

# **Amplifizierung und Charakterisierung von humanen hämatopoetischen Stammzellen im optimierten 3D Modell**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades**

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Lisa Marx-Blümel**

**geboren am 03.08.1990 in Jena**



## **Gutachter**

(akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)

1. Prof. Dr. James F. Beck, Jena
2. Prof. Dr. Aria Baniahamad, Jena
3. Prof. Dr. Oliver H. Krämer, Mainz

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.11.2022

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Zusammenfassung	1
2 <i>Summary</i>	3
3 Einleitung	5
3.1 Stammzellen in der Hämatopoese und Homöostase	5
3.2 Charakteristische Merkmale und Funktionen von HSCs	8
3.3 Stammzelltransplantationen mit hämatopoetischen Stammzellen	10
3.4 Möglichkeiten der <i>In-vitro</i> -Expansion von hämatopoetischen Stammzellen	12
3.4.1 3D Kultivierungssysteme zur Vermehrung von hämatopoetischen Stammzellen	12
3.4.2 Optimierte Zellkulturbedingungen zur Vermehrung von hämatopoetischen Stammzellen	13
3.4.3 Molekulare Signalwege bei der Vermehrung von hämatopoetischen Stammzellen	15
4 Zusammenhang zum Thema der Dissertation und Ziele der Arbeit	17
5 Publierte Originaldaten	18
5.1 Übersicht zu den Manuskripten	18
5.2 Manuskripte	19
5.2.1 „ <i>Biomimetic reconstruction of the hematopoietic stem cell niche for in vitro amplification of human hematopoietic stem cells</i> “	19
5.2.2 „ <i>Molecular characterization of hematopoietic stem cells after in vitro amplification on biomimetic 3D PDMS cell culture scaffolds</i> “	21
6 Diskussion	23
6.1 Transplantation mit hämatopoetischen Stammzellen	23
6.1 Möglichkeiten zur <i>In-vitro</i> -Expansion humaner HSCs	25

6.2.1	Einsatz von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und chemischen Substanzen	25
6.2.2	Nachbildung der hämatopoetischen Stammzellnische	28
6.2.3	Vergleich mit bereits beschriebenen Methoden zur <i>In-vitro</i> -Kultivierung	33
6.3	Einfluss der Kultivierung auf intrazelluläre Signalwege	36
7	Literaturverzeichnis	45
8	Anhang	51
8.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	51
8.2	Lebenslauf	51
8.3	Danksagung	54
8.4	Ehrenwörtliche Erklärung	56

## Abkürzungsverzeichnis

HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> , hämatopoetische Stammzelle
KM	Knochenmark
LT-HSCs	<i>long-term HSCs</i>
ST-HSCs	<i>short-term HSCs</i>
MPP	multipotente Progenitorzellen
MLP	<i>common myeloid progenitor</i> , myeloide Progenitorzellen
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i> , lymphoide Progenitorzellen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
CD	<i>cluster of differentiation</i> , charakteristische Oberflächenproteine
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
HSCT	<i>hematopoietic stem cell transplantation</i> , Stammzelltransplantation
3D	dreidimensional
VPA	Valproinsäure
SCF	<i>stem cell factor</i>
TPO	Thrombopoietin
FLT-3	<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
IL6	Interleukin 6
IL3	Interleukin 3
SR-1	Stemreginin-1
HDACi	Histondeacetylase Inhibitor
GSK3 $\beta$	Glykogensynthasekinase 3-beta
HoxB4	homeobox B4-Protein
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
AKT	Aktivierte Proteinkinase B
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	mTOR Komplex 1
mTORC2	mTOR Komplex 2
FOXO	<i>forkhead box O</i>
HIF1 $\alpha$	<i>hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>

GVHD	<i>graft-versus-host disease</i> , Spender gegen Wirt- Erkrankung
PS	Polystyrol
PDMS	Polydimethylsiloxan
SiOn	Siliziumoxid
CFU-Assay	<i>colony forming unit assay</i>
CFU-GEMM	<i>colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte</i>
BFU-E	<i>burst forming unit-erythrocyte</i>
2D	zweidimensional
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IL8	Interleukin 8

## 1 Zusammenfassung

Hämatopoetische Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, können in alle Typen von Blutzellen differenzieren und sind *in vivo* in der Stammzellnische des Knochenmarks (KM) zu finden. Neben zahlreichen Interaktionen der HSCs mit anderen dort ansässigen Zelltypen, spielen auch geometrische und physikalische Gegebenheiten im KM eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Stammzelleigenschaften. Da Blutzellen eine begrenzte Lebensdauer haben, müssen sie stetig durch Differenzierung von HSCs nachgebildet werden, um das hämatopoetische System zu erhalten. Daher werden HSCs auch für Stammzelltransplantationen (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) eingesetzt, einer Möglichkeit, anderweitig nicht behandelbare Krebserkrankungen oder nicht-maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems zu therapieren. Patienten profitieren dabei von hohen Mengen an transplantierten Stammzellen. Trotz stetiger Weiterentwicklung der HSCT stehen oft nicht genügend Stammzellen im Spendermaterial zur Verfügung, was den Erfolg der HSCTs deutlich verringert. Eine Möglichkeit diese Hürde zu überwinden, stellt die Nutzung eines *In-vitro*-Kultivierungssystems dar, welches die Proliferation von HSCs unter Erhalt ihrer Pluripotenz unterstützt. Äußere Einflüsse und intrinsische Signalwege beeinflussen maßgeblich die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von HSCs. Um die natürliche Stammzellnische *in vitro* nachzuahmen, entwickelten wir dreidimensionale (3D) Strukturen basierend auf dem Querschnitt eines humanen Röhrenknochens aus Polydimethylsiloxan (PDMS). Zur Verbesserung der Kultivierungsbedingungen optimierten wir das verwendete Zellkulturmedium durch Zugabe von verschiedenen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und des Histondeacetylase Inhibitors Valproinsäure. In Kombination mit unseren 3D PDMS-Strukturen konnte somit eine geeignete Möglichkeit geschaffen werden, um humane HSCs während 14-tägiger *In-vitro*-Kultivierung zu amplifizieren und gleichzeitig deren Pluripotenz und Fähigkeit zur Selbsterneuerung zu erhalten. Eine Beschichtung der 3D PDMS-Strukturen mit Siliziumoxid (SiO<sub>2</sub>) konnte die Ausbeuten an CD34<sup>+</sup>-Zellen zwar weiter signifikant steigern, jedoch wurden die unreifen *long-term* (LT)-HSCs am besten auf unbeschichteten 3D PDMS-Strukturen vermehrt. Damit übereinstimmend wurden in *colony forming unit assays* die meisten unreifen Kolonien von HSCs gebildet, die zuvor auf unbeschichteten 3D PDMS-Strukturen kultiviert wurden. Proteom- und

Transkriptomanalysen der HSCs, welche 14 Tage auf unbeschichteten 3D PDMS-Strukturen kultiviert wurden, zeigten Veränderungen des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, einhergehend mit einer Aktivierung von SREBP, HIF1 $\alpha$  und FOXO. Diese Aktivierung kann eine Expansion von HSCs begünstigen und steht im Zusammenhang mit dem Erhalt der Stammzeleigenschaften. Die SiOn-Beschichtung der 3D PDMS-Strukturen hingegen führte zu einer pro-inflammatorischen Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs und dadurch zu geringeren Ausbeuten an LT-HSCs. Zusammenfassend konnte durch die Kombination biotechnologischer wie auch zell- und molekularbiologischer Ansätze die Möglichkeit der *In-vitro*-Kultivierung humaner HSCs optimiert werden, einhergehend mit der Aktivierung von molekularen Signalwegen zur effektiven Amplifizierung undifferenzierter HSCs *in vitro*.

## **2 Summary**

Hematopoietic stem cells (HSCs) are characterized by their ability for self-renewal and to differentiate into all other types of blood cells. They reside within the bone marrow (BM), in the so-called stem cell niche. This stem cell niche has specific geometrical and physical features and offers close interactions with other cell types, which both supports the growth and maintenance of HSCs. Since blood cells have a short lifetime, HSCs are essential to recover the blood-forming system constantly by differentiation. Therefore, HSCs are also used for transplantation (HSCT), which is an option to cure patients suffering from high-risk cancers or non-malignant blood-borne diseases. Patients benefit from high numbers of transplanted stem cells and, *vice versa*, insufficient numbers of donor HSCs can impair the efficacy of HSCT. A promising strategy to overcome this hurdle is the use of an advanced *in vitro* culture system that supports the proliferation and, at the same time, maintains the pluripotency of HSCs. Environmental factors and intrinsic molecular signaling pathways influence the pluripotency maintenance of HSCs. To model the natural stem cell niche *in vitro*, we created artificial three-dimensional (3D) BM-like scaffolds made of polydimethylsiloxane (PDMS) based on the cross-section of a human long bone. To promote the amplification of high numbers of undifferentiated HSCs *in vitro*, we optimized the cell culture medium composition with a panel of cytokines, growth factors and the histone deacetylase inhibitor valproic acid. We confirmed that our 3D PDMS scaffolds in combination with the optimized HSC medium offered a suitable platform to amplify human HSCs during 14 days *in vitro* culture and, simultaneously, to support their pluripotency and ability for self-renewal. Silicon oxide (SiO<sub>2</sub>)-covering of PDMS structures further improved the amplification of CD34<sup>+</sup> cells, although the conservation of naïve long-term (LT)-HSCs was better on non-covered 3D PDMS scaffolds. Consistently, we found that HSCs cultivated on non-covered 3D PDMS generated most pluripotent colonies within colony forming unit assays. After 14 days *in vitro* cell culture, we performed transcriptome and proteome analyses to study alterations of molecular signaling pathways. Post-analysis of the data sets indicated that the growth of HSCs on non-covered 3D PDMS scaffolds altered PI3K/AKT/mTOR pathways by activation of SREBP, HIF1 $\alpha$  and FOXO signaling. This signaling pathway activation is associated with the expansion of HSCs and is involved in the maintenance of their pluripotency. In contrast, SiO<sub>2</sub>-covered 3D PDMS scaffolds induced a pro-

inflammatory response of the PI3K/AKT/mTOR pathway in cells, explaining the reduced amounts of LT-HSCs on these structures. In conclusion, by combining biological and biotechnological approaches, we successfully optimized *in vitro* HSCs culture conditions associated with an activation of key molecular signaling pathways to effectively amplify the numbers of undifferentiated HSCs *in vitro*.

### **3 Einleitung**

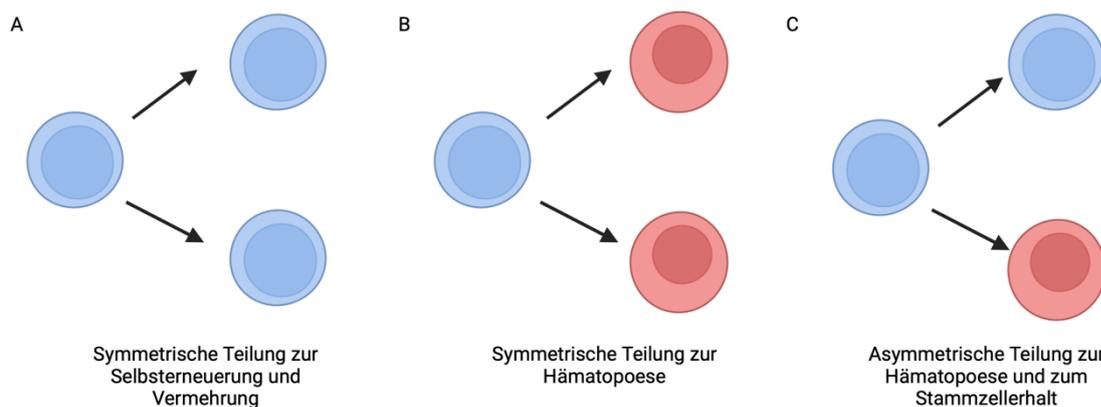
#### **3.1 Stammzellen in der Hämatopoese und Homöostase**

Stammzellen werden in embryonale und unterschiedliche Klassen adulter Stammzellen unterschieden. Dabei haben alle Stammzellen drei charakteristische Eigenschaften: (1) die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, (2) die Kapazität zu unbegrenzter Vermehrung und (3) die Fähigkeit, eine oder mehrere Linien differenzierter Zellen zu bilden (Prochazkova et al., 2015). Embryonale Stammzellen, welche kurz nach der Befruchtung aus Embryoblasten der Blastozysten hervorgehen, sind dadurch gekennzeichnet, dass sie noch alle Zellen eines Organismus bilden können und sind daher omnipotent (Prochazkova et al., 2015). Adulte Stammzellen sind auf einen spezifischen Zelltyp determiniert und können nicht mehr alle Zellen eines Organismus bilden, was als Pluripotenz, Unipotenz oder Multipotenz bezeichnet wird. Sie sind Teil eines spezifischen Gewebes (beziehungsweise Organs) und in der Lage, alle Zellen dieses Gewebes neu zu bilden, wodurch sie essentiell für den Gewebeaufbau nach der Geburt und den Geweberhalt im Erwachsenenalter sind (Prochazkova et al., 2015).

Da Blutzellen sehr kurzlebig sind, gibt es einen hohen Bedarf an funktionalen hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs), um diese fortwährend nachbilden zu können (Prochazkova et al., 2015). HSCs wurden erstmals in sich neubildenden hämatopoetischen Zellkolonien in der Milz letal bestrahlter Mäuse entdeckt, welchen das Knochenmark (KM) gesunder Tiere nach der Bestrahlung übertragen wurden (Cheng et al., 2020; Osawa et al., 1996). HSCs erneuern sich nach heutigem Wissenstand, so wie andere Formen adulter Stammzellen, in spezifischen Geweben. Sie sind ein Teil des KMs, wobei nur etwa eine von  $10^4$  Zellen im KM eine HSC ist (Prochazkova et al., 2015). Analog zu anderen adulten Stammzellen sind HSCs in der Lage, alle Zellen des blutbildenden Systems eines Organismus zu (re)generieren und haben zudem die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Orkin, 2000; Orkin and Zon, 2008; Walasek et al., 2012).

Die Regulation der Homöostase, der Selbsterneuerung von HSCs und der Bildung differenzierter Blutzellen (Hämatopoese) hängt dabei von den jeweiligen Umgebungsbedingungen ab, die als induktive Mikroumgebung, Stammzellnische oder Stammzellsynapse bezeichnet wird (Wilson and Trumpp, 2006). Einerseits teilen sich HSCs *in vivo* im Zuge ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung in effektiver Weise

symmetrisch, wobei zwei identische Tochterzellen gebildet werden, welche der ursprünglichen Stammzelle in ihren Eigenschaften der Pluripotenz entsprechen (Abbildung 1A). Dies geschieht vor allem während der Entwicklung des hämatopoetischen Systems in der fetalen Leber oder in der Stammzellnische im KM und dient der Vergrößerung des Stammzellpools. Es besteht auch die Möglichkeit, dass während der symmetrischen Teilung zwei differenzierte Zellen des blutbildenden Systems entstehen, die keine Stammzeleigenschaften mehr aufweisen (Abbildung 1B). Der Stammzellpool wird dabei verkleinert. Teilen sich HSCs jedoch asymmetrisch, entsteht je eine Stammzelle mit all ihren charakteristischen Merkmalen und eine differenzierte Zelle des blutbildenden Systems (Abbildung 1C). Der Stammzellpool wird dabei in seiner Größe aufrechterhalten (Walasek et al., 2012).

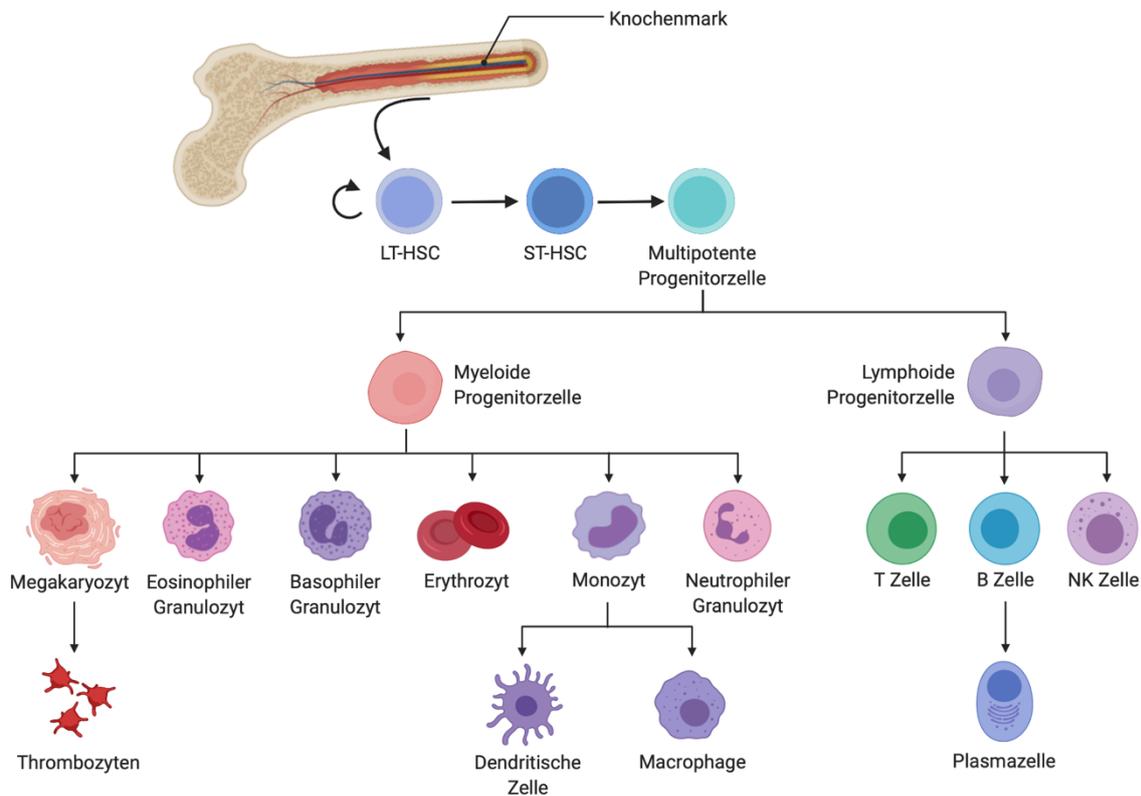


#### Abbildung 1: Möglichkeiten der Teilung von HSCs

HSCs können sich entweder symmetrisch (A, B) oder asymmetrisch (C) teilen. (A) Während der symmetrischen Teilung im Sinne der Selbsterneuerung entstehen zwei identische Tochterzellen, welche der ursprünglichen Stammzelle in ihren Eigenschaften der Pluripotenz entsprechen. (B) Während der symmetrischen Teilung, welche nicht im Sinne der Selbsterneuerung steht, können zwei differenzierte Progenitorzellen, welche keine Stammzeleigenschaften mehr besitzen, entstehen. (C) Kommt es zur asymmetrischen Teilung entstehen dabei eine zur ursprünglichen HSC identische Tochterzelle und eine differenzierte Progenitorzelle. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com nach (Walasek et al., 2012) erstellt.

Innerhalb der HSC-Population unterscheidet man zwischen den sehr unreifen, entweder ruhenden oder aktivierten *long-term* HSCs (LT-HSCs) und bereits determinierten *short-term* HSCs (ST-HSCs) (Cheng et al., 2020) (Abbildung 2). Im Gegensatz zu den sehr selten vorkommenden LT-HSCs haben die ST-HSCs nur ein sehr kurzfristiges Potenzial zur Repopularisierung des Blutsystems und differenzieren schnell weiter in multipotente Progenitorzellen (MPPs), myeloide (*common myeloid progenitor*, MLP) oder lymphoide Progenitorzellen (*common lymphoid progenitor*, CLP) (Abbildung 2). *In vitro* teilen sich HSCs selten symmetrisch im Sinne der

Selbsterneuerung. Es findet meist eine symmetrische Teilung in Zellen des blutbildenden Systems oder eine asymmetrische Teilung statt, wodurch spezifische Vorläuferzellen (Progenitorzellen) generiert werden, welche die Fähigkeit der Pluripotenz verloren haben (Walasek et al., 2012).



**Abbildung 2: Modell der adulten Hämatopoese im Menschen**

Die im KM ansässigen humanen LT-HSCs können sich symmetrisch oder asymmetrisch teilen, wodurch die kontinuierliche Bildung aller Zellen des blutbildenden Systems und der Erhalt des Stammzellpools gewährleistet wird. Im Zuge der Differenzierung entstehen aus LT-HSCs ST-HSCs, welche weiter in MPPs differenzieren. MPPs treten nachfolgend entweder in die myeloide oder in die lymphoide Linie der Hämatopoese ein. Aus der myeloiden Progenitorzelle können sich im Zuge der Blutbildung Granulozyten, Thrombozyten, Erythrozyten und Monozyten, aus welchen wiederum dendritische Zellen und Macrophagen entstehen, bilden. Die lymphoide Linie der Hämatopoese mit der lymphoiden Progenitorzelle zu Beginn bringt dahingegen T-, B- und natürliche Killerzellen (NK Zelle) sowie Plasmazellen hervor. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com nach (Cheng et al., 2020) erstellt.

Diese Progenitorzelltypen können nur noch in eine der beiden Linien der Hämatopoese weiter differenzieren. Bei der Myelopoese, welche ausschließlich im KM stattfindet, entstehen aus MLPs Erythrozyten, Thrombozyten, die verschiedenen Formen der Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen. Die Lymphopoese hingegen kommt auch außerhalb des KMs in lymphatischen Organen vor und bringt T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Plasmazellen aus CLPs hervor (Abbildung 2). Alle genannten Zelltypen exprimieren unterschiedliche und charakteristische Oberflächenproteine (z. B. *cluster of differentiation*, CDs) und lassen

sich anhand dieser, beispielsweise mittels Durchflusszytometrie nach immunologischer Markierung, voneinander unterscheiden und isolieren.

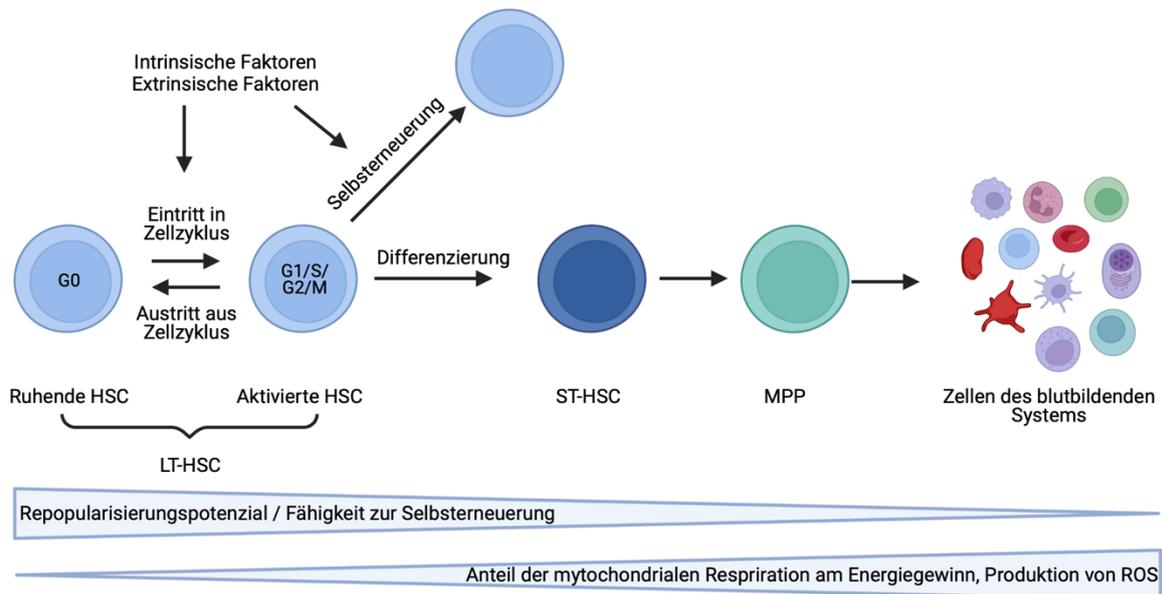
### **3.2 Charakteristische Merkmale und Funktionen von HSCs**

Alle HSCs tragen bis zu einem gewissen Differenzierungsgrad als spezifischen Oberflächenmarker das Antigen CD34. Die Unterfraktion der CD34<sup>+</sup>-LT-HSCs wird weiterhin durch das Vorhandensein der Oberflächenmarker CD90 und CD49f sowie durch die Abwesenheit der Oberflächenmarker CD38 und CD45RA charakterisiert. Diese Subfraktion, welche nach heutigem Kenntnisstand besonders wichtig für eine zügige Blutbildung im Patienten ist, besteht aus sehr unreifen Zellen mit einem hochkonservierten pluripotenten Charakter und einer ausgeprägten Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Laurenti and Gottgens, 2018). LT-HSCs existieren über die gesamte Lebenszeit eines Organismus hinweg und erneuern fortwährend das hämatopoetische System. Bei der Aktivierung ruhender LT-HSCs und einer sich möglicherweise anschließenden Differenzierung nimmt das Repopulationspotenzial und die Fähigkeit der Selbsterneuerung der LT-HSCs jedoch ab (Nakamura-Ishizu et al., 2014) (Abbildung 3). Die entstehenden ST-HSCs beziehungsweise MPPs können die Hämatopoese nur über einen kurzen Zeitraum aufrechterhalten, bevor deren Kapazität endet und sie weiter differenzieren (Challen et al., 2009). Die Veränderungen innerhalb der Zellpopulationen lassen sich anhand der Oberflächenmarker dokumentieren.

Darüber hinaus unterscheiden sich die unreifen LT-HSCs aber noch in anderen Punkten von den bereits weiter differenzierten ST-HSCs und MPPs. Ruhende LT-HSCs verweilen in einem inaktiven Status, der sogenannten G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus und teilen sich weder symmetrisch noch asymmetrisch. Da HSCs die gesamte Lebensdauer in einem Organismus existieren (müssen), muss die Balance zwischen Proliferation, Differenzierung und Ruhezustand streng kontrolliert und reguliert werden, um die Homöostase fortwährend zu gewährleisten und gleichzeitig die genomische Stabilität der LT-HSCs zu bewahren. Letztere könnte im Zuge von Fehlern/Mutationen während der Replikation im Zellzyklus und bei der Differenzierung geschädigt werden (Pietras et al., 2011).

Um die Selbsterneuerung oder die Bildung verschiedener differenzierter Blutzellen eines Organismus zu gewährleisten, sind LT-HSCs in der Lage, den G<sub>0</sub>-Status durch Eintritt in den Zellzyklus zu verlassen. Dieser Vorgang wird durch verschiedene

intrinsische und extrinsische Faktoren gesteuert und ist bis zu einem gewissen Punkt umkehrbar, sodass aktivierte LT-HSCs den Zellzyklus wieder verlassen und erneut in G0 eintreten können (Nakamura-Ishizu et al., 2014) (Abbildung 3).



### Abbildung 3: Stadien der Aktivierung und Differenzierung von HSCs

Ruhende LT-HSCs in G0 können aktiviert werden und in den Zellzyklus eintreten (G1/S/G2/M Phase), wobei abhängig von extrinsischen oder intrinsischen Faktoren eine Selbsterneuerung (symmetrische Selbsterneuerungs-Teilung) oder eine Differenzierung stattfindet. Aktivierte LT-HSCs können den Zellzyklus wieder verlassen und in den G0-Zustand zurückkehren. Im Zuge der Differenzierung entstehen ST-HSCs und MPPs. ST-HSCs haben ein geringes Repopularisierungspotenzial, können sich aber noch asymmetrisch teilen, wohingegen MPPs diese Fähigkeit vollständig verloren haben und in Blutzellen ausdifferenzieren (symmetrische Teilung). Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com nach (Nakamura-Ishizu et al., 2014) erstellt.

Ruhende LT-HSCs sind weiterhin durch einen sehr niedrigen Metabolismus charakterisiert, wobei ihre benötigte Energie weitestgehend durch aerobe Glykolyse erzeugt wird. Diese geringe Stoffwechselaktivität fördert den Stammzellerhalt durch eine limitierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). Im Zuge der Aktivierung von LT-HSCs kommt es zu einer Verschiebung ihres glykolytischen Metabolismus in Richtung mitochondrialer Respiration, was eine Vermehrung der Mitochondrien in den HSCs voraussetzt (Kumar and Geiger, 2017; Suda et al., 2011; Wilkinson and Yamazaki, 2018) (Abbildung 3). Durch die effizientere oxidative Energiegewinnung in Mitochondrien stehen den HSCs für die symmetrische oder asymmetrische Teilung zwar mehr Energie zur Verfügung, allerdings sind sie gleichzeitig auch größeren Mengen an ROS ausgesetzt, welche zu Mutationen (oxidative DNA-Schäden) und zu Schädigungen von Proteinen und Organellen der Stammzellen führen können.

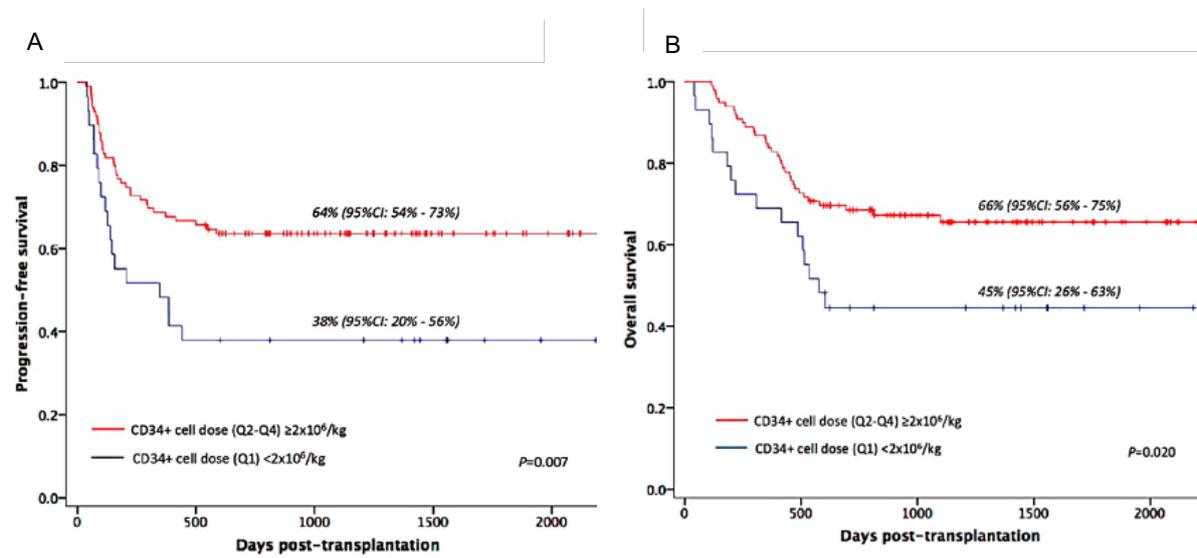
### 3. 3 Stammzelltransplantationen mit hämatopoetischen Stammzellen

Seit der Einführung der Stammzelltransplantation (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) in den späten 1950ern konnte das Behandlungsverfahren enorm verbessert werden und wurde so zu einer lebensrettenden Therapie für Patienten mit bestimmten, anderweitig nicht therapierbaren Hochrisiko-Krebserkrankungen, wie beispielsweise chronischen oder akuten Leukämien. Die HSCT wird zudem bei einem breiten Spektrum an nicht-malignen angeborenen und erworbenen Krankheiten, wie schweren Immundefekten (z.B. *severe combined immunodeficiency* beziehungsweise dem Wiskott Aldrich Syndrom), schwer verlaufenden hämatologischen Erkrankungen (z.B. beta-Thalassämia major oder der Sichelzellanämie) oder den erworbenen Formen schwerer aplastischer Anämien eingesetzt. Jährlich werden über 60.000 Patienten weltweit transplantiert und die Behandlungsverfahren werden dabei immer weiter verbessert (Gupta and Wagner, 2020; Niederwieser et al., 2016).

Ein vielversprechender Ansatz für eine effektive HSCT, besteht in der Transplantation großer Mengen an pluripotenten HSCs, um die Zeitspanne zwischen der Transplantation und immunologischer/hämatologischer Rekonstitution zu verkürzen (Chen et al., 2004). Transplantierte HSCs vermehren sich *in vivo* unter Beibehaltung ihrer Pluripotenz sehr effektiv und gehen dabei nicht *de novo* aus anderen Geweben des Empfängers hervor (Brecher et al., 1993; Lo Celso et al., 2009). Durch größere Mengen an transplantierten HSCs konnte ein besseres Überleben der Patienten beobachtet werden (Chen et al., 2004) (Abbildung 4).

HSCs lassen sich an verschiedenen Stellen aus gesunden Spendern isolieren. Dazu gehören das periphere Blut nach Mobilisierung des Spenders mittels Wachstumsfaktoren, das KM und Nabelschnurblut (Abbildung 5). Die Transplantate werden nach Isolation aus den Spendern anhand des Oberflächenmarkers CD34 mit HSCs und determinierten Vorläuferzellen angereichert. Diese Zellpopulation ist wichtig für eine erfolgreiche und effiziente Repopularisierung nach einer HSCT. Der Anteil an LT-HSCs spielt in diesem Zuge keine Rolle, da eine Anreicherung nach den charakteristischen Oberflächenmarkern dieser HSC-Subpopulation technisch sehr aufwendig ist, eine viel zu geringe Ausbeute erbringt und zusätzlich den Stammzellpool des Spenders zu sehr dezimieren würde. Nichtsdestotrotz können oftmals nur geringe Mengen an CD34+-HSCs von einem Spender während einer Stammzellsammlung gewonnen werden, unabhängig von dem angewandten

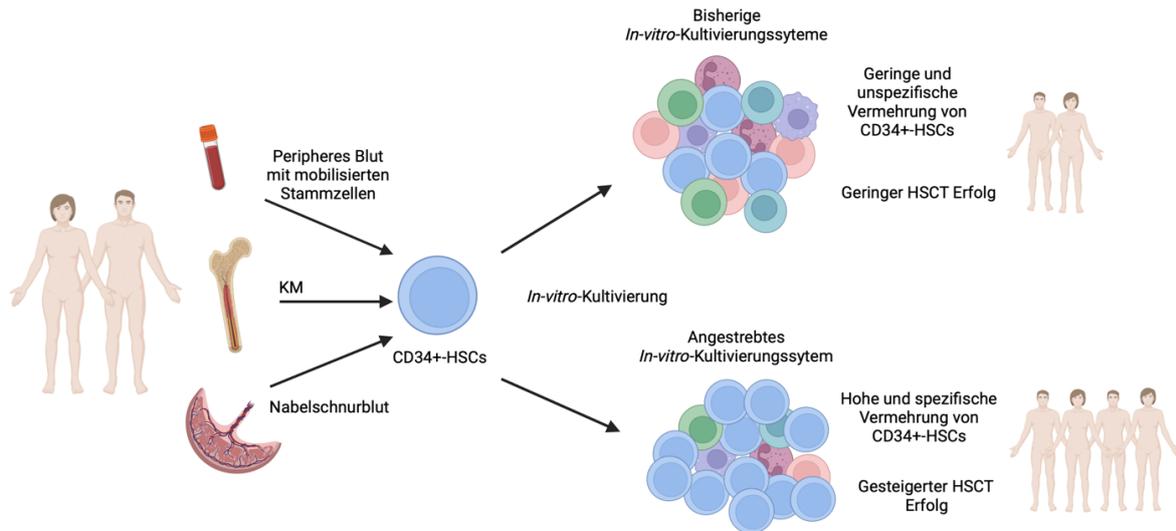
Verfahren, was den Erfolg der HSCT durch eine verlängerte Zeitspanne bis zur immunologischen Rekonstitution negativ beeinflussen kann.



**Abbildung 4: Zusammenhang zwischen der Menge der transplantierten CD34+-HSCs und des (krankheitsfreien) Überlebens der Patienten**

(A) Der Anteil der Patienten mit krankheitsfreiem Überleben lag bei Gabe einer höheren HSC Menge (CD34+-Zellen  $> 2 \times 10^6$ /kg, rote Linie) mit 64 % deutlich über dem der Patienten welche eine geringere Menge an HSCs (CD34+-Zellen  $< 2 \times 10^6$ /kg, blaue Linie; 38 %) bei der Transplantation bekamen. (B) Das Überleben der Patienten insgesamt lag bei Gabe einer höheren Menge an HSCs (CD34+-Zellen  $> 2 \times 10^6$ /kg, rote Linie) mit 66 % deutlich über dem der Patienten, welche eine geringere Menge an HSCs (CD34+-Zellen  $< 2 \times 10^6$ /kg, blaue Linie; 45 %) bei einer Transplantation bekamen. Abbildung modifiziert nach (Hyder et al., 2018).

Eine Möglichkeit, deutlich höhere Mengen an CD34+-HSCs zu erhalten, stellt grundsätzlich die *In-vitro*-Expansion der verfügbaren HSCs eines Spenders vor der eigentlichen HSCT dar. Allerdings ist die Generierung großer Stammzellmengen für die Transplantation nach wie vor für den klinischen Einsatz nicht zugelassen, da HSCs *in vitro* schnell in Vorläuferzellen ausdifferenzieren und somit ihre Pluripotenz und die Fähigkeit der Selbsterneuerung verlieren (Abbildung 5) (Gupta and Wagner, 2020; Walasek et al., 2012). Trotz der großen Fortschritte in der Behandlung von Krebs und der Korrektur genetischer Erkrankungen durch die HSCT können bis zu 20 % aller Patienten in der Krebsbehandlung nicht ausreichend therapiert werden, da entweder nur wenig geeignetes oder nicht ausreichend Zellmaterial in Form eines Transplantates zur Verfügung steht. Diese Umstände zeigen die große Bedeutung eines optimierten *In-vitro*-Kultivierungssystems, welches die Proliferation von humanen HSCs unterstützt und dabei die Fähigkeit der Selbsterneuerung und den pluripotenten Charakter der Zellen aufrechterhält (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Gewinnung und *In-vitro*-Vermehrung humaner HSCs – derzeitige Situation vs. wünschenswerter Zustand**

Humane HSCs können aus mobilisiertem peripherem Blut, dem KM und Nabelschnurblut gewonnen werden. Um die Menge an CD34+-HSCs zu steigern, werden *in vitro* Kultivierungsmodelle angewandt. Bisherige *In-vitro*-Expansionsmodelle zur Amplifizierung humaner HSCs unterstützen den Erhalt der Pluripotenz nicht ausreichend. Es gibt kaum Standardisierungen und nur geringe Expansionsraten trotz langer Wartezeiten (oberer Abschnitt). Wünschenswert wäre die personalisierte und standardisierte Herstellung qualitativ kontrollierter HSC-Produkte durch *In-vitro*-Systeme, welche die symmetrische Vermehrung von HSCs unterstützen (unterer Abschnitt). Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com nach (Walasek et al., 2012) erstellt.

### 3.4 Möglichkeiten der *In-vitro*-Expansion von hämatopoetischen Stammzellen

#### 3.4.1 3D Kultivierungssysteme zur Vermehrung von hämatopoetischen Stammzellen

Eine vielversprechende Möglichkeit, HSCs unter Beibehaltung ihrer Stammzeleigenschaften *in vitro* effektiv zu vermehren, liegt in der Nutzung von dreidimensionalen (3D) Kultivierungssystemen, welche die natürliche Umgebung von HSCs simulieren, um so möglichst effektive Bedingungen für eine symmetrische Teilung im Sinne der Selbsterneuerung zu schaffen. Ein wichtiger und sehr komplexer Faktor, welcher erheblichen Einfluss auf die Funktionsweise von HSC *in vivo* besitzt, ist neben der reinen Geometrie der Kultivierungssysteme die molekulare und physikalische Mikroumgebung der HSCs, die auch als hämatopoetische Stammzellnische bezeichnet wird. Dabei spielen nach heutigem Kenntnisstand auch zelluläre Interaktionen von HSCs in der Stammzellnische mit anderen dort ansässigen Zelltypen eine bedeutende Rolle zur Konservierung der Stammzeleigenschaften (Dawson et al., 2008; Gupta and Wagner, 2020; Li et al., 2001; Muller et al., 2015;

Prewitz et al., 2012; Prewitz et al., 2013; Zhang et al., 2003). Es ergeben sich daher verschiedene zu bewältigende Aufgaben, um die Stammzellnische für eine effektive Vermehrung von HSCs *in vitro* naturgetreu nachzubilden. Dabei genutzte natürliche Biomaterialien können beispielsweise aus Agarose, extrazellulärer Matrix (Matrigel) oder Methylzellulose bestehen. Aber auch synthetische Strukturen aus Polymeren, Keramik oder Metall wurden bereits eingesetzt, um naturnahe Gegebenheiten für HSCs zu schaffen (Dawson et al., 2008; Kimlin et al., 2013; Koehler et al., 2013). Weiterhin wurde beschrieben, dass es gelungen ist, grundlegende Eigenschaften des KMs artifiziell nachzubilden (Raic et al., 2014). Zum einen wurde mithilfe von synthetischen Polymeren eine poröse Struktur hergestellt, welche die schwammartige Struktur des Knochens im Bereich des blutbildenden KMs nachahmt. Zusätzlich wurden daran Proteine immobilisiert, wie sie auch in der Matrix des KMs vorkommen würden und HSCs als Verankerungsmöglichkeiten dienen (Raic et al., 2014; Torisawa et al., 2014). In einem anderen vielversprechenden Ansatz, die Morphologie des KMs nachzuahmen, wurde ein artifizielles System *in vivo* in Mäuse implantiert, welches die Tiere stimuliert, eine dem humanen KM ähnliche Matrix zu bilden. Nach Entnahme dieser Matrix wurde das System *in vitro* zur Stammzellexpansion genutzt (Torisawa et al., 2014). Beide Ansätze, die hier beispielhaft erwähnt wurden, konnten die *In-vitro*-Vermehrung deutlich verbessern. Unabhängig davon müssen die eingesetzten Systeme eine Vielzahl an weiteren Anforderungen erfüllen, wie zum Beispiel einen optimalen Flüssigkeitstransport zu den Zellen, die Versorgung mit bioaktiven Molekülen/Nährstoffen, einen geringen/keinen Materialverschleiß und mechanische Integration der Zellen in das System (Dawson et al., 2008). Im Idealfall sollten die genutzten Systeme außerdem zur mikroskopischen Begutachtung und Analyse der kultivierten Zellen geeignet sein. Die bisher verwendeten Systeme bieten diese Möglichkeit zumeist nicht oder kaum. In geschlossenen Strukturen treten weitere Probleme bezüglich der Rückgewinnung der kultivierten Zellen nach der Expansion auf. Daher besteht weiterhin der Bedarf neue 3D Systeme zu *In-vitro*-Kultivierung von HSCs zu entwickeln oder bestehende Systeme zu optimieren.

#### 3.4.2 Optimierte Zellkulturbedingungen zur Vermehrung von hämatopoetischen Stammzellen

Es wurden unterschiedliche Möglichkeiten beschrieben, die zur Verbesserung der HSC-Kultivierungsbedingungen *in vitro* beitragen. Diese Ansätze beinhalten

beispielsweise den Einsatz von speziellen Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Differenzierungsregulatoren oder andere biochemische Agenzien, um die Pluripotenz der HSCs *in vitro* zu erhalten (Walasek et al., 2012). Zytokine beziehungsweise Wachstumsfaktoren, die den Stammzellerhalt *in vitro* fördern, sind unter anderen *Stem Cell Factor* (SCF), Thrombopoietin (TPO), *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand* (FLT-3), Interleukin 6 (IL6) und Interleukin 3 (IL3). Eine chemische Verbindung, für die stammzellerhaltende Eigenschaften beschrieben wurde, ist Stemreginin-1 (SR-1). SR-1 bindet und inhibiert den Arylhydrogenrezeptor an der Oberfläche von HSCs und verhindert so die Bindung spezifischer Zytokine, wie beispielsweise CXCR4, an der Zelloberfläche. Infolgedessen wird eine Mobilisation von HSCs aus dem KM heraus und damit einhergehend auch deren Differenzierung inhibiert (Boitano et al., 2010; Dahlberg et al., 2014; Panch et al., 2017; Wagner et al., 2016). Daher konnte durch den Einsatz von SR-1 die *In-vitro*-Expansion humaner HSCs bereits gesteigert und die hämatopoetische Rekonstitution nach der HSCT unterstützt werden (Dahlberg et al., 2014; Wagner et al., 2016). Eine weitere geeignete Verbindung stellt Valproinsäure (VPA), ein Klasse I- und II-Histondeacetylase Inhibitor (HDACi), dar, welche sich als ein wirksames Mittel zur Amplifizierung humaner HSCs unter Konservierung der Pluripotenz hervorgetan hat (Chaurasia et al., 2014). Die postulierte Wirkung beruht dabei darauf, dass durch den Einsatz von VPA die Phosphorylierung der Glykogensynthasekinase 3-beta (GSK3 $\beta$ ) reduziert wird. Dies führt zur Inaktivierung der GSK3 $\beta$  und damit verknüpft zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen des Wnt-Signalwegs und einer Zunahme des homeobox B4-Proteins (HoxB4). Wnt und HoxB4 stimulieren direkt die HSC-Proliferation und fördern den Erhalt der Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Bug et al., 2005; Chaurasia et al., 2014; De Felice et al., 2005). Generell besteht beim Einsatz von bioaktiven Molekülen zur Verbesserung der HSC-Vermehrung aber die Gefahr der Überdosierung, was zu einer gesteigerten Differenzierung während der Proliferation führen und im Extremfall toxisch sein kann. Ein weiterer Faktor, der das Wachstum und die Differenzierung von HSCs beeinflusst, ist der Sauerstoffgehalt im umgebenden Medium/Blut. Innerhalb der Stammzellnische im KM liegt der Sauerstoffgehalt mit 1-6 % weit unter normoxischen Verhältnissen, wie beispielsweise in der Raumluft mit etwa 20-21 % (Eliasson et al., 2010; Mohyeldin et al., 2010). Der Sauerstoffgehalt in der konventionellen Zellkultur liegt hingegen bei dem Wert der Raumluft. Eine *In-vitro*-Kultivierung von HSCs unter hypoxischen Verhältnissen kann daher die Ausbeute an pluripotenten HSCs verbessern. Nach

heutigem Kenntnisstand befinden sich im Speziellen die unreifen, ruhenden LT-HSCs *in vivo* weiter entfernt von Sauerstoff-transportierenden Blutgefäßen innerhalb des KM als die aktivierten LT-HSCs, ST-HSCs und MPPs, welche mit fortschreitender Differenzierung direkt in die Blutbahn eintreten und somit im Organismus als ausdifferenzierte Blutzellen zirkulieren können. Die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen ahmt die Umgebung der ruhenden LT-HSCs innerhalb der Stammzellnische effektiv nach und fördert außerdem den aeroben glykolytischen Metabolismus der LT-HSCs (Eliasson et al., 2010; Mohyeldin et al., 2010). Eine gezielte und ausbalancierte Optimierung der Kulturbedingungen ist daher Grundvoraussetzung für eine effiziente *In-vitro*-Vermehrung von HSCs unter Erhalt ihrer Stammzeleigenschaften.

### 3.4.3 Molekulare Signalwege bei der Vermehrung von hämatopoetischen Stammzellen

Verschiedene molekulare Stoffwechsel- und Signalwege können den Erhalt des Stammzellcharakters von HSCs während der *In-vitro*-Kultivierung beeinflussen, und eine gezielte Einflussnahme auf diese Signalwege kann zu einem verbesserten Erhalt der Pluripotenz *in vitro* führen. Einer der am besten erforschten Signalwege ist dabei der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Aktivierte Proteinkinase B (AKT)/*mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Signalweg, welcher eine große Rolle bei verschiedenen Vorgängen in der Zelle spielt, wie beispielsweise der Regulation der Proliferation, der Motilität, der Autophagie und des Metabolismus. mTOR liegt intrazellulär mit weiteren Proteinen/Kofaktoren in zwei funktionalen Komplexen vor: mTOR Komplex 1 (mTORC1) und mTOR Komplex 2 (mTORC2). Im Kontext von HSCs und deren Vermehrung ist vor allem mTORC1 entscheidend. Für mTORC2 wurden deutlich weniger Zusammenhänge mit dem Stammzellerhalt beschrieben. Eine ausgewogene Aktivierung des mTORC1-Signalweges fördert Stammzellfunktionen und deren Aufrechterhaltung, wobei Defekte oder eine Überaktivierung des Signalweges zu massiver HSC-Differenzierung und einer Verringerung des Stammzellpools führen können (Fernandes et al., 2021; Ghosh and Kapur, 2016; Ghosh et al., 2016; Huang et al., 2012).

Die *forkhead box O* (FOXO)-Familie von Transkriptionsfaktoren und der *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF1 $\alpha$ ), als Teile des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges, sind ebenfalls an der Kontrolle des Zellzyklus, der Autophagie, des Zellmetabolismus und

des intrazellulären Redoxstatus der HSCs beteiligt. Ihre Aktivierung fördert die Selbsterneuerung von HSCs und den Stammzellerhalt (Cheng et al., 2014; Kocabas et al., 2015; Regitz et al., 1988; Takubo et al., 2010; Tothova and Gilliland, 2007; Wang and Ema, 2016). FOXO-Transkriptionsfaktoren sind außerdem an der Aufrechterhaltung des Ruhezustands von LT-HSCs beteiligt, indem sie verschiedene essenzielle Proteine der Zellzyklusprogression regulieren und somit den Eintritt beziehungsweise den Übertritt zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen steuern. Aktivierte FOXOs unterdrücken zusätzlich die Apoptose-Induktion innerhalb der Stammzellnische, indem sie vor ROS-bedingten Zellschäden schützen und damit eine wichtige Aufgabe beim Erhalt des Stammzellpools haben (Tothova and Gilliland, 2007).

Aktuelle Studien konnten zeigen, dass der Fettsäure- und Cholesterinstoffwechsel wichtig für die Expansion großer Mengen an undifferenzierten HSCs *in vitro* ist (DeBose-Boyd and Ye, 2018; Kobayashi et al., 2019), da sich replizierende Zellen eine ausreichende Menge an Lipiden benötigen, um die Bildung neuer Membranen zu gewährleisten. Diese Stoffwechselwege werden vom PI3K/AKT/mTOR- und den beiden damit eng verknüpften HIF1 $\alpha$ - und *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP)-Signalwegen reguliert (Duvel et al., 2010; Peterson et al., 2011; Porstmann et al., 2008). mTORC1 unterstützt diese Regulation, indem es über SREBP-Transkriptionsfaktoren die *De-novo*-Lipidsynthese anregt.

Obwohl in vorangegangenen Arbeiten (Tothova and Gilliland, 2007; Wagner et al., 2016) bereits Fortschritte hin zu optimierten HSC-*in-vitro*-Kultursystemen gemacht wurden, scheint die Nutzung nur einer der oben beschriebenen Ansatzpunkte, des optimierten Zellkulturmediums oder des optimierten 3D Zellkultursystems, allein nicht ausreichend zu sein, um HSCs *in vitro* effektiv unter Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters zu amplifizieren (Aerts-Kaya, 2021; Gillatt et al., 1988; Marx-Blümel et al., 2020; Sei et al., 2020; Sei et al., 2019; Walasek et al., 2012). Eine Kombination von beispielsweise Zytokinen, Wachstumsfaktoren und biochemischen Verbindungen mit geeigneten 3D Kultivierungssystemen unter Berücksichtigung der physiologischen Gegebenheiten in der Stammzellnische könnte hier ein vielversprechender neuer Ansatz sein.

#### **4 Zusammenhang zum Thema der Dissertation und Ziele der Arbeit**

Eine neuartige Methode 3D HSC-Kultivierungssysteme zu entwickeln, bietet die Gestaltung von Strukturen mit Hilfe von Polymeren. Dabei wird die zugrundeliegende Morphologie des KMs nicht nur artifiziell nachgeahmt, sondern direkt übernommen. (Patent Schober, Beck et al. DE 10 2015 108 566.6). Somit können die im humanen KM vorherrschenden geometrischen Gegebenheiten direkt übertragen und mittels biokompatibler Polymere in Form von 3D Kultivierungssubstraten abgebildet werden. Nach dem heutigen Stand der Entwicklung gibt es noch keine kommerziell vertriebenen 3D-Kultursysteme zur *In-vitro*-Expansion von humanen HSCs in der klinischen Anwendung und alle diesbezüglichen Veröffentlichungen sind noch im Labormaßstab angesiedelt. Wäre es durch den Einsatz unserer neuartigen 3D Kultivierungsplattform in Kombination mit einem optimierten Kultivierungsmedium möglich, humane HSCs mit hohem Repopulationspotenzial *in vitro* vorab zu vermehren und für eine klinische Anwendung bereitzustellen, würde ein gravierendes Problem der Transplantationsmedizin gelöst werden. Ziel des Projektes ist es daher, ein Kultivierungssystem durch direktes Nachbilden der Morphologie in der Stammzellnische im KM unter Berücksichtigung der vorherrschenden physikochemischen und molekularbiologischen Randbedingungen so zu konstruieren, dass Stammzellen auch *in vitro* effektiv vermehrt und für anschließende Arbeitsschritte bereitgestellt werden können.

## **5 Publierte Originaldaten**

### **5.1 Übersicht zu den Manuskripten**

Im Zuge dieser Dissertation konnten bereits zwei Publikationen veröffentlicht werden, wobei die Kandidatin bei beiden Erstautor ist und die gesamte Korrespondenz mit den Journalen übernahm.

Erschienen sind folgende Publikationen:

Marx-Blümel, L., Marx, C., Weise F. et al. (2020) Biomimetic reconstruction of the hematopoietic stem cell niche for in vitro amplification of human hematopoietic stem cells. PLOS ONE 15(6): e0234638.

und

Marx-Blümel, L., Marx, C., Sonnemann, J. et al. (2021) Molecular characterization of hematopoietic stem cells after in vitro amplification on biomimetic 3D PDMS cell culture scaffolds. Sci Rep 11, 21163.

In der ersten genannten Veröffentlichung wurde durch Kombination eines neu entwickelten 3D *In-vitro*-Zellkultursystems, beruhend auf der Morphologie des menschlichen KMs, und dem Einsatz verschiedener Mediumsupplemente eine Basis geschaffen, welche die Amplifikation von humanen HSCs unter Erhalt ihrer Pluripotenz ermöglicht. Die dabei genutzten Strukturen wurden mit Hilfe von Mikro- und Nanopolymer-Strukturierungsmethoden aus Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt (Patent Schober, Beck et al. DE 10 2015 108 566.6). Dadurch konnte eine effektive *In-vitro*-Vorabvermehrung von humanen HSCs ermöglicht werden, was beispielsweise für den späteren klinischen Einsatz bei Stammzelltransplantationen von Nutzen sein kann.

In der zweiten genannten Publikation wurden die in dem neuartigen 3D Zellkultursystem amplifizierten HSCs auf molekularer Basis eingehend charakterisiert, um ein besseres Verständnis für die während der Kultivierung ablaufenden Veränderungen von Signal- und Stoffwechselwegen zu erhalten. Es konnten

verschiedene molekulare Signalwege gefunden werden, welche durch die Kultivierung in den 3D PDMS-Strukturen aktiviert wurden und sich positiv auf den Stammzellerhalt der amplifizierten HSCs auswirken.

## 5.2 Manuskripte

### 5.2.1 „Biomimetic reconstruction of the hematopoietic stem cell niche for in vitro amplification of human hematopoietic stem cells“:

Manuskript Nr. 1

**Titel des Manuskriptes:** Biomimetic reconstruction of the hematopoietic stem cell niche for in vitro amplification of human hematopoietic stem cells

**Autoren:** M.Sc. Lisa Marx-Blümel, Dr. Christian Marx, Dipl. Ing. Frank Weise, M.Sc. Jessica Frey, Dr. Birgit Perner, Dr. Gregor Schlingloff, M.Sc. Nora Lindig, Dipl. Ing. Jörg Hampl, Dr. Jürgen Sonnemann, Dr. Dana Brauer, Dr. Astrid Voigt, Dr. Sukhdeep Singh, Bettina Beck, Ute-Maria Jäger, Prof. Dr. Zhao-Qi Wang, Prof. Dr. James F. Beck, Prof. Dr. Andreas Schober

**Bibliographische Informationen:** Marx-Blümel, L., Marx, C., Weise F. et al. (2020) Biomimetic reconstruction of the hematopoietic stem cell niche for in vitro amplification of human hematopoietic stem cells. PLOS ONE 15(6): e0234638.

**Der Kandidat / Die Kandidatin ist**

Erstautor/-in,  Ko-Erstautor/-in,  Korresp. Autor/-in,  Koautor/-in.

**Status:** bereits publiziert (06/2020)

**Anteile (in %) der Autoren / der Autorinnen an der Publikation** (anzugeben ab 20%)

Autor/-in	Konzeptionell	Datenanalyse	Experimentell	Verfassen des Manuskriptes	Bereitstellung von Material
M.Sc. Lisa Marx-Blümel	20 %	75 %	60 %	70 %	-

Dr. Christian Marx	-	20 %	-	20 %	-
Dipl. Ing. Frank Weise	-	-	20 %	-	-
M.Sc. Jessica Frey	-	-	-	-	-
Dr. Birgit Perner	-	-	-	-	-
Dr. Gregor Schlingloff	-	-	-	-	-
M.Sc. Nora Lindig	-	-	-	-	-
Dipl. Ing. Jörg Hampl	-	-	-	-	-
Dr. Jürgen Sonnemann	-	-	-	-	-
Dr. Dana Brauer	-	-	-	-	-
Dr. Astrid Voigt	-	-	-	-	-
Dr. Sukhdeep Singh	-	-	-	-	-
Bettina Beck	-	-	-	-	-
Ute-Maria Jäger	-	-	-	-	-
Prof. Dr. Zhao-Qi Wang	-	-	-	-	-
Prof. Dr. James F. Beck	40 %	-	-	-	50 %
Prof. Dr. Andreas Schober	40 %	-	-	-	50 %

---

Unterschrift Kandidat/-in

---

Unterschrift Betreuer/-in (Mitglied der Fakultät)

5.2.2 „Molecular characterization of hematopoietic stem cells after in vitro amplification on biomimetic 3D PDMS cell culture scaffolds“

Manuskript Nr. 2

**Titel des Manuskriptes:**

**Autoren:** M.Sc. Lisa Marx-Blümel, Dr. Christian Marx, Dr. Jürgen Sonnemann, Dipl. Ing. Frank Weise, Dipl. Ing. Jörg Hampl, M.Sc. Jessica Frey, M.Sc. Linda Rothenburg, Dr. Emilio Cirri, Norman Rahnis, Dr. Philipp Koch, Dr. Marco Groth, Prof. Dr. Andreas Schober, Prof. Dr. Zhao-Qi Wang, Prof. Dr. James F. Beck

**Bibliographische Informationen:** Marx-Blümel, L., Marx, C., Sonnemann, J. et al. (2021) Molecular characterization of hematopoietic stem cells after in vitro amplification on biomimetic 3D PDMS cell culture scaffolds. Sci Rep 11, 21163.

**Der Kandidat / Die Kandidatin ist**

Erstautor/-in,  Ko-Erstautor/-in,  Korresp. Autor/-in,  Koautor/-in.

**Status:** bereits publiziert (10/2021)

**Anteile (in %) der Autoren / der Autorinnen an der Publikation** (anzugeben ab 20%)

Autor/-in	Konzeptionell	Datenanalyse	Experimentell	Verfassen des Manuskriptes	Bereitstellung von Material
M.Sc. Lisa Marx-Blümel	40 %	60 %	60 %	50 %	-
Dr. Christian Marx	-	30 %	30 %	40 %	-
Dr. Jürgen Sonnemann	-	-	-	-	-
Dipl. Ing. Frank Weise	-	-	-	-	-
Dipl. Ing. Jörg Hampl	-	-	-	-	-
M.Sc. Jessica Frey	-	-	-	-	-
M.Sc. Linda Rothenburg	-	-	-	-	-
Dr. Emilio Cirri	-	-	-	-	-

Norman Rahnis	-	-	-	-	-
Dr. Philipp Koch	-	-	-	-	-
Dr. Marco Groth	-	-	-	-	-
Prof. Dr. Andreas Schober	-	-	-	-	20 %
Prof. Dr. Zhao-Qi Wang	-	-	-	-	20 %
Prof. Dr. James F. Beck	50 %	-	-	-	60 %

---

Unterschrift Kandidat/-in

---

Unterschrift Betreuer/-in (Mitglied der Fakultät)

## **6 Diskussion**

### **6.1 Transplantation mit hämatopoetischen Stammzellen**

Die Transplantation von humanen HSCs ist die effektivste Behandlungsmöglichkeit für ein breites Spektrum an hämatopoetischen Erkrankungen und nicht-malignen, angeborenen oder erworbenen Defekten. Der Erfolg dieser Behandlungsmethode wird allerdings durch eine oft auftretende Diskrepanz zwischen der vom Spender zur Verfügung stehenden und der vom Empfänger benötigten Menge an HSCs eingeschränkt. Wird bei einer HSCT eine unzureichende Menge Stammzellen transplantiert, verlängert sich die Zeitspanne bis zur immunologischen Rekonstitution des Empfängers und das Risiko von bedrohlichen Infektionen infolge der Immunsuppression steigt (Chen et al., 2004; Hyder et al., 2018). HSCs können für eine Transplantation entweder aus dem KM, dem Nabelschnurblut oder dem peripheren Blut des Spenders gewonnen werden. Alle drei Möglichkeiten werden in der Praxis angewandt, unterscheiden sich aber bezüglich der Charakteristika und Menge der gewonnenen HSCs und abhängig davon auch in deren klinischer Verwendung (Panch et al., 2017). Bezogen auf die absolute Menge an CD34+-HSCs, kann durch eine Aphaese nach vorangegangener Mobilisation die beste Stammzellausbeute erreicht werden. Nabelschnurblut ist prozentual zwar reich an unreifen HSCs und CD34+-Progenitorzellen, jedoch stehen davon nur geringe Mengen zur Verfügung, welche meist nicht ausreichend für eine Transplantation sind (Gupta and Wagner, 2020). Werden HSCs aus der Nabelschnurarterie isoliert, ergeben sich keine Risiken für den Spender. Ethische Bedenken dabei sind gering, da diesen Zellen anderweitig kein Nutzen zukommen würde und sie entsorgt werden würden. Im Gegensatz dazu steht die risikoreichere Prozedur der Punktion des KM zur Gewinnung der dort ansässigen Stammzellen (Panch et al., 2017). Wenngleich dieses Verfahren mittlerweile Standard ist, kann es zu Komplikationen wie Blutungen oder Infektionen infolge der Punktion und Aspiration beim Spender kommen. Auch die verabreichte Sedierung kann Nebenwirkungen verursachen (Panch et al., 2017). Die Gewinnung von Stammzellen aus dem peripheren Blut erfordert eine Mobilisation der HSCs, beispielsweise mit dem Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor, über einen gewissen Zeitraum, damit HSCs in ausreichender Anzahl in der Blutbahn zur Verfügung stehen. Mögliche Komplikationen wie Knochenschmerzen und grippeähnliche Symptome treten oft im Zusammenhang mit denen zur Mobilisation verwendeten Substanzen auf. Ein

potenziell erhöhtes Risiko für Krebserkrankungen, Schlaganfälle oder Autoimmunkrankheiten infolge der Mobilisation konnte jedoch nicht bestätigt werden. Allerdings kann es zu Nebenwirkungen während der Aphaese, wie beispielsweise Blutungen oder einer Hypokalzämie infolge der verabreichten Antikoagulantia, kommen (Panch et al., 2017). Studien ergaben jedoch, dass Spender nach einer Punktion des KM deutlich länger für eine vollständige Erholung brauchten als jene, die sich einer Mobilisation mit anschließender Aphaese unterzogen (Panch et al., 2017). Da die isolierten Stammzellen aus allen drei beschriebenen HSC-Quellen auch T-Zellen enthalten, kann es zu Nebenwirkungen in Form einer akuten oder chronischen Spender-gegen-Wirt-Erkrankung (*graft-versus-host-disease*, GVHD) des Empfängers kommen, wenn sie für eine allogene Transplantation genutzt werden. T-Zellen in Transplantaten aus dem Nabelschnurblut sind im Gegensatz zu den beiden anderen Ursprüngen immunologisch noch naiv und rufen demnach deutlich weniger unerwünschte Reaktionen im Empfänger hervor. Durch die generell geringe Zellmenge und damit einhergehend der geringen Ausbeute an CD34+-Zellen in Transplantaten aus Nabelschnurblut wird bei einer HSCT mit diesem Stammzelltyp aber ein deutlich langsames Anwachsen der Spenderzellen im Vergleich mit den anderen beiden Methoden erreicht. Damit steigt die Gefahr von Infektionen, Spenderabstoßung und infolgedessen eines Rückfalls des Patienten deutlich (Panch et al., 2017). Neben der Qualität des Spendermaterials spielt also auch die Quantität eine große Rolle, um eine erfolgreiche Transplantation zu ermöglichen.

Eine Möglichkeit, das Problem des Missverhältnisses zwischen benötigter und vorhandener Anzahl von Spenderzellen zu lösen, stellt die *In-vitro*-Vorabvermehrung von humanen HSCs dar. Allerdings gibt es bisher noch keine Möglichkeit, die einer klinischen Anwendung genügt (Chen et al., 2004; Walasek et al., 2012). Darauf aufbauend war es Ziel dieser Arbeit, eine *In-vitro*-Umgebung für humane HSCs zu schaffen, welche deren Proliferation steigert und gleichzeitig ihre Pluripotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung unterstützt. Dazu musste während der *In-vitro*-Kultur die Differenzierung der HSCs in entsprechende Linien-spezifische Progenitorzellen reduziert und optimale Wachstumsbedingungen erzeugt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich aus dem peripheren Blut nach Mobilisierung gewonnene kryokonservierte CD34+-angereicherte HSCs gesunder Spender verwendet (Ethikvotum des Universitätsklinikums Jena, #3595-10/12, #5320-10/17, Marx-Blümel et al., 2020, Marx-Blümel et al., 2021). Durch Nutzung des

tatsächlichen Primärmaterials, welches im Späteren auch für die klinische Anwendung verwendet werden würde, ergeben sich einerseits optimale Bedingungen, um spezifische Aussagen über das neuartige Zellkultursystem zu erhalten, andererseits erhöht sich damit aber auch die Varianz der ermittelten Ergebnisse zwischen den verschiedenen Spendern, was sich in den Ergebnissen der beiden Arbeiten widerspiegelt (Marx-Blümel et al., 2020, Marx-Blümel et al., 2021).

## **6.2 Möglichkeiten zur *In-vitro*-Expansion humaner HSCs**

### 6.2.1 Einsatz von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und chemischen Substanzen

#### Einsatz von Zytokinen und Wachstumsfaktoren

Es sind verschiedene Methoden und Strategien in der Fachliteratur beschrieben, um die Kultivierungsbedingungen humaner HSCs zu verbessern, um damit deren Pluripotenz und Fähigkeit zur Selbsterneuerung *in vitro* aufrecht zu erhalten. Zur optimalen Versorgung von Stammzellen, insbesondere HSCs, sind verschiedene Kultivierungsmedien bereits kommerziell erhältlich, welche abhängig vom jeweiligen Hersteller verschiedene Supplemente enthalten, die den Stammzellerhalt fördern sollen. Aufbauend auf einer bereits veröffentlichten Studie (Chaurasia et al., 2014) wurde für dieses Projekt ein kommerzielles HSC-Zellkulturmedium ausgewählt und in einem ersten Schritt durch die Zugabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren optimiert, die bereits in der Kultivierung von HSCs erprobt wurden. Die in der Literatur beschriebenen verwendeten Konzentrationen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren weisen dabei jedoch eine hohe Spanne auf (Chaurasia et al., 2014; Marx-Blümel et al., 2020; Walasek et al., 2012). Nicht publizierte Vorversuche zu unserer ersten Arbeit (Marx-Blümel et al., 2020) ergaben, dass höhere Konzentrationen dieser Supplemente von Vorteil waren und die Expansion der CD34+-HSCs enorm förderten. Das lässt sich durch die Dauer der Kultivierung begründen: Obwohl das Medium im Laufe der 14-tägigen *In-vitro*-Kultivierung einmal erneuert wurde, mussten ausreichende Mengen aller Supplemente zu jedem Zeitpunkt der Kultur für mindestens sieben Tage gewährleistet werden. Daher wurden einige Substanzen im Vergleich zu Studien anderer Arbeitsgruppen hochdosiert oder sogar überdosiert eingesetzt. Es zeigten sich in unserem System jedoch keine negativen Aspekte dieser Zytokin- beziehungsweise Wachstumsfaktorkonzentrationen, wie beispielsweise ungewollte Differenzierung der

HSCs oder ein erhöhter Zelltod. Unterschiede in der Anzahl der Stammzellen zwischen den einzelnen Spendertransplantaten und daraus resultierend in der Effektivität der Amplifikation dieser Zellen im Kultivierungszeitraum haben einen bedeutenden Einfluss und machten es schwer, den individuellen Bedarf an Supplementen einzuschätzen, weshalb ein Überschuss generell von Vorteil war. Dies bietet vorrauschaugend für eine klinische Anwendung aber bereits die Möglichkeit unser optimiertes Medium allgemein für verschiedene Spender anzuwenden und deren HSCs zu *in vitro* zu vermehren, ohne vorher individuelle Gegebenheiten berücksichtigen zu müssen.

### Einsatz von chemischen Substanzen

Neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren werden zunehmend auch biologisch aktive chemische Substanzen eingesetzt, die ebenfalls den Stammzellerhalt und die Amplifikation von HSCs fördern können (Chaurasia et al., 2014; Walasek et al., 2012). Zwei dieser Verbindungen sind VPA und SR-1. Im Einklang mit den Ergebnissen andere Arbeitsgruppen (Chaurasia et al., 2014; Walasek et al., 2012) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der HDACi VPA den Stammzellerhalt und die Proliferation von CD34+-Zellen fördert (Marx-Blümel et al., 2020). VPA steigert durch epigenetische Modifikationen und den resultierenden Veränderungen in der Chromatinstruktur die Proliferation von HSCs und deren Stammzellerhalt (Bug et al., 2005; De Felice et al., 2005). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass VPA zu einer Anregung des Wnt-Signalweges und zu einer Zunahme der HoxB4-Expression führt. Beide Ereignisse stimulieren die HSC-Proliferation und die Aufrechterhaltung ihrer Pluripotenz (Abbildung 7, (Bug et al., 2005)). In der vorliegenden Arbeit konnte durch den Einsatz von VPA im angepassten HSC-Zellkulturmedium eine weitere Amplifikation der CD34+-HSCs um ca. das 150-fache innerhalb von 14 Tagen *In-vitro*-Kultivierung im Vergleich zum optimierten HSC-Medium ohne VPA, erreicht werden (Marx-Blümel et al., 2020). Dies ist eine deutlich höhere Ausbeute an CD34+-HSCs als in der Arbeit von De Felice *et al.* (2005) und eine vergleichbare Ausbeute an CD34+-HSCs wie in der Arbeit von Chaurasia *et al.* (2014) bei ansonsten ähnlichen Kulturbedingungen. Mögliche Unterschiede könnten durch die verwendeten HSCs und verschiedene Kultivierungszeiten hervorgerufen worden sein: Chaurasia *et al.* (2014) verwendeten frische, aus Nabelschnurblut isolierte CD34+-HSCs. Im Gegensatz dazu wurden in unserer Arbeit kryokonservierte, aus dem peripheren Blut nach Mobilisation

gewonnene, CD34+-HSCs verwendet. Die Kultivierungsdauer in der Arbeit von De Felice *et al.* (2005) war nur sieben Tage und damit deutlich kürzer als in der hier vorliegenden Arbeit. Mit zunehmender Kultivierungsdauer steigt zwar einerseits die Gefahr der Differenzierung, andererseits haben die Stammzellen mehr Zeit zu proliferieren. Ein sorgfältiges Abwägen der Kultivierungsdauer im Vergleich zur gewünschten Ausbeute an Stammzellen ist somit nötig und eine Kultivierung von 14 Tagen erwies sich für unseren Ansatz als vorteilhaft (Marx-Blümel *et al.*, 2020). Zudem konnte gezeigt werden, dass der Ursprung der verwendeten HSCs einen deutlichen Effekt auf die Amplifikationsrate *in vitro* unter ansonsten gleichen Kulturbedingungen hat. CD34+-HSCs aus dem Nabelschnurblut und aus dem peripheren Blut zeigten deutlich höhere Amplifikationsraten als Zellen aus dem KM (De Felice *et al.*, 2005).

Eine weitere chemische Substanz, welche den Stammzellerhalt und die hämatopoetische Rekonstitution nach einer HSCT fördern soll, ist SR-1, ein Arylhydrogenrezeptor-Antagonist. Arylhydrogenrezeptoren sind an verschiedenen Signalwegen beteiligt, welche die Hämatopoese regulieren und spielen daher auch bei der Differenzierung von HSCs eine Rolle (Boitano *et al.*, 2010; Dahlberg *et al.*, 2014; Panch *et al.*, 2017; Wagner *et al.*, 2016). Der für SR-1 beschriebene positive Effekt bezüglich der HSC-Expansion und des Stammzellerhalts konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigt werden (Marx-Blümel *et al.*, 2020). In den dieser Annahme zugrundeliegenden Studien von Dahlberg, *et al.* (2014) und Wagner, *et al.* (2016) wurde ein anderes HSC-Kultivierungsmedium mit einer ebenfalls anderen Kombination an Zytokinen genutzt, was die Unterschiede erklären könnte. Auch war der Ursprung der verwendeten HSCs ein anderer (HSCs isoliert aus Nabelschnurblut (Dahlberg *et al.*, 2014; Wagner *et al.*, 2016) vs. peripherem Blut in unseren Arbeiten (Marx-Blümel *et al.*, 2021; Marx-Blümel *et al.*, 2020)).

Wie oben bereits erwähnt, hat der Ursprung der verwendeten HSCs einen deutlichen Einfluss auf die Amplifikation *in vitro* (De Felice *et al.*, 2005), und die gewonnenen Transplantate weisen charakteristische Unterschiede auf (Panch *et al.*, 2017). Zusätzlich liegt es nahe, dass aus dem KM mobilisierte HSCs im Zuge der Stimulation ganz andere nichtphysiologische Reize und Signale erhalten als HSCs, die direkt aus dem KM punktiert wurden. Die aus dem Nabelschnurblut isolierten HSCs sind deutlich jünger als Zellen eines adulten Spenders und könnten sich, aufgrund fehlender Prozesse im Laufe der Alterung eines Organismus, *in vitro* anders verhalten als HSCs aus dem KM oder dem peripheren Blut. Daher kann das Ansprechverhalten der

theoretisch ansonsten identischen HSCs verschiedenen Ursprungs auf gleiche Kultivierungsbedingungen vollkommen unterschiedlich ausfallen.

Ein weiterer Aspekt ist, dass für SR-1 nur ein enges Wirkungsspektrum beschrieben wurde, welches sehr spezifische Voraussetzungen bezüglich der verwendeten Zytokine im Kultivierungsmedium hat (Boitano et al., 2010). Entsprechend erscheint SR-1 zumindest in dem Aufbau der vorliegenden Arbeit wenig geeignet zu sein.

Obwohl in der Vergangenheit ein enormer Erkenntnisgewinn bezüglich der effektiven *In-vitro*-Kultivierung von HSCs verzeichnet werden konnte, ist der alleinige Einsatz von Supplementen nicht ausreichend, um neben dem kurzzeitigen Anwachsen der Spenderzellen auch das Langzeitrepopulierungspotenzial dieser Zellen *in vitro* zu steigern (Panch et al., 2017; Walasek et al., 2012). Wegen der großen Unterschiede im Ansprechverhalten der HSCs unterschiedlicher Herkunft konnten bislang nur wenige Supplemente für einen klinischen Einsatz uneingeschränkt validiert werden.

#### 6.2.2 Nachbildung der hämatopoetischen Stammzellnische

Die Funktion humaner HSCs *in vivo* hängt stark mit ihrer Mikroumgebung, der so genannten hämatopoetischen Stammzellnische zusammen. Neben zellulären Interaktionen spielen auch die vorherrschenden geometrischen und physikalischen Gegebenheiten eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und der physiologischen Funktionen von HSCs (Dawson et al., 2008; Gupta and Wagner, 2020; Li et al., 2001; Muller et al., 2015; Prewitz et al., 2012; Prewitz et al., 2013; Zhang et al., 2003). Entsprechend ergeben sich weitere Möglichkeiten zur naturnahen und effektiven *In-vitro*-Kultivierung von HSCs, welche weniger subjektiv sind als die Verwendung von Supplementen im Zellkulturmedium.

#### Materialien zur Nachbildung der hämatopoetischen Stammzellnische

Polystyrol (PS) ist das *state-of-the-art* Material für alle Bereiche der Zellkultivierung (Berthier et al., 2012). Es hat viele Vorteile gegenüber anderen Materialien, wie beispielsweise seine Transparenz, Beständigkeit gegenüber einer Vielzahl an Substanzen und Langlebigkeit. Nichtsdestotrotz ergeben sich bei der Nutzung von PS für 3D Kultivierungssysteme aufgrund seiner spröden Eigenschaften Probleme und erschweren dessen Nutzung, beziehungsweise machen dieses Material ungeeignet für einen solchen Einsatz (unpublizierte Daten aus (Marx-Blümel et al., 2020); (Berthier et al., 2012)). PS ist starr und fest und lässt sich entsprechend schlecht in 3D Formate

abbilden. Nutzt man nur eine dünne Schicht von PS, um eine vorgegebene Form damit zu überziehen, kommt es zu Spannungsrissen (unpublizierte Daten in (Marx-Blümel et al., 2020)). Eine Nachbildung von sehr kleinen und feinen Struktureinheiten ist deswegen nicht möglich. Ein neuartiger Ansatz zur Herstellung von 3D Kultivierungssubstraten findet sich in der freien multiskaligen Gestaltung von Mikro- und Nanotexturen durch Polymer-Strukturierungsmethoden (Marx-Blümel et al., 2020) (Patent Schober, Beck et al. DE 10 2015 108 566.6). Diese Technik ermöglicht zum Beispiel die Übertragung der im menschlichen KM vorherrschenden geometrischen Strukturen auf makroskopische Flächen in biokompatiblen Polymeren. Die dadurch geschaffenen 3D Oberflächen erlauben ungeahnte Möglichkeiten in der *In-vitro*-Kultivierung humaner HSCs. Alternative Ansätze wie beispielsweise die Kultivierung von HSCs in 3D Gelen bilden die Morphologie des Knochens nur als Analogie ab (Berthier et al., 2012; Hashimoto et al., 2011), während der in dieser Arbeit vertretene Ansatz einer direkten Analyse und Replikation der Knochenmarksmorphologie entspringt. Die neuartigen 3D Strukturen spiegeln somit die wesentlichen Elemente der Morphologie des KMs in einem Mikrosystem mit sowohl mikro- wie mesoskaliger Strukturierung wider (Patent Schober, Beck et al. DE 10 2015 108 566.6) (Marx-Blümel et al., 2020). Die Strukturen werden aus PDMS hergestellt, das zu den am meisten eingesetzten Silikon-basierten organischen Polymeren zählt. PDMS bietet zahlreiche Vorteile wie beispielsweise geringe Kosten, eine einfache Vervielfältigung der einzelnen Einheiten und ermöglicht im Gegensatz zu Strukturen aus Keramik, Metall oder Knochenmaterial durch seine Transparenz mikroskopische Analysen (Berthier et al., 2012). Verglichen mit anderen für die Stammzellkultivierung verwendeten Strukturen aus 3D Gelen oder Schäumen sowie aus keramischem oder knochenartigem Material gefertigte Strukturen (Berthier et al., 2012; Choi et al., 2015; Hashimoto et al., 2011), ermöglicht unser nach oben geöffnetes 3D System aus PDMS eine einfachere Handhabung während der Zellkultur. Es erlaubt, die amplifizierten HSCs zu jedem Zeitpunkt der *In-vitro*-Kultivierung zu passagieren, behandeln, ernten, analysieren und sogar wiederzuverwenden. Die Verwendung der 3D PDMS-Strukturen steigerte darüber hinaus die Ausbeute an CD34+-HSCs verglichen mit handelsüblichen PS-Zellkulturplatten deutlich (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020).

Um den Effekt des verwendeten Materials besser einschätzen zu können, wurden identische 3D Strukturen aus PDMS und PS gefertigt und zur Kultivierung humaner

HSCs eingesetzt. Es zeigte sich allerdings, dass nur die *In-vitro*-Kultivierung auf 3D PDMS-Strukturen zu einer effizienten Expansion von humanen CD34+-HSCs führte. Die dreidimensionale, dem KM nachempfundene Struktur allein reicht also nicht für die erfolgreiche Kultivierung aus und wir konnten zeigen, dass der Erfolg maßgeblich auch vom verwendeten Material abhängt.

PDMS und PS unterscheiden sich stark in ihren physiologischen und physikalischen Eigenschaften (Berthier et al., 2012). Es ist bekannt, dass die Festigkeit und Steifheit eines Materials selbst, ebenso wie verschiedene Oberflächenbeschichtungen, stark das Wachstum und die Differenzierung von den darauf kultivierten HSCs beeinflusst (Choi and Harley, 2017; Zhang et al., 2019). PS ist im Gegensatz zu PDMS ein starres und festes Material, welches den semi-adhären HSCs eine bessere Anheftung, Adhäsion und Migration im Zuge der *In-vitro*-Kultivierung erlaubt und somit neben der Expansion aber auch die Differenzierung fördert (Choi and Harley, 2017; Zhang et al., 2019). Zudem erwies sich die Herstellung von 3D Strukturen aus PS aufgrund dessen Materialeigenschaften als sehr aufwendig mit einem hohen Materialverlust durch unbrauchbare, gesplittete Strukturen (unpublizierte Daten (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020)). Aufgrund der technischen und ökonomischen Aspekte sowie des mangelnden Erfolgs hinsichtlich der Amplifizierung humaner HSCs, wurde der Ansatz, 3D Strukturen aus PS herzustellen, nicht weiterverfolgt.

#### Beschichtung der Kultivierungssubstrate

Humane HSCs sind als semi-adhären beschrieben, haften demnach nur transient an ihrer Unterlage, benötigen aber eine Kontaktfläche für das sogenannte *homing*, das Erreichen der Stammzellnische im KM, zusammen mit der physiologischen Bindung an die dortige Umgebungsstruktur (Sahin and Buitenhuis, 2012). Dies ist wichtig, da die Funktion der HSCs *in vivo* maßgeblich von Kontakten mit ihrer Mikroumgebung, der hämatopoetischen Stammzellnische, abhängt (Dawson et al., 2008; Li et al., 2001; Prewitz et al., 2012; Zhang et al., 2003). PDMS ist ein hydrophobes Material, was möglicherweise die Adhäsion der HSCs erschwert und somit einen negativen Einfluss auf die Amplifikation der Zellen hat. Um die Oberfläche der 3D Strukturen hydrophiler zu gestalten und die Situation *in vivo* besser zu rekonstruieren, wurden verschiedene Möglichkeiten zur Beschichtung der 3D PDMS-Strukturen getestet. Zielführend dabei erwies sich die Verwendung einer Siliziumoxid (SiO<sub>2</sub>)-Beschichtung (Aquacer®-Beschichtung) der 3D PDMS (3D SiO<sub>2</sub>) Strukturen, welche tatsächlich zu einer

weiteren Steigerung der Ausbeute an CD34+-Zellen nach *In-vitro*-Kultivierung führte. Mikroskopische Analysen der auf 3D SiOn- und 3D PDMS-Strukturen kultivierten HSCs bestätigten die Annahme, dass eine hydrophilere Oberfläche die initiale Anheftung der CD34+-HSCs an das Kultivierungssubstrat erleichtert und somit auch das Wachstum der Zellen fördert. Die SiOn-Beschichtung ermöglichte es den HSCs, zusätzlich an den Seitenwänden der Kavitäten und auf der unstrukturierten Oberfläche der 3D Strukturen zu wachsen. Dies trat im Fall von 3D PDMS-Strukturen wesentlich weniger auf. Allerdings exprimierten nur wenige der Zellen, die außerhalb der Kavitäten der 3D Strukturen wuchsen, CD34, was einen Verlust des Stammzellcharakters in diesen Zellen nahelegt (Marx-Blümel et al., 2020).

Für eine als erfolgreich zu bewertende *In-vitro*-HSC-Amplifikation ist aber nicht allein die totale Menge von CD34+-Zellen wichtig, sondern auch der Anteil an LT-HSCs in der Gesamtpopulation. Diese HSC-Subfraktion mit Langzeitrepopulierungspotenzial, welche nach heutigem Kenntnisstand besonders wichtig für eine zügige Blutbildung im Empfänger ist, besteht aus sehr unreife Stammzellen mit einem hochkonservierten pluripotenten Charakter und einer ausgeprägten Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Doulatov et al., 2012; Laurenti and Gottgens, 2018). LT-HSCs wurden jedoch nicht durch die SiOn-Beschichtung stärker vermehrt und zeigten die höchste Amplifikationsrate auf unbeschichteten 3D PDMS-Strukturen (Marx-Blümel et al., 2020).

Zur Einschätzung des klonogenen Potenzials der *in vitro* amplifizierten HSCs wurde nach der Kultivierung ein *colony forming unit* (CFU) Assay durchgeführt. Die auf 3D PDMS kultivierten Zellen führten, im Einklang mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen, zur Bildung der größten Zahl unreifer Kolonien: *Colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte* (CFU-GEMM) und *burst forming unit-erythrocyte* (BFU-E) (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020). CFU-GEMM-Kolonien werden durch unreife, multipotente Vorläuferzellen gebildet, die *in vitro* nach weiterer Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu Granulozyten, Erythrozyten, Macrophagen und Megakaryozyten differenzieren können. BFU-E-Kolonien hingegen bestehen aus primitiven erythroiden Progenitorzellen, welche ein hohes proliferatives Potenzial haben (Ash et al., 1981; Frisch and Calvi, 2014). Zellen die auf zweidimensionalem (2D) PS, 3D PS oder 3D SiOn kultiviert wurden, führten hingegen zur Bildung von weiter differenzierten Zellkolonien und kaum beziehungsweise gar nicht zur Bildung von CFU-GEMM- und BFU-E-Kolonien. 3D PDMS konservierte

folglich unter allen getesteten Strukturen den pluripotenten Charakter der Zellen am besten (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020).

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch der Effekt von Fibronectin- und Kollagen-Beschichtungen auf 2D PS untersucht. Fibronectin und Kollagen sind Proteine der extrazellulären Matrix und werden in der *In-vitro*-Kultivierung vielseitig eingesetzt, um das Wachstum von Zellen zu fördern. Diese Matrixproteine ahmen die physiologische Umgebung der kultivierten Zellen besser nach als unbeschichtetes PS. Dabei kommt Fibronectin häufiger zur Kultivierung von humanen HSCs zum Einsatz als Kollagen, welches hingegen oftmals für die Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen genutzt wird (Dawson et al., 2008; Lutolf and Hubbell, 2005). Es zeigte sich allerdings, dass eine Beschichtung mit diesen beiden Matrixproteinen keine Verbesserung der Amplifikation unreifer LT-HSCs im Vergleich zu den unbeschichteten 3D PDMS-Strukturen brachte (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Beschichtung von PS mit Fibronectin oder Kollagen, genauso wie die Beschichtung von 3D PDMS mit SiOn, zwar die Adhäsion der kultivierten HSCs erleichtert, dadurch aber neben einer gesteigerten Amplifikation auch eine erhöhte Differenzierung in Progenitorzellen fördert. In Vorversuchen dieser Arbeit wurde auch versucht, die 3D PDMS-Strukturen mit Fibronectin oder Kollagen zu beschichten. Allerdings waren diese Ansätze ohne Erfolg (unpublizierte Daten (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020)). Die Beschichtung von 3D PDMS-Strukturen mit Fibronectin war technisch nicht möglich, da zu große Protein-Aggregate die Kavitäten der 3D Strukturen verstopfen. Eine Beschichtung mit Kollagen hingegen ist technisch sehr aufwendig, da die Verbindung zur Oberfläche der PDMS-Strukturen sich als nicht ausreichend haltbar herausgestellt hatte, um eine Kultivierung über 14 Tage zu gewährleisten (unpublizierte Daten (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020)). Daher wurden diese Ansätze nicht weiterverfolgt.

### Möglichkeiten der Co-Kultur

Um eine physiologische Umgebung *in vitro* zu schaffen, besteht neben den bereits erwähnten Optionen, die Möglichkeit der Verwendung von Helferzellen in einer direkten oder indirekten Co-Kultur mit den HSCs. Dazu werden die HSCs in Gegenwart von Zellen, die *in vivo* auch innerhalb der Stammzellnische zu finden sind (mesenchymale Stammzellen), kultiviert, um den HSCs die gewohnten Interaktionen mit diesen Zellen zu ermöglichen (Raic et al., 2014). Im Falle einer direkten Co-Kultur

kommt es im Laufe der *In-vitro*-Kultivierung jedoch zu einer Vermischung der verschiedenen Zelltypen, was wiederum eine Rückgewinnung der amplifizierten HSCs und deren weiteren Einsatz erschwert oder sogar unmöglich machen kann. Ebenso ist die Verdrängung der semi-adhären HSCs vom Kultivierungssubstrat durch andere, adhären Zellen möglich (Sahin and Buitenhuis, 2012). HSCs haften *in vitro* zwar nur transient an der Oberfläche, brauchen aber dennoch Kontakte zu dem entsprechenden Kultivierungssubstrat zum Überleben. Für diesen Ansatz kommt erschwerend hinzu, dass die 3D Strukturen lediglich eine indirekte Co-Kultur mittels Inserts ermöglichen und dies sich in Vorversuchen als nicht praktikabel erwies (unpublizierte Daten (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020)). Insofern wurde von dieser Möglichkeit in der vorliegenden Arbeit Abstand genommen.

### 6.2.3 Vergleich mit bereits beschriebenen Methoden zur *In-vitro*-Kultivierung

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur *In-vitro*-Amplifikation humaner HSCs zeigen deutliche Unterschiede bezüglich Quantität und Qualität der generierten Zellen (Tabelle 1, (Congrains et al., 2021; Kumar and Geiger, 2017; Papa et al., 2020)). Ein direkter Vergleich zwischen bereits publizierten Arbeiten ist aus mehreren, im Folgenden beschriebenen, Gründen schwierig, soll quantitativ jedoch durchgeführt werden, um die Effizienz der HSC-Vermehrung in unserem *In-vitro*-Kultivierungssystem besser einordnen zu können. Zwar sind in Tabelle 1 ausschließlich Studien mit humanem Ausgangsmaterial zusammengefasst, jedoch wurden HSCs unterschiedlichen Ursprungs (KM, peripheres Blut, Nabelschnurblut) für die *In-vitro*-Kulturen verwendet. Darüber hinaus wurden in den Studien sowohl frisch isolierte als auch kryokonservierte Zellen genutzt und die Kultivierungsdauer reichte Studienabhängig von sieben bis über 28 Tage. Andere Arbeitsgruppen verwendeten zur Kultivierung andere Zellkulturmedien, die außerdem mit verschiedenen Kombinationen aus Zytokinen und Wachstumsfaktoren versetzt waren. Weiterhin kommt es durch die reine Fläche, welche das angewandte *In-vitro*-System den Zellen zur Verfügung stellt, zu enormen Unterschieden. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden daher ausschließlich Studien zitiert, in welchen die Ergebnisse als x-fache Vermehrung bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Zahl reiner CD34+-HSCs angegeben wurde. Die Tabelle kann folglich nicht alle publizierten Daten der vergangenen Jahre bezüglich verschiedener Modelle für eine *In-vitro*-Amplifikation von humanen HSCs abbilden und dient nur als Richtlinie. Insgesamt gesehen konnte mit

Hilfe unserer neuartiger 3D PDMS-Strukturen und des angepassten Stammzellmediums die Amplifikation von CD34+-HSCs und von LT-HSCs sehr gut gesteigert werden (Tabelle 1, blau unterlegt).

**Tabelle 1: Zusammenfassung verschiedener Ansätze zur *In-vitro*-Amplifikation humaner HSCs**

	<i>In-vitro</i> -Kultivierungsmethode	circa x-fache Vermehrung	Quelle
	CD34+-HSCs	Co-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen	40
Nutzung chemischer Verbindung (Notch-Ligand)		>100	(Delaney et al., 2010)
Nutzung chemischer Verbindung (SR-1)		50	(Boitano et al., 2010)
Nutzung chemischer Verbindung (VPA)		30-213	(Bug et al., 2005; Chaurasia et al., 2014)
3D Insert™-Polycaprolactone (PCL) mit Co-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen		10 <sup>2</sup>	(Ferreira et al., 2012)
3D actin-co-glycolic acid (PLGA) Mesh-basierte Co-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen		-	(Ferreira et al., 2012)
3D Fibrin-basierte Co-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen		3x10 <sup>7</sup>	(Ferreira et al., 2012)
3D OptiMaix™-Kollagen-basierte Co-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen		10 <sup>4</sup>	(Ferreira et al., 2012)
3D Polyethylenglycol-Hydrogel		175	(Raic et al., 2014)
Dezellularisierte extrazelluläre Matrix aus dem KM		1,8	(Krater et al., 2017)
Alginate-Gelatin-basiertes 3D Modell in Co-Kultur mit mesenchymalen Zellen		17	(Zhou et al., 2020)
GSK3β-Inhibitor		10-20	(Huang et al., 2012)
3D PDMS-Strukturen		150	(Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020)
LT-HSCs (erfasst durch mind. CD34+/CD38- oder vergleichbarer/zusätzlicher Marker im FACS)		<i>In-vitro</i> -Kultivierungsmethode	circa x-fache Vermehrung
	3D PDMS-basierte Co-Kultur mit mesenchymalen Zellen	13	(Futrega et al., 2017)
	3D Hydrogel	73	(Wu et al., 2018)
	Nutzung chemischer Verbindung (VPA)	35-20202	(Chaurasia et al., 2014)
	<i>Hematosphere</i> -basierte 3D Kultur	10	(Hur et al., 2011)
	Alginate-Gelatin-basiertes 3D Modell in Co-Kultur mit mesenchymalen Zellen	34	(Zhou et al., 2020)
	HOXB4-Überexpression	20	(Amsellem et al., 2003)
	Alexidine-Dihydrochlorid	2	(Liu et al., 2015)
	UM171	>100	(Fares et al., 2014)
	3D PDMS-Strukturen	4000	(Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020)

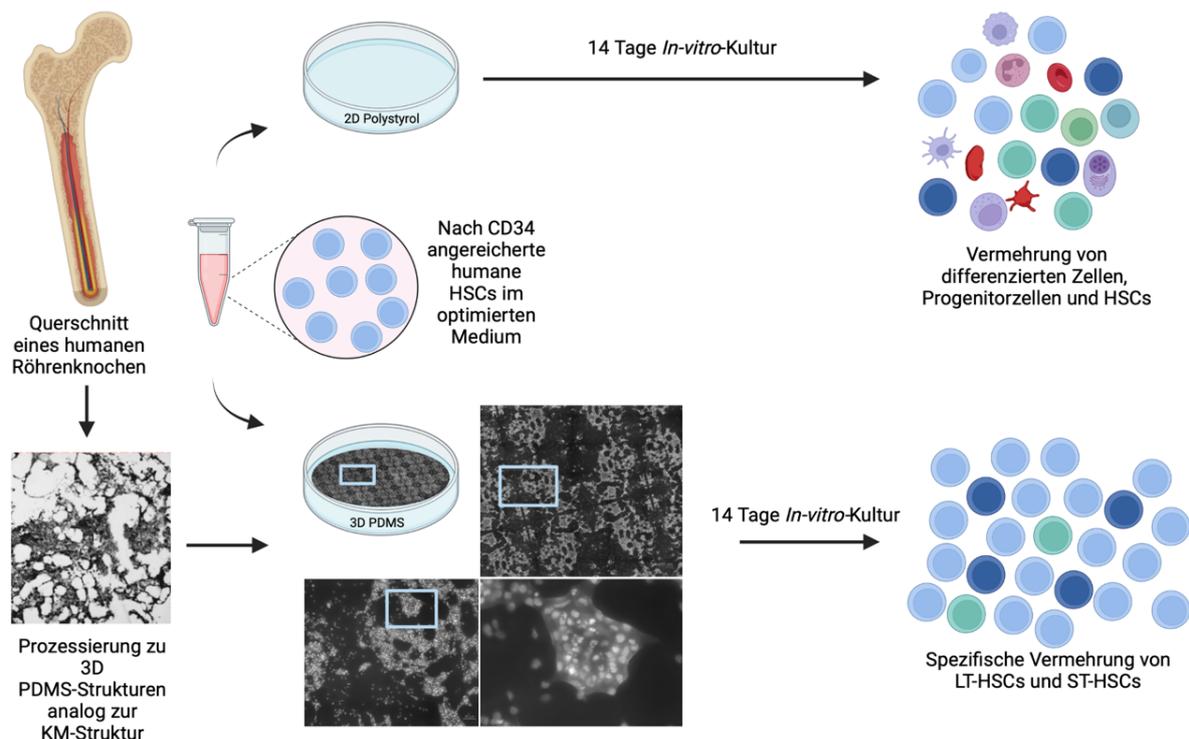
Herausragend sind hierbei die in der Arbeit von Ferreira *et al* (2012) erreichten außergewöhnlich hohen Amplifikationsraten von CD34+-HSCs. In dieser Studie wurde im 96-Well-Format gearbeitet, wobei 1x10<sup>6</sup> CD34+-HSCs zu Beginn eingesät wurden (im Vergleich dazu wurden 1x10<sup>4</sup> CD34+-HSCs in den hier vorgestellten Studien im 24-Well-Format verwendet (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020)). Die

nach sieben Tagen *In-vitro*-Kultur erreichte  $3 \times 10^7$ -fache Vermehrung von CD34+-HSCs mittels Fibrin-basierter 3D Co-Kultur mit mesenchymalen Stromazellen (Ferreira et al., 2012) erscheint dabei sehr hoch. Allerdings wurde dieser vielversprechende Ansatz zur *In-vitro*-Kultivierung bisher von Ferreira und Kollegen nicht weiterverfolgt, was auf mögliche Probleme bei der praktischen Umsetzung des Systems hindeuten könnte. Im Vergleich mit den anderen hier zitierten Studien erwies sich unser System allerdings als vergleichbar oder sogar überlegen.

Bei der Einschätzung der Proliferation von LT-HSCs kommt neben den beschriebenen Unterschieden im Studiendesign noch die Tatsache dazu, dass die Kriterien zur Klassifizierung solcher Zellen nicht einheitlich sind. Es gibt verschiedene Kombinationen an Oberflächenmarkern, die zur Detektion dieser Subfraktion im FACS genutzt werden können (De Felice et al., 2005; Laurenti and Gottgens, 2018; Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020; Notta et al., 2011; Will and Steidl, 2010). Trotz sehr ähnlichem Studiendesign und genutzten Oberflächenmarkern zur Detektion der LT-HSCs wurden in der Arbeit von Chaurasia *et al.* (2014) deutlich höhere Amplifikationsraten von LT-HSCs erreicht als in den hier diskutierten Arbeiten (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020). Eine Ursache könnte darin liegen, dass Chaurasia *et al.* (2014) keine Unterscheidung zwischen vitalen und nicht-vitalen Zellpopulationen vorgenommen hat und so die Gesamtzellzahl der entsprechenden Populationen deutlich höher liegt als in den hier diskutierten Arbeiten (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020). Allein eine höhere Ausbeute beziehungsweise Vermehrung der Zellen geht folglich nicht *per se* mit einem besseren Erhalt des Langzeitrepopulierungspotenzials der Zellen und im Zuge dessen mit einem gesteigerten Erfolg bei einer Transplantation einher.

Zusammenfassend konnte in den vorliegenden Arbeiten also gezeigt werden, dass neben den verwendeten Mediumsupplementen und der räumlichen Gegebenheiten der Kultivierungssubstrate auch deren Plastizität und Oberflächenhydrophobizität einen großen Einfluss auf den Erfolg der Amplifikation von HSCs und LT-HSCs *in vitro* hat. Für einen möglichen klinischen Einsatz spielen diese Erkenntnisse eine große Rolle: Es geht offensichtlich nicht nur darum, optimale Bedingungen für eine größtmögliche Expansion der kultivierten HSCs zu schaffen, denn diese geht oft mit einer gesteigerten Differenzierung der Zellen und somit mit einem Verlust von transplantierbaren LT-HSCs und HSCs einher. Vielmehr beinhaltet eine effektive

Methode zur prä-klinischen *In-vitro*-Expansion humaner HSCs neben proliferationsfördernden Maßnahmen auch solche, die die Differenzierung der HSCs *in vitro* hemmen und somit eine Amplifikation von HSCs unter gleichzeitigem Erhalt ihrer Pluripotenz ermöglichen (Abbildung 6).



**Abbildung 6: *In-vitro*-Amplifikation humaner HSCs – bisheriger Weg vs. optimierte Kultivierung**

Die neuartigen 3D PDMS-Strukturen wurden analog zu den Gegebenheiten im KM basierend auf dem Querschnitt eines humanen Röhrenknochens gefertigt. CD34<sup>+</sup>-HSCs gesunder Spender wurden entweder auf konventionellem 2D PS (oberer Teil) oder auf 3D PDMS-Strukturen (unterer Teil) im optimierten HSC-Medium für 14 Tage kultiviert. *In-vitro*-Kultur auf 2D PS führt zu einer Vermehrung von überwiegend differenzierten Zellen, Progenitorzellen und nur wenigen HSCs (oberer Abschnitt). Nutzung der 3D PDMS-Strukturen hingegen führte zu einer spezifischen Vermehrung von LT-HSCs und ST-HSCs (unterer Abschnitt). Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

### 6.3 Einfluss der Kultivierung auf intrazelluläre Signalwege

Um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu charakterisieren, welche durch die *In-vitro*-Kultivierung auf 2D PS, 3D PDMS oder 3D SiOn aktiviert werden und die Amplifikation der HSCs beeinflussen, wurden Proteom- und Transkriptom-Analysen durchgeführt.

#### NOTCH, MYC und FOXO1/3 Transkriptionsfaktoren

Die größten Veränderungen im Transkriptom und Proteom wurden unabhängig vom verwendeten Kultivierungssubstrat in Zellen nach 14 Tagen *In-vitro*-Kultur im Vergleich

zu den initial eingesetzten CD34-angereicherten HSCs an Tag 0 gefunden (Marx-Blümel et al., 2021). Das spiegelt die unvermeidliche Differenzierung einiger Zellen während der *In-vitro*-Kultivierung wider. Analog dazu wurden in allen Zellpopulationen mittels *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) der Omics-Datensätze Hinweise auf Veränderungen der Zellproliferation und des Zellzyklus sowie den entsprechenden molekularen Regulatoren, wie beispielsweise MYC (Bahr et al., 2018; Delgado and Leon, 2010), gefunden (Marx-Blümel et al., 2021). Zusätzlich deuten die Ergebnisse auf eine verringerte Aktivität von Signalwegen hin, die den Stammzellerhalt und die Selbsterneuerung der HSCs aufrechterhalten, wie beispielweise NOTCH1 und FOXO (Palomero et al., 2006, Tothova and Gilliland, 2007). Diese Veränderungen traten unabhängig vom verwendeten Kultivierungssubstrat auf. Zellen, die auf 3D PDMS kultiviert wurden, behielten nach 14 Tagen *In-vitro*-Kultur dabei jedoch die höchsten Proteinmengen von FOXO1 und FOXO3 und konnten diese Signalwege am besten aufrechterhalten (Marx-Blümel et al., 2021). NOTCH ist in der Lage, MYC zu aktivieren, um dadurch den Eintritt in den Zellzyklus zu ermöglichen und die Proliferation zu steigern (Abbildung 7) (Huang et al., 2014; Palomero et al., 2006). Es wurde aber auch gezeigt, dass ein aktivierter NOTCH-Signalweg nötig ist, um die Differenzierung von HSCs zu unterdrücken und somit deren Repopularisierungspotenzial aufrecht zu erhalten (Ribeiro-Filho et al., 2019). Die Transkriptionsfaktoren FOXO1/3 sind unter anderem maßgeblich an der Regulierung der Zellzyklusprogression beteiligt und können somit den Übergang zwischen einzelnen Zellzyklusphasen steuern (Tothova and Gilliland, 2007; Wang and Ema, 2016). Durch eine vorherrschend niedrige Aktivität von NOTCH1 und MYC, spielen FOXO1/3 in unserem Zellkultursystem die entscheidende Rolle, um die Proliferation und die daraus resultierende Differenzierung von HSCs zu kontrollieren und fördern somit den Ruhezustand von LT-HSCs aufrecht zu erhalten (Tothova and Gilliland, 2007, Marx-Blümel et al., 2021) (Abbildung 7).

### HIF1 $\alpha$ -Signalweg

Die IPA der Datensätze zeigte, dass der HIF1 $\alpha$ -Signalweg, welcher ebenfalls wichtig für den Stammzellerhalt ist (Cheng et al., 2014; Kobayashi et al., 2019; Kocabas et al., 2015; Takubo et al., 2010), durch die Kultivierung auf 3D PDMS und 3D SiOn aktiviert wurde, wobei der Effekt auf 3D PDMS am deutlichsten ausfiel (Marx-Blümel et al., 2021). HIF1 $\alpha$  ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und hat genau wie FOXO-

Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Autophagie, den Metabolismus und den intrazellulären Redoxstatus von HSCs (Cheng et al., 2014; Donnelly and Finlay, 2015; Kocabas et al., 2015; Soto-Herederó et al., 2020). Die im Vergleich zu 2D PS und 3D SiOn erhöhten FOXO1/3 Proteinmengen und die gesteigerte HIF1 $\alpha$ -Aktivität in Zellen, die auf 3D PDMS kultiviert wurden, könnten somit den besseren Stammzellerhalt auf diesem Kultivierungssubstrat nach 14 Tagen *In-vitro*-Kultur erklären. Eine gesteigerte Aktivität beider Signalwege steht mit einem besseren Erhalt der Stammzelleigenschaften *in vivo* in Verbindung (Abbildung 7, (Cheng et al., 2014; Kobayashi et al., 2019; Kocabas et al., 2015; Regitz et al., 1988; Takubo et al., 2010; Tothova and Gilliland, 2007; Wang and Ema, 2016)).

### Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist einer der am besten untersuchten molekularen Signalwege und maßgeblich an der Aufrechterhaltung und Kontrolle verschiedener Stoffwechsel- und Signalwege beteiligt. mTOR und dessen beide Proteinkomplexe mTORC1 und mTORC2 sind bedeutende Regulatoren der Hämatopoese (Fernandes et al., 2021; Ghosh and Kapur, 2016; Huang et al., 2012). Wenngleich für den mTORC1 deutlich mehr Zusammenhänge zum Stammzellerhalt beschrieben wurden, spielt auch mTORC2 eine Rolle bei dessen Regulation. Eine mäßige Aktivierung des mTORC1-Signalweges ist essenziell für die Aufrechterhaltung verschiedener Stammzellfunktionen, wobei eine Überaktivierung oder andere Defekte dieses Signalweges zu verminderten Stammzelleigenschaften und einer Dezimierung des Stammzellpools führen kann (Fernandes et al., 2021; Ghosh and Kapur, 2016; Ghosh et al., 2016; Huang et al., 2012). Sowohl FOXO-Transkriptionsfaktoren als auch HIF1 $\alpha$  sind ein Teil des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges. Dabei wird FOXO1/3 von dem *upstream*-Regulator AKT kontrolliert und HIF1 $\alpha$  durch mTORC1 reguliert (Abbildung 7). *Downstream*-Effektormoleküle des mTORC1-Signalwegs, wie beispielsweise S6K, spielen ebenfalls eine große Rolle bezüglich der Aufrechterhaltung und Funktion von HSCs (Ghosh and Kapur, 2016; Ghosh et al., 2016).

IPA der Multi-Omics-Daten konnte nach 14-tägiger *In-vitro*-Kultivierung eine Aktivierung von RAPTOR und RICTOR, zwei Interaktionspartner von mTOR in mTORC1 und mTORC2 (Huang and Manning, 2009), unabhängig vom Kultivierungssubstrat zeigen (Marx-Blümel et al., 2021). Diese Ergebnisse deuten auf eine Aktivierung von mTORC1 parallel zu den ablaufenden Differenzierungsprozessen

in allen Zellpopulationen während der *In-vitro*-Kultivierung hin. Dies stimmt mit bereits veröffentlichten Daten überein (Fernandes et al., 2021; Ghosh and Kapur, 2016; Huang et al., 2012) und könnte, da die vermutete Aktivierung von mTORC1 unabhängig vom verwendeten Zellkulturmaterial war, mit dem von uns verwendeten Zellkulturmedium im Zusammenhang stehen. Eine Überaktivierung von mTOR führt zu einer gesteigerten HSC-Differenzierung und damit verbunden zu einer Dezimierung des Stammzellpools (Fernandes et al., 2021; Ghosh and Kapur, 2016; Ghosh et al., 2016; Huang et al., 2012). Die Verwendung von GSK3 $\beta$ - oder mTOR-Inhibitoren im Zellkulturmedium während der *In-vitro*-Kultivierung humaner HSCs kann diesem Effekt entgegenwirken. Tatsächlich führte die Nutzung von VPA, welches GSK3 $\beta$  und mTOR durch Aktivierung von Wnt-Signalgenen inhibiert (De Felice et al., 2005; Ghosh and Kapur, 2016; Ghosh et al., 2016), zu einer gesteigerten Amplifikation von CD34 $^{+}$ -HSCs (Abbildung 7, (Marx-Blümel et al., 2021; Marx-Blümel et al., 2020)). Eine niedrige basale Aktivität von mTORC1, die durch unser optimiertes Zellkulturmedium gewährleistet wurde, erscheint unter diesem Gesichtspunkt als entscheidend für die effektive Amplifikation von HSCs unter Aufrechterhaltung ihrer Pluripotenz *in vitro*. Eine eindeutige Aktivierung von mTORC1 nach 14-tägiger *In-vitro*-Kultivierung konnte unabhängig vom verwendeten Kultivierungssubstrat aber nicht gefunden werden (Marx-Blümel et al., 2021). Die gemachten Annahmen zur mTORC1-Aktivität beruhen somit auf Schlussfolgerungen, die durch die erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Aktivität von *upstream*- und *downstream*-Proteinen von mTORC1 mittels IPA gefunden wurden. Lediglich die deutliche Aktivierung von mTORC2 in Zellen, die auf 3D SiOn kultiviert wurden, konnten im Vergleich zu Zellen, die auf 2D PS oder 3D PDMS wuchsen, nachgewiesen werden (Marx-Blümel et al., 2021). Auf den Zusammenhang zwischen der Kultivierung auf 3D SiOn und der Aktivierung von mTORC2 wird später noch einmal eingegangen.

### Die SREPB1-Familie von Transkriptionsfaktoren

Die SREPB1-Familie von Transkriptionsfaktoren wird ebenfalls durch mTORC1 kontrolliert und ist maßgeblich an der Regulation des Fettsäure- und Cholesterinstoffwechsels beteiligt (DeBose-Boyd and Ye, 2018; Duvel et al., 2010; Kobayashi et al., 2019; Porstmann et al., 2008). In den Multi-Omics-Analysen wurde eine erhöhte Aktivierung von SREBP1/2 und des Fettsäure- und Cholesterinmetabolismus in Zellen, die auf 3D PDMS kultiviert wurden, gefunden.

Zusätzlich konnte ein leichter Anstieg von aktiviertem SREBP1/2 auf Proteinebene in diesen Zellen gezeigt werden. Im Vergleich dazu zeigten Zellen von Tag 0 und auf 2D PS oder 3D SiOn kultivierte Zellen diesbezüglich keine Veränderungen (Marx-Blümel et al., 2021). SREBP1/2 ist in der Lage, die *de-novo*-Lipidsynthese anzuregen, wodurch die Verfügbarkeit einer ausreichenden Menge an Lipiden sichergestellt wird. Das ist speziell während der Zellproliferation wichtig, da diese das Vorhandensein ausreichender Mengen an Lipiden zur Membranbildung voraussetzt. Neben SREBP1/2 spielt auch HIF1 $\alpha$  eine große Rolle bei der Regulation des Fettsäure- und Cholesterinmetabolismus (DeBose-Boyd and Ye, 2018; Duvel et al., 2010; Kobayashi et al., 2019; Peterson et al., 2011; Porstmann et al., 2008). Die *In-vitro*-Kultivierung der HSCs auf 3D PDMS-Strukturen führte demnach durch die offensichtliche Aktivierung von PI3K/AKT/mTOR, SREBP und HIF1 $\alpha$  zu einer gesteigerten Fettsäure- und Cholesterinsynthese, was vermutlich den Stammzellerhalt förderte und eine gesteigerte Expansion unreifer LT-HSCs ermöglichte (Marx-Blümel et al., 2021) (Abbildung 7).

#### Metabolische Adaptation und Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks

Ruhende, sich in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befindende Stammzellen, können aktiviert werden und in den Zellzyklus eintreten, um sich entweder selbst zu erneuern oder um in Progenitorzellen zu differenzieren. Bedingt durch ihren Ruhezustand sind LT-HSCs in G<sub>0</sub> im Gegensatz zu aktivierten, proliferierenden (LT-/ST-)HSCs und Progenitorzellen, durch einen geringen Energiebedarf und Stoffwechsel charakterisiert. Ihre benötigte Energie wird dabei vornehmlich durch aerobe Glykolyse gewonnen (Kumar and Geiger, 2017; Suda et al., 2011; Wilkinson and Yamazaki, 2018). In Zellen, die auf 3D PDMS wuchsen, wurden spezifische metabolische Adaptionen gefunden (Marx-Blümel et al., 2021). Dabei korreliert die verringerte mitochondriale Respiration dieser Zellen mit einer gesteigerten Anzahl an ruhenden LT-HSCs (Ghosh and Kapur, 2016; Huang et al., 2012; Kocabas et al., 2015; Wang and Ema, 2016), welche auf 3D PDMS-Strukturen generiert werden konnten (Marx-Blümel et al., 2021). Aktivierte (LT-/ST-)HSCs beziehen ihre Energie vorwiegend aus der mitochondrialen Respiration, was eine ausreichende Menge an Mitochondrien voraussetzt und eine effizientere Energiegewinnung ermöglicht (Kumar and Geiger, 2017; Suda et al., 2011; Wilkinson and Yamazaki, 2018). Im Vergleich zur Glykolyse kann durch die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien zwar deutlich mehr

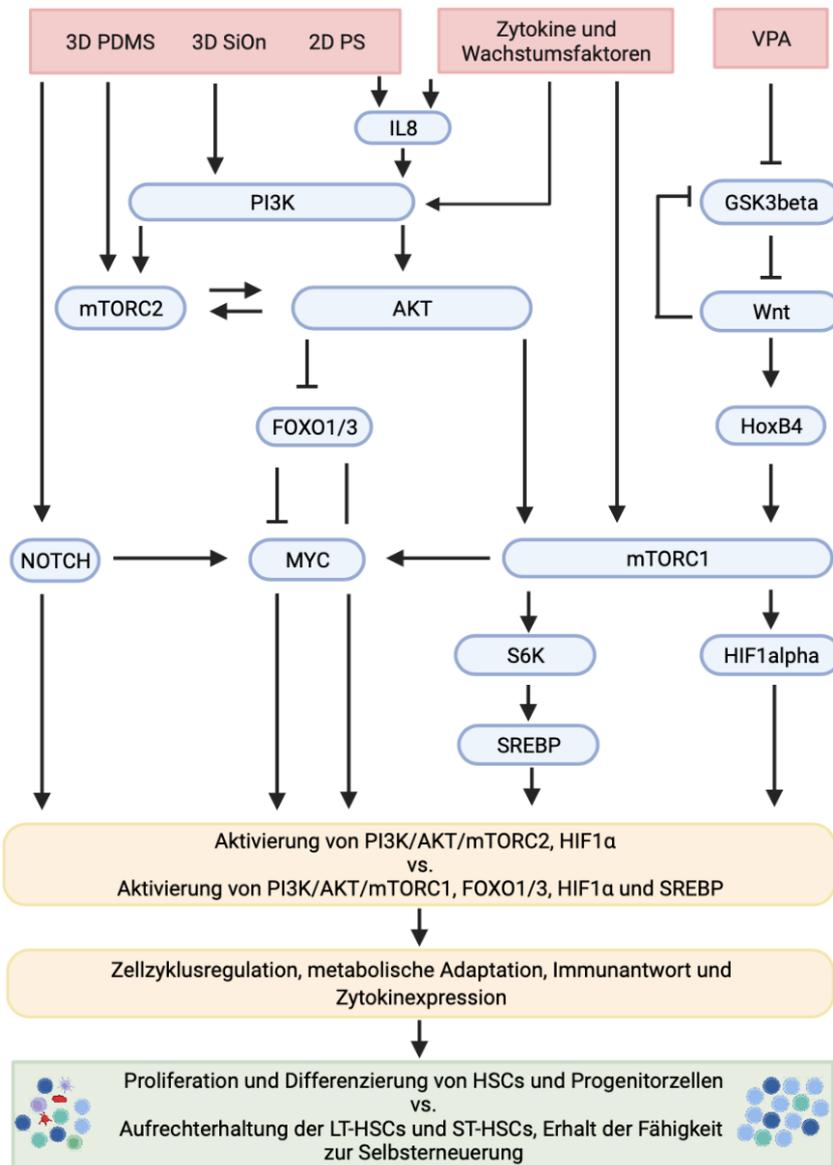
Energie erzeugt werden, dadurch bedingt kann es aber auch zu einer vermehrten ROS-Produktion in der Zelle kommen. ROS können zu oxidativen DNA-Schäden sowie zur Schädigung einzelner Proteine oder ganzer Organellen führen und damit den Stammzellerhalt beeinflussen. Bei sehr hohen Levels an intrazellulärem ROS oder einer zu großen oxidativen Schädigung der Zelle kann es zur Apoptose kommen (Tothova and Gilliland, 2007). FOXO-Transkriptionsfaktoren sind in der Lage, HSCs vor ROS-bedingten Zellschäden zu schützen und somit die Anzahl apoptotischer Zellen in Zusammenhang mit ROS möglichst gering zu halten und dadurch den Erhalt des Stammzellpools zu fördern (Tothova and Gilliland, 2007). In Zellen, die auf 3D PDMS kultiviert wurden, konnten wie bereits erwähnt erhöhte FOXO1/3-Level gefunden werden, was die erhöhten Mengen an LT-HSCs nach Kultivierung auf 3D PDMS durch einen verbesserten Abbau von ROS begünstigt haben könnte (Marx-Blümel et al., 2021).

Der niedrige Metabolismus der LT-HSCs steht auch mit dem umgebenden Sauerstoffpartialdruck in Verbindung. Durch sauerstoffarme Bedingungen wird die Energiegewinnung mittels mitochondrialer Respiration vermindert und Zellen werden zu einem niedrigeren Metabolismus beziehungsweise zur Glykolyse angeregt. Um die Bedingungen *in vitro* weiter den *in vivo* vorherrschenden Verhältnissen anzugleichen, könnte zukünftig ein niedriger Sauerstoffpartialdruck im Zellkulturinkubator in Betracht gezogen werden. In einem handelsüblichen Inkubator, wie er in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, herrscht ein Sauerstoffgehalt von ca. 20 %, was in etwa die Verhältnisse in der Raumluft widerspiegelt. In der hämatopoetischen Stammzellnische hingegen liegt der Sauerstoffgehalt bei nur 1-6 % und somit unter normoxischen Bedingungen (Eliasson et al., 2010; Mohyeldin et al., 2010). Dabei gibt es innerhalb des KMs ein Gefälle der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration: in den äußeren Bereichen liegt diese niedriger als in der Nähe Sauerstoff-transportierender Blutgefäße. Damit einhergehend wird auch ein unterschiedliches Auftreten von HSC-Subpopulationen postuliert. Je weiter eine Stammzelle von vorhandenen Blutgefäßen entfernt ist, desto unreifer/ruhender ist diese (Eliasson et al., 2010; Mohyeldin et al., 2010). Mit fortschreitender Aktivierung von LT-HSCs und der daraus resultierenden metabolischen Adaptation, Proliferation und Differenzierung wandern diese Stammzellen weiter in Richtung der Gefäße, um in die Blutbahn eintreten und zirkulieren zu können. Die Vermutung liegt nahe, dass die Sauerstoffkonzentration innerhalb der verwendeten 3D PDMS-Strukturen aufgrund der Vertiefungen nicht

homogen ist und es infolgedessen zu Unterschieden in der Sauerstoffverfügbarkeit für die kultivierten HSCs kommt. Nach einer Modellrechnung konnte jedoch ermittelt werden, dass die Unterschiede der Sauerstoffkonzentration innerhalb der 3D Strukturen minimal sind und keinen Einfluss auf das Verhalten der kultivierten HSCs haben sollten (unpublizierte Daten (Marx-Blümel et al., 2020)).

Zellen, die auf 3D SiOn expandiert wurden, zeigten eine deutlich verringerte mitochondriale Respiration und eine gesteigerte Glykolyse (Marx-Blümel et al., 2021). Das könnte einerseits auf eine große Anzahl ruhender, inaktiver LT-HSCs hindeuten, kann gleichzeitig aber auch ein Zeichen von PI3K/AKT/mTORC2-gesteuerten inflammatorischen Prozessen und einer Immunzellaktivierung sein (Cheng et al., 2014; Donnelly and Finlay, 2015; Huang et al., 2012; Kocabas et al., 2015; Regitz et al., 1988; Soto-Herederó et al., 2020; Wang and Ema, 2016). Damit übereinstimmend konnte eine Aktivierung der pro-inflammatorischen Immunantwort mittels IPA in Zellen, die auf 3D SiOn kultiviert wurden, nachgewiesen werden (Marx-Blümel et al., 2021). Eine Aktivierung von AKT, vermittelt durch dessen Phosphorylierung, und eine Aktivierung von mTORC2 konnte in Zellen, die auf 3D SiOn wuchsen, ebenfalls gezeigt werden (Marx-Blümel et al., 2021) und tritt im Zuge einer inflammatorischen Reaktion auf (Vergadi et al., 2017; Zegeye et al., 2018). Weiterhin führte die Kultivierung auf 3D SiOn ebenso wie die Kultivierung auf 2D PS zu einer gesteigerten Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, welche mittels IPA und ELISA-Tests gezeigt werden konnten. Im Hinblick auf die geringere Expansion an LT-HSCs auf 3D SiOn im Vergleich zu 3D PDMS und der gesteigerten Aktivität pro-inflammatorischer Signalwege, kann vermutet werden, dass die Veränderungen des Zellstoffwechsels nicht auf einen verbesserten Stammzellerhalt, sondern auf eine gesteigerte Inflammation in auf 3D SiOn kultivierten HSCs hindeuten (Marx-Blümel et al., 2021). Durch eine Entzündungsreaktion ausgelöste metabolische Adaptation werden dabei durch den PI3K/AKT/mTORC1/2- und den sich anschließenden mTORC1/HIF1 $\alpha$ -Signalweg vermittelt (Abbildung 7) (Cheng et al., 2014; Donnelly and Finlay, 2015; Soto-Herederó et al., 2020), was mit den Ergebnissen der Multi-Omics-Analyse übereinstimmt (Marx-Blümel et al., 2021). 3D PDMS hingegen induzierte eine ausbalancierte Sekretion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Besonders deutlich war die Sekretion von Interleukin 8 (IL8), welches in großen Mengen vor allem nach Kultivierung auf 3D PDMS gefunden werden konnte (Marx-Blümel et al., 2021).

Für IL8 wurde beschrieben, dass es die Mobilisation von HSCs aktiviert (Laterveer et al., 1995; Nervi et al., 2006) und auf diesem Wege an der effektiven Amplifikation von HSCs beteiligt sein könnte. Zusätzlich scheint IL8 durch Bindung des membranständigen IL8-Rezeptors den PI3K/AKT-Signalweg zu aktivieren, der einen großen Einfluss auf den Stammzellerhalt hat (Abbildung 7, (Campbell et al., 2013)).



**Abbildung 7: Durch die optimierte Kultivierung aktivierte Proteine und Signalwege und die resultierenden Folgen**

Durch Verwendung der optimierten *in-vitro*-Kulturbedingungen (rote Kästchen) kommt es zur Aktivierung verschiedener Proteine/Proteinkomplexe (blaue Kästchen) und infolgedessen zur Aktivierung verschiedener Signalwege (gelbe Kästchen). Dabei kommt es durch Verwendung der 3D SiOn-Strukturen zu einer Aktivierung von PI3K/AKT/mTORC2, HIF1α bzw. durch Verwendung der 3D PDMS-Strukturen zur Aktivierung von PI3K/AKT/mTORC1, FOXO1/3, HIF1α und SREBP. Diese Signalwege stehen im Zusammenhang mit der Proliferation und Differenzierung von HSCs und Progenitorzellen oder fördern die Aufrechterhaltung der LT-HSCs und ST-HSCs (grünes Kästchen). Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

Zusammenfassend konnte durch die verbesserte Hydrophilie der 3D SiOn-Strukturen zwar die initiale Anheftung der HSCs gefördert werden, allerdings kam es im Zuge dessen zu einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung der Stammzellen und damit verbunden zu einer geringeren Amplifikation von LT-HSCs. Dem zugrunde lag eine Aktivierung des PI3K/AKT/mTORC2/HIF1 $\alpha$ -Signalweges nach *In-vitro*-Kultivierung. Diese Ergebnisse stimmen mit dem verminderten klonogenen Potenzial von Zellen überein, die auf 3D SiOn kultiviert wurden.

Unbeschichtete 3D PDMS-Strukturen weisen zwar eine geringere Hydrophilie auf, ermöglichen aber eine sehr gute Expansion von unreifen LT-HSCs durch eine ausgewogene Proliferation der Zellen und damit verbunden einer geringeren Differenzierung und eines hohen klonogenen Potentials der Zellen. Zudem kommt es zu einer Aktivierung von FOXO1/3, HIF1 $\alpha$  und SREBP und den entsprechenden Signalwegen, was zu einer Anpassung des Stoffwechsels und einer ausgeglichenen Sekretion von Zytokinen in Zellen führt, die auf 3D PDMS kultiviert wurden. Diese molekularen Veränderungen verbessern den Erhalt von Stammzellen, insbesondere der LT-HSCs auf 3D PDMS deutlich im Vergleich zu 2D PS und 3D SiOn.

Noch ungeklärt ist das tatsächliche Repopularisierungspotenzial der im neuartigen 3D System amplifizierten HSCs *in vivo*. Dies erfordert allerdings aufwendige Tierexperimente und könnte Teil eines Folgeprojekts werden. Unabhängig davon konnte mittels Nutzung der 3D Strukturen und einer optimierten Mediumskomposition bereits eine geeignete Plattform entwickelt werden, welche eine effektive Amplifikation von LT-HSCs *in vitro* ermöglicht und gleichzeitig deren Vitalität, Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Pluripotenz unterstützt (Abbildung 6, Abbildung 7).

## **7 Literatur- und Quellenverzeichnis**

- Aerts-Kaya, F. (2021). Strategies to Protect Hematopoietic Stem Cells from Culture-induced Stress Conditions. *Current stem cell research & therapy* 16, 755-770.
- Amsellem, S., Pflumio, F., Bardinet, D., Izac, B., Charneau, P., Romeo, P.H., Dubart-Kupferschmitt, A., and Fichelson, S. (2003). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med* 9, 1423-1427.
- Ash, R.C., Detrick, D.A., and Zanjani, E.D. (1981). Studies of human pluripotential hemopoietic stem cells (CFU-GEMM) in vitro. *Blood* 58, 309-316.
- Bahr, C., von Paleske, L., Uslu, V.V., Remeseiro, S., Takayama, N., Ng, S.W., Murison, A., Langenfeld, K., Petretich, M., Scognamiglio, R., *et al.* (2018). A Myc enhancer cluster regulates normal and leukaemic haematopoietic stem cell hierarchies. *Nature* 553, 515-520.
- Berthier, E., Young, E.W., and Beebe, D. (2012). Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab Chip* 12, 1224-1237.
- Boitano, A.E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L.C., Parker, A.E., Sutton, S.E., Walker, J.R., Flaveny, C.A., Perdew, G.H., Denison, M.S., *et al.* (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329, 1345-1348.
- Brecher, G., Bookstein, N., Redfearn, W., Necas, E., Pallavicini, M.G., and Cronkite, E.P. (1993). Self-renewal of the long-term repopulating stem cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6028-6031.
- Bug, G., Gul, H., Schwarz, K., Pfeifer, H., Kampfmann, M., Zheng, X., Beissert, T., Boehrer, S., Hoelzer, D., Ottmann, O.G., *et al.* (2005). Valproic acid stimulates proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cells. *Cancer Res* 65, 2537-2541.
- Campbell, L.M., Maxwell, P.J., and Waugh, D.J. (2013). Rationale and Means to Target Pro-Inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)* 6, 929-959.
- Challen, G.A., Boles, N., Lin, K.K., and Goodell, M.A. (2009). Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A* 75, 14-24.
- Chaurasia, P., Gajzer, D.C., Schaniel, C., D'Souza, S., and Hoffman, R. (2014). Epigenetic reprogramming induces the expansion of cord blood stem cells. *J Clin Invest* 124, 2378-2395.
- Chen, B.J., Cui, X., Sempowski, G.D., Domen, J., and Chao, N.J. (2004). Hematopoietic stem cell dose correlates with the speed of immune reconstitution after stem cell transplantation. *Blood* 103, 4344-4352.
- Cheng, H., Zheng, Z., and Cheng, T. (2020). New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell* 11, 34-44.
- Cheng, S.C., Quintin, J., Cramer, R.A., Shepardson, K.M., Saeed, S., Kumar, V., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Martens, J.H., Rao, N.A., Aghajani-refah, A., *et al.* (2014). mTOR- and HIF-1alpha-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* 345, 1250684.
- Choi, J.S., and Harley, B.A. (2017). Marrow-inspired matrix cues rapidly affect early fate decisions of hematopoietic stem and progenitor cells. *Sci Adv* 3, e1600455.
- Choi, J.S., Mahadik, B.P., and Harley, B.A. (2015). Engineering the hematopoietic stem cell niche: *Frontiers in biomaterial science. Biotechnol J* 10, 1529-1545.
- Congrains, A., Bianco, J., Rosa, R.G., Mancuso, R.I., and Saad, S.T.O. (2021). 3D Scaffolds to Model the Hematopoietic Stem Cell Niche: Applications and Perspectives. *Materials (Basel)* 14.
- Dahlberg, A., Brashem-Stein, C., Delaney, C., and Bernstein, I.D. (2014). Enhanced generation of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells by culture with StemRegenin1 and Delta1(Ext-IgG.). *Leukemia* 28, 2097-2101.

Dawson, E., Mapili, G., Erickson, K., Taqvi, S., and Roy, K. (2008). Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 215-228.

De Felice, L., Tatarelli, C., Mascolo, M.G., Gregorj, C., Agostini, F., Fiorini, R., Gelmetti, V., Pascale, S., Padula, F., Petrucci, M.T., *et al.* (2005). Histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances the cytokine-induced expansion of human hematopoietic stem cells. *Cancer Res* 65, 1505-1513.

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.

DeBose-Boyd, R.A., and Ye, J. (2018). SREBPs in Lipid Metabolism, Insulin Signaling, and Beyond. *Trends Biochem Sci* 43, 358-368.

Delaney, C., Heimfeld, S., Brashem-Stein, C., Voorhies, H., Manger, R.L., and Bernstein, I.D. (2010). Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 16, 232-236.

Delgado, M.D., and Leon, J. (2010). Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Genes Cancer* 1, 605-616.

Donnelly, R.P., and Finlay, D.K. (2015). Glucose, glycolysis and lymphocyte responses. *Mol Immunol* 68, 513-519.

Dossou, A.S., and Basu, A. (2019). The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy. *Cancers (Basel)* 11.

Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., and Dick, J.E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* 10, 120-136.

Duvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., *et al.* (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 39, 171-183.

Eliasson, P., Rehn, M., Hammar, P., Larsson, P., Sirenko, O., Flippin, L.A., Cammenga, J., and Jonsson, J.I. (2010). Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp Hematol* 38, 301-310 e302.

Fares, I., Chagraoui, J., Gareau, Y., Gingras, S., Ruel, R., Mayotte, N., Csaszar, E., Knapp, D.J., Miller, P., Ngom, M., *et al.* (2014). Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science* 345, 1509-1512.

Fernandes, H., Moura, J., and Carvalho, E. (2021). mTOR Signaling as a Regulator of Hematopoietic Stem Cell Fate. *Stem Cell Rev Rep* 17, 1312-1322.

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.

Frisch, B.J., and Calvi, L.M. (2014). Hematopoietic stem cell cultures and assays. *Methods Mol Biol* 1130, 315-324.

Futrega, K., Atkinson, K., Lott, W.B., and Doran, M.R. (2017). Spheroid Coculture of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells and Monolayer Expanded Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Polydimethylsiloxane Microwells Modestly Improves In Vitro Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Expansion. *Tissue Eng Part C Methods* 23, 200-218.

Ghosh, J., and Kapur, R. (2016). Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and leukemia maintenance by the PI3K-mTORC1 pathway. *Current stem cell reports* 2, 368-378.

Ghosh, J., Kobayashi, M., Ramdas, B., Chatterjee, A., Ma, P., Mali, R.S., Carlesso, N., Liu, Y., Plas, D.R., Chan, R.J., *et al.* (2016). S6K1 regulates hematopoietic stem cell self-renewal and leukemia maintenance. *J Clin Invest* 126, 2621-2625.

Gillatt, D.A., Roberts, J.B., Gingell, J.C., and Smith, P.J. (1988). Treatment of prostatic cancer. *Br Med J (Clin Res Ed)* 296, 644-645.

Gupta, A.O., and Wagner, J.E. (2020). Umbilical Cord Blood Transplants: Current Status and Evolving Therapies. *Front Pediatr* 8, 570282.

Hashimoto, Y., Funamoto, S., Kimura, T., Nam, K., Fujisato, T., and Kishida, A. (2011). The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 32, 7060-7067.

Huang, H., Weng, H., Zhou, H., and Qu, L. (2014). Attacking c-Myc: targeted and combined therapies for cancer. *Curr Pharm Des* 20, 6543-6554.

Huang, J., and Manning, B.D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 37, 217-222.

Huang, J., Nguyen-McCarty, M., Hexner, E.O., Danet-Desnoyers, G., and Klein, P.S. (2012). Maintenance of hematopoietic stem cells through regulation of Wnt and mTOR pathways. *Nat Med* 18, 1778-1785.

Hur, J., Park, J., Lee, S.E., Yoon, C.H., Jang, J.H., Yang, J.M., Lee, T.K., Choi, J.I., Yang, H.M., Lee, E.J., *et al.* (2011). Human peripheral blood-born hematosphere as a niche for hematopoietic stem cell expansion. *Cell Res* 21, 987-990.

Hyder, M.A., Goebel, W.S., Ervin, K.D., Schwartz, J.E., Robertson, M.J., Thakrar, T.C., Albany, C., and Farag, S.S. (2018). Low CD34(+) Cell Doses Are Associated with Increased Cost and Worse Outcome after Tandem Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with Relapsed or Refractory Germ Cell Tumors. *Biol Blood Marrow Transplant* 24, 1497-1504.

Kimlin, L.C., Casagrande, G., and Virador, V.M. (2013). In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol Carcinog* 52, 167-182.

Kobayashi, H., Morikawa, T., Okinaga, A., Hamano, F., Hashidate-Yoshida, T., Watanuki, S., Hishikawa, D., Shindou, H., Arai, F., Kabe, Y., *et al.* (2019). Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo. *Cell Rep* 28, 145-158 e149.

Kocabas, F., Xie, L., Xie, J., Yu, Z., DeBerardinis, R.J., Kimura, W., Thet, S., Elshamy, A.F., Abouellail, H., Muralidhar, S., *et al.* (2015). Hypoxic metabolism in human hematopoietic stem cells. *Cell Biosci* 5, 39.

Koehler, K.R., Mikosz, A.M., Molosh, A.I., Patel, D., and Hashino, E. (2013). Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature* 500, 217-221.

Krater, M., Jacobi, A., Otto, O., Tietze, S., Muller, K., Poitz, D.M., Palm, S., Zinna, V.M., Biehain, U., Wobus, M., *et al.* (2017). Bone marrow niche-mimetics modulate HSPC function via integrin signaling. *Sci Rep* 7, 2549.

Kumar, S., and Geiger, H. (2017). HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends Mol Med* 23, 799-819.

Laterveer, L., Lindley, I.J., Hamilton, M.S., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (1995). Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* 85, 2269-2275.

Laurenti, E., and Gottgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553, 418-426.

Li, Y., Ma, T., Kniss, D.A., Yang, S.T., and Lasky, L.C. (2001). Human cord cell hematopoiesis in three-dimensional nonwoven fibrous matrices: in vitro simulation of the marrow microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 355-368.

Liu, X., Zheng, H., Yu, W.M., Cooper, T.M., Bunting, K.D., and Qu, C.K. (2015). Maintenance of mouse hematopoietic stem cells ex vivo by reprogramming cellular metabolism. *Blood* 125, 1562-1565.

Lo Celso, C., Fleming, H.E., Wu, J.W., Zhao, C.X., Miake-Lye, S., Fujisaki, J., Cote, D., Rowe, D.W., Lin, C.P., and Scadden, D.T. (2009). Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* 457, 92-96.

Lutolf, M.P., and Hubbell, J.A. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 23, 47-55.

Marx-Blümel, L., Marx, C., Sonnemann, J., Weise, F., Hampl, J., Frey, J., Rothenburger, L., Cirri, E., Rahnis, N., Koch, P., *et al.* (2021). Molecular characterization of hematopoietic stem cells after in vitro amplification on biomimetic 3D PDMS cell culture scaffolds. *Sci Rep* 11, 21163.

Marx-Blümel, L., Marx, C., Weise, F., Frey, J., Perner, B., Schlingloff, G., Lindig, N., Hampl, J., Sonnemann, J., Brauer, D., *et al.* (2020). Biomimetic reconstruction of the hematopoietic stem cell niche for in vitro amplification of human hematopoietic stem cells. *PLoS One* 15, e0234638.

Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T., and Quinones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150-161.

Muller, E., Grinenko, T., Pompe, T., Waskow, C., and Werner, C. (2015). Space constraints govern fate of hematopoietic stem and progenitor cells in vitro. *Biomaterials* 53, 709-715.

Nakamura-Ishizu, A., Takizawa, H., and Suda, T. (2014). The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development* 141, 4656-4666.

Nervi, B., Link, D.C., and DiPersio, J.F. (2006). Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem* 99, 690-705.

Niederwieser, D., Baldomero, H., Szer, J., Gratwohl, M., Aljurf, M., Atsuta, Y., Bouzas, L.F., Confer, D., Greinix, H., Horowitz, M., *et al.* (2016). Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. *Bone Marrow Transplant* 51, 778-785.

Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poeppl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333, 218-221.

Orkin, S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1, 57-64.

Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245.

Palomero, T., Lim, W.K., Odom, D.T., Sulis, M.L., Real, P.J., Margolin, A., Barnes, K.C., O'Neil, J., Neuberg, D., Weng, A.P., *et al.* (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18261-18266.

Panch, S.R., Szymanski, J., Savani, B.N., and Stroncek, D.F. (2017). Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 23, 1241-1249.

Papa, L., Djedaini, M., and Hoffman, R. (2020). Ex vivo HSC expansion challenges the paradigm of unidirectional human hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 1466, 39-50.

Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., *et al.* (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146, 408-420.

Pietras, E.M., Warr, M.R., and Passegue, E. (2011). Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* 195, 709-720.

Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.L., and Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab* 8, 224-236.

Prewitz, M., Seib, F.P., Pompe, T., and Werner, C. (2012). Polymeric biomaterials for stem cell bioengineering. *Macromol Rapid Commun* 33, 1420-1431.

Prewitz, M.C., Seib, F.P., von Bonin, M., Friedrichs, J., Stissel, A., Niehage, C., Muller, K., Anastassiadis, K., Waskow, C., Hoflack, B., *et al.* (2013). Tightly anchored tissue-mimetic matrices as instructive stem cell microenvironments. *Nat Methods* 10, 788-794.

Prochazkova, M., Chavez, M.G., Prochazka, J., Felfy, H., Mushegyan, V., and Klein, O.D. (2015). Embryonic versus adult stem cells. In *Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences* (Elsevier), pp. 249-262.

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.

Regitz, V., Shug, A.L., Schuler, S., Yankah, C., Hetzer, R., and Fleck, E. (1988). [Heart failure in dilated cardiomyopathy and coronary heart disease. The contribution of biochemical parameters to assessing the prognosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 113, 781-786.

Ribeiro-Filho, A.C., Levy, D., Ruiz, J.L.M., Mantovani, M.D.C., and Bydlowski, S.P. (2019). Traditional and Advanced Cell Cultures in Hematopoietic Stem Cell Studies. *Cells* 8.

Robinson, S.N., Simmons, P.J., Yang, H., Alousi, A.M., Marcos de Lima, J., and Shpall, E.J. (2011). Mesenchymal stem cells in ex vivo cord blood expansion. *Best Pract Res Clin Haematol* 24, 83-92.

Sahin, A.O., and Buitenhuis, M. (2012). Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells. *Cell Adh Migr* 6, 39-48.

Sei, J., Moses, B., Becker, A.H., Kim, M., Kaur, N., Vemuri, M., and Civin, C. (2020). Optimized culture medium for enhanced ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. *Cytotherapy* 22, S60-S61.

Sei, J.J., Moses, B.S., Harris-Becker, A., Kim, M., Kaur, N., Vemuri, M.C., and Civin, C.I. (2019). Optimized culture medium for enhanced ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 134, 1965.

Soto-Herederó, G., Gomez de Las Heras, M.M., Gabande-Rodriguez, E., Oller, J., and Mittelbrunn, M. (2020). Glycolysis - a key player in the inflammatory response. *FEBS J* 287, 3350-3369.

Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 9, 298-310.

Sun, J., Yan, L., Shen, W., and Meng, A. (2018). Maternal Ybx1 safeguards zebrafish oocyte maturation and maternal-to-zygotic transition by repressing global translation. *Development* 145.

Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M., *et al.* (2010). Regulation of the HIF-1 $\alpha$  level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 391-402.

Torisawa, Y.S., Spina, C.S., Mammoto, T., Mammoto, A., Weaver, J.C., Tat, T., Collins, J.J., and Ingber, D.E. (2014). Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology in vitro. *Nat Methods* 11, 663-669.

Tothova, Z., and Gilliland, D.G. (2007). FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell* 1, 140-152.

Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K., and Tsatsanis, C. (2017). Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *J Immunol* 198, 1006-1014.

Wagner, J.E., Jr., Brunstein, C.G., Boitano, A.E., DeFor, T.E., McKenna, D., Sumstad, D., Blazar, B.R., Tolar, J., Le, C., Jones, J., *et al.* (2016). Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. *Cell Stem Cell* 18, 144-155.

Walasek, M.A., van Os, R., and de Haan, G. (2012). Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1266, 138-150.

Wang, X., Chu, Y., Wang, W., and Yuan, W. (2016). mTORC signaling in hematopoiesis. *Int J Hematol* 103, 510-518.

Wang, Z., and Ema, H. (2016). Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 103, 498-509.

Wilkinson, A.C., and Yamazaki, S. (2018). The hematopoietic stem cell diet. *Int J Hematol* 107, 634-641.

Will, B., and Steidl, U. (2010). Multi-parameter fluorescence-activated cell sorting and analysis of stem and progenitor cells in myeloid malignancies. *Best Pract Res Clin Haematol* 23, 391-401.

Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6, 93-106.

Wu, J., Xiao, Z., Chen, A., He, H., He, C., Shuai, X., Li, X., Chen, S., Zhang, Y., Ren, B., *et al.* (2018). Sulfated zwitterionic poly(sulfobetaine methacrylate) hydrogels promote complete skin regeneration. *Acta Biomater* 71, 293-305.

Zegeye, M.M., Lindkvist, M., Falker, K., Kumawat, A.K., Paramel, G., Grenegard, M., Sirsjo, A., and Ljungberg, L.U. (2018). Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT pathways are crucial for IL-6 trans-signaling-mediated pro-inflammatory response in human vascular endothelial cells. *Cell Commun Signal* 16, 55.

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, P., Zhang, C., Li, J., Han, J., Liu, X., and Yang, H. (2019). The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Res Ther* 10, 327.

Zhou, D., Chen, L., Ding, J., Zhang, X., Nie, Z., Li, X., Yang, B., and Xu, T. (2020). A 3D engineered scaffold for hematopoietic progenitor/stem cell co-culture in vitro. *Sci Rep* 10, 11485.

## **8 Anhang**

### **8.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildung 1:	Möglichkeiten der Teilung von HSCs	6
Abbildung 2:	Modell der adulten Hämatopoese im Menschen	7
Abbildung 3:	Stadien der Aktivierung und Differenzierung von HSCs	9
Abbildung 4:	Zusammenhang zwischen der Menge der transplantierten CD34+-HSCs und des krankheitsfreien Überlebens der Patienten	11
Abbildung 5:	Gewinnung und <i>In-vitro</i> -Vermehrung humaner HSCs – derzeitige Situation vs. wünschenswerter Zustand	12
Abbildung 6:	<i>In-vitro</i> -Amplifikation humaner HSCs – bisheriger Weg vs. optimierte Kultivierung	36
Abbildung 7:	Durch die optimierte Kultivierung aktivierte Proteine und Signalwege und die resultierenden Folgen	43
Tabelle 1:	Zusammenfassung verschiedener Ansätze zur <i>In-vitro</i> -Amplifikation humaner HSCs	34

### **8.2 Lebenslauf**

#### **Veröffentlichungen und Tagungen**

Assessment of Mitochondrial Dysfunctions after Sirtuin Inhibition. Marx C, **Marx-Blümel L**, Sonnemann J, Wang ZQ (2022) *Methods Mol Biol*

**Marx-Blümel L<sup>§#</sup>**, Marx C, Sonnemann J, Weise F, Hampf J, Frey J, Rothenburger L, Cirri E, Rahnis N, Koch P, Groth M, Schober A, Wang ZQ, Beck JF. Molecular characterization of hematopoietic stem cells after in vitro amplification on biomimetic 3D PDMS cell culture scaffolds. *Sci Rep* 11, 21163 (2021).

Mechanistic insights into a p53-regulated cytotoxicity of entinostat and irinotecan against colorectal cancer cells. Marx C, Sonnemann J, Maddocks ODK, Lilla S, Beyer M, Hauzenberger I, Nunna S, **Marx-Blümel L**, Westermann M, Wagner T, Siniuk K,

Hoelzer D, Thierbach R, Mullins CS, Linnebacher M, Neri F, Wang ZQ, Heinzl T, Krämer OH (2021) *Mol Onc*

Cooperative treatment effectiveness of ATR and HSP90 inhibition in Ewing's sarcoma cells. Marx C, Schaarschmidt MU, Kirkpatrick J, **Marx-Blümel L**, Halilovic M, Westermann M, Hoelzer D, Meyer FB, Geng Y, Buder K, Schadwinkel HM, Siniuk K, Becker S, Thierbach R, Beck JF, Sonnemann J, Wang ZQ (2021) *Cell Biosci*. 11(1):57.

DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Function Is Implicated in the Age-Related Loss of Cortical Interneurons. Hahn A, Pensold D, Bayer C, Tittelmeier J, González-Bermúdez L, **Marx-Blümel L**, Linde J, Groß J, Salinas-Riester G, Lingner T, von Maltzahn J, Spehr M, Pieler T, Urbach A, Zimmer-Bensch G (2020) *Front Cell Dev Biol*. 22;8:639.

Biomimetic reconstruction of the hematopoietic stem cell niche for in vitro amplification of human hematopoietic stem cells. **Marx-Blümel L<sup>#</sup>**, Marx C, Weise F, Frey J, Perner B, Schlingloff G, Lindig N, Hampl J, Sonnemann J, Brauer D, Voigt A, Singh S, Beck B, Jäger UM, Wang ZQ, Beck JF, Schober A (2020) *PLoS One*, 15(6), e0234638

Marx C, **Marx-Blümel L<sup>§</sup>**, Lindig N, Thierbach R, Hoelzer D, Becker S, Wittig S, Lehmann R, Slevogt H, Heinzl T, Wang ZQ, Beck JF, Sonnemann J. The sirtuin 1/2 inhibitor tenovin-1 induces a nonlinear apoptosis-inducing factor-dependent cell death in a p53 null Ewing's sarcoma cell line. (2018) *Invest New Drugs*. 2018 Jun;36(3):396-406.

Assessment of HDACi-induced cytotoxicity. **Blümel L<sup>\*</sup>**, Marx C, Kühne M, Sonnemann J (2017) *Meth Mol Biol*

Reverse chemomodulatory effects of the SIRT1 activators resveratrol and SRT1720 in Ewing's sarcoma cells: resveratrol suppresses and SRT1720 enhances etoposide- and vincristine-induced anticancer activity. Sonnemann J, Kahl M,

Siranjeevi PM, Blumrich A, **Blümel L**, Becker S, Wittig S, Winkler R, Krämer OH, Beck JF (2016) *J Cancer Res Clin Oncol*, 142, Vol. 1, p 17-26

RETRA exerts anticancer activity in Ewing's sarcoma cells independent of their TP53 status. Sonnemann J, Grauel D, **Blümel L**, Hentschel J, Marx C, Blumrich A, Focke K, Becker S, Wittig S, Schinkel S, Krämer OH, Beck JF (2015) *Eur J Cancer*, 51, Vol. 7, p 841-51

Curbing Methylation: A Key To Eternal Youth And Vigor?. **Blümel L\***, Pensold D, Khundaze M, Zimmer G (2014) *Neural Science and Brain Research*, 1, Vol.1

\* Erstautor

# Korresp. Autor

\$ geteilter Erstautor

Poster Präsentation beim “European Society for Blood and Marrow Transplantation Annual meeting”, Frankfurt am Main, 03/2019

Teilnahme am “American Society of Hematology Annual Meeting”, San Diego, 11/2018

Short Talk beim „Postgraduate Symposium on Cancer Research“ des IZKF Jena im Alten Schloss in Dornburg, 2013

Jena, 02.04.2022

Lisa Marx-Blümel

### 8.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich in den letzten Jahren sowohl beruflich als auch persönlich unterstützt und dadurch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor James Beck, der es mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und mir über die Jahre stets zur Seite stand. Danke für die vielen guten Gespräche und die Bereitschaft, das Vertrauen und die Geduld, mich in meiner eigenen Forschungsarbeit zu bestärken und mir dadurch die Möglichkeit zu geben, mich zu entfalten und weiterzuentwickeln.

Ebenso möchte ich Dr. Jürgen Sonnemann danken, der über die Zeit nicht nur zu einem guten Kollegen, sondern viel mehr zu einem Freund geworden ist und mich mit ehrlichen und hilfreichen Worten und jeder Menge starkem Kaffee in meiner Arbeit unterstützt hat. Darüber hinaus möchte ich mich bei den Mitgliedern des Stammzelllabors der Kinderklinik, Dr. Astrid Voigt (Alumni), Sabine Becker, Carola „Wolli“ Wollenhaupt und Susann Wittig, bedanken, welche mir oft mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein großes Dankeschön gilt auch Bärbel Jehn, die im Dschungel der Bürokratie immer den Durchblick hatte und mir damit oft sehr geholfen hat. Jessica Frey möchte ich ebenfalls für Ihre Unterstützung und die vielen Gespräche danken, die nicht nur einmal zur Lösung eines Problems oder zur Findung neuer Ideen beigetragen haben.

Auch möchte ich meinen Dank an Professor Aria Baniahmad, für seine Bereitschaft, die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen, richten.

Herrn Professor Schober und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die jahrelange Zusammenarbeit danken. Durch die Idee und das technische *Knowhow* zur Herstellung der Strukturen wurde der Grundstein zu diesem Projekt erst gelegt.

Ebenso gilt mein Dank Professor Wang vom FLI, ohne dessen Unterstützung ich ein Großteil meines Projektes nicht hätte realisieren können. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe Tjard Jörß, Doreen May, Tina Rüdiger und Nadine

Schneble (Alumni), welche mich herzlich aufgenommen und mir stets geholfen haben, meine Arbeit in ihrem Labor voranzubringen. Den Core Facilities des FLI und ihren Mitarbeitern, insbesondere Dr. Marco Groth, Dr. Philipp Koch, Linda Rothenburger und Norman Rahnis, gilt ebenfalls mein Dank.

Mein Dank gilt auch dem BMBF, welcher durch seine Förderung den Großteil des Projektes finanziert und die Bearbeitung ermöglicht hat. Ein besonderer Dank richtet sich an dieser Stelle an die Graduierten Akademie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, insbesondere an Angela Köhler-Saß, welche mich über einen ausgesprochen langen Zeitraum finanziell gefördert und so essenziell zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Zum Schluss möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie, insbesondere bei meinem Mann Christian, bedanken. Mit seiner tatkräftigen Unterstützung und seinem unermüdlichen Forscherdrang hat er immer wieder neue Ideen in das Projekt gebracht und damit in großem Maße zum Gelingen der praktischen als auch schriftlichen Arbeiten beigetragen. Als Ruhepol hat er mich immer wieder auf Kurs gebracht und es mir so ermöglicht, die Dinge wieder klarer zu sehen und meine Forschungsarbeit fokussiert voranzutreiben. Unsere drei gemeinsamen Kinder Marten, Mika und Marie haben ebenfalls ihren Teil beigetragen. Auch wenn sie einige Nerven und noch viel mehr Stunden Schlaf gekostet haben, so zeigen sie mir doch jeden Tag aufs Neue, wie viele wunderbare Dinge die Welt bereithält, wenn man sie nur durch Kinderaugen betrachtet.

Danke an alle, auch an jene, die ich vergessen habe zu erwähnen und die deshalb hier nicht auftauchen!

#### 8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,  
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,  
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: niemand,  
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,  
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Lisa Marx-Blümel