differenzierungsverhaltens von der geometrischen Zellform, wobei dieser Prozess durch eine auffällige Neuordnung des Zytoskeletts charakterisiert ist (Kilian et al., 2010).

### **1.3 Mobilisierung der Stammzellen**

Täglich gehen ungefähr 1–5 % aller HSCs unter physiologischen Normalbedingungen und ohne vorhergehende Zellteilung aus dem Knochenmark ins Blut über (Bhattacharya et al., 2009). Diese nicht induzierte Stammzellwanderung ist im Rahmen der Geweberegeneration oder Immunabwehr erhöht. Darüber hinaus wurde für das hämatopoetische System ein zirkadianer Rhythmus, der entsprechend den Ruhe- und Aktivitätsphasen des Organismus oszilliert, beobachtet. Hämatopoetische Vorläufer und reife Immunzellen gehen zu Beginn der Ruhephase verstärkt ins periphere Blut über, wobei diese physiologische Mobilisierung durch eine deutliche Expressionsherunterregulierung von SDF-1 $\alpha$  und CXCR4 im Knochenmark charakterisiert ist (Lucas et al., 2008; Mendez-Ferrer et al., 2008). Eine wichtige Rolle bei der Steuerung dieser Vorgänge spielt das SNS, denn das Katecholamin Noradrenalin stimuliert die Proliferation und Migration humaner CD34<sup>+</sup> HSCs (Spiegel et al., 2007).

Im Gegensatz dazu kann für eine Stammzellspende der Austritt der HSPCs aus ihren Knochenmarknischen in den peripheren Blutkreislauf pharmakologisch induziert und die Stammzellen durch Leukapherese aus dem Blut isoliert werden (Pusic et al., 2008). Diese Variante hat aufgrund der geringeren invasiven Maßnahmen beim Spender und der damit verbundenen Schmerzen und Risiken die klassische Knochenmarkspende mit direkter Entnahme der Zellen aus dem Knochen unter Vollnarkose weitgehend ersetzt (Copelan, 2006; Welniak et al., 2007). Hinzu kommt der Vorteil einer schnelleren Rekonstitution des blutbildenden Systems in den Empfängern nach der Transplantation von mobilisierten Stammzellen im Vergleich zur Knochenmarkspende (Hoggatt et al., 2013). Die HSPC-Mobilisierung kann durch chemische Therapeutika wie Cyclophosphamid oder eine Reihe an endogenen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen wie G-CSF, GM-CSF, Interleukin-8 (IL-8) oder Erythropoetin hervorgerufen werden, wobei dieser Prozess je nach Art der verabreichten Agenzien wenige Minuten bis mehrere Tage dauern kann (Fibbe et al., 2000; Greenbaum and Link, 2011; Starckx et al., 2002). Der Grund für die stark abweichende Mobilisierungskinetik liegt vermutlich in den sehr unterschiedlichen Wirkmechanismen der jeweiligen Agenzien (Kronenwett et al., 2000; Nervi et al., 2006).

Klinisch am bedeutsamsten für die Stammzellmobilisierung ist derzeit aufgrund seiner hohen Effizienz das Zytokin G-CSF (Bendall and Bradstock, 2014). Allerdings ist es auch mit einigen Nachteilen behaftet. Besonders bei Patienten mit autologen Transplantationen scheitert die Mobilisierung mit G-CSF aufgrund der starken Stammzelldepletion und Nischenschäden durch vorangegangene chemotherapeutische Behandlungen, was den wiederholten kostenintensiven Einsatz von G-CSF erfordert oder die Transplantation in einigen Fällen unmöglich macht (Hoggatt et al., 2013). Bei gesunden Spendern scheinen zudem genetische Polymorphismen in den Molekülen, die in die Migration und die Nischeneinbettung der HSCs involviert sind, den Erfolg einer G-CSF-Behandlung zu bestimmen (Bendall and Bradstock, 2014). Häufige Nebenwirkungen wie Kopf- und Knochenschmerzen, Müdigkeit und Übelkeit stellen zwar nur eine kurzzeitige Beeinträchtigung der Lebensqualität für die meisten Spender dar, es wurden jedoch, wenn auch sehr selten, schwerwiegende toxische Folgen wie Milzruptur sowie ein erhöhtes Herz- und Hirninfarkttrisiko aufgrund des prokoagulatorischen Potentials von G-CSF berichtet (Bendall and Bradstock, 2014; Hoggatt et al., 2013). Demnach ist eine genaue Aufklärung der Mobilisierungsprozesse unbedingt erforderlich, um diese Risiken insbesondere für gesunde Spender zu minimieren und effizientere Strategien zu entwickeln.

Die pharmakologische Wirkung von G-CSF scheint in erster Linie durch das SNS vermittelt zu werden (Mendez-Ferrer et al., 2010a). Dabei wird parallel eine Reihe zellulärer Prozesse in Gang gesetzt, unter anderem die Expansion und Einwanderung neutrophiler Granulozyten ins Knochenmark (Bendall and Bradstock, 2014). Durch ihre Degranulation entsteht in der Stammzellnische eine anatomische Mikroumgebung mit hoher proteolytischer Aktivität (Greenbaum and Link, 2011; Lapidot and Petit, 2002). Die Freisetzung der Serinproteasen Cathepsin G und neutrophile Elastase sowie der Matrixmetalloproteinasen MMP-2, -8 und -9 initiiert eine Kaskade an Ereignissen, die durch Inaktivierung von Retentionsfaktoren, Aktivierung von mobilisierenden Faktoren und Zytokinen sowie Ab- und Umbau der ECM zum Zusammenbruch wichtiger Zell-Matrix- und Zell-Zell-Verbindungen und letztendlich zum Austritt der HSCs aus ihrer Nische führen (Levesque et al., 2002; Steinl et al., 2013). Die durch mehrere Knochenmarkzelltypen exprimierte Carboxypeptidase M und die von Osteoblasten und Stromazellen sezernierte Cysteinprotease Cathepsin X können SDF-1 $\alpha$  prozessieren und ebenfalls zum Aufbau des proteolytischen Milieus in der Nische beitragen (Marquez-Curtis et al., 2008; Staudt et al., 2010). Darüber hinaus kann die hohe proteolytische Aktivität auch durch Abnahme der Proteasen-Gegenspieler, ihrer endogenen Inhibitoren, verstärkt werden. So waren Serpina1 und -3, Inhibitoren der Serinproteasen, nach G-CSF-Behandlung oder Chemotherapie herunterreguliert (Winkler et al., 2005). Dagegen hat die exogene Verabrei-

chung von Serpina1 die IL-8-induzierte Stammzellmobilisierung in der Maus fast vollständig gehemmt, was die Bedeutung eines adäquaten Gleichgewichts zwischen den proteolytischen Enzymen und ihren Inhibitoren für die HSC-Regulierung hervorhebt (van Pel et al., 2006). Am Ende dieser langen Kette an molekularen Ereignissen steht der Bruch der beiden für die Retention der HSCs wichtigen adhäsiven und chemotaktischen Achsen aus VLA-4/VCAM1 bzw. SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 (Levesque et al., 2001; 2003).

Das Parathormon (PTH) ist ein Peptidhormon der Nebenschilddrüsen und reguliert die Kalzium- und Phosphathomöostase durch Steuerung der Knochenresorption und der Kalzium-Reabsorption in der Niere (Brown, 1983). Patienten mit Schilddrüsenüberfunktion fallen durch ungewöhnlich hohe HSPC-Mengen im peripheren Blut auf, denn PTH hat Einfluss auf die hämatopoetische Nische über seine Osteoblasten aktivierende Wirkung, was zu einer erhöhten Expression des Notch-Liganden Jagged1 und somit zu einer Steigerung des HSC-Pools führt (Brunner et al., 2007; Calvi et al., 2003). Zusätzlich induziert das Hormon die Synthese von SCF und SDF-1 $\alpha$  in osteoblastischen Zellen (Blair et al., 1999; Jung et al., 2006). Bei Mäusen war die Gabe von PTH allein bereits ausreichend, um diverse HSPC-Subpopulationen in signifikanten Mengen zu mobilisieren, was mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert war. Die kombinierte Behandlung mit PTH und G-CSF hatte dabei nur einen geringen synergistischen Effekt, was eine indirekte Wirkung von PTH durch Zunahme der endogenen G-CSF-Synthese im Knochenmark impliziert (Brunner et al., 2008). Basierend auf diesen präklinischen Ergebnissen wurde eine Phase I-Studie mit Patienten, die nach den herkömmlichen Mobilisierungsverfahren keine ausreichend hohen Blutkonzentrationen an CD34<sup>+</sup> Zellen erreichten, durchgeführt und durch kombinierte Behandlung mit PTH und G-CSF ein signifikanter Anstieg der Mobilisierung bei 40–47 % der Studienteilnehmer erzielt (Ballen et al., 2007).

Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für die HSC-Retention in der Nische, stellt die SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Achse ein überaus geeignetes Ziel für neue potentielle Mobilisierungsagenzien dar. AMD3100 ist der bisher einzige für die klinische Anwendung zugelassene CXCR4-Antagonist, der durch spezifische und reversible Bindung an den Rezeptor die Signalwirkung von SDF-1 $\alpha$  unterbindet (Broxmeyer et al., 2005; Devine et al., 2008). Im Vergleich zur alleinigen Gabe von G-CSF stellte sich die kombinierte Verabreichung von AMD3100 und G-CSF als effektivere Variante zur Mobilisierung von humanen CD34<sup>+</sup> Zellen heraus (Liles et al., 2005). Allerdings bindet dieses Molekül auch an CXCR7, einen weiteren Rezeptor für SDF-1 $\alpha$ , und kann bei den Empfängern zu gastrointestinalen Nebenwirkungen führen (Burns et al., 2006; Flomenberg et al., 2005; Kalatskaya et al., 2009). Eine leichte zytotoxische Wir-

kung durch Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion wurde ebenfalls beschrieben (Zirafi et al., 2015). Daher ist eine detaillierte Aufklärung und Optimierung der Mobilisierungsvorgänge im Knochenmark auf jeden Fall unumgänglich.

#### **1.4 Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren**

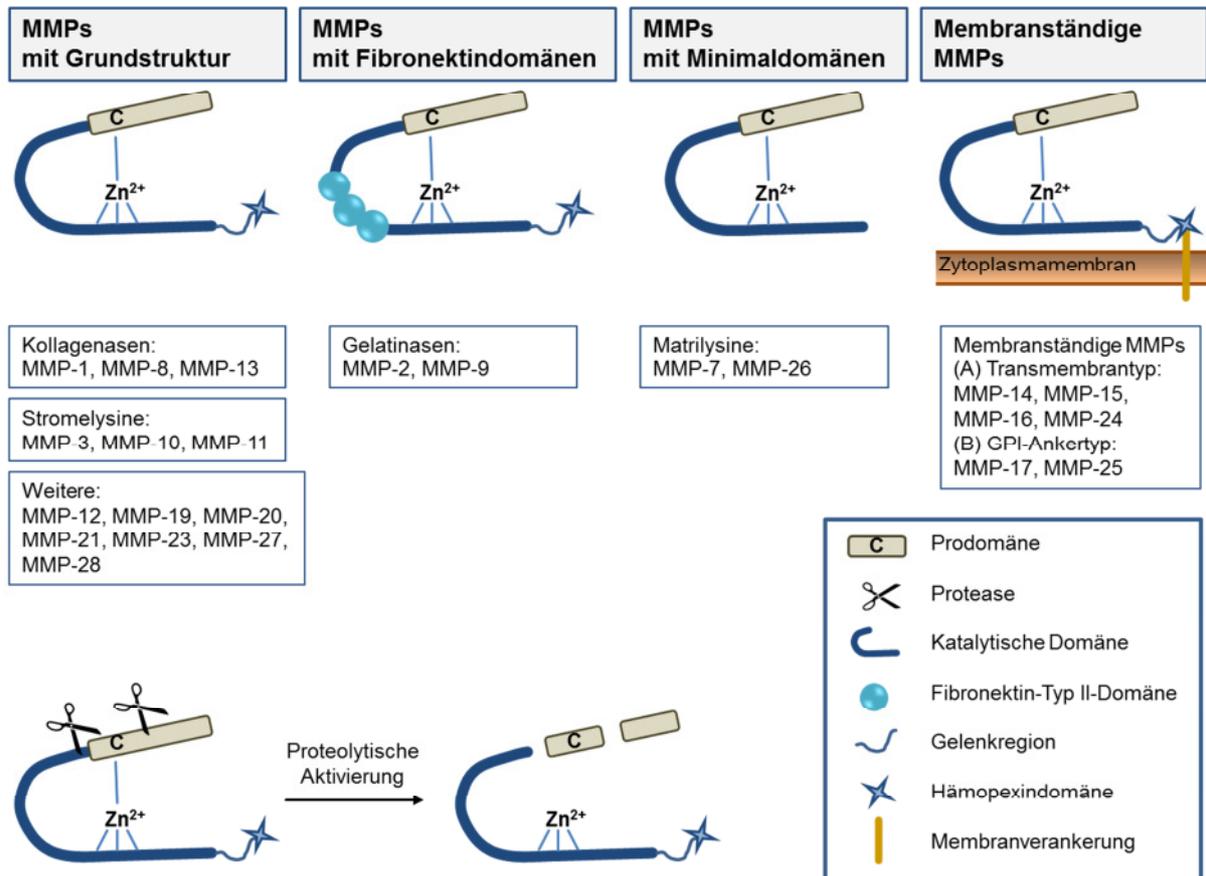
Rund 2 % aller Genprodukte des humanen Genoms sind Proteasen, sie bilden damit eine der größten Proteingruppen. In den letzten Jahren hat sich die allgemeine Betrachtungsweise der Proteasen von ausschließlich für den Proteinabbau bestimmten Enzymen hin zu wichtigen Signalgebern gewandelt (Turk and Turk, 2008). Eine der wichtigsten Gruppen stellen die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) dar. Sie sind aufgrund ihrer proteolytischen Fähigkeiten in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert, wobei in erster Linie der Ab- und Umbau der ECM zu nennen ist. Diese Eigenschaft macht sie zu wichtigen Komponenten der Kanzerogenese, wo sie durch Beseitigung der physikalischen Barrieren im Gewebe die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen ermöglichen (Hua et al., 2011). Sie lösen die Freisetzung bioaktiver Moleküle aus, regulieren die Aktivität von Wachstumsfaktoren und Zytokinen und induzieren die epithelial-mesenchymale Transition (Hua et al., 2011). Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht der Krebstypen, die mit einer auffälligen MMP-Überexpression assoziiert sind.

**Tabelle 1-1. Assoziation von MMP-Überexpression und Krebs (angepasst aus Kessenbrock et al., 2015).**

<b>Protease</b>	<b>Krebstyp</b>
<b>MMP-1</b>	Brust, Kopf-Hals, Kolon, Haut
<b>MMP-3</b>	Kolorektum, Kopf-Hals, Haut
<b>MMP-7</b>	Kolorektum
<b>MMP-9</b>	Lymphom
<b>MMP-10</b>	Kopf-Hals
<b>MMP-11</b>	Brust
<b>MMP-12</b>	Kopf-Hals, Lunge, Speiseröhre, Bauchspeicheldrüse, Lymphom
<b>MMP-13</b>	Brust
<b>MMP-14</b>	Speiseröhre

Im humanen Proteom wurden bisher 23 MMPs identifiziert. Sie bilden eine Familie von Endopeptidasen mit einem  $Zn^{2+}$ -Ion, das von drei konservierten Histidinen im aktiven Zentrum

komplexiert wird, und sind hauptsächlich für die proteolytische Prozessierung von extrazellulären Matrixproteinen zuständig (Nagase et al., 2006; Page-McCaw et al., 2007). Anhand ihrer Substratspezifität, Lokalisation und Struktur werden MMPs in mehrere Gruppen eingeteilt (Abbildung 1-3).



**Abbildung 1-3. Schematische Struktur der Matrixmetalloproteinasen und ihre Einteilung in Gruppen.** Die Grundstruktur der inaktiven Proform setzt sich aus der Prodomäne, die über ein Cystein das  $Zn^{2+}$ -Ion im aktiven Zentrum komplexiert, und der katalytischen Domäne, die über eine Gelenkregion mit der Hämopexindomäne verbunden ist, zusammen. Sämtliche Kollagenasen und Stromelysine sowie weitere MMPs weisen diese Struktur auf. Gelatinasen besitzen zusätzlich drei Fibronektin-Typ II-Domänen. Den Matri lysinen fehlt die Gelenk- und die Hämopexindomäne. Membranebundene MMPs können über eine Transmembrandomäne oder einen Glycosylphosphatidylinositol-Rest (GPI) in der Zytoplasmamembran verankert sein. Bei der Aktivierung der Proform wird die Prodomäne durch proteolytische Spaltung, wie in der unteren Bildhälfte dargestellt, entfernt.

Allen MMPs ist ein Signalpeptid für den Transport in den Extrazellulärraum und eine Prodomäne, die durch einen Cysteinrest ebenfalls an der Komplexierung des katalytisch aktiven  $Zn^{2+}$ -Ions beteiligt ist, gemeinsam. Die Cystein-Zink-Interaktion sorgt für den Verbleib des Enzyms in der inaktiven Proform (Zymogen) durch Verdrängung des für die Katalyse erforderlichen

derlichen H<sub>2</sub>O-Moleküls und durch Rückfaltung der Prodomäne über die katalytische Domäne für eine sterische Hinderung der Substratumsetzung. Die Aktivierung der Zymogene durch proteolytisches Entfernen der Prodomäne kann autokatalytisch oder durch andere Proteasen erfolgen. *In vitro* kann sie zudem durch Quecksilberverbindungen induziert werden (Nagase et al., 1990). Über ein kurzes Gelenkstück ist der katalytische Bereich bei allen MMPs bis auf MMP-7, -23 und -26 mit einer Hämopexindomäne verbunden. Diese vierblättrige  $\beta$ -Propellerstruktur im carboxyterminalen Bereich trägt maßgeblich zur Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem Enzym und dem zu spaltenden Molekül bei und bestimmt demnach seine Substratspezifität (Kessenbrock et al., 2015).

MMPs leisten einen erheblichen Beitrag zum Aufbau des proteolytischen Milieus bei der HSPC-Mobilisierung (Lapidot and Petit, 2002). Die Gelatinase MMP-9 spaltet den HSC-regulierenden Faktor SCF, seinen Rezeptor c-Kit sowie SDF-1 $\alpha$  (Heissig et al., 2002; Levesque et al., 2003a; 2003b). Die Fähigkeit zur Inaktivierung des Hauptretentionsfaktors SDF-1 $\alpha$  wurde zudem für die sezernierten MMP-2 und MMP-8 sowie für die membranständige MMP-14 belegt (McQuibban et al., 2001; Steinl et al., 2013). Sie prozessieren das Chemokin im aminoterminalen Bereich, wo die ersten acht Aminosäuren essentiell für die Bindung an CXCR4 sind, und reduzieren somit seine chemotaktische Wirkung gegenüber den Stammzellen (Janowski, 2009). Die beiden Gelatinasen MMP-2 und -9 können ECM-Substrate wie Fibronectin, verschiedene Kollagen-Typen und Laminin-Isoformen prozessieren und werden vor allem von neutrophilen Granulozyten in hohen Konzentrationen ins Knochenmark abgegeben (Kollet et al., 2006; Patterson et al., 2001). HSCs selbst können ebenfalls MMP-2 und MMP-9 sezernieren, was jedoch eine größere Rolle bei der Einwanderung der Stammzellen ins Knochenmark nach erfolgter Transplantation als bei ihrer Mobilisierung spielen dürfte (Janowska-Wieczorek et al., 1999; Zheng et al., 2003).

Über die tatsächliche Bedeutung von MMP-9 beim Mobilisierungsprozess besteht noch Uneinigkeit. Einerseits war die HSC-Rekrutierung in MMP-9-defizienten Mäusen oder nach Behandlung mit einem MMP-9-spezifischen Antikörper in Affen beeinträchtigt (Heissig et al., 2002; Pruijt et al., 1999), andererseits konnten mehrere Arbeitsgruppen keinen Effekt eines MMP-9-Knockouts in Mäusen feststellen (Levesque et al., 2004; Robinson et al., 2003). Für MMP-2 wurde dagegen die Beteiligung kürzlich auch *in vitro* belegt. Die Sekretion der aktivierten MMP-2 durch humane MSCs nach direkter Stimulation mit G-CSF führte zur Erhöhung der HSPC-Migrationsrate durch einen konfluenten MSC-Zellrasen und konnte mit einem spezifischen Antikörper gegen MMP-2 gehemmt werden, während ein MMP-9-spezifischer Antikörper keinen Effekt hatte (Ponte et al., 2012). Die Migration der HSPCs in

dieser Studie konnte außerdem durch einen MMP-Inhibitor mit einem breiten Aktivitätsspektrum reduziert werden, sodass ein Beitrag weiterer MMPs zur G-CSF-Wirkung nicht auszuschließen ist.

Die neutrophile Kollagenase MMP-8 ist ein weiteres Schlüsselenzym in der Stammzellmobilisierung. Hohe Mengen zirkulierender HSPCs im Blut G-CSF-behandelter Probanden waren mit signifikant erhöhten MMP-8- und MMP-9-Serumkonzentrationen assoziiert. Beide Proteasen waren darüber hinaus hoch konzentriert im Nabelschnurblut, was ihre Beteiligung an der physiologischen Mobilisierung während der Embryonalentwicklung impliziert (Steinl et al., 2013). Die SDF-1 $\alpha$ -abhängige HSPC-Migration wurde nach der Prozessierung des Chemokins durch MMP-8 deutlich beeinträchtigt. Die HSPC-Adhäsion an Osteoblasten wurde durch Zugabe der aktivierten Protease signifikant reduziert, wobei das verantwortliche Adhäsionsmolekül noch nicht genau identifiziert werden konnte (Steinl et al., 2013).

Die membrangebundene MMP-14 (MT1-MMP, membrane type 1-MMP) ist bekannt für ihre zellmotilitätsfördernde Eigenschaft durch Verdau der umgebenden perizellulären Matrix und für die Inaktivierung von SDF-1 $\alpha$  und von Adhäsionsmolekülen wie Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, Syndecan-1 und CD44 (Endo et al., 2003; Itoh and Seiki, 2006). Durch G-CSF mobilisierte HSPCs im peripheren Blut waren durch eine deutlich höhere MMP-14-Expression als die ruhenden Stammzellen im Knochenmark charakterisiert. Eine auffällige Herunterregulierung des membranassoziierten MMP-14-Inhibitors RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) auf der HSPC-Oberfläche ging mit dieser Beobachtung einher (Vagima et al., 2009). Zusätzlich ist MMP-14 in der Lage, die zymogene Form von MMP-2 in einem ternären Komplex mit dem MMP-Inhibitor TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinases) durch Proteolyse zu aktivieren (Zitka et al., 2010). Somit kann die durch G-CSF ausgelöste Hochregulierung von MMP-14 durch Aktivierung von MMP-2 eine Aktivierungskaskade weiterer Vertreter dieser Proteasengruppe im Knochenmark initiieren (Overall, 2002; Shirvaikar et al., 2010).

Für TIMPs, die endogenen Inhibitoren der MMPs, wurden kürzlich ebenfalls Funktionen bei der HSC-Regulierung beschrieben. Nach induzierter Myelosuppression in Mäusen war die Expression von TIMP-3 im Knochenmark auffällig angestiegen und hatte eine erhöhte Proliferation von HSCs und multipotenten Vorläufern zur Folge (Nakajima et al., 2010). Diese Effekte waren unabhängig von der MMP-hemmenden Eigenschaft von TIMP-3 und vermutlich auf eine direkte Hemmung der Wirkung von Angiopoietin 1, eines wichtigen Faktors für die Regelung des HSC-Ruhezustands, zurückzuführen. Eine Bedeutung dieses Inhibitors für die Stammzellmobilisierung wurde vorgeschlagen, nachdem seine Überexpression im

murinen Knochenmark zum Anstieg der HSC-Proliferation und Rekrutierung von Zellen in die Peripherie führte (Shen et al., 2010).

## 1.5 Cathepsine

Zu den Cathepsinen zählt eine Gruppe lysosomaler Cysteinproteasen vom Papain-Typ mit homologen Aminosäuresequenzen. Neben dem Beitrag zum intrazellulären Proteinumsatz sind sie auch erheblich an der Prozessierung und Aktivierung anderer Proteasen, an der Antigenprozessierung und -präsentation sowie am Knochenumbau beteiligt (Turk and Turk, 2008). Die derzeit bekannten humanen Cystein-Cathepsine B, C, F, H, K, L, O, S, V, W und X/Z/P werden als Präproenzyme synthetisiert (Rossi et al., 2004). Bei der Translokation ins endoplasmatische Retikulum wird das Signalpeptid entfernt, anschließend erfolgt die Glykosylierung des Proenzym, das dann durch proteolytische Prozessierung in die aktive Form überführt wird. Das Propeptid ist für die richtige Faltung und die Stabilität des Enzyms erforderlich und wird erst in der sauren Umgebung des endosomalen/lysosomalen Systems abgespalten (Turk and Turk, 2008). Diese Abspaltung kann autokatalytisch bei Endopeptidasen wie Cathepsin B, K, L und S erfolgen oder aber mit Hilfe anderer Proteasen bei Exopeptidasen wie Cathepsin C (Dahl et al., 2001).

In der Regel sind Cystein-Cathepsine kleine monomere Enzyme mit einem Molekulargewicht von 24–35 kDa. Das katalytische Zentrum wird durch einen Cystein- und einen Histidin-Rest gebildet, ihr Aktivitätsmaximum liegt im sauren Bereich bei pH-Werten zwischen 4 und 6.5 (Grzonka et al., 2001). Die meisten Vertreter dieser Gruppe fungieren vorwiegend als Endopeptidasen, während Cathepsin X ausschließlich als Exopeptidase und zwar als Carboxy-monopeptidase oder -dipeptidase aktiv ist (Klemencic et al., 2000). Im Allgemeinen haben Cystein-Cathepsine ein breites Spektrum an Substraten und spalten vorzugsweise carboxy-terminal von basischen oder hydrophoben Aminosäuren (Turk et al., 2001). Viele Komponenten der extrazellulären Matrix werden von Cathepsinen umgesetzt. Tabelle 1-2 gibt einen Überblick über einige Cathepsin-Substrate aus der ECM, von denen viele auch integrale Bestandteile der Stammzellnischen im Knochenmark sind.

**Tabelle 1-2. Durch Cystein-Cathepsine prozessierte Bestandteile der extrazellulären Matrix (angepasst aus Brömme and Wilson, 2011).**

ECM-Protein	Cystein-Cathepsin
Proteoglykane	Cathepsin B, L
Aggrecan	Cathepsin B, K, L, S
Kollagen Typ I	Cathepsin K, L
Kollagen Typ II	Cathepsin B, K, L
Kollagen Typ IV	Cathepsin B
Elastin	Cathepsin K, L, S, V
Fibronektin	Cathepsin B, L, S
Laminin	Cathepsin B, L
Osteokalzin	Cathepsin B, L, S
Osteonektin	Cathepsin B, K

Eine Behandlung mit G-CSF induzierte im murinen Knochenmark eine erhöhte Sekretion der knochenabbauenden Cystein-Protease Cathepsin K durch Osteoklasten. In dieser Studie wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Prozessierung und Inaktivierung der HSC-regulierenden Faktoren SDF-1 $\alpha$  und SCF durch Cathepsin K und einem Anstieg primitiver hämatopoetischer Vorläufer im Blutkreislauf hergestellt (Kollet et al., 2006). Darüber hinaus kann auch Osteopontin, das durch seine proliferationshemmende Eigenschaft die Größe des HSC-Pools reguliert, ebenfalls von Cathepsin K prozessiert werden (Bossard et al., 1996). Cathepsin G ist ein Mitglied der Serin-Proteasen und von großer Bedeutung bei der G-CSF-induzierten Stammzellmobilisierung. Es wird in hohen Konzentrationen durch neutrophile Granulozyten ins Knochenmark sezerniert und trägt zur Degradation des HSC-Adhäsionsmoleküls VCAM-1, des Chemokins SDF-1 $\alpha$  und seines Rezeptor CXCR4 bei (Levesque et al., 2002; 2003).

Osteoblasten exprimieren die Cystein-Cathepsine B, K, L und X. Für Cathepsin B konnte ein Anstieg der Sekretion nach Stimulation mit PTH, das ebenfalls zur Stammzellmobilisierung fähig ist, gezeigt werden (Aisa et al., 1996; 2003; Staudt et al., 2012). Alle vier Proteasen konnten *in vitro* den HSC-Retentionsfaktor SDF-1 $\alpha$  prozessieren, wobei Cathepsin L und B die höchste Effizienz hatten. Allerdings führte nur die Degradation mit Cathepsin B zu einem vollständigen Verlust der chemotaktischen Wirkung von SDF-1 $\alpha$ , wie es in einem Migrationsversuch mit HSPCs analysiert wurde. Cathepsin L konnte das Chemokin teilweise inaktivieren, die HSPC-Migration jedoch nicht komplett hemmen (Staudt et al., 2012). Cathepsin X

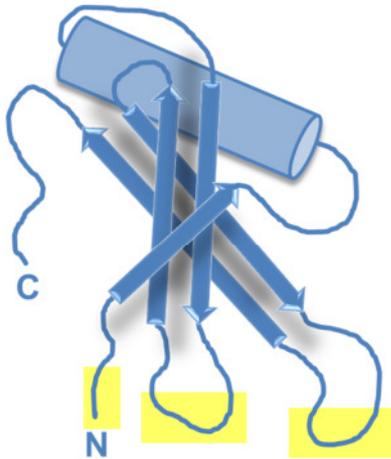
scheint darüber hinaus noch ein weiteres wichtiges Substrat in der Stammzellnische zu haben, denn die Adhäsion von HSPCs an Osteoblasten konnte *in vitro* durch Zugabe von exogenem Cathepsin X deutlich reduziert werden (Staudt et al., 2010; 2012).

## 1.6 Cystatine

Die Balance zwischen Proteinsynthese und -abbau ist eine essentielle Voraussetzung für funktionierende Zelleinheiten und den gesamten Organismus. Somit muss für die Aktivität der Cathepsine auch ein entsprechendes Gegengewicht vorhanden sein, das durch ihre endogenen Inhibitoren, die Cystatine, gegeben ist. Cystatine sind evolutionär verwandte Proteasenhemmer mit sehr unterschiedlichen biologischen Aktivitäten (Müller-Esterl et al., 1985). Ursprünglich lediglich als Rettungsmaßnahme bei der Freisetzung lysosomaler Enzyme durch sterbende Zellen betrachtet, sind Cystatine jedoch darüber hinaus in die Regulierung der Knochenresorption, Entzündungsprozesse, Hormonprozessierung und Antigenpräsentation involviert, lösen chemotaktisches Verhalten bei Granulozyten aus und spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegen bakterielle und virale Infektionen (Magister and Kos, 2013; Pierre and Mellman, 1998). Des Weiteren sind sie an der Steuerung proteolytischer Systeme bei Immunerkrankungen und vielen Krebsvarianten beteiligt und kommen daher auch als Biomarker in Frage (Calkins and Sloane, 1995; Kos et al., 2000).

Humane Cystatine bilden eine Superfamilie, die anhand der Molekülstruktur und der Verbreitung im Organismus in drei Hauptgruppen unterteilt wird. Inhibitoren vom Typ I, auch Stefine genannt, umfassen Stefin A und B, sind vorwiegend intrazellulär lokalisiert, haben ein Molekulargewicht von ungefähr 11 kDa und bestehen aus einer Domäne, die weder Disulfidbrücken noch Glykosylierungen aufweist (Vray et al., 2002). Cystatine vom Typ II werden aufgrund des Vorhandenseins eines N-terminalen Signalpeptids von 20–26 Aminosäuren Länge über die Zellmembran in extrazelluläre Bereiche transportiert und sind daher in vielen Körperflüssigkeiten zu finden (Abrahamson et al., 1986). Sie bestehen ebenfalls aus einer Domäne ohne Glykosylierung, jedoch mit zwei Disulfidbrücken im carboxyterminalen Bereich und sind im Schnitt 14 kDa groß. Zu dieser Gruppe gehören Cystatin C, D, E/M, F, S, SA und SN, wobei einige Vertreter auch intrazelluläre Funktionen haben (Pierre and Mellman, 1998). Die dritte Hauptgruppe schließlich besteht aus den multifunktionalen Glykoproteinen L- und H-Kininogen, die sich aus mehreren Cystatin-ähnlichen Domänen zu Molekülen von 60–120 kDa Größe zusammensetzen und in hohen Konzentration im Blutplasma vorkommen (Salvesen et al., 1986).

Als gemeinsame Proteingrundstruktur weisen die Inhibitoren ein fünfsträngiges, antiparallel verlaufendes  $\beta$ -Faltblatt, das sich um eine zentrale  $\alpha$ -Helix hüllt, auf (Abbildung 1-4). Dadurch entsteht eine keilförmige Konformation mit einem teilweise flexiblen N-terminalen Segment und zwei  $\beta$ -Haarnadelschleifen, die zusammen für die hemmende Eigenschaft der Cystatine verantwortlich sind (Bode and Huber, 2000).



**Abbildung 1-4. Schematische Darstellung der Cystatin-Faltstruktur.** Typisch für Cystatine ist eine zentrale, aus fünf Windungen bestehende  $\alpha$ -Helix, die von einem antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblatt umgeben ist. Die für die inhibitorische Wirkung verantwortlichen  $\beta$ -Haarnadelschleifen und das N-terminale Segment sind gekennzeichnet.

Die Interaktion zwischen Cystatinen und den Proteasen erfolgt in einem einstufigen Prozess durch kompetitive, nicht kovalente und somit reversible Bindung im nano- bis pikomolaren Bereich. Trotz der teilweise hohen strukturellen Homologie zeigen sie dabei recht unterschiedliche Enzymaffinitäten (Grzonka et al., 2001). Tabelle 1-3 gibt einen Überblick über die Spezifität einzelner Cystatine und ihre Inhibitionskonstanten im Komplex mit den jeweiligen Cystein-Cathepsinen.

Diverse Studien zur Interaktion der Inhibitoren mit Cathepsinen haben ergeben, dass Enzyme mit einem blockierten aktiven Zentrum immer noch Cystatine binden konnten, wenn auch mit einer verringerten Affinität (Grzonka et al., 2001). Daraus konnte man ableiten, dass die Hemmung anders als beim Enzym-Substrat-Komplex nicht durch eine direkte Wechselwirkung mit dem katalytisch aktiven Cystein der Protease, sondern durch hydrophobe Wechselwirkungen des N-terminalen Segments und der beiden  $\beta$ -Haarnadelschleifen des Inhibitors mit entsprechenden Positionen in der Bindetasche des Enzyms erfolgt (Grzonka et al., 2001). Die Aminosäuresequenzen in den interagierenden Bereichen sind in den Cystatin-Familien hoch konserviert (Tabelle 1-4).

**Tabelle 1-3. Inhibitionskonstanten  $K_i$  [nM] der Enzym-Cystatin-Komplexe (zusammengetragen aus Turk and Turk, 2008 und Grzonka et al., 2001).**

Cystatin	Cathepsin B	Cathepsin H	Cathepsin L	Cathepsin S
A	8.2	0.31	1.3	0.05
B	73	0.58	0.23	0.07
C	0.27	0.28	<0.005	0.008
D	>1000	7.5	18	0.24
E	32	-	-	-
F	>1000	-	0.31	-
S	-	-	-	-
SA	-	-	-	-
SN	19	-	-	-

**Tabelle 1-4. Konservierte Aminosäuresequenzen in den Bindestellen der humanen Cystatine (entnommen und angepasst aus Grzonka et al., 2001).**

Cystatin	N-Terminus	1. $\beta$ -Schleife	2. $\beta$ -Schleife
A	MIPGG	QVVAG	-
B	AcMMCGA	QVVAG	-
C	RLVGG	QIVAG	VPWQ
D	TLAGG	QIVAG	VPWE
E	RMVGE	QLVAG	VPWQ
F	VKPGF	QIVKG	VPWL
S	IIPGG	QTFGG	VPWE
SA	IIPGG	QIVGG	VPWE
SN	IIPGG	QTVGG	VPWE

Stefin A und B bestehen jeweils aus 98 Aminosäuren und sind vorrangig im Zytosol zu finden. Stefin A wird in höheren Mengen in der Epidermis exprimiert (Turk and Turk, 2008). Die Expression von Stefin B ist dagegen in mehreren Zell- und Gewebetypen nachgewiesen worden. Als reversible Inhibitoren der Cathepsine B, H und L sind die beiden Cystatine vermutlich für die Inaktivierung von freigesetzten lysosomalen Enzymen verantwortlich (Turk and Bode, 1991).

Der am intensivsten untersuchte Vertreter der Typ II-Inhibitoren ist Cystatin C, das in der Literatur gemeinhin als der wichtigste Inhibitor der humanen lysosomalen Cystein-Proteasen, nicht zuletzt aufgrund seiner ubiquitären Verbreitung im menschlichen Körper, genannt wird. Nach Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids (Abbildung 1-5) liegt Cystatin C als nicht glykosyliertes, basisches Protein mit 120 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ungefähr 13.4 kDa vor (Abrahamson et al., 1987). Die Aminosäuren an den Positionen 73 und 83 sowie 97 und 117 bilden jeweils eine Disulfidbrückenbindung. Cystatin C ist ein hoch effektiver, reversibler Inhibitor von Cathepsin B, H, K, L und S (Abrahamson, 1994) und kann aufgrund seiner hohen physiologischen Konzentrationen als wichtiges Werkzeug zur schnellen Enzymneutralisierung bei „Proteasen-Notfällen“ betrachtet werden (Turk et al., 2002).

	MAGPLR	APLLLLLAILA	VALAVSPAAG				
-26	-20	-10	-1	1	10	20	
EGVRRALDFA	VGEYNKASND	MYHSRALQVV	RARK	<b>QIVAGV</b>	NYFLDVELGR		
	30	40	50	60	70		
TTCTKTQPNL	DNCPFHDQPH	LKRKAFCSFQ	IYA	<b>VPWQ</b>	GTMTLSKSTCQDA		
	80	90	100	110	120		

**Abbildung 1-5. Aminosäuresequenz des humanen Cystatin C.** Das Signalpeptid am aminoterminalen Ende ist durch einen grauen Hintergrund markiert. Die konservierten Bereiche der inhibitorisch aktiven  $\beta$ -Schleifen und des aminoterminalen Segments sind durch Fettschrift hervorgehoben.

Die biologischen Funktionen von Cystatin C sind vielfältig. So wird ein verminderter Abbau der Knochenmatrix durch Osteoklasten auf die Hemmung der Cathepsin K-Aktivität durch Cystatin C zurückgeführt (Brage et al., 2005). Aufgrund seiner sehr konstanten Syntheserate und der Tatsache, dass das Protein ausschließlich über glomeruläre Filtration aus dem Blut ausgeschieden, im proximalen Tubulus jedoch vollständig rückresorbiert und abgebaut wird, eignet sich Cystatin C als Marker zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate und der Nierenfunktion (Dworkin, 2001; Laterza et al., 2002). Mutationen und Veränderungen in der Expression von Cystatin C wurden mit einigen Erkrankung in Zusammenhang gebracht. Die hereditäre zerebrale Amyloidangiopathie wird durch eine Punktmutation hervorgerufen und äußert sich in einer massiven Ablagerung von  $\beta$ -Amyloid in den Blutgefäßen des Gehirns (Olafsson et al., 1996). Anomalien in den Cystatin C-Serumkonzentrationen wurden bei Kolon-, Haut-, und Lungenkrebs beobachtet und das Peptid daher als diagnostischer und prognostischer Marker für diese Tumorarten vorgeschlagen (Kos et al., 2000; Zore et al., 2001).

Die Cystatine E/M und F sind zwei glykosylierte Vertreter der Typ II-Cystatine. Humanes Cystatin E/M wurde gleichzeitig von zwei unabhängigen Gruppen entdeckt (Ni et al., 1997; Sotiropoulou et al., 1997). Es wird stark in mehreren Hautschichten exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der epidermalen Verhornung und Aufrechterhaltung der Hautbarriere (Zeeuwen et al., 2007). Diese Funktionen werden durch die hemmende Wirkung gegenüber Cathepsin V und L vermittelt und führen bei fehlerhafter Expression zu Brüchen in der Hautbarriere und Haarverlust (Cheng et al., 2006; 2009). Cystatin F wurde ebenfalls zum ersten Mal parallel von zwei Gruppen beschrieben und ist auch als Leukocystatin bekannt (Halfon et al., 1998; Ni et al., 1998). Seine Expression ist fast ausschließlich auf Zellen des Immunsystems, insbesondere CD8<sup>+</sup> T-Zellen, natürliche Killerzellen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und Mastzellen, beschränkt (Halfon et al., 1998; Hamilton et al., 2008). Das Leukocystatin ist ein ungewöhnliches Mitglied seiner Familie, da es als inaktives, durch Disulfidbrücken verbundenes Dimer synthetisiert und erst unter reduzierenden Bedingungen *in vitro* bzw. durch proteolytische Spaltung im endosomalen/lysosomalen System zum aktiven Monomer wird, das stark inhibitorisch gegenüber Cathepsin F, K, L und V wirkt (Colbert et al., 2011; Langerholc et al., 2005).

Die restlichen Mitglieder der Typ II-Cystatine zeigen ein relativ beschränktes Expressionsmuster im menschlichen Organismus. Die Cystatine S, SA und SN, die in ihrer Aminosäuresequenz paarweise Homologien von 88 % aufweisen, sind in höheren Konzentrationen im Speichel sowie in den Tränen- und Samenflüssigkeiten zu finden (Abrahamson et al., 1986; Minakata and Asano, 1984). Cystatin D kommt hauptsächlich im Speichel vor, in kleineren Mengen auch in der Tränenflüssigkeit (Freije et al., 1993). Demnach können diese Inhibitoren als spezialisierte Drüsen-Cystatine, die in den Drüsensekreten als schützende Faktoren gegen exogen eindringende Cysteinpeptidasen fungieren, betrachtet werden.

Von besonderer Bedeutung ist die Beobachtung, dass die Cathepsin-Inhibitoren bei vielen Krebsvarianten und anderen Erkrankungen eine abweichende Expression im Vergleich zum gesunden Gewebe haben. Eine deutliche Herunterregulierung wurde für Cystatin C beim Prostatakarzinom, für Cystatin E/M beim Brust-, Hirn- und Lungenkrebs und für Stefin B in der Myoklonusepilepsie gezeigt (Briggs et al., 2010; Pennacchio et al., 1996; Wegiel et al., 2009). Auf der anderen Seite sind viele dieser Krankheitsbilder gleichzeitig durch eine erhöhte Cathepsin-Expression charakterisiert (Kuester et al., 2008; Vizin et al., 2012).

## 1.7 Vom Monolayer zur 3D Kultur

In ihrer Gesamtheit betrachtet, ist die Stammzellnische im Knochenmark ein dynamisches Milieu aus biochemischen und biophysikalischen Faktoren, die räumlich und zeitlich unterschiedlich verteilt sind. Die herkömmliche Art der Zellkultur in Petrischalen oder Kulturflaschen ist selten wirklich in der Lage, die Bedingungen, welchen Zellen *in vivo* ausgesetzt sind, wiederzugeben. Besonders die im physiologischen Gewebe äußerst wichtige Zellkommunikation und Architektur geht in Kultur oft verloren. Daher stieg in den vergangenen Jahrzehnten das Bestreben, die Zellkultur in der Weise zu optimieren, dass sie der physiologischen Situation möglichst nahe kommt, was sich in einer rasant wachsenden Zahl an Studien mit dreidimensionalen (3D) Kulturbedingungen äußerte. Dabei kann man zwischen drei typischen Formen der 3D Kultur unterscheiden – den organotypischen Modellen, der Matrixbasierten Kultur und den Sphäroiden (Pampaloni et al., 2007).

Die organotypische Kulturmethode kommt dem lebenden Organismus am nächsten, denn hierfür werden in der Regel kleine Gewebescheibchen direkt den Versuchstieren entnommen und *in vitro* inkubiert (Lin and Chang, 2008). Jedoch wohnt diesem Model durch eine Dicke von mehreren Millimetern der Nachteil des eingeschränkten Transports in die zentralen Bereiche und der erschwerten Visualisierung inne. Die Gewinnung humaner Proben gestaltet sich außerdem recht schwierig und birgt aus ethischer Sichtweise einige Bedenken.

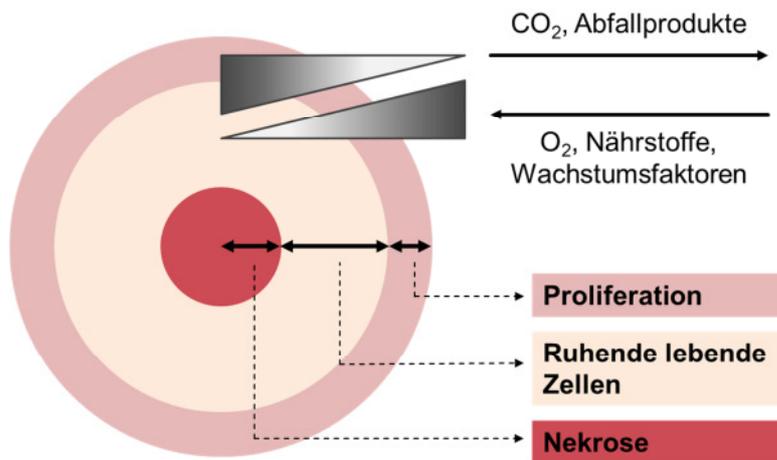
Beim Matrix-unterstützten Ansatz werden dagegen Einzelzellsuspensionen in Gele eingebettet. Üblicherweise bestehen die Gele aus Proteinen der extrazellulären Matrix wie Lamininen oder Kollagenen, denn bereits 1982 konnte gezeigt werden, dass Signale der ECM die Chromatinstruktur und somit die Genexpression in Epithelzellen beeinflussen (Bissell et al., 1982). Viele Studien haben seither den endgültigen Beweis dafür erbracht, dass 3D kultivierte Zellen eine abweichende Genexpression im Vergleich zur herkömmlichen zweidimensionalen (2D) Kultur haben. Matrix-Gele werden meist aus Tieren oder *in vitro*-Kulturen gewonnen und können sich hinsichtlich Qualität und Gehalt verschiedener Wachstumsfaktoren beträchtlich unterscheiden, wodurch die Reproduzierbarkeit der Analysen beeinträchtigt werden kann (Pampaloni et al., 2007). Aus diesem Grund wurden artifizielle Gele auf Biopolymer-Basis generiert, die sich aus Oligopeptiden bei adäquaten physikalisch-chemischen Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Salzgehalt selbst zu einem netzartigen Gerüst organisieren (Seliktar, 2012). Sie bieten den großen Vorteil der Biofunktionalisierung, also des Einfügens bestimmter funktioneller Gruppen, die das Anhaften der Zellen ans Gerüst durch Adhäsionsmoleküle fördern. Häufig wird hierbei die spezifisch durch Integrine erkannte Aminosäurese-

quenz RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) eingefügt (Hersel et al., 2003). Allerdings können die natürlichen Peptidkomponenten der Biopolymere bei Anwendungen, die Proteinextraktionen oder -aufreinigungen beinhalten, Schwierigkeiten bereiten und werden daher teilweise durch Gerüste aus Kunststoff ersetzt. Mit Plastikanordnungen trifft man jedoch auch auf Probleme bei der Applikation, insbesondere aufgrund mangelnder Visualisierungsmöglichkeiten. Darüber hinaus können diese Modelle nicht als eine vollkommene 3D Umgebung angesehen werden, denn zumindest in dem Bereich, wo einzelne Zellen am Scaffold haften, entspricht dies der Kultur als Monolayer. Hierdurch erfährt die Zelle die für die 2D Inkubation typische Polarisierung, die ihre Eigenschaften und Funktionen im Vergleich zur *in vivo*-Situation verändert (Jacks and Weinberg, 2002).

Eine „echte“ 3D Alternative, die ausschließlich durch Zell-Zell-Kontakte zustande kommt und mit der oben genannte technische Nachteile erfolgreich umgangen werden können, bietet die Kultivierung der Zellen in Sphäroiden. Dabei macht man sich mit Hilfe verschiedener Ansätze die den meisten Zelltypen innewohnende natürliche Neigung zur Aggregation zunutze (Fennema et al., 2013). Durch rotierende Vorrichtungen wird das Kulturmedium in permanente Bewegung versetzt, wodurch die darin suspendierten Zellen aggregieren. Diese Technik ist jedoch kostspielig und erlaubt wenig Kontrolle über die Aggregatgröße. Auf der anderen Seite ist der Einsatz von Kulturgefäßen mit minimalem Adhäsionspotential gegenüber Zellen möglich, was allerdings auch oft eine aufwändige Oberflächenbehandlung erfordert. Im Vergleich dazu können Sphäroide einheitlicher Größe besonders einfach und effizient mit Hilfe der „Hanging-Drop“-Methode hergestellt und kultiviert werden (Lin and Chang, 2008). Die Sphäroid-Kultur ist besonders in der Tumor-, Stammzell- und Entwicklungsbiologie sowie bei Screening-Studien aufgrund der Eignung zu Hochdurchsatzverfahren verbreitet (Fennema et al., 2013; Pampaloni et al., 2007). Ein großer Vorteil ist durch die natürlich entstehenden Gradienten hinsichtlich Metabolisierung und Zellproliferation innerhalb der Sphäroide gegeben (Abbildung 1-6), was zusammen mit der Möglichkeit zur Kokultur mehrerer Zelltypen sie zu hervorragenden physiologischen Modellen macht (Lin and Chang, 2008).

Der Wandel von der 2D zur 3D Kultur hat auch bereits bei den *in vitro*-Studien mit hämatopoetischen Stammzellen Einzug gehalten. Zur Nachahmung der natürlichen HSC-Umgebung im Knochenmark wurden Zellen in Hydrogele natürlichen oder synthetischen Ursprungs eingebettet (Ferreira et al., 2012; Leisten et al., 2012; Raic et al., 2014; Sharma et al., 2012). Auch Kulturgefäße mit sehr geringem Adhäsionspotential für Zellen sowie mit Vertiefungen im Mikrometerbereich wurden evaluiert, wobei Letztere lediglich als „quasi-3D“ Modell gelten sollten (Cook et al., 2012; de Barros et al., 2010; Kurth et al., 2011). Besonders identisch

mit der physiologischen Architektur des trabekulären Knochens, also der anatomischen Heimat der Stammzellnischen, sind biokompatible schwammartige Gerüste (Di Maggio et al., 2011; Lee and Kotov, 2009; Pallotta et al., 2011). Jedoch sind viele dieser Methoden durch die Verwendung von Zusätzen tierischen Ursprungs oder durch eine technisch und zeitlich aufwändige Herstellung der Inkubationshilfsmittel mit Nachteilen behaftet und somit für die Routineanwendung oft nicht geeignet.



**Abbildung 1-6. Natürliche Gradienten in Sphäroiden.** Werden Zellen als Sphäroide kultiviert, so entsteht bei einer Aggregatgröße von ungefähr  $500\ \mu\text{m}$  eine mehrschichtige Struktur mit einem nekrotischen Zentrum, das von einem breiten Ring vitaler, aber nicht proliferierender Zellen umgeben ist. Die äußere Schicht setzt sich hingegen aus expandierenden Zellen zusammen. Durch begrenzte Diffusionsmöglichkeiten bilden sich über die verschiedenen Zellschichten natürliche Gradienten für Gase, Nährstoffe und metabolische Abfallprodukte aus (angepasst aus Lin and Chang, 2008).

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Knochenmarknische für hämatopoetische Stammzellen stellt einen der aktivsten Bereiche im menschlichen Körper dar, indem sie die Entstehung reifer Blutzellen reguliert und zugleich für die Aufrechterhaltung des Stammzellreservoirs sorgt. Die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung wird durch ein komplexes Zusammenspiel zellulärer, biochemischer und biophysikalischer Nischenbestandteile erreicht. Für Transplantationszwecke kann eine Mobilisierung der Stammzellen aus der Nische ins periphere Blut pharmakologisch durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine wie G-CSF induziert werden. Physiologisch ist die Mobilisierung durch Entstehung einer proteolytisch hoch aktiven Mikroumgebung, die den Austritt der Stammzellen aus der Knochenmarknische fördert, charakterisiert. Mit Hilfe gene-

tischer und funktioneller Studien wurde ein essentieller Beitrag der Matrixmetalloproteinasen MMP-2, -8, -9 und -14 zur HSC-Mobilisierung bereits bestätigt. Basierend auf der Fähigkeit vieler MMPs zur Prozessierung von Matrix-Proteinen, Cyto- und Chemokinen, die spezifisch für die Stammzellnische sind, und ihrer Überexpression bei kanzerogenen Prozessen, die ebenfalls durch ausgeprägte proteolytische Aktivität und Zellmigration charakterisiert sind, sollte die Involvierung weiterer Mitglieder dieser Enzymgruppe in die HSC-Mobilisierung überprüft werden. Die Expression und Sezernierung von MMPs durch Nischenzellen sollte untersucht und anschließend die Inaktivierung des Hauptretentionsfaktors SDF-1 $\alpha$  durch die Proteasen analysiert werden.

Die Cystein-Proteasen Cathepsin B, K, L und X werden auch von Nischenzellen sezerniert, Cathepsin B kann durch Proteolyse die chemotaktische Funktion von SDF-1 $\alpha$  und folglich die Migration von HSPCs hemmen. Auch diese Enzyme sind bei vielen Tumorvarianten überexprimiert, was oft mit einer Herunterregulierung der Expression ihrer endogenen Inhibitoren, der Cystatine, einhergeht. Die potentielle Funktion der Cystatine in der hämatopoetischen Nische sollte durch Expressionsstudien evaluiert werden. Biochemische Verfahren sollten helfen, ihre hemmenden Eigenschaften gegenüber den im Knochenmark aktiven Cathepsinen zu bestimmen. Die Folgen für die HSPC-Adhäsion und -Migration sollten durch funktionelle Studien untersucht werden. Da MSCs durch ihre HSC-regulierenden Eigenschaften immer bedeutender werden und darüber hinaus ubiquitär im Knochenmarkstroma und in der vaskulären Nische verteilt sind, während die Lokalisation der Osteoblasten nur auf den endostealen Bereich beschränkt ist, wurden Untersuchungen zur Funktion der Proteasen und der Inhibitoren mit MSCs durchgeführt. Für TIMP-3, einen MMP-spezifischen endogenen Inhibitor, wurde kürzlich eine von den Proteasen unabhängige proliferationsfördernde Wirkung auf HSPCs beschrieben. Daher sollten Cystatine ebenfalls auf ein direktes HSC-regulierendes Potential hin überprüft werden.

Häufig ist bei Transplantationen aufgrund der beschränkt verfügbaren Menge an Spenderstammzellen eine *ex vivo*-Expansion erforderlich, wodurch die Qualität der HSPCs hinsichtlich Selbsterneuerung und Differenzierung beträchtlich verringert wird. Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag darin, in einem 3D *in vitro*-Ansatz die Expansion und die Eigenschaften von HSPCs aus Nabelschnurblut in Kokultur mit MSCs aus dem Knochenmark zu untersuchen, da diese Art der Inkubation der tatsächlichen *in vivo*-Organisation der Nische näher kommt als die herkömmliche 2D Kultur. Die Ergebnisse dieser Studien sollen helfen, die Umsetzung der Methoden und Technologien aus dem Labor im klinischen Bereich zu beschleunigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Lösungsmittel und Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder AppliChem (Darmstadt) bezogen.

### 2.2 Geräte

Tabelle 2-1 enthält eine Auflistung der verwendeten Geräte.

**Tabelle 2-1. Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Modell (Hersteller)</b>
Sterilbänke	LaminAir, HBB2448 (Heraeus, Stuttgart)
	BioGARD Hood (The Baker COMPANY, Inc., Sanford, USA)
Zentrifugen	Biofuge fresco (Heraeus)
	Eppendorf Centrifuge 5402 (Eppendorf, Hamburg)
Inkubatoren	HERACELL 240i (Thermo Scientific, Karlsruhe)
	NuAire™, US Auto Flow, CO2 Water-Jacketed Incubator (Plymouth, USA)
PCR-Cycler	PTC-100™ Programmable Thermal Controller (Biozym, Hamburg)
Mikroskope	Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen)
	Zeiss Axiovert 135 (Zeiss)
	XL30 Rasterelektronenmikroskop (Philips, Amsterdam, Niederlande)
	Libra 120 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss)
Durchflusszytometer	BD LSRII (BD Biosciences, Heidelberg)
Ultraschall-Gerät	Sonifier B-12 Branson (Sonic Power Company, Danbury, USA)
SDS-PAGE-Kammer	Mighty Small (Hoefer, San Francisco, USA)
Elektrophorese-Powersupply	EPS 600 (Pharmacia Biotech, Freiburg)
Western Blot-Apparatur	Hoefer® SemiPhor™ (Hoefer)
Entwicklermaschine	Curix 60 (AGFA, Bonn)
CCD-Kamera	Diana III Advanced Imaging System (Raytest, Straubenhardt)
Überkopfschüttler	MACS-Mix™ (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach)
ELISA-Reader	Tecan Genios Reader (Tecan)

**Tabelle 2-1. Geräte (Fortsetzung)**

<b>Gerät</b>	<b>Modell (Hersteller)</b>
Fluorospektrometer	NanoDrop <sup>TM</sup> ND-1000 (Peqlab, Erlangen) Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific, Dreieich) Tecan Fluoroscan (Tecan, Crailsheim)
MALDI-TOF-Gerät	Reflex IV (Bruker Daltonics, Bremen)
Kryostat	CM3050S (Leica)

### 2.3 Rekombinante und native Proteine

Die verwendeten rekombinanten und nativen Proteine sind in Tabelle 2-2 aufgelistet.

**Tabelle 2-2. Rekombinante und native humane Proteine**

<b>Protein</b>	<b>Katalognummer (Hersteller)</b>
Rh Cystatin C	#PHP0044 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
Rh Cystatin C	#C2749 (Sigma-Aldrich)
Rh Cystatin E	#1286-PI (R&D Systems, Wiesbaden)
Rh Cathepsin B	#953-CY (R&D Systems)
Rh Cathepsin L	#952-CY (R&D Systems)
Rh MMP-2	#PF037 (Calbiochem, Darmstadt)
Rh MMP-7	#907-MP (R&D Systems)
MMP-8, nativ, human	#444229 (Calbiochem)
Rh MMP-9	#PF140 (Calbiochem)
Rh MMP-11	#BML-SE282 (Enzo Life Sciences)
Rh MMP-13	# G04MP13C (Giotto Biotech, Florenz, Italien)
Rh MMP-14	#918-MPN (R&D Systems)
Rh SDF-1 $\alpha$	#300-28A (PeproTech, Hamburg)
Rh G-CSF	#GF051 (Millipore, Schwalbach)

(Rh: rekombinant, human)

## **2.4 Isolierung humaner Zellen und Zellkultur**

### **2.4.1 Aufreinigung humaner CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut**

Nabelschnurblutproben von Neugeborenen wurden an der Frauenklinik des Uniklinikums Tübingen nach schriftlicher Einverständniserklärung der Eltern und Freigabe durch die örtlichen Ethikkommission (Projekt-Nr. 005/2012B02) gesammelt und in Reaktionsgefäßen mit Heparin (Braun, Melsungen) als Gerinnungshemmer transportiert. Für die Dichtegradientenzentrifugation zur Trennung der mononukleären Zellen von den Erythrozyten und polymorphkernigen Leukozyten wurde das Blut mit dem doppelten Volumen PBS (Invitrogen, Darmstadt), 2 mM EDTA (Biochrom, Berlin) verdünnt, über Histopaque<sup>®</sup> (1.077 g/ml; Sigma-Aldrich) geschichtet und für 20 min bei 1500 x g, Raumtemperatur (RT) und abgeschalteter Bremse zentrifugiert. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde sorgfältig abgenommen und mit PBS/EDTA gewaschen. Zur Lyse der noch vorhandenen Erythrozyten wurden die Zellen für 5 min bei RT im Erythrozyten-Lysepuffer inkubiert (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7.4). Die Isolierung der CD34<sup>+</sup> HSPCs erfolgte mit Hilfe des MACS-Systems von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) nach Herstellerangaben. Hierzu wurden die mononukleären Zellen in 300 µl pro 1x10<sup>8</sup> Zellen Laufpuffer (PBS, 2 mM EDTA, 0.5 % BSA) aufgenommen, mit je 100 µl FcR-Blocking Reagens und CD34-Microbeads pro 1x10<sup>8</sup> Zellen versetzt und für 30 min invertierend bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden CD34<sup>+</sup> HSPCs nacheinander über zwei Magnetsäulen sortiert und eluiert. Frisch isolierte Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, direkt für Versuche eingesetzt oder bis zur Verwendung in serumfreiem Expansionsmedium (SFEM, StemCell Technologies) mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (1 % P/S; Biochrom) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre inkubiert.

### **2.4.2 Isolierung humaner mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspiraten**

Knochenmarkaspirate von gesunden Probanden wurden an der BG Unfallklinik Tübingen nach schriftlicher Einverständniserklärung der Spender und gemäß den Richtlinien der örtlichen Ethikkommission (Projekt-Nr. 453/2011/B0) gesammelt. Mononukleäre Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation über Histopaque<sup>®</sup> (1.077 g/ml) gewonnen und in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät. Das Wachstumsmedium für MSCs wurde gemäß den aktuellen Leitlinien für gute medizinische Praxis hergestellt (GMP-Medium) und bestand aus

DMEM, 1 g/l Glucose (Lonza, Basel, Schweiz) mit 5 % gefrorenes Frischplasma (TCS Bioscience, Buckingham, UK), 5 % humanes Thrombozytenlysate (Blutspendezentrale, Uniklinikum Tübingen), 2 mM L-Glutamin (Lonza), 1000 IE Natrium-Heparin (Carl Roth) und 25 mM Natrium-HEPES (Sigma-Aldrich). Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre wurden nicht adhärenente Zellen entfernt und adhärenente MSCs weiter expandiert. Das GMP-Medium wurde alle 2–3 Tage gewechselt. Kurz vor Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen durch Accutase<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) vom Flaschenboden abgelöst und in einem Verhältnis von 1:3 in neue Kulturflaschen ausgesät. Für die vorliegende Arbeit wurden MSCs in den Passagen 2 bis 5 verwendet und routinemäßig nach den durch die Konsensuskonferenz der Internationalen Gesellschaft für zelluläre Therapien (ISCT) empfohlenen Minimalkriterien für multipotente MSCs charakterisiert (Dominici et al., 2006).

### **2.4.3 Isolierung humaner Osteoblasten aus Hüftkopfknochen**

Mit schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten und gemäß den Richtlinien der örtlichen Ethikkommission wurden operativ entfernte Hüftkopfknochen von der Orthopädischen Klinik des Uniklinikums Tübingen erhalten. Primäre Osteoblasten wurden nach einem abgewandelten Protokoll von Rifas und Mitarbeitern aus der Spongiosa gewonnen (Rifas et al., 1995). Hierzu wurde der trabekuläre Anteil des Knochens unter sterilen Bedingungen zerkleinert, in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und in mehreren Schritten mit PBS, versetzt mit CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> (PBS<sup>++</sup>; Invitrogen), gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Knochenstückchen 1 h rotierend bei 37 °C einem Vorverdau mit Dispase II (2.4 U/ml; Roche, Mannheim) und Kollagenase Typ-XI (1500 U/ml; Sigma-Aldrich) unterzogen. Nach einem Waschschrift mit PBS<sup>++</sup> folgte der Hauptverdau mit Kollagenase Typ-XI für 2–3 h. Nach zwei weiteren Waschschriften wurden die Knochenfragmente in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen überführt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium für Osteoblasten setzte sich aus DMEM mit 4.5 g/ml Glucose und L-Glutamin (Invitrogen), 20 % hitzeinaktiviertes, mit Aktivkohle behandeltes fötales bovines Serum (FBS, Invitrogen), 2 % MEM-Vitaminlösung (Gibco, Darmstadt), 1 % P/S, 1 % Fungizone (Invitrogen), 1.4 mM  $\beta$ -Glycerophosphat (Calbiochem) und 50  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich) zusammen. Nach einer Woche in Kultur waren aus den Knochenstückchen auswandernde, adhärenente Osteoblasten erkennbar. Die Knochenfragmente und nicht adhärenente Zellen wurden nach 10–14 Tagen durch Ausspülen mit PBS entfernt. Konfluente Zellrasen

wurden mit Hilfe von AccuMax<sup>TM</sup> (PAA, Cölbe) vom Flaschenboden abgelöst und in neue Kulturflaschen in einem Verhältnis von 1:3 oder 1:4 ausgesät. Das Medium wurde alle 2–3 Tage zur Hälfte gewechselt. Für die vorliegende Arbeit wurden Osteoblasten bis zur Passage 6 verwendet. Die Expression der spezifischen osteogenen Marker alkalische Phosphatase (AP), Bone Sialoprotein (BSP), Kollagen Typ I, Osteonektin, Osteopontin und Osteokalzin wurde routinemäßig mittels RT-PCR und Immunfluoreszenzfärbung kontrolliert.

#### **2.4.4 Kultivierung humaner Zellen und Zelllinien**

Die verwendeten humanen Zellen und Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellkulturmedien wurden von der Firma Invitrogen, die Zellkulturzusätze ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) und NEAA (Non-Essential Amino Acids) von BD Biosciences bzw. Gibco bezogen.

Die CD34-exprimierende leukämische Zelllinie KG1a wurde als Modell für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen verwendet. Primäre Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene (HUVEC) wurden als Surrogat für Knochenmarkendothelien herangezogen. Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und die Zelllinie des kolorektalen Karzinoms CaCo-2 dienten als Positivkontrollen für die Expressionsanalyse von MMPs bzw. Cystatin B. Ursprung, Kulturbedingungen und Quellen der jeweiligen Zelllinien sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst.

Suspensionszellen wurden bei hoher Zelldichte mit frischem Medium verdünnt und in neue Flaschen überführt. Adhärenz wachsende Zelltypen wurden bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung (0.25 % Trypsin, 0.38 g/l EDTA; Gibco) vollständig vom Flaschenboden abgelöst und in neue Flaschen passagiert. HUVECs wurden mit Accutase<sup>®</sup> abgelöst. Für den Einsatz in verschiedenen Versuchen wurden die Zellen nach dem Ablösen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die gewünschten Zellmengen entsprechend in Platten oder Flaschen ausgesät.

Zur Lagerung wurden Zellen in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei ungefähr –155 °C kryokonserviert. Hierfür wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml des entsprechenden Wachstumsmediums, versetzt mit 10 % DMSO (AppliChem), aufgenommen, in Kryoröhrchen (Greiner Bio-One, Solingen-Wald) überführt und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Nalgene<sup>®</sup> Cryo 1 °C Freezing Container, Rochester, USA) bei konstanter Rate von 1 °C pro Minute auf –80 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Röhrchen in einen Stickstofftank überführt.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden Kryoröhrchen für kurze Zeit im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die aufgetaute Zellsuspension wurde mit frischem Medium versetzt und bei 150 x g für 10 min zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde im entsprechenden Wachstumsmedium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche ausgesät. Innerhalb der ersten Woche in Kultur wurde bei jedem Mediumwechsel das Mycoplasmen-Removal Agent (AbD Serotec, Düsseldorf) in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben.

**Tabelle 2-3. Humane Zelllinien**

Zelllinie	Ursprung/Zelltyp	Kulturmedium	Quelle
KG1a	CD34 <sup>+</sup> myeloblastische Leukämiezelllinie; Suspension	RPMI 1640, 20 % FBS, 1 % P/S	ATCC (Manassas, USA)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells; adhären	64 % Ham's F-12, 16 % DMEM, 20 % FBS, 1 % L-Gln, 30 µg/ml ECGS, 50 µg/ml Heparin, 1 % P/S	PromoCell (Heidelberg)
MDA-MB-231	Adenokarzinom, Pleuraerguss; adhären	RPMI 1640, 10 % FBS, 20 mM HEPES, 2 mM L-Gln, 1 % P/S	ATCC
CaCo-2	Kolorektales Adenokarzinom; adhären	DMEM, 20 % FBS, 1 % P/S, 1 % NEAA	ATCC

#### 2.4.5 Herstellung von Zellpellets, Zelllysaten und konditionierten Medien

Zum Zweck der RNA-Gewinnung für Genexpressionsanalysen bzw. der Proteinextraktion für Western Blot-Versuche wurden Pellets von Suspensionszellen oder von konfluenten Zellrasen adhären wachsender Zellen durch Ablösen mit dem entsprechenden Enzym nach 10 min Zentrifugation bei 400 x g und 4 °C erhalten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen sofort verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Für die Untersuchung der Cadherin-Expression mittels Western Blot wurden konfluente Zellrasen nach zwei Waschschrinen ohne vorherige Enzymbehandlung direkt in der Kulturflasche mit 1 ml RIPA-Lysepuffer [1 % NP-40, 150 mM NaCl, 40 mM Tris, 2 mM EDTA, 0.5 % Natriumdesoxycholat, 0.1 % SDS (pH 8), versetzt mit Proteaseninhibitoren (Complete Mini EDTA-free; Roche)] lysiert. Nach 1 h bei 4 °C wurden die Zellen mit einem Schaber vom Flaschenboden abgelöst und in 1.5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Für alle übrigen Western Blot-Experimente wurden Zellpellets mit 1 ml RIPA-Lysepuffer oder Triton-Lysepuffer [1 %

Triton X<sup>®</sup>-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02 % SDS (pH 7.4), versetzt mit Proteaseninhibitoren] pro  $1 \times 10^7$  Zellen für 1 h bei 4 °C lysiert. Alle Zelllysate wurden für 1 min im Ultraschallbad homogenisiert und die klaren Überstände durch 10 min Zentrifugation bei  $10.000 \times g$  und 4 °C von Zelltrümmern getrennt.

Um konditioniertes Medium herzustellen, wurden adhärent wachsende Zellen in hoher Dichte in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ungefähr 90 % kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden zur Konditionierung 10 ml serumfreies Medium für 24 oder 48 h zugegeben. Suspensionszellen wurden zur Konditionierung in 10 ml serumfreies Medium resuspendiert und für 24 oder 48 h kultiviert. Eine Million CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen wurden in 1 ml SFEM-Medium für 24 h inkubiert. Nach der Konditionierung wurde das Medium abgenommen und zweimal für 10 min bei  $400 \times g$  und 4 °C zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zellen zu entfernen. Für Western Blot-Analysen erfolgte anschließend eine Konzentrierung des Mediums mit Hilfe von Ultrafiltrationsröhrchen, die eine Ausschlussgröße von 3 kDa (Vivaspin 20; Sartorius, Göttingen) oder 10 kDa (Amicon Ultra-15; Millipore) aufwiesen. Hierzu wurde das Medium bei  $3000 \times g$  und 4 °C bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration zentrifugiert. Für ELISA-Experimente wurde das Medium nicht konzentriert. Um mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben zu verhindern, wurden sowohl Zelllysate als auch konditionierte Überstände aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

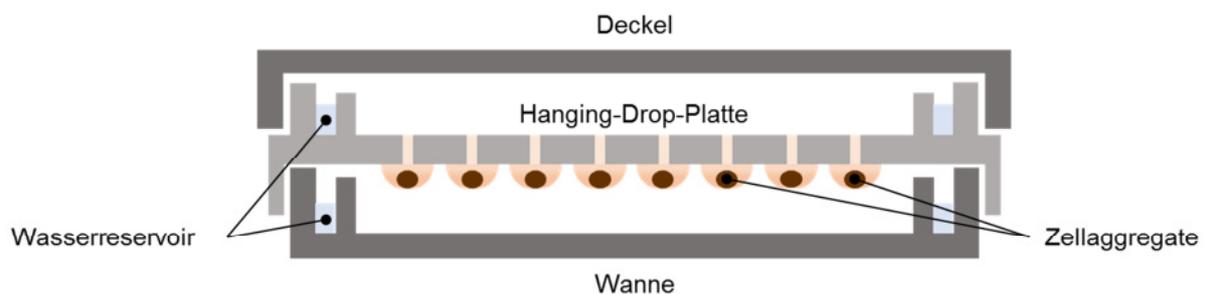
Der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Cystatin-Sekretion von primären Osteoblasten und MSCs wurde nach einmaliger Behandlung der Zellen untersucht. Hierfür wurden  $3 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung einer 12-Well-Kulturplatte ausgesät, kultiviert und kurz vor Erreichen der Konfluenz stimuliert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde in jedes Well 1 ml serumfreies Medium, das entweder 15 µg/ml G-CSF (Millipore), 10 µM Clenbuterol (Sigma-Aldrich) oder die Lösungsmittelkontrolle enthielt, gegeben und die Zellen für bis zu 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. An verschiedenen Zeitpunkten wurden Überstände abgenommen, zweimal zentrifugiert und bis zur Analyse mit Hilfe eines ELISA bei -80 °C gelagert.

## **2.5 Dreidimensionale Zellkultur**

### **2.5.1 Kultivierung humaner mesenchymaler Stromazellen in Hanging-Drop-Platten**

Zur Etablierung eines 3D Modells für die Expansion hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen in Kokultur mit mesenchymalen Stromazellen wurden Perfecta<sup>®</sup> Hanging-Drop-

Platten (3D Biomatrix, Biotrend, Köln) im 96-Well-Format verwendet (Abbildung 2-1). Um das Verhalten der Zellen in diesem Modell zu charakterisieren, wurden zunächst MSCs durch Accutase von Kulturflaschen abgelöst und verschiedene Zellzahlen in 40 µl GMP-Medium pro Well ausgesät und über mehrere Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Verhalten der Zellen in den Hanging-Drop-Platten (HDA, hanging drop array) wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet und durch repräsentative Aufnahmen dokumentiert.



**Abbildung 2-1. Dreidimensionale Zellkultur in Hanging-Drop-Platten.** Die durch 96 Löcher perforierte Platte erlaubt eine einfache Tropfenbildung und Zellaggregation durch Schwerkraft. Wasserreservoirs umranden die Proben und verhindern eine Austrocknung.

Für alle nachfolgenden 3D Versuche wurden jeweils  $5 \times 10^3$  MSCs in 40 µl Medium pro Well ausgesät. Ein partieller Mediumwechsel erfolgte alle 2–3 Tage. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopische Aufnahmen von den MSC-Sphäroiden erstellt und deren Durchmesser mit Hilfe der AxioVision<sup>TM</sup>-Software (Version 4.8; Zeiss) bestimmt.

### 2.5.1.1 Vergleich der Proliferation mesenchymaler Stromazellen in 3D und 2D Kulturen

Das Wachstumsverhalten der MSCs in HDA-Platten wurde im Vergleich zur 2D Kultur in konventionellen 96-Well-Zellkulturplatten mit flachem Boden analysiert. Hierfür wurden parallel  $5 \times 10^3$  MSCs in 40 µl Medium pro Well in 3D und 2D Kulturen ausgesät. Verglichen wurde außerdem die Proliferation im GMP-Medium und in einer Mischung aus 1 Teil GMP-Medium und 4 Teilen SFEM-Medium, die einen Zytokincocktail enthielt, da dies die optimale Zusammensetzung für die spätere Expansion der HSPCs war (Kapitel 3.3.2). Das Medium wurde nach Bedarf gewechselt. Nach 3 und 7 Tagen in Kultur wurden die Sphäroide durch Hinzupipettieren eines größeren Volumens PBS von der Oberseite der HDA-Platte in eine darunter platzierte 96-Well-Platte überführt. Die Überstände wurden von den Sphäroiden und

den 2D Kulturen vollständig entfernt und die Zellen sofort für mindestens 24 h bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Sobald alle Proben von einem Spender gesammelt waren, erfolgte die Quantifizierung des DNA-Gehalts mit Hilfe des CyQUANT<sup>®</sup>-Kits (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Bei diesem Verfahren wird ein Fluoreszenzfarbstoff spezifisch an die zelluläre DNA gebunden und anschließend die Fluoreszenzintensität bei 485 nm Anregungs- und 538 nm Emissionswellenlänge am Fluorospektrometer (Fluoroskan Ascent Reader) gemessen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden für jeden Spender Eichkurven mit bekannten Zellmengen pro Vertiefung einer 96-Well-Kulturplatte erstellt. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

### **2.5.1.2 Einfluss funktionsblockierender anti-Cadherin-Antikörper auf die Sphäroidbildung**

Um die Beteiligung von Zell-Zelladhäsionsmolekülen an der Aggregation der MSC-Sphäroide zu untersuchen, wurden  $5 \times 10^3$  MSCs in 40  $\mu\text{l}$  Medium pro Well einer HDA-Platte ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht mit einem funktionsblockierenden monoklonalen Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von N-Cadherin (Klon 8C11; BioLegend, London, UK) oder mit einem monoklonalen anti-Cadherin-11-Antikörper (Klon 283416; R&D Systems) behandelt. Zur Kontrolle wurden in einige Wells die entsprechende Menge PBS oder 3 mM EDTA pipettiert. Die Sphäroidbildung wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet und repräsentative Aufnahmen wurden angefertigt.

### **2.5.2 Kokultur hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen mit mesenchymalen Stromazellen in HDA-Platten**

Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Expansion der HSPCs in 3D Kokultur mit MSCs wurden mehrere Ansätze getestet. Zunächst erfolgte die Identifizierung der geeigneten Zellmengen in der Startkultur für eine effektive HSPC-Expansion, indem MSCs und HSPCs in den Verhältnissen  $5 \times 10^3:5 \times 10^2$ ,  $2,5 \times 10^3:2,5 \times 10^3$  und  $5 \times 10^2:5 \times 10^3$  (entsprechend MSC:HSPC 10:1, 1:1 und 1:10) in 40  $\mu\text{l}$  Medium pro Well einer HDA-Platte ausgesät wurden. Nach 14 Tagen in Kultur wurden die Mengen der expandierten HSPCs pro Well für den jeweiligen Ansatz bestimmt. Hierfür wurden die Zellen durch Hinzupipettieren eines größeren Volumens PBS von der Oberseite der HDA-Platte in eine darunter platzierte 96-Well-Platte überführt. Die Zellaggregate konnten durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vollständig

dissoziiert werden und die Einzelzellsuspensionen wurden nach einer Trypanblau-Färbung zur Sichtbarmachung toter Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anhand ihrer Größe, Form und Granularität konnten HSPCs eindeutig von MSCs beim Zählen unterschieden werden.

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Mediumzusammensetzungen für die Kokultur getestet. Es wurden  $5 \times 10^3$  MSCs zusammen mit  $5 \times 10^2$  HSPCs in 40  $\mu$ l Medium pro Well einer HDA-Platte ausgesät, wobei das Kulturmedium sich zu verschiedenen Teilen aus GMP- und SFEM-Medium zusammensetzte und mit einem Zytokincocktail, bestehend aus den rekombinanten humanen Proteinen Flt3-Ligand und Stammzellfaktor SCF (jeweils in der Konzentration 100 ng/ml) sowie Interleukin-3 und Interleukin-6 (jeweils in der Konzentration 20 ng/ml) (CC100; Stem Cell Technologies), versetzt wurde. Über einen Zeitraum von 2 Wochen wurden die Zellzahlen der expandierten HSPCs, wie im vorherigen Absatz bereits beschrieben, in regelmäßigen Abständen bestimmt.

Nachdem die besten Konditionen für eine hohe Proliferationsrate der HSPCs gefunden wurden, erfolgte der Vergleich der HSPC-Expansion im etablierten 3D Hanging-Drop-Modell im Gegensatz zur 2D Kultur in herkömmlichen 96-Well-Zellkulturplatten mit flachem Boden. Eine Mischung aus  $5 \times 10^3$  MSCs und  $5 \times 10^2$  HSPCs wurde in 40  $\mu$ l des Mediums mit der Zusammensetzung GMP:SFEM=1:4 (v/v), ergänzt mit dem Zytokincocktail CC100 und im Folgenden als "GMP-SFEM-CC100-Medium" bezeichnet, pro Well einer 3D bzw. 2D Platte ausgesät und für 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Medium wurde nach Bedarf anteilig gewechselt. In regelmäßigen Abständen wurde die Zellmenge der expandierten HSPCs pro Well der 3D Kokultur, wie oben bereits beschrieben, gezählt. Die Zellzahlen der 2D Kokultur wurden nach vorhergehender Ablösung mit Accutase bestimmt. Parallel zur Kokultur wurde außerdem die Proliferation der HSPCs in Monokultur in 3D und 2D verglichen, indem ausschließlich  $5 \times 10^2$  HSPCs pro Well ausgesät wurden.

### **2.5.3 Herstellung und HE-Färbung von Sphäroidkryoschnitten**

Für Hämatoxylin-Eosin- und Immunfluoreszenzfärbungen wurden Kryoschnitte von Sphäroiden hergestellt. Fünf Tausend MSCs allein oder in Kokultur mit  $5 \times 10^2$  HSPCs wurden pro Well einer HDA-Platte für bis zu 14 Tage kultiviert. An verschiedenen Tagen der Mono- bzw. Kokultur wurden die entstandenen Sphäroide direkt in der HDA-Platte dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung (PFA; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) für 30 min bei RT im Dunkeln fixiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgten die

Färbung mit Trypanblau (0.5 %-Lösung; PAA) für 3–5 min und weitere Waschschriffe sowie die Einbettung mit Tissue-Tek® O.C.T.™-Einbettmedium (Sakura Finetek Europe, Staufen). Die Proben wurden vor dem Schneiden für mindestens 24 h bei –20 °C gefroren. Schnitte mit einer Dicke von 5–8 µm wurden am CM3050S-Kryostat (Leica) hergestellt, für mindestens 1 h bei RT getrocknet und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

Die HE-Färbung erfolgte nach dem in Tabelle 2-4 aufgeführten Protokoll. Zuvor wurden die Kryoschnitte für 15–30 min bei RT aufgetaut. Die gefärbten Schnitte wurden mit Entellan® (Merck) eingedeckt.

**Tabelle 2-4. Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Kryoschnitten**

Schritt	Dauer
Fixieren mit Aceton bei –20 °C	10 min
Waschen mit PBS <sup>++</sup>	2x5 min
Kernfärbung mit Hämalaun	3 bis 8 min
Spülen in destilliertem Wasser	kurz
Bläuen unter fließendem Leitungswasser	10 min
Färben mit 0.1 % Eosin-G	10 min
Spülen in ddH <sub>2</sub> O	10 min
Entwässern in 70 %, 96 % und 100 % Ethanol	5 min je Lösung
100 % Ethanol	5 min
Xylol	5 min

#### 2.5.4 Analyse der 3D Sphäroide mittels Rasterelektronenmikroskopie

Zur Sichtbarmachung der Interaktionen zwischen MSCs und HSPCs im Hanging-Drop-Modell wurden Proben für eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (REM) vorbereitet. CD34<sup>+</sup> HSPCs wurden zusammen mit MSCs im Verhältnis 5x10<sup>2</sup>:5x10<sup>3</sup> pro Well einer HDA-Platte für 1 Woche kultiviert. An verschiedenen Tagen der Kokultur wurden Proben für die REM-Analyse geerntet, indem die Zellen direkt in den Platten dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und mit der Karnovsky-Fixierlösung bestehend aus 2 % PFA und 2.5 % Glutaraldehyd (Serva, Heidelberg) für 30 min bei RT im Dunkeln fixiert wurden. Nach dreimaligem Waschen wurden die Sphäroide in 70 % Ethanol bei 4 °C gelagert, bis alle Proben eines Spenders fixiert und geerntet waren. Nun folgte die Inkubation in einer Reihe von Ethanol-Lösungen mit aufsteigenden Konzentrationen zur Entwässerung der Proben, die im Anschluss bei RT

vollständig getrocknet und mit Hilfe eines Einkomponenten-Cyanoacrylatklebers (Wevo-Cyamet 75; Wevo-Chemie, Ostfildern) auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 1 cm befestigt wurden. Die Deckgläschen wurden unter Zuhilfenahme von leitfähigen Graphit-Polycarbonat-Tabs (G3347, Plano, Wetzlar) auf Probenteller aus Aluminium aufgebracht und mit einer Gold-Schicht von 20 nm Dicke überzogen. Am Rasterelektronenmikroskop XL30 (Philips) wurden Aufnahmen bei einer Beschleunigungsspannung von 10 kV angefertigt.

### **2.5.5 Analyse der 3D Sphäroide mittels Transmissionselektronenmikroskopie**

Für eine detailliertere Darstellung der Zell-Zellinteraktion im 3D Modell wurden zudem Proben für eine Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) vorbereitet. CD34<sup>+</sup> HSPCs wurden mit MSCs im Verhältnis  $5 \times 10^2 : 5 \times 10^3$  pro Well einer HDA-Platte für 1 Woche kultiviert. An Tag 3 und 7 der Kokultur wurden Proben für die TEM-Analyse geerntet, indem die Zellen direkt in den Platten dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und mit der Karnovsky-Fixierlösung über Nacht bei 4 °C im Dunkeln fixiert wurden. Nun erfolgte die Einbettung in 2 % Agaroselösung und die Aufarbeitung für die Elektronenmikroskopie nach folgendem Protokoll:

2x5 min	waschen in 0.1 M Cacodylatpuffer
2 h	fixieren in 1 % Osmiumlösung lichtgeschützt im Eisbad
3x5 min	waschen in H <sub>2</sub> O
30–45 min	kontrastieren in Uranylacetatlösung
3x5 min	waschen in H <sub>2</sub> O
2x10 min	in 50 % Ethanol entwässern
2x10 min	in 70 % Ethanol entwässern
2x5 min	in 95 % Ethanol entwässern
3x1 min	in 100 % Ethanol entwässern
45 min	in Epon/Ethanol 1:1 inkubieren
2 h	in 100 % Epon inkubieren
16 h	bei 50 °C polymerisieren, Proben in Einbettungsformen mit 100 % Epon überführen, ausrichten und
48 h	bei 60 °C polymerisieren.

Von den in Epon eingebetteten Proben wurden Semidünnschnitte hergestellt, bei 80 °C getrocknet und für 5 min mit 0.1 % (w/v) Toluidinblau, 0.27 % (w/v) NaHCO<sub>3</sub> bei 80 °C ge-

färbt. Die Schnitte wurden kurz gespült, für 5 min in Leitungswasser gebläut, kurz in ddH<sub>2</sub>O gespült und bei 80 °C getrocknet. Nach Analyse unter dem Lichtmikroskop wurden von ausgewählten Probenbereichen Ultradünnschnitte von 20–30 nm Dicke angefertigt und mit Hilfe des Libra 120 Transmissionselektronenmikroskops (Zeiss) untersucht.

**Tabelle 2-5. Reagenzien für die TEM-Probenaufarbeitung**

Reagenz	Zusammensetzung
Karnovsky-Fixierlösung (5.25 ml A + 2.25 ml B)	Lösung A: 30 ml 0.2 M Natriumcacodylat 40 ml 7.5 % PFA 50 mg CaCl <sub>2</sub> Lösung B: 12 % Glutaraldehyd
Osmiumlösung	2 % (w/v) Osmiumtetroxid 2 % (w/v) Kaliumhexacyanoferrat in ddH <sub>2</sub> O
Uranylacetatlösung	0.05 M Uranylacetat in ddH <sub>2</sub> O
Eponlösung (30 % Mixtur A + 70 % Mixtur B)	Mixtur A: 38 % (v/v) Glycidether 100 62 % (v/v) Dodeceny succinanhydrid  Mixtur B: 53 % (v/v) Glycidether 100 47 % (v/v) Methylnadicanhydrid
Polymerisierung	98.5 % (v/v) Eponlösung 1.5 % (v/v) DMP-30 Härter

## 2.6 Zellfunktionsanalysen

### 2.6.1 Zellproliferationsassay

Um mögliche Einflüsse von Cystatinen auf das Wachstumsverhalten von CD34<sup>+</sup> HSPCs zu detektieren, wurden Zellproliferationsversuche durchgeführt. Hierfür wurden 1x10<sup>4</sup> frisch isolierte HSPCs in 100 µl SFEM-Medium, versetzt mit dem CC100-Zytokincocktail und 1 % P/S, pro Vertiefung einer 96-Well-Kulturplatte mit U-Boden ausgesät. Die Zellen wurden einmalig mit rekombinantem Cystatin C (Life Technologies) in den Konzentrationen 1, 2.5, 5 und 10 µg/ml behandelt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Lösungsmittelkontrollen wurden mit einem identischen Volumen PBS versetzt. Nach 4 Tagen in Kultur wurde die Proliferationsrate der HSPCs bestimmt, indem die Kulturplatten für 10 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde.

Nach mindestens 24 h bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen bei RT aufgetaut und der DNA-Gehalt pro Well mit Hilfe des CyQUANT<sup>®</sup>-Kits, wie in Kapitel 2.5.1.1 bereits beschrieben, quantifiziert. Die Proliferationsansätze wurden in Duplikaten durchgeführt.

### 2.6.2 Differenzierungsassay (CFU)

Ein möglicher Effekt von Cystatin C auf das Differenzierungspotential der CD34<sup>+</sup> HSPCs wurde im CFU-Assay (colony-forming unit) untersucht. Nach der Isolierung aus Nabelschnurblut wurden  $1 \times 10^4$  HSPCs in 100  $\mu\text{l}$  SFEM-Medium, versetzt mit dem CC100-Zytokincocktail und 1 % P/S, pro Vertiefung einer 96-Well-Kulturplatte mit U-Boden ausgesät. Die Zellen wurden mit rekombinantem Cystatin C (Life Technologies) in verschiedenen Konzentrationen oder mit dem gleichen Volumen PBS bei der Lösungsmittelkontrolle für 3 Tage bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 % CO<sub>2</sub> in Triplikaten inkubiert. Im Anschluss daran wurden pro Replik  $1 \times 10^3$  HSPCs in 100  $\mu\text{l}$  IMDM mit 2 % FBS (Stem Cell Technologies) aufgenommen und mit 1 ml Methylzellulosemedium, das die rekombinanten Faktoren SCF, GM-CSF, Interleukin-3 und EPO enthielt (MethoCult H4434; Stem Cell Technologies) gemischt. Die Zellen wurden in 35 mm-Petrischalen ausplattiert und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre für 14 Tage kultiviert. Zellaggregate mit mindestens 50 Zellen wurden bei der Auswertung als Kolonien-bildende Einheiten (CFU) definiert und nach morphologischen Kriterien klassifiziert. Kolonien, die aus erythroiden Progenitoren (burst-forming unit-erythrocyte; BFU-E), aus Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren (colony-forming unit-granulocyte/macrophage; CFU-GM) oder aus den multipotenten Granulozyten-Erythrozyten-Makrophagen-Megakaryozyten-Progenitoren (colony-forming unit-granulocyte/erythrocyte/macrophage/megakaryocyte; CFU-GEMM) entstanden, wurden von zwei Personen unabhängig voneinander gezählt.

Mit Hilfe des CFU-Assays wurden außerdem HSPCs, die für 7–8 Tage in der 3D oder 2D Kultur expandiert wurden (siehe Kapitel 2.5.2), analysiert, um das Differenzierungspotential der Zellen in Abhängigkeit von den jeweiligen Kulturbedingungen zu bestimmen und mit frisch isolierten CD34<sup>+</sup> HSPCs zu vergleichen. Die Vervielfachung der Kolonienzahl nach der Expansion in 3D bzw. 2D im Vergleich zum CFU-Gehalt der nicht expandierten HSPCs wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{CFU der expandierten HSPCs} \times \text{Proliferationsfaktor nach 7 Tagen in 3D bzw. 2D}}{\text{CFU der nicht expandierten HSPCs}}$$

Die Versuche wurden jeweils in Triplikaten angesetzt und mit verschiedenen MSC- und HSPC-Spendern unabhängig voneinander durchgeführt.

### 2.6.3 Zell-Zelladhäsionsassay

Bei diesen Experimenten wurde untersucht, ob die Bindung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen an mesenchymale Stromazellen durch Cystatin C beeinflusst wird. Hierfür wurden zwischen  $2 \times 10^4$  und  $4 \times 10^4$  MSCs pro Vertiefung einer 48-Well-Zellkulturplatte ausgesät und bis zur Konfluenz bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert.  $\text{CD}34^+$  HSPCs wurden aus Nabelschnurblut isoliert und entweder am gleichen Tag verwendet oder über Nacht bis zur Durchführung des Assays in SFEM-Medium im Brutschrank inkubiert. Die jeweiligen Schritte des Adhäsionsprotokolls sind zur Veranschaulichung in Abbildung 2-2 dargestellt. Konfluente MSC-Zellrasen wurden zunächst mit serumfreiem Medium, welches mit  $1\text{ mM CaCl}_2$ ,  $1\text{ mM MgCl}_2$  und  $25\ \mu\text{M MnCl}_2$  versetzt war (im Folgenden als „Medium/Ionenmix“ bezeichnet), gewaschen. Zweiwertige Metallionen sind essentiell für die Ausbildung der Zell-Zellkontakte. Dann wurden pro Well  $200\ \mu\text{l}$  Medium/Ionenmix zugegeben. Nun wurde die Adhäsionsstudie entweder direkt durchgeführt oder es folgte zuerst eine Konditionierung des MSC-Überstands für 24 h. Zunächst wurden rekombinantes Cystatin C (Life Technologies) in verschiedenen Konzentrationen oder ein vergleichbares Volumen PBS bei den Lösungsmittelkontrollen zugegeben und für 1 h inkubiert.  $\text{CD}34^+$  HSPCs wurden in der Zeit mit  $2\ \mu\text{g}$  des fluoreszierenden Farbstoffs 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(6)-Carboxyfluorescein-Acetoxymethylester (BCECF-AM; Sigma-Aldrich) pro  $1 \times 10^6$  Zellen für 15 min rotierend bei  $37^\circ\text{C}$  im Dunkeln gefärbt und zweimal mit Medium/Ionenmix gewaschen. Anschließend wurden bis zu  $1 \times 10^5$  gefärbte HSPCs pro MSC-Well zugegeben und die Adhäsion der Zellen durch Inkubation für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  ermöglicht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand mit den nicht gebundenen Zellen abgenommen und der Zellrasen zweimal vorsichtig mit PBS/Ionenmix gewaschen. Die Fluoreszenz der gebundenen HSPCs wurde am Fluorospektrometer (Fluoroskan Ascent Reader) bei  $485\text{ nm}$  Absorptions- und  $538\text{ nm}$  Emissionswellenlänge gemessen. Die Adhäsionsstärke wurde in Relation zur Fluoreszenzintensität der Lösungsmittelkontrolle berechnet. Die Ansätze wurden jeweils als Duplikate durchgeführt.

Darüber hinaus erfolgten weitere Zell-Zelladhäsionsstudien nach herunterregulierter Expression von Cystatin C in MSCs. In diesem Fall wurden subkonfluente MSC-Rasen in 48-Well-Platten mit spezifischer siRNA über Nacht transfiziert (siehe Kapitel 2.7.4). Am darauffol-

genden Tag wurde der Adhäsionsassay nach dem im letzten Absatz beschriebenen Protokoll durchgeführt.

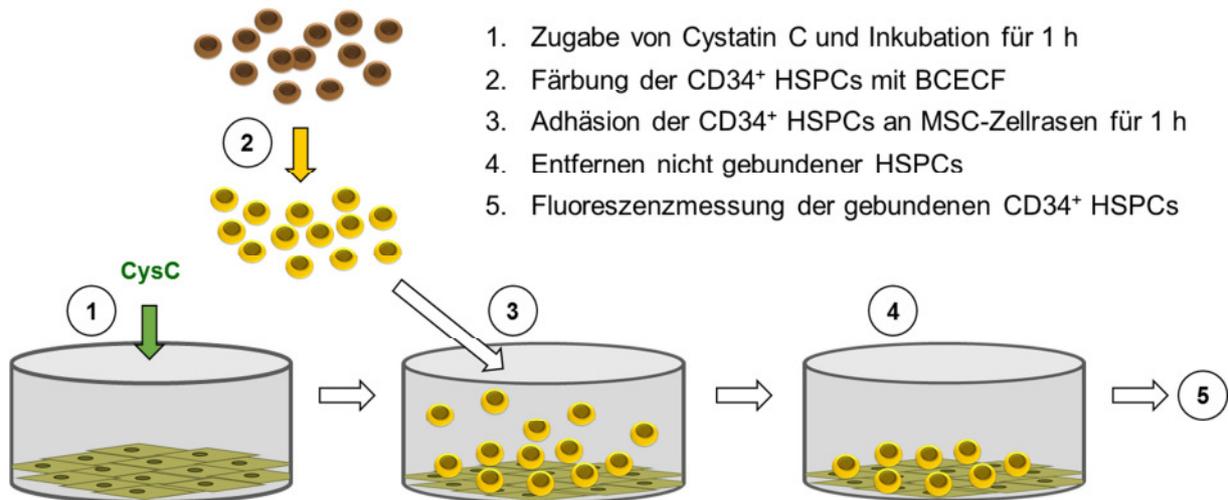


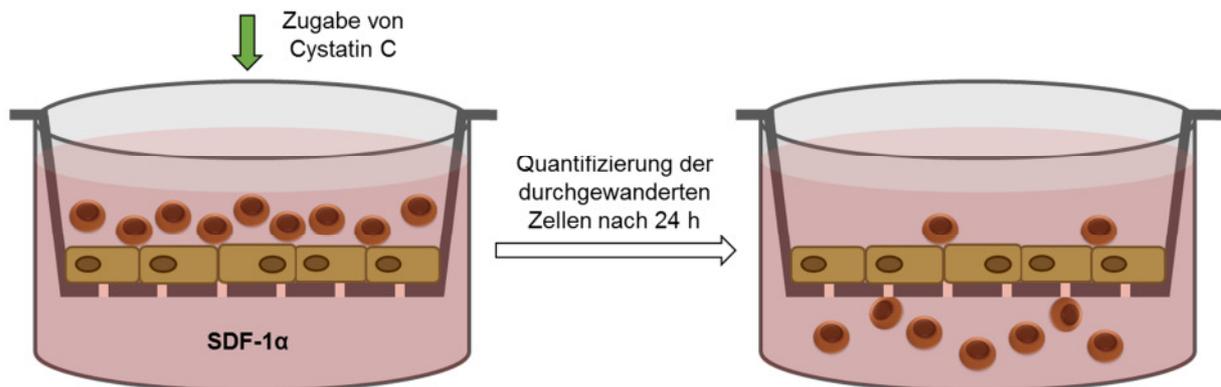
Abbildung 2-2. Schematische Darstellung des Zell-Zelladhäsionsassays.

#### 2.6.4 Transwell-Invasionsassay

Der Einfluss von Cystatin C auf die gerichtete, durch einen chemotaktischen Stimulus ausgelöste Wanderung der CD34<sup>+</sup> HSPCs durch einen konfluenten MSC-Zellrasen wurde in Transwell-Invasionsversuchen analysiert. In Abbildung 2-3 sind die wichtigsten Schritte des Transwell-Assays schematisch veranschaulicht. Zunächst wurden zwischen  $4 \times 10^4$  und  $5 \times 10^4$  MSCs in die obere Kammer eines Transwell-Inserts (Thincert<sup>TM</sup>; Greiner Bio-One) ausgesät. Die Polystyrolmembran dieser Einsätze weist 3  $\mu\text{m}$ -Poren und eine Wachstumsfläche, die ungefähr der einer herkömmlichen 48-Well-Kulturplatte mit flachem Boden entspricht, auf. Es folgte die Kultur bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre. Das Erreichen eines konfluenten MSC-Zellrasens wurde durch Anfärben mit Neutralrot kontrolliert. Die MSCs wurden zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und bis zu  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> HSPCs in SFEM-Medium wurden zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinatem Cystatin C (Life Technologies) oder einem vergleichbaren PBS-Volumen bei den Lösungsmittelkontrollen in die obere Kammer eines Transwells gegeben. Als chemotaktischen Stimulus enthielt die untere Kammer des Transwells 100 ng/ml rekombinantes SDF-1 $\alpha$ . Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 24 h, in denen den Zellen die Möglichkeit zur Migration gegeben wurde. Nach dem Entfernen der Inserts wurde die Menge der durchgewanderten Zellen in der unteren Kammer des Transwells durch Quantifizierung des DNA-Gehalts mit Hilfe des

CyQUANT<sup>®</sup>-Kits bestimmt. Die Invasion wurde in Relation zur Fluoreszenzintensität der Lösungsmittelkontrolle berechnet. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt.

Des Weiteren wurde die HSPC-Wanderung durch MSC-Zellrasen nach herunterregulierter Expression von Cystatin C in MSCs untersucht. Für diese Experimente wurden MSC-Zellrasen in den Transwell-Inserts mit spezifischer siRNA über Nacht transfiziert (siehe Kapitel 2.7.4). Am darauffolgenden Tag wurde der Transwell-Invasionsassay nach dem im letzten Absatz beschriebenen Protokoll durchgeführt.



**Abbildung 2-3. Schematische Darstellung des Transwell-Invasionsassays.** Nach der Bildung eines konfluenten MSC-Zellrasens auf der perforierten Transwellmembran werden die Zellen mit Cystatin C behandelt. HSPCs werden in die obere Kammer pipettiert und die Menge der in die untere Kammer durchgewanderten HSPCs nach 24 h bestimmt.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Primerherstellung

Spezifische Primerpaare zur Analyse der Genexpression von Cystatinen und Matrixmetalloproteinasen mit Hilfe der Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurden unter Verwendung des online zugänglichen Primer-Designing-Tools von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) entworfen und sind in den Tabellen 2-5 und 2-6 aufgelistet. Als Vorlagen dienten die in der NCBI-Genbank veröffentlichten cDNA-Sequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Für den Entwurf der Primer wurden nach Möglichkeit folgende Kriterien berücksichtigt: eine Länge von 18–25 Nukleotiden, ein vergleichbarer Guanin-Cytosin-Gehalt von 40–60 %, eine vergleichbare Schmelztemperatur und PCR-Amplifikationsprodukte von 100–500 Basenpaaren Länge.

**Tabelle 2-5. Verwendete Primerpaare für Cystatine**

<b>Gen</b>	<b>NCBI-Nummer</b>	<b>Primer-Sequenz 5' &gt; 3'</b>	<b>Binde- stelle</b>	<b>T<sub>m</sub> [°C]</b>	<b>Amplifikat [bp]</b>
Cystatin A	NM_005213.3	For: CACTTCCCTGTTCACTTTGGT Rev: TCTTCAAGCTGTGGTTTAACTT	72 - 92 193 - 215	59	144
Cystatin B	NM_000100.2	For: CTGTGTTTAAGGCCGTGCA Rev: AGCTCATCATGCTTGGCTTT	216 - 235 374 - 393	60	178
Cystatin C	NM_000099.2	For: GCTGGGCCGAACACGTGTAC Rev: GTCATTGTGCCCTGCCAAGGC	354 - 374 465 - 485	59	132
Cystatin D	NM_001900.4	For: TGACCAGCCAAAAGTAAAGA Rev: TGGGAGTAGGAGGTGGTCAG	391 - 411 520 - 539	59	149
Cystatin E	NM_001323.3	For: GACACGCACATCATCAAGGC Rev: CACAGCGCAGCTTCTCTCT	265 - 284 416 - 433	60	169
Cystatin F	NM_003650.3	For: CTGCGCCATCTACCCAAGAA Rev: TTGGAGGACTCCTGGGTCATT	152 - 171 409 - 429	60	278
Cystatin S	NM_001899.2	For: ACTCCTGATGGCTACCCTGG Rev: GTGGTGGTCGGTGTGACTG	83 - 102 498 - 516	61	434
Cystatin SA	NM_001322.2	For: ACAGGATAATCGAGGGTGGCA Rev: TACAAGGGGTGGGAGTAGGAG	95 - 115 472 - 492	60	398
Cystatin SN	NM_001898.2	For: GGGTACTAAGAGCCAGGCAA Rev: GGCCTGGCACAGATCCCTA	277 - 296 495 - 513	60	237

Die Position der Primer in der chromosomalen Gensequenz wurde überprüft und Intron überspannende Primerpaare wurden ausgewählt, um mRNA-Amplifikationsprodukte von den unerwünschten Amplifikaten der chromosomalen DNA unterscheiden zu können. Die Spezifität der Primer wurde durch Vergleich ihrer Sequenzen mit Nukleotidbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) überprüft. Die Primersynthese erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG (Martinsried).

**Tabelle 2-6. Verwendete Primerpaare für Matrixmetalloproteinasen**

Gen	NCBI- Nummer	Primer-Sequenz 5' > 3'	Bindestelle	T <sub>m</sub> [°C]	Amp- lifikat [bp]
MMP-1	NM_0011459 38.1	For: TGCTCATGCTTTTCAACCAG Rev: GAACATCACTTCTCCCGAA	534 - 553 860 - 879	57	346
MMP-3	NM_002422.3	For: TGCTTTGTCCTTTGATGCTG Rev: GTGCCATATTGTGCCTTCT	941 - 960 1511 - 1530	57	590
MMP-7	NM_002423.3	For: GAGTGCCAGATGTTGCAGAA Rev: AGCGTTCATCCTCATCGAAGT	310 - 329 619 - 639	59	330
MMP-10	NM_002425.2	For: AGGAAATGAGGTACAAGCAGGT Rev: GTGTGTCACCATOCTGGCATT	1126 - 1148 1415 - 1435	60	310
MMP-11	NM_005940.3	For: GGGGATGTCCACTTCGACTA Rev: CAGTGGCTAGCGAAAGGTGT	587 - 606 732 - 751	59	165
MMP-12	NM_002426.4	For: TGGACCTGGATCTGGCATTG Rev: GCCACGTATGTCATCAGCAG	652 - 671 849 - 868	59	217
MMP-13	NM_002427.3	For: GGACAAGTAGTTCCAAAGGCT Rev: GGATGTTTAGGGTTGGGGTCT	649 - 669 842 - 862	59	214
MMP-15	NM_002428.2	For: CTGCTCCTGGTGCTTCTGG Rev: GCTTCATCCACTCCTTGGTCTC	1067 - 1085 1274 - 1295	60	229
MMP-16	NM_005941.4	For: TTA CT TCTGGCGGGCTTGCCTCCTAGTAT Rev: ACAGTACAGTATGTGGCGGGGTTCCTTT	1428 - 1457 2050 - 2079	69	652
MMP-17	NM_016155.4	For: CACCAAGTGGAACAAGAGGAACCT Rev: TGGTAGTACGGCCGCATGATGGAGTGTGCA	489 - 512 882 - 911	67	423
MMP-24	NM_006690.3	For: GGGCAGAACTGGTTAAAGTCC Rev: TGATCTCATGGTATGGCCCCT	244 - 264 617 - 637	59	394
MMP-25	NM_022468.4	For: CCACACTCACCCCTGAATCCT Rev: ACTGAGGCTGGACAGCAACT	3075 - 3094 3276 - 3295	60	221
MMP-26	NM_021801.3	For: GCAGAATGGAGATGCAGACA Rev: TTGGATATCATCGGCACTGA	444 - 463 737 - 756	57	313
β-Aktin	NM_001101.2	For: TCAGAAGGATTCTATGTGGGC Rev: CCATCACGATGCCAGTGGTA	217 - 238 514 - 533	58	317

### 2.7.2 RNA-Aufreinigung aus humanen Zellen

Die Isolierung der RNA aus humanen primären Zellen erfolgte unter Verwendung des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben bei RT. Zellpellets (siehe Kapitel 2.4.5) wurden mit 600 µl RLT-Puffer, dem 10 µl/ml β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) frisch zugesetzt wurde, pro 1x10<sup>7</sup> Zellen lysiert. Zum Entfernen der Zelltrümmer wurden die Lysate mit Hilfe der QIAshredder-Säulchen (Qiagen) homogenisiert und anschließend mit

dem gleichen Volumen 70 % Ethanol gemischt. Das Lysat-Ethanol-Gemisch wurde auf RNeasy<sup>®</sup>-Säulchen aufgetragen und für 30 s bei 10.000 x g zentrifugiert. Alle anschließenden Zentrifugationsschritte erfolgten unter den gleichen Bedingungen. Mit 700 µl RW1-Waschpuffer wurde die an die Säule gebundene RNA gewaschen. Eventuell vorhandene DNA wurde durch 15 min Inkubation mit 30 Units DNase I entfernt (10 µl DNase I verdünnt mit 70 µl RDD-Puffer; Qiagen). Nach weiteren Waschschritten mit RW1- bzw. RPE-Puffer wurde die RNA mit 30–50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm bzw. des Verhältnisses der Absorption bei 260 und 280 nm am Spektralphotometer NanoDrop<sup>™</sup> ND-1000 (Peqlab, Erlangen) bestimmt. Die RNA wurde bei –80°C gelagert.

### 2.7.3 RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des SuperScript<sup>™</sup> III First-Strand Synthesis Systems (Invitrogen) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dabei wurde 1 µg RNA mit einem RNA-Primer-Mix versetzt und 5 min bei 65 °C denaturiert. Nach Abkühlung auf 4 °C wurde ein cDNA-Synthese-Mix, der die Reverse Transkriptase (SuperScript<sup>™</sup>) enthielt, auf Eis zugegeben und die cDNA bei 50 °C für 50 min synthetisiert.

#### RNA-Primer-Mix

x µl RNA (1 µg)  
1 µl dNTP-Mix (10 mM)  
1 µl Oligo(dT)<sub>20</sub> (50 µM)  
ad 10 µl DEPC-Wasser

#### cDNA-Synthese-Mix

2 µl 10xRT-Puffer  
4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
2 µl DTT (0.1 M)  
1 µl RNaseOUT<sup>™</sup> (40 U/µl)  
1 µl SuperScript<sup>™</sup> III RT (200 U/µl)

Die Synthesereaktion wurde durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min beendet. Nach Abkühlen auf 4 °C wurde die RNA durch Zugabe von 1 µl RNase H (2 U/µl) und 20 min Inkubation bei 37 °C entfernt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

Die reverse Transkription erfolgte im Thermo-Cycler PTC-100<sup>™</sup> (Biozym) unter Verwendung des folgenden Programms:

5 min    65 °C    - Denaturierung  
2 min    4 °C      - Zugabe des cDNA-Synthese-Mix  
50 min   50 °C    - cDNA-Synthese

5 min	85 °C	- Stoppen der Synthesereaktion
2 min	4 °C	- Zugabe von RNase H
20 min	37 °C	- RNA-Verdau
	4 °C	- Kühlung.

Für die anschließende PCR zur Amplifikation spezifischer Fragmente wurde von der erhaltenen cDNA 1 µl eingesetzt. Die Reaktion erfolgte unter Verwendung der AmpliTaq DNA Polymerase (Roche) mit folgendem Ansatz:

20 µl	autoklaviertes Wasser
2.5 µl	10xPCR-Puffer (15 mM Mg <sup>2+</sup> )
0.25 µl	dNTP-Mix (10 mM)
0.5 µl	Primer forward (10 µM)
0.5 µl	Primer reverse (10 µM)
1 µl	cDNA
0.25 µl	AmpliTaQ DNA Polymerase (5 U/µl).

Die Inkubation wurde im Thermo-Cycler PTC-100<sup>TM</sup> bei den für die jeweiligen Primerpaare spezifischen Annealingtemperaturen mit Hilfe des folgenden Programms durchgeführt:

2 min	94 °C	- Denaturierung	} 35 Zyklen
30 s	94 °C	- Denaturierung	
40 s	x °C	- Annealing	
1 min	72 °C	- Elongation	
10 min	72 °C	- Elongation	
	4 °C	- Kühlung.	

Als Positivkontrolle wurden in jedem Experiment spezifische Primer für das konstitutiv exprimierte Gen  $\beta$ -Aktin (siehe Tabelle 2-6) verwendet. Für Negativkontrollen wurde die cDNA durch Wasser ersetzt.

Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikationsprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. TBE-Puffer [1.1 % (w/v) Tris-Base, 0.55 % (w/v) Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8.0] wurde zum Herstellen von 2 % Agarosegelen (SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose; Lonza) und als Laufpuffer für die Elektrophorese verwendet. Es wurden 5 µl des PCR-Ansatzes mit 1 µl eines sechsfach konzentrierten Probenauftragspuffers (Peqlab) gemischt, auf das Gel aufgetragen und bei 80 V für 30 min zusammen mit einer

100 bp-DNA-Leiter (Peqlab) als Längenstandard elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele lichtgeschützt für 15 min in einer GelRed-Lösung (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain; Biotium, Hayward, CA, USA) inkubiert und unter UV-Licht mit einer CCD-Kamera (Diana III Advanced Imaging System) fotografiert.

#### 2.7.4 Herunterregulierung der Cystatin C-Expression mittels siRNA

Eine herunterregulierte Expression von Cystatin C in mesenchymalen Stromazellen sollte durch Degradation der mRNA mit Hilfe spezifischer siRNA-Molekülen erreicht werden. Hierfür wurde in vorangehenden Experimenten die Transfektion von MSCs mit Hilfe von Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) optimiert. Pro Vertiefung einer 24-Well-Zellkulturplatte wurden  $5 \times 10^4$  MSCs ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80–90 % kultiviert. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit serumfreiem Optimum I (Invitrogen) gewaschen. Die siRNA in verschiedenen Konzentrationen und 2 µl Lipofectamine® wurden getrennt in je 100 µl Optimum verdünnt, durch vorsichtiges Invertieren miteinander vermischt und zur Bildung des RNA-Lipid-Komplexes für 20 min bei RT inkubiert. Nun wurde der Ansatz vorsichtig zu den Zellen in der 24-Well-Kammer pipettiert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Nach 15–18 h wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und zur Regeneration für 2 h mit frischem GMP-Medium inkubiert. Zur Analyse der Transfektionseffizienz wurden die Zellen im Anschluss mit PBS gewaschen und mit 300 µl serumfreies Medium zur Konditionierung für 24 h bedeckt. Die Cystatin C-Konzentration in den konditionierten Überständen wurde mit Hilfe eines spezifischen ELISA bestimmt (siehe Kapitel 2.8.3).

Zur Herunterregulierung der Cystatin C-Expression standen die zwei spezifischen siRNA-Oligonukleotide der SilencerSelect®-Kategorie von Ambion (Life Technologies) s3665 und s3666 zur Verfügung (Tabelle 2-7). Als Negativkontrolle wurde ein unspezifisches Oligonukleotid verwendet.

**Tabelle 2-7. siRNA-Oligonukleotide**

Oligonukleotid	Sense-Strang 5' > 3'	Antisense-Strang 5' > 3'
s3665	GGAAAGCAUUCUGCUCUUUTT	AAAGAGCAGAAUGCUUUCCTT
s3666	CGAACCACGUGUACCAAGATT	UCUUGGUACACGUGGUUCGGC
Silencer® Select Negative Control	UAACGACGCGACGACGUAATT	UUACGUCGUCGCGUCGUUATT

Für Zell-Zelladhäsionsstudien (siehe Kapitel 2.6.3) wurden zwischen  $2 \times 10^4$  und  $4 \times 10^4$  MSCs pro Vertiefung einer 48-Well-Zellkulturplatte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80–90 % kultiviert. Die Zellen wurden mit serumfreiem Optimum gewaschen und nach dem oben beschriebenen Protokoll über Nacht mit 4 pmol der spezifischen bzw. unspezifischen siRNA transfiziert. Nach 15–18 h wurde der Transfektionsüberstand verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und zur Regeneration für 2 h mit frischem GMP-Medium inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit PBS/Ionenmix und der Adhäsionsassay mit CD34<sup>+</sup> HSPCs nach dem in Kapitel 2.6.3 beschriebenen Protokoll. Parallel dazu wurden die MSCs in einigen Wells der 48-Well-Platte mit dem Triton-Lysepuffer (siehe Kapitel 2.4.5) lysiert. Die Effizienz der Herunterregulierung wurde durch Messung der Cystatin C-Konzentration mit Hilfe eines spezifischen ELISA (siehe Kapitel 2.8.3) bestimmt.

Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens von HSPCs wurde die Expression von Cystatin C in MSC-Zellrasen auf Transwell-Inserts herunterreguliert. Hierfür wurden zwischen  $4 \times 10^4$  und  $5 \times 10^4$  MSCs in die obere Transwell-Kammer ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden mit serumfreiem Optimum gewaschen und nach dem oben beschriebenen Protokoll über Nacht mit 4 pmol der spezifischen bzw. unspezifischen siRNA transfiziert. Nach 15–18 h wurde der Transfektionsüberstand verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und zur Regeneration für 2 h mit frischem GMP-Medium inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit serumfreiem Medium und der Transwell-Invasionsassay mit CD34<sup>+</sup> HSPCs nach dem in Kapitel 2.6.4 beschriebenen Protokoll.

## **2.8 Immunologische Methoden**

### **2.8.1 SDS-PAGE und Western Blot**

Die Auftrennung von Proteingemischen aus Zelllysaten und konditionierten Zellkulturüberständen in Abhängigkeit vom Molekulargewicht erfolgte über die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Polyacrylamidkonzentration (PA, Rotiphorese Gel 30; Carl Roth) der Trenngele richtete sich nach der Größe der zu detektierenden Proteine. Das Sammelgel hatte eine PA-Konzentration von 3.9 %. Die Gele wurden mit folgender Zusammensetzung in einer Gelgießapparatur (Mighty Small Multiple Gel Caster SE 200 Series; Hoefer) gegossen:

	6 % Trenngel	10 % Trenngel	15 % Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid [ml]	6.2	10.3	15.3
4xTris/SDS, pH 8.8 [ml]	7.7	7.7	7.7
H <sub>2</sub> O [ml]	16.9	12.8	7.8
10 % APS [ $\mu$ l]	102	102	102
TEMED [ $\mu$ l]	21	21	21

	3.9 % Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid [ml]	1.8
4xTris/SDS, pH 6.8 [ml]	3.5
H <sub>2</sub> O [ml]	8.5
10 % APS [ $\mu$ l]	70
TEMED [ $\mu$ l]	14

In Tabelle 2-8 sind alle für die SDS-PAGE und Western Blot-Analyse verwendeten Puffer zusammengefasst.

**Tabelle 2-8. Puffer für SDS-PAGE und Western Blot**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
4xTris/SDS, pH 6.8	0.5 M Tris, 0.4 % SDS (w/v)
4xTris/SDS, pH 8.8	1.5 M Tris, 0.4 % SDS (w/v)
6xSDS-Probenpuffer, pH 6.8	60 % (v/v) Glycerin, 12 % (w/v) SDS, 0.38 M Tris-HCl, 0.6 % Bromphenolblau (w/v)
Laufpuffer, pH 8.6	50 mM Tris, 380 mM Glycin, 0.1 % SDS (w/v)
CAPS-Puffer, pH 11	10 mM CAPS
TBST, pH 7.4	25 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05 % (v/v) Tween <sup>TM</sup> 20

Bis zu 25  $\mu$ l eines Zelllysats oder des konzentrierten konditionierten Mediums wurden mit 6xSDS-Probenpuffer gemischt, der entweder reduzierend (mit 12 % frisch zugesetztes Mercaptoethanol) oder nicht reduzierend (ohne Mercaptoethanol) eingesetzt wurde, und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden in die Geltaschen geladen und elektrophoretisch in

der Gelkammer Mighty Small (Hoefer) unter Wasserkühlung mit einer Stromstärke von 40 mA pro Gel aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der Lauffront und als Orientierungshilfe für die Proteingrößen wurden auf jedes Gel 5 µl eines Proteinmarkers (Prestained Protein Ladder Broad Range; BioLabs, Frankfurt) aufgetragen.

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit Hilfe der Hoefer<sup>®</sup> SemiPhor<sup>™</sup>-Apparatur (Hoefer) auf eine PVDF-Membran (Immobilon<sup>®</sup>-P; Millipore) geblottet. Da hauptsächlich Proteine mit kleinerem Molekulargewicht untersucht wurden, erfolgte die Übertragung nach dem Semi-dry-Prinzip. Hierbei wurden zwischen zwei Plattenelektroden drei Lagen Whatman<sup>®</sup>-Papier, die PVDF-Membran, das PA-Gel, drei weitere Lagen Whatman<sup>®</sup>-Papier (von der Anode in Richtung Kathode) luftblasenfrei geschichtet. Zuvor wurde die PVDF-Membran für 30 s in Methanol und anschließend für 5 min zusammen mit dem Whatman<sup>®</sup>-Papier in CAPS-Puffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte mit 150 mA pro Gel. Die Transferdauer richtete sich nach der Proteingröße. Eine erfolgreiche Übertragung der Proteine wurde an den gefärbten Banden des Größenmarkers auf der Membran sichtbar.

Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran nun mit 5 % Magermilchlösung in TBST bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit TBST folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4 °C und leichtem Schütteln über Nacht. Tabelle 2-9 enthält eine Auflistung der im Western Blot verwendeten Antikörper.

**Tabelle 2-9. Primäre Antikörper für Western Blot-Analysen**

<b>Antikörper (Spezies; Klon)</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-N-Cadherin (mouse; 8C11)	BioLegend (London, UK)	1:2000
anti-Cadherin-11 (mouse; 283416)	R&D Systems	1:2000
anti-Cystatin B (rabbit; EPR3931)	Abcam (Cambridge, UK)	1:2000
anti-Cystatin C (rabbit; polyklonal)	Abcam	1:400
anti-Cystatin E (mouse; 211515)	R&D Systems	1:300
anti-MMP-2 (rabbit; polyklonal)	Abcam	1:500
anti-MMP-3 (mouse; monoklonal)	Chemicon	1:500
anti-MMP-7 (mouse; 111433)	R&D Systems	1:200
anti-MMP-9 (mouse; GE213)	AbD Serotec	1:500
anti-MMP-10 (mouse; 117239)	R&D Systems	1:200
anti-MMP-11 (mouse; SL3.05)	Thermo Scientific	1:200
anti-MMP-13 (mouse; 87512)	R&D Systems	1:500

Um Signale durch eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers ausschließen zu können, wurde bei jedem Experiment eine Membran mitgeführt, bei der auf den Primärantikörper verzichtet wurde. Nach 2 h intensiven Waschens mit TBST wurde der Sekundärantikörper entsprechend der Spezies, aus der der Primärantikörper stammte, auf die Membranen gegeben und für 1 h bei RT oder 37 °C inkubiert. Es folgten weitere 3 h intensiven Waschens mit TBST. Tabelle 2-10 fasst die eingesetzten Sekundärantikörper zusammen. Im Falle von Peroxidase-gekoppelten Antikörpern wurde die Membran nun mit dem Chemilumineszenz-Reagens Immobilon™ Western (Millipore) für 5 min im Dunkeln inkubiert. Ein lichtempfindlicher Film (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare, Freiburg) wurde aufgelegt und in einer Entwicklermaschine (Curix 60; AGFA) entwickelt. Bei Phosphatase-gekoppelten Antikörpern wurde das Signal durch Inkubation mit dem BCIP®/NBT-Substrat (Sigma) direkt auf der Membran sichtbar.

**Tabelle 2-10. Sekundäre Antikörper für Western Blot-Analysen**

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
AP-conjugated goat anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)	1:2500
AP-conjugated rabbit anti-mouse	Dako (Hamburg)	1:500
HRP-conjugated rabbit anti-mouse	Dako	1:15.000
HRP-conjugated goat anti-rabbit	Abcam	1:10.000

(AP: alkalische Phosphatase; HRP: Meerrettichperoxidase)

### 2.8.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Adhärenz wachsende Zellen wurden für Immunfluoreszenzfärbungen auf Glasobjektträgern mit 8 Kammern (BD BioCoat™ Culture Slides; BD Biosciences) bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert. Für MSCs wurden Objektträger aus Kunststoff (Sarstedt) verwendet, da die Zellen auf Glas unzureichend adhären. Nach zweimaligem Waschen mit PBS<sup>++</sup> wurden die Zellrasen mit eiskaltem Methanol für 5 min bei -20 °C fixiert. Kryoschnitte von Sphäroiden aus der 3D Kultur wurden mit 4 % PFA für 15 min bei RT fixiert. Zur Detektion von intrazellulär lokalisierten Antigenen wurden die Schnitte zudem mit 0.1 % Triton® X-100 (AppliChem; München) für 10 min bei RT permeabilisiert. Nun folgten zwei Waschschriffe mit PBS<sup>++</sup>, die Blockierung unspezifischer Bindestellen mit 3 % BSA in PBS für 1 h bei RT und weitere Waschschriffe. Die Inkubation mit dem Primärantikörper in 0.1 % BSA in PBS wurde entweder über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT in einer dunklen feuchten Kammer durchge-

führt. Für die Färbungen mit den Antikörpern gegen PARP1 und Caspase-3 wurde 5 % normales Ziegen Serum (NGS) mit 0.3 % Triton<sup>®</sup> X-100 in PBS als Blockierlösung verwendet, bevor die Proben mit den Primärantikörpern, verdünnt im Antikörperpuffer (0.1 % BSA, 0.3 % Triton<sup>®</sup> X-100 in PBS), über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Um unspezifische Bindungen durch Sekundärantikörper zu erkennen, wurde bei den Kontrollen auf den Primärantikörper verzichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS<sup>++</sup> wurde der in 0.1 % BSA in PBS oder im Antikörperpuffer verdünnte Fluorochrom-konjugierte sekundäre Antikörper zugegeben und 1 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde der Antikörperlösung 1 µg/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid; Roche) zugesetzt. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Zellen bzw. Schnitte in Einbettmedium (Fluorescence Mounting Medium; Dako) eingebettet. Zur Aushärtung wurden die Proben bei 4 °C im Dunkeln gelagert und am nächsten Tag am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot) mit der Software AxioVision<sup>™</sup> Rel. 4.8 ausgewertet.

**Tabelle 2-11. Primäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen**

Antikörper (Spezies; Klon)	Hersteller	Verdünnung
anti-N-Cadherin (mouse; 8C11)	BioLegend	1:100
anti-Cadherin-11 (mouse; 283416)	R&D Systems	1:100
anti-CD45 (mouse; HI30)	BioLegend	1:250
anti-CD90 (mouse; 5E10)	BioLegend	1:500
anti-Cleaved Caspase-3 (rabbit; 5A1E)	Cell Signaling Technology (Denver, MA, USA)	1:100
anti-Cleaved PARP1 (rabbit; D64E10)	Cell Signaling Technology	1:100
anti-Kollagen Typ I (mouse; I-8H5)	Acris (Herford)	1:100
anti-Kollagen Typ IV (rabbit; monoklonal)	Prof. Dr. Johannes Eble, Universität Münster	1:200
anti-Kollagen Typ VI (rabbit; monoklonal)	Klein et al., 1995	1:100
anti-Laminin $\alpha$ 2 (rabbit; polyklonal)	Bioss (Freiburg)	1:100
anti-Laminin $\alpha$ 4 (mouse; 3H2)	Dr. Sulev Ingerpuu, IMCB, Universität Tartu, Estland	1:500
anti-Laminin $\alpha$ 5 (mouse; 4B12)	Dr. Sulev Ingerpuu	1:500
anti-Laminin $\beta$ 1 (rat; LT3)	Abcam	1:400
anti-Laminin $\beta$ 2 (mouse; C4)	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), University of Iowa	1:100
anti-Laminin $\gamma$ 1 (mouse; D18)	(Iowa City, IA, USA)	1:100
anti-Laminin $\gamma$ 2 (mouse; D4B5)	Millipore	1:100

**Tabelle 2-11. Primäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen (Fortsetzung)**

Antikörper (Spezies; Klon)	Hersteller	Verdünnung
anti-Fibronektin (mouse; P1H11)	R&D Systems	1:200
anti-Perlecan (rabbit; polyklonal)	Labor Prof. Dr. Gerd Klein	1:1000
anti-Tenascin-C (mouse; T2H5)	Abcam	1:100
anti-Cystatin B (rabbit; EPR3931)	Abcam	1:100
anti-Cystatin C (rabbit; polyklonal)	Abcam	1:100
anti-MMP-3 (mouse; monoklonal)	Chemicon	1:500
anti-MMP-7 (mouse; 111433)	R&D Systems	1:50
anti-MMP-10 (mouse; 117239)	R&D Systems	1:50
anti-MMP-11 (mouse; SL3.05)	Thermo Scientific	1:100
anti-MMP-13 (mouse; 87512)	R&D Systems	1:100

**Tabelle 2-12. Sekundäre Antikörper für indirekte Immunfluoreszenzfärbungen**

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488-conjugated goat anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch	1:500
Cy <sup>™</sup> 3-conjugated goat anti-mouse	Jackson ImmunoResearch	1:300
Cy <sup>™</sup> 3-conjugated goat anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch	1:1000
Cy <sup>™</sup> 3-conjugated goat anti-rat	Jackson ImmunoResearch	1:400

### 2.8.3 Cystatin C-ELISA

Die Bestimmung der Cystatin C-Konzentration in Zelllysaten und konditionierten Überständen erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Enzym-gekoppelten Immunoabsorptionstests (Duo-Set ELISA Development Kit; R&D Systems) nach Herstellerangaben. Gemäß dem Prinzip der Sandwichmethode wurde eine Nunc MaxiSorp<sup>®</sup> 96-Well-Mikrotiterplatte (Thermo Scientific) mit einem monoklonalen Fangantikörper (4 µg/ml) gegen Cystatin C beschichtet. Nach der Blockierung mit 1 % BSA in PBS wurden 100 µl einer Standardlösung oder einer Probe pro Vertiefung in Duplikaten pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert, um die Immobilisierung von Cystatin C am Boden der Platte zu erlauben. Nach mehrmaligem Waschen mit 0.05 % Tween<sup>™</sup> 20 erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten monoklonalen Detektionsantikörper (250 ng/ml) für 2 h und mit HRP-gekoppeltem Streptavidin für 20 min bei RT. Zur Detek-

tion wurde ein 1:1-Substratgemisch aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin zugegeben, die Reaktion nach 20 min durch Zugabe von 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die optische Dichte der Lösungen bei 450 nm am ELISA-Reader (Tecan) gemessen. Zum Bestimmen der unbekannt Konzentrationen wurde eine Eichkurve mit rekombinatem Cystatin C erstellt. Die Proben wurden für die Messung nach Bedarf verdünnt.

#### **2.8.4 FACS-Analyse der CD34-Expression der HSPCs**

Die Expression des Oberflächenmarkers CD34 durch HSPCs nach Expansion in der 2D oder 3D Kultur wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers (BD LSRII; BD Biosciences) untersucht. Hierfür wurden die Zellen aus dem jeweiligen System (in 2D mit und in 3D ohne Accutase) geerntet, in FACS-Röhrchen (BD Falcon<sup>®</sup>) überführt und zweimal mit FACS-Puffer (PBS, 0.1 % BSA, 0.05 % NaN<sub>3</sub>) gewaschen. Nach der Blockierung unspezifischer Bindestellen mit 2 µl 1 % Polyglobin (Bayer, Leverkusen) für 10 min bei 4 °C und zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen mit einem FITC-gekoppelten anti-CD34-Antikörper aus der Maus (Klon: AC136; Miltenyi Biotec) für 30 min bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Bei der Negativkontrolle erfolgte keine Zugabe des Antikörpers. Nach drei Waschschrritten wurden nun pro Ansatz 5x10<sup>4</sup> Zellen mit Hilfe der Software FACSDiva (BD Biosciences) gemessen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programms FlowJo 7.6.4 (Tree Star, Inc., Ashland, USA).

### **2.9 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.9.1 Proteolytischer *in vitro*-Verdau rekombinanter Proteine**

Um die Möglichkeit einer proteolytischen Degradation von Cystatin C und SDF-1α durch Matrixmetalloproteinasen zu evaluieren, wurden die Substrate in rekombinanter Form *in vitro* mit den entsprechenden aktivierten Proteasen inkubiert. Hierfür wurde rekombinantes SDF-1α (PeproTech) mit MMP-7 (R&D Systems), MMP-11 (Enzo Life Sciences) oder MMP-13 (Giotto Biotech) nach zwei verschiedenen Protokollen, die in Tabelle 2-13 wiedergegeben sind, verdaut. Die Proform von MMP-7 wurde durch 1 mM APMA (4-Aminophenyl-quecksilberacetat) aktiviert. MMP-11 und -13 lagen bereits in der aktiven Form vor. Rekombinantes Cystatin C (Life Technologies oder Enzo Life Sciences) wurde mit MMP-2 (Calbiochem), MMP-8 (Calbiochem), MMP-9 (Calbiochem) oder MMP-14 (R&D Systems) nach Protokoll 1 (Tabelle 2-13) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wur-

den die Proben entweder für eine massenspektrometrische Analyse bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert oder für eine Gelelektrophorese mit 6xSDS-Probenpuffer gemischt und elektrophoretisch aufgetrennt.

**Tabelle 2-13. Protokolle für den *in vitro*-Verdau von rekombinantem SDF-1 $\alpha$**

	<b>Protokoll 1</b>	<b>Protokoll 2 (nach McQuibban et al., 2001)</b>
Rh SDF-1 $\alpha$	300 ng	100 ng
Rh MMP	100 ng	1 ng
Puffer	200 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 50 $\mu$ M ZnCl <sub>2</sub> ; pH 7.5	150 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 7.5
Inkubation	24 h bei 37 $^{\circ}$ C	24 h bei 37 $^{\circ}$ C

### 2.9.2 Silberfärbung (nach Shevchenko)

Um die Degradation der Proteine nach dem proteolytischen Verdau sichtbar zu machen, erfolgte nach der Gelelektrophorese die Silberfärbung nach Shevchenko (Shevchenko et al., 1996). Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei RT und unter ständigem Schwenken des Gels durchgeführt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel nach kurzem Spülen mit Wasser für 10 min in der Fixierlösung fixiert. Es folgten zwei Waschschrte und die Inkubation in 0.02 % Natriumthiosulfat für 1 min. Das Gel wurde zweimal kurz mit Wasser gewaschen und für 10 min bei 4  $^{\circ}$ C mit 0.1 % Silbernitrat inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten wurde das Gel durch Schwenken in der Entwicklerlösung entwickelt, bis die Banden die gewünschte Farbin-tensität erreichten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM Natrium-EDTA (pH 8) gestoppt. Das Gel wurde nun kurz in Äquilibrierlösung inkubiert und anschließend zwischen zwei Zellulosefolien (DryEase Mini Cellophane; Invitrogen) luftblasenfrei in einen Gel-trock-nungsrahmen gespannt und getrocknet. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 2-14 wiedergegeben.

**Tabelle 2-14. Lösungen für die Silberfärbung von Proteinen in PA-Gelen**

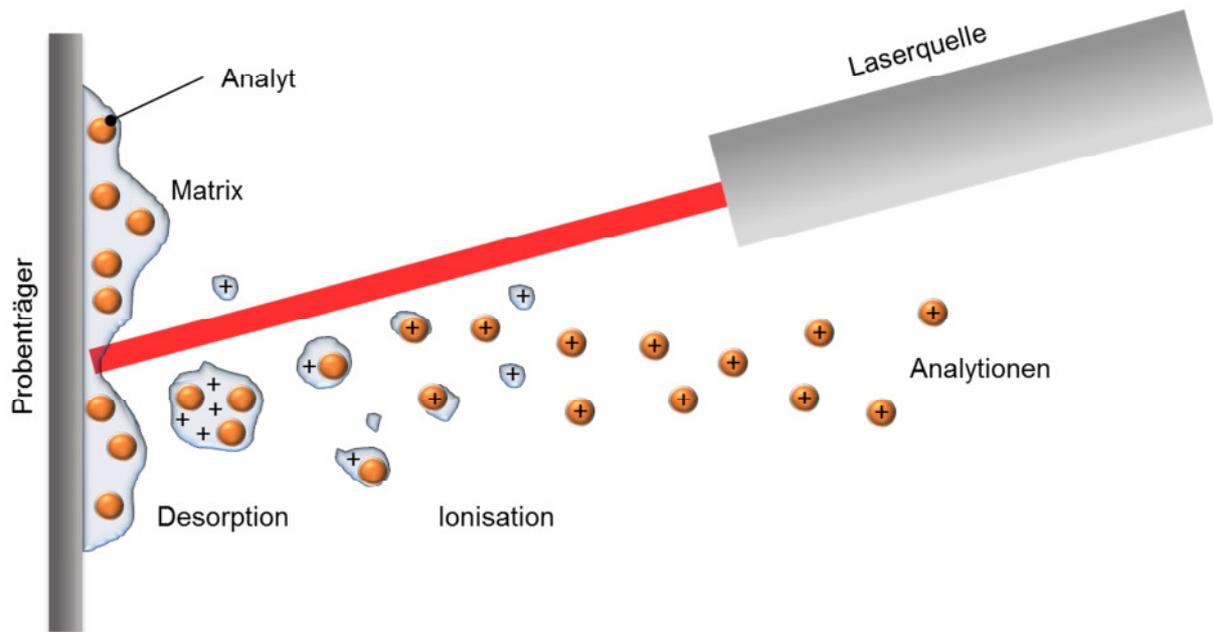
Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung	40 % Methanol, 0.5 % Formaldehyd
Entwicklerlösung	3 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0.05 % Formaldehyd, 0.000016 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
Äquilibrierlösung	10 % Glycerin, 20 % Ethanol

### 2.9.3 MALDI-TOF-Analyse

Die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung (matrix assisted laser desorption/ionization) mit Flugzeit-Analyse (time of flight), kurz MALDI-TOF, ist ein hochspezifisches und sensitives Verfahren zur analytischen Massenbestimmung chemischer Verbindungen und gegebenenfalls deren Identifizierung mittels etablierter Datenbanken (Hillenkamp and Karas, 1990). Gerade Proteine im niedrigmolekularen Bereich, wie SDF-1 $\alpha$  mit 8.6 kDa und Cystatin C mit 13.4 kDa Molekulargewicht, können mit dieser Methode analysiert werden. Hierbei wird der zu untersuchende Analyt mit einer Matrix, welche in der Regel aus Derivaten organischer Säuren wie Benzoe- oder Zimtsäure besteht, gemischt und auf einen Probenträger aufgebracht, wo durch Verdampfen der Wassermoleküle eine Kokristallisation von Analyt und Matrix stattfindet. Im Hochvakuum werden durch einen fokussierten, hochenergetischen Laserstrahl die Matrix-Analyt-Kristalle explosionsartig verdampft (Desorption), wobei es gleichzeitig zur Ionisierung der Analytmoleküle kommt (Abbildung 2-4). Im darauf folgenden starken elektrischen Feld werden die Ionen beschleunigt und gelangen anschließend in eine feldfreie Flugröhre. Hier werden einzelne Ionen nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z-Verhältnis) getrennt, da diese zwei Eigenschaften die Flugzeit beeinflussen und somit den Zeitpunkt des Auftreffens auf einen Detektor bestimmen. Der Detektor ermöglicht die Aufzeichnung eines für den jeweiligen Analyten spezifischen Massenspektrums.

Zur massenspektrometrischen Analyse der proteolytischen Degradation von SDF-1 $\alpha$  und Cystatin C durch MMPs wurde je 1  $\mu$ l vom Verdauansatz (entsprechend 10 ng SDF-1 $\alpha$  bzw. 15 ng Cystatin C) mit 5  $\mu$ l 0.1 % Ameisensäure angesäuert und auf einen Matrixspot eines PAC-HCCA-Trägers (Bruker Daltonics) mit  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizimtsäure als Matrix aufgetragen. Nach 10 min Adsorption, dreimaligem Waschen mit 0.1 % Ameisensäure und vollständigem Trocknen wurde der Träger in den Vakuumbereich des MALDI-TOF-Geräts

Reflex IV (Bruker Daltonics) eingeführt und die Massenspektren mit Hilfe des Programms flexControl 2.4 (Bruker Daltonics) aufgenommen.



**Abbildung 2-4. Schema der Matrix-unterstützten Ionisation beim MALDI-Verfahren.** Durch Laserlicht mit hoher Energie kommt es zur Verdampfung der Matrix-Analyt-Mischung und zur Entstehung von Analytionen.

#### 2.9.4 Aktivitätsmessungen von Cystain C-inhibierten Cathepsinen

Die Aktivität von Proteasen kann *in vitro* durch Fluoreszenz-gequenchte Peptidsubstrate untersucht werden. Hierbei handelt es sich um synthetische Peptide, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz spezifisch von einer Protease oder auch einer Gruppe von Proteasen katalytisch gespalten werden können. Die Proteolyse hat zur Folge, dass ein zuvor gequenchtes Fluorophor von der quencheden Gruppe getrennt wird. Diese spezifische Reaktion kann an einem Fluorospektrometer quantifiziert werden. Zur Messung der Aktivität von rekombinantem Cathepsin B und Cathepsin L (beide R&D Systems) wurden die Peptidsubstrate von Enzo Life Sciences Z-GPR-AMC (Benzyloxycarbonyl-Glycin-Prolin-Arginin-7-Amino-4-Methylcoumarin) bzw. Z-RR-AMC (Benzyloxycarbonyl-Arginin-Arginin-7-Amino-4-Methylcoumarin) verwendet. In vorangehenden Titrationsversuchen mit unterschiedlichen Cystatin C-Konzentrationen (5, 10, 25, 50 und 75 nM) wurden zunächst die optimalen Bedingungen für die Inhibitionsassays bestimmt. Hierfür wurden alle Zutaten in die Vertiefungen

einer weißen 96-Well-Platte (Greiner Bio-One) pipettiert und die Fluoreszenzentwicklung über die Zeit bei 360 nm Anregungs- und 465 nm Emissionswellenlänge am Tecan Fluoroscan (Tecan) gemessen. Die Cathepsin B-Reaktion erfolgte in 25 mM MES, 5 mM DTT (pH 5) und die Cathepsin L-Reaktion in 50 mM MES, 5 mM DTT (pH 6) bei 37 °C. Nach erfolgter Etablierung der richtigen Parameter wurde schließlich das inhibitorische Potential von Cystatin C gegenüber Cathepsin B bzw. L vor und nach der Degradation durch MMPs untersucht.

## **2.10 Statistische Auswertung**

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurden der parametrische *t*-Test oder die Varianzanalyse (ANOVA) mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 5 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA) durchgeführt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant, hochsignifikant oder höchstsignifikant erachtet, wenn  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) bzw.  $p < 0.001$  (\*\*\*) war. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Mittelwerte.

## **3 Ergebnisse**

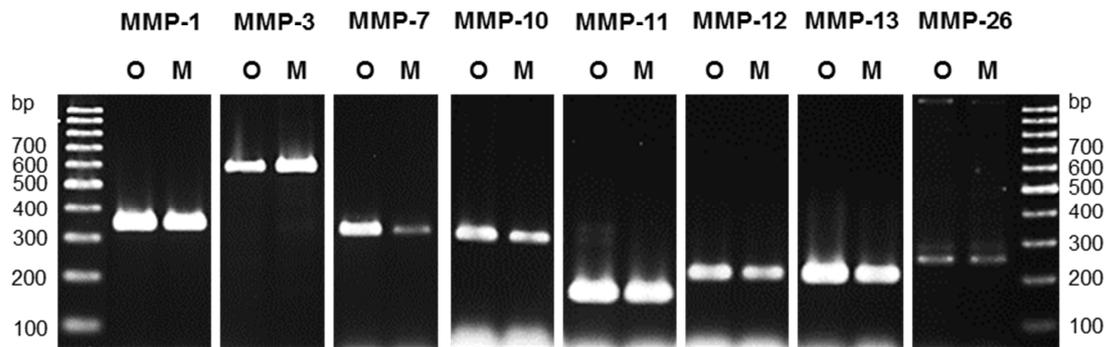
### **3.1 Matrixmetalloproteinasen im humanen Knochenmark**

Während der Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf leisten die Matrixmetalloproteinasen MMP-2, -8, -9 und -14 auf vielfältige Weise einen enormen Beitrag (Klein et al., 2015). Ausgehend von dem breiten Substratspektrum der MMPs hinsichtlich zahlreicher ECM-Bestandteile sowie Chemo- und Zytokine der Stammzellnische sollte hier eine potentielle Beteiligung weiterer MMPs an der HSPC-Regulierung analysiert werden.

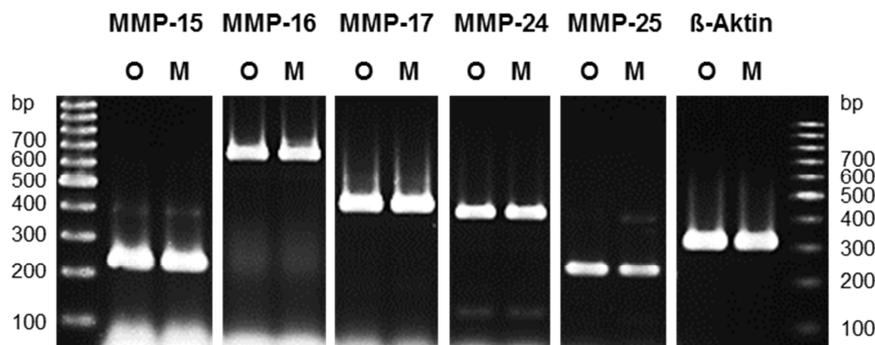
#### **3.1.1 Expression sezernierter MMPs durch Nischenzellen**

Osteoblasten und mesenchymale Stromazellen (MSCs) zählen zu den wichtigsten zellulären Komponenten der Stammzellnische. Nach der Isolierung aus humanem Knochenmark wurden die beiden Zelltypen in Kultur expandiert, um die Genexpression verschiedener MMPs mit Hilfe der RT-PCR-Analyse sichtbar zu machen. Hierzu wurden spezifische Primerpaare für die Gene der sezernierten Proteasen MMP-1, -3, -7, -10, -11, -12, -13 und -26 sowie der membrangebundenen Enzyme MMP-15, -16, -17, -24 und -25 entworfen. Bis auf MMP-26 konnte für alle getesteten Proteasenprimer ein PCR-Produkt mit der richtigen Größe in der Agarose-Gelelektrophorese identifiziert werden, wobei für die meisten Amplifikate keine auffälligen Unterschiede in der Intensität zwischen Osteoblasten und ihren Progenitoren, den MSCs, zu sehen waren (Abbildung 3-1). Lediglich für MMP-7 konnte bei den Osteoblasten eine deutlich intensivere Bande als bei den MSCs detektiert werden. Ausgehend von der gleichen Menge an mRNA, die zur cDNA umgeschrieben und für die PCR-Analyse eingesetzt wurde, kann man daraus schlussfolgern, dass Osteoblasten das MMP-7-Gen in stärkerem Maße transkribieren als ihre Vorläufer. Als Positivkontrolle wurde das konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Aktin-Gen herangezogen. Im Fall von MMP-26 wurde ein um etwa 50 bp kleineres Produkt als das anhand der Primersequenz berechnete PCR-Produkt mit geringer Intensität amplifiziert. Somit konnte kein spezifischer Nachweis für die Transkription dieses Gens in den Nischenzellen erbracht werden. MMP-26 hat ein auf wenige Gewebetypen der Gebärmutter und einige Krebsvarianten beschränktes Expressionsmuster (Nagase et al., 2006).

### Sezernierte MMPs



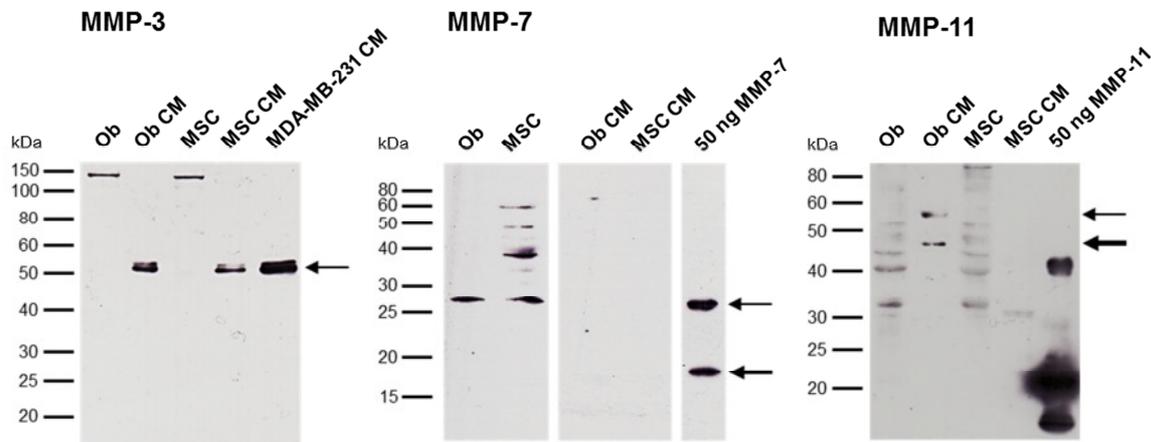
### Membranständige MMPs



**Abbildung 3-1: MMP-Genexpression in humanen Nischenzellen.** Die Transkription der Gene für sezernierte und membrangebundene Matrixmetalloproteinasen in primären Osteoblasten (O) und MSCs (M) aus dem Knochenmark wurde mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Eine 100 bp-DNA-Leiter diente der Größenbestimmung der PCR-Produkte. Ein  $\beta$ -Aktin-Primerpaar mit einem PCR-Produkt von 317 bp wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Alle getesteten Primer führten zu einem spezifischen Amplifikat in Osteoblasten und MSCs. Lediglich für MMP-26 konnte kein Produkt in der richtigen Größe amplifiziert werden.

Da man die Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse nicht immer direkt auf die Expression auf Proteinebene übertragen kann, wurde im nächsten Schritt die Translation der MMP-mRNA mit Antikörpern gegen die jeweilige Protease in Western Blots überprüft. Der Fokus lag dabei auf den sezernierten MMPs. Es wurden Zellysate und über 48 h konditionierte Überstände von primären Osteoblasten und MSCs mit Antikörpern, die spezifisch die zymogene und die aktivierte Form der Proteasen MMP-3, -7, -10 und -11 erkennen, untersucht (Abbildung 3-2). Eine der Proform von MMP-3 (52–54 kDa) entsprechende Doppelbande wurde sowohl in Osteoblasten- als auch in MSC-Überständen detektiert, während in beiden Zellysaten kein spezifisches Signal, statt dessen aber eine klare Bande zwischen 100 und 150 kDa zu sehen war. Dies könnte einem stabilen Komplex aus MMP-3 und einem zel-

lulären Molekül entsprechen, der erst durch Sezernierung der Protease aufgelöst wird. Als Positivkontrolle diente hier die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231, die zahlreiche Vertreter der MMP-Familie, darunter auch MMP-3, exprimiert.

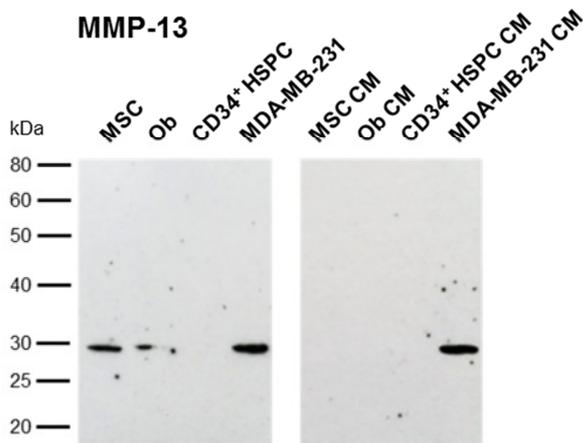


**Abbildung 3-2: MMP-Proteinexpression in humanen Osteoblasten (Ob) und MSCs.** Mit spezifischen Antikörpern, die an die zymogene und aktivierte Form der Proteasen MMP-3 (52–54/45 kDa), MMP-7 (28/18 kDa) oder MMP-11 (60/46 kDa) binden, wurden Western Blot-Analysen mit Zelllysaten und konditionierten Überständen (CM, conditioned medium) von Osteoblasten und MSCs durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten Überstände der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 bzw. rekombinante Proteine. Rh MMP-11 bestand aus der katalytischen Domäne von 19,3 kDa Größe und bildete durch Dimerisierung eine 40 kDa-Bande. Osteoblasten sezernierten die MMP-3-Proform und die zymogene und aktivierte Form von MMP-11 (dünner bzw. dicker Pfeil). MSCs sezernierten lediglich die MMP-3-Proform. Beide Zelltypen exprimierten das MMP-7-Zymogen.

Die Spezifität des Antikörpers gegen MMP-7, der an die Pro- und die aktivierte Form (28 bzw. 18 kDa) bindet, wurde durch Verwendung der rekombinanten humanen (rh) Protease belegt. Das MMP-7-Zymogen wurde von Osteoblasten und MSCs exprimiert, eine Sezernierung war jedoch bei beiden Zelltypen nicht nachweisbar (Abbildung 3-2). Dagegen wurden sowohl die zymogene als auch die aktivierte Protease MMP-11 in Osteoblasten-Überständen, jedoch nicht im MSC-konditionierten Medium detektiert. Der MMP-11-spezifische Antikörper erkannte auch das lediglich aus der katalytischen Domäne bestehende rekombinante Protein (Abbildung 3-2).

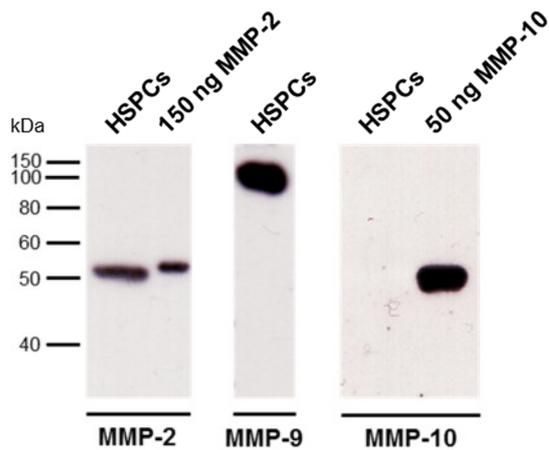
Die Proteinexpression von MMP-1 und -12 konnte nicht untersucht werden, da keine geeigneten Antikörper zur Verfügung standen. Mit einem Antikörper gegen MMP-10 konnte weder in Osteoblasten noch in MSCs ein Western Blot-Signal detektiert werden (nicht gezeigt). Dagegen war eine ausgeprägte Bande von 25–30 kDa Größe mit einem MMP-13-spezifischen Antikörper in beiden Zelltypen und in der Zelllinie MDA-MB-231, jedoch nicht in CD34<sup>+</sup>

HSPCs aus Nabelschnurblut nachweisbar (Abbildung 3-3). Die zymogene und aktivierte Variante von MMP-13 sind ungefähr 60 bzw. 48 kDa groß, wobei Letztere durch Autokatalyse in eine etwa 25–30 kDa große Form übergehen kann. Diese ist proteolytisch immer noch stark aktiv (Han et al., 2007). Eine MMP-13-Sekretion wurde nur für die Brustkrebszellen gezeigt (Abbildung 3-3).



**Abbildung 3-3: Expression der Protease MMP-13 in Nischenzellen des humanen Knochenmarks.** Zelllysate und konditionierte Überständen von MSCs, Osteoblasten und CD34<sup>+</sup> HSPCs aus Nabelschnurblut wurden in Western Blot-Analysen auf die Expression von MMP-13 hin untersucht. Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 diente als Positivkontrolle. Der Antikörper detektierte nicht die zymogene (60 kDa) und aktivierte (48 kDa) Form der Protease, sondern eine 28 kDa-Bande, die der Größe der katalytischen Domäne entsprach. In MSCs und Osteoblasten, jedoch nicht in HSPCs, war diese Form nachweisbar, wurde von den Zellen aber nicht sezerniert.

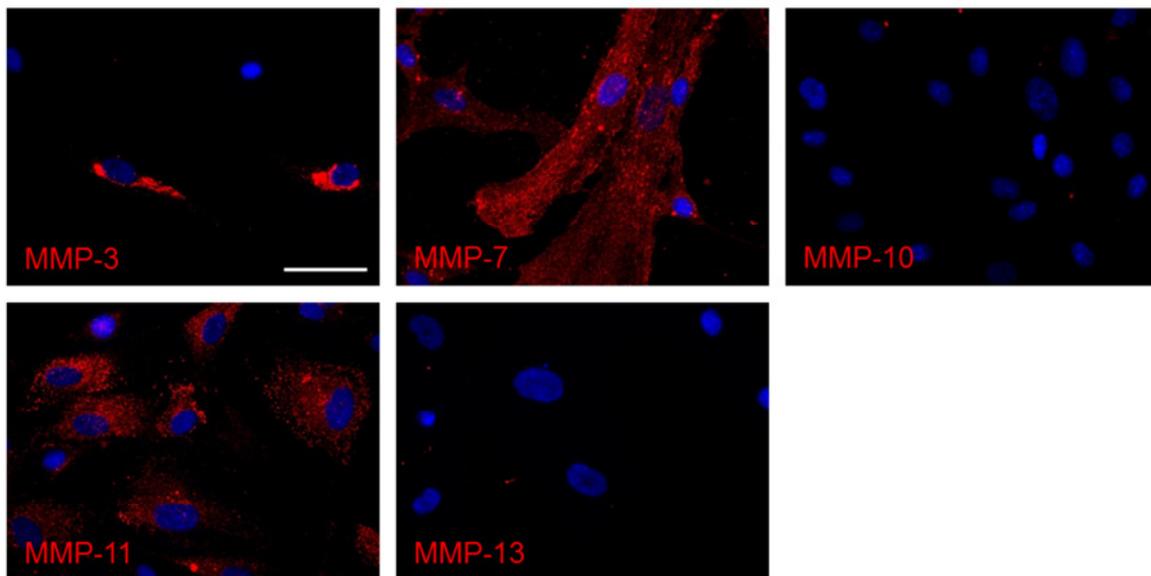
In einer früheren Arbeit wurde mit Hilfe einer Real Time-PCR-Analyse die Transkription der Gene für die Proteasen MMP-1, -2, -9 und -10 auch in CD34<sup>+</sup> HSPCs aus Nabelschnurblut nachgewiesen, jedoch wurde die Expression dieser MMPs nicht auf Proteinebene überprüft (Essl, 2007). Hier konnte durch Western Blot-Analysen die Proteinexpression der beiden Gelatinasen MMP-2 und -9 in CD34<sup>+</sup> HSPCs verifiziert werden (Abbildung 3-4). Der Antikörper gegen MMP-2 erkannte zwar nicht die vom Hersteller angegebenen Banden 72/63–67 kDa, sondern ein Signal von ungefähr 53 kDa, seine Spezifität wurde jedoch durch die Detektion der rekombinanten Protease überprüft. Die vom anti-MMP-9-Antikörper detektierte Bande entsprach der Größe der zymogenen MMP-9-Form von 92 kDa. Ein Signal für MMP-10 wurde im HSPC-Lysat nicht detektiert, obwohl der Antikörper, wie durch Nachweis der rekombinanten Protease gezeigt wurde, spezifisch reagierte (48/52–58 kDa). Keine der drei Proteasen war in HSPC-Überständen nach 24 h Konditionierung nachweisbar (nicht gezeigt).



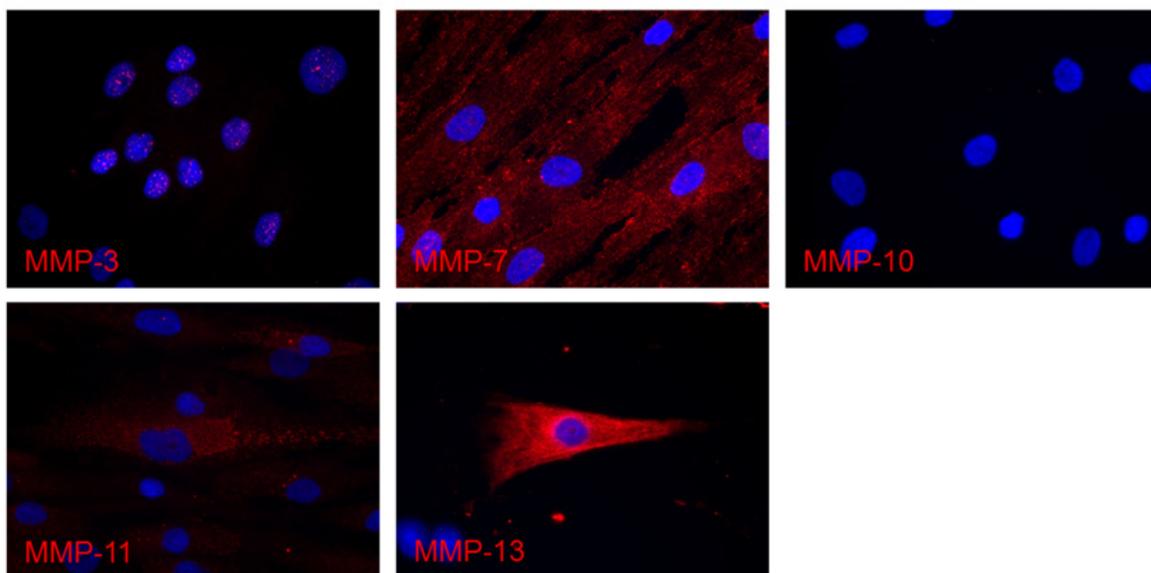
**Abbildung 3-4: MMP-Proteinexpression in humanen CD34<sup>+</sup> HSPCs.** Nach der Isolierung der HSPCs aus Nabelschnurblut wurden die Zellen lysiert und die Expression der Proteasen MMP-2, MMP-9 und MMP-10 wurde mit spezifischen Antikörpern, die jeweils die zymogene und aktivierte Form erkennen (72/63-67 kDa für MMP-2, 92/83-86 kDa für MMP-9 und 48/52-58 kDa für MMP-10), untersucht. Die Expression von MMP-2 und -9 konnte in HSPCs nachgewiesen werden. Mit dem anti-MMP-10-Antikörper wurde kein Signal im Lysat detektiert. Seine Spezifität wurde mit 50 ng des rekombinanten Proteins überprüft.

Eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung der MMPs in Osteoblasten und MSCs folgte nun zum Vergleich mit den Ergebnissen aus den Western Blot-Untersuchungen. Hierfür wurden die Zellen für mindestens 48 h auf Objektträgern, die mit einem 8-Kammer-System versehen sind und eine parallele Detektion mehrerer Antigene erlauben, inkubiert und anschließend mit Methanol fixiert. Nur ein Teil der Osteoblasten war positiv für MMP-3, wobei das Signal auf einen kleinen Bereich um den Kern beschränkt war und mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert sein könnte (Abbildung 3-5). MSCs zeigten dagegen mit punktförmigen Signalen innerhalb des Kerns ein stark abweichendes Färbemuster. Mit dem MMP-7-spezifischen Antikörper konnte eine deutliche Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma beider Zelltypen detektiert werden, was im Einklang mit den Western Blot-Ergebnissen stand.

### Osteoblasten



### MSCs



**Abbildung 3-5: Immunfluoreszenzanalysen zur Expression von MMPs in humanen Osteoblasten und MSCs.** Primäre Osteoblasten und MSCs aus dem Knochenmark wurden auf 8-Kammer-Objektträgern für mindestens 48 h kultiviert, fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen MMP-3, -7, -10, -11 oder -13 unterzogen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Deutliche Signale wurden für MMP-7 und -11 in beiden Zelltypen detektiert, MSCs zeigten zudem eine auffällige Fluoreszenz für MMP-13. Das Signal für MMP-3 war bei den Osteoblasten im Zytosol, bei den MSCs dagegen im Kern lokalisiert. Mit dem Antikörper gegen MMP-10 konnte in keinem der beiden Zelltypen Fluoreszenz nachgewiesen werden. Maßstabsbalken = 50  $\mu\text{m}$ .

Für MMP-10 konnte demgegenüber auch in der Fluoreszenzfärbung kein Signal beobachtet werden. Die Detektion mit dem MMP-11-Antikörper führte bei den Osteoblasten ebenfalls zu

einem einer ER-Färbung gleichenden Signal, welches typisch für ein sezerniertes Protein ist und die Western Blot-Ergebnisse widerspiegelte. In einigen MSCs wurde eine ähnliche MMP-11-Färbung beobachtet. Eine MMP-13-spezifische Fluoreszenz war in den Osteoblasten nicht nachweisbar, jedoch war ein Teil der MSCs stark positiv für diese Protease, was möglicherweise auf eine abweichende Expression durch unterschiedliche MSC-Subpopulationen hindeutet (Abbildung 3-5).

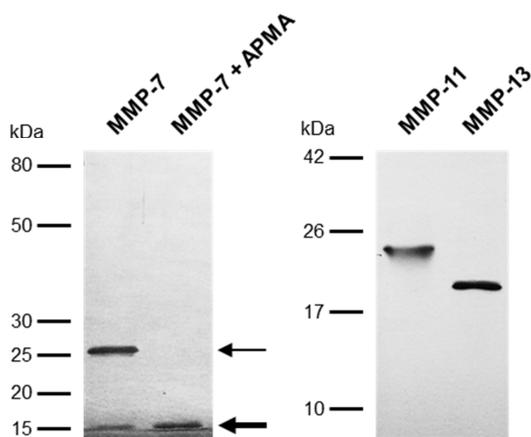
Tabelle 3-1 fasst die Ergebnisse der immunologischen Expressionsanalysen für die fünf Proteasen MMP-3, -7, -10, -11 und -13 in primären Osteoblasten und MSCs aus dem Knochenmark zusammen. Bis auf MMP-10 wurde jedes Enzym von mindestens einem der beiden Zelltypen exprimiert bzw. sezerniert. Die Immunfluoreszenzfärbungen spiegelten die Western Blot-Untersuchungen zum größten Teil wider. Da für MMP-10 kein Synthesenachweis durch die Nischenzellen erbracht wurde, erfolgten weitere biochemische Analysen mit den rekombinanten Formen von MMP-7, -11 und -13. Für MMP-3 stand kein rekombinantes Protein zur Verfügung.

**Tabelle 3-1. Zusammenfassung der immunologischen Untersuchungen zur MMP-Expression in humanen Nischenzellen.** Die Synonyme der MMPs sind in Klammern angegeben. Zeichenerklärung: (+) Signal, (-) kein Signal, (?) unspezifisches Signal. WB: Western Blot-Analyse; IF: Immunfluoreszenzfärbung.

	Osteoblasten			MSCs		
	WB		IF	WB		IF
	Lysat	Überstand		Lysat	Überstand	
<b>MMP-3</b> (Stromelysin 1)	?	+	+	?	+	?
<b>MMP-7</b> (Matrilysin 1)	+	-	+	+	-	+
<b>MMP-10</b> (Stromelysin 2)	-	-	-	-	-	-
<b>MMP-11</b> (Stromelysin 3)	-	+	+	-	-	+
<b>MMP-13</b> (Kollagenase 3)	+	-	-	+	-	+

### 3.1.2 Prozessierung des Chemokins SDF-1 $\alpha$ durch Matrixmetalloproteinasen

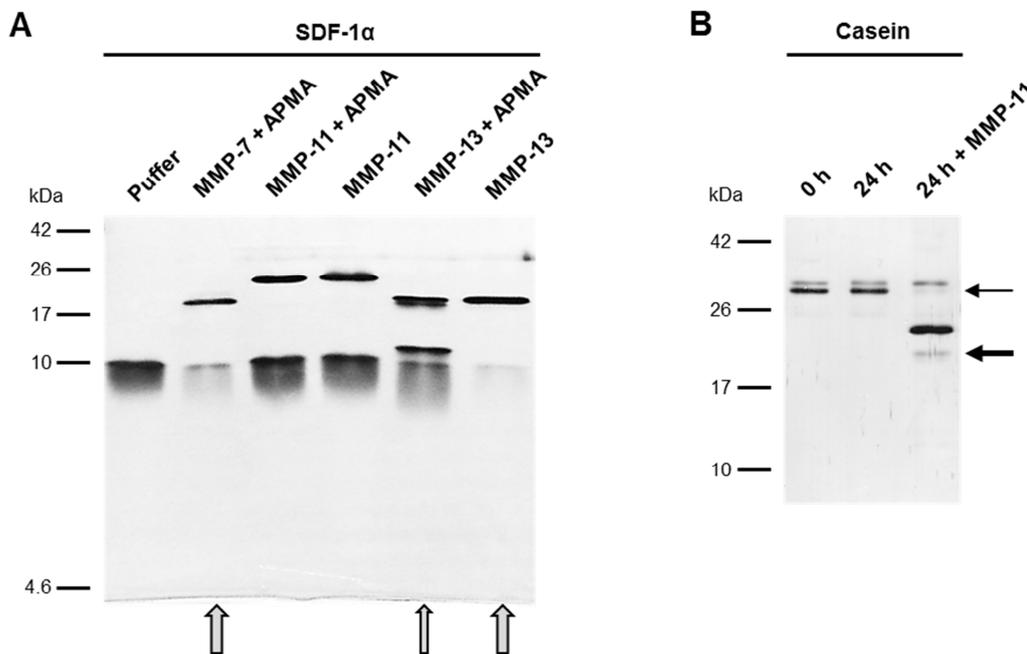
SDF-1 $\alpha$  wird in hohen Konzentrationen von verschiedenen Nischenzellen synthetisiert und ist einer der wichtigsten Faktoren, die den Verbleib der Stammzellen in der schützenden Umgebung der Nische gewährleisten. Während der Stammzellmobilisierung stellt die proteolytische Inaktivierung von SDF-1 $\alpha$  durch diverse Proteasen, darunter MMP-2, -8, -9 und -14, ein zentrales Ereignis dar (Klein et al., 2015). Im Folgenden sollte die Fähigkeit zur Prozessierung des Chemokins durch Proteasen, deren Expression in Osteoblasten und/oder MSCs zuvor immunologisch nachgewiesen wurde, in *in vitro*-Koinkubationsversuchen überprüft werden. Hierfür standen die rekombinanten humanen Proteasen MMP-7, -11 und -13 zur Verfügung, wobei rh MMP-7 hauptsächlich als Proform vorlag und durch kurze Inkubation mit 4-Aminophenylquecksilberacetat (APMA) vollständig in die aktivierte Form überführt werden konnte (Abbildung 3-6). MMP-11 und -13 bestanden bereits aus der proteolytisch aktiven katalytischen Domäne.



**Abbildung 3-6: Aktivierung rekombinanter MMPs mit APMA.** Die rekombinante humane Protease MMP-7 wurde durch Inkubation mit der Quecksilberverbindung APMA aus der zymogenen Form (28 kDa; dünner Pfeil) vollständig in die aktivierte Form (18 kDa; dicker Pfeil) überführt. MMP-11 und -13 bestanden jeweils aus der katalytischen Domäne, die als einzelne Banden von 19–23 kDa bzw. 14–20 kDa Größe sichtbar waren. Der Nachweis erfolgte durch Silberfärbung der SDS-PA-Gele nach erfolgter Elektrophorese.

Für den *in vitro*-Verdau wurde rh SDF-1 $\alpha$  mit der jeweiligen Protease in einem Massenverhältnis von 3:1 (Substrat:Enzym) unter Zugabe von APMA bei 37 °C für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze durch SDS-PA-Gelelektrophorese aufgetrennt und die rekombinanten Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 3-7). Intaktes rh SDF-1 $\alpha$  mit einem Molekulargewicht von 8.6 kDa war in der Negativkontrolle, die statt einer Protease

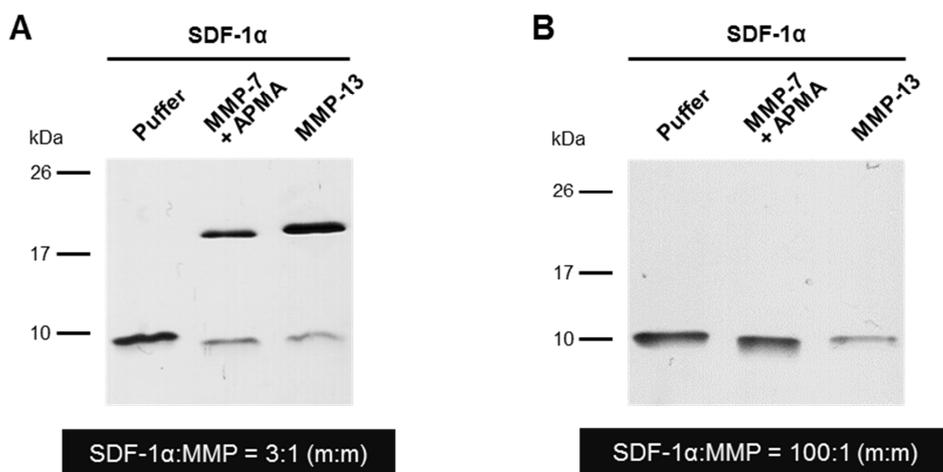
nur den Reaktionspuffer enthielt, als einzelne deutliche Bande zu erkennen. Nach der Inkubation mit rh MMP-7 und -13 nahm diese Bande deutlich an Intensität ab, was auf eine Prozessierung des Chemokins durch die beiden Enzyme hindeutete. Degradationsprodukte im niedermolekularen Bereich konnten im Silbergel allerdings nicht identifiziert werden. Eine MMP-13-Aktivierung durch APMA war nicht erforderlich und hatte sogar einen nachteiligen Effekt für die Funktion der Protease (Abbildung 3-7, A). Ein SDF-1 $\alpha$ -Verdau durch rh MMP-11 konnte dagegen nicht detektiert werden. Die Bande zeigte sowohl mit als auch ohne APMA keine Veränderung zur Pufferkontrolle. Die Funktionsfähigkeit von rh MMP-11 wurde durch spezifische Prozessierung des Milcheiweißmoleküls Casein überprüft und belegt (Abbildung 3-7, B).



**Abbildung 3-7: Proteolytische Prozessierung des Chemokins SDF-1 $\alpha$  durch MMPs.** Rh SDF-1 $\alpha$  wurde mit den Proteasen MMP-7, -11 und -13 mit und ohne Zugabe von APMA inkubiert und die Degradation des Chemokins durch SDS-PAGE und Silberfärbung überprüft (A). Die Bande von etwa 9 kDa in der Pufferkontrolle entsprach dem intakten SDF-1 $\alpha$ . Ihre Intensität nahm nach der Inkubation mit MMP-7 und -13 deutlich ab (dicke Pfeile). Eine APMA-Behandlung hatte keinen verstärkenden Effekt auf die MMP-13-Aktivität (dünner Pfeil). Nach der Inkubation mit MMP-11 war die SDF-1 $\alpha$ -Bande identisch mit der Kontrolle. (B) Die Aktivität von MMP-11 wurde durch Casein-Prozessierung, die sich durch Verschwinden einer Bande (dünner Pfeil) und Auftauchen einer Bande mit kleinerem Molekulargewicht (dicker Pfeil) nach 24 h äußerte, belegt.

Im Folgenden wurde die Proteolyse von rh SDF-1 $\alpha$  durch rh MMP-7 und -13 bei zwei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen verglichen (Abbildung 3-8). Erfolgte die Inkubation im Massenverhältnis von 3:1 (Substrat:Enzym), so zeigte die Chemokinbande nach 24 h eine

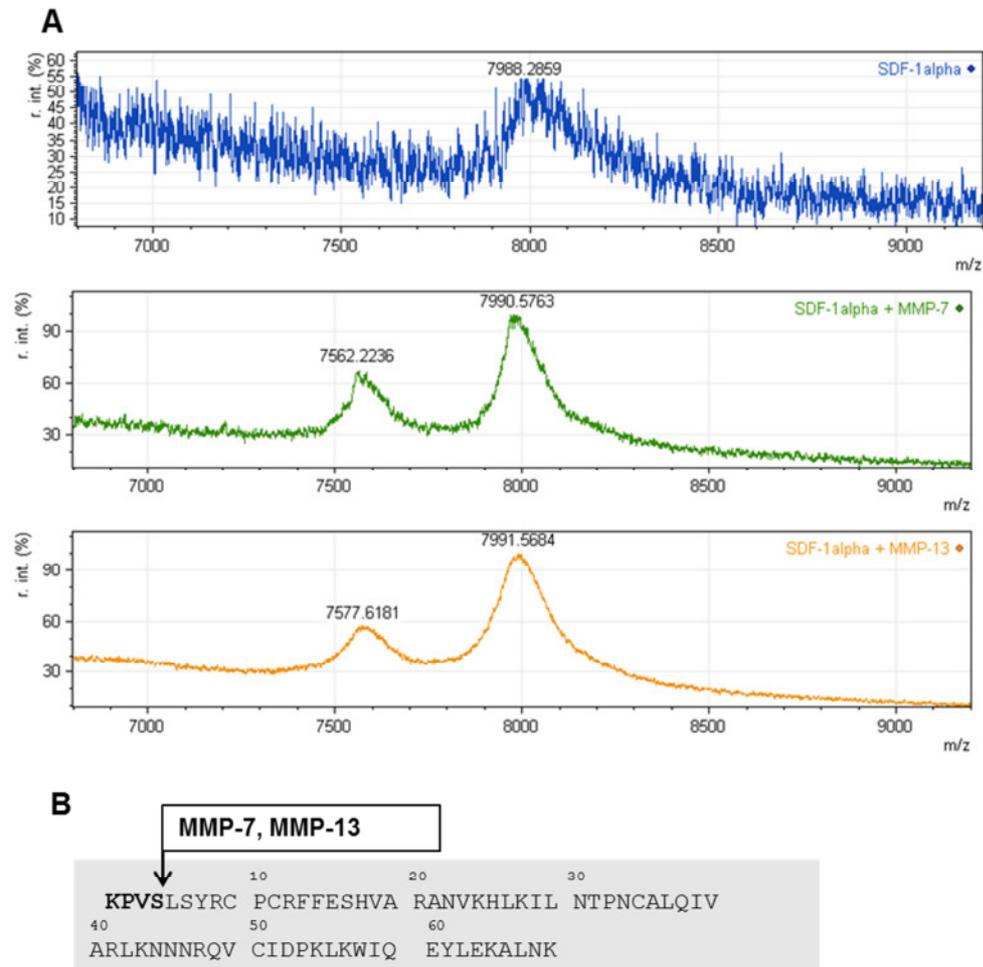
deutlich geringere Intensität und zusätzlich eine Verschiebung in Richtung der Anode, was ein Hinweis auf eine Abnahme des Molekulargewichts war (Abbildung 3-8, A). Wurden die Proteasen dagegen mit der hundertfachen Masse an rh SDF-1 $\alpha$  inkubiert, so war die Bandenintensität im Fall von rh MMP-7 zwar noch von einer ähnlichen Intensität wie die Kontrolle, aber ebenso wie beim Verdau durch rh MMP-13 auch in den niedermolekularen Bereich verschoben (Abbildung 3-8, B). Selbst bei einem deutlichen Mengenunterschied wurde das Chemokin immer noch spezifisch durch MMP-7 und -13 degradiert. Der Reaktionsansatz in B entsprach mehr den physiologischen Bedingungen, denn *in vivo* liegt das Substrat in der Regel in einem enormen Überschuss gegenüber dem Enzym vor.



**Abbildung 3-8: Prozessierung von SDF-1 $\alpha$  durch MMP-7 und -13 bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.** Rh SDF-1 $\alpha$  wurde mit MMP-7 und -13 im Massenverhältnis Substrat:Enzym 3:1 (A) oder 100:1 (B) inkubiert. Für B wurde ein Reaktionspuffer mit geringfügig abweichender Zusammensetzung als für A verwendet. In beiden Fällen war eine leichte Verschiebung der SDF-1 $\alpha$ -Bande in den niedermolekularen Bereich nach MMP-Behandlung im Vergleich zur Pufferkontrolle zu beobachten.

Genauere Aussagen über die proteolytische Aktivität der beiden Proteasen gegenüber SDF-1 $\alpha$  sollten durch massenspektrometrische Untersuchungen der Verdauansätze getroffen werden. Dabei stellt die MALDI-TOF-Analyse ein hochempfindliches und spezifisches Verfahren zum Nachweis von Peptiden und Bestimmung ihrer Aminosäurezusammensetzung anhand der Größe der dabei erzeugten Ionen dar. Im Massenspektrum der unbehandelten Kontrolle wurde ein einzelner Peak mit einem Masse/Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) von ungefähr 7990 detektiert (Abbildung 3-9, A). Dieses Signal entsprach dem aus 68 Aminosäuren bestehenden intakten Chemokin mit einem berechneten Molekulargewicht von 7963.4 Da. Wurde SDF-1 $\alpha$  mit MMP-7 oder -13 inkubiert, so tauchte in beiden Spektren ein weiterer Peak bei einem

m/z-Verhältnis von ungefähr 7577 auf. Die Differenz zwischen den Peaks entsprach in etwa dem berechneten Gewicht des Tetrapeptids KPVS von 411 Da. Demzufolge haben die beiden Proteasen MMP-7 und -13 die vier aminoterminalen Aminosäuren des Chemokins proteolytisch entfernt (Abbildung 3-9, B), was sich in der leichten, aber dennoch merklichen Verschiebung der Bande im Silbergel äußerte. Weitere Degradationsprodukte konnten im niedermolekularen Bereich des Massenspektrums nicht detektiert werden.



**Abbildung 3-9: MMP-7 und -13 spalten SDF-1 $\alpha$  am Aminoende.** Rh SDF-1 $\alpha$  wurde mit MMP-7 und -13 inkubiert und einer MALDI-TOF-Analyse unterzogen. Im Massenspektrum der unbehandelten Kontrolle wurde ein einzelner Peak, welcher dem intakten Chemokin entsprach, detektiert (A). Nach Zugabe der Proteasen trat ein zweiter Massenpeak mit einer Differenz von ungefähr –411 Da auf. Das war die berechnete Masse der ersten vier Aminosäuren am N-Terminus des aus 68 Aminosäuren bestehenden SDF-1 $\alpha$ , die durch MMP-7 und -13 proteolytisch entfernt wurden (B).

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Matrixmetalloproteinasen MMP-3, -7, -11 und -13 von Zellen der Knochenmarknische exprimiert und zum Teil konstitutiv sezerniert werden. *In vitro*-Versuche haben belegt, dass der Stammzellretentionsfaktor

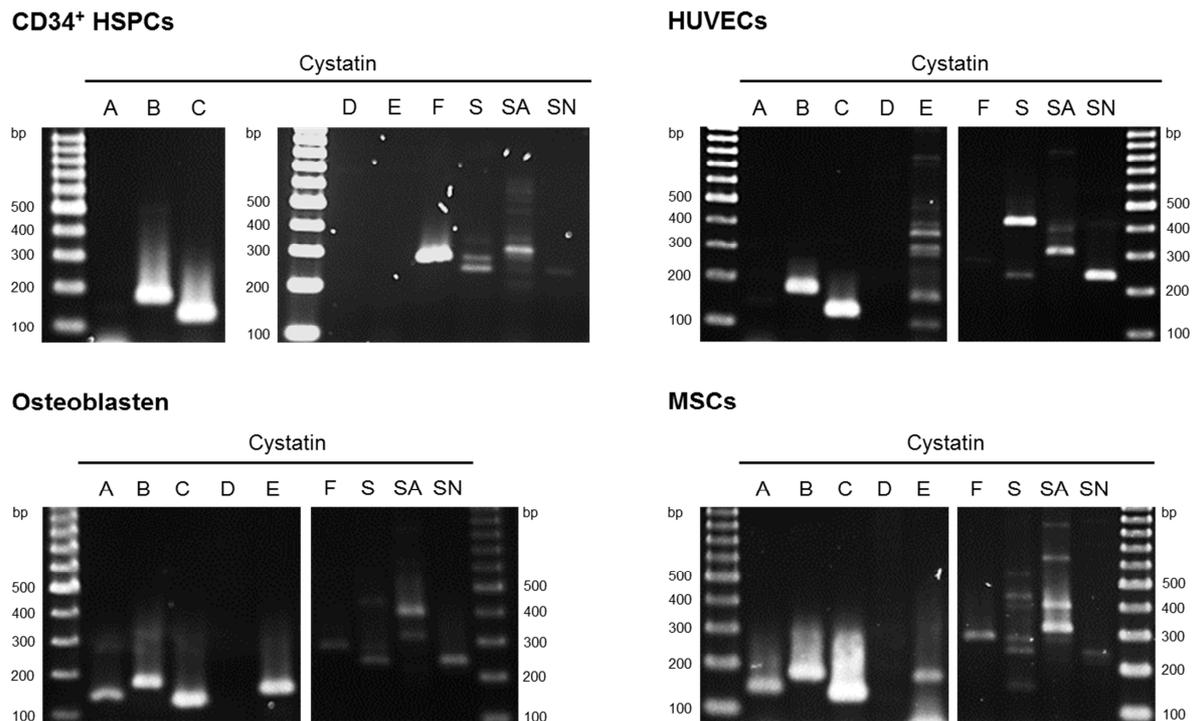
SDF-1 $\alpha$  durch MMP-7 und -13 am Aminoende, das die Interaktion mit dem Rezeptor CXCR4 auf der HSPC-Oberfläche vermittelt, proteolytisch gespalten wird.

### **3.2 Analysen zur Expression und Funktion von Cystatinen in Knochenmarkzellen**

Neben den Matrixmetalloproteinasen stellen die Cathepsine eine weitere wichtige Enzymgruppe dar, wobei einige ihrer Vertreter auch Funktionen in der Stammzellnische übernehmen. Die Cystein-Cathepsine B, K, L und X regulieren durch ihre proteolytischen Fähigkeiten die Adhäsion und Retention der HSPCs in der Nische (Aisa et al., 1996; 2003; Staudt et al., 2012). Als essentielle Gegenspieler können endogene Inhibitoren dieser Proteasen, die Cystatine, eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Cathepsin-Aktivität spielen. Ihre möglichen Funktionen in der Knochenmarknische sollten in dieser Arbeit untersucht werden.

#### **3.2.1 Expression von Cystatinen durch Nischenzellen**

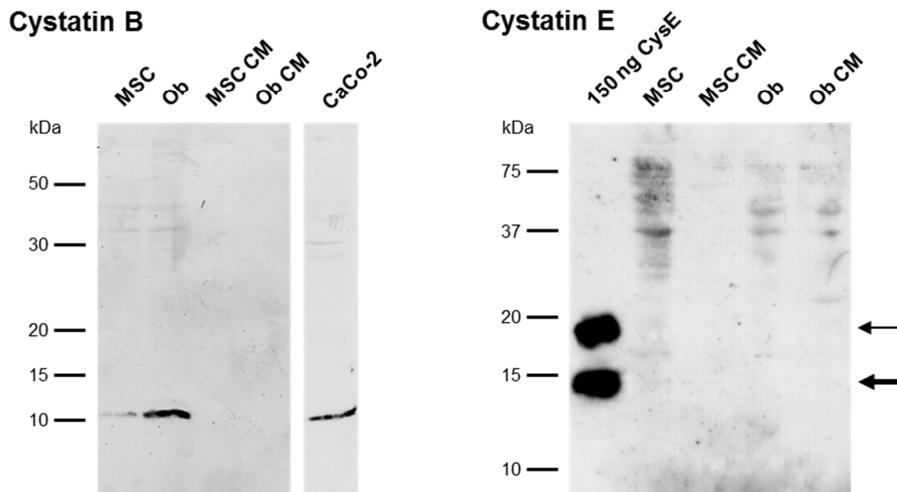
Unter Zuhilfenahme selbst entworfener Primerpaare wurde eine RT-PCR-Analyse mit primären Osteoblasten und MSCs aus dem Knochenmark durchgeführt, um die Genexpression der humanen Cystatine A, B, C, D, E, F, S, SA und SN in diesen Nischenzellen zu untersuchen (Abbildung 3-10). Da sinusoidale Endothelzellen, die eine wichtige zelluläre Komponente der vaskulären Stammzellnische darstellen, nur schwer isoliert werden können, wurden Endothelzellen der Nabelschnurvene zum Vergleich herangezogen (HUVECs, human umbilical vein endothelial cells). Zusätzlich wurden aus dem Nabelschnurblut isolierte CD34<sup>+</sup> HSPCs analysiert. Cystatin B und C wurden in allen vier Zelltypen am stärksten exprimiert. Zusätzlich zeigten Osteoblasten und MSCs ein spezifisches Signal mit den Cystatin A- und Cystatin E-Primerpaaren, während für Cystatin D ein PCR-Produkt mit der berechneten Größe in keinem der untersuchten Zelltypen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-10). Eine starke Transkription von Cystatin F war in CD34<sup>+</sup> HSPCs zu verzeichnen, Osteoblasten und MSCs hatten hier nur ein sehr schwaches Signal. Die Primerpaare für die Cystatine S, SA und SN lieferten entweder nur wenig intensive oder unspezifische Banden.



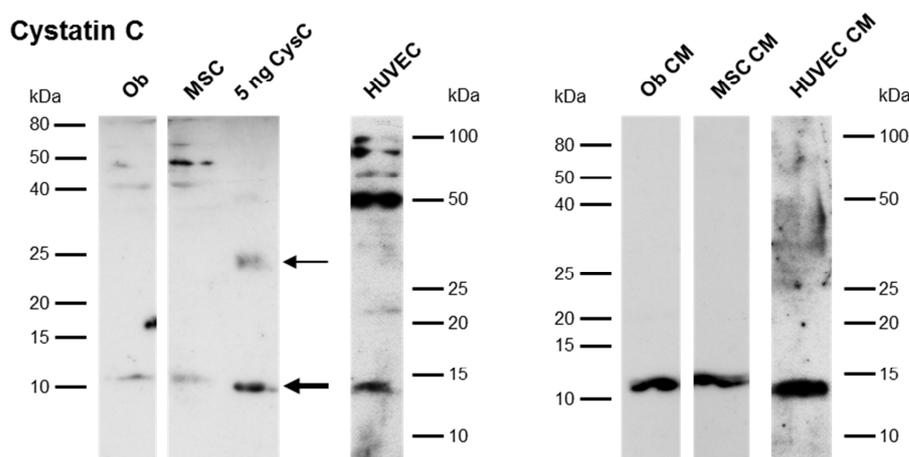
**Abbildung 3-10: Cystatin-Genexpression in humanen Nischenzellen.** Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Transkription der Gene für Cystatin A, B, C, D, E, F, S, SA und SN in CD34<sup>+</sup> HSPCs, Endothelzellen (HUVECs), primären Osteoblasten und ihren Vorläufern, den MSCs, untersucht. Eine 100 bp-DNA-Leiter diente der Größenbestimmung der jeweiligen PCR-Produkte. Cystatin B und C zeigten eine ubiquitäre Expression, während ein Cystatin D-spezifisches Amplifikat in keinem der analysierten Zelltypen nachweisbar war. Die Transkription von Cystatin E konnte in Osteoblasten und MSCs detektiert werden, Cystatin F wurde stark in HSPCs transkribiert.

Die Expressionsanalyse auf Proteinebene mit Hilfe von Western Blot-Untersuchungen erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Cystatin B, C und E. Für Cystatin A stand kein Antikörper zur Verfügung. Die Cystatine S, SA und SN wurden nicht näher untersucht, da sie ein sehr spezifisches Expressionsmuster im humanen Organismus haben und vorwiegend in Drüsensekreten vorkommen (Abrahamson et al., 1986). Es wurden jeweils Zelllysate von primären Osteoblasten und MSCs sowie durch die Zellen konditionierte Überstände analysiert, um eine Sekretion der Inhibitoren nachzuweisen. Cystatin B mit einem Molekulargewicht von ungefähr 11 kDa wurde in den Lysaten beider Zelltypen, jedoch nicht in deren Überständen detektiert (Abbildung 3-11). Als Positivkontrolle diente die Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2, denn Cystatin B ist bei diesem Krebstyp stark überexprimiert (Kos et al., 2000). Dagegen konnte für eine Cystatin E-Expression weder in Osteoblasten noch in MSCs ein Nachweis erbracht werden, obwohl der Antikörper sowohl die nicht glykosylierte als auch die glykosylierte Form des rekombinanten Proteins erkannte (Abbildung 3-11). Aufgrund des sehr

schwachen RT-PCR-Signals für Cystatin F in diesen beiden Nischenzelltypen wurde die Proteinexpression von Cystatin F nicht untersucht.



**Abbildung 3-11: Proteinexpression der Cystatine B und E in humanen Osteoblasten (Ob) und MSCs.** Mit spezifischen Antikörpern wurden Western Blot-Analysen mit Zelllysaten und konditionierten Überständen (CM) von Osteoblasten und MSCs durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten die Cystatin B-exprimierende Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 bzw. rekombinantes Cystatin E, das in einer glykosylierten und nicht glykosylierten Form vorlag (dünner bzw. dicker Pfeil). In Osteoblasten und MSCs, jedoch nicht in deren Überständen wurde die 11 kDa-Bande von Cystatin B nachgewiesen. Cystatin E konnte in keinem der beiden Zelltypen detektiert werden.

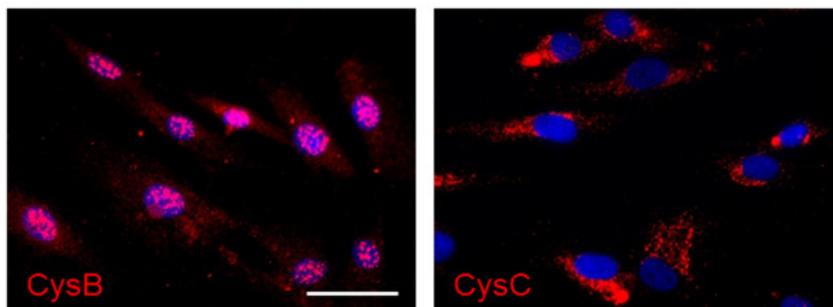


**Abbildung 3-12: Proteinexpression des Inhibitors Cystatin C in humanen Nischenzellen.** In Western Blot-Analysen mit Zelllysaten von Osteoblasten, MSCs und Endothelzellen (HUVECs) konnte Cystatin C in allen drei Zelltypen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein sehr intensives Signal in den dazugehörigen Überständen (CM) detektiert. Als Positivkontrolle für den Antikörper wurde rekombinantes Cystatin C mit einem Molekulargewicht von ungefähr 14 kDa (dicker Pfeil) verwendet. Durch Dimerisierung führte es zur Detektion einer zweiten Bande (dünner Pfeil).

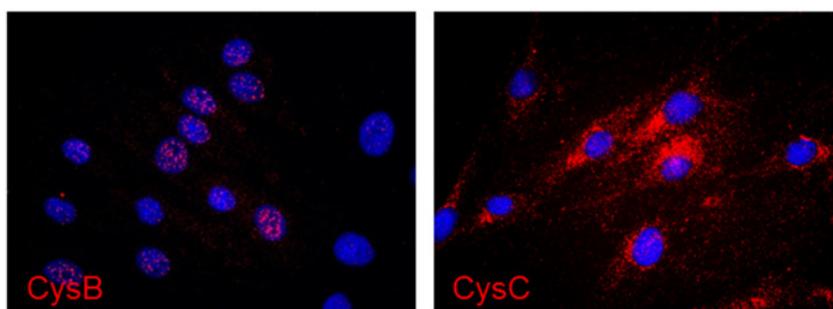
Eines der wichtigsten Mitglieder der Inhibitorgruppe, Cystatin C, wurde in Osteoblasten und MSCs ebenso wie in Endothelzellen (HUVECs) nachgewiesen (Abbildung 3-12). Eine intensive 14 kDa-Bande wurde auch in den Überständen aller Zellen detektiert, was auf eine Sekretion von Cystatin C in großen Mengen hindeutete.

In einer anschließenden Immunfluoreszenzfärbung von Osteoblasten und MSCs mit Antikörpern gegen Cystatin B und C sollte die Verteilung der Inhibitoren innerhalb der Zellen sichtbar gemacht werden (Abbildung 3-13). Besonders auffällig neben der Zytoplasmafärbung waren die intensiven punktförmigen Signale für Cystatin B in den Zellkernen. Diese Fluoreszenz rührte höchstwahrscheinlich von der Interaktion des Inhibitors mit H2- und H3-Histonproteinen (Ceru et al., 2010). Die Cystatin C-Färbung resultierte in einem intensiven Signal im Zellplasma. Charakteristisch für sezernierte Proteine, erinnerte das Fluoreszenzmuster mit besonders hoher Intensität in der Kernperipherie an eine ER-Färbung (Abbildung 3-13).

### Osteoblasten



### MSCs

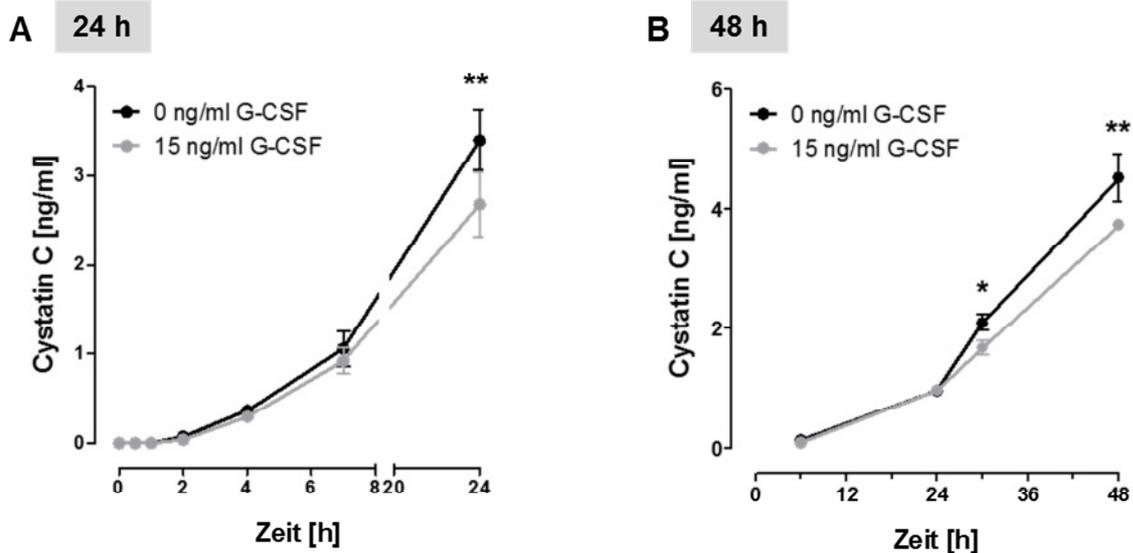


**Abbildung 3-13: Immunfluoreszenzanalysen zur Lokalisation von Cystatin B und C in humanen Osteoblasten und MSCs.** Die Knochenmarkszellen wurden in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Cystatin B und C auf die zelluläre Verteilung der Proteine hin untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Cystatin B lieferte auffällige Signale innerhalb der Zellkerne. Das Cystatin C-Signal lokalisierte im Zytoplasma und war besonders intensiv im perinukleären Bereich. Maßstabsbalken = 50  $\mu$ m.

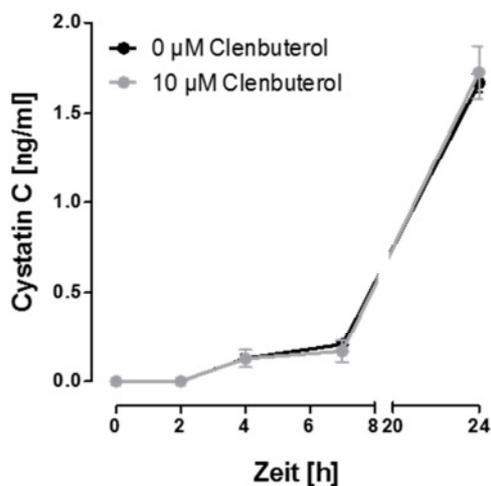
Die Ergebnisse der immunologischen Studien dokumentieren, dass die Cathepsin-Inhibitoren Cystatin B und C von Zellen der Knochenmarknische exprimiert werden. Cystatin C wird in hohem Maße in den Extrazellulärraum sezerniert und könnte auf diese Weise in die regulatorischen Vorgänge innerhalb der Nische involviert sein. Bei den nachfolgenden biochemischen und funktionellen Analysen lag der Fokus daher auf Cystatin C, da Cystatin B vorwiegend intrazellulär aktiv ist (Vray et al., 2002).

### **3.2.2 Einfluss mobilisierender Faktoren auf die Sekretion von Cystatin C**

Der Cathepsin-Inhibitor Cystatin C scheint von den Nischenzellen konstitutiv exprimiert und sezerniert zu werden. Für den MMP-Inhibitor TIMP-3 und die Serinproteasen-Inhibitoren Serpina1 und -3 wurde eine Herunterregulierung der Expression im Knochenmark nach einer G-CSF-induzierten Stammzellmobilisierung beobachtet (Shen et al., 2010; Winkler et al., 2005). In Anlehnung daran sollte die Änderung der Cystatin C-Sekretion durch eine direkte G-CSF-Behandlung von MSCs, die den G-CSF-Rezeptor (Synonym: CD114) exprimieren und somit durch das Zytokin unmittelbar stimuliert werden können, untersucht werden (Ponte et al., 2012). Hierfür wurden zwischen  $3 \times 10^4$  und  $5 \times 10^4$  Knochenmark-MSCs pro Vertiefung einer 12-Well-Kulturplatte ausgesät und kurz vor Erreichen der Konfluenz mit 15 ng/ml rh G-CSF für 24 h behandelt. Die Cystatin C-Menge im Überstand wurde nach 0,5, 1, 4, 7 und 24 h Behandlung mit Hilfe eines spezifischen Sandwich-ELISA bestimmt (Abbildung 3-14, A). Die Konzentrationszunahme zeigte einen exponentiellen Anstieg sowohl bei der Kontrolle als auch bei stimulierten MSCs, lediglich nach 24 h konnte ein Unterschied beobachtet werden. Die G-CSF-Zugabe führte zu einer signifikanten Abnahme des Cystatin C-Gehalts im Überstand im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Wurde die Analyse der Sekretionskinetik auf 2 Tage ausgedehnt, so konnte auch hier nach 30 h und 48 h eine signifikant reduzierte Konzentration des Inhibitors nach der G-CSF-Stimulation beobachtet werden (Abbildung 3-14, B). Die Diskrepanz zwischen den 24 h-Werten von A und B ist vermutlich auf die spenderabhängigen Unterschiede zwischen den MSCs, die eine sehr heterogene Zellpopulation bilden, und die daraus resultierende Abweichung der Proliferations- und Syntheserate zurückzuführen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der mobilisierende Faktor G-CSF nach direkter Stimulation der MSCs die von den Zellen ausgeschiedene Cystatin C-Menge signifikant reduzierte.



**Abbildung 3-14: Cystatin C-Sekretion durch MSCs nach der Stimulation mit dem Mobilisierungsfaktor G-CSF.** Knochenmark-MSCs wurden in 12-Well-Platten mit 15 ng/ml G-CSF für 24 h (A) bzw. 48 h (B) behandelt und die Cystatin C-Konzentration in den Überständen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit einem spezifischen ELISA gemessen. Die G-CSF-Behandlung führte zu einer signifikanten Abnahme des Cystatin C-Gehalts. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD) von  $N = 3$ . Zur statistischen Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA mit  $p < 0.05$  (\*) und  $p < 0.01$  (\*\*) durchgeführt.



**Abbildung 3-15: Cystatin C-Sekretion durch Osteoblasten nach der Stimulation mit dem Adrenorezeptoragonisten Clenbuterol.** Osteoblasten wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz einmalig mit 10  $\mu$ M Clenbuterol behandelt. Die Cystatin C-Menge in den Überständen wurde in regelmäßigen Abständen innerhalb von 24 h mit einem ELISA gemessen. An keinem der getesteten Zeitpunkte konnte ein Unterschied in der Inhibitor-Konzentration detektiert werden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $N = 3$ .

Da primäre Osteoblasten den G-CSF-Rezeptor nicht exprimieren, wurde durch adrenerge Stimulation die indirekte systemische Wirkung von G-CSF über das sympathische Nervensystem (SNS) simuliert. Der Effekt der SNS-Neurotransmitter kann *in vitro* durch eine Behandlung mit Clenbuterol, einem sympathomimetischen Amin, das an die  $\beta$ -Adrenorezeptoren auf der Osteoblastenoberfläche bindet, nachgeahmt werden (Lee-Thedieck et al., 2012). Osteoblasten wurden nach dem gleichen Protokoll wie MSCs in 12-Well-Platten kultiviert und anschließend mit 10  $\mu$ M Clenbuterol behandelt. Die mit Hilfe des ELISA gemessenen Inhibitor-konzentrationen in den Überständen waren zu allen getesteten Zeitpunkten identisch mit denjenigen der unbehandelten Kontrollen, sodass ein direkter Einfluss des Adrenorezeptoragonisten auf die Cystatin C-Sekretion durch Osteoblasten nicht anzunehmen war (Abbildung 3-15).

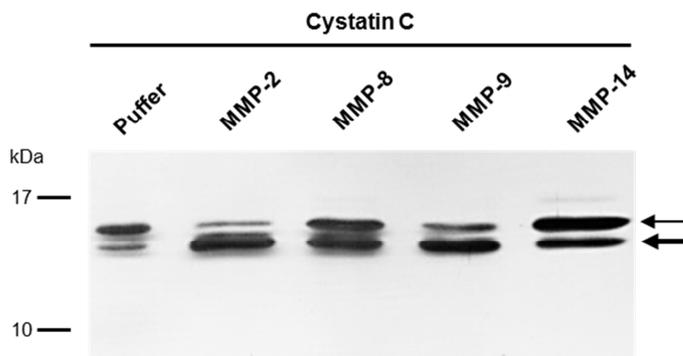
### 3.2.3 Prozessierung von Cystatin C durch Matrixmetalloproteinasen

Die hier beobachtete Abnahme der Cystatin C-Konzentration nach der G-CSF-Behandlung der MSCs war zwar statistisch signifikant, schien aber für ein direktes Resultat einer herunterregulierten Expression eine zu geringe Differenz zu haben. Kürzlich wurde über eine erhöhte MMP-2-Aktivität durch MSCs nach einer direkten *in vitro*-Stimulation mit G-CSF berichtet (Ponte et al., 2012). Deshalb stellte sich die Frage, ob die reduzierten Cystatin C-Mengen eher auf eine verstärkte proteolytische Prozessierung durch Proteasen im extrazellulären Bereich zurückzuführen sind.

#### 3.2.3.1 Silbergele und MALDI-TOF

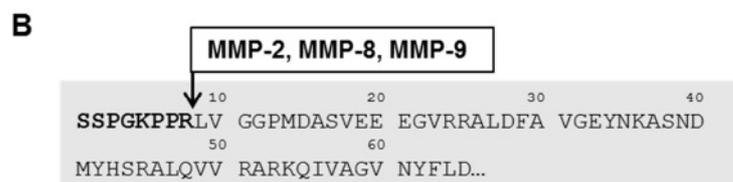
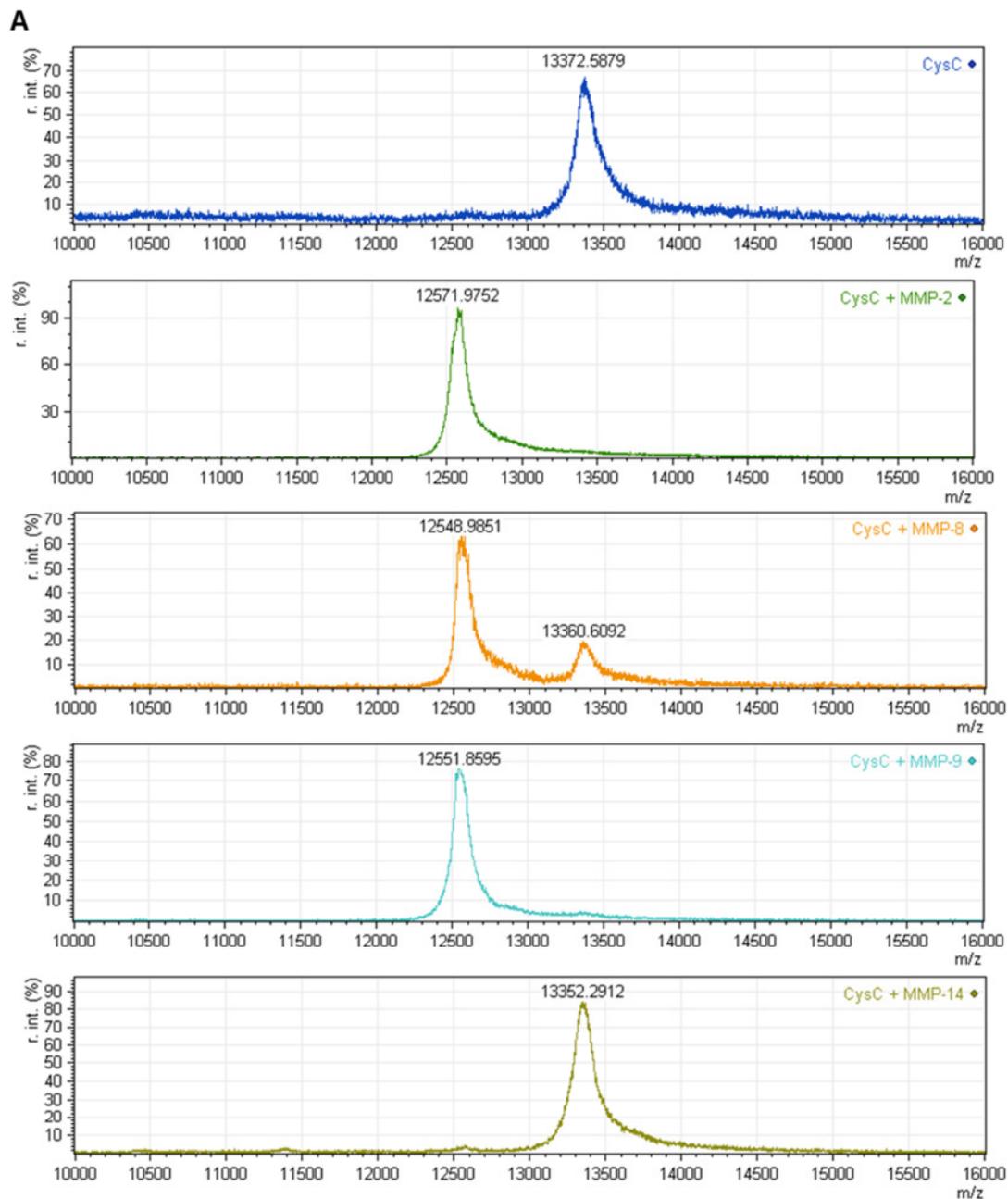
In biochemischen Versuchen wurde die Fähigkeit der in der Nische wichtigen Proteasen MMP-2, -8, -9 und -14 zur Proteolyse von Cystatin C bestimmt. Dazu wurde rekombinantes Cystatin C mit den rekombinanten Enzymen in einem Massenverhältnis von 3:1 gemischt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse des *in vitro*-Verdauansatzes wurden durch SDS-PAGE und Silberfärbung sichtbar gemacht. Wie aus Abbildung 3-16 hervorgeht lag das durch eine humane Zelllinie hergestellte rekombinante Cystatin C als Doppelbande bei ungefähr 14 kDa vor. Die obere Bande entsprach dem intakten Inhibitor, der ein Molekulargewicht von 13.4 kDa aufweist, die untere dagegen stammte von einer natürlich vorkommenden verkürzten Form, die bei der Prozessierung durch endogene Proteasen entstehen kann. Nach der Inkubation mit MMP-2 oder -9 war eine starke Verschiebung der Intensität von der oberen zur unteren Bande zu beobachten, was auf eine Degradation von Cystatin C durch diese Proteasen

schließen ließ (Abbildung 3-16). Degradationsprodukte im niedermolekularen Bereich wurden im Silbergel nicht nachgewiesen. Im Fall von MMP-8 war nur eine leichte Veränderung der Bandenintensität zu sehen, bei MMP-14 konnte kein Unterschied zur Pufferkontrolle festgestellt werden.



**Abbildung 3-16: Proteolytische Prozessierung von Cystatin C durch MMPs der Stammzellnische.** Das rekombinante humane Protein Cystatin C wurde mit den Proteasen MMP-2, -8, -9 und -14 im Massenverhältnis 3:1 inkubiert und die Degradation des Inhibitors durch SDS-PAGE und Silberfärbung überprüft. Rh Cystatin C in der Pufferkontrolle bestand aus dem intakten Molekül und einer verkürzten Form (dünner bzw. dicker Pfeil) bei ungefähr 14 kDa. Nach der Inkubation mit MMP-2 oder -9 nahm die Intensität der oberen Bande beträchtlich ab, die der unteren hingegen zu. Mit MMP-8 war nur ein leichte, mit MMP-14 keine Verschiebung der Bandenintensität zu beobachten.

Mit Hilfe einer anschließenden MALDI-TOF-Analyse sollten die genauen Schnittstellen der MMPs im Cystatin C-Molekül bestimmt werden. Für diese Untersuchungen wurde ein alternatives rekombinantes Protein, das durch Hefezellen synthetisiert wurde und nur die intakte Form des Inhibitors enthielt, eingesetzt. Dieses Protein wurde im Massenspektrum als ein einzelner Peak mit einem  $m/z$ -Verhältnis von ungefähr 13373 identifiziert (Abbildung 3-17, A). Wurde rh Cystatin C mit MMP-2, -8 oder -9 inkubiert, so tauchte ein zweiter großer Peak bei durchschnittlich 12550  $m/z$  auf, der nach einer Inkubation mit MMP-14 nicht detektiert werden konnte. Aus der Massendifferenz der beiden Peaks kann abgeleitet werden, dass der prozessierten Cystatin C-Form am Aminoende 8 Aminosäuren, deren berechnetes Molekulargewicht 824.9 Da beträgt, fehlen (Abbildung 3-17, B). MMP-8 ist bei der Degradation des Inhibitors offensichtlich weniger effektiv als MMP-2 oder -9, denn hier war noch ein der intakten Form entsprechender Massenpeak im Spektrum sichtbar (Abbildung 3-17, A). Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob die durch die Matrixmetalloproteinasen verkürzte Cystatin C-Form immer noch die volle inhibitorische Fähigkeit gegenüber den Cystein-Cathepsinen aufbringt.

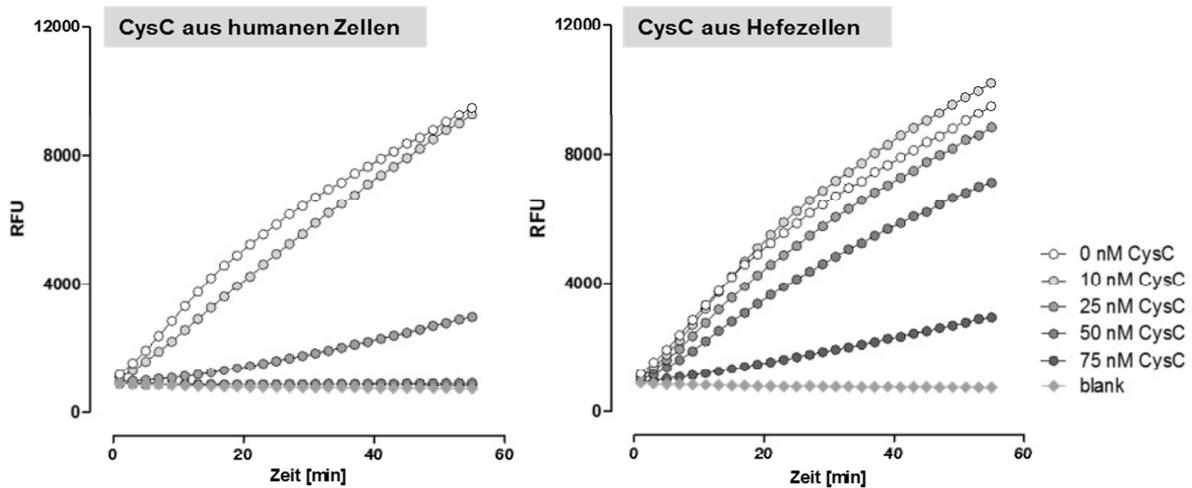


**Abbildung 3-17: MMP-2, -8 und -9 spalten Cystatin C am Aminoende.** Rh Cystatin C wurde mit MMP-2, -8, -9 oder -14 inkubiert und einer MALDI-TOF-Analyse unterzogen. Im Massenspektrum der unbehandelten Kontrolle wurde ein einzelner Peak, welcher dem intakten Cystatin C entsprach, detektiert (A). Nach Zugabe der Proteasen MMP-2, -8 oder -9 trat ein zweiter Massenpeak mit einer Differenz von ungefähr  $-825$  Da auf. Diese Masse entspricht den ersten 8 Aminosäuren am N-Terminus von Cystatin C, die durch MMP-2, -8 und -9 proteolytisch entfernt werden können (B).

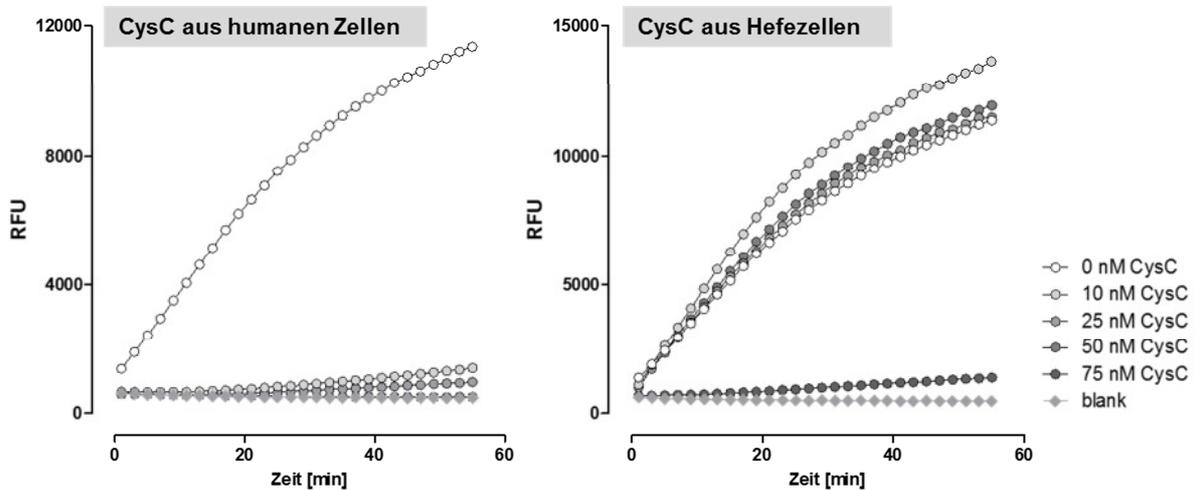
### 3.2.3.2 Inhibitorische Aktivität der degradierten Form von Cystatin C

Mit Hilfe der Fluoreszenz-gequenchten Peptidsubstrate Z-GPR-AMC und Z-RR-AMC kann *in vitro* die Aktivität von Cathepsin B bzw. L bestimmt werden, da diese Aminosäuresequenzen von den Enzymen spezifisch gespalten werden. Die Freisetzung des gequenchten Fluorophors wird mit einem Spektrometer quantitativ erfasst.

#### A Cathepsin B



#### B Cathepsin L

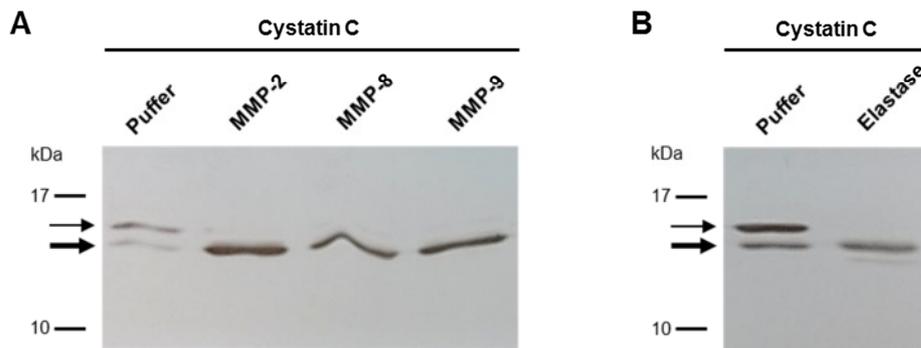


**Abbildung 3-18: Titrationsversuche zur Hemmung von Cathepsin B und L durch Cystatin C.** Rh Cathepsin B (A) und L (B) wurden jeweils mit einem Fluoreszenz-gequenchten Substrat unter Zugabe verschiedener Konzentrationen des rh Cystatin C inkubiert. Die Fluoreszenzentwicklung (RFU) wurde über die Zeit gemessen. Das kommerziell erworbene rh Cystatin C stammte entweder aus einem humanen (links) oder einem Hefezellsystem (rechts) und zeigte deutliche Unterschiede bei der Inhibition.

Zunächst wurden die zwei unterschiedlichen rekombinanten Cystatin C-Produkte in ihrer inhibitorischen Fähigkeit verglichen. Hierfür wurde die Umsetzung von 10  $\mu\text{M}$  Z-GPR-AMC

oder 5  $\mu\text{M}$  Z-RR-AMC durch 10 ng Cathepsin B bzw. L bei Anwesenheit der beiden Cystatin C-Formen in verschiedenen Konzentrationen gemessen (Abbildung 3-18). Wurde das jeweilige Peptid von Cathepsin B bzw. L prozessiert, so stieg die Fluoreszenzintensität exponentiell an (0 nM CysC). Gegenüber Cathepsin B zeigte das mit Hilfe einer humanen Zelllinie hergestellte Cystatin C bereits bei einer Konzentration von 50 nM eine vollständige Hemmung, denn die dazugehörige Fluoreszenzkurve war deckungsgleich mit der Negativkontrolle, die kein Enzym enthielt (blank). Das aus Hefezellen stammende Produkt konnte Cathepsin B selbst bei 75 nM nicht zu 100 % inhibieren (Abbildung 3-18, A). Die Cathepsin L-Aktivität wurde mit 50 nM Cystatin C aus humanen Zellen ebenfalls vollständig gehemmt, während bei der gleichen Konzentration des in Hefezellen synthetisierten Inhibitors noch eine deutliche Proteasenaktivität zu verzeichnen war (Abbildung 3-18, B). Bei diesen Titrationsversuchen stellte sich das durch humane Zellen hergestellte und aus einer intakten und verkürzten Form bestehende Cystatin C (Abbildung 3-16) als deutlich effektiver hinsichtlich seiner Cathepsin hemmenden Eigenschaften heraus und wurde daher für die nachfolgenden biochemischen und funktionellen Analysen eingesetzt.

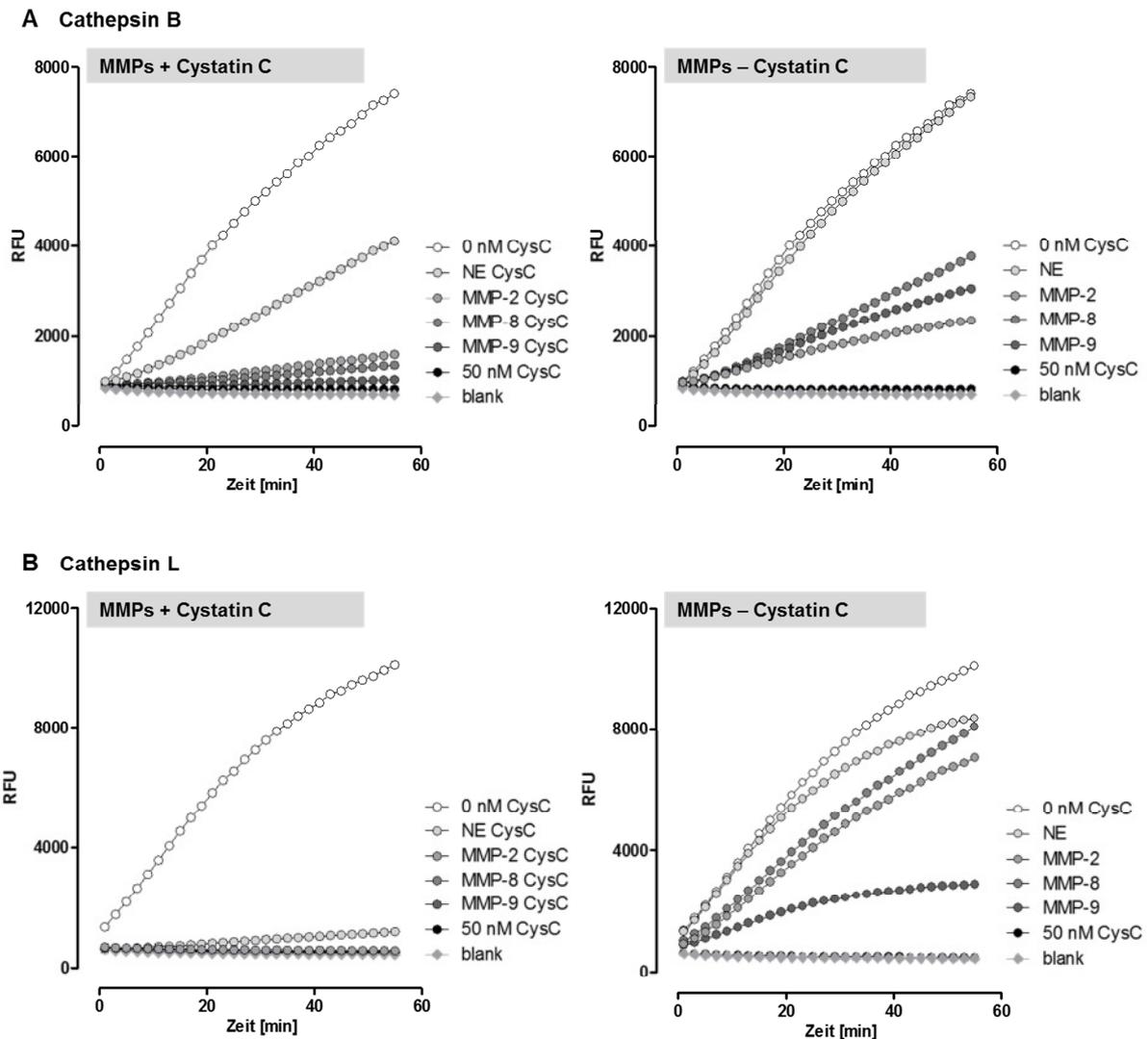
Die physiologische Konzentration von Cystatin C im Blut liegt bei 0.3–1  $\mu\text{g/ml}$  (Kos et al., 1997; Tumminello et al., 2009). Der Gehalt von MMP-8 und -9 im Serum kann nach einer G-CSF-Behandlung auf bis zu 4  $\mu\text{g/ml}$  ansteigen (Steinl et al., 2013). Wurden die *in vitro*-Verdauansätze also mit einem Substrat:Enzym-Verhältnis von 1:1 statt 3:1 durchgeführt, so konnte im Silbergel sogar eine vollständige Umsetzung der intakten Cystatin C-Form in die verkürzte beobachtet werden (Abbildung 3-19, A). Dieses Verhältnis wurde folglich auch für die Prozessierung von Cystatin C durch MMP-2, -8 oder -9 verwendet, um die Hemmfähigkeit der verkürzten Form gegenüber Cystein-Cathepsinen zu untersuchen. MMP-14 wurde nicht weiter analysiert, da für diese Protease weder im Silbergel noch im Massenspektrum eine Cystatin C-Proteolyse detektiert wurde. Die in neutrophilen Granulozyten in größeren Mengen exprimierte neutrophile Elastase (NE) wurde als Positivkontrolle eingesetzt (Abbildung 3-19, B), da sie durch Proteolyse am Aminoende die inhibitorische Fähigkeit von Cystatin C signifikant beeinträchtigt (Abrahamson et al., 1991).



**Abbildung 3-19: Vollständiger Verdau von Cystatin C durch MMPs und die neutrophile Elastase.** Das aus zwei Formen bestehende rh Cystatin C wurde mit den Proteasen MMP-2, -8 oder -9 (A) und der neutrophilen Elastase (B) im Massenverhältnis 1:1 inkubiert. Bei der anschließenden Silberfärbung der Verdauungsansätze konnte die dem intakten Molekül entsprechende Bande (dünner Pfeil) weder nach der MMP-Inkubation noch nach dem Elastase-Verdau nachgewiesen werden. Cystatin C wurde vollständig in die verkürzte Form umgewandelt (dicker Pfeil).

Die Umsetzung der Fluoreszenz-gequenchten Peptidsubstrate durch Cathepsin B und L wurde unter Zugabe des durch MMPs oder NE prozessierten Inhibitors gemessen (Abbildung 3-20, links). Da der Cystatin C-Verdauungsansatz samt der enthaltenen Proteasen verwendet wurde, erfolgten parallele Messungen nur unter Zugabe von MMP-2, -8, -9 oder NE ohne Cystatin C, um den Einfluss der Proteasen selbst auf die Cathepsin-Aktivität zu vergleichen (Abbildung 3-20, rechts). Die Hemmfähigkeit des durch NE prozessierten Cystatin C gegenüber Cathepsin B und L war um ungefähr 50 % bzw. 10 % verringert. Dagegen war das inhibitorische Potential von Cystatin C gegenüber Cathepsin B und L nach dem Verdau durch MMPs nur leicht bzw. gar nicht beeinträchtigt (Abbildung 3-20, links). Wurde allerdings der direkte Einfluss der Proteasen auf die Cathepsin-Aktivität untersucht, so zeigte NE gegenüber Cathepsin B keinen und gegenüber Cathepsin L nur einen leichten negativen Effekt (Abbildung 3-20, rechts). Die MMPs haben die Substratumsetzung von Cathepsin B jedoch erheblich reduziert. MMP-9 hat die Aktivität von Cathepsin L auf ungefähr 30 % verringert, der negative Effekt von MMP-2 und -8 fiel weniger deutlich aus.

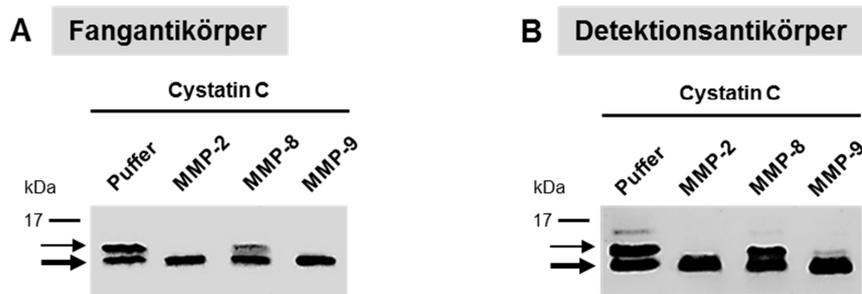
Zusammenfassend zeigen diese Messungen, dass die Prozessierung von Cystatin C kaum Einfluss auf seine inhibitorischen Fähigkeiten gegenüber den in der Nische aktiven Cysteinproteasen Cathepsin B und L hat. Ferner scheinen die an der Stammzellmobilisierung beteiligten Enzyme MMP-2, -8 und -9 die Aktivität von Cathepsin B und L negativ zu beeinflussen, was jedoch in direkten *in vitro*-Inkubationen der beiden Proteasentypen miteinander bestätigt werden müsste.



**Abbildung 3-20: Inhibitorische Aktivität von Cystatin C nach der Prozessierung durch MMPs.** Rh Cathepsin B (A) und L (B) wurden jeweils mit einem Fluoreszenz-gequenchten Substrat unter Zugabe von 50 nM rh Cystatin C, das durch die MMP-2, -8, -9 oder neutrophile Elastase (NE) degradiert wurde, inkubiert (linke Spalte). Zum Vergleich wurde der Inhibitor weggelassen, um den Effekt der Proteasen auf die Cathepsin-Aktivität zu bestimmen (rechte Spalte). Die Fluoreszenzentwicklung (RFU) wurde über die Zeit gemessen. Durch NE verdautes Cystatin C war in seiner Hemmfähigkeit gegenüber Cathepsin B und L beeinträchtigt, der Verdau durch MMPs hatte hingegen kaum einen Effekt (links). Die MMPs selbst verringerten zum Teil die Substratumsetzung der Cathepsine (rechts).

Ausgehend von den Ergebnissen der biochemischen Analysen, wurde die Spezifität der im Cystatin C-ELISA verwendeten Antikörper überprüft. Dazu wurde rh Cystatin C erneut mit MMP-2, -8 oder -9 inkubiert und für die anschließende Western Blot-Untersuchung jeweils der Fang- und Detektionsantikörper des ELISA-Kits verwendet (Abbildung 3-21). Beide Antikörper waren in der Lage, neben dem intakten Molekül auch die verkürzte Form des Inhibitors zu detektieren. Daraus konnte man ableiten, dass die in den Stimulationsversuchen

(Abbildungen 3-14 und 3-15) gemessenen Konzentrationen sowohl das intakte Cystatin C als auch die degradierte Variante, die durch mögliche aktive MMPs im Zellkulturüberstand entstand, beinhalteten. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die Konzentrationsabnahme wahrscheinlicher aus einer verringerten Expression als aus einer extrazellulären Modifizierung resultierte.



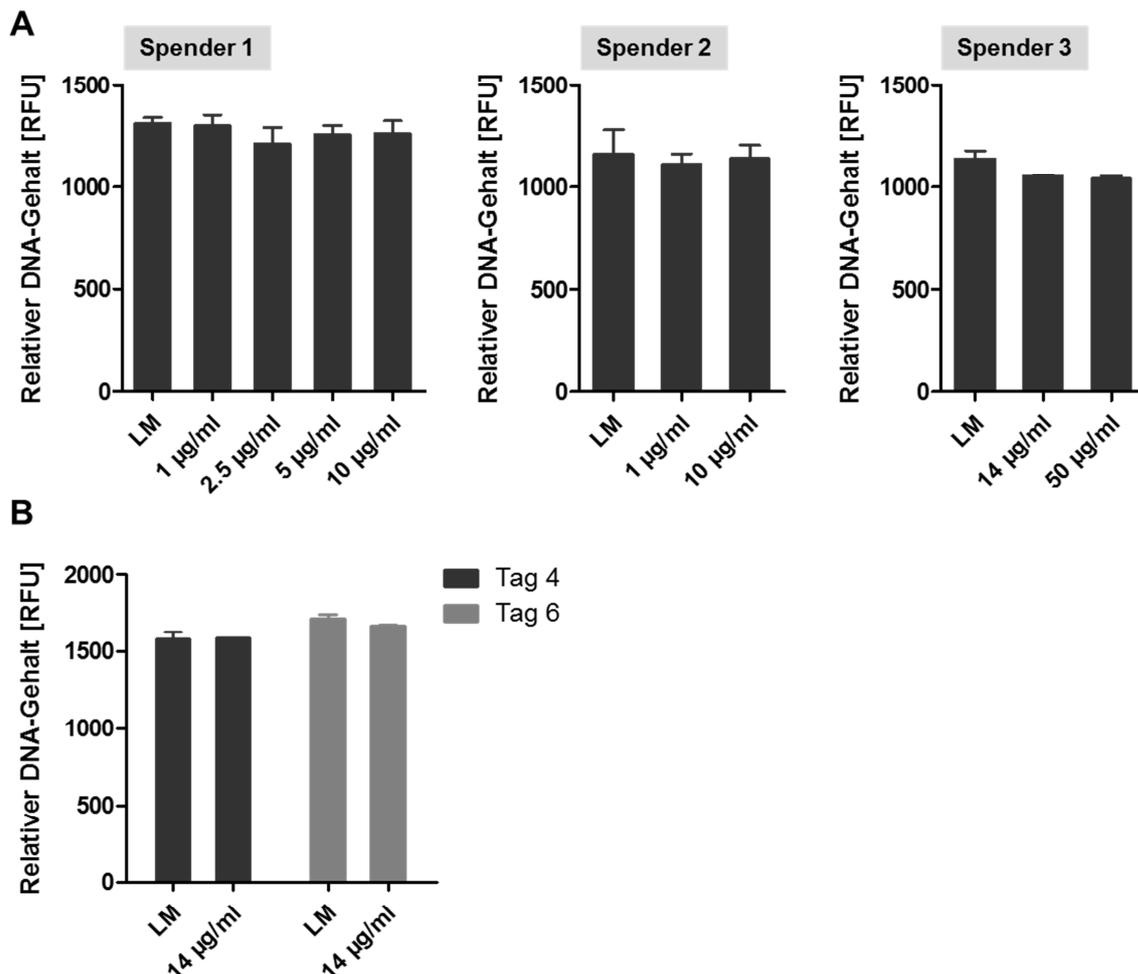
**Abbildung 3-21: Überprüfung der Antikörperspezifität des Cystatin C-ELISA.** Rh Cystatin C wurde mit MMP-2, -8 oder -9 inkubiert und einer SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit den ELISA-Antikörpern unterzogen. Sowohl der Fangantikörper (A) als auch der Detektionsantikörper (B) haben an die intakte und an die verkürzte Form von Cystatin C gebunden.

### 3.2.4 Funktionelle Analysen der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in Abhängigkeit von Cystatin C

#### 3.2.4.1 Cystatin C-Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der HSPCs

Da Cystatin C in größeren Mengen von Nischenzellen hergestellt und ausgeschieden wird, sollte eine mögliche direkte Wirkung des Proteins auf die Stammzellen in funktionellen *in vitro*-Untersuchungen mit aus Nabelschnurblut isolierten CD34<sup>+</sup> HSPCs gezeigt werden. Für den endogenen MMP-Inhibitor TIMP-3 wurde kürzlich ein proliferationsfördernder Effekt auf murine HSCs *in vitro* beschrieben (Nakajima et al., 2010). Daher sollte zunächst der Einfluss von Cystatin C auf das proliferative Verhalten der HSPCs durch Inkubation der frisch isolierten Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des rekombinanten Cystatin C nach 4 Tagen bestimmt werden (Abbildung 3-22, A). Die Proliferationsrate wurde durch Quantifizierung des relativen DNA-Gehalts unter Verwendung eines fluoreszierenden Farbstoffs, der spezifisch in die DNA-Helix interkaliert, gemessen. HSPCs wurden mit einer Cystatin C-Konzentration im physiologischen Bereich (1 µg/ml), mit einer zehnfach höheren Konzentration und mit zwei Konzentrationen im Zwischenbereich behandelt, wobei kein Un-

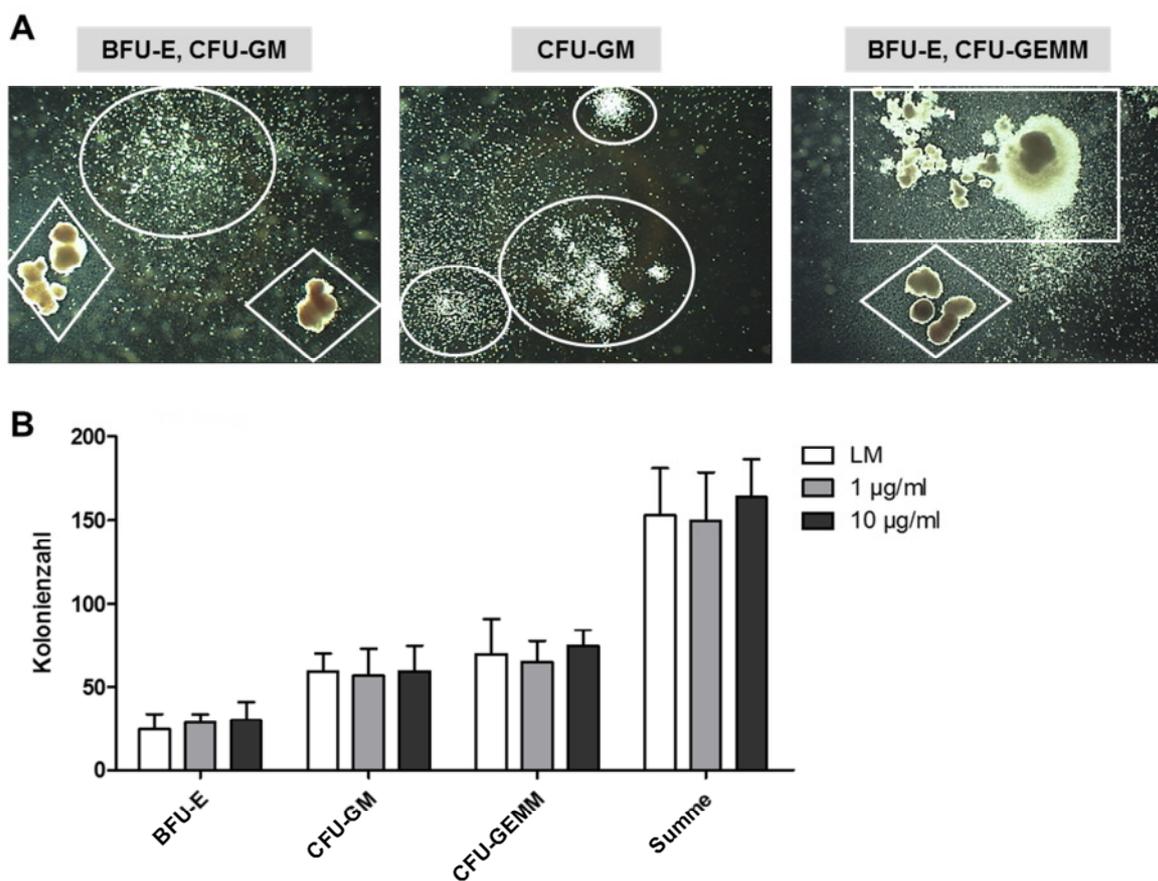
terschied zur Lösungsmittelkontrolle (LM) festgestellt werden konnte (Abbildung 3-22, Spender 1). Auch mit einem zweiten Spender war kein Effekt zu beobachten. Selbst eine drastische Erhöhung auf das Fünzigfache der physiologischen Cystatin C-Konzentration hatte keine Veränderung der Proliferationsrate zur Folge (Spender 3). Um eine zeitabhängige Wirkung auszuschließen, wurde die Inkubationsdauer mit dem Inhibitor von 4 auf 6 Tage verlängert, was jedoch ebenfalls keinen Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen zur Folge hatte (Abbildung 3-22, B).



**Abbildung 3-22: Einfluss von Cystatin C auf die HSPC-Proliferation *in vitro*.** Frisch isolierte CD34<sup>+</sup> HSPCs wurden für 4 Tage mit rh Cystatin C inkubiert (A). Die Proliferationsrate wurde durch eine anschließende Messung des DNA-Gehalts bestimmt. Für keinen der getesteten Spender konnte ein Unterschied im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (LM) detektiert werden. Eine Verlängerung des Proliferationsassays auf 6 Tage hatte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen gezeigt (B). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von N = 4.

Wurde der MMP-Inhibitor TIMP-3 in der Maus überexprimiert, so äußerte sich das in einer verringerten Anzahl an B- und T-Lymphozyten und einer erhöhten Menge myeloischer Zellen

im Blut und Knochenmark (Shen et al., 2010). Zum Vergleich wurde hier der Effekt des Cathepsin-Inhibitors Cystatin C auf das Differenzierungspotential humaner CD34<sup>+</sup> HSPCs *in vitro* untersucht. Nabelschnurblut-HSPCs wurden für 3 Tage mit einer physiologischen (1 µg/ml) und einer zehnfach höheren Konzentration des rh Cystatin C inkubiert. Im Anschluss daran wurden 1x10<sup>3</sup> Zellen je Replikat in halbfestem Methylzellulose-Medium, das die rekombinanten Faktoren SCF, GM-CSF, IL-3 und EPO enthielt, ausplattiert und im Brutschrank kultiviert. Nach 14 Tagen wurde die Anzahl der Kolonien, die aus erythroiden Vorläufern (BFU-E), aus Granulozyten-Makrophagen-Vorläufern (CFU-GM) oder aus primitiven multipotenten Vorläufern (CFU-GEMM) hervorgingen, bestimmt (Abbildung 3-23, A).



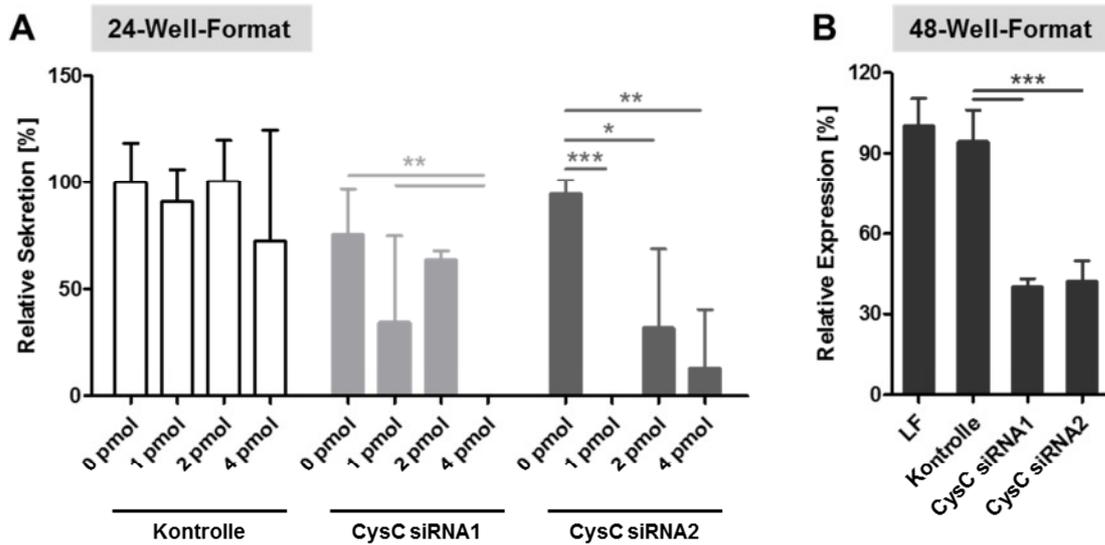
**Abbildung 3-23: Einfluss von Cystatin C auf die HSPC-Differenzierung *in vitro*.** CD34<sup>+</sup> HSPCs wurden mit rh Cystatin C inkubiert und anschließend einem Koloniebildungsassay unterzogen. Nach 14 Tagen wurde die Anzahl der erythroiden (BFU-E; Raute), Granulozyten-Makrophagen- (CFU-GM; Ellipse) und gemischten Kolonien (CFU-GEMM; Rechteck) anhand ihrer Morphologie und der Hämoglobinsynthese bestimmt (A). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (LM) zeigte weder die Anzahl der jeweiligen Kolonientypen noch die Gesamtkolonienzahl (Summe) eine von der Cystatin C-Behandlung abhängige Veränderung (B). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von N = 3.

Ein signifikanter Unterschied in der Zahl der jeweiligen Kolonientypen konnte weder bei physiologischen Cystatin C-Mengen noch bei einem deutlichen Überschuss des rekombinanten Proteins festgestellt werden (Abbildung 3-23, B). Auch die Gesamtzahl der Kolonien nach einer Cystatin C-Behandlung glich der Summe der Kolonien in der Lösungsmittelkontrolle. Insgesamt dokumentieren die dargestellten funktionellen Untersuchungen, dass Cystatin C *in vitro* weder einen direkten Einfluss auf das proliferative Verhalten der HSPCs noch auf deren Differenzierungspotential in die unterschiedlichen Blutlinien hatte.

#### **3.2.4.2 HSPC-Adhäsion und -Invasion nach Herunterregulierung der Cystatin C-Expression in MSCs**

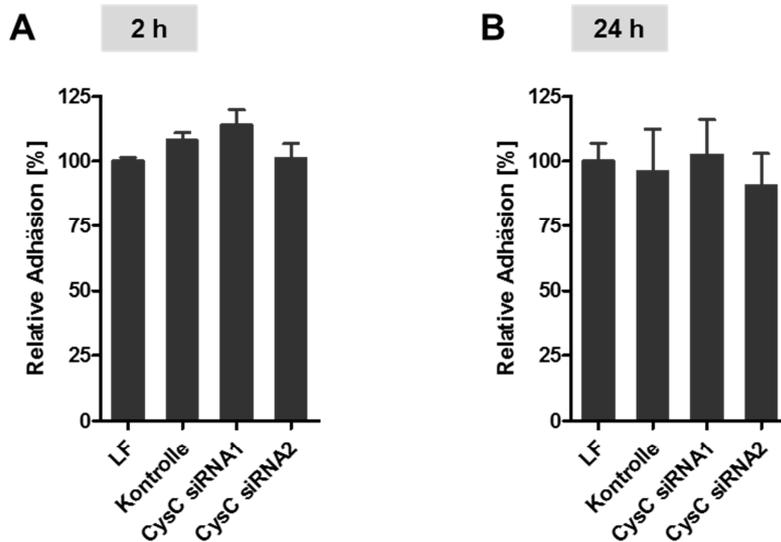
Die Cystatin C-Sekretion durch MSCs nahm ab, als die Zellen mit dem mobilisierenden Faktor G-CSF stimuliert wurden. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche verringerte Konzentration des aktiven Cathepsin-Inhibitors in der Knochenmarknische während der Stammzellmobilisierung hin. Folglich sollte die Frage nach dem Einfluss von Cystatin C auf die Adhäsion und Invasion der CD34<sup>+</sup> HSPCs beantwortet werden.

Dabei wurde zunächst die Adhäsion der Stammzellen an einen konfluenten Zellrasen aus MSCs, die aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen eine der wichtigsten zellulären Komponenten der Nische darstellen, nach der Herunterregulierung der Cystatin C-Expression in diesen Stromazellen untersucht. Der Knockdown erfolgte unter Verwendung zweier spezifischer siRNA-Moleküle, die komplementär zur Sequenz der Cystatin C-mRNA sind. Wird die siRNA mittels Lipotransfektion in die Zelle eingeschleust, so führt dies zur mRNA-Bindung mit anschließender Degradation und somit zur reduzierten Proteinexpression des Inhibitors. In vorangehenden Tests sollte die Transfektion der MSCs optimiert werden. Dazu wurden MSCs in 24-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80–90 % kultiviert. Die subkonfluenten Zellrasen wurden mit verschiedenen Mengen einer unspezifischen siRNA oder zweier Cystatin C-spezifischer siRNA-Moleküle über Nacht transfiziert. Anschließend wurde die Sekretion des Inhibitors mit einem ELISA bestimmt. Dabei konnte eine hoch signifikante Abnahme der Cystatin C-Ausscheidung durch Transfektion der Zellen mit 4 pmol für beide spezifischen siRNA-Varianten detektiert werden (Abbildung 3-24, A). Wurde die Transfektion mit MSCs in 48-Well-Platten durchgeführt, da dieses Format bei den nachfolgenden Zell-Zellbindungsstudien zum Einsatz kam, so konnte eine Abnahme der Cystatin C-Expression von ungefähr 60 % im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden (Abbildung 3-24, B).



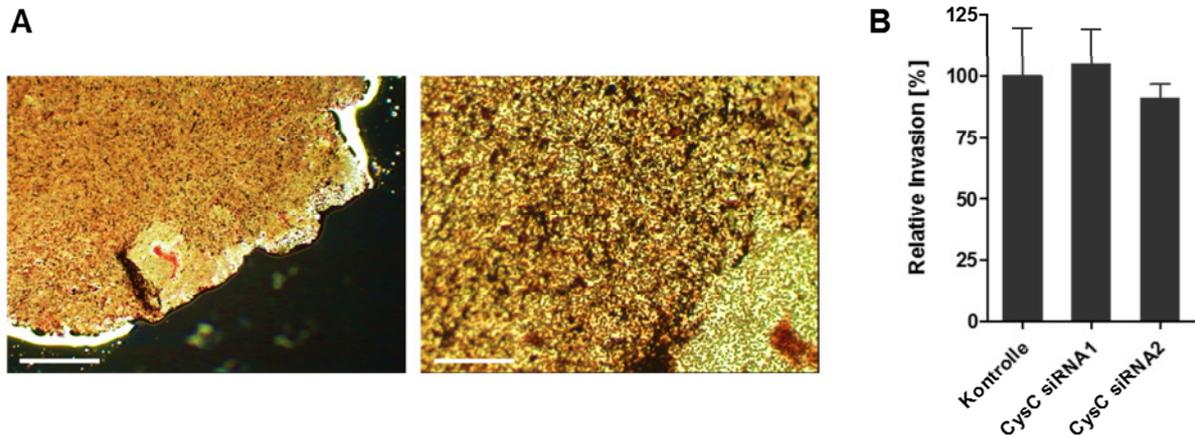
**Abbildung 3-24: siRNA-basierte Herunterregulierung der Cystatin C-Expression in MSCs.** Die Zellen wurden mit verschiedenen Mengen einer unspezifischen siRNA (Kontrolle) oder zweier Cystatin C-spezifischer siRNA-Moleküle in 24-Well-Platten transfiziert (A). Die Cystatin C-Sekretion wurde anschließend mit einem ELISA bestimmt und war für die spezifische siRNA signifikant reduziert bei 4 pmol. Die MSC-Transfektion in 48-Well-Platten mit 4 pmol siRNA verringerte den Cystatin C-Gehalt in den Zellen um ungefähr 60 % (B). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, die auf 0 pmol der Kontrolle in A bzw. auf die Lipofectamine-Kontrolle (LF) in B normalisiert wurden. Die Signifikanzanalyse erfolgte durch einfaktorische ANOVA mit  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) und  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Zur Untersuchung der Zell-Zellbindung wurden die MSC-Zellrasen nach dem Knockdown gewaschen und die Zellen zur Regeneration für 2 Stunden mit frischem GMP-Medium versehen. Nach erneutem Waschen wurden schließlich die mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF markierten HSPCs zu den MSCs gegeben und für 2 Stunden koinkubiert. Anschließend wurden die Überstände mit den nicht gebundenen Stammzellen entfernt und die Mengen der adhären HSPCs durch Messung der Fluoreszenz quantifiziert. Beim Vergleich mit den Kontrollen, die nur das Transfektionsreagenz Lipofectamine enthielten oder mit der unspezifischen siRNA transfiziert wurden, konnte mit den Cystatin C-spezifischen siRNA-Sequenzen kein Unterschied in der Adhäsion beobachtet werden (Abbildung 3-25, A). Nachdem Cystatin C ein sezernierter Faktor ist und der gesamte MSC-Überstand vor Zugabe der HSPCs entfernt wurde, sollten die Zellen nun nach der Transfektion zunächst für 24 h mit serumfreiem Medium konditioniert werden, um den Unterschied in der Expression auf die Sekretion zu übertragen. Die HSPCs wurden anschließend zu den MSCs mit den konditionierten Überständen gegeben, allerdings konnte auch in diesem Fall keine Abweichung in der HSPC-Bindung nach dem Knockdown detektiert werden (Abbildung 3-25, B).



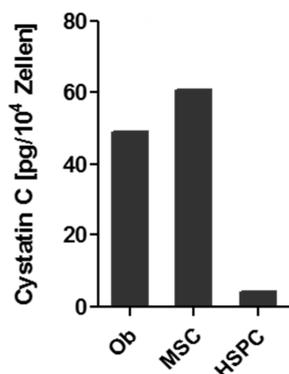
**Abbildung 3-25: HSPC-Adhäsion an MSCs nach herunterregulierter Cystatin C-Expression.** Die Anzahl adhärenter CD34<sup>+</sup> HSPC wurde 2 h (A) und 24 h (B) nach einem siRNA-basierten Cystatin C-Knockdown in MSCs mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs bestimmt. Mit keinem der beiden spezifischen siRNA-Moleküle konnte ein Unterschied in der Adhäsion im Vergleich zur unspezifischen siRNA-Kontrolle beobachtet werden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von N = 4. Die Werte wurden auf die Lipofectamine-Kontrollen (LF) normalisiert.

Ferner wurde der Effekt der siRNA-basierten Herunterregulierung der Cystatin C-Expression in einem konfluenten MSC-Zellrasen auf das invasive Potential der HSPCs durch diesen Monolayer untersucht. Hierfür wurden MSCs auf Transwell-Inserts mit einer Membran mit 3  $\mu$ m-Poren inkubiert, wobei das Erreichen der Konfluenz durch Färbung der Zellen mit dem membrangängigen, nicht toxischen Farbstoff Neutralrot kontrolliert wurde (Abbildung 3-26, A). Die Porengröße von 3  $\mu$ m war gerade klein genug, dass HSPCs mit einem Zelldurchmesser von ungefähr 8–10  $\mu$ m in der oberen Kammer des Transwells nicht passiv, sondern nur als Reaktion auf einen chemotaktischen Stimulus, der in diesem Fall durch rh SDF-1 $\alpha$  in der unteren Kammer gegeben war, durch den MSC-Rasen und die Membran wandern konnten. Die MSCs auf der Membran wurden nun mit den zwei Cystatin C-spezifischen siRNA-Molekülen transfiziert, bevor frisch isolierte HSPCs in die obere Kammer des Transwells gegeben wurden. Die Menge der in die untere Kammer durchgewanderten HSPCs wurde nach 24 h Inkubation bestimmt, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Transfektion mit der unspezifischen siRNA (Abbildung 3-26, B).



**Abbildung 3-26: HSPC-Invasion nach Cystatin C-Knockdown in konfluenten MSCs.** Zur Kontrolle der Konfluenz des MSC-Zellrasens im Transwell-Insert wurden die Zellen mit Neutralrot angefärbt (A). Am unteren Rand der mit einem Skalpell herausgetrennten Membran ist der Rasen durch eine Pinzette zerstört. Maßstabsbalken: links = 1 mm, rechts = 0.5 mm. Wurde die Cystatin C-Expression in den MSCs mit zwei spezifischen siRNA-Molekülen herunterreguliert, so hatte dies keinen Einfluss auf die Invasion der CD34<sup>+</sup> HSPCs durch den konfluenten MSC-Rasen (B). Dargestellt sind die auf die Kontrolle normalisierten Mittelwerte  $\pm$  SD von N = 3.

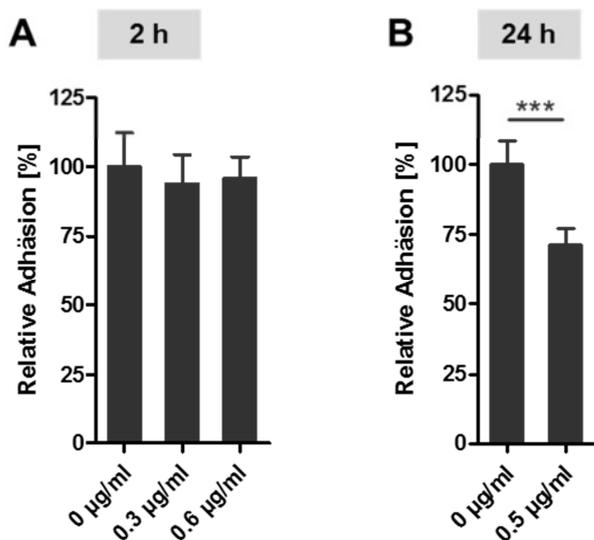
Zusammenfassend zeigen die Knockdown-Studien, dass selbst bei einer Abnahme der Cystatin C-Expression durch MSCs um 60 % die HSPC-Adhäsion und -Invasion nicht beeinflusst wurde. Ein fehlender Effekt aufgrund einer Kompensation des Knockdowns durch die Cystatin C-Synthese in HSPCs kann ausgeschlossen werden, denn im Vergleich zu MSCs und Osteoblasten sezernierten die hämatopoetischen Zellen *in vitro* nur sehr geringe Mengen des Inhibitors, wie durch ELISA-Messungen gezeigt wurde (Abbildung 3-27).



**Abbildung 3-27: Vergleich der Cystatin C-Sekretion verschiedener Knochenmarkzelltypen.** Die Cystatin C-Konzentration im Überstand wurde nach 24 h Konditionierung mit einem spezifischen ELISA gemessen. CD34<sup>+</sup> HSPCs sezernierten nur ungefähr 10 % der Cystatin C-Menge, die von MSCs ausgeschieden wurde.

### 3.2.4.3 Einfluss eines Cystatin C-Überschusses auf die HSPC-Adhäsion und -Invasion

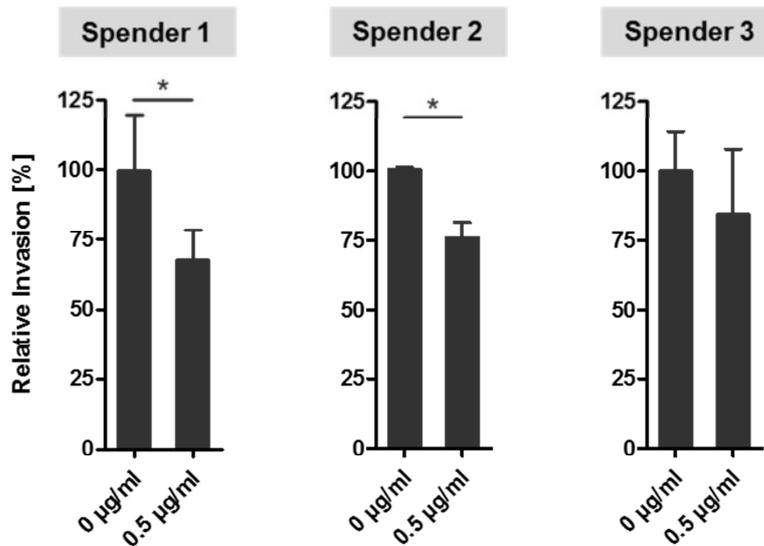
Ergänzend zum Einfluss einer verringerten Expression sollten nun die Folgen einer im Vergleich zu den Konzentrationen, die MSCs *in vitro* sezernieren (Abbildung 3-14), stark erhöhten Cystatin C-Menge auf das adhäsive und invasive Verhalten der HSPCs analysiert werden. Dazu wurde ein MSC-Zellrasen gewaschen, für eine Stunde mit rh Cystatin C behandelt und für eine weitere Stunde mit fluoreszenzmarkierten CD34<sup>+</sup> HSPCs koinkubiert (Abbildung 2-2). Wie bereits beim Knockdown konnte auch hier nach 2 h kein Unterschied in der HSPC-Adhäsion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen festgestellt werden (Abbildung 3-28, A). Wurden die MSCs dagegen nach dem Waschen für 24 h mit serumfreiem Medium konditioniert und das rh Cystatin C und die HSPCs in diesen konditionierten Überstand gegeben, so war die Anzahl der adhären HSPCs signifikant geringer als bei der Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 3-28, B).



**Abbildung 3-28: HSPC-Adhäsion an MSCs bei einem Cystatin C-Überschuss.** Die Anzahl am MSC-Rasen adhären CD34<sup>+</sup> HSPC wurde 2 h nach Zugabe hoher rh Cystatin C-Konzentrationen mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs bestimmt, wobei kein Effekt zu beobachten war (A). Wurde der MSC-Überstand vor dem Adhäsionsassay für 24 h konditioniert, so war die HSPC-Adhäsion bei Cystatin C-Zugabe signifikant verringert (B). Dargestellt sind die auf die 0 µg/ml-Kontrollen normalisierten Mittelwerte  $\pm$  SD von N = 2 in A und N = 3 in B. Signifikanzanalyse: parametrischer *t*-Test mit  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Übereinstimmend mit der verringerten Adhäsion wurde bei einem Transwell-Invasionsassay mit MSCs und HSPCs bei zwei von drei verschiedenen Spendern auch eine signifikante Abnahme in der Anzahl der durchgewanderten Zellen beobachtet, nachdem rh Cystatin C zuge-

geben wurde (Abbildung 3-29). Da MSCs und HSPCs sowohl innerhalb eines Versuchs als auch für jede Wiederholung eines Experiments von unterschiedlichen Spendern stammten, war eine spenderabhängige Abweichung der Ergebnisse nicht auszuschließen. Insgesamt zeigen diese funktionellen Studien jedoch, dass stark erhöhte Cystatin C-Mengen im Gegensatz zu einer verringerten Expression einen Einfluss auf die Stammzelladhäsion und -invasion haben können.



**Abbildung 3-29: HSPC-Invasion bei einem Cystatin C-Überschuss.** Im Transwell-Assay wurde die Menge der durch einen konfluenten MSC-Zellrasen durchgewanderten CD34<sup>+</sup> HSPCs nach Zugabe einer hohen rh Cystatin C-Konzentration bestimmt. Bei 2 von 3 unabhängigen Spendern konnte eine Cystatin C-abhängige signifikante Abnahme der Invasion beobachtet werden. Dargestellt sind die auf die 0 µg/ml-Kontrollen normalisierten Mittelwerte ± SD. Signifikanzanalyse: parametrischer *t*-Test mit  $p < 0.05$  (\*).

### 3.3 Etablierung einer 3D Kokultur mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und mesenchymalen Stromazellen mit Hilfe der Hanging-Drop-Methode

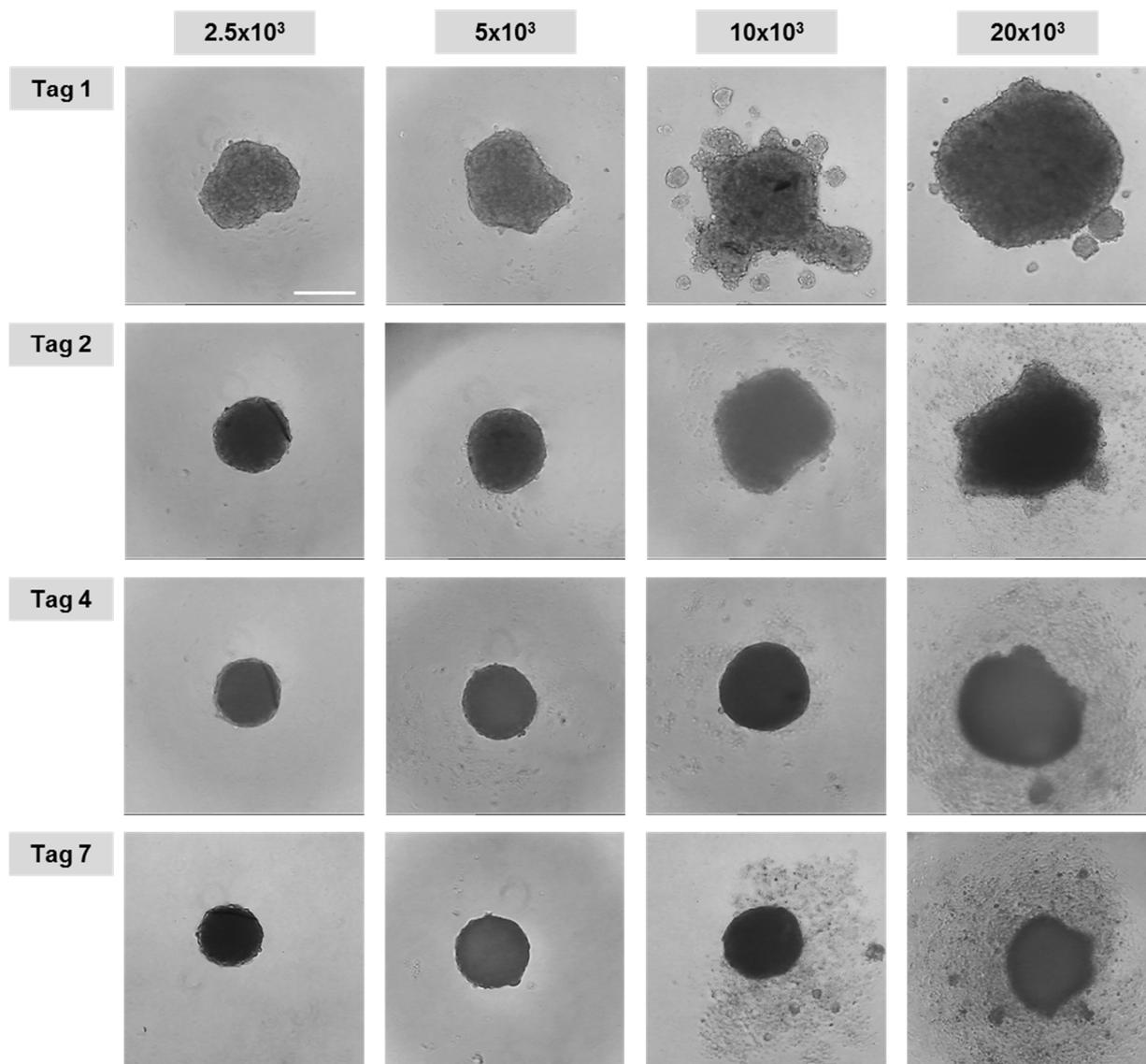
In vielen Fällen, insbesondere bei den häufig in geringen Mengen verfügbaren Stammzellen aus dem Nabelschnurblut, erfordert die Transplantation eine vorangehende Zellexpansion *ex vivo*. Allerdings führt dieser Schritt oft zu veränderten Eigenschaften der HSPCs, wodurch sie in ihrer Repopulations- und Rekonstitutionsfähigkeit beeinträchtigt werden. Durch kontinuierliche Optimierung der Expansionsprotokolle, zum Beispiel mit Hilfe der Zugabe verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie der Kokultur mit Knochenmarkstromazellen, wird versucht, dem Qualitätsverlust der Stammzellen zu begegnen. Darüber hinaus finden 3D Kulturmethoden seit einigen Jahren immer häufiger Anwendung, um die natürliche *in vivo*-Umgebung der HSPCs hinsichtlich räumlicher Anordnung und Zellkommunikation möglichst getreu zu imitieren. In dieser Arbeit sollte ebenfalls ein Modell zur *in vitro*-Expansion von CD34<sup>+</sup> HSPCs aus Nabelschnurblut in Kokultur mit MSCs aus dem humanen Knochenmark etabliert werden. Hierfür wurde die Hanging-Drop-Methode ausgewählt, bei der die Zellen ohne Zugabe von Hydrogelen oder artifiziellen Gerüsten sich allein durch Zell-Zellkontakte zu 3D Aggregaten, den sogenannten Sphäroiden, anordnen. Diese Art der Zellkultur ist technisch einfach realisierbar und nicht mit den Visualisierungsproblemen, die vielen Scaffold-basierten Modellen zugrunde liegen, behaftet.

#### 3.3.1 Sphäroidbildung aus MSCs

Für die Sphäroidkultur wird ein Tropfen Zellsuspension in die Wells einer HDA-Platte (hanging drop array) im 96-Well-Format pipettiert (Abbildung 2-1). Dabei erlaubt die Geometrie der HDA-Platte das Hängen des Tropfens bei einem gegebenen Volumen, ohne dass dieser heruntertropft, und die Aggregation der Zellen zum Sphäroid innerhalb weniger Tage. Auf diese Weise wird in jedem Well ein einzelnes Zellaggregat gebildet, wodurch eine genaue Kontrolle der Sphäroidgröße und -einheitlichkeit allein durch die Zellzahl ermöglicht wird.

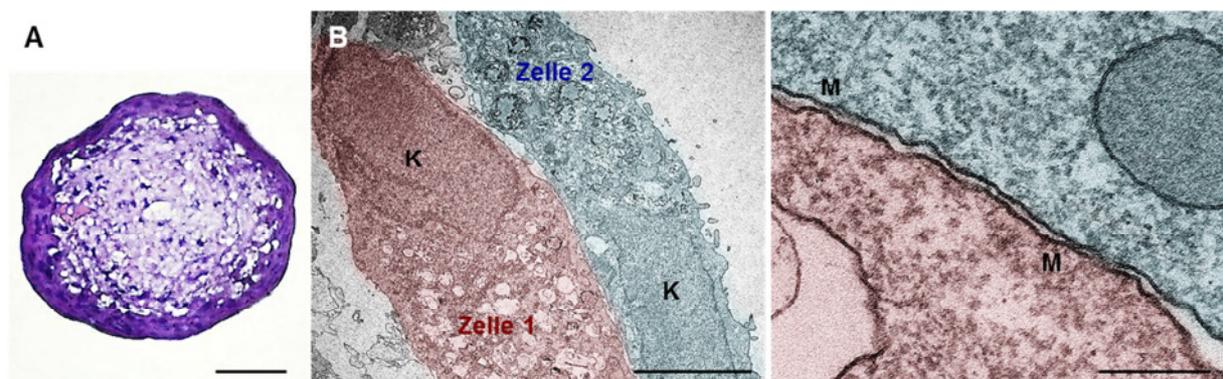
Zunächst sollte das Verhalten der MSCs im Hanging-Drop-Modell untersucht werden. Zur Bestimmung der optimalen Zellmenge für die Sphäroidkultur in einer 96-Well-Platte wurden pro Vertiefung  $2.5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10 \times 10^3$  oder  $20 \times 10^3$  MSCs in 40  $\mu$ l GMP-Medium ausgesät und die Sphäroidbildung über die Zeit beobachtet (Abbildung 3-30). Bereits nach einem Tag ordneten sich alle Zellen in den  $2.5 \times 10^3$ - und  $5 \times 10^3$ -Ansätzen zu einem einzelnen Aggregat, das nach spätestens zwei Tagen eine gleichmäßige kugelige Form zeigte, an. Dagegen wiesen die aus  $10 \times 10^3$  oder  $20 \times 10^3$  MSCs entstandenen Aggregate zu dieser Zeit eine irreguläre Ge-

ometrie mit zusätzlichen kleineren Zellansammlungen auf und waren nach einer Woche in Kultur durch eine größere Anreicherung von Abfallprodukten gekennzeichnet (Abbildung 3-30). Demnach waren diese Zellmengen für das hier verwendete HDA-Plattenformat nicht geeignet. Demgegenüber waren die  $2.5 \times 10^3$ - und  $5 \times 10^3$ -Sphäroide nach 7 Tagen immer noch einheitlich in ihrer Form und wiesen keine sichtbare Ansammlung von Abfallprodukten auf. Um eine langfristige Expansion größerer HSPC-Mengen in der späteren Kokultur zu erreichen, wurde demzufolge mit  $5 \times 10^3$  die höchstmögliche MSC-Zahl pro Well für die nachfolgenden Experimente gewählt.



**Abbildung 3-30: Sphäroidbildung aus MSCs in Abhängigkeit von der Zellzahl.** MSC-Suspensionen mit verschiedenen Zellzahlen wurden in  $40 \mu\text{l}$  Medium pro Well einer HDA-Platte ausgesät. Nach 7 Tagen in Kultur war eine starke Akkumulation von Abfallprodukten bei  $10 \times 10^3$  und  $20 \times 10^3$  MSCs pro Well zu beobachten. Maßstabsbalken =  $250 \mu\text{m}$ .

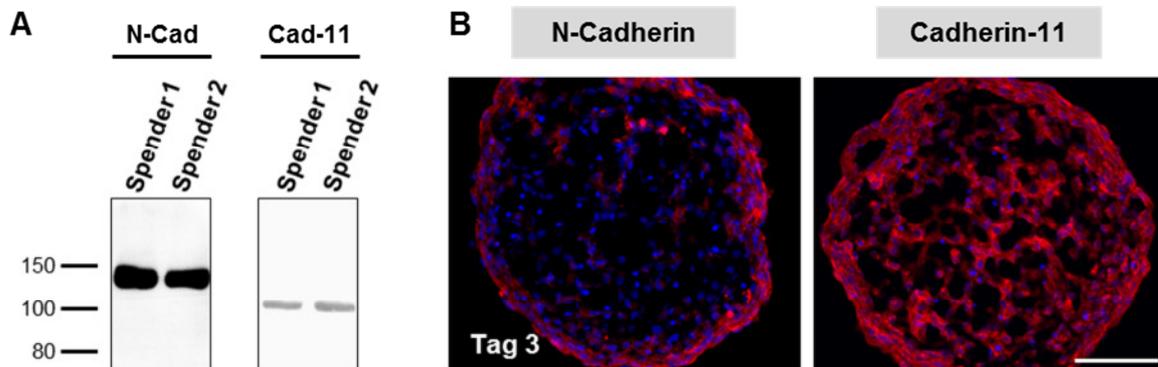
Zur näheren Charakterisierung der MSC-Sphäroide wurden Kryoschnitte von 3 Tage alten Zellaggregaten hergestellt und diese mit der Hämatoxylin-Eosin-Methode gefärbt. Dabei wurde eine auffällige morphologische Besonderheit mit einem schwammartigen, große Interzellularräume umfassenden zentralen Bereich, der von einem peripheren Ring aus sehr dicht angeordneten Zellen umgeben war, sichtbar (Abbildung 3-31, A). Für eine detailliertere Analyse wurden Ultradünnschnitte von den Sphäroiden angefertigt und am Transmissionselektronenmikroskop untersucht. In der Peripherie des Sphäroids waren MSCs in mehreren übereinander liegenden Schichten angeordnet (Abbildung 3-31, B). Auf diese Weise bildeten sie große Kontaktflächen über die Zytoplasmamembran, die zu einem verstärkten Stoffaustausch zwischen den Zellen führen könnten.



**Abbildung 3-31: Morphologie der MSC-Sphäroide.** Kryoschnitte von Zellaggregaten aus  $5 \times 10^3$  MSCs an Tag 3 wurden HE-gefärbt und zeigten eine spezielle Morphologie mit großen interzellulären Räumen, umgeben von einem dichten Zellring (A). In TEM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten wurde eine geschichtete Anordnung der MSCs im Randbereich mit engem Zell-Zellkontakt sichtbar (B). K: Zellkern; M: Zytoplasmamembran. Maßstabsbalken: links = 50  $\mu\text{m}$ , Mitte = 5  $\mu\text{m}$ , rechts = 0.2  $\mu\text{m}$ .

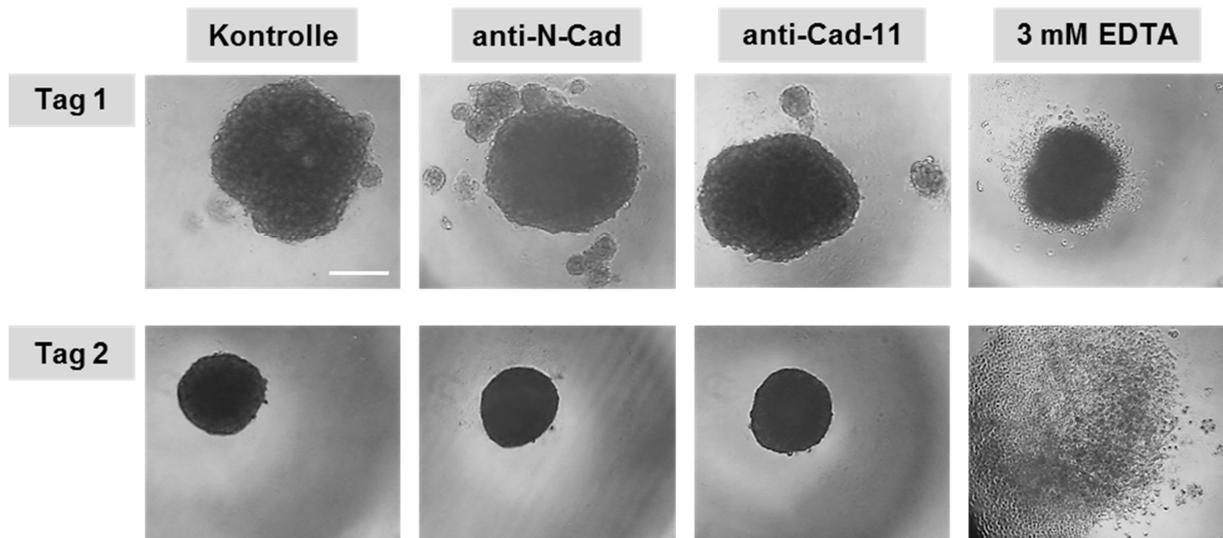
Für die beiden Zelladhäsionsmoleküle N-Cadherin und Cadherin-11, die jeweils auf homophile Weise wechselwirken, wurde kürzlich ein wichtiger Beitrag zur Interaktion zwischen hämatopoetischen Progenitoren und MSCs *in vitro* berichtet (Wein et al., 2010). Mit Hilfe spezifischer Antikörper konnte in Western-Blot-Analysen die Expression von N-Cadherin und Cadherin-11 durch MSCs aus dem Knochenmark bestätigt werden (Abbildung 3-32, A). Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen von Sphäroidkryoschnitten belegten zudem die Expression beider Adhäsionsmoleküle bei Kultivierung der Zellen unter 3D Bedingungen (Abbildung 3-32, B). Dabei war das N-Cadherin-spezifische Signal sehr intensiv im peripheren Bereich mit hoher Zelldichte und kaum detektierbar im schwammartigen Kernbereich, während der

Cadherin-11-spezifische Antikörper eine über den gesamten Querschnitt des Sphäroids gleichmäßige Fluoreszenzintensität lieferte.



**Abbildung 3-32: MSCs exprimieren N-Cadherin und Cadherin-11 in 2D und 3D.** In Western Blot-Analysen wurde die Expression von N-Cadherin und Cadherin-11 für mindestens zwei MSC-Spender gezeigt (A). Eine Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten zeigte unterschiedliche Expressionsmuster der Cadherine in MSC-Sphäroiden (B). Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m.

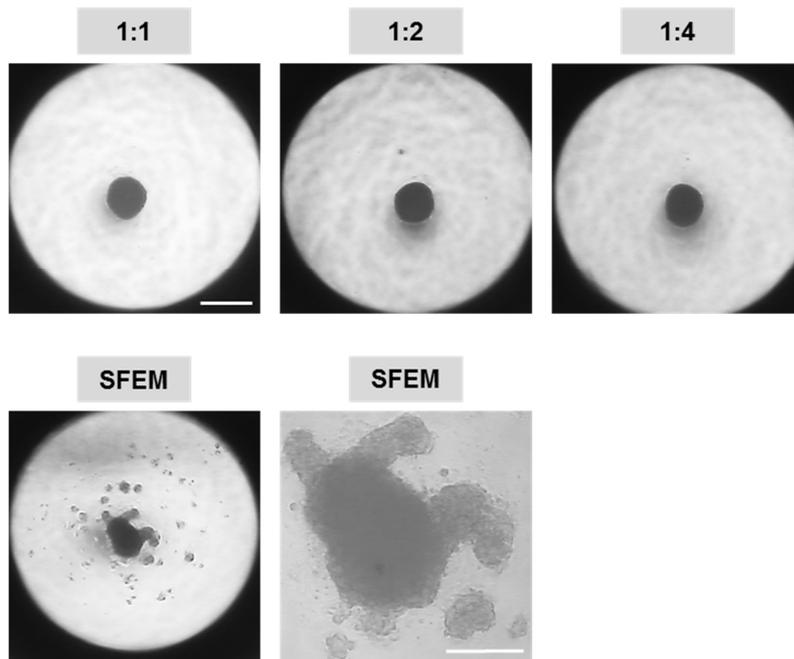
Im nächsten Schritt wurde untersucht, welchen Beitrag die beiden Cadherine zum Sphäroidbildungsprozess leisten, indem eine Suspension von  $5 \times 10^3$  MSCs zusammen mit einem funktionsblockierenden monoklonalen Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von N-Cadherin oder mit einem monoklonalen anti-Cadherin-11-Antikörper pro Well einer HDA-Platte ausgesät wurde (Abbildung 3-33). Nach der Inkubation über Nacht waren bei den behandelten Ansätzen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zusätzliche kleinere Zellaggregate zu beobachten, wobei der hemmende Effekt des Antikörpers gegen N-Cadherin etwas stärker ausgeprägt war, obwohl die Immunfluoreszenzfärbung auf eine deutlich höhere Expression von Cadherin-11 in den Sphäroiden schließen ließ (Abbildung 3-32, B). Als Positivkontrolle für diese Studie wurde EDTA zur Komplexbildung zweiwertiger Metallionen, darunter der für die homophile Cadherin-Wechselwirkung erforderlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, verwendet. In diesem Ansatz befanden sich neben dem Sphäroid zahlreiche Zellen in Suspension. Nach 2 Tagen in Kultur waren die Aggregate unter EDTA-Zugabe vollständig aufgelöst, während die mit den anti-Cadherin-Antikörpern behandelten Sphäroide nicht mehr von den Lösungsmittelkontrollen unterschieden werden konnten (Abbildung 3-33). Somit scheinen sowohl N-Cadherin als auch Cadherin-11 an der Sphäroidbildung beteiligt zu sein, allerdings ist eine Kompensation ihrer Blockierung durch andere Adhäsionsmoleküle wahrscheinlich, da die Zellaggregation durch die Antikörper nur für eine kurze Dauer beeinträchtigt werden konnte.



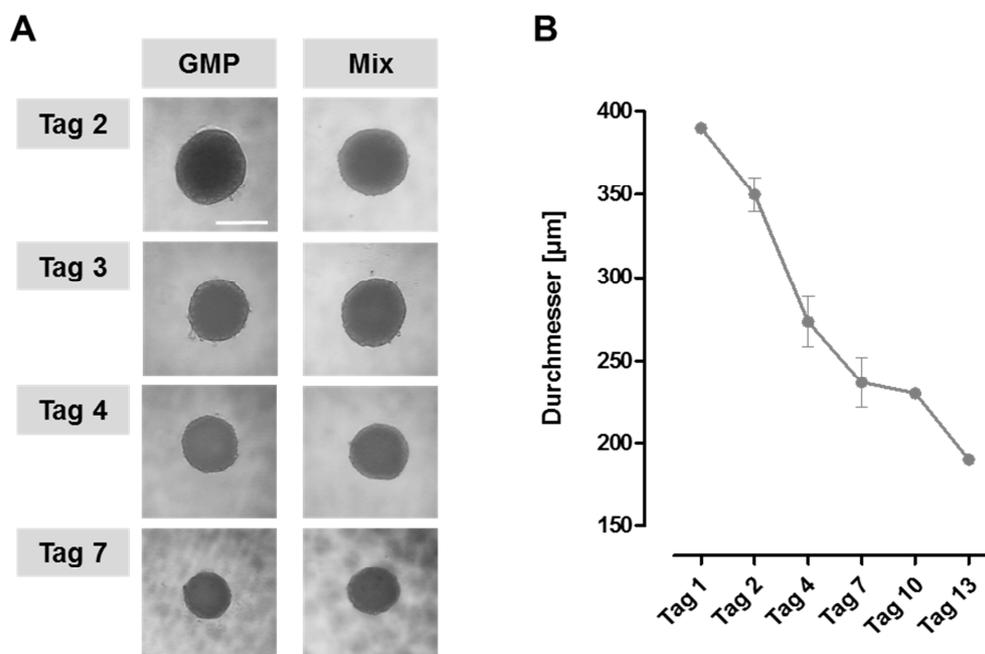
**Abbildung 3-33: N-Cadherin und Cadherin-11 sind an der Sphäroidbildung beteiligt.** Die MSC-Aggregation wurde nach Zugabe eines funktionsblockierenden Antikörpers gegen N-Cadherin im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle verlangsamt. Ein gegen Cadherin-11 gerichteter Antikörper zeigte einen weniger ausgeprägten Effekt an Tag 1. Nach 2 Tagen war kein Unterschied mehr zwischen den Sphäroiden zu beobachten. EDTA wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Maßstabsbalken = 250  $\mu\text{m}$ .

Da für die spätere Kokultur mit HSPCs das speziell für hämatopoetische Zellen optimierte Expansionsmedium SFEM verwendet werden sollte, wurde nun das Verhalten der Sphäroidbildenden MSCs in Abhängigkeit vom Kulturmedium untersucht. MSCs wurden zur Kultur in HDA-Platten entweder in SFEM-Medium oder in einer Mischung aus dem MSC-Expansionsmedium GMP und SFEM-Medium im Volumenverhältnis von 1:1, 1:2 oder 1:4 suspendiert (Abbildung 3-34). Während die Zellen in den Ansätzen mit gemischtem Medium bereits nach 1 Tag einzelne kompakte Sphäroide bildeten, war im Vergleich dazu die MSC-Aggregation in SFEM-Medium nach 2 Tagen immer noch erheblich beeinträchtigt.

Ferner konnte sowohl in GMP- als auch in gemischtem Medium mit fortschreitender Kulturdauer eine deutliche Größenabnahme für die Sphäroide beobachtet werden (Abbildung 3-35, A). Um diese Größenveränderung quantitativ zu erfassen, wurden die Sphäroiddurchmesser von mehreren MSC-Spendern mit Hilfe der Mikroskopsoftware AxioVision<sup>TM</sup> bestimmt. Dabei konnte für in GMP kultivierte Sphäroide eine Verringerung des Durchmessers auf ungefähr die Hälfte der ursprünglichen Größe innerhalb von 2 Wochen detektiert werden (Abbildung 3-35, B). Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob MSCs trotz Inkubation in dem eigens für ihre Expansion entwickelten GMP-Medium in der 3D Hanging-Drop-Kultur proliferieren.

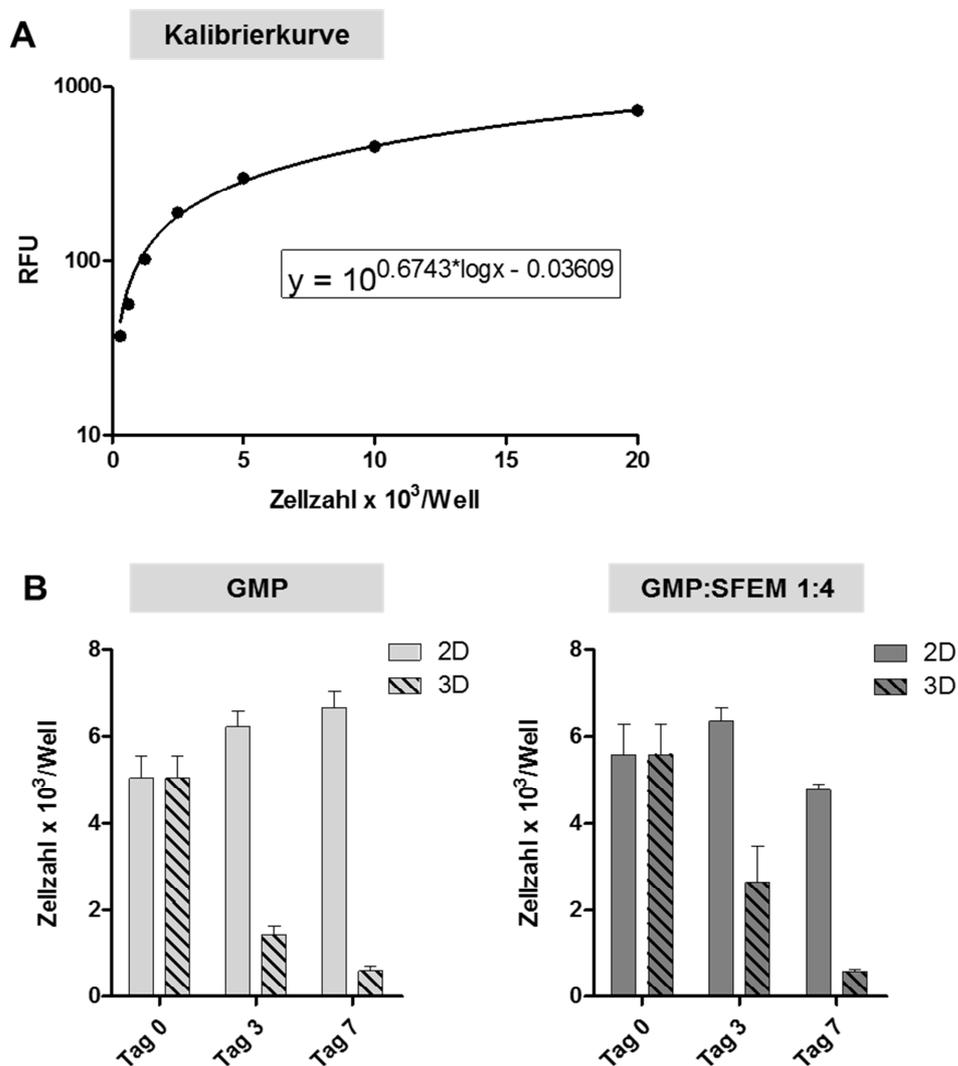


**Abbildung 3-34: MSC-Sphäroidbildung in Abhängigkeit von der Mediumzusammensetzung.** Pro Well einer HDA-Platte wurden  $5 \times 10^3$  MSCs, suspendiert in einem Medium mit dem GMP:SFEM-Volumenverhältnis von 1:1, 1:2, 1:4 oder ausschließlich in SFEM, ausgesät. Die Sphäroidbildung in SFEM war nach 2 Tagen immer noch stark beeinträchtigt. Maßstabsbalken: oben = 500  $\mu\text{m}$ , unten = 200  $\mu\text{m}$ .



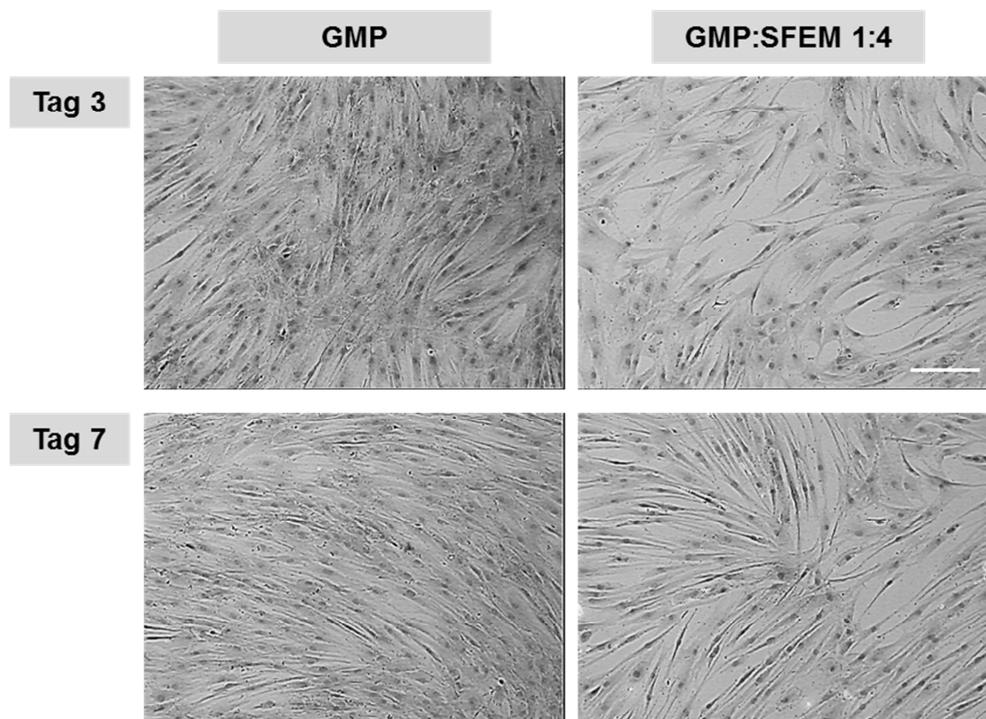
**Abbildung 3-35: Veränderung des Sphäroiddurchmessers.**  $5 \times 10^3$  MSCs wurden in GMP oder GMP:SFEM 1:4 (v/v; Mix) ausgesät (A). Die Sphäroidgröße nahm mit der Zeit unabhängig von der Mediumzusammensetzung ab. Die Messung des Durchmessers von in GMP kultivierten Sphäroiden ergab eine Verringerung von ungefähr 50 % innerhalb von 2 Wochen (B). Maßstabsbalken = 250  $\mu\text{m}$ .

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Proliferationsanalysen mit Hilfe des fluoreszenzba-  
sierten CyQUANT®-Kits zur Messung des DNA-Gehalts durchgeführt. Sphäroide aus unge-  
fähr  $5 \times 10^3$  MSCs wurden nach 3 und 7 Tagen in Kultur untersucht und hinsichtlich ihrer  
Proliferationseigenschaften mit der gleichen MSC-Menge, die in einem parallelen Ansatz in  
konventionellen 96-Well-Zellkulturplatten im gleichen Mediumvolumen inkubiert wurden,  
verglichen. Eine Kalibrierkurve mit bekannten Zellmengen wurde erstellt, um über die ge-  
messene Fluoreszenzintensität die Zellzahl in den unbekanntenen Proben berechnen zu können  
(Abbildung 3-36, A).



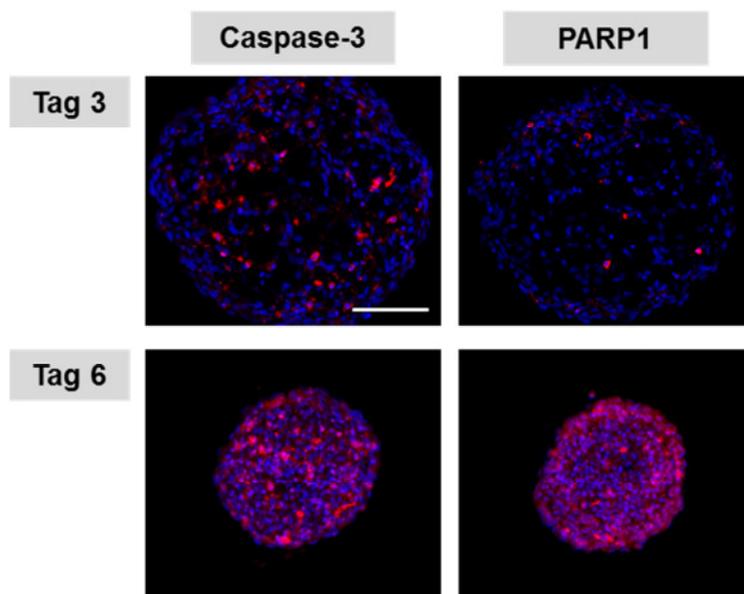
**Abbildung 3-36: Vergleich der MSC-Proliferation in 2D und 3D.** Ungefähr  $5 \times 10^3$  MSCs pro Well wurden parallel in 96-Well-Platten (2D) und HDA-Platten (3D) kultiviert. Die Proliferation wurde durch Erstellen einer Kalibrierkurve und Quantifizierung des DNA-Gehalts mit CyQUANT® gemessen (A). Sowohl in GMP als auch in GMP:SFEM 1:4 (v/v) ging die Zellzahl in 3D im Vergleich zur 2D Kultur deutlich zurück (B). Die Mittelwerte  $\pm$  SD sind repräsentativ für N = 4.

Anders als in der 2D Kultur war bei den Sphäroiden sowohl im GMP- als auch im gemischten Medium ein deutlicher Rückgang der Zellzahl innerhalb einer Woche zu verzeichnen (Abbildung 3-36, B). Die MSC-Zahl in den 2D Platten mit gemischtem Medium nahm zu diesem Zeitpunkt nur geringfügig ab, wohingegen sie bei 2D Kultur in GMP-Medium über die Zeit zunahm. Der beobachtete Wachstumsstopp in den Sphäroiden war also nur zu einem geringen Teil dem Medium geschuldet und hauptsächlich eine Folge der 3D Kulturmethode. Angesichts der für MSCs charakteristischen durchschnittlichen Verdopplungszeit von ungefähr 36 h war bei diesen Studien die zwar vorhandene, aber dennoch geringe Proliferationsrate der Zellen in herkömmlicher 2D Kultur trotz der Inkubation im MSC-Expansionsmedium GMP, auffällig. Wurden die Zellen in den 96-Well-Platten mit Methanol fixiert und mit Trypanblau angefärbt, so waren die Zellrasen bereits nach 3 Tagen nahezu zu 100 % konfluent (Abbildung 3-37). Demgegenüber stand eine deutlich reduzierte MSC-Konfluenz bei Kultivierung der gleichen Zellmengen in GMP:SFEM-Medium mit dem Volumenverhältnis von 1:4 selbst nach 7 Tagen. Demzufolge resultierte die niedrige 2D Proliferationsrate ausgehend von  $5 \times 10^3$  MSCs zu Beginn der Kultur in GMP aus einem Platzmangel bei dem verwendeten Plattenformat.



**Abbildung 3-37: MSC-Proliferation in 2D in Abhängigkeit vom Medium.**  $5 \times 10^3$  MSCs pro Vertiefung einer 96-Well-Platte erreichten bereits nach 3 Tagen Kultur in GMP-Medium nahezu vollständige Konfluenz, während bei der Inkubation in GMP:SFEM 1:4 (v/v) der Zellrasen selbst nach 7 Tagen nicht konfluent war. Maßstabsbalken = 200  $\mu\text{m}$ .

Die Proliferationsuntersuchungen brachten nicht nur einen Wachstumsarrest, sondern vielmehr auch einen Rückgang der MSC-Zellzahlen, aus denen die Sphäroide sich zusammensetzten, zum Vorschein, was einen möglichen Hinweis auf programmierten Zelltod in den Zellaggregaten lieferte. Folglich wurden Sphäroidkryoschnitte in Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen Apoptosemarker gefärbt. Dabei gilt das durch proteolytische Prozessierung aktivierte Enzym Caspase-3, das wiederum eine Kaskade weiterer proteolytischer Vorgänge in Gang setzt, als charakteristischer Nachweis apoptotischer Ereignisse (Budihardjo et al., 1999). Eines der Zielproteine der Caspase-3 ist das DNA-Strangbrüche reparierende Zellkernenzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1), das somit ebenfalls als typischer Apoptosemarker herangezogen werden kann (Tewari et al., 1995). Antikörper, die spezifisch die aktivierte Form der Effektor-Caspase-3 bzw. Spaltfragmente des nukleären Proteins PARP1 erkennen, führten bereits in 3 Tage alten Sphäroiden zu vereinzelt auftretenden Fluoreszenzsignalen hauptsächlich im schwammartigen zentralen Bereich der MSC-Aggregate (Abbildung 3-38). Nach 6 Tagen in Kultur nahm die Signalintensität für beide Proteine zu und war über den gesamten Querschnitt verteilt. Bei der Kernfärbung durch DAPI fielen in diesen Untersuchungen zudem das Verschwinden der für frühe Sphäroide typischen großen Interzellularräume und eine infolgedessen deutlich dichtere Zellanordnung mit zunehmender Kulturdauer auf (Abbildung 3-38).



**Abbildung 3-38: Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von Apoptosemarkern in MSC-Sphäroiden.** In Kryoschnitten von 3 Tage alten Sphäroiden konnten Signale für die aktivierte Caspase-3 und das gespaltene Kernprotein PARP1 nachgewiesen werden. Nach 6 Tagen in Kultur nahm die Intensität für beide Marker zu. Maßstabsbalken = 100  $\mu\text{m}$ .

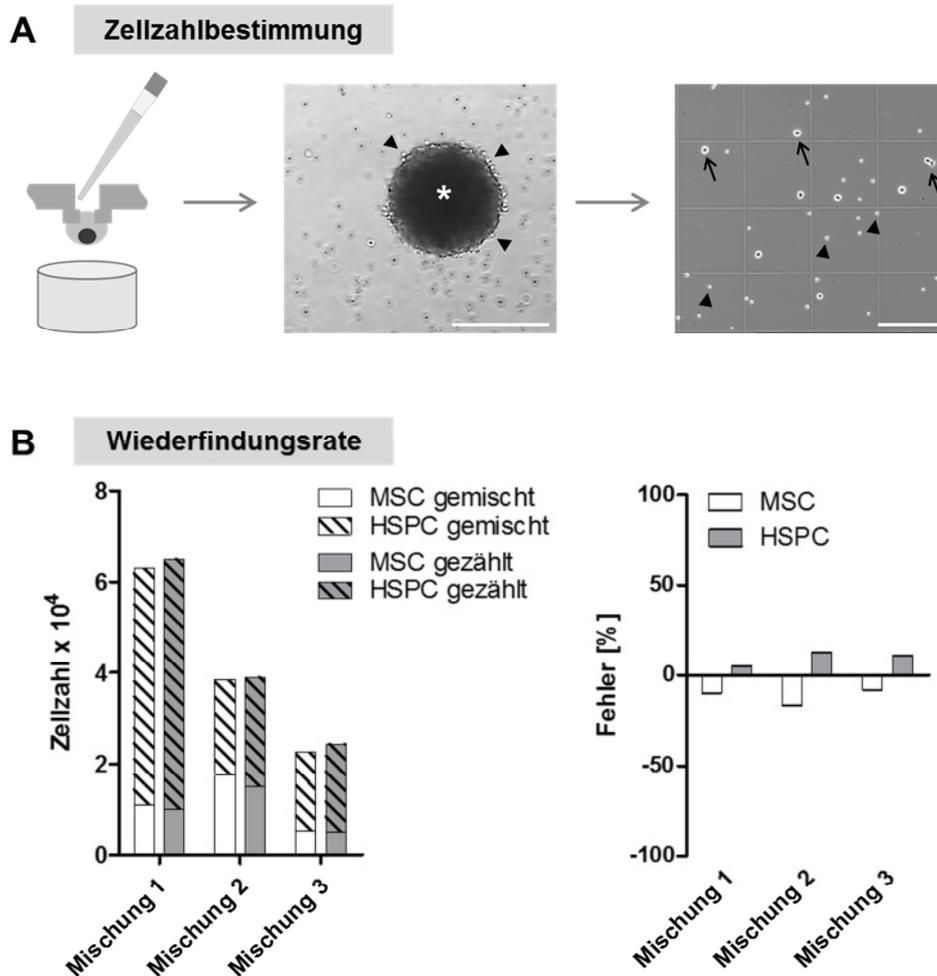
Insgesamt dokumentieren diese Ergebnisse, dass Knochenmark-MSCs bei Kultivierung im Hanging-Drop-Modell rasch zu gleichmäßigen Sphäroiden aggregierten, wobei N-Cadherin und Cadherin-11 neben weiteren Zelladhäsionsmolekülen am Sphäroidbildungsprozess beteiligt waren. Bei einer Kulturdauer von 2 Wochen nahm der Durchmesser der Sphäroide kontinuierlich ab, was einerseits auf eine fehlende MSC-Proliferation unter 3D Bedingungen und andererseits auf beginnende apoptotische Ereignisse zurückzuführen war.

### **3.3.2 Evaluierung der optimalen Bedingungen für die HSPC-MSC-Kokultur**

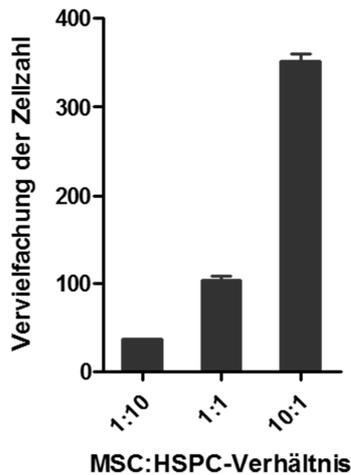
Um die optimale Zusammensetzung der 3D Kokultur für eine möglichst effektive HSPC-Expansionsrate zu finden, wurden unterschiedliche Parameter evaluiert. Da bei der Messung des DNA-Gehalts mit Hilfe der fluoreszenzbasierten CyQUANT<sup>®</sup>-Methode nicht zwischen verschiedenen Zelltypen unterschieden werden kann, erfolgte die Quantifizierung der HSPC-Proliferation durch Zählen der Zellen unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Kammer. Hierfür wurden die HDA-Platten auf herkömmlichen 96-Well-Kulturplatten positioniert und die Zellen aus dem Tropfen durch Hinzupipettieren eines größeren Volumens PBS in die darunter befindlichen Wells überführt (Abbildung 3-39, A). Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren konnten die Zellen vollständig suspendiert werden. Anhand ihrer Größe, Granularität und morphologischen Eigenschaften konnten MSCs unter dem Lichtmikroskop eindeutig von HSPCs unterschieden werden. Zum Beleg der optischen Identifizierbarkeit beider Zelltypen wurden mehrere Mischungen mit bekannten Mengenverhältnissen hergestellt und gezählt (Abbildung 3-39, B). Die Wiederfindungsrate für MSCs und HSPCs war sehr hoch und der Zählfehler betrug im Durchschnitt 10 % der theoretischen Zellkonzentration, was durchaus im Rahmen der Pipettiergenauigkeit liegt.

Mit Hilfe dieser Quantifizierungsmethode sollten nun verschiedene MSC:HSPC-Mengenverhältnisse im Hinblick auf die HSPC-Proliferation getestet werden. Pro Well einer HDA-Platte wurden gemischte Zellsuspensionen mit einem MSC:HSPC-Verhältnis von  $5 \times 10^3 : 5 \times 10^2$ ,  $2.5 \times 10^3 : 2.5 \times 10^3$  oder  $5 \times 10^2 : 5 \times 10^3$  ausgesät und die Zahl der expandierten hämatopoetischen Zellen nach 14 Tagen in Kultur bestimmt (Abbildung 3-40). Die höchste Proliferationsrate, dargestellt als Vervielfachung der ursprünglich eingesetzten HSPC-Konzentration, konnte bei Inkubation der HSPCs mit der zehnfachen Menge MSCs erzielt werden. Dieses Mengenverhältnis (MSC:HSPC  $5 \times 10^3 : 5 \times 10^2$ ) wurde folglich in GMP-Medium, SFEM-Medium oder in einer GMP:SFEM-Mischung von 1:1 oder 1:4 (v/v) inkubiert, um die effektivste Mediumzusammensetzung für die Expansion zu bestimmen (Abbildung 3-41). Bereits

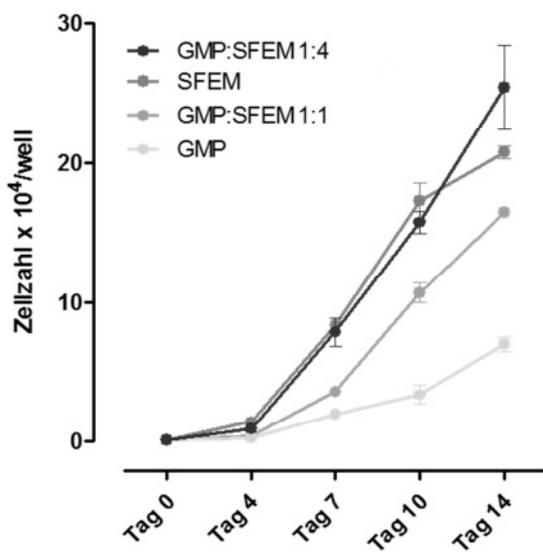
nach 7 Tagen zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der HSPC-Proliferationsrate in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturmedium. Nach 14 Tagen wurden die höchsten HSPC-Zellzahlen mit dem GMP:SFEM-Volumenverhältnis von 1:4 gemessen.



**Abbildung 3-39: Quantifizierung der HSPC-Proliferation in der Kokultur mit MSCs.** Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen aus der HDA-Platte in eine 96-Well-Platte überführt (A). In der Anfangsphase der Kokultur blieb das Sphäroid (Stern) intakt mit wenigen adhärenen HSPCs (Pfeilköpfe). Zu den späteren Zeitpunkten konnten die Zellaggregate durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einzelne Zellen dissoziiert werden. Beim Zählen mit Hilfe der Neubauer-Kammer konnten MSCs (Pfeile) und HSPCs (Pfeilköpfe) deutlich unterschieden werden. Maßstabsbalken = 250  $\mu\text{m}$ . Zur Kontrolle wurden unterschiedliche MSC-HSPC-Mischungen mit bekannter Zellzahl hergestellt und unter dem Lichtmikroskop gezählt (B). Dabei betrug der Wiederfindungsfehler maximal 15 %.



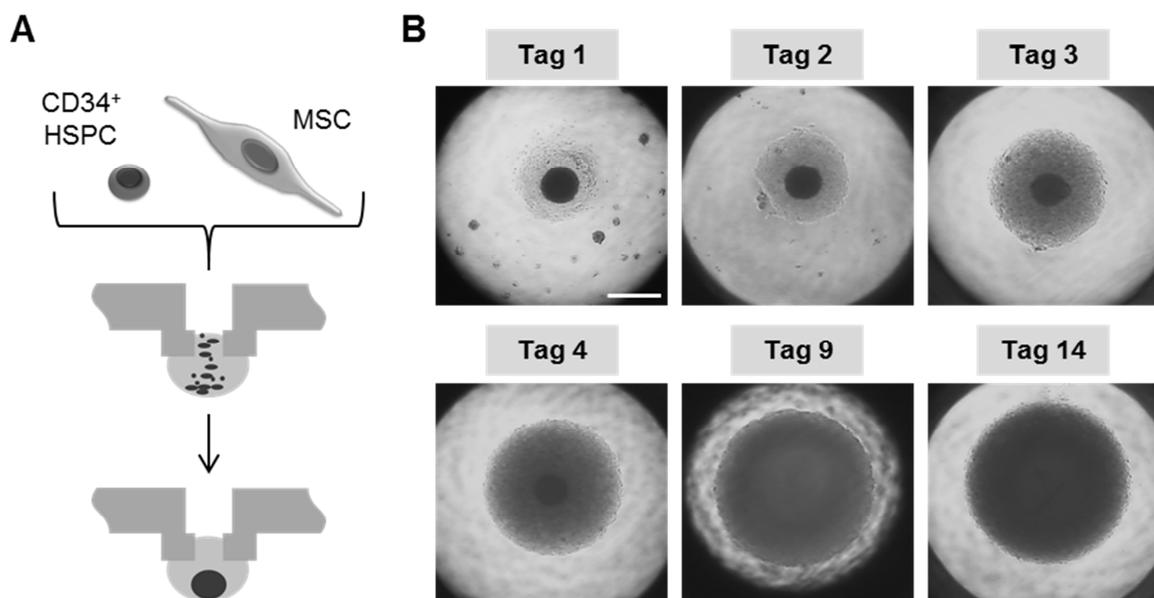
**Abbildung 3-40: HSPC-Proliferation in der 3D Kokultur in Abhängigkeit von der MSC-Zellzahl.** Die Vervielfachung der pro Well einer HDA-Platte ausgesäten HSPC-Menge nach 14 Tagen in Kokultur wurde für verschiedene MSC:HSPC-Verhältnisse bestimmt. Die höchste HSPC-Proliferation konnte mit einem MSC:HSPC-Verhältnis von 10:1 erreicht werden.



**Abbildung 3-41: HSPC-Proliferation in der 3D Kokultur in Abhängigkeit vom Medium.** Pro Well einer HDA-Platte wurden  $5 \times 10^2$  HSPCs mit der zehnfachen Menge MSCs bei verschiedenen zusammengesetzten Medien kultiviert. Die höchste HSPC-Zahl konnte nach 14 Tagen bei einem GMP:SFEM-Verhältnis von 1:4 detektiert werden.

### 3.3.3 Charakterisierung der 3D Sphäroide in der Kokultur

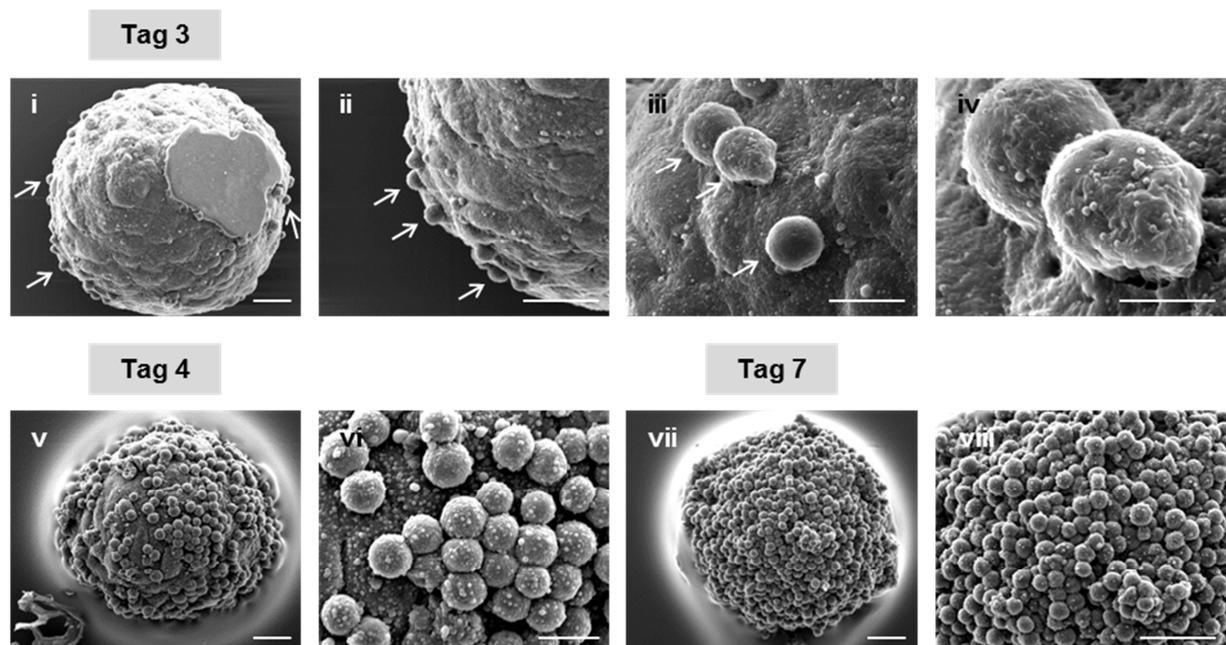
Basierend auf den im letzten Kapitel dargestellten Ergebnissen und ausgehend von einer nicht beeinträchtigten Sphäroidbildung bei gemischter Mediumzusammensetzung (Abbildung 3-34), wurde für die Kokultur der MSCs und HSPCs ein Mengenverhältnis von  $5 \times 10^3 : 5 \times 10^2$  Zellen, suspendiert in 40  $\mu\text{l}$  einer 1:4-Mischung (v/v) aus GMP- und SFEM-Medium, pro Well einer HDA-Platte gewählt (Abbildung 3-42, A). Das Medium wurde zudem mit dem hämatopoetischen Zytokincocktail CC100, bestehend aus den humanen Zytokinen Flt3-Ligand, SCF, Interleukin-3 und Interleukin-6, supplementiert. Im Tropfen bildete sich innerhalb eines Tages ein kompaktes Sphäroid, das von wenigen Zellen in Suspension umgeben war (Abbildung 3-42, B). Während die Menge der Suspensionszellen mit fortschreitender Inkubationsdauer rasch anstieg, konnte für das dichte Zellaggregat im Zentrum kaum eine Veränderung beobachtet werden. Nach über einer Woche in Kultur nahm die Konzentration der proliferierenden Zellen derart zu, dass das Sphäroid nicht mehr erkennbar war.



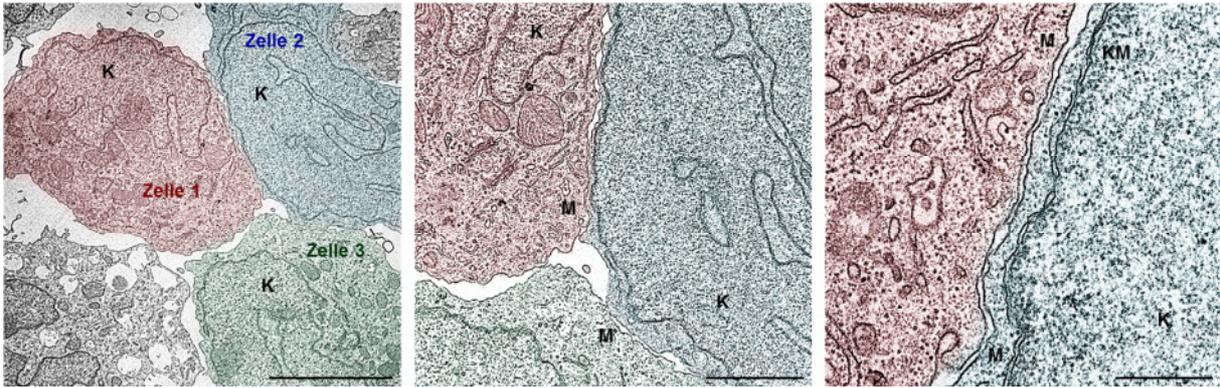
**Abbildung 3-42: Kokultur von CD34<sup>+</sup> HSPCs und MSCs in HDA-Platten.** Pro Well wurde eine Suspension aus  $5 \times 10^2$  HSPCs und  $5 \times 10^3$  MSCs in 40  $\mu\text{l}$  Medium (GMP:SFEM:CC100) pipettiert, wobei sich ein Tropfen bildete (A). Die Zellen im Tropfen aggregierten rasch zu einem dichten Sphäroid, das von Suspensionszellen mit einer hohen Proliferationsrate umgeben war (B). Maßstabstrahlen = 500  $\mu\text{m}$ .

Die lichtmikroskopische Begutachtung gibt wenig Aufschluss über die genaue Lokalisation der beiden Zelltypen innerhalb der Kokultur. Daher wurden Proben von verschiedenen Tagen

der Inkubation für rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchungen vorbereitet und analysiert. Nach 3 Tagen in Kultur konnte im EM ein kompaktes Sphäroid mit glatter Oberfläche, das sich vermutlich aus MSCs zusammensetzte, beobachtet werden (Abbildung 3-43). Auf der Sphäroidoberfläche waren nur vereinzelt HSPCs, die anhand ihres kleinen Durchmessers und kugelige Form identifiziert werden konnten, zu detektieren. Mit zunehmender Inkubationsdauer stieg die Anzahl der anhaftenden HSPCs deutlich an, sodass nach 7 Tagen in Kokultur die Sphäroidoberfläche vollständig bedeckt war. Dabei schienen die hämatopoetischen Zellen auch adhärenente Eigenschaften untereinander zu entwickeln (Abbildung 3-43). Diese Beobachtung wurde durch TEM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten bestätigt (Abbildung 3-44). In unmittelbarer Nähe des Sphäroids waren HSPCs, die üblicherweise als Suspensionszellen kultiviert werden, nach 7 Tagen in der 3D Kokultur in sehr engem Kontakt zueinander mit über längere Strecken parallel verlaufender Zytoplasmamembran. Die Stärke dieser Wechselwirkungen war jedoch eher gering, denn durch mehrfaches Auf- und Abpipetieren konnten anhaftende HSPCs wieder vollständig vom Sphäroid und voneinander gelöst werden. Eine Konservierung dieser Zell-Zellinteraktion war nur durch chemische Fixierung möglich.

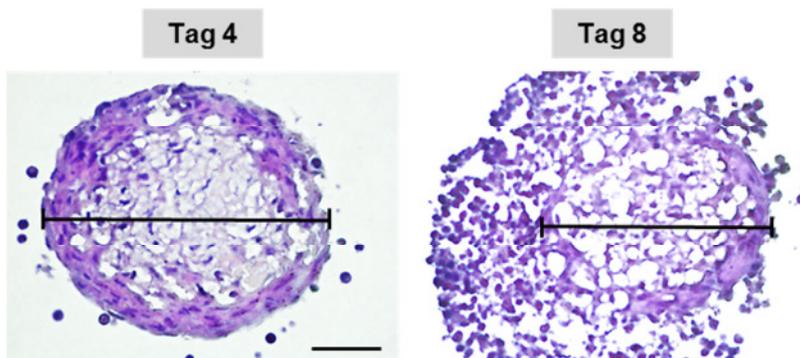


**Abbildung 3-43: REM-Analyse der Kokultur aus HSPCs und MSCs.** Eine Bildserie mit steigender Vergrößerung von Tag 3 der Kokultur zeigt ein kompaktes, glattes Sphäroid mit nur wenigen adhärenenten HSPCs auf der Oberfläche (Pfeile). Die HSPC-Adhäsion nahm nach 4 und 7 Tagen erheblich zu. Maßstabsbalken: i, ii, v, vii, viii = 25  $\mu\text{m}$ ; iii, vi = 10  $\mu\text{m}$ ; iv = 5  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3-44: Interaktion der HSPCs untereinander während der 3D Kokultur mit MSCs.** Die TEM-Bildserie mit steigender Vergrößerung macht den engen Kontakt von HSPCs zueinander und ihre Interaktion über die Zellmembran nach 7 Tagen Kultur deutlich. K: Zellkern; KM: Kernmembran; M: Zytoplasmamembran. Maßstabsbalken: links = 5 µm, Mitte = 2 µm, rechts = 0,5 µm.

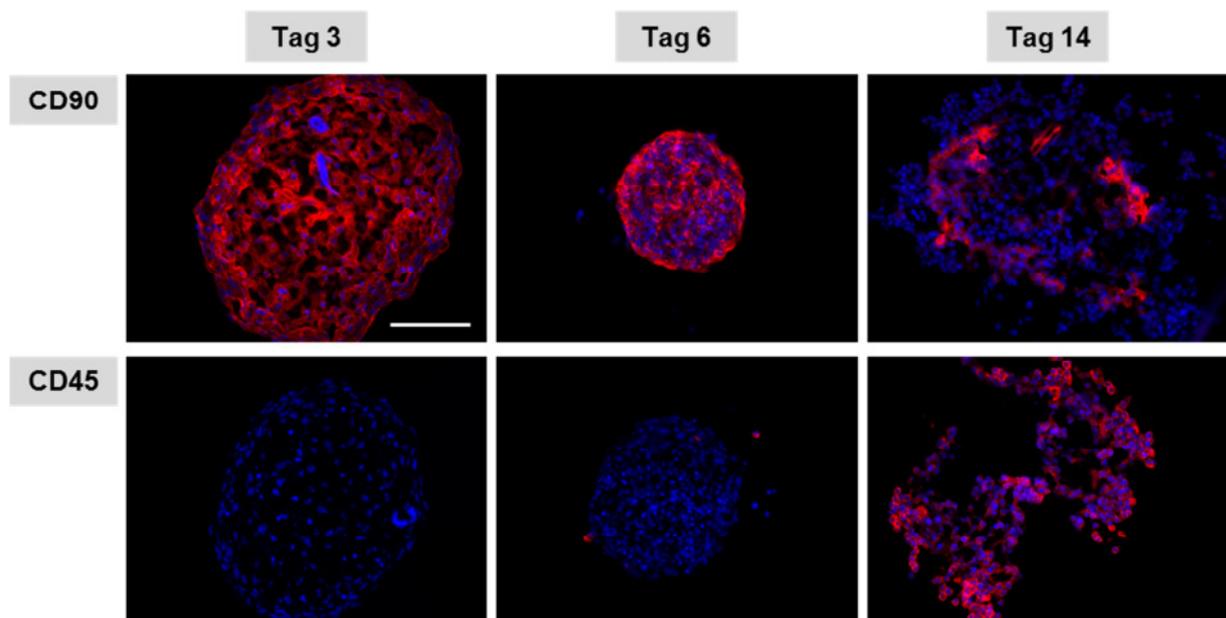
Beim HE-Färben von Kryoschnitten nach 4 Tagen in 3D Kokultur kam die bereits für MSC-Sphäroide beobachtete Morphologie zum Vorschein (Abbildung 3-45), was den Beleg dafür lieferte, dass der kompakte Bestandteil der Kokultur durch MSCs gebildet wurde. Einzelne runde Zellen mit dunkler Farbintensität, die den HSPCs entsprachen, waren um das Sphäroid verteilt, konnten jedoch nicht innerhalb des MSC-Aggregats detektiert werden. Nach längerer Kulturdauer nahm die HSPC-Zahl erheblich zu, während der vorher klare Rand des MSC-Sphäroids sich langsam auflöste (Abbildung 3-45, Tag 8).



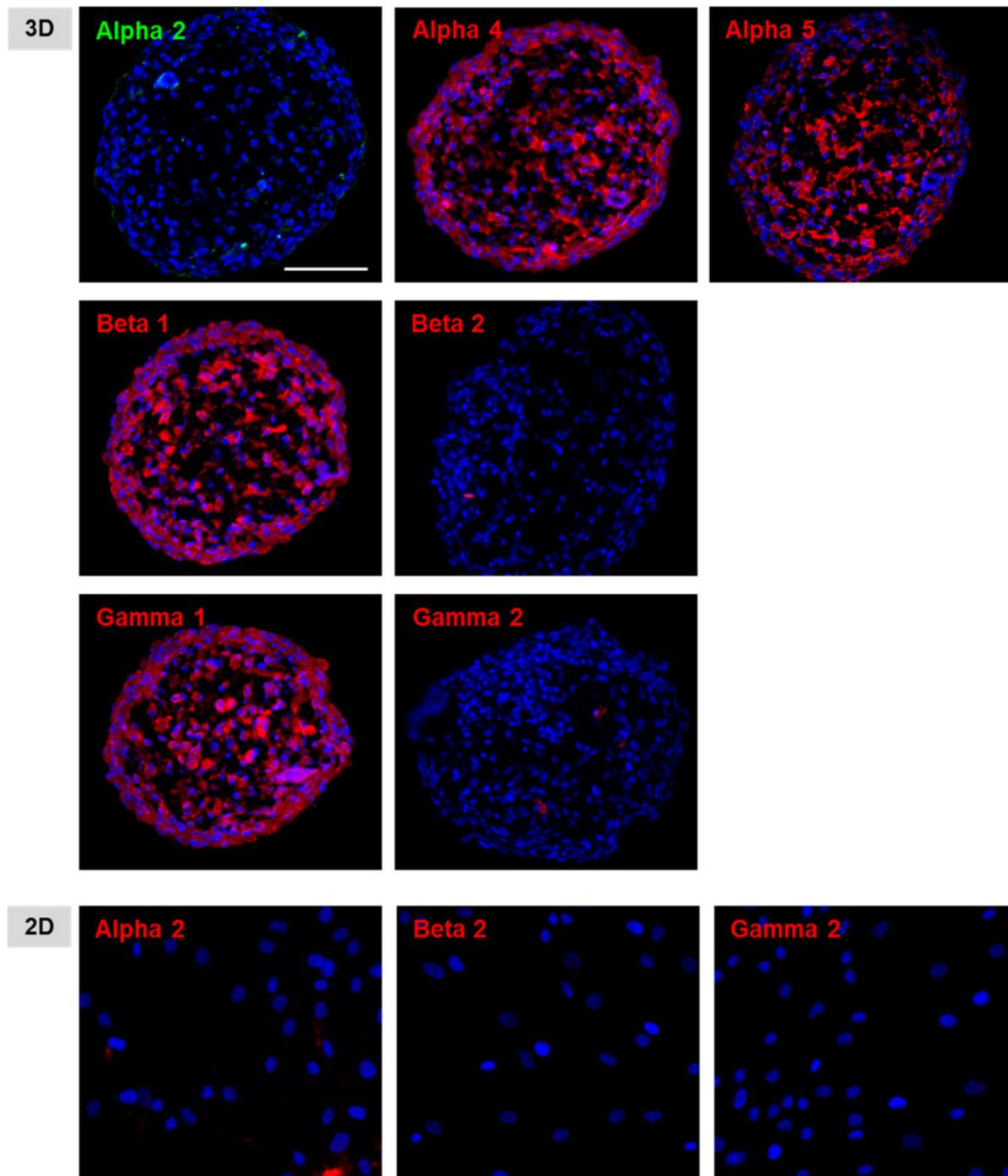
**Abbildung 3-45: HE-Färbung von Kryoschnitten der 3D Kokultur von MSCs und HSPCs.** Nach 4 Tagen entsprach die Morphologie hauptsächlich derjenigen von MSC-Sphäroiden mit einzelnen HSPCs (dunkle runde Zellen) außerhalb des Sphäroids (Balken). Zu einem späteren Zeitpunkt aggregierten deutlich mehr HSPCs um das Sphäroid und die scharfe Grenze zwischen dem MSC-Zellaggregat und HSPCs verschwand allmählich. Maßstabsbalken = 100 µm.

Um eine spezifische Identifizierung der beiden Zelltypen in der 3D Kokultur zu ermöglichen, wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen von Kryoschnitten mit Antikörpern gegen

CD90, ein charakteristisches MSC-Oberflächenprotein, oder CD45, ein panhämatopoetisches Markermolekül, durchgeführt. In der Anfangsphase der Kokultur war das gesamte Sphäroid durchgehend positiv für CD90 und zeigte eine schwammähnliche Struktur, umgeben von einem dichten Zellring, während für CD45 kein Signal detektiert werden konnte (Abbildung 3-46). Nach 6 Tagen war das CD90-Signal immer noch über den gesamten Sphäroidquerschnitt verteilt, wobei die Interzellularräume nicht mehr vorhanden waren, und die MSCs eine sehr dichte, kompakte Anordnung einnahmen. Zu diesem Zeitpunkt konnten einige wenige CD45-positive Zellen auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Bei der 2 Wochen alten Kokultur war dagegen die große Mehrheit der Zellen positiv für CD45 (Abbildung 3-46). Mit dem CD90-spezifischen Antikörper konnte in diesem Fall keine geordnete Struktur mehr angefärbt werden, was auf einen Zusammenbruch des MSC-Sphäroids hindeutete. Die auffällige Diskrepanz zwischen den Fluoreszenzfärbungen und den REM-Aufnahmen hinsichtlich der Menge der am Sphäroid haftenden HSPCs nach etwa einer Woche in Kultur (vgl. Abbildung 3-43, Tag 7 und Abbildung 3-46, Tag 6) war auf die unterschiedlichen Fixiermethoden für die jeweilige Analyse zurückzuführen. Die Karnovsky-Lösung für EM-Fixierungen enthielt zusätzlich Glutaraldehyd, das schwächere Zell-Zellinteraktionen in stärkerem Maße konservieren konnte als das für die Immunfluoreszenz verwendete Paraformaldehyd.



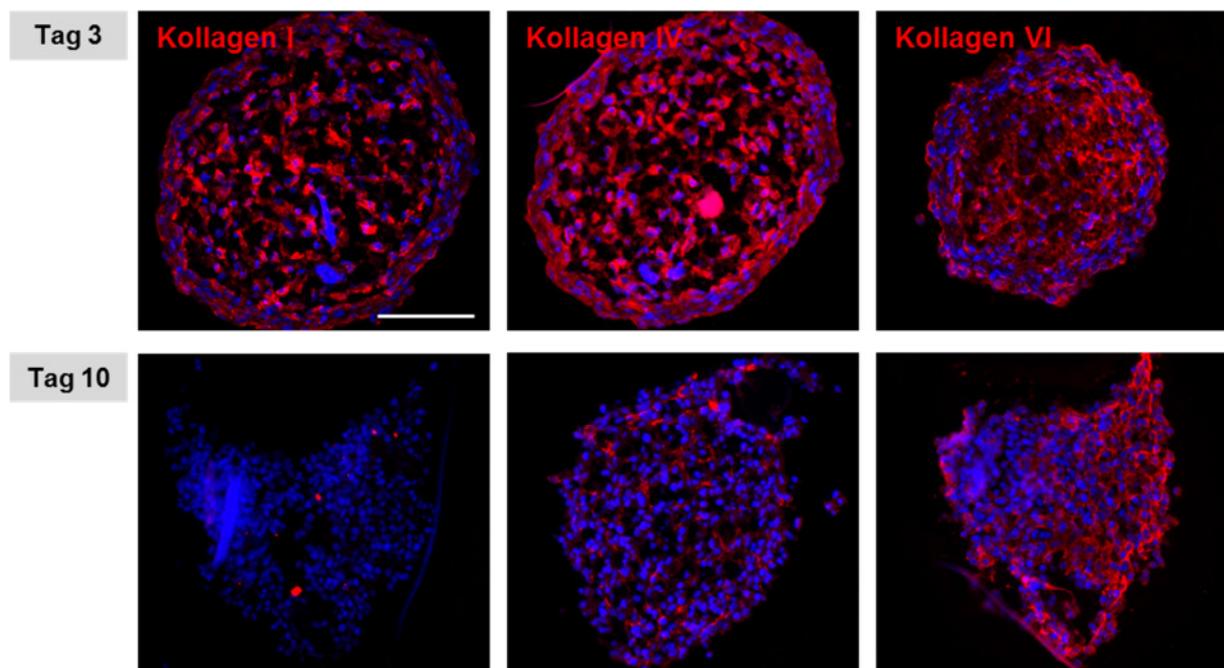
**Abbildung 3-46: Räumliche Verteilung der HSPCs und MSCs innerhalb der 3D Kokultur.** Kryoschnitte von unterschiedlichen Zeitpunkten der Kokultur wurden mit Antikörpern gegen den MSC-Marker CD90 oder den HSPC-Marker CD45 gefärbt. In der ersten Kulturwoche waren die Zellen fast ausschließlich CD90-positiv, nur einzelne CD45-positive Zellen wurden auf der Oberfläche lokalisiert. Nach 14 Tagen war die Mehrzahl der Zellen mit dem CD45-Antikörper angefärbt, während das CD90-Signal ein fleckenartiges Muster ergab. Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m.



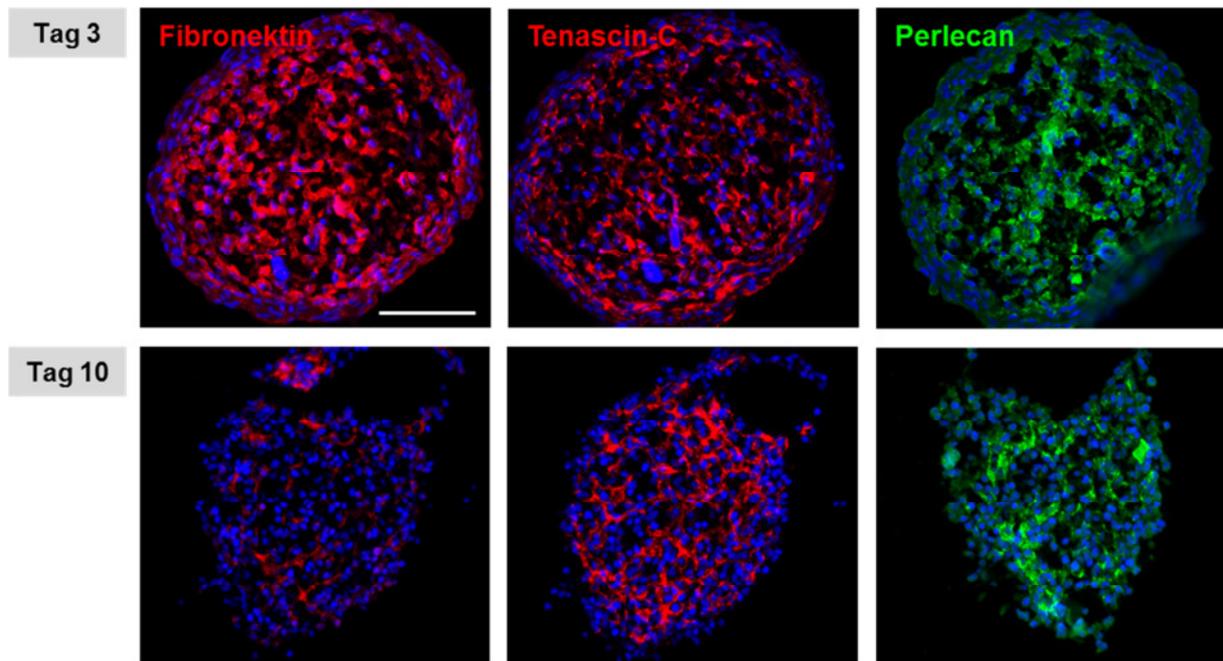
**Abbildung 3-47: Expression verschiedener Lamininisoformen in 3D Sphäroiden.** Kryoschnitte von 3 Tage alten Sphäroiden wurden mit Antikörpern gegen einzelne Lamininketten inkubiert. Die Immunfluoreszenzfärbung lieferte intensive Signale für die LM-Ketten  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  sowie  $\beta 1$  und  $\gamma 1$ . Die LM-Ketten  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  und  $\gamma 2$  konnten in MSCs weder unter 3D noch unter 2D Bedingungen nachgewiesen werden. Maßstabsbalken = 100  $\mu\text{m}$ .

Die Sphäroide in der 3D Kokultur wurden darüber hinaus auf die Expression unterschiedlicher, für die Knochenmarknische spezifischer Bestandteile der extrazellulären Matrix hin untersucht. Dabei stellen mehrere Lamininisoformen essentielle Komponenten des Knochen-

marks dar und haben vielfältige Funktionen bei der Regulation der Stammzellen. Durch indirekte Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern, die spezifisch nur einzelne Ketten der heterotrimeren Glykoproteine erkennen, konnten in Sphäroiden nach 3 Tagen in Kultur die LM-Ketten  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  und  $\gamma 1$  nachgewiesen werden (Abbildung 3-47). Für die LM-Ketten  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  und  $\gamma 2$  konnten keine Signale detektiert werden. Diese Lamininmoleküle wurden von MSCs, die unter herkömmlichen 2D Bedingungen als adhärenente Zellrasen kultiviert wurden, ebenfalls nicht exprimiert. Von diesen Färbungen ausgehend, kann auf eine Expression der Lamininisoformen LM-411 und LM-511 in der 3D Kultur geschlossen werden. Ferner wurde in der Anfangsphase der MSC-HSPC-Kokultur unter 3D Bedingungen die Expression der drei spezifischen Kollagentypen I, IV und VI gezeigt (Abbildung 3-48). Nach 10 Tagen in Kokultur, als die Mehrheit der Zellen als CD45-positive HSPCs identifiziert wurde und das zentrale MSC-Sphäroid sich bereits in der Auflösungsphase befand, konnte kein Kollagen Typ I mehr, jedoch intensive Signale für Kollagen Typ IV und VI detektiert werden. Weitere wichtige Komponenten der Nischenmatrix sind Fibronectin, Tenascin-C und Perlecan, die in 3 Tage alten Sphäroiden ebenfalls stark exprimiert wurden und nach 10 Tagen noch nachweisbar waren, mit der intensivsten Färbung für Tenascin-C (Abbildung 3-49).



**Abbildung 3-48: Nachweis verschiedener Kollagentypen in 3D Sphäroiden.** Kryoschnitte von 3 Tage alten Sphäroiden zeigten eine intensive Färbung nach der Inkubation mit Antikörpern gegen Kollagen Typ I, IV oder VI. Nach 10 Tagen in Kokultur war Typ I nicht mehr, Typ IV und VI jedoch deutlich nachweisbar. Maßstabsbalken = 100  $\mu\text{m}$ .



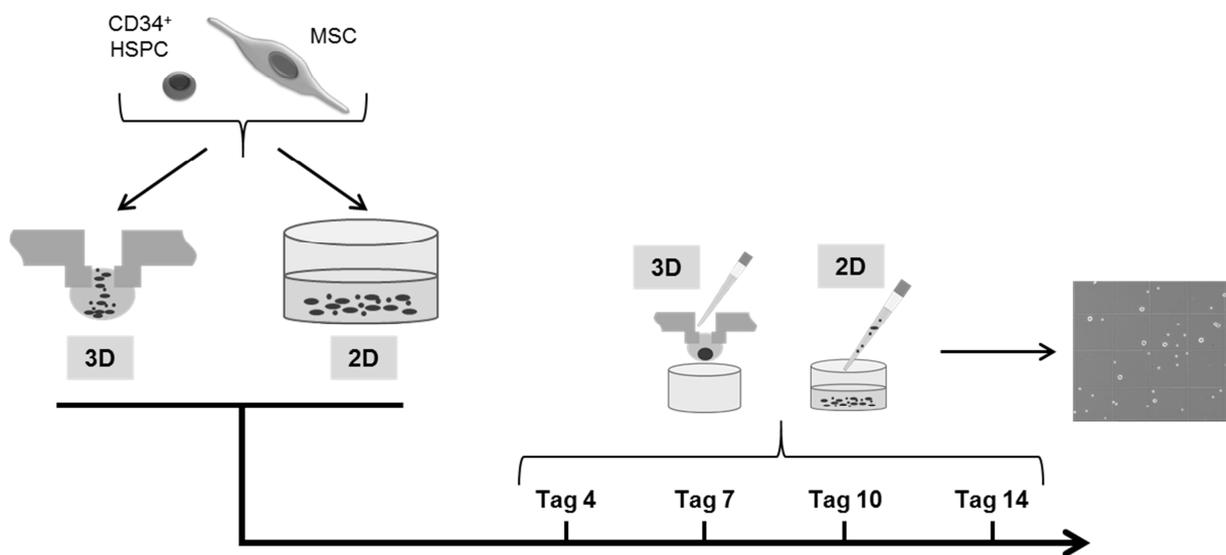
**Abbildung 3-49: Nachweis verschiedener ECM-Komponenten in 3D Sphäroiden.** Kryoschnitte von 3 Tage alten Sphäroiden waren in der Immunfluoreszenzfärbung stark positiv für Fibronectin, Tenascin-C und Perlecan. Das intensivste Signal konnte nach 10 Tagen in Kokultur für Tenascin-C gemessen werden. Maßstabsbalken = 100  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass bei der MSC-HSPC-Kokultur im 3D Hanging-Drop-Modell die MSCs in der Anfangsphase zu einem Sphäroid unter Ausschluss der hämatopoetischen Zellen aggregierten und eine Vielzahl an ECM-Bestandteilen exprimierten, die charakteristisch für die Stammzellnische sind. Mit fortschreitender Koinkubationsdauer und Proliferation nahm das adhäsive Potential der HSPCs zu, was schließlich zum Zusammenbruch des MSC-Sphäroids führte.

### 3.3.4 Expansion der HSPCs in 3D und Vergleich ihrer Qualität zur konventionellen 2D Kokultur mit MSCs

Das Hanging-Drop-Modell wurde mit dem Ziel,  $\text{CD34}^+$  HSPCs aus Nabelschnurblut in Kokultur mit MSCs aus dem Knochenmark auf rasche und effiziente Weise zu expandieren, entwickelt. Im Folgenden sollte die HSPC-Proliferation in diesem 3D Kultursystem quantitativ erfasst und mit der Wachstumsrate bei Inkubation der Zellen über einem MSC-Zellrasen in einer herkömmlichen 2D Kulturplatte vom gleichen Format verglichen werden. Abbildung 3-50 gibt einen schematischen Überblick über diese *in vitro*-Vergleichsstudie. Eine Mischung aus  $5 \times 10^3$  MSCs und  $5 \times 10^2$  HSPCs wurde in 40  $\mu\text{l}$  GMP-SFEM-Medium mit einem Volu-

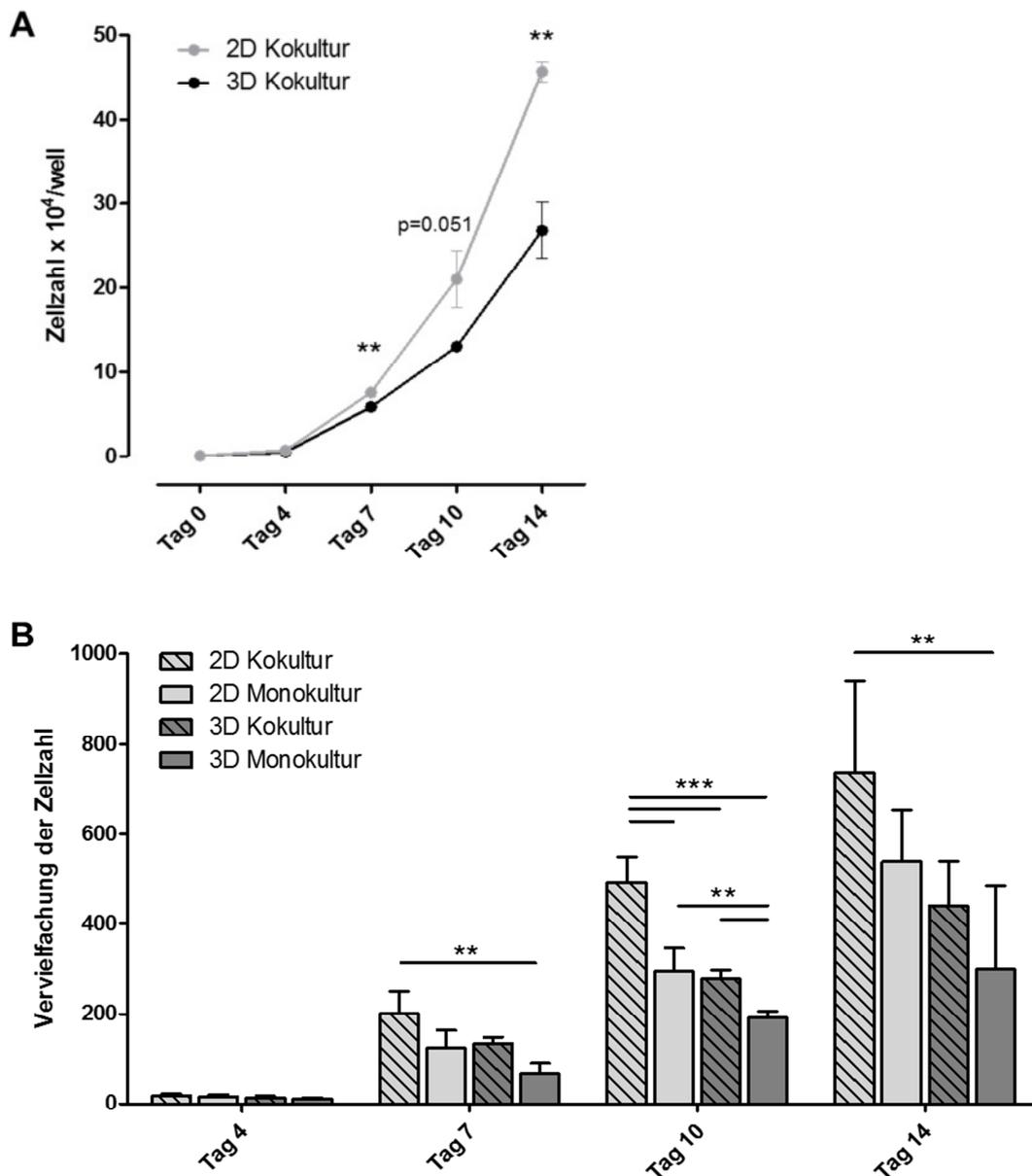
menverhältnis von 1:4 und Zytokinzusatz parallel in HDA-Platten oder konventionellen 96-Well-Zellkulturplatten mit flachem Boden ausgesät. Jeweils an Tag 4, 7, 10 und 14 der Kokultur wurden die Zellen geerntet und die Menge der expandierten HSPCs mit Hilfe der in Abbildung 3-39 beschriebenen Methode bestimmt. Dabei wurden die Zellen im 2D System durch Accutase-Behandlung abgelöst, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Da in den vorhergehenden Studien eine Einwanderung der HSPCs in das MSC-Sphäroid nicht detektiert werden konnte, war eine enzymatische Dissoziation des Sphäroids im 3D Modell nicht erforderlich, sodass HSPCs durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vollständig suspendiert werden konnten.



**Abbildung 3-50: Verlauf der *in vitro*-Studie zum Vergleich der HSPC-Proliferation unter 2D und 3D Kulturbedingungen.** Eine MSC:HSPC-Mischung mit dem Mengenverhältnis 10:1 wurde parallel in gleichen Volumina in HDA- oder 96-Well-Kulturplatten ausgesät. An Tag 4, 7, 10 und 14 der 2D und 3D Kokultur wurden die Zellen geerntet und die HSPC-Expansionsraten im jeweiligen System durch Zählen quantifiziert.

Die auf diese Weise gemessenen HSPC-Mengen pro Well waren bei Koinkubation der Zellen mit einem MSC-Zellrasen unter 2D Bedingungen bereits nach 7 Tagen signifikant erhöht gegenüber der Kokultur im Hanging-Drop-Modell, wobei der Unterschied mit fortschreitender Inkubationsdauer weiter wuchs (Abbildung 3-51, A). Wurde die HSPC-Proliferationsrate als Vervielfachung der zu Beginn der Kokultur ausgesäten Zellmengen dargestellt und zudem mit der Monokultur der hämatopoetischen Zellen im jeweiligen System verglichen, so waren auch hier die Werte der 2D Kokultur gegenüber allen übrigen Systemen am höchsten (Abbildung 3-51, B). Die Expansionsrate der HSPCs im 3D Kokulturmodell war zu allen untersuchten

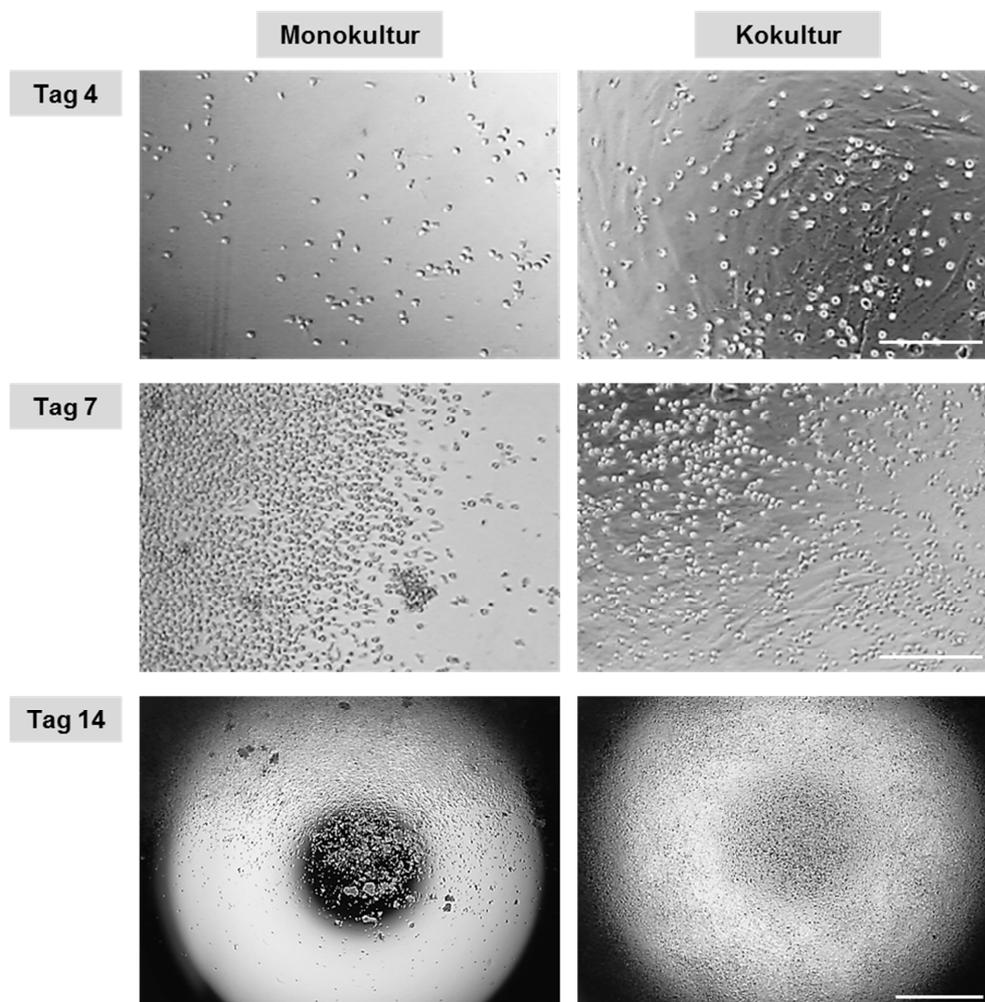
Zeitpunkten vergleichbar mit derjenigen in der 2D Monokultur. Für die Monokultur der HSPCs in den HDA-Platten wurde stets die niedrigste Proliferationsrate detektiert.



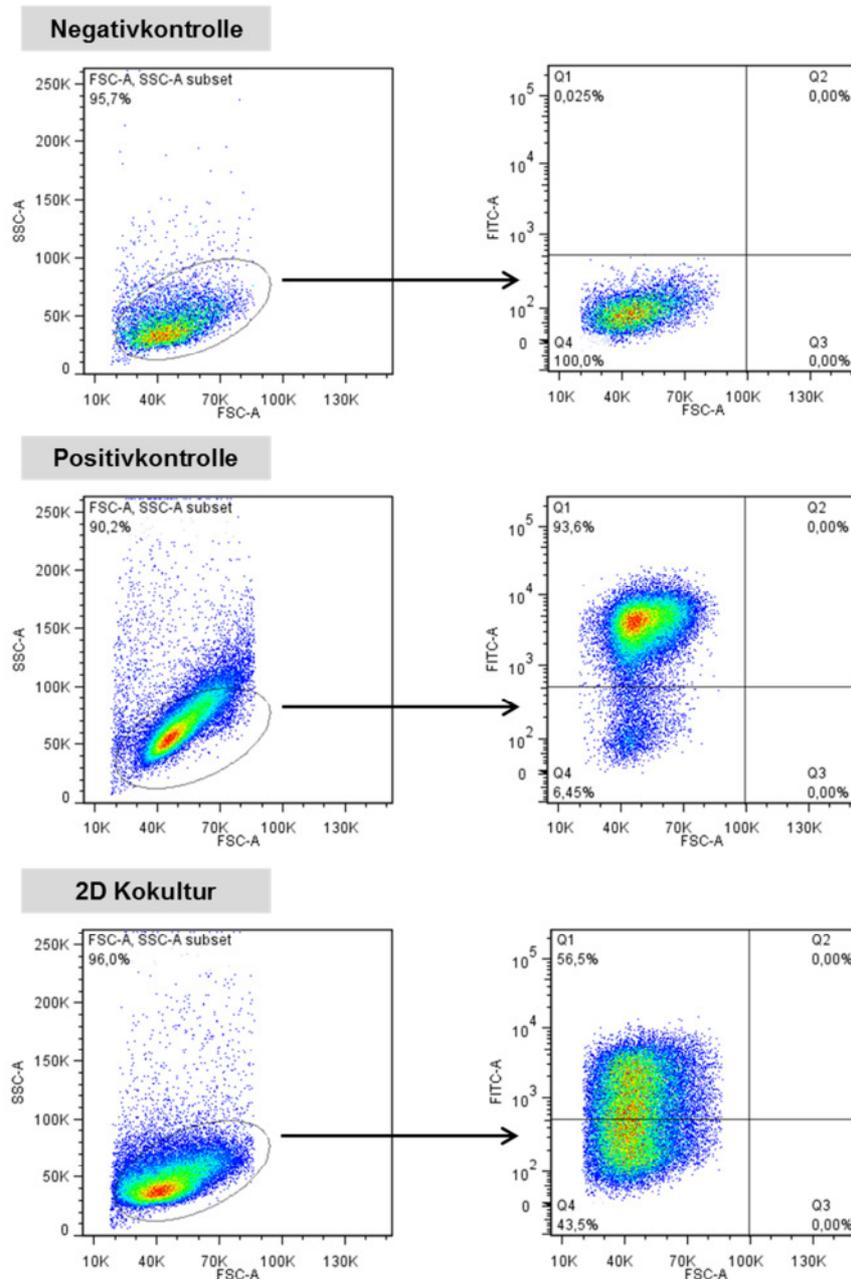
**Abbildung 3-51: HSPC-Expansionsraten in Kokultur mit MSCs unter 2D und 3D Bedingungen.**

Die HSPC-Konzentration im 2D Kokultursystem war bereits nach 7 Tagen signifikant höher im Vergleich zum 3D Modell (A). Die Vervielfachung der ursprünglich ausgesäten HSPC-Menge pro Well war in der 2D Kokultur ab diesem Zeitpunkt signifikant am höchsten (B). Die Werte der Hanging-Drop-Kokultur kamen über diejenigen der in 2D Monokultur expandierten HSPCs nicht hinaus. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD von N = 4 dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch einfaktorielle ANOVA mit  $p < 0.01$  (\*\*) und  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Bei allen für die Expansionsstudie untersuchten Spendern fiel zudem während der Inkubation unter 2D Bedingungen eine optische Besonderheit auf. Während HSPCs in der Monokultur mit zunehmender Inkubationszeit immer stärker zur Akkumulation in der einen Hälfte der Vertiefungen der 96-Well-Platten neigten, zeigten HSPCs, die zusammen mit einem MSC-Zellrasen kultiviert wurden, eine sehr homogene Verbreitung über die gesamte Fläche des Wells (Abbildung 3-52). Darüber hinaus konnten in der Mono-, jedoch nicht in der Kokultur, zu den späteren Zeitpunkten dunkle Zellaggregate, die möglicherweise aus einem Verlust des Stammzellcharakters und beginnender Differenzierung resultierten, beobachtet werden, was auf die wichtige Funktion der MSCs bei der HSPC-Erhaltung hindeutete (Abbildung 3-52, linke Spalte Tag 7 und Tag 14).



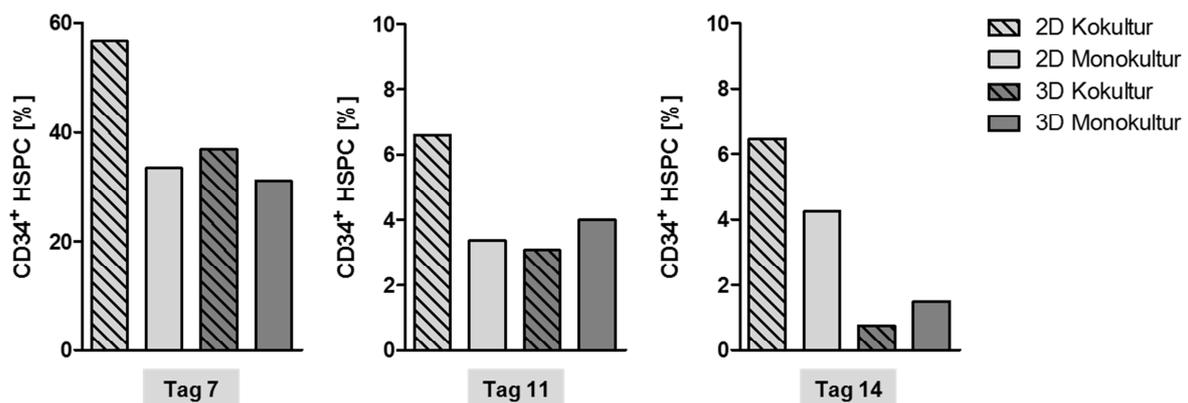
**Abbildung 3-52: Räumliche Verteilung der unter 2D Bedingungen kultivierten CD34<sup>+</sup> HSPCs.** Im Vergleich zur Akkumulation der proliferierenden HSPCs auf einer Seite des Wells in der Monokultur waren die über einem MSC-Zellrasen inkubierten HSPCs (helle runde Zellen) gleichmäßig über die gesamte Wachstumsfläche verteilt. Maßstabsbalken: oben und Mitte = 200  $\mu$ m, unten = 1 mm.



**Abbildung 3-53: Gatingstrategie für die FACS-Analyse von CD34<sup>+</sup> HSPCs.** Eine Suspension unbehandelter HSPCs wurde zum Einstellen der Messparameter zur Identifizierung der hämatopoetischen Zellen aus der Kokultur verwendet. Als Positivkontrolle für den CD34-Nachweis mit Hilfe eines FITC-gekoppelten Antikörpers diente die Leukämiezelllinie KG1a.

Im Anschluss an den Proliferationsvergleich der HSPCs unter verschiedenen Kulturbedingungen sollten die expandierten Zellen hinsichtlich ihrer Qualität untersucht werden. Die Expression des für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen charakteristischen Oberflächenproteins CD34 kann während der *in vitro*-Kultur infolge der Differenzierung zu reiferen Zellen der myeloischen oder lymphatischen Blutlinien stark abnehmen und eignet sich deshalb gut

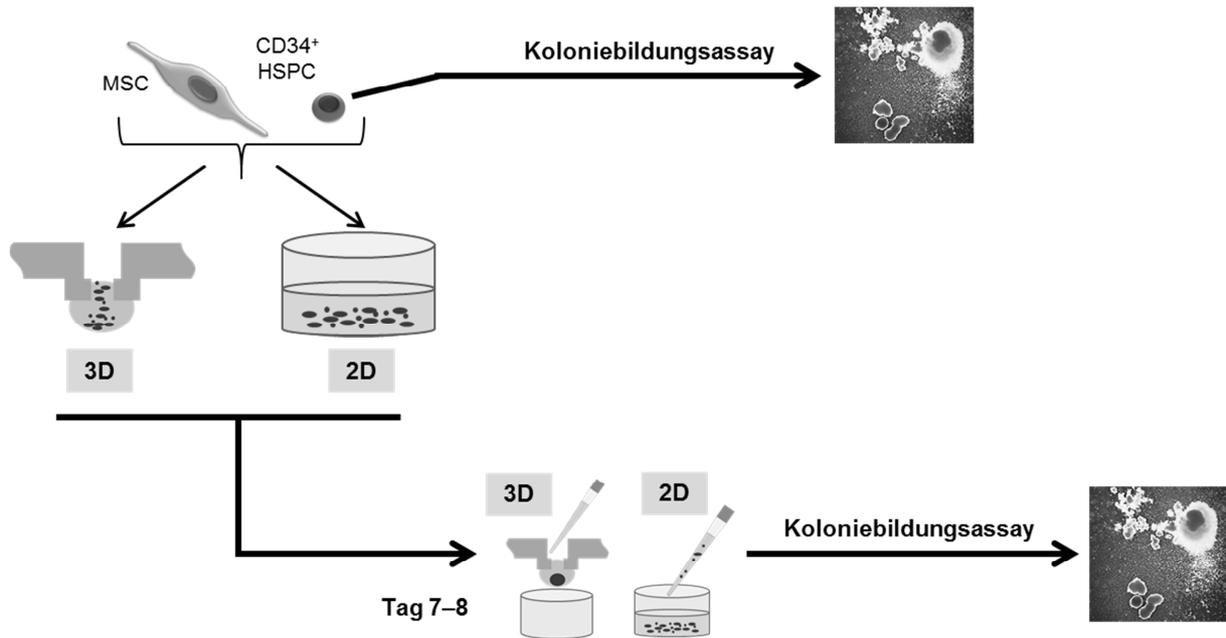
für einen qualitativen Vergleich der HSPCs. Mit Hilfe eines direkt mit FITC gekoppelten Antikörpers wurde der prozentuale Anteil der CD34-positiven Zellen innerhalb der expandierten hämatopoetischen Population in den 2D und 3D Kulturmodellen bestimmt (Abbildung 3-53). Bei den durchflusszytometrischen Messungen (FACS) wurde die Spezifität des Antikörpers durch Analyse der myeloblastischen Leukämiezelllinie KG1a, die *in vitro* routinemäßig als CD34 exprimierendes Surrogat für HSPCs herangezogen wird, überprüft (Positivkontrolle). Als der Prozentsatz der CD34<sup>+</sup> Zellen innerhalb der HSPC-Population an Tag 7, 11 und 14 verglichen wurde, war er für die in der 2D Kokultur vermehrten HSPCs stets am höchsten, nach 7 Tagen mit fast 60 % sogar beinahe doppelt so hoch wie für alle übrigen Systeme (Abbildung 3-54). Die Menge der CD34<sup>+</sup> HSPCs in der 3D Kokultur war vergleichbar mit den Werten der Monokultursysteme bzw. deutlich niedriger als in der 2D Monokultur an Tag 14.



**Abbildung 3-54: Expression des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34<sup>+</sup> in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen.** Der prozentuale Anteil der CD34 exprimierenden Zellen in der gesamten HSPC-Population war nach 7, 11 und 14 Tagen Expansion im 2D Kokultursystem deutlich höher als in den übrigen Inkubationsmodellen. Für die FACS-Analyse wurden drei Spender verglichen, wobei mehrere Replikate für eine ausreichend hohe Zellzahl vor der Messung gepoolt wurden.

Ferner sollte das *in vitro*-Differenzierungspotential der in 2D oder in 3D expandierten HSPCs verglichen werden. Wie in der schematischen Übersicht in Abbildung 3-55 dargestellt und bereits für die Proliferationsstudie beschrieben, wurden  $5 \times 10^3$  MSCs mit  $5 \times 10^2$  HSPCs in 40  $\mu$ l GMP-SFEM-Medium mit Zytokinzusatz parallel in HDA-Platten oder herkömmlichen 96-Well-Platten kultiviert. Nach 7–8 Tagen Inkubation unter 2D oder 3D Bedingungen wurden die HSPCs geerntet und  $1 \times 10^3$  Zellen pro Replikat zur Bestimmung der Menge der Kolonie-bildenden Einheiten im jeweiligen System für weitere 2 Wochen in halbfestem Methylzellulosemedium ausgesät. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die Proliferationsunterschiede

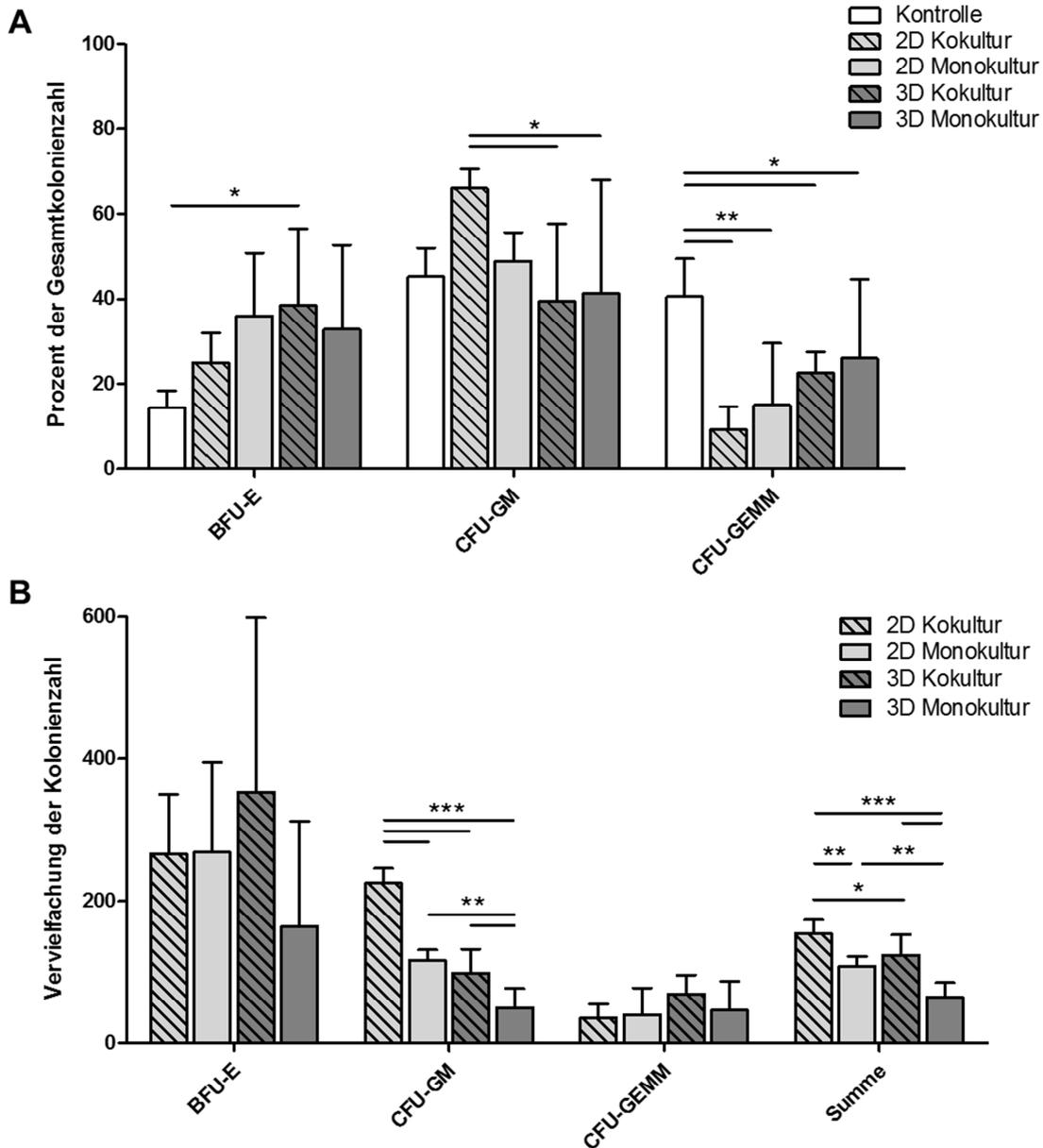
der HSPCs nach 7 Tagen bereits hoch signifikant waren (vgl. Abbildung 3-51). Um das Differenzierungsverhalten der expandierten Zellen zudem mit frisch isolierten, unbehandelten HSPCs vergleichen zu können, wurde darüber hinaus für jeden HSPC-Spender ein Koloniebildungsassay mit  $1 \times 10^3$  Zellen pro Replikat direkt nach der Aufreinigung aus Nabelschnurblut durchgeführt.



**Abbildung 3-55: Verlauf der *in vitro*-Studie zum Vergleich des Differenzierungspotentials der in 2D und 3D expandierten HSPCs.** Eine MSC:HSPC-Mischung mit dem Mengenverhältnis 10:1 wurde parallel in gleichen Volumina in HDA- oder 96-Well-Kulturplatten ausgesät. Nach etwa einer Woche in Kultur wurden die HSPCs aus dem jeweiligen System geerntet, einem Koloniebildungsassay unterzogen und hinsichtlich ihrer Differenzierung mit frisch isolierten HSPCs verglichen.

Nach dem Zählen der Kolonien, die aus erythroiden Vorläufern (BFU-E), aus Granulozyten-Makrophagen-Vorläufern (CFU-GM) oder aus den multipotenten Granulozyten-Erythrozyten-Makrophagen-Megakaryozyten-Vorläufern (CFU-GEMM) hervorgingen, wurde der prozentuale Anteil der Kolonientypen an der Gesamtkolonienzahl berechnet (Abbildung 3-56, A). Die BFU-E-Werte stiegen für alle expandierten Zellen verglichen mit frisch isolierten HSPCs an, während gleichzeitig der Anteil der CFU-GEMM nach der *in vitro*-Expansion unabhängig vom Modell stark zurückging. Signifikante Unterschiede zwischen den 2D und 3D Modellen konnten für diese Kolonientypen nicht detektiert werden. Der Anstieg der BFU-E ist im Einklang mit der ausgeprägten *ex vivo*-Proliferationsfähigkeit erythroider Vorläufer, die aus dem Nabelschnurblut stammen, im Vergleich zu Stammzellen aus alternativen Quellen (Giarratana et al., 2005). Des Weiteren stieg der Prozentsatz der CFU-GM nach der Proliferation im 2D

Kokulturmodell deutlich an und war zudem signifikant höher gegenüber den in 3D HDA-Platten expandierten HSPCs (Abbildung 3-56, A).



**Abbildung 3-56: HSPC-Differenzierungspotential nach der Expansion unter 2D oder 3D Bedingungen.** Im Vergleich zu frisch isolierten HSPCs war der prozentuale Anteil der BFU-E und CFU-GEMM an der Gesamtkolonienzahl für alle Expansionsmodelle größer bzw. kleiner, während der Prozentsatz der CFU-GM nach der 2D Kokultur signifikant gegenüber dem 3D Modell anstieg (A). Die Vervielfachung der Kolonienzahl im Vergleich zu nicht expandierten Zellen lieferte im Falle der 2D Kokultur signifikant höhere Werte für CFU-GM und die Koloniensumme gegenüber allen übrigen Inkubationsmodellen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD von  $N = 3$  dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch einfaktorielles ANOVA mit  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) und  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Zum näheren Vergleich wurden die Proliferationsfaktoren der HSPCs für die verschiedenen Kulturmodelle zu dem Zeitpunkt, als der Differenzierungsassay mit  $1 \times 10^3$  expandierten Zellen angesetzt wurde (vgl. Abbildung 3-51), mit der jeweiligen gezählten Kolonienmenge multipliziert. Diese Werte wurden als Vervielfachung der Kolonienzahlen, die aus  $1 \times 10^3$  frisch aufgereinigten HSPCs hervorgingen, dargestellt, um den genauen Einfluss der *in vitro*-Expansion auf die Differenzierungsfähigkeit der hämatopoetischen Zellen zu bestimmen (Abbildung 3-56, B). In diesem Fall war der Unterschied für CFU-GM zwischen der 2D Kokultur und den übrigen Modellen sogar noch deutlicher, während der Wert der 3D Kokultur nicht über denjenigen der 2D Monokultur hinauskam. Demgegenüber waren die BFU-E- und CFU-GEMM-Werte für die Kokultur in 3D Hanging-Drop-Platten erhöht, erreichten aber keine Signifikanz im Vergleich zur 2D Expansion. Schließlich war die Summe aller detektierten Kolonien nach der 2D Proliferation der HSPCs in Kokultur mit MSCs ebenfalls signifikant am höchsten (Abbildung 3-56, B).

In ihrer Gesamtheit zeigen die hier dargestellten Studien, dass die HSPC-Expansion bei Kultivierung der Zellen zusammen mit MSCs unter herkömmlichen 2D Bedingungen effizienter war als bei der Kokultur im 3D Hanging-Drop-Modell. Die in der 2D Kokultur expandierten hämatopoetischen Zellen waren zudem durch bessere qualitative Eigenschaften charakterisiert. Allgemein wurde darüber hinaus detektiert, dass die Inkubation zusammen mit MSCs der HSPC-Monokultur im gleichen System in jeder analysierten Hinsicht überlegen war.

## 4 Diskussion

Im klinischen Bereich ist G-CSF das derzeit am häufigsten verwendete Mittel zur Mobilisierung von ruhenden hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aus ihren Nischen im Knochenmark in den peripheren Blutkreislauf (Bonig and Papayannopoulou, 2013). Für die Transplantation werden die mobilisierten Zellen den Spendern mittels Leukapherese entnommen. Jedoch ist der durch G-CSF ausgelöste physiologische Effekt bei ungefähr 5 bis 40 % der gesunden Donoren und Patienten mit autologen Transplantationen stark vermindert, so dass sie nicht in der Lage sind, Stammzellen in für Transplantationszwecke ausreichenden Mengen zu mobilisieren (Alvarez et al., 2013). Aus diesem Grund ist es besonders wichtig, die genauen Vorgänge im Knochenmark und in der Stammzellnische bei der Mobilisierung durch G-CSF zu identifizieren. Es wurden bereits einige Substanzen synthetischen Ursprungs beschrieben wie CTCE-0021, VTP195183 oder ML141, die zusammen mit G-CSF eine synergistische Wirkung beim Mobilisierungsprozess auslösen (Chen et al., 2015; Herbert et al., 2007; Pelus et al., 2005). Ebenso sind weitere körpereigene Faktoren bekannt, die den Effekt von G-CSF verstärken können, darunter Adrenalin und der Hepatozytenwachstumsfaktor HGF (Chen et al., 2013; Jalili et al., 2010). Dennoch wird erst eine vollständige, detaillierte Aufschlüsselung der physiologischen und molekularen Vorgänge samt aller beteiligten Faktoren und Zelltypen es ermöglichen, die ehemals empirisch entdeckte Wirkung von G-CSF zu optimieren bzw. effektivere Mobilisierungsprotokolle zu etablieren.

Angesichts der bereits aufgedeckten Funktionen der Matrixmetalloproteinasen MMP-2, -8, -9 und -14 bei der Regulierung der HSPCs wurde in dieser Arbeit eine mögliche Beteiligung weiterer Mitglieder dieser Enzymgruppe am Mobilisierungsprozess evaluiert. Die Expression von MMP-7 und -13 sowie die Sekretion von MMP-3 und -11 durch Nischenzellen unter Normalbedingungen wurden nachgewiesen. In biochemischen Analysen konnte zum ersten Mal die Fähigkeit von MMP-7 zur Prozessierung des nischenspezifischen Chemokins SDF-1 $\alpha$  gezeigt werden. Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurde belegt, dass die Degradation von SDF-1 $\alpha$  durch MMP-7 und -13 identisch mit dem Verdau durch MMP-9 ist. Folglich könnten diese Proteasen die chemotaktische Aktivität von SDF-1 $\alpha$  gegenüber HSPCs in gleicher Weise hemmen wie MMP-9 (Steinl et al., 2013).

Ferner wurde die Beteiligung von Cystatinen am Nischengeschehen untersucht, da diese endogenen Inhibitoren als wichtige Gegenspieler der Cystein-Cathepsine für die Gewährleistung der proteolytischen Balance essentiell sind. Das ubiquitär exprimierte Cystatin C wurde in hohen Konzentrationen auch durch Zellen der Knochenmarknische ausgeschieden, wobei die

Sekretion durch MSCs nach direkter Stimulation mit dem mobilisierenden Agens G-CSF verringert wurde. Die infolge der Mobilisierung im Nischenmilieu hoch aktiven MMPs waren zur *in vitro*-Prozessierung von Cystatin C in der Lage, beeinflussten allerdings nicht dessen inhibitorische Aktivität gegenüber den an der HSPC-Regulierung beteiligten Cathepsinen B und L. Während eine Herunterregulierung der Cystatin C-Expression in MSCs ohne Effekt blieb, konnte die HSPC-Adhäsion an MSCs und ihr invasives Verhalten durch einen Überschuss des Inhibitors reduziert werden.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit ein 3D Modell zur Expansion von CD34<sup>+</sup> HSPCs aus Nabelschnurblut in Kokultur mit MSCs aus dem Knochenmark vorgestellt. Oft ist eine zu geringe Zellzahl, gerade bei Stammzellen aus dem Nabelschnurblut, der limitierende Faktor für eine erfolgreiche Transplantation. Daher ist das Bestreben, hoch effiziente Kulturmethode für eine *ex vivo*-Vermehrung der Spenderstammzellen zu etablieren, besonders groß und eine zunehmende Tendenz zu dreidimensionalen Inkubationsverfahren ist zu beobachten. Überraschenderweise und entgegen der allseits propagierten Überlegenheit der 3D Zellkultur war die hier beschriebene Hanging-Drop-Methode, die zur Sphäroidbildung führte, weniger effizient im Vergleich zur HSPC-MSK-Kokultur unter traditionellen 2D Bedingungen. Die über einem MSC-Zellrasen expandierten HSPCs waren denjenigen aus der Kokultur mit einem MSC-Sphäroid sowohl in Zahl als auch in Qualität überlegen.

#### **4.1 Mögliche Beteiligung weiterer Matrixmetalloproteinasen am proteolytischen Geschehen im Zuge der Stammzellmobilisierung**

Die durch Zytokine induzierte Mobilisierung von HSPCs ist aus evolutionsbiologischer Sicht ein hoch konservierter Prozess, so dass die Abläufe in der Maus und im Menschen relativ identisch sind und die Maus somit einen überaus geeigneten Modellorganismus für Mobilisierungsstudien darstellt (Broxmeyer et al., 2005). Die meisten der G-CSF-induzierten zellulären und molekularen Vorgänge wurden in der Tat in der Maus entdeckt und evaluiert (Ryan et al., 2010). Ein zentrales Ereignis dabei ist der Aufbau eines proteolytischen Milieus in der Stammzellnische des Knochenmarks mit hoch aktiven Proteasen, die zu den verschiedensten Klassen gehören (Greenbaum and Link, 2011; Lapidot and Petit, 2002). Gemeinsam ist jedoch allen die Fähigkeit zum Abbau und somit zur Inaktivierung diverser nischenspezifischer Rezeptoren, Zytokine, Chemokine sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix, wodurch den HSPCs der Austritt aus ihrer schützenden und aktivitätshemmenden Umgebung ins zirkulierende Blut ermöglicht wird.

Klare Hinweise für eine tragende Rolle bei der Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen aus ihren Nischen gibt es bisher für die sezernierten Gelatinasen MMP-2 und -9 und die neutrophile Kollagenase MMP-8 sowie für die membrangebundene MMP-14, wobei diese ihre Funktion hauptsächlich durch Inaktivierung des Retentionsfaktors SDF-1 $\alpha$  ausüben (McQuibban et al., 2001; Steinl et al., 2013). Durch proteolytische Spaltung am Aminoende wird die chemotaktische Wirkung des Moleküls gegenüber HSPCs erheblich beeinträchtigt und deren Auswanderung aus dem Knochen in den Blutkreislauf erleichtert. Darüber hinaus sind zahlreiche MMP-Gene bei verschiedenen humanen Krebsvarianten überexprimiert, wodurch es zu einem gesteigerten Um- und Abbau der extrazellulären Matrix sowie zur Freisetzung bioaktiver Moleküle und infolgedessen zu stärkeren migratorischen und invasiven Fähigkeiten der Krebszellen kommt (Hua et al., 2011; Kessenbrock et al., 2015). Im Vergleich zur Tumorgenese finden während der HSPC-Mobilisierung sehr ähnliche physiologische Prozesse statt, sodass eine Involvierung weiterer Mitglieder der MMP-Familie auch hier angenommen werden kann.

RT-PCR-Analysen in dieser Arbeit zeigten, dass MSCs und aus ihnen hervorgehende Osteoblasten, zwei wichtige zelluläre Komponenten der Knochenmarknische, außerdem die Gene für die sezernierten Proteasen MMP-1, -3, -7, -10, -11, -12 und -13 sowie für die membrangebundenen MMP-15, -16, -17, -24 und -25 transkribieren. Bei der anschließenden Fokussierung auf die sezernierten MMPs konnte eine Expression auf Proteinebene für das Matrilysin MMP-7 und die Kollagenase MMP-13 und darüber hinaus die Sekretion in den extrazellulären Bereich für die Stromelysine MMP-3 bei beiden Zelltypen sowie MMP-11 bei Osteoblasten nachgewiesen werden. Eine wichtige Rolle für MMP-11 in Osteoblasten wurde schon früher im Zuge der Metastasierung von Krebszellen ins Knochengewebe berichtet, wobei die Expression der Protease durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  gesteigert werden kann (Delany and Canalis, 2001). Dieses Enzym ist zudem eine der wenigen MMPs, die aufgrund einer Furin-Domäne auch durch intrazellulär lokalisierte Serinproteasen prozessiert und bereits in der aktiven Form ausgeschieden werden können (Pei and Weiss, 1995).

MMP-7, das durch Spaltung von Fibronectin, RANK-Ligand oder E-Cadherin an Prozessen wie Adipozytendifferenzierung, Osteoklastenaktivierung bzw. Zellinvasion teilnimmt (Nagase et al., 2006), wurde von MSCs und Osteoblasten auf Proteinebene hergestellt, jedoch nicht ins Medium abgegeben. Möglicherweise wird MMP-7 in größeren Mengen von den Zellen gespeichert und erst durch einen bestimmten Stimulus, der im Rahmen der induzierten Stammzellmobilisierung gegeben sein kann, in den extrazellulären Bereich ausgeschieden, wie es bei der strukturell verwandten MMP-26 der Fall ist (Nagase et al., 2006). Dies wäre

auch im Einklang mit der deutlichen Zytoplasmafärbung in den Immunfluoreszenzanalysen. Ein ähnliches Szenario wäre ausgehend von den starken Signalen in den Zelllysaten und fehlendem Nachweis für eine Sekretion auch bei MMP-13 denkbar, allerdings wurde hier ein der katalytischen Domäne des Enzyms entsprechendes Fragment detektiert, was gegen eine Speicherung, sondern vielmehr für eine mögliche intrazelluläre Aktivität in bestimmten Kompartimenten spricht. Beweise für eine proteolytische Aktivierung von MMP-13 im Zellinneren wurden bisher noch nicht geliefert. Die Aktivierung erfordert eine Prozessierung des Zymogens durch die sezernierten Proteasen MMP-2, -3, -9 oder durch die auf der Außenseite der Zelle gebundene MMP-14, kann auf der anderen Seite aber auch autokatalytisch erfolgen (Han et al., 2007; Leeman et al., 2002). MMP-13 wurde zum ersten Mal im Mammakarzinom identifiziert und scheint dort eine zentrale Rolle in der MMP-Aktivierungskaskade zu haben (Leeman et al., 2002).

Die Stromelysine MMP-3 und -10 führten zu deutlichen Signalen in den Genexpressionsanalysen, jedoch konnte eine Proteinsekretion durch Nischenzellen nur für MMP-3 bestätigt werden. Diese Protease ist bei Krebs stark überexprimiert und durch E-Cadherin-Degradation an der Zellinvasion beteiligt (Kessenbrock et al., 2015; Nagase et al., 2006). Sie zeigt mit mehreren Kollagentypen, Proteoglykanen, Lamininen und Fibronectin sowie mit einigen Chemokinen ein breites Substratspektrum (Hua et al., 2011). MMP-10 ist hoch aktiv beim hepatozellulären Karzinom durch einen Crosstalk mit der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Achse, welche bekanntlich eine Schlüsselstelle bei der HSPC-Mobilisierung im Knochenmark einnimmt (Garcia-Irigoyen et al., 2015). Deshalb sollte auch eine mögliche Funktion von MMP-10 in der Stammzellnische evaluiert werden, jedoch konnte das Protein weder in Osteoblasten noch in MSCs detektiert werden.

Die Proteinexpression der beiden Gelatinasen MMP-2 und -9 konnte auch für CD34<sup>+</sup> HSPCs aus humanem Nabelschnurblut gezeigt werden, nachdem aus einer früheren Arbeit bekannt war, dass die Gene für MMP-1, -2, -9 und -10 in diesen Zellen transkribiert werden (Essl, 2007). Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass ins periphere Blut mobilisierte HSPCs MMP-2 und -9 deutlich stärker exprimieren als ruhende Stammzellen im Knochenmark (Janowska-Wieczorek et al., 1999). Die Proteasen erleichtern durch ECM-Prozessierung den Durchtritt der Stammzellen durch das Endothelgewebe der Blutgefäße. HSPCs aus Nabelschnurblut durchlaufen ähnliche Prozesse bei ihrer Rekrutierung aus der fötalen Leber im letzten Schwangerschaftstrimester. Andererseits wurde keine MMP-Sekretion in den Western Blot-Analysen der Nabelschnurblut-HSPCs nachgewiesen. Dies ist vermutlich der Grund dafür, dass diese Zellen nach einer Transplantation eine deutlich

längere Rekonstitutionsphase als mobilisierte Stammzellen aus peripherem Blut haben. Allerdings kann die Sezernierung der aktiven MMP-2 und -9 durch *in vitro*-Stimulation der HSPCs mit SCF induziert werden, was wiederum ihre migratorischen Fähigkeiten erhöht (Janowska-Wieczorek et al., 1999; Zheng et al., 2003).

Die SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Wechselwirkung nimmt eine zentrale Position bei der Stammzellregulierung ein und zwar nicht nur im Rahmen der HSPC-Retention in ihrer Nische, sondern auch während ihrer Auswanderung ins zirkulierende Blut, Wiederbesiedlung des Knochenmarks nach der Transplantation sowie bei der Steuerung des Überlebens und der Proliferation der Stammzellen (Vagima et al., 2011). Folglich wurde die Fähigkeit der durch MSCs und Osteoblasten exprimierten MMPs zur proteolytischen Spaltung von SDF-1 $\alpha$  in *in vitro*-Inkubationsversuchen mit rekombinanten Proteinen untersucht. Hierbei wurde zum ersten Mal der Nachweis für die Proteolyse von SDF-1 $\alpha$  durch MMP-7 erbracht. Im Gegensatz zu früheren Studien durch McQuibban und Mitarbeiter, bei welchen im Vergleich zu MMP-1, -2, -3, -9, -13 und -14 für MMP-7 und -8 keine Prozessierung des Chemokins detektiert wurde (McQuibban et al., 2001), war MMP-7 in der Lage, die ersten vier Aminosäuren am N-Terminus von SDF-1 $\alpha$  proteolytisch zu entfernen. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen auch für die Kollagenase MMP-13 erhalten, was wiederum im Einklang mit den Untersuchungen von McQuibban und Mitarbeitern steht (McQuibban et al., 2001). Eine Degradation von SDF-1 $\alpha$  durch MMP-11, dessen katalytische Aktivität durch Spaltung von Casein belegt wurde, konnte hier nicht beobachtet werden. Diese Protease wird von Osteoblasten sezerniert, scheint aber ihre potentielle HSPC-regulierende Funktion folglich unabhängig von SDF-1 $\alpha$  auszuüben.

Eine Frage, die noch zu klären bleibt, ist die nach dem richtigen Mengenverhältnis von Enzym und Substrat bei den *in vitro*-Degradationsstudien mit MMPs und SDF-1 $\alpha$ . Üblicherweise liegt das Substrat unter *in vivo*-Bedingungen in deutlich höherer Konzentration gegenüber der Protease vor, sodass neben dem anfänglichen MMP-Chemokin-Massenverhältnis von 3:1 auch das Verhältnis 100:1 getestet wurde. Während die Ergebnisse aus den Silberfärbungen immer noch auf eine vollständige Konvertierung von SDF-1 $\alpha$  in die um vier Aminosäuren verkürzte Form nach 24 h Inkubation mit MMP-7 oder -13 hindeuteten, erkennbar an der Verschiebung der entsprechenden Banden in den niedermolekularen Bereich, war in den MALDI-TOF-Massenspektren mit dem 100:1-Verhältnis immer noch ein der intakten Form entsprechender Peak zu detektieren. Also kann man hier annehmen, dass die umfangreiche Inaktivierung des Chemokins im Knochenmark, die schlussendlich zur HSPC-Rekrutierung führt, sehr wahrscheinlich aus der Summe sämtlicher in der Nische exprimierter MMPs zu-

sätzlich zu anderen Proteasentypen wie Carboxypeptidase M, Cathepsin G, Cathepsin X und neutrophile Elastase resultiert (Levesque et al., 2002; Marquez-Curtis et al., 2008; Staudt et al., 2010).

MMP-7 und -13 entfernten die vier Aminosäuren Lysin, Prolin, Valin und Serin am N-Terminus von SDF-1 $\alpha$ , das von MMP-9 auf die gleiche Weise prozessiert wird (Steinl et al., 2013). Die ersten acht aminoterminalen Reste sind für die Bindung an CXCR4 und somit für die chemotaktische Wirkung des Retentionsfaktors erforderlich (Janowski, 2009). Folglich ist eine verminderte chemotaktische Aktivität bei der durch MMP-7 und -13 prozessierten Form von SDF-1 $\alpha$  sehr wahrscheinlich. Dies wäre im Einklang mit der deutlich reduzierten *in vitro*-Migration von CD34<sup>+</sup> HSPCs in Richtung des Chemokins, nachdem dieses durch MMP-9 proteolytisch verdaut wurde (Steinl et al., 2013). Ein möglicher ähnlicher Effekt für MMP-7 und -13 muss in zukünftigen funktionellen Studien mit Stammzellen überprüft werden.

Eine derartige physiologische Funktion in der Nische setzt die Sekretion von MMP-7 und -13 voraus, um das ebenfalls sezernierte SDF-1 $\alpha$  inaktivieren zu können. Allerdings konnte hier trotz der Expression beider Proteasen in MSCs und Osteoblasten eine Ausscheidung in den Extrazellulärraum unter normalen Bedingungen nicht gezeigt werden. Demnach sollte in weiterführenden Experimenten die Möglichkeit der induzierten Sekretion von MMP-7 und -13 infolge einer Behandlung mit HSPC-mobilisierenden Faktoren wie G-CSF, PTH oder Interleukin-8 analysiert werden. Der Nachweis der Sekretion aktiver Matrixmetalloproteinasen kann *in vitro* durch Gelatine- oder Casein-Zymogramme erfolgen, da die beiden Substrate von mehreren MMPs gespalten werden. In Anbetracht des breiten Substratspektrums vieler MMPs bleibt außerdem zu klären, welche zusätzlichen Beiträge diese Proteasen sowie die durch Nischenzellen ebenfalls exprimierten MMP-3 und -11 zur HSPC-Regulation und möglicherweise -Mobilisierung leisten könnten. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die nischenspezifischen ECM-Bestandteile gelegt werden, da MMPs vor allem für ihre Matrixmodellierenden Eigenschaften bekannt sind (Nagase et al., 2006; Page-McCaw et al., 2007).

Die Diskrepanz in der Literatur zur Bedeutung von MMP-9 bei der HSPC-Rekrutierung aus dem Knochenmark deutete die Beteiligung weiterer MMPs am Mobilisierungsprozess an (Heissig et al., 2002; Pruijt et al., 1999). Dies lässt die Vermutung zu, dass einzelne MMPs zwar eine wichtige Funktion haben, diese durch andere Mitglieder der Familie jedoch kompensiert werden könnte, insbesondere im Hinblick auf die überlappende Substratspezifität nicht nur zwischen MMPs einer Untergruppe, sondern auch zwischen den Gruppen. Außerdem ist die Interaktion und gegenseitige Regulierung der MMPs durch proteolytische Aktivierung der zymogenen Formen maßgebend (Leeman et al., 2002; Zitka et al., 2010). Demnach

mag die Aktivität einzelner MMPs vielleicht entbehrlich, die kombinierte Aktivität mehrerer MMP-Mitglieder jedoch für die Schnelligkeit und Effizienz der Stammzellmobilisierung bei diesem überaus komplexen Prozess bestimmend sein.

#### **4.2 Ubiquitär exprimiertes Cystatin C und seine Funktion in der Stammzellnische des humanen Knochenmarks**

Eine zweite Gruppe von Proteasen, die im Knochenmark vielfältige Aufgaben übernehmen, wird durch die Cathepsine gebildet. Für Cathepsine vom Aspartase-Typ wurde kürzlich eine völlig neue Funktion bei der Stammzellmobilisierung in die Peripherie beschrieben. Aus dem humanen Serumalbumin wird unter sauren pH-Bedingungen durch Cathepsin D und E das aus 16 Aminosäuren bestehende Peptid EPI-X4 generiert, das als endogener CXCR4-Antagonist fungieren kann (Zirafi et al., 2015). EPI-X4 hemmte *in vitro* die durch SDF-1 $\alpha$  induzierte Migration von hämatopoetischen Stammzellen und führte *in vivo* innerhalb kurzer Zeit zu einer effektiven Mobilisierung von HSCs und neutrophilen Granulozyten. Somit ist dieses Peptid ein vielversprechender Kandidat für die klinische Applikation, da es im Gegensatz zu dem bisher einzigen zugelassenen CXCR4-Antagonisten AMD3100 keine nachweisbaren immunogenen oder zytotoxischen Nebenwirkungen aufweist (Devine et al., 2008; Zirafi et al., 2015).

Der Beitrag der Cystein-Cathepsine zur HSPC-Regulierung ist dagegen schon länger bekannt. Diese Proteasen kommen in vielen lebenden Organismen vor und sind essentieller Bestandteil verschiedener biologischer und pathologischer Prozesse, darunter Proteinkatabolismus, Antigenprozessierung, Entzündung, Dystrophie und Metastasierung (Bode and Huber, 2000; Calkins and Sloane, 1995; Turk et al., 2001). Daher ist eine genaue zeitliche und räumliche Kontrolle ihrer enzymatischen Aktivität von kardinaler Bedeutung. Diese regulatorische Funktion wird durch ihre endogenen Peptidinhibitoren, die Cystatine, gewährleistet. Aus diesem Grund und angesichts der vor Kurzem entdeckten Eigenschaft des endogenen MMP-Inhibitors TIMP-3 zur Steuerung der HSPC-Proliferation und -Mobilisierung sollten mögliche Beiträge der Cystatine zu den regulatorischen Prozessen in der Nische untersucht werden (Nakajima et al., 2010; Shen et al., 2010).

#### 4.2.1 Cystatin C wird in hohen Konzentrationen von Nischenzellen ausgeschieden

Es gibt bereits zahlreiche Studien zur Funktion von Cystatinen in Zellen der hämatopoetischen Linie, wie zum Beispiel bei der Osteoklastogenese aus Makrophagen oder durch Cathepsinhemmung während der Reifung dendritischer Zellen, wobei diese Vorgänge überwiegend in intrazellulären Kompartimenten stattfinden (Magister and Kos, 2013; Stralberg et al., 2013). Demgegenüber liegen über eine mögliche Bedeutung der Cystatine bei der Stammzellmobilisierung derzeit noch keine Daten vor. In RT-PCR-Analysen konnte die Transkription der Gene für Cystatin B und C in allen untersuchten Zelltypen des Knochenmarks nachgewiesen werden. Zusätzlich exprimierten MSCs und Osteoblasten das Cystatin E-Gen. In anschließenden Western Blot-Analysen wurde das Cystatin B-Protein nur im Zellinneren, für Cystatin C hingegen auch eine Sekretion in hohen Mengen in den Extrazellulärraum detektiert. Ein Nachweis von Cystatin E auf Proteinebene war in den Nischenzellen jedoch nicht möglich.

In Immunfluoreszenzfärbungen von MSCs und Osteoblasten konnte für Cystatin C ein für sekretorische Proteine typisches Signalmuster mit besonders intensiver Färbung in der Kernperipherie, also im Bereich des endoplasmatischen Retikulums, beobachtet werden. Für Cystatin B wurden hingegen auffällige Signale im Zellkern detektiert. Aufgrund seiner Lokalisierung im Kern kann Cystatin B die Aktivität der dort wirkenden Cathepsine hemmen und somit die Prozessierung von Transkriptionsfaktoren und anderen Kernproteinen verhindern (Ceru et al., 2010). Auf diese Weise wäre ein intrinsischer Beitrag zur HSPC-Regulierung möglich. Obwohl Osteoblasten und MSCs das Protein exprimieren, wird es von den Nischenzellen nicht ausgeschieden und kann folglich auch nicht in die HSPC-Kerne gelangen. Folglich müsste der Inhibitor von den Stammzellen selbst synthetisiert werden. Die Transkription des Cystatin B-Gens wurde in CD34<sup>+</sup> HSPCs durch RT-PCR-Analysen nachgewiesen.

Aufgrund der fehlenden Sekretion von Cystatin B, das eher für seine Aufgaben im intrazellulären Bereich bekannt ist (Ceru et al., 2010; Vray et al., 2002), und angesichts der Aktivität der Cathepsine im extrazellulären Bereich der Knochenmarknische bestand der Fokus bei den darauffolgenden Studien auf dem sezernierten Cystatin C. Latexin ist der bisher einzige bekannte endogene Inhibitor der Carboxypeptidase A in Säugetieren und gewann kürzlich stark an Interesse aufgrund seiner Beteiligung an der Homöostase hämatopoetischer Stammzellen und potentieller Tumorsuppressoreigenschaften (Liu et al., 2012; Mitsunaga et al., 2012). Latexin reguliert die HSC-Zahl im murinen Knochenmark durch Hemmung der zellulären Selbsterneuerung, wobei dieser Effekt unabhängig von seiner Protease-hemmenden Aktivität

ist und eher durch Wechselwirkung mit Faktoren, die für den Verbleib der Stammzellen in ihrer Nische sorgen, vermittelt wird (Mitsunaga et al., 2012). Da Cystatin C eine hohe Strukturhomologie zu diesem Molekül aufweist und von sämtlichen analysierten Knochenmarkzelltypen exprimiert wurde, schien eine Evaluierung der Funktion des Cathepsin-Hemmers von besonderem Interesse zu sein.

Da Cystatin C, wie in Western Blot-Experimenten gezeigt wurde, konstitutiv in Knochenmarkzellen exprimiert wird, sollte im nächsten Schritt die Wirkung HSPC mobilisierender Faktoren auf die Sekretion bestimmt werden. Das systemisch wirkende Zytokin G-CSF führte im Knochenmark der Maus zu einer auffällig herunterregulierten Expression des MMP-Inhibitors TIMP-3 sowie in einer anderen Studie zur deutlich verringerten Konzentration der endogenen Serinproteasenhemmer Serpina1 und Serpina3 (Shen et al., 2010; Winkler et al., 2005). Während des Mobilisierungsprozesses kann G-CSF neben seiner durch das sympathische Nervensystem vermittelten Wirkung auch direkten Einfluss auf MSCs, die nachweislich den Rezeptor für G-CSF exprimieren, nehmen (Ponte et al., 2012). Die Cystatin C-Konzentration in MSC-Überständen war nach der Behandlung der Zellen mit G-CSF signifikant verringert, jedoch viel der Unterschied mit ungefähr 20 % im Vergleich zu den unbehandelten MSCs nicht sehr hoch aus. Somit war es fraglich, ob die Abnahme aus einer reduzierten Genexpression resultierte oder ob die Cystatin C-Menge nach der Ausscheidung durch extrazelluläre Modifikation reguliert werden könnte. Da MSCs nach G-CSF-Stimulation *in vitro* eine erhöhte Aktivität von MMP-2 zeigen, wurde diese Hypothese folglich durch Inkubation von Cystatin C mit Matrixmetalloproteinasen, die in der Knochenmarknische aktiv sind, überprüft (Ponte et al., 2012).

Im Gegensatz zu den MSCs wird der G-CSF-Rezeptor durch Osteoblasten nicht exprimiert (Lee-Thedieck et al., 2012). Daher wurden diese Knochenmarkzellen mit Hilfe des sympathomimetischen Amins Clenbuterol, das an die durch Osteoblasten exprimierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren bindet und auf diese Weise eine den SNS-Neutransmittern identische Wirkung auslöst, stimuliert (Elefteriou et al., 2005; Katayama et al., 2006). Mit einer Konzentration von 10  $\mu$ M konnte durch Clenbuterol bei Osteoblasten *in vitro* eine spezifische und reproduzierbare Zellabflachung und -versteifung hervorgerufen werden (Lee-Thedieck et al., 2012). Eine Veränderung in der Cystatin C-Sekretion im Überstand war nach der Clenbuterol-Stimulation bei den Osteoblasten allerdings nicht zu verzeichnen, wie die Konzentrationsbestimmung des Inhibitors mit Hilfe eines spezifischen ELISA ergab. Als mögliche Erklärung für einen fehlenden Effekt wäre eine zeitlich versetzte Reaktion auf Ebene der Cystatine denkbar. Die HSPC-Mobilisierung ist anfänglich durch einen extremen Anstieg der proteoly-

tischen Aktivität in der Nische charakterisiert, wobei es einer gewissen Wirkdauer der Proteasen bedarf, damit ausreichend Zellen mobilisiert werden können. Erst danach wäre eine Hochregulierung der Proteaseninhibitoren zu erwarten, um die Enzymaktivität wieder auf das normale Niveau zu reduzieren und die Homöostase herzustellen. Andererseits könnte die Aktivität der Inhibitoren in der Anfangsphase im Gegensatz zur erhöhten Proteasenaktivität abnehmen, ob infolge reduzierter Expression oder extrazellulärer Degradation, sodass die proteolytische Mikroumgebung zusätzlich verstärkt würde. Diese Möglichkeit wird eher durch die hier beobachtete verringerte Cystatin C-Ausscheidung durch MSCs nach G-CSF-Stimulation gestützt.

PTH, das Hormon der Nebenschilddrüsen, ist ebenfalls in die Stammzellmobilisierung involviert. Frühere Studien deuteten auf eine Vermittlung des PTH-Effekts hauptsächlich durch seine Osteoblasten-stimulierende Wirkung hin, denn eine *in vivo*-Verabreichung des Peptidhormons führte zu einer erhöhten Osteoblastenexpansion und Verdopplung des HSC-Pools (Adams et al., 2007; Calvi et al., 2003). Neuere Untersuchungen zeigen zudem einen direkten Einfluss von PTH auf Nestin<sup>+</sup> MSCs im murinen Knochenmark, was sich in einer Verdopplung der MSC-Population und ihrer gesteigerten osteogenen Differenzierung äußerte (Mendez-Ferrer et al., 2010). Da beide Zelltypen den PTH-Rezeptor exprimieren, wären Untersuchungen zur Cystatin C-Expression nach direkter Behandlung der Zellen mit diesem mobilisierenden Faktor ebenfalls interessant.

#### **4.2.2 Inhibitorisches Potential von Cystatin C wird von nischenspezifischen MMPs kaum beeinflusst**

Ausgehend von den *in vivo*-Konzentrationsverhältnissen zwischen Cystatin C und MMPs kann durchaus eine erhöhte Proteolyse des Inhibitors in der Nische angenommen werden. Für Cystatin C wurden Serumkonzentrationen unter Normalbedingungen von 0.3–1 µg/ml berichtet (Kos et al., 1997; Tumminello et al., 2009). Die Konzentration von MMP-8 und -9 im Blut gesunder Probanden stieg nach 7 d G-CSF-Behandlung auf bis zu 4 µg/ml (Steinl et al., 2013). Biochemische *in vitro*-Studien bestätigten die Fähigkeit der nischenspezifischen Proteasen MMP-2, -8 und -9 zur Degradation von Cystatin C. Eine MALDI-TOF-Analyse ergab, dass alle drei Enzyme das Molekül im N-terminalen Bereich durch Abspaltung eines 8 Aminosäuren langen Peptids prozessierten. Wurde für den *in vitro*-Verdau die Enzym-zu-Substrat-Menge so gewählt, dass sie mehr dem oben beschriebenen physiologischen Konzentrationsverhältnis entsprach, so konnte sogar eine vollständige Konvertierung von Cystatin C in die

verkürzte Form erreicht werden. Für die im Knochenmark ebenfalls stark aktive MMP-14 konnte eine proteolytische Aktivität gegenüber diesem Cathepsin-Inhibitor jedoch nicht beobachtet werden.

Folgerichtig stellte sich die Frage, ob die durch MMPs vermittelte N-terminale Prozessierung von Cystatin C dessen inhibitorische Eigenschaften gegenüber den Cathepsinen beeinträchtigt, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass das Aminoende zusammen mit zwei  $\beta$ -Haarnadelschleifen für die Hemmfunktion essentiell sind (Bode and Huber, 2000). Die von Osteoblasten sezernierten Cathepsine B, K, L und X sind hoch aktiv im extrazellulären Bereich und in der Lage, den Stammzellretentionsfaktor SDF-1 $\alpha$  proteolytisch zu verdauen (Staudt et al., 2012). Dabei wird durch Cathepsin B, K und L ähnlich wie durch MMPs ein den vier N-terminalen Aminosäuren entsprechendes Peptidfragment entfernt, anders als beim Verdau durch MMPs tauchen allerdings nach längerer Inkubationszeit sowie bei der Prozessierung durch Cathepsin X zusätzliche Degradationsprodukte auf. Die chemotaktische Aktivität von SDF-1 $\alpha$  gegenüber HSPCs war nach der Degradation durch Cathepsin B und L stark beeinträchtigt, wodurch diese Proteasen eine wichtige Rolle bei der Stammzellregulierung und möglicherweise bei der Mobilisierung erhalten (Staudt et al., 2012). Demnach sollte die inhibitorische Fähigkeit der infolge einer Spaltung durch MMPs entstandenen verkürzten Cystatin C-Form gegenüber den Cystein-Cathepsinen B und L getestet werden.

Unter Verwendung von Peptidsubstraten, die nach der spezifischen Spaltung durch Cathepsin B oder L fluoreszierendes Licht emittieren, wurde die Aktivität der rekombinanten Enzyme gemessen, wobei beide Proteasen durch Cystatin C-Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich vollständig gehemmt werden konnten. Wurde der Inhibitor zuvor mit MMP-2, -8 oder -9 inkubiert, so hatte dies im Fall von Cathepsin B nur einen sehr geringfügigen negativen und im Fall von Cathepsin L gar keinen Effekt auf die hemmende Fähigkeit von Cystatin C. Folglich scheint die Prozessierung durch die Matrixmetalloproteinasen das inhibitorische Potential von Cystatin C nicht zu beeinflussen.

Humanes Cystatin C kann die Cystein-Cathepsine B, H, K, L und S reversibel hemmen (Abrahamson, 1994). Studien zum Verhältnis von Struktur und Aktivität des Inhibitors ergaben, dass eine Spaltung zwischen Gly<sup>11</sup> und Gly<sup>12</sup> die Affinität von Cystatin C für Papain, das den Cystein-Cathepsinen sehr ähnlich ist und ebenfalls von dieser Inhibitorgruppe gehemmt werden kann, um drei Zehnerpotenzen reduziert (Grzonka et al., 2001). Bei genaueren Analysen stellte sich heraus, dass die Aminosäuren Arg<sup>8</sup>, Leu<sup>9</sup>, Val<sup>10</sup> und Gly<sup>11</sup> für die Enzymbindung und somit für die inhibitorische Aktivität essentiell sind. Dabei übernimmt die Seitenkette von Val<sup>10</sup> die Hauptfunktion beim Affinitätsaufbau des aminoterminalen Fragments von

Cystatin C gegenüber Cathepsinen allgemein, während die Aminosäure Leu<sup>9</sup> über die selektive Bindung und Unterschiede zwischen Cathepsin B, H, L und S entscheidet (Hall et al., 1995). Wird Gly<sup>11</sup> gegen eine beliebige andere Aminosäure ausgetauscht, so führt das zu einer drastischen Abnahme des inhibitorischen Potentials, was die Schlussfolgerung zulässt, dass diese Aminosäure eine Gelenkfunktion zwischen dem flexiblen aminoterminalen Segment und dem Rest des Cystatin C-Peptids übernehmen könnte (Grzonka et al., 2001).

Die nischenspezifischen Matrixmetalloproteinasen MMP-2, -8 und -9 entfernten die Aminosäuren Ser<sup>1</sup> bis Arg<sup>8</sup> am N-Terminus von Cystatin C, jedoch ohne die Cathepsininhibition dadurch in nennenswerter Weise zu beeinflussen, was vermutlich durch eine ausreichende hemmende Aktivität mittels der verbleibenden Aminosäuren 9, 10 und 11 sowie der nicht beeinträchtigen inhibitorischen  $\beta$ -Haarnadelschleifen zu erklären ist. Die im Vergleich zu Cathepsin L um 10 % reduzierte Hemmung von Cathepsin B durch die verkürzte Cystatin C-Form könnte auf die Selektivität der Aminosäure Leu<sup>9</sup> zurückzuführen sein (Hall et al., 1995). Diese Ergebnisse stehen in leichtem Gegensatz zu einer früher publizierten Studie über den Effekt von MMP-2 auf Cystatin C, bei der ebenfalls über die proteolytische Spaltung der Aminosäuren 1 bis 8 und im Anschluss hierzu jedoch über eine um die Hälfte reduzierte Hemmfähigkeit gegenüber Cathepsin L berichtet wurde (Dean et al., 2007). Diese Gruppe zeigte eine Zunahme der IC<sub>50</sub>-Werte, also der Cystatin C-Konzentrationen, die zu einer 50 %-Inhibition der Cathepsin-Aktivität führten, von 48 pM für das intakte Molekül auf 86 pM für das verkürzte Cystatin C. Allerdings können diese Veränderungen als sehr gering im Vergleich zu den um mehrere Zehnerpotenzen abweichenden Inhibitorkonzentrationen, die nach der Prozessierung der Aminosäuren 1 bis 10 erforderlich sind, betrachtet werden (Grzonka et al., 2001).

Beim Vergleich der Ergebnisse mit denjenigen von Dean und Mitarbeitern sollten außerdem die MMP-Kontrollen berücksichtigt werden (Dean et al., 2007). Wurden bei den Cathepsin-Aktivitätsassays mit den gequenchten Substraten nur MMP-2, -8 oder -9 ohne Cystatin C zugegeben, da die Matrixmetalloproteinasen nach dem vorhergehenden *in vitro*-Verdau nicht entfernt werden konnten, so hatte das bereits eine teilweise Reduzierung der Fluoreszenzentwicklung bei Cathepsin L zur Folge. Bei Cathepsin B war dieser Effekt noch ausgeprägter. Folglich wurde die Cathepsin-Aktivität durch die Matrixmetalloproteinasen ebenfalls leicht gehemmt. Ob diese Hemmung eine mögliche Folge der Cathepsindegradation durch MMPs war oder umgekehrt aus einem Verdau der MMPs durch die Cathepsine, die demnach eine vorübergehend geringere Affinität für die Fluoreszenz-gequenchten Peptidsubstrate zeigen, resultierte, muss mit Hilfe weiterführender biochemischer Analysen noch geklärt werden. Die

kürzlich beschriebene Fähigkeit von Cathepsin B und L zur proteolytischen Prozessierung von MMP-2 bei unterschiedlichen pH-Werten sprechen eher für die zweite Theorie (Tholen et al., 2014). Dieser Punkt gewinnt in Anbetracht der hohen Abundanz beider Proteasengruppen in der Knochenmarknische und somit möglicher gegenseitiger Beeinflussung zusätzlich an Gewicht.

Die Prozessierung von Cystatin C durch die neutrophile Elastase, welche die Aminosäuren 1 bis 10 entfernt (Abrahamson et al., 1991), führte in den *in vitro*-Aktivitätsassays dagegen zu einer um etwa 50 % reduzierten Inhibition gegenüber Cathepsin B, obwohl das für alle Typ I- und Typ II-Cystatine konservierte Glycin an Position 11 hier ebenfalls noch vorhanden war. Gegenüber Cathepsin L war auch hier kein Effekt zu beobachten. Offensichtlich ist der entscheidende Unterschied durch die Aminosäuren Leu<sup>9</sup> und Val<sup>10</sup> gegeben, da diese bei der Degradation durch MMPs nicht entfernt wurden und die Selektivität von Cystatin C gegenüber Cathepsin B und L bestimmten, sodass die beiden Cystein-Proteasen noch effektiv gehemmt werden konnten (Hall et al., 1995).

Neutrophile Granulozyten wandern bei der G-CSF-induzierten Stammzellmobilisierung in hoher Zahl ins Knochenmark ein, wo sie durch Degranulation ein stark proteolytisches Milieu in der Nische erzeugen (Greenbaum and Link, 2011; Lapidot and Petit, 2002). Somit wird auch die Konzentration der neutrophilen Elastase in der Nische stark erhöht, was eine beträchtliche Degradation von Cystatin C zur Folge haben könnte. Durch die Inhibitorinaktivierung würde im Umkehrschluss die Aktivität der Cystein-Cathepsine erhöht, den hier beschriebenen Ergebnissen zufolge mindestens die Aktivität von Cathepsin B, was wiederum für eine Potenzierung der proteolytischen Mikroumgebung sorgen könnte.

Darüber hinaus gehört Cystatin C zu den Inhibitoren, die an Positionen nahe des aktiven Zentrums der Zielprotease binden und nicht am aktiven Zentrum selbst. Auf diese Weise wird der Zugang der zu spaltenden Substrate, die in der Regel ein viel größeres Molekulargewicht aufweisen als die Inhibitoren, zu den katalytischen Gruppen am Reaktionszentrum blockiert (Bode and Huber, 2000). Demzufolge ist eine ausreichende sterische Hinderung der Substrate wohl auch noch bei der MMP-prozessierten verkürzten Form von Cystatin C gewährleistet, was sich in der nahezu vollständigen Hemmung der Cathepsine B und L in den Aktivitätsassays äußerte.

Im Anschluss an die biochemischen Studien wurde außerdem getestet, ob die Antikörper des Cystatin C-spezifischen ELISA nur an das intakte Inhibitormolekül oder auch an das durch MMPs verkürzte Peptid binden. Sowohl der Fang- als auch der Detektionsantikörper erkannten beide Cystatin C-Formen. Folglich konnte bei der Messung der Cystatin C-Sekretion nach

der MSC-Stimulation mit dem Mobilisierungsfaktor G-CSF nicht zwischen den beiden Molekülvarianten unterschieden werden, wodurch die detektierte Konzentrationsabnahme eher als Resultat einer veränderten Genexpression denn einer Prozessierung durch MMPs nach der Sekretion zu betrachten ist. In diesem Zusammenhang sollte auch die Fähigkeit der Aspartatprotease Cathepsin D zur Proteolyse von Cystatin C erwähnt werden (Lenarcic et al., 1991). Der Inhibitor wird an mehreren intramolekularen Positionen gespalten, was eine Abnahme der Hemmfähigkeit gegenüber Cystein-Cathepsinen zur Folge hat (Laurent-Matha et al., 2012). Eine Beteiligung von Cathepsin D am proteolytischen Geschehen im Zuge der Stammzellmobilisierung wurde bisher noch nicht berichtet, jedoch belegen Proteomanalysen die Expression der Protease in MSCs aus dem Knochenmark (Miranda et al., 2012).

#### **4.2.3 Hohe Cystatin C-Konzentrationen beeinträchtigen die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit der HSPCs**

Eine mögliche direkte Wirkung von Cystatin C auf HSPCs wurde durch Untersuchung der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der CD34<sup>+</sup> Zellen nach ihrer Stimulation mit dem rekombinanten Inhibitor überprüft. Im Gegensatz zu dem kürzlich beschriebenen proliferationsfördernden Effekt eines MMP-Inhibitors auf murine HSCs (Nakajima et al., 2010), konnte für den Cathepsin-Inhibitor Cystatin C keine vergleichbare Wirkung gegenüber humanen HSPCs beobachtet werden. Selbst die Behandlung mit einem Vielfachen der physiologischen Cystatin C-Konzentration und eine längere Inkubationsdauer hatten keine signifikanten Einflüsse auf die proliferativen Eigenschaften der Zellen *in vitro*. Es gibt bisher nur wenige Berichte über eine Funktion von Cystatin C bei der Zellvermehrung. In zwei älteren Studien mit tierischen Zellen wurde eine erhöhte Teilungsrate für murine Fibroblasten und Rattennierenzellen beobachtet (Sun, 1989; Tavera et al., 1992). Jedoch fehlten hierbei weitergehende Untersuchungen, um die für diesen Effekt verantwortlichen Signalwege zu ermitteln. Darüber hinaus war der Unterschied der effektiven Cystatin C-Konzentrationen mit 120 µg/ml bei den Mauszellen und nur ungefähr 1.3 µg/ml bei den Rattenzellen enorm. Für neuronale Stammzellen der Ratte wurde außerdem eine proliferationsfördernde Wirkung auf auto- und parakrine Weise durch eine glykosylierte Cystatin C-Variante, die unter normalen Bedingungen im menschlichen Organismus nicht auftritt, sondern als Folge einer Punktmutation entsteht, berichtet (Taupin et al., 2000).

Im Vergleich dazu scheint eine direkte Beeinflussung der Proliferation humaner hämatopoetischer Stammzellen durch Cystatin C nicht gegeben zu sein, wie die Ergebnisse der vorliegen-

den Arbeit zeigten. Auch für die Fähigkeit der HSPCs, in verschiedene hämatopoetische Linien zu differenzieren, konnte in den CFU-Assays keine von Cystatin C abhängige Veränderung festgestellt werden. Ein ebenfalls oft verwendeter alternativer Ansatz für Proliferations- und Differenzierungsanalysen wäre durch Inkubation der Zellen mit einem funktionsblockierenden Antikörper möglich. Jedoch erscheint er in diesem Zusammenhang wenig sinnvoll, da ELISA-Messungen ergaben, dass HSPCs selbst *in vitro* nur sehr geringe Cystatin C-Mengen sezernierten, und bei der Inkubation als Monokultur keine weitere Cystatin C-Quelle vorhanden ist.

Möglicherweise spielen Cystatine für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen eine größere Bedeutung im intrazellulären Bereich. Zusammen mit Cathepsin S und D ist Cystatin C in die Differenzierung von HSCs zu dendritischen Zellen involviert (Martino et al., 2011). Dabei ist der Inhibitor für die Bildung eines hoch affinen Komplexes mit Cathepsin S verantwortlich. Diese Protease ist essentiell für die Antigenpräsentierung. Cathepsin D greift in diese Wechselwirkung durch proteolytische Spaltung von Cystatin C ein, was schließlich zur Aktivierung von Cathepsin S führt (Martino et al., 2011). Ein weiterer Cathepsin-Inhibitor, das Serpin Spi2A, ist in die erythropoetischen Differenzierungsprozesse durch Inhibierung der lysosomalen Cathepsine B und L in Erythroblasten involviert (Dev et al., 2013). Jedoch sind die eben beschriebenen Vorgänge ausschließlich intrazellulär lokalisiert, sodass es keinen Hinweis hierbei auf eine extern vermittelte Wirkung des Inhibitors gibt, die beim CFU-Assay mit Zugabe des rekombinanten Proteins ins Differenzierungsmedium erforderlich wäre, um einen Effekt beobachten zu können. Cystatin C kann durch Zellen in größeren Mengen internalisiert werden (Wallin et al., 2010). Diese Fähigkeit wurde bisher allerdings nur für transfierte Krebszelllinien gezeigt, sodass ihre Bedeutung für primäre Stammzellen eher fraglich bleibt.

Ein unmittelbarer Effekt auf die Proliferation oder Differenzierung für ein gegebenes Molekül, das die Zellmembran nicht durchqueren kann, setzt die direkte Interaktion mit bestimmten Strukturen auf der Zelloberfläche voraus. Für TIMP-3 wurde gezeigt, dass dieser MMP-Inhibitor die HSPC-Proliferation steigert, indem er die supprimierende Wirkung des negativen Regulators Angiopoietin durch Bindung an dessen Rezeptor Tie2 aufhebt (Nakajima et al., 2010). Dadurch gehen die Zellen vermehrt in die Teilungsphase des Zellzyklus über. Eindeutige Beweise wurden durch Koimmunpräzipitationsversuche auch für die Bindung von TIMP-3 an den Rezeptor VEGF-R2 erbracht, wodurch Prozesse der Angiogenese gehemmt werden können (Qi et al., 2003). Diese Beobachtungen deuten neben der Funktion als Enzymhemmer auf einen zusätzlichen, von den Proteasen unabhängigen Wirkmechanismus von

TIMP-3 hin. Ob eine derartige Fähigkeit auch für Cystatin C in Frage kommt, muss in zukünftigen Studien noch geklärt werden. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Proliferations- und Differenzierungsassays geben derzeit noch keine Hinweise darauf, jedoch sollte ein direkter Einfluss von Cystatin C auf die Zellen nicht pauschal ausgeschlossen werden. Cystatin C wurde kürzlich als Antagonist für den TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ II identifiziert, wodurch eine Hemmung des TGF- $\beta$ -Signalwegs eintritt (Sokol and Schiemann, 2004). Durch direkte physikalische Interaktion mit dem TGF- $\beta$ -Rezeptor war der Inhibitor in der Lage, die Cathepsin-unabhängige Migration von murinen Fibroblasten zu beeinflussen.

Durch Herunterregulierung der Cystatin C-Expression in MSCs wurde ein möglicher Einfluss von Cystatin C auf die HSPC-Motilität untersucht. Die Funktion der MSCs als HSPC-steuernde Komponenten im Vergleich zu Osteoblasten gewann in den letzten Jahren stark an Gewicht (Morrison and Scadden, 2014). Mit Hilfe der Lipotransfektion unter Verwendung von zwei verschiedenen siRNA-Molekülen, die spezifisch gegen die Cystatin C-mRNA gerichtet waren, konnte in Knochenmark-MSCs eine Herunterregulierung der Proteinexpression auf ungefähr 40 % der Mengen, die unter normalen *in vitro*-Bedingungen detektiert wurden, erreicht werden. Allerdings hatte dieser Knockdown weder für das adhäsive noch für das invasive Verhalten der CD34<sup>+</sup> HSPCs, die mit den transfizierten MSCs kokultiviert wurden, einen Effekt zur Folge. Möglicherweise würde erst eine vollständige Hemmung der Cystatin C-Synthese einen Unterschied in der Adhäsion oder Invasion bewirken, jedoch konnte eine 100 % Herunterregulierung des Inhibitors mit dieser Methode nicht erzielt werden. Offensichtlich war die reduzierte Syntheserate immer noch hoch genug, sodass die Wechselwirkungen zwischen den beiden Zelltypen nicht nennenswert beeinflusst wurden. Auf der anderen Seite kann eine Kompensierung des in MSCs herunterregulierten Cathepsin-inhibitors durch die in HSPCs stattfindende Synthese mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, denn im Vergleich zu den Stromazellen war die Ausscheidungsrate durch die hämatopoetischen Zellen sehr gering. Die Folgen einer längerfristig und vollständig veränderten Expression könnten *in vitro* durch eine stabile Transfektion der Zellen auf DNA-Ebene oder *in vivo* im Knockout-Tiermodell evaluiert werden. Es wurden bereits einige Mausmodelle mit dem homozygoten Genotyp Cystatin C<sup>-/-</sup> vorgestellt, jedoch wurden für keine dieser Studien Auffälligkeiten im hämatopoetischen System berichtet (Huh et al., 1999; Schulte et al., 2010; Yu et al., 2010).

Bei den Zellbewegungsstudien unterscheidet man zwischen der Migration und der Invasion. Während die Migration die Fähigkeit der Zellen, auf eine chemotaktisch aktive Substanz zu reagieren und sich in Richtung der Substanz zu bewegen, beinhaltet, beschreibt die Invasion

den Prozess des aktiven Durchwanderns ganzer Zell-, Matrix- oder Basalmembranschichten. In einer Studie zur Funktion von Cystatin C beim Prostatakrebs wurde die Expression des Inhibitors in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 mit der siRNA-Methode gehemmt und hatte eine deutlich erhöhte Wanderung der Zellen im Matrigel-Invasionsassay zur Folge (Wegiel et al., 2009). Analog dazu wurde in dieser Arbeit die Wanderung von HSPCs durch einen konfluenten MSC-Zellrasen in einem Transwell-Assay nach siRNA-basierter Herunterregulierung von Cystatin C in den MSCs untersucht. Ein Unterschied in der HSPC-Invasivität zu den mit einer unspezifischen siRNA transfizierten MSCs konnte wie bereits bei der Adhäsion der HSPCs an einen MSC-Zellrasen jedoch nicht festgestellt werden.

Demgegenüber nahm die Zahl der adhärennten HSPCs nach der Behandlung der MSCs mit einer Cystatin C-Konzentration, die deutlich über der von MSCs unter *in vitro*-Bedingungen produzierten Menge lag, signifikant ab. In Übereinstimmung damit war auch die Invasionsrate der HSPCs durch den MSC-Zellrasen bei einem Cystatin C-Überschuss reduziert, da eine Durchwanderung zunächst eine Kontaktaufnahme in Form von Anheftung der HSPCs an MSCs voraussetzt. Für den hier detektierten Einfluss von Cystatin C auf die HSPC-Adhäsion wurde eine Abhängigkeit von der Zeit beobachtet. Vor der Koinkubation mit den hämatopoetischen Zellen wurden die MSCs mehrfach gewaschen, wobei alle durch die Zellen sezernierten Faktoren, darunter auch sämtliche extrazellulär aktiven Proteasen, entfernt wurden. In diesem Fall hatte die Behandlung mit rekombinantem Cystatin C keinerlei Wirkung. Wurde der MSC-Überstand dagegen nach dem Waschen für 24 h konditioniert und die HSPCs in das konditionierte Medium zugegeben, so adhärten signifikant weniger Zellen nach der Cystatin C-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse sprechen für einen Cathepsin-abhängigen Effekt. Die sezernierten Cysteinproteasen werden durch die erhöhten Cystatin C-Mengen verstärkt gehemmt, sodass der Abbau verschiedener ECM-Komponenten, Zell-Zellkontakte oder Retentionsfaktoren wie SDF-1 $\alpha$  vermindert und folglich die HSPC-Adhäsion gegenüber MSCs erhöht ist. Proteomanalysen zeigen, dass das Cystein-Cathepsin B von MSCs aus dem Knochenmark exprimiert wird (Li et al., 2009; Miranda et al., 2012; Sun et al., 2006). Darüber hinaus gibt es Berichte über Cathepsin K-Aktivität in Knochenmarkstromazellen (Podgorski et al., 2009). Allerdings wurde hier der gegenteilige Effekt infolge einer Behandlung mit überschüssigen Cystatin C-Mengen beobachtet, was eher eine direkte, Cathepsin-unabhängige Wirkung des Inhibitors auf die Zellen impliziert. In einer Migrationsstudie zeigte natives humanes Cystatin C chemotaktisches und chemokinetisches Potential gegenüber neutrophilen

Granulozyten (Leung-Tack et al., 1990). Demnach sollten die Zellen des hämatopoetischen Systems in der Lage sein, dieses Molekül unmittelbar zu detektieren.

Die Ergebnisse der Transwell-Invasionsstudien mit überschüssigem Cystatin C, wodurch die Zahl der durchgewanderten HSPCs abnahm, sind in Übereinstimmung mit der reduzierten Invasivität der PC3-Zellen nach Überexpression des Inhibitors in diesen Zellen (Wegiel et al., 2009). In dieser Studie wurde auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Cystatin C-Wirkung und der infolge einer Aktivierung des Androgenrezeptors induzierten MAPK/Erk-Signalkaskade hingewiesen. Somit hätte Cystatin C eine direkte rezeptorvermittelte Wirkung auf die Zellen. Darüber hinaus haben Sokol und Mitarbeiter gezeigt, dass eine Hemmung der epithelial-mesenchymalen Transition und der damit einhergehenden morphologischen Veränderungen wie Verminderung der Zellpolarisierung, Abnahme der Zell-Zellkontakte und Erhöhung des Invasions- und Migrationspotentials durch Cystatin C in murinen Brustkrebszellen möglich ist, ebenfalls durch antagonistische Interaktion mit einem Oberflächenrezeptor, dem TGF- $\beta$ -Rezeptor (Sokol et al., 2005). Ob eine vergleichbare Cystatin C-Interaktion mit dem TGF- $\beta$ -Rezeptor auch bei der HSPC-Invasion eine Bedeutung hat, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

*In vivo* scheint außerdem eine indirekte Wirkung der Cystatine über andere Zelltypen der Knochenmarknische möglich zu sein. So ist Cystatin C in der Lage, die Differenzierung und die knochenresorbierende Aktivität von Osteoklasten zu unterdrücken (Brage et al., 2004; 2005). In einer darauf aufbauenden Studie wurde der Einfluss von Cystatin C auf die zellulären Gegenspieler der Osteoklasten, die Osteoblasten, untersucht (Danjo et al., 2007). Infolge einer direkten Stimulation der Osteoblasten mit dem Inhibitor wurde eine erhöhte Zellfunktion in Form von AP-Aktivität (alkalische Phosphatase) und Mineralisierung der Knochenmatrix detektiert. Cystatin C konnte also unmittelbar die Osteoblastendifferenzierung und Knochenbildung fördern (Danjo et al., 2007). Sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten sind als essentielle HSPC-Regulatoren in der Nische in die Mobilisierungsprozesse involviert und wären demnach in der Lage, Änderungen der Cystatin C-Konzentration im Knochenmark auf die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu übertragen.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Studien, dass der ubiquitär exprimierte Cathepsin-Inhibitor Cystatin C auch von verschiedenen Zelltypen der Knochenmarknische in höheren Konzentrationen ausgeschieden wird. Infolge einer G-CSF-Stimulation war die Cystatin C-Sekretion durch MSCs, vermutlich als Resultat einer veränderten Expression, reduziert, obwohl in der Nische aktive Matrixmetalloproteinasen auch zur extrazellulären Degradation des Inhibitors fähig sind. Diese Prozessierung beeinflusste jedoch kaum die Hemm-

funktion von Cystatin C gegenüber Cathepsin B und L, die maßgeblich an der HSPC-Steuerung beteiligt sind. Allerdings hatte ein Cystatin C-Überschuss eine Abnahme des adhäsiven und invasiven Potentials der HSPCs zur Folge, wodurch ein direkter, Cathepsin-unabhängiger oder ein alternativer, durch andere Nischenzellen vermittelter indirekter Effekt von Cystatin C auf die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen impliziert wird.

#### **4.3 Effizientere Expansion hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen unter 2D Kulturbedingungen im Vergleich zum 3D Hanging-Drop-Modell**

Für viele Patienten, die eine Stammzelltransplantation benötigen, ist das Finden eines geeigneten Spenders aufgrund fehlender Übereinstimmungen bei den humanen Leukozytenantigenen (HLA) erschwert. Nabelschnurblut hat sich in solchen Fällen als effektive Alternative herausgestellt und erlaubt eine Transplantation selbst bei einem geringen Grad an Histokompatibilität (Ballen et al., 2012; Copelan, 2006). Diese Tatsache ist hauptsächlich auf die geringere Menge an T-Zellen im Nabelschnurblut zurückzuführen. Zusätzlich bietet diese Stammzellquelle die Vorteile einer wenig invasiven Spendemethode, der Möglichkeit zur Kryokonservierung und einer geringeren Übertragungsgefahr von Spenderinfektionen (Kekre and Antin, 2014). Allerdings ist die Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems bei Transplantationen von Nabelschnurblut oft durch die geringere Menge an HSPCs im Vergleich zu Knochenmarkaspiraten oder peripherem Blut limitiert, sodass erwachsene Empfänger in der Regel die Spende von mehreren Donoren benötigen (Barker et al., 2002). Demnach ist für eine rasche *ex vivo*-Expansion von HSPCs eine effiziente Kulturmethode mit gleichzeitiger Erhaltung des Stammzellcharakters höchst wünschenswert.

In dieser Arbeit wurde ein 3D Modell zur Kokultur von CD34<sup>+</sup> HSPCs aus Nabelschnurblut mit humanen MSCs aus dem Knochenmark etabliert. Eine gemischte Suspension aus beiden Zelltypen wurde in Hanging-Drop-Platten ausgesät, wobei MSCs rasch zu einem kompakten Sphäroid, das von expandierenden HSPCs umgeben war, aggregierten. Während der Anfangsphase der 3D Kokultur konnten keine Hinweise auf eine Einwanderung der HSPCs ins Innere des Sphäroids erbracht werden. Überraschenderweise war die Proliferation der hämatopoetischen Zellen bei Kokultur in einem herkömmlichen 2D System deutlich höher als die HSPC-Expansionsrate im 3D Modell, obwohl die Sphäroid-bildenden MSCs nachweislich zahlreiche wichtige ECM-Bestandteile der Knochenmarknische exprimierten. Ferner waren die in Hanging-Drop-Platten expandierten HSPCs denjenigen aus der 2D Kokultur hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials unterlegen. Folglich zeigte diese Studie mögliche Vortei-

le der traditionellen 2D Zellkultur gegenüber bestimmten 3D Kultursystemen auf, sodass Letztere entgegen der weit verbreiteten Meinung nicht *per se* als die überlegene Variante betrachtet werden sollten.

Das Hanging-Drop-Modell als technisch einfach realisierbare Methode zur 3D Kultur von Zellen ist in der Entwicklungsbiologie bereits seit Jahrzehnten bekannt und stellt heute ein gängiges Verfahren bei Studien zur Stammzellendifferenzierung dar (Mu et al., 2014; Potter and Morris, 1985; Schulz et al., 2012). Die ursprüngliche Vorgehensweise, bei der kleine Volumina der Zellsuspension auf die Deckelinnenseite pipettiert wurden und der Deckel daraufhin umgekehrt auf einer Petrischale platziert wurde, barg das Risiko des Zusammenfließens einzelner Tropfen. Die Methode machte große Fortschritte durch die Herstellung von perforierten Kulturplatten, die aufgrund ihrer Geometrie zur Tropfenbildung durch Schwerkraft führen. Die Hanging-Drop-Array-Platten (HDA-Platten) eignen sich dank der Verwendung von automatisierten Liquid-Handling-Systemen hervorragend für Hochdurchsatzverfahren in der Tumorbiologie und bei der Suche nach Arzneistoffkandidaten in der präklinischen Phase (Amann et al., 2014; Tung et al., 2011).

Darüber hinaus ist dieses System gegenüber anderen Sphäroid-basierten Methoden, wie Kulturgefäßen mit sehr niedrigem Adhäsionspotential oder spezieller Oberflächenbeschichtung, aufgrund seiner einfachen Handhabung, die keine chemisch aufwändige Vorbehandlung erfordert, überlegen. Frei von tierischen oder artifiziellen Zusätzen bilden Zellen ausschließlich durch physiologische Kontakte einheitlich geformte Aggregate, die ihre eigene ECM synthetisieren und abhängig von der Sphäroidgröße Gradienten für den Nährstoff-, Wirkstoff- und Sauerstofftransport aufbauen, welche denjenigen *in vivo* sehr nahe kommen. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist die in dieser Arbeit beschriebene Studie die erste, bei der die Hanging-Drop-Kultur zur vereinfachten 3D Reproduktion der hämatopoetischen Nische *in vitro* herangezogen wurde.

#### **4.3.1 Etablierung des 3D Hanging-Drop-Modells**

Bei der Etablierung einer Kokulturmethode sollten vier zentrale Aspekte berücksichtigt werden: Nach der Wahl der beiden Zelltypen (i) sollte entschieden werden, in welchem Mischungsverhältnis (ii) die Inkubation der Zellen erfolgt. Im nächsten Schritt sollte die Zusammensetzung des Kulturmediums (iii) für das primär zu erreichende Ziel optimiert werden. Schließlich bedarf es für die anschließenden Analysen zuverlässiger Nachweisverfahren zur Identifizierung (iv) beider Zelltypen in der Kokultur.

Das primäre Ziel des hier vorgestellten Modells bestand darin, HSPCs aus dem Nabelschnurblut auf effiziente Weise in großer Zahl zu expandieren. Klinisch erfolgt die *ex vivo*-Expansion der zu transplantierenden Zellen in der Monokultur unter Zugabe zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren. Diese Methode ist jedoch oft mit dem Nachteil der spontanen Differenzierung und dem Verlust wichtiger Oberflächenmoleküle, die für die Wiederbesiedlung des Empfänger Knochenmarks unentbehrlich sind, behaftet (Denning-Kendall et al., 2003; Purton and Scadden, 2008). Als Weiterentwicklung werden HSPCs deshalb seit einiger Zeit in Kokultur mit Knochenmarkstromazellen, die in der Nische unterstützende Funktionen gegenüber den Stammzellen übernehmen, expandiert (Breems et al., 1998). Ein großer Pluspunkt der Kokultur besteht darin, dass Stromazellen zusätzlich zu dem supplementierten Wachstumsmedium verschiedenartige, bisher möglicherweise noch nicht identifizierte regulatorische Nischenelemente, die die Selbsterneuerung und Stammzellerhaltung sichern, beisteuern und die natürliche HSPC-Umgebung auf diese Weise besser nachbilden können.

Mesenchymale Stromazellen (MSCs) nehmen durch ihre vielfältigen Funktionen in der Nische eine zentrale Stellung unter den HSPC-regulierenden zellulären Komponenten ein. Kokulturstudien zeigten, dass MSCs die *ex vivo*-Expansion der HSPCs durch Synthese essentieller Faktoren wie Interleukin-6, M-CSF, Flt3-Ligand und SCF fördern, wodurch das Engraftment der auf diese Weise expandierten hämatopoetischen Zellen nach intravenöser Transplantation erheblich verbessert wurde (de Lima et al., 2012; Kadereit et al., 2002; McNiece et al., 2004). Basierend auf den dargestellten Daten und aufgrund der einfachen Verfügbarkeit humaner MSCs aus dem Knochenmark im klinischen Alltag wurden diese Zellen für das 3D Kokulturmodell mit HSPCs gewählt.

Beim Vergleich der Sphäroidbildung, ausgehend von verschiedenen MSC-Zellzahlen pro Vertiefung der 3D HDA-Platte, wurden deutliche Unterschiede hinsichtlich der Geschwindigkeit der Zellaggregation sichtbar. Neben verlangsamter Sphäroidbildung waren Ansätze mit  $1 \times 10^4$  oder mehr MSCs durch eine starke Akkumulation von Abfallprodukten, möglicherweise als Resultat einer hohen Apoptoserate aufgrund eines ungünstigen Medium-Zellen-Mengenverhältnisses, charakterisiert. Folglich wurde die Zellzahl pro Vertiefung der HDA-Platte im 96-Well-Format auf  $5 \times 10^3$  MSCs beschränkt. Frühe MSC-Sphäroide zeigten ein typisches morphologisches Erscheinungsbild, bei dem die Zellen in einem lockeren Geflecht mit großräumigen interzellulären Bereichen angeordnet waren und dieses wiederum von einem abschließenden Ring aus in mehreren Schichten eng übereinander liegenden MSCs umgeben war, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen und HE-Färbungen von Kryoschnitten belegten. Mit zunehmender Kulturdauer veränderte sich die Morphologie zu einer durchge-

hend kompakten Anordnung der MSCs, wodurch sich der Sphäroiddurchmesser kontinuierlich verringerte. Anschließende Proliferationsuntersuchungen zeigten, dass MSCs nach dem Zusammenschluss zum Sphäroid sich trotz Inkubation im Expansionsmedium nicht mehr teilen. Dies erklärt auch die Verringerung der Sphäroidgröße im Gegensatz zu der bei einer ausgeprägten Proliferation erwarteten Größenzunahme des Aggregats. Der Vergleich mit der Sphäroidkultur in gemischtem Medium belegte, dass der Wachstumsstopp hauptsächlich als Resultat der 3D Kultur zu betrachten war.

Die Fachliteratur enthält bereits einige Berichte über die Kultivierung von MSCs als Sphäroide. Bei einer Studie zum therapeutischen Potential transplanteder MSCs wurde eine erhöhte Expression von anti-Tumor- und anti-Entzündungsfaktoren in 3 Tage alten Sphäroiden detektiert, wobei die MSC-Aggregate ebenfalls durch eine periphere, epithelähnliche Zellschicht und eine mit der Zeit zunehmende Kompaktierung auffielen (Bartosh et al., 2010; Ylostalo et al., 2014). Ferner wurde für die Sphäroidkultur eine verstärkte Differenzierung der MSCs in die adipogene oder osteogene Linie sowie in epitheliale und neuronale Vorläufer berichtet (Jing and Jian-Xiong, 2011; Wang et al., 2009). Diese Studien betonen die Unterschiede zwischen der Inkubation in 3D oder in 2D Systemen, die sich nicht nur in veränderter Morphologie und Struktur der MSCs, sondern auch in einem abweichenden Transkriptom- und Proteomprofil und somit auch in einem veränderten Verhalten der Zellen äußern. Eine deutliche Verringerung der Zellteilungsrate ist in einer 3D Umgebung infolge der Kontaktinhibition sehr wahrscheinlich, da die meisten Zellen in enger Wechselwirkung mit benachbarten Zellen stehen, wodurch auch der Proliferationsarrest in den MSC-Sphäroiden erklärt werden kann. Ferner ist Plastik- bzw. Substratadhärenz ein typisches Kriterium für stark expandierende MSCs, sodass ein Mangel an Anheftungsmöglichkeiten offensichtlich zusätzlich zu der beeinträchtigten Wachstumsrate beiträgt. MSCs in Sphäroiden waren zusätzlich durch eine verringerte Größe gekennzeichnet, was sich durch deutlich kleinere Zellkerne nach der Immunfluoreszenzfärbung zum Vergleich der ECM-Synthese unter 2D und 3D Bedingungen bemerkbar machte. Diese Beobachtung war konsistent mit den in anderen MSC-Studien berichteten Zellgrößen während der Sphäroidkultur und kann entsprechend dem Wachstumsstopp der Zellen durch den Arrest in der ruhenden  $G_0$ -Phase des Zellzyklus erklärt werden (Guo et al., 2014; Ylostalo et al., 2014).

Neben der abnehmenden Zellproliferation waren die MSC-Aggregate durch Apoptose im Sphäroidinneren gekennzeichnet, die bereits nach 3 Tagen in Kultur einsetzte und durch Nachweis der spezifischen Apoptosemarker Caspase-3 und PARP1 detektiert wurde. Diese Beobachtung war konsistent mit dem von Lin und Chang vorgestellten Zonenmodell für zel-

luläre Sphäroide (Abbildung 1-6), für welches Zelltod im Zentrum des Aggregats charakteristisch ist (Lin and Chang, 2008). Nach etwa einer Woche in Kultur war der Apoptosegrad in den Sphäroiden erhöht, was vermutlich auch auf die Kompaktierung und infolgedessen auf eine beeinträchtigte Diffusion von Nährstoffen in den zentralen Bereich zurückzuführen war. Ein Vergleich mit anderen MSC-Sphäroidstudien kann an dieser Stelle kaum angestellt werden, da die meisten eine Kulturdauer von 3 bis 4 Tagen kaum überschreiten.

Verglichen mit der natürlichen Organisation der Zellen im Knochenmarkgewebe ist der entscheidende Unterschied zu den Sphäroiden in einem äußerst umfangreichen vaskulären Netzwerk *in vivo* gegeben. Viele MSC-Subpopulationen sind außerdem im unmittelbaren perivaskulären Bereich lokalisiert, wodurch sich zusammen mit einem Vaskularisierungsgrad von ungefähr  $30 \pm 5$  % eine gleichmäßige Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Gasen ergibt (Ding et al., 2012; Mendez-Ferrer et al., 2010; Nombela-Arrieta et al., 2013). Für eine authentischere *in vitro*-Reproduktion der Nische ist daher wohl das Hinzufügen weiterer Zelltypen des Knochenmarks wie zum Beispiel Endothelzellen erforderlich. Kürzlich ist es gelungen, als Ergänzung zu den bisher bekannten Transplantationsstudien auf Einzelzellbasis ganze Zelleinheiten aus murinem Knochenmark zu isolieren (Ahmadbeigi et al., 2013). Diese natürlichen Zellaggregate wiesen Eigenschaften sowohl mesenchymaler als auch hämatopoetischer Stammzellen auf, konnten erfolgreich transplantiert werden und waren sehr häufig mit Blutgefäßen assoziiert. Demnach sollte eine Eingliederung zusätzlicher wichtiger Zelltypen für zukünftige *in vitro*-Modelle auf jeden Fall in Betracht gezogen werden, allerdings wird die Komplexität der Methoden dadurch unvermeidlich erhöht und ihre Machbarkeit aufgrund begrenzter Materialverfügbarkeit, insbesondere von humanen Knochenmarkendothelzellen, erheblich erschwert.

Zur Bestimmung des optimalen Mengenverhältnisses aus MSCs und HSPCs in der Kokultur wurden verschiedene Mischungen beider Zelltypen in den 3D Hanging-Drop-Platten inkubiert und verglichen, ebenfalls im Hinblick auf das Ziel einer möglichst hohen Expansionsrate der hämatopoetischen Zellen. Dabei war nach 14 Tagen die Vervielfachung der ursprünglich eingesetzten HSPC-Menge am höchsten, wenn  $5 \times 10^3$  MSCs und  $5 \times 10^2$  HSPCs pro Well ausgesät wurden. Auf der einen Seite kann man bei dieser Fragestellung versuchen, die Kulturbedingungen so zu wählen, dass sie mit denjenigen *in vivo* möglichst identisch sind. Aus zahlreichen Studien, bei welchen Knochenmarkzellen isoliert und in Kulturgefäße ausplattiert wurden, kann man herleiten, dass MSCs eine eher kleine Population bilden und möglicherweise 0.001 % bis 0.01 % aller kernhaltigen Zellen des Knochenmarks ausmachen, wodurch sie den HSPCs mengenmäßig etwa um den Faktor 10 unterlegen sind (Pittenger and Martin, 2004).

Jedoch war bei einer MSC-HSPC-Mischung von 1:10 in der Startkultur die HSPC-Proliferationsrate nach 14 Tagen deutlich geringer als beim umgekehrten Zellzahlverhältnis. Hierbei mag sicherlich auch von Bedeutung sein, dass HSPCs in ihrer Nische neben MSCs mit Osteoblasten, Osteoklasten, Adipozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Anderen von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen umgeben sind und diese in der Summe ausreichende Konzentrationen derjenigen Komponenten synthetisieren, die die Erhaltung des Stammzellpools gewährleisten (Boulais and Frenette, 2015). Daher erfordert die *in vitro*-Kokultur der HSPCs mit nur einer dieser Zellgruppen ein anderes Mengenverhältnis als das unter physiologischen Bedingungen vorhandene.

Auf der anderen Seite sollten die Konditionen für die Kokultur so gewählt werden, dass sie für den Zweck der zu etablierenden Methode, also eine rasche und effiziente Expansion der HSPCs, optimal sind. Folglich wurden mit dem MSC-HSPC-Verhältnis von 10:1 nun auch verschiedene Zusammensetzungen des Kulturmediums getestet und die höchsten Proliferationsraten nach 14 Tagen Inkubation in einer Mischung aus 1 Teil des MSC-Wachstumsmediums GMP, 4 Teilen des HSPC-Wachstumsmediums SFEM und den Zytokinen Flt3-Ligand, SCF, Interleukin-3 und Interleukin-6 erzielt. Für die Vitalität der MSCs war das gemischte Medium im Vergleich zum GMP-Medium allein weniger förderlich, wie MSC-Proliferationsstudien unter 2D und 3D Bedingungen bestätigten. Jedoch reflektierte es den mit der Zeit stark anwachsenden Mengenunterschied zwischen MSCs und HSPCs in der Kokultur und förderte diesen zusätzlich.

#### **4.3.2 MSCs und HSPCs segregieren in der frühen Phase der 3D Kokultur**

Für detaillierte Untersuchungen der Wechselwirkung zweier verschiedener Zelltypen in einem Kokulturansatz sind verlässliche Methoden für ihren individuellen Nachweis erforderlich. Bei MSCs und HSPCs ist ein großer Vorteil diesbezüglich bereits durch ihre deutlich abweichende Zellgröße gegeben. Während HSPCs als Suspensionszellen einen Durchmesser von ungefähr 8–10 µm aufweisen, liegen im Monolayer expandierte und durch Accutase-Behandlung suspendierte MSCs mit 20–30 µm deutlich darüber. Demzufolge konnten bei rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen HSPCs als kugelförmige Zellen, die an die Oberfläche eines Aggregats gebunden waren, welches sich aus größeren, stark miteinander wechselwirkenden MSCs zusammensetzte, identifiziert werden. Die zu Beginn recht schwache Interaktion beider Zelltypen änderte sich bei längerer Kulturdauer, sodass nach ungefähr einer Woche die gesamte Sphäroidoberfläche mit adhärierenden HSPCs bedeckt war. Da diese Visualisierungs-

methode keinen Einblick in das Innere des Zellaggregats erlaubte, wurden zusätzlich Kryoschnitte von der 3D Kokultur hergestellt und diese bei Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Oberflächenproteine, die spezifisch nur von einem der beiden Zelltypen exprimiert werden, inkubiert. Dadurch war eine erheblich zuverlässigere Identifizierung der MSCs bzw. HSPCs als anhand des Größenvergleichs möglich. Auch bei diesen Untersuchungen konnten nur schwache Wechselwirkungen zwischen dem MSC-Sphäroid und den umgebenden HSPCs beobachtet werden, wobei keine Einwanderung der hämatopoetischen Zellen ins Sphäroidinnere stattfand.

Die EM- und Immunfluoreszenzanalysen zeichneten also ein Bild der HSPC-MSK-Kokultur, das nach Aussäen einer gemischten Zellsuspension durch eine ausgeprägte Segregation beider Zelltypen in der Anfangsphase gekennzeichnet war. Offensichtlich sorgten MSCs durch ihre epithelähnliche Anordnung in der Peripherie des Sphäroids für einen strikten Ausschluss der HSPCs. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in einer anderen Sphäroidstudie die HSPC-Migration in das Stromazellaggregat beobachtet werden (de Barros et al., 2010). Die Sphäroidbildung in dieser Studie wurde durch Inkubation undifferenzierter MSCs mit Zellen, die zur Differenzierung in die osteogene Linie induziert wurden, in Agarose-beschichteten Zellkulturplatten erreicht, wobei die osteo-induzierten Zellen ein deutlich abgegrenztes Aggregat innerhalb des MSC-Aggregats bildeten. In diesen gemischten Sphäroiden lokalisierten einzelne HSPCs in unmittelbarer Nähe des osteo-induzierten Zellaggregats (de Barros et al., 2010), wodurch die abweichenden Ergebnisse zu den in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen erklärt werden können. Homotypische Interaktionen zwischen MSCs scheinen also unter den Kulturbedingungen, wie sie im Hanging-Drop-Modell gegeben sind, im Vergleich zu den heterotypischen Wechselwirkungen zwischen MSCs und HSPCs deutlich begünstigt zu werden. Erst bei längerer Kulturdauer, als die Vitalität der MSCs abnahm und die Sphäroidstruktur in die Auflösungsphase übergang, zeigten HSPCs eine großflächige Verteilung auch innerhalb des Sphäroids. Der Zusammenbruch des MSC-Sphäroids in der Kokultur lag zu einem Teil sicherlich auch in der ausgiebigen Proliferation der HSPCs begründet, wodurch das Kulturmedium in der Weise verändert wurde, dass es für das Überleben der MSCs nicht mehr förderlich war.

Beim Analysieren der Interaktion von mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen sollte ein besonderes Augenmerk auf die Cadherine gelegt werden. Diese Zelladhäsionsmoleküle interagieren ausschließlich über homophile Bindungen und müssen deshalb auf der Oberfläche beider Zelltypen exprimiert sein. Die Bedeutung von N-Cadherin für die HSC-Regulation in der Nische ist umstritten. Während in einer Studie die Herunterregulierung des

Adhäsionsmoleküls in HSCs ihre Repopulationsfähigkeit nach der Transplantation stark beeinträchtigte, konnten in anderen Studien nach der Gendeletion keine Folgen für die Stammzellen hinsichtlich ihrer Zahl, Mobilisierung, Proliferation oder Repopulationseigenschaften beobachtet werden (Hosokawa et al., 2010; Kiel et al., 2009; Li and Zon, 2010). Für Cadherin-11 wurde kürzlich eine mögliche Funktion bei der Vermittlung des Hämatopoese-fördernden Effekts des Hormons PTH beschrieben, wobei dieses zur verstärkten Cadherin-11-Expression in humanen MSCs führte (Yao et al., 2014). Diese MSC-Reaktion wurde als ausschlaggebend für die daraufhin beobachtete erhöhte Expansion der kokultivierten HSPCs angenommen, muss jedoch durch weiterführende Studien noch verifiziert werden. Sowohl N-Cadherin als auch Cadherin-11 wurden von den Sphäroid-bildenden MSCs exprimiert, wie Immunfluoreszenzuntersuchungen bestätigten. Mit spezifischen Antikörpern konnte die Sphäroidbildung jedoch nur geringfügig und für kurze Zeit blockiert werden. Folglich sind diese beiden Cadherine in die Aggregation der MSCs im Hanging-Drop-Modell involviert, allerdings muss von der Beteiligung weiterer Adhäsionsmoleküle ausgegangen werden. Überraschend war in dieser Hinsicht die sehr schwache Wechselwirkung zwischen MSCs und HSPCs in der frühen Phase der 3D Kokultur, obwohl N-Cadherin und Cadherin-11 bei der Interaktion beider Zelltypen *in vitro* eine große Rolle spielen (Wein et al., 2010).

Die folgenden Untersuchungen beschäftigten sich mit einer weiteren Nischenkomponente, die in hohem Maße zur Stammzellregulierung, in erster Linie durch Sicherung der zellulären Adhäsion und somit der Lokalisation, beiträgt – der extrazellulären Matrix. Bei der *ex vivo*-Kultur primärer Zellen stellt sich oft die Frage, ob eine Supplementierung mit exogenen ECM-Substraten erforderlich ist oder ob die Zellen selbst in der Lage sind, die Matrix nach individuellem Bedarf zu synthetisieren. Matrigel ist ein weit verbreitetes Hilfsmittel, um eine 3D Umgebung zu erzeugen und die Zellen mit künstlicher ECM zu versorgen (Benton et al., 2009). Obwohl dieses von Sarkomzellen hergestellte Substratgemisch mit Kollagen Typ IV und verschiedenen Lamininen auch wichtige Komponenten der Nischenmatrix enthält, können enorme Abweichungen in der Matrigelzusammensetzung die Reproduzierbarkeit von *in vitro*-Studien erschweren (Hughes et al., 2010). Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass MSCs in den Sphäroiden zahlreiche essentielle Bestandteile der Knochenmark-ECM synthetisieren. Mit spezifischen Antikörpern gegen einzelne Lamininketten wurde die Expression der Lamininisoformen LM-411 und LM-511 in den MSC-Aggregaten nach 3 Tagen in Kultur nachgewiesen. Beide Isoformen spielen unter anderem eine zentrale Rolle bei der HSPC-Adhäsion und -Migration (Gu et al., 2003; Siler et al., 2000). Die *in vivo* ebenfalls detektierten Lamininketten  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  und  $\gamma 2$ , wobei  $\alpha 2$  hauptsächlich in den Endothelien der Knochen-

markgefäße auftrat, wurden von MSCs weder im 3D Modell noch unter 2D Bedingungen exprimiert (Gu et al., 1999; Siler et al., 2002; Vogel et al., 1999).

Ferner synthetisierten die Sphäroid-bildenden MSCs mit Kollagen Typ IV und Perlecan zwei wichtige physiologische Bestandteile der Basalmembran. Im Gegensatz zu Kollagen Typ IV zeigt das Proteoglykan Perlecan vorwiegend anti-adhäsive Eigenschaften gegenüber HSPCs (Klein et al., 1995). Dagegen stellen Fibronektin und Tenascin-C ECM-Substrate mit starken zytoadhäsiven Funktionen dar, die darüber hinaus über die durch HSPCs exprimierten Integrine  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) bzw.  $\alpha 9\beta 1$  Einfluss auf deren Proliferation und Differenzierung nehmen können (Schreiber et al., 2009; Verfaillie, 1998; Williams et al., 1991). Fibronektin und Tenascin-C sowie Kollagen Typ I und VI konnten ebenfalls in hohen Mengen in frühen MSC-Sphäroiden detektiert werden, wobei einige dieser Matrixkomponenten selbst nach 10 Tagen der Kokultur noch auffällige Signale lieferten und durch ihre adhäsiven Eigenschaften, insbesondere bei Tenascin-C und Kollagen Typ VI, vermutlich für die Aggregation der HSPCs nach dem Zusammenbruch des MSC-Sphäroids verantwortlich waren. Wie in zahlreichen Studien gezeigt wurde, hat die Zusammensetzung der ECM auch einen entscheidenden Einfluss auf die Selbsterhaltung bzw. Differenzierung der MSCs selbst (He et al., 2013; Thibault et al., 2010). Wichtig für adhärent wachsende Zellen ist außerdem, dass bereits der Verlust der Zell-Matrixkontakte zum programmierten Zelltod führen kann – ein physiologisches Ereignis, das als Anoikis bezeichnet wird und mit dem Sterben der MSCs in Sphäroiden in Zusammenhang gebracht werden kann (Santini et al., 2000).

Obwohl MSCs im Hanging-Drop-Modell in der Lage waren, beachtliche Mengen einer ECM, die derjenigen *in vivo* sehr nahe kam, zu synthetisieren, war in der frühen Phase der 3D Kokultur keine Einwanderung der HSPCs ins Sphäroidinnere und nur eine schwache Wechselwirkung an der Oberfläche zu verzeichnen. Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm allerdings auch die HSPC-Adhäsion zu, was mit der auffälligen Kompaktierung der MSC-Sphäroide einherging. Hier kommt folglich mit der Substratelastizität ein weiterer wichtiger HSPC-regulierender Faktor ins Spiel, der beim Vergleich der Zellkultur in 2D und 3D berücksichtigt werden sollte. Im humanen Knochenmark kann die gewebespezifische Elastizität zwischen 0.1 kPa für das Mark, ungefähr 3 kPa für das Fettgewebe und 30–40 kPa für nicht mineralisierte Knochenmatrix variieren, während herkömmliche Plastikgefäße für die Zellkultur eine Steifigkeit von etwa 100 kPa aufweisen (Choi and Harley, 2012; Discher et al., 2009). HSPCs besitzen die Fähigkeit, die biomechanische Beschaffenheit ihrer Mikroumgebung wahrzunehmen und diese Information in zelluläre Ereignisse umzuwandeln (Holst et al., 2010). So kann eine veränderte Substratelastizität die adhäsiven und migratorischen Eigen-

schaften der hämatopoetischen Zellen beeinflussen (Lee-Thedieck et al., 2012). Andererseits wird das Schicksal der MSCs, zum Beispiel ihr Differenzierungsverhalten, ebenfalls zu einem erheblichen Teil in Abhängigkeit von der Elastizität des Substrats, auf dem sie wachsen, und der Zellgeometrie entschieden (Engler et al., 2006; Harris et al., 2014). Es kann also darüber spekuliert werden, ob HSPCs die höhere Steifigkeit des mit der Zeit kompakter gewordenen MSC-Sphäroids wahrnehmen konnten, woraufhin sich ihre Haftung an der Sphäroidoberfläche erhöhte. Diese Hypothese wäre in Übereinstimmung mit der auffälligen Beobachtung, die beim Vergleich des Hanging-Drop-Modells mit der Kokultur unter 2D Bedingungen gemacht wurde. In herkömmlichen Zellkulturplatten waren  $CD34^+$  HSPCs über die gesamte Oberfläche des MSC-Zellrasens verteilt, was auf eine ausgeprägte Interaktion der beiden Zelltypen hindeutete. Auf Plastik wachsende MSC-Zellen können durchaus als weniger elastisch betrachtet werden als solche, die zu einem Sphäroid mit großen Interzellularräumen aggregieren, wodurch sich vermutlich die Unterschiede in der HSPC-MS-Adhäsion zwischen den beiden Modellen ergaben. Weiterführende Analysen mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (AFM, atomic force microscope), das die Bestimmung der Elastizität einzelner Zellen sowie der Interaktionsstärke zwischen individuellen Zellen erlaubt, können bei der Überprüfung dieser Hypothese helfen.

#### **4.3.3 HSPCs expandieren effizienter und mit höherer Qualität unter 2D Bedingungen als in der 3D Kokultur**

Die wichtigste Fragestellung bei der Einführung eines jeden neuen Modells oder Systems ist schließlich, ob dieses den *bis dato* bestehenden Methoden überlegen ist. Folglich wurde das 3D Hanging-Drop-Modell einem direkten Vergleich mit der Kokultur der MSCs und HSPCs unter herkömmlichen 2D Bedingungen unterzogen. Hierfür wurde zunächst die HSPC-Expansion beim Inkubieren identischer Zellmengen in identischen Volumina des Kulturmediums in 3D oder 2D Platten des gleichen Wellformats verglichen. Überraschenderweise war die Proliferationsrate der hämatopoetischen Zellen in Kokultur mit einem MSC-Zellrasen bereits nach 7 Tagen signifikant höher als bei der Kokultur mit einem MSC-Sphäroid. Dieser Unterschied war bei längerer Inkubationsdauer sogar noch ausgeprägter, während die HSPC-Expansion unter 3D Bedingungen lediglich das Niveau der HSPC-Monokultur im 2D System erreichte. Bei der Überprüfung der Qualität der expandierten hämatopoetischen Zellen stellte sich heraus, dass die Koinkubation mit einem MSC-Monolayer in dieser Hinsicht ebenfalls förderlicher war als die Kokultur in Hanging-Drop-Platten. Ein erheblich höherer Prozentsatz

der HSPCs in der 2D Kokultur war nach 7 Tagen und 2 Wochen noch positiv für den Oberflächenmarker CD34, der als spezifisch für hämatopoetische Stammzellen und frühe Vorläufer angesehen wird und dessen Expression mit Verlust des Stammzellcharakters abnimmt (Civin et al., 1984). Somit war der Grad der spontanen, bei der *ex vivo*-Expansion nicht erwünschten Differenzierung in der Hanging-Drop-Kokultur höher.

Wie bereits erwähnt, zeigten HSPCs im 2D Kokultursystem eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten MSC-Monolayer, während jene in der Monokultur vorwiegend in einem kleinen Bereich akkumulierten. Vergleicht man nun die deutlich höhere HSPC-Expansionsrate in der 2D Kokultur im Gegensatz zum 3D System unter Beachtung der Oberfläche, die auf der einen Seite durch einen ausgedehnten MSC-Zellrasen und auf der anderen Seite durch ein kompaktes, kugelförmiges MSC-Sphäroid gegeben ist, so sprechen diese Ergebnisse für eine essentielle Bedeutung der direkten Wechselwirkung beider Zelltypen für die unterstützende Wirkung der MSCs gegenüber den hämatopoetischen Zellen. Unmittelbarer HSPC-Kontakt zu den Stromazellen schien eine äußerst förderliche Wirkung für den Erhalt des Stammzellcharakters zu haben. In Übereinstimmung damit wurde in einer aktuellen Studie mit einer CD271<sup>+</sup> MSC-Subpopulation ebenfalls auf die Voraussetzung des direkten Zell-Zellkontakts für die erfolgreiche Unterstützung CD34-positiver Stammzellen *in vitro* hingewiesen (Matsuoka et al., 2015).

Des Weiteren wurden die im jeweiligen System expandierten HSPCs auch hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials in verschiedene Linien des blutbildenden Systems mit Hilfe des Koloniebildungsassays verglichen. Dabei war die Anzahl der erythroiden und der frühen gemischten Vorläufer in der 3D Kokultur zwar leicht erhöht, jedoch beinhalteten die unter 2D Bedingungen proliferierten HSPCs signifikant größere Mengen der Granulozyten-Makrophagen-Vorläufer und bildeten insgesamt mehr Kolonien. Folglich war die Inkubation in den beiden Modellen für bestimmte hämatopoetische Progenitoren in unterschiedlicher Weise förderlich. Außerdem scheint unter Berücksichtigung der unterschiedlich großen Kontaktflächen bei einem Zellrasen und einem Sphäroid die direkte Wechselwirkung mit MSCs einen anderen Einfluss auf die HSPC-Proliferation als auf ihre Differenzierung zu haben, so dass Letztere vermutlich zu einem höheren Grad durch sezernierte Faktoren beeinflusst wird. Diese Ergebnisse der Proliferations- und Differenzierungsversuche weichen zum Teil stark von einigen publizierten Studien ab, die ebenfalls die Kokultur beider Zelltypen unter 2D und 3D Bedingungen verglichen haben und dabei die Überlegenheit des jeweiligen 3D Systems demonstrieren konnten. Wurden MSCs zum Beispiel auf einem netzartigen Geflecht aus Polyethylenterephthalat (PET) kultiviert, so proliferierten HSPCs in dieser Kokultur stärker als

unter 2D Bedingungen und waren überdies durch ein höheres Differenzierungspotential gekennzeichnet (Zhang et al., 2006). Stromazellen, die auf 3D PET-Matrices inkubiert werden, scheinen zudem höhere Mengen an ECM zu synthetisieren (Grayson et al., 2004). Der Vorteil dieses Modells liegt jedoch eher in der deutlichen Vergrößerung der Kulturfläche durch das PET-Netz, das den adhärent wachsenden MSCs erheblich mehr Möglichkeiten zum Anhaften bietet und umgekehrt auch wieder die Hypothese stützt, dass diese Zellen bei der HSPC-Expansion erheblich effektiver sind, wenn anders als beim MSC-Sphäroid und ähnlich wie beim MSC-Zellrasen eine ausgeprägte Substratadhärenz möglich ist.

In neueren Studien wurde kürzlich die Fähigkeit bestimmter MSC-Subpopulationen zur Bildung von Zellaggregaten unterschiedlicher Größe, die als „Mesenspheres“ bezeichnet wurden, während der *in vitro*-Kultur in „Ultralow-Adherence“-Gefäßen beschrieben (Isern et al., 2013; Mendez-Ferrer et al., 2010; Pinho et al., 2013). Die MSC-Isolierung war zum Teil allein durch Inkubation CD45-negativer Knochenmarkzellen in einem selektiven Medium möglich, wobei die Zellen innerhalb weniger Tage zu „Mesenspheres“ aggregierten (Isern et al., 2013). Diese Aggregate zeigten ein hohes proliferationsförderndes Potential gegenüber koinkubierten CD34<sup>+</sup> HSPCs, wobei kein direkter Zell-Zellkontakt erforderlich war, wie durch Transwell-Versuche bestätigt wurde (Isern et al., 2013; Pinho et al., 2013). Demgegenüber deutete der Vergleich der Kokultur im Hanging-Drop-Modell und in herkömmlichen 2D Platten auf die Wichtigkeit der MSC-HSPC-Wechselwirkungen hin, was im Einklang mit den Berichten anderer Gruppen steht (Breems et al., 1998; de Barros et al., 2010; Harvey and Dzierzak, 2004; Matsuoka et al., 2015).

Die für die 3D Kokultur verwendeten MSCs wurden routinemäßig gemäß den empfohlenen Minimalkriterien für multipotente MSCs hinsichtlich Morphologie, Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle und Differenzierungspotential charakterisiert (Dominici et al., 2006). Danach sind MSCs adhärent wachsende, fibroblastenähnliche Zellen, die bei durchflusszytometrischer Analyse negativ für die Marker des blutbildenden Systems CD14, CD34 und CD45 sowie positiv für die Oberflächenmoleküle CD73, CD90 und CD105 sind. Ein weiteres charakteristisches MSC-Merkmal besteht in ihrer Fähigkeit, bei Kultivierung in induzierendem Medium in die adipogene, osteogene und chondrogene Zelllinien zu differenzieren. Demnach konnte in der vorliegenden Arbeit bei den MSCs für die Sphäroidkokultur nicht zwischen einzelnen Subpopulationen der Knochenmarkstromazellen unterschieden werden. Auf diese Weise können die abweichenden Ergebnisse zu den „Mesenspheres“-Modellen erklärt werden (Isern et al., 2013; Pinho et al., 2013). Darüber hinaus wurden die hier zur Sphäroidbildung eingesetzten MSCs zuvor unter 2D Bedingungen expandiert, wodurch sich

einige ihrer Eigenschaften verändert haben können, während „Mesenspheres“-formende Zellen direkt nach der Isolierung aggregierten und im Gegensatz zum MSC-Proliferationsarrest im Hanging-Drop-Modell sich durch ein ausgeprägtes Potential zur Selbsterneuerung auszeichneten. Ferner kann angesichts der Selektionsmethode aus CD45-negativen Knochenmarkzellen bei der „Mesenspheres“-Kultur die Beteiligung anderer adhärenter Zelltypen als MSCs nicht ausgeschlossen werden (Isern et al., 2013). Obwohl die Autoren die Identifizierung derjenigen MSC-Subpopulation, die das höchste Potential zur Erhaltung der hämatopoetischen Stammzellen aufweist, als Ziel formulierten, ist vielleicht gerade die Heterogenität der Stromazellen besonders förderlich für die HSPC-Proliferation.

Bei abschließender Betrachtung demonstriert das hier vorgestellte Hanging-Drop-Modell, dass 3D Kulturbedingungen den traditionellen 2D Zellkulturmethoden nicht zwingend überlegen sind. Insbesondere für die HSPC-Expansion war die Kokultur mit einem MSC-Zellrasen förderlicher als mit einem MSC-Sphäroid. Die Ergebnisse stützen außerdem die Hypothese, dass direkter Kontakt zwischen beiden Zelltypen für eine umfangreiche HSPC-Proliferation erforderlich ist. Obwohl die Sphäroid-bildenden MSCs zahlreiche Bestandteile der Nischenmatrix synthetisierten, schien ihre ausgeprägte homotypische Wechselwirkung im Zellaggregat einen flächenhaften Kontakt mit HSPCs zu unterdrücken. Die Morphologie der MSCs, die Expression von Oberflächenmolekülen sowie ihre Interaktion mit hämatopoetischen Zellen scheint sich erheblich zu unterscheiden, wenn die Zellen in einem großflächigen Monolayer oder in einem Sphäroid, das durch eine kleinere Oberfläche und kleinere Zellvolumina charakterisiert ist, kultiviert werden. Offensichtlich benötigen diese Knochenmarkstromazellen ein physikalisches Substrat, um ihre HSPC-unterstützende Funktion optimal ausüben zu können – ein wichtiger Punkt, der bei zukünftigen Protokollen zur klinischen Stammzellexpansion berücksichtigt werden sollte. Um das regulatorische Geschehen in der Nische vollständig verstehen zu können, muss dieses komplexe Netzwerk zur Analyse in seine biophysikalischen, biochemischen und zellulären Einzelkomponenten zerlegt werden. Die Identifizierung der Einzelteile wird eines Tages eventuell die Generierung einer artifiziellen Nische zur kontrollierten Expansion von HSPCs ermöglichen.

## 5 Zusammenfassung

Für viele Leukämiepatienten ist eine Stammzelltransplantation die lebensrettende Therapiemaßnahme. Spenderzellen werden heutzutage hauptsächlich durch Leukapherese gewonnen, nachdem sie durch G-CSF-Behandlung aus ihrer schützenden Knochenmarknische ins periphere Blut mobilisiert wurden. Zwischen 5 und 40 % der Spender sind jedoch nicht in der Lage, ausreichend hohe Mengen hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs) zu mobilisieren. Daher ist eine genaue Aufklärung der molekularen Prozesse im Zuge der induzierten HSPC-Mobilisierung erforderlich, um ihre Effektivität zu erhöhen. Ein zentrales Ereignis hierbei ist der Aufbau einer proteolytischen Mikroumgebung in der Nische, welche durch Auflösung der Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte sowie durch Degradation biologisch aktiver Moleküle den Austritt der HSPCs aus dem Knochenmark ermöglicht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass neben den bereits bekannten Matrixmetalloproteinasen MMP-2, -8, -9 und -14 weitere MMP-Mitglieder zum Aufbau des proteolytischen Milieus beitragen könnten. MMP-3, -7, -11 und -13 wurden von Nischenzellen exprimiert. MMP-7 und -13 prozessierten den HSPC-Retentionsfaktor SDF-1 $\alpha$  in gleicher Weise wie MMP-9, wodurch seine chemotaktische Wirkung beeinträchtigt werden könnte. Eine weitere HSPC-regulierende Proteasengruppe stellen Cystein-Cathepsine dar, die durch endogene Inhibitoren der Cystatin-Familie reguliert werden können. Eine mögliche Funktion der Cystatine in der Stammzellnische wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Cystatin C wurde in hohen Konzentrationen durch Knochenmarkstromazellen ausgeschieden, wobei die Sekretion durch direkte Stimulation mit G-CSF beeinflusst werden konnte. Die adhäsiven und invasiven Eigenschaften hämatopoetischer Zellen gegenüber mesenchymalen Stromazellen (MSCs) konnten durch Cystatin C reduziert werden, allerdings nur bei einem Überschuss des Inhibitors.

Eine weitere Quelle für Stammzellen bietet das Nabelschnurblut, jedoch müssen die HSPCs meist aufgrund niedriger Zellzahl für eine Transplantation *ex vivo* expandiert werden. In dieser Arbeit wurde ein 3D Modell zur Expansion von CD34<sup>+</sup> HSPCs in Kokultur mit MSCs aus dem Knochenmark etabliert. Eine gemischte Zellsuspension wurde in Hanging-Drop-Platten ausgesät. Die MSCs segregierten in kurzer Zeit zu einem kompakten Sphäroid, umgeben von rasch expandierenden HSPCs. Überraschenderweise stellte sich die 3D Methode im Vergleich zur HSPC-Proliferation über einem 2D Zellrasen aus MSCs als weniger effizient heraus, wobei die expandierten Stammzellen auch an Qualität unterlegen waren. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass bestimmte biophysikalische Voraussetzungen erfüllt sein müssen, damit MSCs ihre HSPC unterstützende Funktion optimal ausüben können.

## Summary

Stem cell transplantation is the life saving therapy for many patients suffering from hematopoietic disorders. Donor cells are routinely isolated by means of leukapheresis after being mobilized from the protective environment of their bone marrow niches into the peripheral blood through G-CSF treatment. Yet, 5 to 40 % of all donors fail to mobilize sufficient numbers of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs). Hence, an in-depth elucidation of the molecular processes taking place during the induced HSPC mobilisation is required in order to optimize its efficiency. One key event after G-CSF administration is the development of a highly proteolytic microenvironment inside the bone marrow, which leads to a breakdown of cell-cell and cell-matrix connections as well as to the processing of biologically active molecules thus facilitating the exit of HSPCs into the blood stream. The matrix metalloproteinases MMP-2, -8, -9, and -14 are highly involved in these processes. The present study provides evidence for a possible contribution of further MMP family members to the proteolytic activity in the bone marrow. MMP-3, -7, -11, and -13 were shown to be expressed by niche cells. Furthermore, MMP-7 and -13 were able to digest the main HSPC retaining factor SDF-1 $\alpha$  in the same way as MMP-9 thus probably reducing its chemotactic activity. Cysteine cathepsins provide another enzyme group that is strongly active in the stem cell niche. *In vitro* studies were performed to elucidate possible contributions of their endogenous inhibitors, the cystatins. High amounts of secreted cystatin C were detected for several cell types of the bone marrow and could be affected by a direct stimulation with G-CSF. Additionally, the adhesion and invasion potential of HSPCs incubated with a confluent monolayer of mesenchymal stromal cells (MSCs) was reduced after addition of excess cystatin C.

Umbilical cord blood represents an alternative stem cell source for patients lacking a donor with a highly matching human leukocyte antigen (HLA) phenotype. However, these cells are mostly available in low amounts which would require an *ex vivo* expansion prior to transplantation. A simplified 3D model for a fast and efficient expansion of CD34<sup>+</sup> HSPCs in co-culture with bone marrow-derived MSCs was established. When seeded as a mixed cell suspension in hanging drops, MSCs readily segregated into tight spheroids which were surrounded by strongly proliferating HSPCs. Surprisingly, a conventional 2D system with HSPCs grown over a MSC monolayer was superior to the hanging drop model with respect to HSPC expansion and quality. In conclusion, the results demonstrated that MSCs are in need of physical substrates in order to optimally exert their HSPC supportive functions.

## Literaturverzeichnis

- Abrahamson, M. (1994). Cystatins. *Methods Enzymol* 244, 685-700.
- Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G., and Grubb, A. (1986). Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem* 261, 11282-11289.
- Abrahamson, M., Grubb, A., Olafsson, I., and Lundwall, A. (1987). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *FEBS Lett* 216, 229-233.
- Abrahamson, M., Mason, R.W., Hansson, H., Buttle, D.J., Grubb, A., and Ohlsson, K. (1991). Human cystatin C. role of the N-terminal segment in the inhibition of human cysteine proteinases and in its inactivation by leucocyte elastase. *Biochem J* 273 ( Pt 3), 621-626.
- Adams, G.B., Chabner, K.T., Alley, I.R., Olson, D.P., Szczepiorkowski, Z.M., Poznansky, M.C., Kos, C.H., Pollak, M.R., Brown, E.M., and Scadden, D.T. (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* 439, 599-603.
- Aggarwal, R., Lu, J., Pompili, V.J., and Das, H. (2012). Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, ex vivo expansion and clinical application. *Curr Mol Med* 12, 34-49.
- Ahmadbeigi, N., Soleimani, M., Vasei, M., Gheisari, Y., Mortazavi, Y., Azadmanesh, K., Omidkhoda, A., Janzamin, E., and Nardi, N.B. (2013). Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived cell components with hematopoietic stem cell niche properties. *Stem Cells Dev* 22, 3052-3061.
- Aisa, M.C., Beccari, T., Costanzi, E., and Maggio, D. (2003). Cathepsin B in osteoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1621, 149-159.
- Aisa, M.C., Rahman, S., Senin, U., Maggio, D., and Russell, R.G. (1996). Cathepsin B activity in normal human osteoblast-like cells and human osteoblastic osteosarcoma cells (MG-63): regulation by interleukin-1 beta and parathyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* 1290, 29-36.
- Alvarez, P., Carrillo, E., Velez, C., Hita-Contreras, F., Martinez-Amat, A., Rodriguez-Serrano, F., Boulaiz, H., Ortiz, R., Melguizo, C., Prados, J., *et al.* (2013). Regulatory systems in bone marrow for hematopoietic stem/progenitor cells mobilization and homing. *Biomed Res Int* 2013, 312656.
- Amann, A., Zwierzina, M., Gamerith, G., Bitsche, M., Huber, J.M., Vogel, G.F., Blumer, M., Koeck, S., Pechriggl, E.J., Kelm, J.M., *et al.* (2014). Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour--stroma interactions in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 9, e92511.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-161.
- Arai, F., Hosokawa, K., Toyama, H., Matsumoto, Y., and Suda, T. (2012). Role of N-cadherin in the regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci* 1266, 72-77.
- Avigdor, A., Goichberg, P., Shivtiel, S., Dar, A., Peled, A., Samira, S., Kollet, O., Hershkoviz, R., Alon, R., Hardan, I., *et al.* (2004). CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood* 103, 2981-2989.
- Ballen, K.K., Koreth, J., Chen, Y.B., Dey, B.R., and Spitzer, T.R. (2012). Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. *Blood* 119, 1972-1980.
- Ballen, K.K., Shpall, E.J., Avigan, D., Yeap, B.Y., Fisher, D.C., McDermott, K., Dey, B.R., Attar, E., McAfee, S., Konopleva, M., *et al.* (2007). Phase I trial of parathyroid hormone to facilitate stem cell mobilization. *Biol Blood Marrow Transplant* 13, 838-843.
- Barker, J.N., Krepski, T.P., DeFor, T.E., Davies, S.M., Wagner, J.E., and Weisdorf, D.J. (2002). Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant* 8, 257-260.

- Bartosh, T.J., Ylostalo, J.H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., Lee, R.H., Choi, H., and Prockop, D.J. (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 13724-13729.
- Bendall, L.J., and Bradstock, K.F. (2014). G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev* *25*, 355-367.
- Benton, G., George, J., Kleinman, H.K., and Arnaoutova, I.P. (2009). Advancing science and technology via 3D culture on basement membrane matrix. *J Cell Physiol* *221*, 18-25.
- Bhattacharya, D., Czechowicz, A., Ooi, A.G., Rossi, D.J., Bryder, D., and Weissman, I.L. (2009). Niche recycling through division-independent egress of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* *206*, 2837-2850.
- Bianco, P. (2011). Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood* *117*, 5281-5288.
- Bianco, P., and Robey, P.G. (2015). Skeletal stem cells. *Development* *142*, 1023-1027.
- Bissell, M.J., Hall, H.G., and Parry, G. (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* *99*, 31-68.
- Blair, H.C., Julian, B.A., Cao, X., Jordan, S.E., and Dong, S.S. (1999). Parathyroid hormone-regulated production of stem cell factor in human osteoblasts and osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* *255*, 778-784.
- Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T.A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* *382*, 829-833.
- Bode, W., and Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta* *1477*, 241-252.
- Bonig, H., and Papayannopoulou, T. (2013). Hematopoietic stem cell mobilization: updated conceptual renditions. *Leukemia* *27*, 24-31.
- Bossard, M.J., Tomaszek, T.A., Thompson, S.K., Amegadzie, B.Y., Hanning, C.R., Jones, C., Kurdyła, J.T., McNulty, D.E., Drake, F.H., Gowen, M., *et al.* (1996). Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* *271*, 12517-12524.
- Boulais, P.E., and Frenette, P.S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* *125*, 2621-2629.
- Boyce, B.F., Yao, Z., Zhang, Q., Guo, R., Lu, Y., Schwarz, E.M., and Xing, L. (2007). New roles for osteoclasts in bone. *Ann N Y Acad Sci* *1116*, 245-254.
- Brage, M., Abrahamson, M., Lindstrom, V., Grubb, A., and Lerner, U.H. (2005). Different cysteine proteinases involved in bone resorption and osteoclast formation. *Calcif Tissue Int* *76*, 439-447.
- Brage, M., Lie, A., Ransjo, M., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Abrahamson, M., Grubb, A., and Lerner, U.H. (2004). Osteoclastogenesis is decreased by cysteine proteinase inhibitors. *Bone* *34*, 412-424.
- Breems, D.A., Blokland, E.A., Siebel, K.E., Mayen, A.E., Engels, L.J., and Ploemacher, R.E. (1998). Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells. *Blood* *91*, 111-117.
- Briggs, J.J., Haugen, M.H., Johansen, H.T., Riker, A.I., Abrahamson, M., Fodstad, O., Maelandsmo, G.M., and Solberg, R. (2010). Cystatin E/M suppresses legumain activity and invasion of human melanoma. *BMC Cancer* *10*, 17.
- Brömme, D., Wilson, S. (2011). Role of cysteine cathepsins in extracellular proteolysis. *Extracellular Matrix Degradation*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Bromberg, O., Frisch, B.J., Weber, J.M., Porter, R.L., Civitelli, R., and Calvi, L.M. (2012). Osteoblastic N-cadherin is not required for microenvironmental support and regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* *120*, 303-313.
- Brown, E.M. (1983). Four-parameter model of the sigmoidal relationship between parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* *56*, 572-581.

- Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., *et al.* (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med* *201*, 1307-1318.
- Brunner, S., Theiss, H.D., Murr, A., Negele, T., and Franz, W.M. (2007). Primary hyperparathyroidism is associated with increased circulating bone marrow-derived progenitor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *293*, E1670-1675.
- Brunner, S., Zaruba, M.M., Huber, B., David, R., Vallaster, M., Assmann, G., Mueller-Hoecker, J., and Franz, W.M. (2008). Parathyroid hormone effectively induces mobilization of progenitor cells without depletion of bone marrow. *Exp Hematol* *36*, 1157-1166.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *15*, 269-290.
- Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M.E., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., *et al.* (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* *203*, 2201-2213.
- Butler, J.M., Nolan, D.J., Vertes, E.L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A.T., Seandel, M., Shido, K., White, I.A., Kobayashi, M., *et al.* (2010). Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 251-264.
- Calkins, C.C., and Sloane, B.F. (1995). Mammalian cysteine protease inhibitors: biochemical properties and possible roles in tumor progression. *Biol Chem Hoppe Seyler* *376*, 71-80.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* *425*, 841-846.
- Ceru, S., Konjar, S., Maher, K., Repnik, U., Krizaj, I., Bencina, M., Renko, M., Nepveu, A., Zerovnik, E., Turk, B., *et al.* (2010). Stefin B interacts with histones and cathepsin L in the nucleus. *J Biol Chem* *285*, 10078-10086.
- Chan, C.K., Chen, C.C., Luppen, C.A., Kim, J.B., DeBoer, A.T., Wei, K., Helms, J.A., Kuo, C.J., Kraft, D.L., and Weissman, I.L. (2009). Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* *457*, 490-494.
- Chen, C., Cao, J., Song, X., Zeng, L., Li, Z., Li, Y., and Xu, K. (2013). Adrenaline administration promotes the efficiency of granulocyte colony stimulating factor-mediated hematopoietic stem and progenitor cell mobilization in mice. *Int J Hematol* *97*, 50-57.
- Chen, C., Song, X., Ma, S., Wang, X., Xu, J., Zhang, H., Wu, Q., Zhao, K., Cao, J., Qiao, J., *et al.* (2015). Cdc42 inhibitor ML141 enhances G-CSF-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization. *Int J Hematol* *101*, 5-12.
- Cheng, T., Hitomi, K., van Vlijmen-Willems, I.M., de Jongh, G.J., Yamamoto, K., Nishi, K., Watts, C., Reinheckel, T., Schalkwijk, J., and Zeeuwen, P.L. (2006). Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *J Biol Chem* *281*, 15893-15899.
- Cheng, T., Tjabringa, G.S., van Vlijmen-Willems, I.M., Hitomi, K., van Erp, P.E., Schalkwijk, J., and Zeeuwen, P.L. (2009). The cystatin M/E-controlled pathway of skin barrier formation: expression of its key components in psoriasis and atopic dermatitis. *Br J Dermatol* *161*, 253-264.
- Chitteti, B.R., Cheng, Y.H., Poteat, B., Rodriguez-Rodriguez, S., Goebel, W.S., Carlesso, N., Kacena, M.A., and Srour, E.F. (2010). Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function. *Blood* *115*, 3239-3248.
- Choi, J.S., and Harley, B.A. (2012). The combined influence of substrate elasticity and ligand density on the viability and biophysical properties of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials* *33*, 4460-4468.

- Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Mendez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., *et al.* (2011). Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* 208, 261-271.
- Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., and Shaper, J.H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133, 157-165.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 *Suppl* 3, S131-139.
- Colbert, J.D., Matthews, S.P., Kos, J., and Watts, C. (2011). Internalization of exogenous cystatin F suppresses cysteine proteases and induces the accumulation of single-chain cathepsin L by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 286, 42082-42090.
- Cook, M.M., Futrega, K., Osiecki, M., Kabiri, M., Kul, B., Rice, A., Atkinson, K., Brooke, G., and Doran, M. (2012). Micromarrows--three-dimensional coculture of hematopoietic stem cells and mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods* 18, 319-328.
- Copelan, E.A. (2006). Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 354, 1813-1826.
- Dahl, S.W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V., and Turk, B. (2001). Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry* 40, 1671-1678.
- Danjo, A., Yamaza, T., Kido, M.A., Shimohira, D., Tsukuba, T., Kagiya, T., Yamashita, Y., Nishijima, K., Masuko, S., Goto, M., *et al.* (2007). Cystatin C stimulates the differentiation of mouse osteoblastic cells and bone formation. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 199-204.
- de Barros, A.P., Takiya, C.M., Garzoni, L.R., Leal-Ferreira, M.L., Dutra, H.S., Chiarini, L.B., Meirelles, M.N., Borojevic, R., and Rossi, M.I. (2010). Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model. *PLoS One* 5, e9093.
- de Lima, M., McNiece, I., Robinson, S.N., Munsell, M., Eapen, M., Horowitz, M., Alousi, A., Saliba, R., McMannis, J.D., Kaur, I., *et al.* (2012). Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med* 367, 2305-2315.
- Dean, R.A., Butler, G.S., Hama-Kourbali, Y., Delbe, J., Brigstock, D.R., Courty, J., and Overall, C.M. (2007). Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis. *Mol Cell Biol* 27, 8454-8465.
- Delany, A.M., and Canalis, E. (2001). The metastasis-associated metalloproteinase stromelysin-3 is induced by transforming growth factor-beta in osteoblasts and fibroblasts. *Endocrinology* 142, 1561-1566.
- Denning-Kendall, P., Singha, S., Bradley, B., and Hows, J. (2003). Cytokine expansion culture of cord blood CD34+ cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. *Stem Cells* 21, 61-70.
- Dev, A., Byrne, S.M., Verma, R., Ashton-Rickardt, P.G., and Wojchowski, D.M. (2013). Erythropoietin-directed erythropoiesis depends on serpin inhibition of erythroblast lysosomal cathepsins. *J Exp Med* 210, 225-232.
- Devine, S.M., Vij, R., Rettig, M., Todt, L., McGlauchlen, K., Fisher, N., Devine, H., Link, D.C., Calandra, G., Bridger, G., *et al.* (2008). Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood* 112, 990-998.
- Di Maggio, N., Piccinini, E., Jaworski, M., Trumpp, A., Wendt, D.J., and Martin, I. (2011). Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials* 32, 321-329.
- Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457-462.
- Discher, D.E., Mooney, D.J., and Zandstra, P.W. (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324, 1673-1677.

- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Dworkin, L.D. (2001). Serum cystatin C as a marker of glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 551-553.
- Ehninger, A., and Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med* 208, 421-428.
- Ekblom, M., Fässler, R., Tomasini-Johansson, B., Nilsson, K., and Ekblom, P. (1993). Downregulation of tenascin expression by glucocorticoids in bone marrow stromal cells and in fibroblasts. *J Cell Biol* 123, 1037-1045.
- Eleftheriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannon, T.W., Noda, M., *et al.* (2005). Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434, 514-520.
- Ellis, S.L., Grassinger, J., Jones, A., Borg, J., Camenisch, T., Haylock, D., Bertocello, I., and Nilsson, S.K. (2011). The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood* 118, 1516-1524.
- Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Sato, H. (2003). Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem* 278, 40764-40770.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-689.
- Essl, M. (2007). Einfluss von Matrix-Metalloproteinasen und Laminin-Isoformen auf das zelluläre Verhalten adulter Stammzellen. Dissertation, Universität Tübingen.
- Evans, N.D., Minelli, C., Gentleman, E., LaPointe, V., Patankar, S.N., Kallivretaki, M., Chen, X., Roberts, C.J., and Stevens, M.M. (2009). Substrate stiffness affects early differentiation events in embryonic stem cells. *Eur Cell Mater* 18, 1-13; discussion 13-14.
- Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. (2013). Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol* 31, 108-115.
- Ferreira, M.S., Jahnen-Dechent, W., Labude, N., Bovi, M., Hieronymus, T., Zenke, M., Schneider, R.K., and Neuss, S. (2012). Cord blood-hematopoietic stem cell expansion in 3D fibrin scaffolds with stromal support. *Biomaterials* 33, 6987-6997.
- Fibbe, W.E., Pruijt, J.F., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., Opdenakker, G., and Willemze, R. (2000). The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8-induced stem-cell mobilization. *Semin Hematol* 37, 19-24.
- Flomenberg, N., Devine, S.M., Dipersio, J.F., Liesveld, J.L., McCarty, J.M., Rowley, S.D., Vesole, D.H., Badel, K., and Calandra, G. (2005). The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 106, 1867-1874.
- Freije, J.P., Balbin, M., Abrahamson, M., Velasco, G., Dalboge, H., Grubb, A., and Lopez-Otin, C. (1993). Human cystatin D. cDNA cloning, characterization of the Escherichia coli expressed inhibitor, and identification of the native protein in saliva. *J Biol Chem* 268, 15737-15744.
- Frenette, P.S., Pinho, S., Lucas, D., and Scheiermann, C. (2013). Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol* 31, 285-316.
- Frenette, P.S., Subbarao, S., Mazo, I.B., von Andrian, U.H., and Wagner, D.D. (1998). Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14423-14428.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3, 393-403.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4, 267-274.
- Friedenstein, A.J., Latzinik, N.W., Grosheva, A.G., and Gorskaya, U.F. (1982). Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol* 10, 217-227.

- Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., and Frolova, G.P. (1968). Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230-247.
- Garcia-Irigoyen, O., Latasa, M.U., Carotti, S., Uriarte, I., Elizalde, M., Urtasun, R., Vespasiani-Gentilucci, U., Morini, S., Benito, P., Ladero, J.M., *et al.* (2015). Matrix metalloproteinase 10 contributes to hepatocarcinogenesis in a novel crosstalk with the stromal derived factor 1/C-X-C chemokine receptor 4 axis. *Hepatology* 62, 166-178.
- Giarratana, M.C., Kobari, L., Lapillonne, H., Chalmers, D., Kiger, L., Cynober, T., Marden, M.C., Wajcman, H., and Douay, L. (2005). Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 69-74.
- Gilbert, P.M., Havenstrite, K.L., Magnusson, K.E., Sacco, A., Leonardi, N.A., Kraft, P., Nguyen, N.K., Thrun, S., Lutolf, M.P., and Blau, H.M. (2010). Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* 329, 1078-1081.
- Grassinger, J., Haylock, D.N., Storan, M.J., Haines, G.O., Williams, B., Whitty, G.A., Vinson, A.R., Be, C.L., Li, S., Sorensen, E.S., *et al.* (2009). Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with alpha9beta1 and alpha4beta1 integrins. *Blood* 114, 49-59.
- Grayson, W.L., Ma, T., and Bunnell, B. (2004). Human mesenchymal stem cells tissue development in 3D PET matrices. *Biotechnol Prog* 20, 905-912.
- Greenbaum, A., Hsu, Y.M., Day, R.B., Schuettelpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495, 227-230.
- Greenbaum, A.M., and Link, D.C. (2011). Mechanisms of G-CSF-mediated hematopoietic stem and progenitor mobilization. *Leukemia* 25, 211-217.
- Greenbaum, A.M., Revollo, L.D., Woloszynek, J.R., Civitelli, R., and Link, D.C. (2012). N-cadherin in osteolineage cells is not required for maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 120, 295-302.
- Grzonka, Z., Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Lankiewicz, L., Wiczak, W., Wiczerzak, E., Ciarkowski, J., Drabik, P., Janowski, R., *et al.* (2001). Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol* 48, 1-20.
- Gu, Y., Sorokin, L., Durbeek, M., Hjalt, T., Jonsson, J.I., and Ekblom, M. (1999). Characterization of bone marrow laminins and identification of alpha5-containing laminins as adhesive proteins for multipotent hematopoietic FDCP-Mix cells. *Blood* 93, 2533-2542.
- Gu, Y.C., Kortessmaa, J., Tryggvason, K., Persson, J., Ekblom, P., Jacobsen, S.E., and Ekblom, M. (2003). Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood* 101, 877-885.
- Guerriero, A., Worford, L., Holland, H.K., Guo, G.R., Sheehan, K., and Waller, E.K. (1997). Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. *Blood* 90, 3444-3455.
- Guo, L., Ge, J., Zhou, Y., Wang, S., Zhao, R.C., and Wu, Y. (2014). Three-dimensional spheroid-cultured mesenchymal stem cells devoid of embolism attenuate brain stroke injury after intra-arterial injection. *Stem Cells Dev* 23, 978-989.
- Halfon, S., Ford, J., Foster, J., Dowling, L., Lucian, L., Sterling, M., Xu, Y., Weiss, M., Ikeda, M., Liggett, D., *et al.* (1998). Leukocystatin, a new Class II cystatin expressed selectively by hematopoietic cells. *J Biol Chem* 273, 16400-16408.
- Hall, A., Hakansson, K., Mason, R.W., Grubb, A., and Abrahamson, M. (1995). Structural basis for the biological specificity of cystatin C. Identification of leucine 9 in the N-terminal binding region as a selectivity-conferring residue in the inhibition of mammalian cysteine peptidases. *J Biol Chem* 270, 5115-5121.
- Hamilton, G., Colbert, J.D., Schuettelkopf, A.W., and Watts, C. (2008). Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis. *EMBO J* 27, 499-508.
- Han, Y.P., Yan, C., Zhou, L., Qin, L., and Tsukamoto, H. (2007). A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem* 282, 12928-12939.

- Harris, G.M., Piroli, M.E., and Jabbarzadeh, E. (2014). Deconstructing the effects of matrix elasticity and geometry in mesenchymal stem cell lineage commitment. *Adv Funct Mater* 24, 2396-2403.
- Harvey, K., and Dzierzak, E. (2004). Cell-cell contact and anatomical compatibility in stromal cell-mediated HSC support during development. *Stem Cells* 22, 253-258.
- Haylock, D.N., and Nilsson, S.K. (2006). The role of hyaluronic acid in hemopoietic stem cell biology. *Regen Med* 1, 437-445.
- He, H., Liu, X., Peng, L., Gao, Z., Ye, Y., Su, Y., Zhao, Q., Wang, K., Gong, Y., and He, F. (2013). Promotion of hepatic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on decellularized cell-deposited extracellular matrix. *Biomed Res Int* 2013, 406871.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M.A., *et al.* (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625-637.
- Herbert, K.E., Walkley, C.R., Winkler, I.G., Hendy, J., Olsen, G.H., Yuan, Y.D., Chandraratna, R.A., Prince, H.M., Levesque, J.P., and Purton, L.E. (2007). Granulocyte colony-stimulating factor and an RARalpha specific agonist, VTP195183, synergize to enhance the mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Transplantation* 83, 375-384.
- Hergeth, S.P., Aicher, W.K., Essl, M., Schreiber, T.D., Sasaki, T., and Klein, G. (2008). Characterization and functional analysis of osteoblast-derived fibulins in the human hematopoietic stem cell niche. *Exp Hematol* 36, 1022-1034.
- Hersel, U., Dahmen, C., and Kessler, H. (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24, 4385-4415.
- Hillenkamp, F., and Karas, M. (1990). Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* 193, 280-295.
- Hoggatt, J., and Pelus, L.M. (2011). Mobilization of hematopoietic stem cells from the bone marrow niche to the blood compartment. *Stem Cell Res Ther* 2, 13.
- Hoggatt, J., Speth, J.M., and Pelus, L.M. (2013). Concise review: Sowing the seeds of a fruitful harvest: hematopoietic stem cell mobilization. *Stem Cells* 31, 2599-2606.
- Holst, J., Watson, S., Lord, M.S., Eamegdool, S.S., Bax, D.V., Nivison-Smith, L.B., Kondyurin, A., Ma, L., Oberhauser, A.F., Weiss, A.S., *et al.* (2010). Substrate elasticity provides mechanical signals for the expansion of hemopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol* 28, 1123-1128.
- Hooper, A.T., Butler, J.M., Nolan, D.J., Kranz, A., Iida, K., Kobayashi, M., Kopp, H.G., Shido, K., Petit, I., Yanger, K., *et al.* (2009). Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. *Cell Stem Cell* 4, 263-274.
- Hosokawa, K., Arai, F., Yoshihara, H., Iwasaki, H., Nakamura, Y., Gomei, Y., and Suda, T. (2010). Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood* 116, 554-563.
- Hua, H., Li, M., Luo, T., Yin, Y., and Jiang, Y. (2011). Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell Mol Life Sci* 68, 3853-3868.
- Huebsch, N., Arany, P.R., Mao, A.S., Shvartsman, D., Ali, O.A., Bencherif, S.A., Rivera-Feliciano, J., and Mooney, D.J. (2010). Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater* 9, 518-526.
- Hughes, C.S., Postovit, L.M., and Lajoie, G.A. (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10, 1886-1890.
- Huh, C.G., Hakansson, K., Nathanson, C.M., Thorgeirsson, U.P., Jonsson, N., Grubb, A., Abrahamson, M., and Karlsson, S. (1999). Decreased metastatic spread in mice homozygous for a null allele of the cystatin C protease inhibitor gene. *Mol Pathol* 52, 332-340.
- Isern, J., Martin-Antonio, B., Ghazanfari, R., Martin, A.M., Lopez, J.A., del Toro, R., Sanchez-Aguilera, A., Arranz, L., Martin-Perez, D., Suarez-Lledo, M., *et al.* (2013). Self-renewing human bone marrow mesospheres promote hematopoietic stem cell expansion. *Cell Rep* 3, 1714-1724.
- Itoh, Y., and Seiki, M. (2006). MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol* 206, 1-8.

- Jacks, T., and Weinberg, R.A. (2002). Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. *Cell* *111*, 923-925.
- Jalili, A., Shirvaikar, N., Marquez-Curtis, L.A., Turner, A.R., and Janowska-Wieczorek, A. (2010). The HGF/c-Met axis synergizes with G-CSF in the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev* *19*, 1143-1151.
- Janowska-Wieczorek, A., Marquez, L.A., Matsuzaki, A., Hashmi, H.R., Larratt, L.M., Boshkov, L.M., Turner, A.R., Zhang, M.C., Edwards, D.R., and Kossakowska, A.E. (1999). Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and -2) in acute myelogenous leukaemia blasts: comparison with normal bone marrow cells. *Br J Haematol* *105*, 402-411.
- Janowski, M. (2009). Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell Adh Migr* *3*, 243-249.
- Jiang, Y., Bonig, H., Ulyanova, T., Chang, K., and Papayannopoulou, T. (2009). On the adaptation of endosteal stem cell niche function in response to stress. *Blood* *114*, 3773-3782.
- Jing, Y., and Jian-Xiong, Y. (2011). 3-D spheroid culture of bone marrow mesenchymal stem cell of rhesus monkey with improved multi-differentiation potential to epithelial progenitors and neuron in vitro. *Clin Experiment Ophthalmol* *39*, 808-819.
- Jung, Y., Wang, J., Schneider, A., Sun, Y.X., Koh-Paige, A.J., Osman, N.I., McCauley, L.K., and Taichman, R.S. (2006). Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* *38*, 497-508.
- Kadereit, S., Deeds, L.S., Haynesworth, S.E., Koc, O.N., Kozik, M.M., Szekely, E., Daum-Woods, K., Goetchius, G.W., Fu, P., Welniak, L.A., *et al.* (2002). 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* *20*, 573-582.
- Kalatskaya, I., Berchiche, Y.A., Gravel, S., Limberg, B.J., Rosenbaum, J.S., and Heveker, N. (2009). AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol* *75*, 1240-1247.
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* *124*, 407-421.
- Kekre, N., and Antin, J.H. (2014). Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood* *124*, 334-343.
- Kessenbrock, K., Wang, C.Y., and Werb, Z. (2015). Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biol* *44-46C*, 184-190.
- Kfoury, Y., and Scadden, D.T. (2015). Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell* *16*, 239-253.
- Kiel, M.J., Acar, M., Radice, G.L., and Morrison, S.J. (2009). Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell* *4*, 170-179.
- Kiel, M.J., and Morrison, S.J. (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* *8*, 290-301.
- Kiel, M.J., Radice, G.L., and Morrison, S.J. (2007). Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell* *1*, 204-217.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* *121*, 1109-1121.
- Kilian, K.A., Bugarija, B., Lahn, B.T., and Mrksich, M. (2010). Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 4872-4877.
- Kimura, S., Roberts, A.W., Metcalf, D., and Alexander, W.S. (1998). Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 1195-1200.
- Klein, G., Beck, S., and Müller, C.A. (1993). Tenascin is a cytoadhesive extracellular matrix component of the human hematopoietic microenvironment. *J Cell Biol* *123*, 1027-1035.
- Klein, G., Conzelmann, S., Beck, S., Timpl, R., and Müller, C.A. (1995a). Perlecan in human bone marrow: a growth-factor-presenting, but anti-adhesive, extracellular matrix component for hematopoietic cells. *Matrix Biol* *14*, 457-465.

- Klein, G., Kibler, C., Schermutzki, F., Brown, J., Müller, C.A., and Timpl, R. (1998). Cell binding properties of collagen type XIV for human hematopoietic cells. *Matrix Biol* 16, 307-317.
- Klein, G., Müller, C.A., Tillet, E., Chu, M.L., and Timpl, R. (1995b). Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood* 86, 1740-1748.
- Klein, G., Schmal, O., and Aicher, W.K. (2015). Matrix metalloproteinases in stem cell mobilization. *Matrix Biol* 44-46C, 175-183.
- Klemencic, I., Carmona, A.K., Cezari, M.H., Juliano, M.A., Juliano, L., Guncar, G., Turk, D., Krizaj, I., Turk, V., and Turk, B. (2000). Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *Eur J Biochem* 267, 5404-5412.
- Kollet, O., Dar, A., Shvitiel, S., Kalinkovich, A., Lapid, K., Sztainberg, Y., Tesio, M., Samstein, R.M., Goichberg, P., Spiegel, A., *et al.* (2006). Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 12, 657-664.
- Kondo, M., Wagers, A.J., Manz, M.G., Prohaska, S.S., Scherer, D.C., Beilhack, G.F., Shizuru, J.A., and Weissman, I.L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 21, 759-806.
- Kos, J., Stabuc, B., Schweiger, A., Krasovec, M., Cimerman, N., Kopitar-Jerala, N., and Vrhovec, I. (1997). Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 3, 1815-1822.
- Kos, J., Werle, B., Lah, T., and Brunner, N. (2000). Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Int J Biol Markers* 15, 84-89.
- Kronenwett, R., Martin, S., and Haas, R. (2000). The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells* 18, 320-330.
- Kuester, D., Lippert, H., Roessner, A., and Krueger, S. (2008). The cathepsin family and their role in colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 204, 491-500.
- Kurth, I., Franke, K., Pompe, T., Bornhauser, M., and Werner, C. (2011). Extracellular matrix functionalized microcavities to control hematopoietic stem and progenitor cell fate. *Macromol Biosci* 11, 739-747.
- Langerholc, T., Zavasnik-Bergant, V., Turk, B., Turk, V., Abrahamson, M., and Kos, J. (2005). Inhibitory properties of cystatin F and its localization in U937 promonocyte cells. *FEBS J* 272, 1535-1545.
- Lapidot, T., and Petit, I. (2002). Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 30, 973-981.
- Laterza, O.F., Price, C.P., and Scott, M.G. (2002). Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem* 48, 699-707.
- Laurent-Matha, V., Huesgen, P.F., Masson, O., Derocq, D., Prebois, C., Gary-Bobo, M., Lecaille, F., Rebiere, B., Meurice, G., Orear, C., *et al.* (2012). Proteolysis of cystatin C by cathepsin D in the breast cancer microenvironment. *FASEB J* 26, 5172-5181.
- Lee-Thedieck, C., Rauch, N., Fiammengo, R., Klein, G., and Spatz, J.P. (2012). Impact of substrate elasticity on human hematopoietic stem and progenitor cell adhesion and motility. *J Cell Sci* 125, 3765-3775.
- Lee, J., and Kotov, N.A. (2009). Notch ligand presenting acellular 3D microenvironments for ex vivo human hematopoietic stem-cell culture made by layer-by-layer assembly. *Small* 5, 1008-1013.
- Lee, S., Im, S.A., Yoo, E.S., Nam, E.M., Lee, M.A., Ahn, J.Y., Huh, J.W., Kim, D.Y., Lee, S.N., Kim, M.J., *et al.* (2000). Mobilization kinetics of CD34(+) cells in association with modulation of CD44 and CD31 expression during continuous intravenous administration of G-CSF in normal donors. *Stem Cells* 18, 281-286.
- Leeman, M.F., Curran, S., and Murray, G.I. (2002). The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37, 149-166.
- Leisten, I., Kramann, R., Ventura Ferreira, M.S., Bovi, M., Neuss, S., Ziegler, P., Wagner, W., Knuchel, R., and Schneider, R.K. (2012). 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials* 33, 1736-1747.

- Lenarcic, B., Krasovec, M., Ritonja, A., Olafsson, I., and Turk, V. (1991). Inactivation of human cystatin C and kininogen by human cathepsin D. *FEBS Lett* 280, 211-215.
- Leung-Tack, J., Tavera, C., Martinez, J., and Colle, A. (1990). Neutrophil chemotactic activity is modulated by human cystatin C, an inhibitor of cysteine proteases. *Inflammation* 14, 247-258.
- Levesque, J.P., Hendy, J., Takamatsu, Y., Simmons, P.J., and Bendall, L.J. (2003a). Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 111, 187-196.
- Levesque, J.P., Hendy, J., Takamatsu, Y., Williams, B., Winkler, I.G., and Simmons, P.J. (2002). Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol* 30, 440-449.
- Levesque, J.P., Hendy, J., Winkler, I.G., Takamatsu, Y., and Simmons, P.J. (2003b). Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 31, 109-117.
- Levesque, J.P., Liu, F., Simmons, P.J., Betsuyaku, T., Senior, R.M., Pham, C., and Link, D.C. (2004). Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood* 104, 65-72.
- Levesque, J.P., Takamatsu, Y., Nilsson, S.K., Haylock, D.N., and Simmons, P.J. (2001). Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 98, 1289-1297.
- Li, G., Zhang, X.A., Wang, H., Wang, X., Meng, C.L., Chan, C.Y., Yew, D.T., Tsang, K.S., Li, K., Tsai, S.N., *et al.* (2009). Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: implication in the migration. *Proteomics* 9, 20-30.
- Li, J.J., Huang, Y.Q., Basch, R., and Karpatkin, S. (2001). Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets. *Thromb Haemost* 85, 204-206.
- Li, P., and Zon, L.I. (2010). Resolving the controversy about N-cadherin and hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 199-202.
- Liles, W.C., Rodger, E., Broxmeyer, H.E., Dehner, C., Badel, K., Calandra, G., Christensen, J., Wood, B., Price, T.H., and Dale, D.C. (2005). Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion* 45, 295-300.
- Lin, R.Z., and Chang, H.Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 3, 1172-1184.
- Liu, Y., Howard, D., Rector, K., Swiderski, C., Brandon, J., Schook, L., Mehta, J., Bryson, J.S., Bondada, S., and Liang, Y. (2012). Latexin is down-regulated in hematopoietic malignancies and restoration of expression inhibits lymphoma growth. *PLoS One* 7, e44979.
- Lucas, D., Battista, M., Shi, P.A., Isola, L., and Frenette, P.S. (2008). Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell* 3, 364-366.
- Ma, Y.D., Park, C., Zhao, H., Oduro, K.A., Jr., Tu, X., Long, F., Allen, P.M., Teitelbaum, S.L., and Choi, K. (2009). Defects in osteoblast function but no changes in long-term repopulating potential of hematopoietic stem cells in a mouse chronic inflammatory arthritis model. *Blood* 114, 4402-4410.
- Magister, S., and Kos, J. (2013). Cystatins in immune system. *J Cancer* 4, 45-56.
- Mancini, S.J., Mantei, N., Dumortier, A., Suter, U., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2005). Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 105, 2340-2342.
- Mansour, A., Abou-Ezzi, G., Sitnicka, E., Jacobsen, S.E., Wakkach, A., and Blin-Wakkach, C. (2012). Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *J Exp Med* 209, 537-549.

- Marquez-Curtis, L., Jalili, A., Deiteren, K., Shirvaikar, N., Lambeir, A.M., and Janowska-Wieczorek, A. (2008). Carboxypeptidase M expressed by human bone marrow cells cleaves the C-terminal lysine of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ : another player in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization? *Stem Cells* 26, 1211-1220.
- Martino, S., Tiribuzi, R., Ciraci, E., Makrypidi, G., D'Angelo, F., di Girolamo, I., Gritti, A., de Angelis, G.M., Papaccio, G., Sampaolesi, M., *et al.* (2011). Coordinated involvement of cathepsins S, D and cystatin C in the commitment of hematopoietic stem cells to dendritic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 775-783.
- Matsuoka, Y., Nakatsuka, R., Sumide, K., Kawamura, H., Takahashi, M., Fujioka, T., Uemura, Y., Asano, H., Sasaki, Y., Inoue, M., *et al.* (2015). Prospectively isolated human bone marrow cell-derived MSCs support primitive human CD34-negative hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 33, 1554-1565.
- Mazzon, C., Anselmo, A., Cibella, J., Soldani, C., Destro, A., Kim, N., Roncalli, M., Burden, S.J., Dustin, M.L., Sarukhan, A., *et al.* (2011). The critical role of agrin in the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 118, 2733-2742.
- McCall, M.D., Toso, C., Baetge, E.E., and Shapiro, A.M. (2010). Are stem cells a cure for diabetes? *Clin Sci (Lond)* 118, 87-97.
- McNiece, I., Harrington, J., Turney, J., Kellner, J., and Shpall, E.J. (2004). Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 6, 311-317.
- McQuibban, G.A., Butler, G.S., Gong, J.H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 276, 43503-43508.
- Mendez-Ferrer, S., Battista, M., and Frenette, P.S. (2010a). Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci* 1192, 139-144.
- Mendez-Ferrer, S., Chow, A., Merad, M., and Frenette, P.S. (2009). Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* 16, 235-242.
- Mendez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 452, 442-447.
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010b). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834.
- Mercier, F., Ragu, C., and Scadden, D. (2012). The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol* 12, 49-60.
- Minakata, K., and Asano, M. (1984). New protein inhibitors of cysteine proteinases in human saliva and salivary glands. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 365, 399-403.
- Miranda, H.C., Herai, R.H., Thome, C.H., Gomes, G.G., Panepucci, R.A., Orellana, M.D., Covas, D.T., Muotri, A.R., Greene, L.J., and Faca, V.M. (2012). A quantitative proteomic and transcriptomic comparison of human mesenchymal stem cells from bone marrow and umbilical cord vein. *Proteomics* 12, 2607-2617.
- Mitsunaga, K., Kikuchi, J., Wada, T., and Furukawa, Y. (2012). Latexin regulates the abundance of multiple cellular proteins in hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 227, 1138-1147.
- Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327-334.
- Mu, J., Li, X., Yuan, S., Zhang, J., and Bo, P. (2014). Comparative study of directional differentiation of human and mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Cell Biol Int* 38, 1098-1105.
- Müller-Esterl, W., Fritz, H., Kellermann, J., Lottspeich, F., Machleidt, W., and Turk, V. (1985). Genealogy of mammalian cysteine proteinase inhibitors. Common evolutionary origin of stefins, cystatins and kininogens. *FEBS Lett* 191, 221-226.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
- Nagasawa, T., Omatsu, Y., and Sugiyama, T. (2011). Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol* 32, 315-320.

- Nagase, H., Enghild, J.J., Suzuki, K., and Salvesen, G. (1990). Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry* 29, 5783-5789.
- Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562-573.
- Nakajima, H., Ito, M., Smookler, D.S., Shibata, F., Fukuchi, Y., Morikawa, Y., Ikeda, Y., Arai, F., Suda, T., Khokha, R., *et al.* (2010). TIMP-3 recruits quiescent hematopoietic stem cells into active cell cycle and expands multipotent progenitor pool. *Blood* 116, 4474-4482.
- Nakamura, A., Dohi, Y., Akahane, M., Ohgushi, H., Nakajima, H., Funaoka, H., and Takakura, Y. (2009). Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 15, 169-180.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460, 259-263.
- Nervi, B., Link, D.C., and DiPersio, J.F. (2006). Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem* 99, 690-705.
- Ni, J., Abrahamson, M., Zhang, M., Fernandez, M.A., Grubb, A., Su, J., Yu, G.L., Li, Y., Parmelee, D., Xing, L., *et al.* (1997). Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J Biol Chem* 272, 10853-10858.
- Ni, J., Fernandez, M.A., Danielsson, L., Chillakuru, R.A., Zhang, J., Grubb, A., Su, J., Gentz, R., and Abrahamson, M. (1998). Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 273, 24797-24804.
- Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Whitty, G.A., Williams, B., Webb, R.J., Denhardt, D.T., Bertocello, I., Bendall, L.J., Simmons, P.J., and Haylock, D.N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 106, 1232-1239.
- Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K.J., Harley, B., Mahoney, J.E., Park, S.Y., Lu, J., Protopopov, A., and Silberstein, L.E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* 15, 533-543.
- Ohta, M., Sakai, T., Saga, Y., Aizawa, S., and Saito, M. (1998). Suppression of hematopoietic activity in tenascin-C-deficient mice. *Blood* 91, 4074-4083.
- Olafsson, I., Thorsteinsson, L., and Jensson, O. (1996). The molecular pathology of hereditary cystatin C amyloid angiopathy causing brain hemorrhage. *Brain Pathol* 6, 121-126.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.
- Overall, C.M. (2002). Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol* 22, 51-86.
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221-233.
- Pallotta, I., Lovett, M., Kaplan, D.L., and Balduini, A. (2011). Three-dimensional system for the in vitro study of megakaryocytes and functional platelet production using silk-based vascular tubes. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 1223-1232.
- Pampaloni, F., Reynaud, E.G., and Stelzer, E.H. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 839-845.
- Patterson, M.L., Atkinson, S.J., Knauper, V., and Murphy, G. (2001). Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett* 503, 158-162.
- Pei, D., and Weiss, S.J. (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375, 244-247.
- Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., *et al.* (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283, 845-848.

- Pelus, L.M., Bian, H., Fukuda, S., Wong, D., Merzouk, A., and Salari, H. (2005). The CXCR4 agonist peptide, CTCE-0021, rapidly mobilizes polymorphonuclear neutrophils and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood and synergizes with granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 33, 295-307.
- Pennacchio, L.A., Lehesjoki, A.E., Stone, N.E., Willour, V.L., Virtaneva, K., Miao, J., D'Amato, E., Ramirez, L., Faham, M., Koskiniemi, M., *et al.* (1996). Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science* 271, 1731-1734.
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R.S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., *et al.* (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3, 687-694.
- Pierre, P., and Mellman, I. (1998). Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93, 1135-1145.
- Pinho, S., Lacombe, J., Hanoun, M., Mizoguchi, T., Bruns, I., Kunisaki, Y., and Frenette, P.S. (2013). PDGFR $\alpha$  and CD51 mark human nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J Exp Med* 210, 1351-1367.
- Pittenger, M.F., and Martin, B.J. (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95, 9-20.
- Podgorski, I., Linebaugh, B.E., Koblinski, J.E., Rudy, D.L., Herroon, M.K., Olive, M.B., and Sloane, B.F. (2009). Bone marrow-derived cathepsin K cleaves SPARC in bone metastasis. *Am J Pathol* 175, 1255-1269.
- Ponte, A.L., Ribeiro-Fleury, T., Chabot, V., Gouilleux, F., Langonne, A., Herault, O., Charbord, P., and Domenech, J. (2012). Granulocyte-colony-stimulating factor stimulation of bone marrow mesenchymal stromal cells promotes CD34+ cell migration via a matrix metalloproteinase-2-dependent mechanism. *Stem Cells Dev* 21, 3162-3172.
- Potter, S.W., and Morris, J.E. (1985). Development of mouse embryos in hanging drop culture. *Anat Rec* 211, 48-56.
- Pruijt, J.F., Fibbe, W.E., Laterveer, L., Pieters, R.A., Lindley, I.J., Paemen, L., Masure, S., Willemze, R., and Opdenakker, G. (1999). Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10863-10868.
- Puri, M.C., and Bernstein, A. (2003). Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12753-12758.
- Purton, L.E., and Scadden, D.T. (2008). The hematopoietic stem cell niche. In *StemBook* (Cambridge (MA)).
- Pusic, I., Jiang, S.Y., Landua, S., Uy, G.L., Rettig, M.P., Cashen, A.F., Westervelt, P., Vij, R., Abboud, C.N., Stockerl-Goldstein, K.E., *et al.* (2008). Impact of mobilization and remobilization strategies on achieving sufficient stem cell yields for autologous transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 1045-1056.
- Qi, J.H., Ebrahim, Q., Moore, N., Murphy, G., Claesson-Welsh, L., Bond, M., Baker, A., and Anand-Apte, B. (2003). A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 9, 407-415.
- Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C.D., Jensen, C.T., Antonchuk, J., Mansson, R., Thoren, L.A., Ekblom, M., Alexander, W.S., and Jacobsen, S.E. (2007). Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 671-684.
- Raic, A., Rodling, L., Kalbacher, H., and Lee-Thedieck, C. (2014). Biomimetic macroporous PEG hydrogels as 3D scaffolds for the multiplication of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials* 35, 929-940.
- Rifas, L., Kenney, J.S., Marcelli, M., Pacifici, R., Cheng, S.L., Dawson, L.L., and Avioli, L.V. (1995). Production of interleukin-6 in human osteoblasts and human bone marrow stromal cells: evidence that induction by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha is not regulated by ovarian steroids. *Endocrinology* 136, 4056-4067.

- Robinson, S.N., Pisarev, V.M., Chavez, J.M., Singh, R.K., and Talmadge, J.E. (2003). Use of matrix metalloproteinase (MMP)-9 knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or Flt-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment. *Stem Cells* 21, 417-427.
- Rossi, A., Deveraux, Q., Turk, B., and Sali, A. (2004). Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biol Chem* 385, 363-372.
- Ryan, M.A., Nattamai, K.J., Xing, E., Schleimer, D., Daria, D., Sengupta, A., Kohler, A., Liu, W., Gunzer, M., Jansen, M., *et al.* (2010). Pharmacological inhibition of EGFR signaling enhances G-CSF-induced hematopoietic stem cell mobilization. *Nat Med* 16, 1141-1146.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., *et al.* (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131, 324-336.
- Salvesen, G., Parkes, C., Abrahamson, M., Grubb, A., and Barrett, A.J. (1986). Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem J* 234, 429-434.
- Santini, M.T., Rainaldi, G., and Indovina, P.L. (2000). Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit Rev Oncol Hematol* 36, 75-87.
- Scheele, S., Nystrom, A., Durbeej, M., Talts, J.F., Ekblom, M., and Ekblom, P. (2007). Laminin isoforms in development and disease. *J Mol Med (Berl)* 85, 825-836.
- Schepers, K., Campbell, T.B., and Passegue, E. (2015). Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* 16, 254-267.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.
- Schreiber, T.D., Steinl, C., Essl, M., Abele, H., Geiger, K., Müller, C.A., Aicher, W.K., and Klein, G. (2009). The integrin alpha9beta1 on hematopoietic stem and progenitor cells: involvement in cell adhesion, proliferation and differentiation. *Haematologica* 94, 1493-1501.
- Schulte, S., Sun, J., Libby, P., Macfarlane, L., Sun, C., Lopez-Illasaca, M., Shi, G.P., and Sukhova, G.K. (2010). Cystatin C deficiency promotes inflammation in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurisms in atherosclerotic mice. *Am J Pathol* 177, 456-463.
- Schulz, J.C., Stumpf, P.S., Katsen-Globa, A., Sachinidis, A., Hescheler, J., and Zimmermann, H. (2012). First steps towards the successful surface-based cultivation of human embryonic stem cells in hanging drop systems. *Eng Life Sci* 12, 584-587.
- Seiffert, M., Beck, S.C., Schermtzki, F., Müller, C.A., Erickson, H.P., and Klein, G. (1998). Mitogenic and adhesive effects of tenascin-C on human hematopoietic cells are mediated by various functional domains. *Matrix Biol* 17, 47-63.
- Seliktar, D. (2012). Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. *Science* 336, 1124-1128.
- Sharma, M.B., Limaye, L.S., and Kale, V.P. (2012). Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. *Haematologica* 97, 651-660.
- Shen, Y., Winkler, I.G., Barbier, V., Sims, N.A., Hendy, J., and Levesque, J.P. (2010). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) regulates hematopoiesis and bone formation in vivo. *PLoS One* 5, e13086.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Shirvaikar, N., Marquez-Curtis, L.A., Shaw, A.R., Turner, A.R., and Janowska-Wieczorek, A. (2010). MT1-MMP association with membrane lipid rafts facilitates G-CSF--induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Exp Hematol* 38, 823-835.
- Siler, U., Rousselle, P., Müller, C.A., and Klein, G. (2002). Laminin gamma2 chain as a stromal cell marker of the human bone marrow microenvironment. *Br J Haematol* 119, 212-220.
- Siler, U., Seiffert, M., Puch, S., Richards, A., Torok-Storb, B., Müller, C.A., Sorokin, L., and Klein, G. (2000). Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood* 96, 4194-4203.

- Sokol, J.P., Neil, J.R., Schiemann, B.J., and Schiemann, W.P. (2005). The use of cystatin C to inhibit epithelial-mesenchymal transition and morphological transformation stimulated by transforming growth factor-beta. *Breast Cancer Res* 7, R844-853.
- Sokol, J.P., and Schiemann, W.P. (2004). Cystatin C antagonizes transforming growth factor beta signaling in normal and cancer cells. *Mol Cancer Res* 2, 183-195.
- Sotiropoulou, G., Anisowicz, A., and Sager, R. (1997). Identification, cloning, and characterization of cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer. *J Biol Chem* 272, 903-910.
- Spiegel, A., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Ludin, A., Netzer, N., Goichberg, P., Azaria, Y., Resnick, I., Hardan, I., Ben-Hur, H., *et al.* (2007). Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat Immunol* 8, 1123-1131.
- Starckx, S., Van den Steen, P.E., Wuyts, A., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2002). Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization. *Leuk Lymphoma* 43, 233-241.
- Staudt, N.D., Aicher, W.K., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Carmona, A.K., Bogyo, M., and Klein, G. (2010). Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts. *Haematologica* 95, 1452-1460.
- Staudt, N.D., Maurer, A., Spring, B., Kalbacher, H., Aicher, W.K., and Klein, G. (2012). Processing of CXCL12 by different osteoblast-secreted cathepsins. *Stem Cells Dev* 21, 1924-1935.
- Steinl, C., Essl, M., Schreiber, T.D., Geiger, K., Prokop, L., Stevanovic, S., Potz, O., Abele, H., Wessels, J.T., Aicher, W.K., *et al.* (2013). Release of matrix metalloproteinase-8 during physiological trafficking and induced mobilization of human hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dev* 22, 1307-1318.
- Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N., and Scadden, D.T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 99, 2369-2378.
- Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grunewald, E., Cheng, T., Dombkowski, D., Calvi, L.M., Rittling, S.R., *et al.* (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 201, 1781-1791.
- Stralberg, F., Henning, P., Gjertsson, I., Kindlund, B., Souza, P.P., Persson, E., Abrahamson, M., Kasprzykowski, F., Grubb, A., and Lerner, U.H. (2013). Cysteine proteinase inhibitors regulate human and mouse osteoclastogenesis by interfering with RANK signaling. *FASEB J* 27, 2687-2701.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977-988.
- Sun, H.J., Bahk, Y.Y., Choi, Y.R., Shim, J.H., Han, S.H., and Lee, J.W. (2006). A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. *J Orthop Res* 24, 2059-2071.
- Sun, Q. (1989). Growth stimulation of 3T3 fibroblasts by cystatin. *Exp Cell Res* 180, 150-160.
- Sungaran, R., Markovic, B., and Chong, B.H. (1997). Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* 89, 101-107.
- Taichman, R.S., and Emerson, S.G. (1994). Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med* 179, 1677-1682.
- Taupin, P., Ray, J., Fischer, W.H., Suhr, S.T., Hakansson, K., Grubb, A., and Gage, F.H. (2000). FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron* 28, 385-397.
- Tavera, C., Leung-Tack, J., Prevot, D., Gensac, M.C., Martinez, J., Fulcrand, P., and Colle, A. (1992). Cystatin C secretion by rat glomerular mesangial cells: autocrine loop for in vitro growth-promoting activity. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 1082-1088.

- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* *81*, 801-809.
- Thibault, R.A., Scott Baggett, L., Mikos, A.G., and Kasper, F.K. (2010). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements. *Tissue Eng Part A* *16*, 431-440.
- Tholen, S., Biniossek, M.L., Gansz, M., Ahrens, T.D., Schlimpert, M., Kizhakkedathu, J.N., Reinheckel, T., and Schilling, O. (2014). Double deficiency of cathepsins B and L results in massive secretome alterations and suggests a degradative cathepsin-MMP axis. *Cell Mol Life Sci* *71*, 899-916.
- Till, J.E., McCulloch, E.A., and Siminovitch, L. (1964). A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *51*, 29-36.
- Tumminello, F.M., Badalamenti, G., Incorvaia, L., Fulfaro, F., D'Amico, C., and Leto, G. (2009). Serum interleukin-6 in patients with metastatic bone disease: correlation with cystatin C. *Med Oncol* *26*, 10-15.
- Tung, Y.C., Hsiao, A.Y., Allen, S.G., Torisawa, Y.S., Ho, M., and Takayama, S. (2011). High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* *136*, 473-478.
- Turk, B., Turk, D., and Salvesen, G.S. (2002). Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des* *8*, 1623-1637.
- Turk, V., and Bode, W. (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* *285*, 213-219.
- Turk, V., and Turk, B. (2008). Lysosomal cysteine proteases and their protein inhibitors: recent developments. *Acta Chimica Slovenica* *55*, 727-738.
- Turk, V., Turk, B., and Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* *20*, 4629-4633.
- Ulyanova, T., Priestley, G.V., Nakamoto, B., Jiang, Y., and Papayannopoulou, T. (2007). VCAM-1 ablation in nonhematopoietic cells in MxCre+ VCAM-1f/f mice is variable and dictates their phenotype. *Exp Hematol* *35*, 565-571.
- Vagima, Y., Avigdor, A., Goichberg, P., Shvitiel, S., Tesio, M., Kalinkovich, A., Golan, K., Dar, A., Kollet, O., Petit, I., *et al.* (2009). MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. *J Clin Invest* *119*, 492-503.
- Vagima, Y., Lapid, K., Kollet, O., Goichberg, P., Alon, R., and Lapidot, T. (2011). Pathways implicated in stem cell migration: the SDF-1/CXCR4 axis. *Methods Mol Biol* *750*, 277-289.
- van Pel, M., van Os, R., Velders, G.A., Hagoort, H., Heegaard, P.M., Lindley, I.J., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (2006). Serpinal is a potent inhibitor of IL-8-induced hematopoietic stem cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 1469-1474.
- Varnum-Finney, B., Purton, L.E., Yu, M., Brashem-Stein, C., Flowers, D., Staats, S., Moore, K.A., Le Roux, I., Mann, R., Gray, G., *et al.* (1998). The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* *91*, 4084-4091.
- Verfaillie, C.M. (1998). Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood* *92*, 2609-2612.
- Via, A.G., Frizziero, A., and Oliva, F. (2012). Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles Ligaments Tendons J* *2*, 154-162.
- Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J., and Aguila, H.L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* *103*, 3258-3264.
- Vizin, T., Christensen, I.J., Nielsen, H.J., and Kos, J. (2012). Cathepsin X in serum from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Radiol Oncol* *46*, 207-212.
- Vogel, W., Kanz, L., Brugger, W., Berndt, A., and Kosmehl, H. (1999). Expression of laminin beta2 chain in normal human bone marrow. *Blood* *94*, 1143-1145.
- Vray, B., Hartmann, S., and Hoebeke, J. (2002). Immunomodulatory properties of cystatins. *Cell Mol Life Sci* *59*, 1503-1512.

- Wallin, H., Bjarnadottir, M., Vogel, L.K., Wasselius, J., Ekstrom, U., and Abrahamson, M. (2010). Cystatins--Extra- and intracellular cysteine protease inhibitors: High-level secretion and uptake of cystatin C in human neuroblastoma cells. *Biochimie* 92, 1625-1634.
- Wang, L.D., and Wagers, A.J. (2011). Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 643-655.
- Wang, W., Itaka, K., Ohba, S., Nishiyama, N., Chung, U.I., Yamasaki, Y., and Kataoka, K. (2009). 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 30, 2705-2715.
- Wegiel, B., Jiborn, T., Abrahamson, M., Helczynski, L., Otterbein, L., Persson, J.L., and Bjartell, A. (2009). Cystatin C is downregulated in prostate cancer and modulates invasion of prostate cancer cells via MAPK/Erk and androgen receptor pathways. *PLoS One* 4, e7953.
- Wein, F., Pietsch, L., Saffrich, R., Wuchter, P., Walenda, T., Bork, S., Horn, P., Diehlmann, A., Eckstein, V., Ho, A.D., *et al.* (2010). N-cadherin is expressed on human hematopoietic progenitor cells and mediates interaction with human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res* 4, 129-139.
- Welniak, L.A., Blazar, B.R., and Murphy, W.J. (2007). Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 25, 139-170.
- Williams, D.A., Rios, M., Stephens, C., and Patel, V.P. (1991). Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions. *Nature* 352, 438-441.
- Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6, 93-106.
- Winkler, I.G., Barbier, V., Nowlan, B., Jacobsen, R.N., Forristal, C.E., Patton, J.T., Magnani, J.L., and Levesque, J.P. (2012). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med* 18, 1651-1657.
- Winkler, I.G., Hendy, J., Coughlin, P., Horvath, A., and Levesque, J.P. (2005). Serine protease inhibitors *serpina1* and *serpina3* are down-regulated in bone marrow during hematopoietic progenitor mobilization. *J Exp Med* 201, 1077-1088.
- Winkler, I.G., Sims, N.A., Pettit, A.R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Poulton, I.J., van Rooijen, N., Alexander, K.A., Raggatt, L.J., *et al.* (2010). Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 116, 4815-4828.
- Yamaguchi, A., Komori, T., and Suda, T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and *Cbfa1*. *Endocr Rev* 21, 393-411.
- Yao, H., Miura, Y., Yoshioka, S., Miura, M., Hayashi, Y., Tamura, A., Iwasa, M., Sato, A., Hishita, T., Higashi, Y., *et al.* (2014). Parathyroid hormone enhances hematopoietic expansion via upregulation of cadherin-11 in bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 32, 2245-2255.
- Ylostalo, J.H., Bartosh, T.J., Tiblow, A., and Prockop, D.J. (2014). Unique characteristics of human mesenchymal stromal/progenitor cells pre-activated in 3-dimensional cultures under different conditions. *Cytotherapy* 16, 1486-1500.
- Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K., *et al.* (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 1, 685-697.
- Yu, W., Liu, J., Shi, M.A., Wang, J., Xiang, M., Kitamoto, S., Wang, B., Sukhova, G.K., Murphy, G.F., Orasanu, G., *et al.* (2010). Cystatin C deficiency promotes epidermal dysplasia in K14-HPV16 transgenic mice. *PLoS One* 5, e13973.
- Zeeuwen, P.L., Ishida-Yamamoto, A., van Vlijmen-Willems, I.M., Cheng, T., Bergers, M., Iizuka, H., and Schalkwijk, J. (2007). Colocalization of cystatin M/E and cathepsin V in lamellar granules and corneodesmosomes suggests a functional role in epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 127, 120-128.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.

- Zhang, Y., Chai, C., Jiang, X.S., Teoh, S.H., and Leong, K.W. (2006). Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 12, 2161-2170.
- Zheng, Y., Watanabe, N., Nagamura-Inoue, T., Igura, K., Nagayama, H., Tojo, A., Tanosaki, R., Takaue, Y., Okamoto, S., and Takahashi, T.A. (2003). Ex vivo manipulation of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells with recombinant human stem cell factor can up-regulate levels of homing-essential molecules to increase their transmigratory potential. *Exp Hematol* 31, 1237-1246.
- Zirafi, O., Kim, K.A., Standker, L., Mohr, K.B., Sauter, D., Heigele, A., Kluge, S.F., Wiercinska, E., Chudziak, D., Richter, R., *et al.* (2015). Discovery and characterization of an endogenous CXCR4 antagonist. *Cell Rep* 11, 737-747.
- Zitka, O., Kukacka, J., Krizkova, S., Huska, D., Adam, V., Masarik, M., Prusa, R., and Kizek, R. (2010). Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem* 17, 3751-3768.
- Zore, I., Krasovec, M., Cimerman, N., Kuhelj, R., Werle, B., Nielsen, H.J., Brunner, N., and Kos, J. (2001). Cathepsin B/cystatin C complex levels in sera from patients with lung and colorectal cancer. *Biol Chem* 382, 805-810.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AP	Alkalische Phosphatase
APMA	4-Aminophenylmercuriacetat
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BCECF	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(6)-Carboxyfluorescein
BCIP/NBT	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
BFU-E	Burst-forming unit-erythrocyte
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-Propansulfonsäure
CAR-Zelle	CXCL12-abundante retikuläre Zelle
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CFU	Kolonie-bildende Einheit (colony-forming unit)
CFU-GEMM	Colony-forming unit-granulocyte/erythrocyte/macrophage/megakaryocyte
CFU-GM	Colony-forming unit-granulocyte/macrophage
CM	Conditioned medium
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CXCR4	CXC chemokine receptor 4
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECGS	Endothelial cell growth supplement
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoetin
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FBS	Fötales bovines Serum
for	forward
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
GMP	Good medical practice
HDA	Hanging drop array
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPC	Hämatopoetische Vorläuferzelle (hematopoietic progenitor cell)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (hematopoietic stem cell)
HSPCs	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (hematopoietic stem and progenitor cells)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IF	Immunfluoreszenzfärbung
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbecco-Medium
kDa	Kilodalton
LF	Lipofectamine
Lin	Lineage
LM	Laminin
LT-HSC	Long-term repopulating HSC
MACS	Magnetically activated cell sorting
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung (matrix assisted laser desorption/ionization) mit Flugzeit-Analyse (time of flight)
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MEM	Minimum essential medium
MMP	Matrixmetalloproteinase

---

MSC	Mesenchymale Stamm-/Stromazelle (mesenchymal stem/stromal cell)
MT-MMP	Membranständige MMP (membrane type-MMP)
m/z	Masse/Ladung
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NE	Neutrophile Elastase
NEAA	Non-essential amino acids
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP1	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTH	Parathormon
RECK	Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs
rev	reverse
RFU	Relative fluorescence unit
Rh	Rekombinant, human
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SCF	Stem cell factor
SD	Standard deviation
SDF-1 $\alpha$	Stromal-cell derived factor-1 $\alpha$
SDS	Sodium dodecylsulfate
SEM	Scanning electron microscopy
SFEM	Serum-free expansion medium
siRNA	Small interfering RNA
SNS	Sympathisches Nervensystem
TEM	Transmission electron microscopy
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

VEGF-R	Vascular endothelial growth factor-receptor
VLA4	Very late antigen 4
WB	Western Blot
Z-GPR-AMC	Benzyloxycarbonyl-Glycin-Prolin-Arginin-7-Amino-4-Methylcoumarin
Z-RR-AMC	Benzyloxycarbonyl-Arginin-Arginin-7-Amino-4-Methylcoumarin

### **Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren**

<b>Aminosäure</b>	<b>3 Buchstaben</b>	<b>1 Buchstabe</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## Wissenschaftliche Beiträge

### Artikel

Klein, G., **Schmal, O.**, and Aicher, W.K. (2015).

Matrix metalloproteinases in stem cell mobilization. *Matrix Biol* 44-46C, 175-183.

**Schmal, O.**, Seifert, J., Schäffer, T.E., Walter, C.B., Aicher, W.K., Klein, G. (2015).

Hematopoietic stem and progenitor cell expansion in contact with mesenchymal stromal cells in a hanging drop model uncovers disadvantages of 3D culture. Submitted to *Stem Cells International*.

### Vorträge und Poster

**Schmal, O.**, Geiger, K., Aicher, W.K., Klein, G.

Secreted cystatins (cathepsin inhibitors) in the human hematopoietic stem cell niche.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Matrixbiologie (DGMB), Tübingen, 2013.

**Schmal, O.**, Aicher, W.K., Klein, G.

Secreted cystatins (cathepsin inhibitors) in the human hematopoietic stem cell niche.

Colloquium Glycobiology and Adult Stem Cells, Landesstiftung Baden-Württemberg, Bad Boll, 2013.

**Schmal, O.**, Seifert, J., Schäffer, T.E., Aicher, W.K., Klein, G.

Spheroids in hanging drops: Establishing a 3D model for the hematopoietic stem cell niche.

Kennenlernmeeting des Stem Cell Network Tübingen (SCeNT), Tübingen, 2014.

**Schmal, O.**, Seifert, J., Schäffer, T.E., Aicher, W.K., Klein, G.

Running against the dogma: 2D culture conditions may be advantageous for mimicking the hematopoietic stem cell niche.

2. Jahrestagung des German Stem Cell Network (GSCN), Heidelberg, 2014.

## Lebenslauf

Name	Olga Schmal
Geburtsdatum	09.11.1983
Geburtsort	Andreewka (Russland)
Seit 07/2012	<p><b>Promotion</b></p> <p>am Zentrum für Medizinische Forschung, Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie, Universitätsklinikum Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. G. Klein zum Thema „Humane hämatopoetische Stammzellen – Einflüsse von Proteinase, Inhibitoren und dreidimensionalen Kulturbedingungen“</p>
01/2012 – 03/2012	<p><b>Wissenschaftliche Angestellte</b></p> <p>in der Inneren Medizin I, Universitätsklinikum Tübingen</p>
07/2009 - 10/2011	<p><b>Wissenschaftliche Angestellte</b></p> <p>am Institut für Toxikologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg</p> <p>Mitarbeit am EU-geförderten Projekt „Predict-IV“</p>
03/2007 – 06/2009	<p><b>Stipendiatin</b></p> <p>der Studienstiftung des deutschen Volkes, Bonn</p>
10/2004 – 06/2009	<p><b>Studium der Biologie</b></p> <p>an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg</p> <p>Hauptfach: Pharmazeutische Biologie</p> <p>Nebenfächer: Zell- &amp; Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie</p> <p><b>Diplomarbeit</b> zum Thema „Untersuchungen zur Rolle von oxidativem Stress in der Kanzerogenität von Furan“</p>
06/2004	<p><b>Erwerb der allgemeinen Hochschulreife</b></p> <p>am Röntgen-Gymnasium Würzburg</p>