

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PD Dr. Jochen Grassinger
Experimentelle Innere Medizin

**Mesenchymale Stromazellen im Knochenmark – *in vitro*-Untersuchungen zur Rolle von
Stanniocalcin 1 in der akuten myeloischen Leukämie**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andrea Christina Kratzer

2019

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PD Dr. Jochen Grassinger
Experimentelle Innere Medizin

**Mesenchymale Stromazellen im Knochenmark – *in vitro*-Untersuchungen zur Rolle von
Stanniocalcin 1 in der akuten myeloischen Leukämie**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andrea Christina Kratzer

2019

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. Dirk Hellwig |
| 1. Berichterstatter: | PD Dr. Jochen Grassinger |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. Stefan Brunner |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 04.03.2020 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) | 1 |
| 1.2 | Die hämatopoetische Stammzellnische | 3 |
| 1.2.1 | Das Konzept der hämatopoetischen Stammzellnische | 3 |
| 1.2.2 | Wichtige Signalmoleküle in der Stammzellnische | 4 |
| 1.2.3 | Zelluläre Komponenten der Stammzellnische | 4 |
| 1.3 | Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) | 6 |
| 1.3.1 | Definition von MSZ..... | 6 |
| 1.3.2 | MSZ in der physiologischen Stammzellnische..... | 6 |
| 1.3.3 | MSZ in der leukämischen Stammzellnische | 7 |
| 1.4 | Akute Myeloische Leukämie (AML) | 8 |
| 1.4.1 | Definition und klinische Symptomatik | 8 |
| 1.4.2 | Epidemiologie und Ätiologie | 9 |
| 1.4.3 | Diagnosekriterien und Prognosefaktoren | 9 |
| 1.4.4 | Konventionelle Therapie | 10 |
| 1.4.5 | Die Leukämie-Stammzellhypothese | 10 |
| 1.4.6 | Die Stammzellnische in der Leukämogenese | 10 |
| 1.5 | Die Rolle von Stanniocalcin 1 (STC-1) in der Pathogenese der AML | 12 |
| 2 | ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 14 |
| 3 | MATERIALIEN | 15 |
| 3.1 | Chemikalien und Reagenzien..... | 15 |
| 3.2 | Verbrauchsmaterialien | 17 |
| 3.3 | Geräte und Software | 18 |
| 3.4 | Antikörper und Zytokine..... | 19 |
| 3.5 | Reaktionssysteme (Kit-Systeme)..... | 20 |
| 3.6 | Oligonukleotidprimer | 20 |
| 3.7 | Patientencharakteristika..... | 21 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | METHODEN | 22 |
| 4.1 | Mikroarray-Analyse des Genexpressionsprofils von MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten und hämatologisch gesunden Spendern | 22 |
| 4.2 | Isolierung und Kultivierung von MSZ | 22 |
| 4.2.1 | Anlegen von MSZ-Primärkulturen | 22 |
| 4.2.2 | Zellzahlbestimmung | 24 |
| 4.2.3 | Kryokonservierung | 24 |
| 4.2.4 | Auftauen von kryokonservierten Zellen..... | 25 |
| 4.3 | Charakterisierung der isolierten MSZ | 25 |
| 4.3.1 | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (FACS) - Analyse des Immunphänotyps der MSZ ... | 25 |
| 4.3.2 | Funktionelle Charakterisierung der MSZ..... | 27 |
| 4.4 | Analyse der STC-1 mRNA-Expression in MSZ | 29 |
| 4.4.1 | Extraktion von Gesamt-RNA aus MSZ | 29 |
| 4.4.2 | cDNA-Synthese (Reverse Transkription) | 30 |
| 4.4.3 | Quantitative <i>Real-Time</i> Polymerase Kettenreaktion..... | 31 |
| 4.5 | Analyse der STC-1 Proteinexpression in MSZ..... | 32 |
| 4.5.1 | Immunblotanalysen zum Nachweis der STC-1 Proteinexpression in MSZ-Lysaten | 32 |
| 4.5.2 | Immunhistochemischer Nachweis der STC-1 Proteinexpression im Knochenmark..... | 35 |
| 4.5.3 | Immunhistochemischer Nachweis der STC-1 Proteinexpression in MSZ..... | 36 |
| 4.6 | Analyse der STC-1 Sekretion durch MSZ..... | 37 |
| 4.7 | Analyse der Wirkung von STC-1 auf AML-Zellen <i>in vitro</i> | 39 |
| 4.7.1 | Flüssigkeitskultur von AML-Zellen mit Zugabe von rekombinantem STC-1..... | 40 |
| 4.7.2 | Ko-Kultur von AML-Zellen und MSZ mit STC-1 Blockade | 44 |
| 4.8 | Statistische Analyse | 46 |
| 5 | ERGEBNISSE | 47 |
| 5.1 | Expression von STC-1 in DMEM-MSZ (Mikroarray-Analyse) | 47 |
| 5.2 | Kultivierung von MSZ | 48 |
| 5.2.1 | Einfluss des Kulturmediums auf das Wachstum von MSZ | 49 |
| 5.2.2 | Unterschiede zwischen MSZ von AML-Patienten und hämatologisch gesunden Spendern | 50 |
| 5.3 | Charakterisierung der isolierten MSZ | 51 |
| 5.3.1 | Immunphänotypische Charakterisierung der MSZ..... | 51 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.3.2 | Nachweis des Differenzierungspotentials der MSZ..... | 53 |
| 5.4 | STC-1 mRNA-Expression in MSZ..... | 56 |
| 5.5 | STC-1 Proteinexpression in MSZ und im Knochenmark | 57 |
| 5.5.1 | STC-1 Proteinexpression in MSZ-Lysaten | 57 |
| 5.5.2 | STC-1 Proteinexpression in Knochenmarksbiopsien..... | 58 |
| 5.5.3 | STC-1 Proteinexpression in MSZ (<i>Cytospins</i>) | 60 |
| 5.6 | Sekretion von STC-1 durch MSZ | 61 |
| 5.7 | Auswirkungen von STC-1 auf AML-Zellen <i>in vitro</i> | 62 |
| 5.7.1 | Auswirkungen von rekombinantem STC-1 in der AML-Flüssigkeitskultur | 62 |
| 5.7.2 | Auswirkungen der STC-1 Blockade in der Ko-Kultur von AML-Zellen und MSZ | 69 |
| 5.8 | Expression von STC-1 in NH-MSZ (Mikroarray-Analyse) | 72 |
| 6 | DISKUSSION..... | 74 |
| 6.1 | Isolierung und primäre Kultivierung von MSZ | 74 |
| 6.2 | Funktionelle Charakterisierung von MSZ | 75 |
| 6.3 | STC-1 Expression im Knochenmark und den MSZ von AML-Patienten und hämatologisch gesunden Spendern..... | 76 |
| 6.4 | Auswirkungen von STC-1 auf AML-Zellen <i>in vitro</i> | 79 |
| 6.4.1 | Auswirkungen von rekombinantem STC-1 auf AML-Zellen..... | 79 |
| 6.4.2 | Effekt der Blockade von STC-1 in der Ko-Kultur von MSZ und AML-Zellen..... | 81 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG | 84 |
| | LITERATURVERZEICHNIS..... | 86 |
| | DANKSAGUNG | 92 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Schematische Darstellung wichtiger Komponenten der hämatopoetischen Stammzellnische (modifiziert nach ⁴⁶)..... | 5 |
| Abb. 2: Prinzip eines Sandwich-ELISA (modifiziert nach ¹⁰³)..... | 38 |
| Abb. 3: Schema für den Ansatz der Flüssigkeitskulturen..... | 41 |
| Abb. 4: FACS-Analyse der Zellzyklusverteilung | 42 |
| Abb. 5: Schema für den Ansatz der Ko-Kulturen | 45 |
| Abb. 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ zum Zeitpunkt der Expansion | 48 |
| Abb. 7: Expansionszeit von NH-MSZ und DMEM-MSZ..... | 49 |
| Abb. 8: Zellzahlen von NH-MSZ und DMEM-MSZ zum Zeitpunkt der Ernte..... | 50 |
| Abb. 9: FACS-Analyse des Oberflächenexpressionsprofils der MSZ..... | 52 |
| Abb. 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten nach der Adipogenese | 53 |
| Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten nach der Osteogenese..... | 54 |
| Abb. 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten nach der Chondrogenese | 55 |
| Abb. 13: STC-1 mRNA-Expression in MSZ von AML-Patienten und knochenmarksgesunden Spendern | 56 |
| Abb. 14: STC-1 Proteinexpression in MSZ-Lysaten gesunder und leukämischer Spender..... | 58 |
| Abb. 15: Immunhistochemische Untersuchung der STC-1 Proteinexpression in der Knochenmarksbiopsie eines hämatologisch gesunden Patienten (A) und eines Patienten mit AML (B)..... | 59 |
| Abb. 16: Immunhistochemische Untersuchung der STC-1 Proteinexpression in MSZ (Cytospins)..... | 60 |
| Abb. 17: Aktive Sekretion von STC-1 durch MSZ..... | 61 |
| Abb. 18: FACS-Analyse der Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Zellzyklusprogression von AML-Zellen | 63 |
| Abb. 19: Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Zellzyklusprogression von AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur..... | 64 |
| Abb. 20: FACS-Analyse der Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Proliferation von AML-Zellen..... | 65 |
| Abb. 21: Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Proliferation von AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur..... | 66 |
| Abb. 22: FACS-Analyse der Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Apoptoserate von AML-Zellen..... | 68 |
| Abb. 23: Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Apoptose von AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur..... | 69 |
| Abb. 24: Auswirkungen der STC-1-Blockade auf die Proliferation von AML-Zellen in der Ko-Kultur mit MSZ..... | 70 |
| Abb. 25: Auswirkungen der STC-1 Blockade auf die Apoptoserate von AML-Zellen in der Ko-Kultur mit MSZ..... | 71 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: WHO-Klassifikation der AML von 2016 (vereinfacht, nach ⁷¹) | 9 |
| Tab. 2: Charakteristika der AML-Spender | 21 |
| Tab. 3: Konjugation der Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe | 27 |
| Tab. 4: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese..... | 31 |
| Tab. 5: Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 32 |
| Tab. 6: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (Volumenangaben für ein Gel)..... | 34 |
| Tab. 7: Zusammensetzung des IMDM-Kulturmediums..... | 40 |
| Tab. 8: Verdünnung der Kompensations-Antikörper für die Geräteeinstellung | 44 |
| Tab. 9: Unterschiede im Genexpressionsprofil leukämischer und gesunder MSZ (DMEM) | 47 |
| Tab. 10: Unterschiede im Genexpressionsprofil von gesunden und AML-MSZ (NH-Medium)..... | 73 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| Abb | Abbildung |
| AF | Alexa Fluor |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| APC | Allophycocyanin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| BCA | <i>Bichinchoninic acid</i> |
| CAR-Cells | <i>CXCL12-abundant reticular cells</i> |
| cDNA | <i>Complementary DNA</i> |
| cEBPa | <i>CCAAT/enhancer binding protein α</i> |
| CFSE | Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester |
| CFU-F | <i>Fibroblast colony-forming units</i> |
| CXCL12 | CXC-Motiv-Chemokin 12 |
| CXCR4 | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 |
| D-PBS | <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | EthylendiaminN,N,N',N'-tetraacetat |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| ERK 1/2 | <i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i> |
| Et al. | <i>Et alii</i> (lat. = „und weitere“) |
| FACS | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> |
| FBS | Fetales Rinderserum |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat |
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> (Merrettichperoxidase) |
| HS | <i>Horse serum</i> (Pferdeserum) |
| HSZ | Hämatopoetische Stammzelle |
| IMDM | <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> |
| ISCT | <i>International Society for Cellular Therapy</i> |
| kDa | Kilo-Dalton |
| Lep-R | Leptin-Rezeptor |
| MDS | Myelodysplastisches Syndrom |
| miRNA | Mikro-Ribonukleinsäure |
| ml | Milliliter |

| | |
|----------------|--|
| mRNA | <i>Messenger Ribonukleinsäure</i> |
| MSZ | Multipotente mesenchymale Stromazelle |
| NaCl | Natriumchlorid |
| ng | Nanogramm |
| NGS | Normales Ziegen Serum |
| nm | Nanometer |
| ns | Nicht signifikant (d.h. $p > 0,05$) |
| p-ERK 1/2 | Phosphoryliertes ERK 1/2 |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PBST | <i>Phosphate buffered saline tween</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion) |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein-Complex |
| PI | Propidiumiodid |
| PDGFR | <i>Platelet-derived growth factor receptor</i> |
| PS | Phosphatidylserin |
| qRT-PCR | Quantitative <i>Real-Time</i> PCR |
| RAR γ | <i>Retinoid acid receptor gamma</i> |
| rh-STC-1 | Rekombinantes humanes STC-1 |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| RT | Reverse Transkriptase |
| SCF | <i>Stem cell factor</i> |
| SDF-1 | <i>Stromal derived factor 1</i> |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat) |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| STC-1 | Stanniocalcin 1 |
| Sh-RNA | <i>Small-hairpin</i> RNA |
| Tab | Tabelle |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGF- β 1 | <i>Transforming growth factor β1</i> |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminoethan |
| UCP-2 | <i>Uncoupling Protein 2</i> |
| w/v | <i>Weight in volume</i> |
| v/v | <i>Volume in volume</i> |
| μ l | Mikroliter |

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzellen (HSZ)

Die Lebensspanne von Blutzellen variiert je nach Zelltyp und reicht von wenigen Tagen bei neutrophilen Granulozyten über mehrere Monate bei roten Blutkörperchen bis hin zu Jahren bei den immunologischen Gedächtniszellen. Um das Gleichgewicht (Homöostase) im blutbildenden System gewährleisten zu können, d.h. die Anzahl an Blutzellen lebenslang konstant zu halten, bedarf es daher der ständigen Neubildung von Blutzellen, so müssen pro Tag mehrere Milliarden an neuen Blutzellen produziert werden. Dieser Vorgang wird Hämatopoese genannt und findet beim Erwachsenen hauptsächlich im Markraum von langen Röhrenknochen statt.¹ Die essenzielle Zellpopulation hierfür sind pluripotente hämatopoetische Stammzellen (HSZ). Pluripotenz (lat.: *plus* = mehrere) bedeutet, dass sie in alle linienspezifischen hämatopoetischen Zelltypen ausdifferenzieren können; somit stellen sie die Ausgangsbasis für die Bildung aller peripheren Blutzellen (Effektorzellen) dar. Dabei sorgen die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) für einen geregelten Sauerstofftransport, das Zusammenspiel von Blutplättchen (Thrombozyten) und löslichen Faktoren ermöglicht eine bedarfsgerechte Regulation der Blutgerinnung und die Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Granulozyten und Lymphozyten) garantieren eine nachhaltige Bekämpfung körperfremder Mikroorganismen.^{1,2}

Die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von HSZ beanspruchte mehrere Jahrzehnte intensiver Forschung. Mithilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen bestimmte Antigene auf der Zelloberfläche konnten HSZ gezielt aus dem Knochenmark isoliert und untersucht werden. Als wichtigstes Merkmal humaner HSZ gilt bis heute das Oberflächenantigen *cluster of differentiation 34* (CD34).³ Dieses Protein ist insgesamt nur auf etwa 1 bis 4 Prozent der Zellen im Knochenmark und etwa 0,01 bis 0,1 Prozent der Zellen im peripheren Blut exprimiert.⁴ Neben CD34 wurden zusätzlich CD133 und CD38 als spezifische Marker für HSZ etabliert.⁵ Das Oberflächenantigen CD38 wird erst in einem späteren Differenzierungsstadium von hämatopoetischen Zellen exprimiert, weshalb CD38-negative Zellen eine besonders unreife Gruppe innerhalb der HSZ darstellen.^{6,7} Ein Merkmal von Stammzellen im Allgemeinen ist das Fehlen von Antigenen, die spezifisch für eine bestimmte Blutzelllinie sind; alle HSZ sind daher *lineage negative* (lin^{-}). Demgegenüber sind hämatopoetische Vorläuferzellen (Progenitorzellen) bereits zur Differenzierung in eine

bestimmte Zelllinie determiniert und daher nicht mehr pluripotent wie die HSZ sondern nur mehr oligopotent (gr.: *oligos* = wenig). Eine weitere Besonderheit von HSZ ist die Fähigkeit zur selbsterneuernden Zellteilung. Dadurch können sich die Stammzellen selbst erneuern und weiter ausdifferenzierte Nachkommen hervorbringen. Durch diese als asymmetrisch bezeichnete Zellteilung, bei der jeweils eine Tochterzelle im Stammzellpool verbleibt und eine weitere Tochterzelle in eine Effektorzelle ausdifferenziert, kann die lebenslange Versorgung des Körpers mit reifen Blutzellen sichergestellt werden. Eine andere, für die Aufrechterhaltung der Homöostase im blutbildenden System unverzichtbare Fähigkeit der HSZ besteht darin, in ein ruhendes Zellzyklus-Stadium (Quieszenz) überzutreten, in welchem keine Zellteilung stattfindet und die HSZ vor externen Einflüssen geschützt sind.^{8,9} Die einzelnen Differenzierungs- und Proliferationsschritte bei der Entwicklung von der pluripotenten Stammzelle hin zu den reifen Blutzellen werden von hämatopoetischen Zytokinen (Wachstumsfaktoren), vor allem aber auch von Einflüssen aus der Umgebung im Knochenmark (Mikroenvironment) reguliert. Das Mikroenvironment der HSZ wird auch als hämatopoetische Stammzellnische bezeichnet. Diese Stammzellnische ermöglicht den HSZ, ihre Selbsterneuerungsfähigkeit zu bewahren und bei Bedarf zu proliferieren; somit gewährleistet sie die lebenslange Aufrechterhaltung des Stammzellpools.^{10,11,12} Da die vorliegende Dissertation auf der Hypothese beruht, dass Veränderungen im Mikroenvironment des Knochenmarks mitverantwortlich für die Entwicklung von malignen hämatologischen Erkrankungen sind, erfolgt im nächsten Abschnitt eine Vorstellung der wichtigsten Zelltypen und molekularen Interaktionsmechanismen in der hämatopoetischen Stammzellnische.

1.2 Die hämatopoetische Stammzellnische

1.2.1 Das Konzept der hämatopoetischen Stammzellnische

Um die lebenslange Nachbildung von Blutzellen zu gewährleisten, müssen Funktionalität und Integrität der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen einer exakten Regulation unterliegen. Dabei spielt das Mikroenvironment im Knochenmark, die Stammzellnische, eine entscheidende Rolle. Das Konzept der Nische geht auf die Gruppe um Schofield zurück, die zeigen konnten, dass einzig das Stroma im Knochenmark zur Aufrechterhaltung der HSZ in der Lage ist und die Aktivität der HSZ maßgeblich durch das Mikroenvironment gesteuert wird.^{13,14} Die Nische reguliert den Eintritt der Stammzellen in den Zellzyklus und schützt sie dadurch vor Schäden durch fehlerhafte DNA-Replikation oder externe Einflüsse wie Strahlenexposition.^{13,15-17} Die Entwicklung von bildgebenden Methoden wie dem *in vivo* *Imaging* oder der konfokalen Multi-Photonen-Mikroskopie hat die Kenntnisse auf dem Gebiet der Stammzellnische entscheidend vorangebracht, da hiermit die anatomischen Lagebeziehungen zwischen den HSZ und dem Knochenmarksstroma darstellbar wurden.¹⁸ Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich die HSZ im Knochenmark entweder nahe an der Knochenoberfläche (endosteal) oder in enger Assoziation mit Gefäßen (perivaskulär) befinden.^{19,20} Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die Existenz von mindestens zwei hämatopoetischen Nischen postuliert: einer endostealen und einer perivaskulären Nische. Dabei wurde angenommen, dass die endosteale Nische primär die ruhenden HSZ¹⁵ und die perivaskuläre Nische vor allem die aktivierten, teilungsaktiven HSZ beherbergt. Neuere Daten belegen jedoch, dass auch endosteal gelegene HSZ eng mit Blutgefäßen in Verbindung stehen²⁰; daher gelten die beiden Nischen nicht als strikt getrennt und sollten vielmehr als funktionell zusammenhängende Einheit verstanden werden.²¹ Die komplexen Abläufe in der Stammzellnische werden von den Komponenten des Knochenmarksstromas anhand von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten sowie der Sekretion von löslichen Signalmolekülen genau abgestimmt. Im Folgenden wird die Rolle von löslichen Signalmolekülen sowie die Bedeutung wichtiger Zelltypen für die Regulation der HSZ in der Nische thematisiert.

1.2.2 Wichtige Signalmoleküle in der Stammzellnische

Die Expression löslicher Signalmoleküle durch die Zellen im Knochenmarksstroma ist elementar für die Adhäsion bzw. den Verbleib der HSZ im Knochenmark und ermöglicht zudem das sogenannte *Homing*, d.h. die Wanderung der im peripheren Blut zirkulierenden HSZ zurück in die Knochenmarksnische. Allen voran ist in diesem Zusammenhang der *stem cell factor* (SCF) sowie die sogenannte CXCL12/CXCR4 Achse von Bedeutung; d.h. die Interaktion des *C-X-C motif chemokine ligand 12* mit seinem Rezeptor *C-X-C motif chemokine receptor 4*.^{22,23} Das Chemokin CXCL12 wird von zahlreichen Stromazellen (u.a. Osteoblasten, Endothelzellen und perivaskulären Stromazellen) exprimiert und bindet an CXCR4, einen G-Protein gekoppelten Rezeptor auf den HSZ.²⁴ Unter anderem dadurch können die Stammzeleigenschaften der HSZ aufrechterhalten werden und der Verbleib der HSZ im Knochenmark (*maintenance*)²⁵, die Ruhigstellung der HSZ in der inaktiven G₀-Zellzyklusphase (*quiescence*) und die Selbsterneuerungsfähigkeit der HSZ (*self-renewal*) gewährleistet werden. Die Bedeutung der CXCL12-CXCR4-Achse für die Aufrechterhaltung des Stammzellpools im Knochenmark wurde bereits vielfach belegt; so konnte gezeigt werden, dass die Blockade von CXCR4-Rezeptoren auf den HSZ zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl an HSZ im Knochenmark führt. Therapeutisch wird die CXCL12-CXCR4-Achse unter anderem für die Mobilisierung von Stammzellen in das periphere Blut genutzt.²⁵⁻²⁸

1.2.3 Zelluläre Komponenten der Stammzellnische

Als wichtige zelluläre Nischenkomponenten für die Aufrechterhaltung des HSZ-Pools wurden zunächst Osteoblasten^{29,30} und Endothelzellen identifiziert, ehe die Bedeutung von perivaskulären mesenchymalen Stromazellen (MSZ) mehr und mehr in den Fokus geriet.^{20,31,32} Der unmittelbare Einfluss von Osteoblasten auf die Aufrechterhaltung des Stammzellpools wurde mittlerweile zum Teil widerlegt³³⁻³⁵, während die Beeinflussung der HSZ durch Endothelzellen²⁰ und perivaskuläre mesenchymale Stromazellen (MSZ)^{32,33} eindeutig bewiesen werden konnte. Einen Überblick über die wichtigsten Bestandteile in der Stammzellnische im Knochenmark liefert Abbildung 1. Hierzu gehören neben den Endothelzellen, den MSZ und den Osteoblasten auch Osteoklasten, Makrophagen³⁶ und sogenannte *CXCL12-abundant reticular cells* (CAR cells).²⁷ Diese CAR Zellen werden über eine außerordentlich hohe Expression des HSZ-Erhaltungsgens CXCL12 definiert, sind im Vergleich zu anderen MSZ bereits weiter ausgereift und verfügen daher nur noch über ein

eingeschränktes Differenzierungspotential. Aktuelle Daten belegen zudem die Rolle des sympathischen Nervensystems, das die Expression essenzieller HSZ-Erhaltungsgene wie CXCL12 steuert und dadurch den Aktivitätsgrad der HSZ beeinflussen kann.³⁷⁻⁴³ Neben den in der Abbildung gezeigten Nischenbestandteilen konnten zudem Megakaryozyten⁴⁴, Bestandteile der Extrazellulärmatrix wie Osteopontin und Angiopoetin 1⁴⁵ und die Moleküle TGF- β 1 und Interleukin 7 als regulatorische Nischenkomponenten identifiziert werden. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Kultivierung und Charakterisierung von MSZ sowie der Identifizierung möglicher Abweichungen in den MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten liegt, erfolgt im nächsten Abschnitt eine detaillierte Vorstellung der MSZ und ihrer Rolle in der hämatopoetischen und leukämischen Stammzellnische.

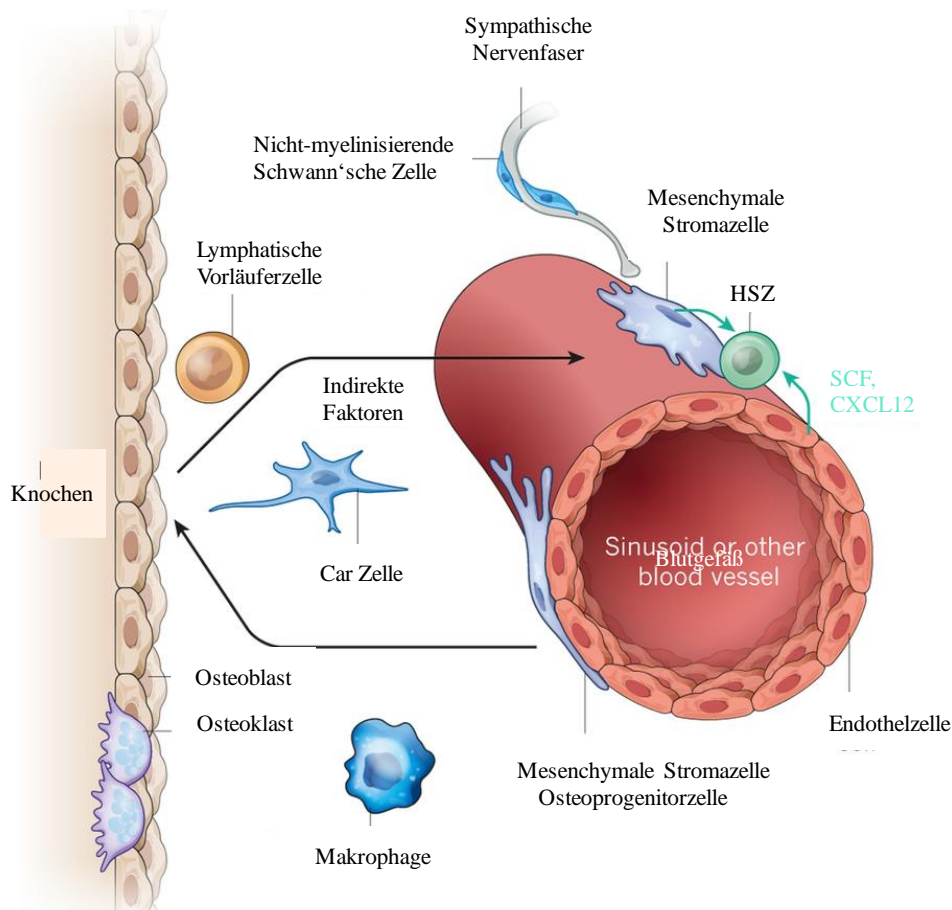


Abb. 1: Schematische Darstellung wichtiger Komponenten der hämatopoetischen Stammzellnische (modifiziert nach ⁴⁶)

Die hämatopoetische Stammzellnische kann in einen endostealen Bereich nahe der Knochenoberfläche (im Bild links dargestellt) und einen perivaskulären bzw. sinusoidalen Bereich eingeteilt werden. Die HSZ (grün dargestellt) scheint dabei nicht strikt in einer der beiden Nischen zu verharren, sondern je nach Aktivitätsgrad von der einen in die andere Nische wechseln zu können. Die endosteale Nische wird vor allem von Osteoblasten gebildet und ist für die Erhaltung von HSZ in einer ruhenden Zellzyklusphase (Quieszenz) zuständig. Die perivaskuläre Nische dagegen beherbergt vor allem teilungsaktive HSZ. HSZ: hämatopoetische Stammzelle; Car-Zelle: CXCL12-abundant reticular-Zelle; SCF: stem cell factor.

1.3 Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ)

1.3.1 Definition von MSZ

Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) im Knochenmark spielen eine zentrale Rolle in der Stammzellnische und sind für die Regulation der blutbildenden Zellen mitverantwortlich. Diese nicht-hämatopoetischen Knochenmarkszellen wurden erstmals 1968 von der Gruppe um Friedenstein beschrieben⁴⁷ und können in Knochen-, Knorpel-, Fett- und fibroblastenähnliche Stromazellen ausdifferenzieren. Auch in anderen Geweben außerhalb des Knochenmarks konnten bereits MSZ identifiziert werden⁴⁸; MSZ sind dort unter anderem zuständig für die Regulation von Prozessen wie Angiogenese, Wundheilung und Inflammation.⁴⁹⁻⁵¹ Aufgrund ihrer multipotenten Differenzierungsfähigkeit wurden sie ursprünglich als mesenchymale Stammzellen bezeichnet. Von der Bezeichnung „Stammzelle“ wurde jedoch aufgrund des fehlenden Selbsterneuerungspotentials der MSZ abgewichen, weshalb seither die Bezeichnung multipotente mesenchymale Stromazelle (MSZ) gilt.^{52,53} Zur besseren Vergleichbarkeit von Studienergebnissen definierte die *International Society for Cellular Therapie* (ISCT) im Jahr 2006 drei Minimalkriterien für die Definition von MSZ. Darunter fallen Plastikadhärenz unter Standard-Kulturbedingungen, die Fähigkeit zur Differenzierung in die drei klassischen Stroma-Zelllinien Fett-, Knorpel- und Knochenzellen (Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten) sowie die Expression der Oberflächenmoleküle CD29, CD105, CD73, CD44 und CD90 bzw. die fehlende Expression der hämatopoetischen Marker CD45 und CD34.⁵⁴ Die MSZ im Knochenmark befinden sich überwiegend perivaskulär im zentralen Markraum und stehen in direktem Kontakt mit der nicht-luminalen Seite von Endothelzellen.⁵⁵ Im Folgenden wird die Bedeutung der MSZ im Knochenmark für die physiologische Blutbildung thematisiert.

1.3.2 MSZ in der physiologischen Stammzellnische

Durch die Regulation der Migration bzw. der Erhaltung der HSZ in ihrer Nische im Knochenmark sind MSZ mitverantwortlich für einen geregelten Ablauf der Blutbildung im Knochenmark. MSZ sind essenziell für den Verbleib der HSZ im Knochenmark und damit für die lebenslange Versorgung des Organismus mit den Effektorzellen aller hämatopoetischen Zelllinien.^{46,56} Eine von Ding et al. publizierte Untersuchung zur Relevanz der wichtigsten Nischenzellen ergab in diesem Zusammenhang, dass die Anzahl der perivaskulären MSZ, im Gegensatz zur Anzahl an Osteoblasten in der Nische, unmittelbar mit der Anzahl an HSZ in der Nische korreliert.³³ Essenziell ist hierbei wiederum die bereits erläuterte CXCL12-

CXCR4-Achse.⁵⁶ So konnte gezeigt werden, dass perivaskuläre MSZ, verglichen mit allen anderen Zelltypen im Knochenmarksstroma, höhere Mengen an CXCL12 exprimieren, dem entscheidenden Faktor für die Adhäsion und den Verbleib der HSZ im Knochenmark. Auch die Expression von SCF, Osteopontin und Angiopoetin ist bei den MSZ höher als bei den anderen Zelltypen (u.a. Osteoblasten und Endothelzellen) in der Stammzellnische.^{27,57,32} Die Rolle der MSZ im Zusammenhang mit der CXCL12-CXCR4-Achse konnte zudem dadurch bestätigt werden, dass die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), der zur Mobilisierung von HSZ aus der Knochenmarksnische in das periphere Blutsystem eingesetzt wird, die CXCL12-Expression spezifisch auf den MSZ reduzierte. Aktuelle Daten belegen zudem, dass aberrante, d.h. dysfunktionale MSZ im Knochenmarksstroma auch eine Rolle in der Entstehung und Progression von Knochenmarkserkrankungen spielen könnten.⁵⁸ Im Folgenden Abschnitt wird daher die Bedeutung von MSZ in der leukämischen Stammzellnische dargestellt. Dabei werden mögliche Auswirkungen aberranter MSZ auf physiologische HSZ bzw. umgekehrt potentielle Effekte von entarteten hämatopoetischen Zellen (z.B. Akute myeloische Leukämie (AML)-Zellen) auf die MSZ im Knochenmarks-Mikroenvironment thematisiert.

1.3.3 MSZ in der leukämischen Stammzellnische

Durch die sehr enge Interaktion mit den hämatopoetischen Zellen im Knochenmark können sich Veränderungen in den MSZ unmittelbar auf die Funktion der HSZ auswirken und so zur Entstehung von Knochenmarkserkrankungen wie der AML beitragen. Wichtige Hinweise für die Bedeutung der MSZ in der Stammzellnische lieferte eine Studie, in der die genetische Inaktivierung von MSZ, bzw. die spezifische Inhibierung der für den Verbleib der HSZ im Knochenmark essenziellen Gene SCF und CXCL12 in den MSZ einen signifikanten Verlust an HSZ im Knochenmark bewirkte.^{32,59} Funktionelle Veränderungen in den MSZ können somit zu einer gestörten Adhäsion von physiologischen HSZ im Knochenmark führen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die gezielte Blockade funktioneller Gene in den MSZ die Entwicklung von Myeloproliferativen Neoplasien (MPN), Myelodysplastischen Syndromen (MDS) oder akuten Leukämien fördert.⁶⁰⁻⁶² Die Gruppe um Raaijmakers et al. konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass die spezifische Blockade einer Endonuklease in mesenchymalen Vorläuferzellen zu Myelodysplasien und akuten Leukämien führte.⁵⁸ Die genaue Kenntnis über das Zusammenspiel von MSZ und hämatopoetischen Zellen könnte daher in der Entwicklung nicht-zellautonomer Therapieansätze von Leukämien genutzt

werden, indem durch gezielte Manipulation von MSZ in die Pathogenese der Erkrankungen eingegriffen und dadurch deren Entwicklung verzögert oder gar verhindert wird. Da die vorliegende Dissertation zur Thematik der Bedeutung aberranter MSZ in der AML verfasst wurde, erfolgt im nächsten Abschnitt eine detaillierte Vorstellung der AML, der häufigsten hämatologischen Tumorerkrankung im Erwachsenenalter.

1.4 Akute Myeloische Leukämie (AML)

1.4.1 Definition und klinische Symptomatik

Der Begriff Leukämie (gr.: *leukós* = weiß; *haima* = Blut; d.h. Weißblütigkeit) geht auf den Pathologen Rudolf Virchow zurück und bezieht sich auf die Farbe des Blutes bei Leukämiepatienten mit sehr hohen Leukozytenzahlen. Von einer myeloischen Leukämie spricht man, wenn Zellen der Myelopoese (Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten oder Erythrozyten) betroffen sind, bei Entartung einer Zelle der Lymphopoese spricht man dementsprechend von einer lymphatischen Leukämie. Je nach Reifegrad der entarteten Zellen erfolgt darüber hinaus die Unterteilung in akut bzw. chronisch.

Als akute myeloische Leukämie (AML) wird eine Gruppe biologisch heterogener Erkrankungen mit pathologischer Proliferation klonaler myeloischer Zellen aus dem hämatopoetischen Vorläufer- oder Stammzellenpool bezeichnet. Dabei kommt es zur Blockade der Differenzierung der myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Die überschießende Expansion des leukämischen Zellklons verdrängt die physiologische Hämatopoese im Knochenmark und führt daher zu einem Mangel an funktionsfähigen roten Blutkörperchen (Anämie), weißen Blutkörperchen (Granulozytopenie) und Blutplättchen (Thrombozytopenie). Die klinische Symptomatik resultiert aus der progredienten Knochenmarksinsuffizienz und beginnt meist mit einem anämiebedingtem Leistungsabfall, einer gesteigerten Infektanfälligkeit aufgrund der Granulozytopenie oder einer von der Thrombozytopenie ausgelösten vermehrten Blutungsneigung. Bei über der Hälfte der AML-Patienten führt die unkontrollierte Proliferation des myeloischen Klons zu einer pathologisch erhöhten Leukozytenzahl (Leukozytose), die ab einem Wert von 100.000 Leukozyten pro μl mit der Gefahr der Leukostase, einem hämatologischen Notfall, assoziiert ist. Dabei kommt es durch die erhöhte Leukozytenzahl zu einer gesteigerten Blutviskosität, was zu Mikrozirkulationsstörungen und daraus resultierenden Organschädigungen führt. Vor der Verfügbarkeit wirksamer Arzneimittel führte der natürliche Verlauf der AML innerhalb von sechs bis maximal 12 Monaten bei fast allen Patienten zum Tode.^{2,63-65}

1.4.2 Epidemiologie und Ätiologie

Die AML ist mit einer Jahresinzidenz von 3,7 pro 100.000 Einwohnern (2015, BRD) die häufigste vom Knochenmark ausgehende maligne Tumorerkrankung im Erwachsenenalter.⁶⁴ Mit einem medianen Erkrankungsalter von 63 Jahren ist die AML eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Das Geschlechterverhältnis zeigt eine leichte Bevorzugung des männlichen Geschlechts. Die 5-Jahres-Überlebensrate nimmt mit steigendem Alter ab und beträgt durchschnittlich etwa 30 Prozent.^{2,66} Bezüglich der Ätiologie der AML ist bekannt, dass die Kumulation von mehreren genetischen Aberrationen in einer hämatopoetischen Vorläuferzelle zur überschießenden Proliferation dieser Zelle führen kann. Die genauen Ursachen dieser genetischen Veränderungen sind jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt. Als Risikofaktoren gelten unter anderem die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, Tabak und Benzolen.² In den letzten Jahren rückte jedoch immer mehr die Rolle des Mikroenvironments im Knochenmark in der Leukämogenese in den Vordergrund.^{58,60,67}

1.4.3 Diagnosekriterien und Prognosefaktoren

Die Diagnose einer AML wird üblicherweise anhand der mikroskopischen Untersuchung eines Knochenmarksaspirats gestellt, wobei ein Anteil von $\geq 20\%$ leukämischer Blasten im Knochenmark oder dem peripheren Blut definierend für die Diagnose ist.⁶⁸ Prognostische Relevanz hat neben der Untersuchung des Karyotyps vor allem das molekulargenetische Profil, anhand dessen die AML in 9 bis 11 unterschiedliche Subtypen eingeteilt werden kann.^{65,69,70} Gemäß der aktuellen Klassifikation der WHO von 2016 kann die AML in die in Tabelle 1 aufgeführten Subgruppen eingeteilt werden.

Tab. 1: WHO-Klassifikation der AML von 2016 (vereinfacht, nach⁷¹)

| WHO-Klassifikation der AML |
|---|
| AML mit rekurrenten genetischen Anomalien |
| AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen |
| Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien |
| Andere Formen der AML (FAB-Klassifikation) |
| Myeloisches Sarkom |
| Myeloische Down-Syndrom assoziierte Proliferation |

1.4.4 Konventionelle Therapie

Die kurative Therapie der AML besteht in einer Induktionstherapie gefolgt von einer Konsolidierungstherapie. Erstere sollte schnellstmöglich nach Diagnosestellung begonnen werden und verfolgt das Ziel einer Komplettremission.^{72,64} Standardmäßig wird dabei die dreitägige Gabe eines Anthrazyklins mit der siebentägigen Gabe von Cytarabin kombiniert. Die anschließende Konsolidierungstherapie soll die Entstehung von Rezidiven verhindern und besteht je nach AML-Risikoprofil sowie dem Allgemeinzustand des Patienten entweder in einer allogenen Stammzelltransplantation oder einer hochdosierten Chemotherapie mit Cytarabin.⁷³

1.4.5 Die Leukämie-Stammzellhypothese

Wie viele andere Krebsentitäten wurde die AML lange Zeit als rein zellautonome Funktionsstörung charakterisiert, d.h. dass ein bestimmtes genetisches oder epigenetisches Ereignis zur Entartung einer physiologischen hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzelle führt, welche sich dann unkontrolliert im Knochenmark ausbreitet und die gesunden Blutzellen verdrängt. Mitte der 1990er Jahre konnte die Arbeitsgruppe von Dr. John Dick aus Kanada belegen, dass akute myeloische Leukämien hierarchisch aufgebaut sind. Danach steht an der Spitze der Erkrankung eine Leukämienstammzelle (LSZ) oder Leukämie-initiiierende-Zelle.^{74,75} Diese gleicht in vielerlei Hinsicht den normalen HSZ und besitzt ebenso wie diese die Fähigkeit zur selbsterneuernden Zellteilung.⁷⁶ Daten von Lapidot et al. zeigen, dass nur eine von 250 000 AML-Zellen Stammzellpotential besitzt und somit zur Initiierung oder Unterhaltung einer AML in der Lage ist.⁷⁴ Die Fähigkeit von LSZ, in einer ruhenden Zellzyklusphase zu verharren, verhilft den LSZ, der Eradikation durch Zytostatika zu entkommen und stellt daher eine potentielle Quelle von Therapieresistenzen und Rezidiven in der AML dar.⁷⁷⁻⁷⁹

1.4.6 Die Stammzellnische in der Leukämogenese

Eine Vielzahl von Studien der letzten Jahre beschäftigte sich mit der Frage, inwieweit das Zusammenspiel von hämatopoetischen Zellen und dem Mikroenvironment im Knochenmark für die Entstehung und Progression hämatologischer Erkrankungen mitverantwortlich ist. Zum einen kann eine dysfunktionale Stammzellnische ursächlich für die Entstehung der Leukämie sein. Demnach schwächt das aberrante Mikromilieu die physiologischen HSZ und fördert die Transformation der physiologischen HSZ in LSZ. Die Veränderungen in der Nische verschaffen dabei den Leukämiezellen einen Überlebensvorteil gegenüber ihren

gesunden Gegenspielern. Hinweise hierfür lieferten Studien, in denen die genetische Manipulation von Knochenmarksstromazellen wie den MSZ die Entstehung von Knochenmarkserkrankungen begünstigte.⁶⁰⁻⁶² Raaijmakers et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die spezifische Inhibierung von *Dicer1*, einer Endonuklease in mesenchymalen Vorläuferzellen zur Entstehung von Myelodysplasien und akuten Leukämien führte.⁵⁸ Weitere Evidenz für die Rolle der Stammzellnische in der Leukämogenese liefern einige Fälle, in denen nach der Transplantation zuvor gesunder HSZ in das Knochenmark von AML-Patienten die Entstehung einer AML beobachtet wurde.⁸⁰ Veränderungen, die zu einem aberranten Mikroenvironment im Knochenmark führen, können aber auch sekundär entstehen, d.h. von den Leukämiezellen hervorgerufen werden. So könnten sich die Leukämiezellen durch gezielte Beeinflussung der Nische einen Überlebensvorteil gegenüber physiologischen HSZ verschaffen. In Einklang mit dieser Hypothese steht beispielsweise der Nachweis von strukturellen Veränderungen im Knochenmark von Leukämiepatienten.⁸¹ Ferner weisen die Stromazellen in leukämisch infiltriertem Knochenmark eine deutlich reduzierte Expression von wichtigen Faktoren für die Erhaltung gesunder HSZ auf.⁸² So wurde beispielsweise ein relativer Mangel an CXCL12 in leukämischen MSZ gefunden, was die geschwächte Erhaltung gesunder HSZ im Knochenmark von AML-Patienten erklären könnte.⁸³ Effekte der Interaktion von Leukämie- und Stromazellen konnten auch in Ko-Kulturen von AML- und Endothelzellen beobachtet werden. Dabei regten sich AML- und Endothelzellen gegenseitig zur Sekretion bestimmter Zytokine an, wodurch die Proliferation der AML-Zellen gesteigert werden konnte.⁸⁴ Weitere Belege für die Theorie, dass sich die Leukämiezellen ihre eigene maligne Nische kreieren, liefern Studien, in denen humane Leukämiezellen in das Knochenmark von Mäusen transplantiert wurden, wo sich anschließend die Konzentration des für die Erhaltung von HSZ wichtigen Zytokins SCF erhöhte. Davon stimuliert, siedelten sich die physiologischen HSZ vermehrt in der dysfunktionalen leukämischen Nische an, und die Hämatopoese wurde signifikant beeinträchtigt, da es den HSZ an der Unterstützung durch das physiologische Mikroenvironment mangelte.^{79,85} Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Veränderungen im Mikroenvironment im Knochenmark, sowohl primär als auch sekundär, eine essentielle Rolle in der Pathogenese maligner Knochenmarkserkrankungen wie der AML spielen könnten. Wichtig scheinen dabei, ähnlich wie in der physiologischen Hämatopoese, vor allem lösliche Faktoren zu sein, welche von den Zellen im Knochenmarksstroma, und dabei allen voran von den MSZ, sezerniert werden. In diesem Zusammenhang untersucht die

vorliegende Arbeit die Auswirkungen von Stanniocalcin 1, einem von den MSZ sezernierten Protein auf AML-Zellen.

1.5 Die Rolle von Stanniocalcin 1 (STC-1) in der Pathogenese der AML

Grundlage für die Forschungsarbeit in der vorliegenden Dissertation war eine vergleichende Analyse des Genexpressionsprofils in den MSZ von AML-Patienten und knochenmarksge-sunden Spendern. Dabei war die Expression von Stanniocalcin 1 (STC-1) in den leukämischen MSZ signifikant erhöht, ein Hinweis auf eine mögliche Bedeutung dieses Gens in der Pathogenese der AML. STC-1 wurde ursprünglich in Knochenfischen entdeckt, wo es als klassisches Hormon wirkt und bei Hyperkalzämie aus endokrinen Nierendrüssen, den sogenannten *Stannius-Korpuskeln* sezerniert wird und zu einer reduzierten Kalziumaufnahme über die Kiemen und den Darm führt.⁸⁶⁻⁹⁰ Auch im Zusammenhang mit Säugetieren wurde STC-1 bereits mehrfach erwähnt;⁹¹ seine Rolle in der Regulation des Serumkalziumspiegels ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Bekannt ist, dass STC-1 in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und in verschiedenste Pathologien wie Netzhautdegeneration, zerebrale Ischämie, Inflammation, Angiogenese und Apoptose involviert ist.⁹²⁻⁹⁴ In einer Reihe an Studien konnte belegt werden, dass zelluläre Stressbedingungen wie Sauerstoffmangel einen Stimulus für eine gesteigerte STC-1 Sekretion darstellen, wodurch das Zellüberleben STC-1-abhängig gesteigert werden kann.^{95,96} Auch in der Pathogenese von Tumorerkrankungen scheint STC-1 eine Rolle zu spielen. Daten von Chang et al. belegen, dass die Inhibierung von STC-1 in murinen und humanen Mammakarzinomzellen zu einer signifikanten Reduktion von Primärtumorgröße und Metastasierungsrate führt.⁹⁷ In einer klinischen Studie konnte zudem gezeigt werden, dass der Serumspiegel von STC-1 bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom erhöht ist im Vergleich zu gesunden Kontrollen.⁹⁸ *In vitro* wurde die Rolle von STC-1 bereits durch Ko-Kulturen von Knochenmarks-MSZ und zuvor mit H₂O₂ behandelten Bronchialkarzinomzellen demonstriert. Dabei stimulierten die apoptotischen Tumorzellen die MSZ zur Sekretion von STC-1, was wiederum zu einer gesteigerten Expression des *Uncoupling Protein 2* (UCP-2) führt, einem Protein welches zur Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette in den Tumorzellen führt. Dadurch wird die Effizienz der mitochondrialen Elektronen-Produktion und somit die Fähigkeit der Tumorzellen zur Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies verbessert. Dies verhilft den Tumorzellen in einer karzinogenen Umgebung mit Produktion von freien Sauerstoffradikalen zu proliferieren. Über diesen Mechanismus konnte die Rate an apoptotischen Tumorzellen gesenkt werden, ein

Effekt der durch die Gabe eines STC-1 Antikörpers inhibiert werden konnte.⁹⁹ Im Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen konnte die Gruppe um Samudio zeigen, dass die Ko-Kultur mit MSZ den für Tumore charakteristischen Warburg-Effekt exzessiver aerober Glykolyse, ebenfalls via Hochregulation von UCP-2, in den leukämischen Zellen verstärkt. Dabei nimmt die Gruppe jedoch keinerlei Bezug auf die Rolle des von den MSZ sezernierten Proteins STC-1. Es gibt jedoch klinische Daten, die zeigen, dass ein erhöhtes STC-1-Level im peripheren Blut von AML-Patienten mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Rezidivrate assoziiert ist ^{100,101} und damit auf eine potentielle Rolle von STC-1 in der Leukämogenese hinweisen. Da es bisher jedoch an Studien fehlt, welche die Auswirkungen von STC-1 auf primäre AML-Zellen analysieren, soll die vorliegende Arbeit eine wichtige Ergänzung zum bisherigen Stand der Forschung auf diesem Gebiet liefern.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Dissertation wurde zur Thematik des Stellenwerts der Stammzellnische im Knochenmark in der Pathogenese der AML, mit dem Schwerpunkt der Rolle des von MSZ sezernierten Proteins STC-1 angefertigt. Dabei wurden folgende Fragestellungen behandelt:

- Entsprechen die aus Knochenmarksproben isolierten MSZ den ISCT-Kriterien?
- Ist STC-1 im Knochenmark bzw. in den aus Knochenmarksproben isolierten MSZ exprimiert?
- Inwieweit unterscheidet sich die Expression von STC-1 im Knochenmark bzw. den MSZ von AML-Patienten und gesunden Spendern?
- Welche Auswirkungen hat STC-1 auf das Wachstum von AML-Zellen *in vitro*?

Ausgehend von einer Genchipanalyse, die eine signifikante Überexpression von STC-1 in den MSZ von AML-Patienten ergab, hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, die Überexpression von STC-1 in den MSZ von AML-Patienten zu verifizieren und ausgehend davon zu untersuchen, inwieweit STC-1 das Wachstum von AML-Zellen beeinflusst. Bestätigt sich die Hypothese, dass das von den MSZ sezernierte STC-1 das Überleben und die Proliferation von AML-Zellen fördert, könnte die spezifische Blockade dieses Proteins einen innovativen Therapieansatz in der nicht-zellautonomen Behandlung der AML darstellen.

Für die Experimente dieser Arbeit wurden zunächst MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten und hämatologisch gesunden Spendern isoliert und hinsichtlich ihres Immunphänotyps sowie ihres Differenzierungspotentials in die mesenchymalen Stromazelllinien untersucht. Die STC-1 Expression wurde mittels quantitativer *real-time* PCR analysiert und durch spezifische Antikörperfärbung von Knochenmarksschnitten und MSZ-Proben nachgewiesen. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob STC-1 auch von den MSZ gebildet und aktiv in das Medium sezerniert wird. Im letzten Teil der Arbeit erfolgten *in vitro* Kulturen von AML-Zellen sowie Ko-Kulturen von AML-Zellen und MSZ, wobei jeweils der Einfluss von STC-1 auf das Überleben und die Proliferation der AML-Zellen im Durchflusszytometer analysiert wurde.

3 Materialien

3.1 Chemikalien und Reagenzien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|---|
| β -Mercaptoethanol | Invitrogen GmbH, Darmstadt |
| 6-Amino-Hexansäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 30 % (37,5:1) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Ammoniumchlorid | Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA |
| Ammoniumpersulfat | Merck-Millipore, Merck KGaA, Darmstadt |
| Bicinchoninsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| <i>Bright-DAB</i> | Medac GmbH, Wedel |
| Bromphenolblau | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| CFSE | Molecular Probes, Eugene, USA |
| Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail tablets (Proteinlysepuffer) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| <i>CytoMix - MSC human</i> 100 μ g | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Dithiothreitol (DTT) | Invitrogen GmbH, Darmstadt |
| Dnase 1 | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| <i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i> (DMEM) | Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| <i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i> (D-PBS) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Ethanol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Ethylendiamin Tetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| <i>Foetal Bovine Serum</i> (FBS) | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| Formaldehyd | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Gentamycin | Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Glycerol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Glycin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Hydrocortison | Pfizer Pharma GmbH, Berlin |
| Isopropanol | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Isopropanol 70 % (V/V) | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Kalium-Hydrogencarbonat | Merck-Millipore, Merck KGaA, Darmstadt |

| | |
|---|---|
| Kupfer(II)-Sulfat | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Magermilchpulver | Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf |
| Methanol | Merck-Millipore, Merck KGaA, Darmstadt |
| <i>Oil Red O Solution</i> (0,5 % in Propylen) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| <i>Horseserum</i> | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| Ponceau S | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Propidiumiodid | Sigma-Aldrich Logistik GmbH, Schnelldorf |
| Proteinmarker <i>Page ruler plus prestained protein ladder</i> 10-250 kDa | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA |
| Proteinpulver Albumin V Fraktion | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| <i>Restore Western Blot Stripping Buffer</i> | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA |
| RNAase A (Dnase-frei) | AppliChem, Darmstadt |
| RNAase A (Dnase-frei) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Safranin O 0,5 % wässrig | Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurth am Main |
| SDS-Pellets | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| TEMED | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Trichloressigsäure | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Tris-Hydrochlorid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Trypsin-EDTA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| TWEEN 20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf |
| Von Kossa Färbung für Osteoblasten | Polysciences Europe GmbH, Eppelheim |

3.2 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|--|
| Deckgläser für Zählkammer (20x26 mm) | Menzel GmbH & Co, Braunschweig |
| Einfrierröhrchen (1,8 ml) | Thermo Fisher Scientific, Jiangsu, China |
| Gel-Blotting-Papier | Whatman GmbH, Dassel |
| Kanülen (20 G) | Becton, Dickinson and Company Limited, Co. Louth, Irland |
| Mikro Schraubröhrchen (1,5 ml) | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| Nitrocellulose Membran | Whatman GmbH, Dassel |
| Pipettenspitzen (0,5-20 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl) | Eppendorf AG, Hamburg |
| Röhrchen aus Polypropylen (5, 15, 50 ml) | Corning Science México S.A. de C.V., Tamaulipas, Mexico C.P. |
| Röhrchen aus Polystyrol (5 ml) | BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Spritze (3, 50 ml) | BD, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Stabpipetten (10 ml, 50 ml) | Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Stabpipetten (2 ml, 25 ml) | Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe |
| Stabpipetten (5 ml) | Corning Incorporated, Corning, NY, USA |
| Sterilfilter (0,20 µm) | Sartorius AG, Goettingen, Deutschland |
| verjüngte Pipettenspitzen (2-200 µl) | Sorenson BioScience Inc., West Salt Lake City, Utah, USA |
| Zellkulturflaschen (75 cm ²) | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| Zellkulturplatten (24-, 96-well) | Corning Incorporated, Corning, NY, USA |
| Zellkulturschalen (100 mm) | Corning Incorporated, Corning, NY, USA |
| Zellsieb (70 µm) | Corning Incorporated, Corning, NY, USA |

3.3 Geräte und Software

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|--|
| Blockthermostat BT 1303 | HLC, Ditabis AG, Pforzheim |
| Blotting-Kammer <i>Fast Blot</i> | Biometra GmbH, Göttingen |
| Brutschrank BBD 6220 | Heraeus instruments, Hanau |
| CCD-Kamera <i>Image Quant LAS 4000</i> | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg |
| Einfrierbox <i>Cryo 1°C Freezing Container</i> | NALGENE, USA |
| Elektrophoresekammer | Whatman Biometra, Göttingen |
| FACS Aria IIu | Becton & Dickinson, St. José, CA, USA |
| FACSCalibur | Becton&Dickson, ST. José, CA, USA |
| Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop 2 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen |
| Inkubator | Heraeus instruments GmbH, Hanau |
| Kolbenhubpipetten (10 - 1000µl) | Eppendorf AG, Hamburg |
| Kühlzentrifuge Megafuge 3.0 R | Heraeus Sepatech, Hanau |
| Lichtmikroskop | Helmut Hund GmbH, Wetzlar |
| Mikrozentrifuge Biofuge fresco | Heraeus instruments GmbH, Hanau |
| Rollenmischer RM 5 | CAT Ingenieurbüro M. Zipperer GmbH, Staufen |
| Rührgerät MR 3001 K | Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim |
| Schüttelgerät MS2 <i>Minishaker</i> | IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Schüttelgerät MS3 digital | IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Software <i>FlowJo</i> ® | FlowJo, LLC |
| Software GraphPad Prism Version 7.01 | GraphPad Software, Inc., San Diego, USA |
| Software Magellan™ 5 | Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz |
| Software Microsoft® Excel, Word | Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim |
| Sterilbank | Heraeus instruments GmbH, Hanau |
| <i>Tecan microplate absorbance reader</i> | Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz |
| Thermo Cycler <i>MyCycler™</i> ® | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Tischzentrifuge <i>capsulefuge</i> | Tomy Kogyo Co., LTD, Tokio, Japan |
| Waage BL 310 | Sartorius AG, Göttingen |
| Zählkammer Neubauer (0,100 mm Tiefe, 0,0025 cm ²) | Brand GmbH + CO KG, Wertheim |
| Zentrifuge Megafuge 1.0 | Heraeus instruments GmbH, Hanau |

3.4 Antikörper und Zytokine

| Antikörper | Bezugsquelle |
|---|--|
| CD45, Annexin V, Isotyp (-FITC), Maus IgG, k | BioLegend Inc., San Diego, CA, USA |
| CD105, CD29, Isotyp (-AF 488), Maus IgG1, k | BioLegend Inc., San Diego, CA, USA |
| CD34, CD45, CD73, Isotyp (-APC), Maus IgG1, k | BioLegend Inc., San Diego, CA, USA |
| CD44, CD90, Isotyp (-PE), Maus IgG1, k | BioLegend Inc., San Diego, CA, USA |
| CD45, Isotyp (-PerCP), Maus IgG1, k | BioLegend Inc., San Diego, CA, USA |
| STC-1, monoklonal Maus IgG1, k | R&D systems GmbH, Wiesbaden |
| Maus IgG, HRP-konjugiert, polyklonal Ziege | R& D systems GmbH, Wiesbaden |
| β -Aktin, HRP-konjugiert, monoklonal Maus IgG | GenScript®, Piscataway, NJ, USA |
| STC-1, polyklonal Kaninchen IgG | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA |
| Isotyp STC-1, polyklonal Kaninchen IgG | Abcam plc., Cambridge, Großbritannien |

| Zytokine | Bezugsquelle |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Recombinant human FLT-3L | Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA |
| Recombinant human G-CSF | Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA |
| Recombinant human IL-3 | Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA |
| Recombinant human SCF | Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA |
| Recombinant human Stanniocalcin 1 | BioVendor GmbH, Kassel |
| Recombinant human TPO | Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA |

3.5 Reaktionssysteme (Kit-Systeme)

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|-------------------------------------|
| <i>Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents</i> | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg |
| <i>FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I</i> | BD Biosciences, San Jose, USA |
| <i>Human Stanniocalcin 1 DuoSet ELISA</i> | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| <i>iScript cDNA Synthesis Kit</i> | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| <i>PCR Prime</i> | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| <i>Rneasy Mini Kit</i> | QIAGEN GmbH, Hilden |
| <i>StemPro Adipogenesis Differentiation Kit</i> | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| <i>StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit</i> | Invitrogen GmbH, Karlsruhe, |
| <i>StemPro Osteogenesis Differentiation Kit</i> | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |

3.6 Oligonukleotidprimer

| Primer | Bezugsquelle |
|--|--|
| <i>GAPDH forward</i> 5'- TCAACggATTTggTCgTATTggg-3' | TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin |
| <i>GAPDH reverse</i> 5'- TgATTTTggAgggATCTCgC-3' | |
| <i>STC-1 forward</i> 5'- CAgCTgCCCAATCACTTC-3' | |
| <i>STC-1 reverse</i> 5'- TCTCCATCAggCTgTCTCTgA-3' | |

3.7 Patientencharakteristika

Die in dieser Arbeit verwendeten MSZ wurden aus dem Knochenmark von AML-Patienten isoliert. Als gesunde Kontrollen dienten MSZ aus dem Knochenmark von hämatologisch gesunden Spendern. Ein Teil der MSZ wurde aus dem Bestand der Arbeitsgruppe entnommen, die restlichen MSZ wurden während der Durchführung der vorliegenden Arbeit kultiviert. Die für die *in vitro* Kulturen verwendeten AML-Zellen entstammen drei unterschiedlichen Spendern aus dem Bestand der Arbeitsgruppe. Die Charakteristika der AML-Spender sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Charakteristika der AML-Spender

| | Geschlecht | Alter (Geburtsjahr) | AML-Subtyp |
|--------------------------|-------------------|----------------------------|---|
| AML 1 (UKR-121) | Männlich | 81 (1936) | AML mit t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 |
| AML 2 (UKR-128) | Männlich | 80 (1937) | Akute myelomonozytische Leukämie |
| AML 3 (MG-120559) | Weiblich | 58 (1959) | AML mit mit Myelodysplasie- assoziierten Veränderungen |

4 Methoden

4.1 Mikroarray-Analyse des Genexpressionsprofils von MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten und hämatologisch gesunden Spendern

Zur Identifizierung von Genen, die möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der AML spielen, hatte die AG Stammzellen im Vorfeld dieser Arbeit vom Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik (KFB) einen *GeneChip*[®] zum Vergleich des Genexpressionsprofils gesunder und leukämischer MSZ anfertigen lassen. Dabei wurden in DMEM kultivierte MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten bzw. zum Vergleich aus dem Knochenmark von hämatologisch gesunden Spendern hinsichtlich ihres Transkriptoms analysiert und mögliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ermittelt. Dabei wurden insgesamt 48 144 Gene analysiert, wovon 141 eine signifikante Über- bzw. Unterexpression in den MSZ der Leukämiepatienten zeigten. Das am stärksten hochregulierte Gen in den MSZ der AML-Patienten codiert das Protein STC-1 und war in den MSZ der AML-Patienten 3,3-mal so stark exprimiert wie in den MSZ der Patienten mit gesundem Knochenmark. Ausgehend von diesem Befund hatten die Versuche der vorliegenden Arbeit zum Ziel, die Überexpression von STC-1 in den MSZ von AML-Patienten zu verifizieren und ausgehend davon zu klären, inwieweit sich diese Überexpression auf das Wachstum der AML-Zellen auswirkt. Hierfür wurden in einem ersten Schritt MSZ aus Knochenmarkspalten gesunder und leukämischer Spender in einem Adhäsionskulturmodell isoliert und anschließend untersucht.

4.2 Isolierung und Kultivierung von MSZ

4.2.1 Anlegen von MSZ-Primärkulturen

Um die Überexpression von STC-1 in den MSZ von AML-Patienten bestätigen und potentielle Effekte von STC-1 im Zusammenhang mit der Pathogenese der AML untersuchen zu können, wurden zunächst MSZ durch routinemäßig in der Klinik durchgeführte Knochenmarkspunktionen gewonnen und in einem Adhäsionskulturmodell isoliert. Die Probe wurde mit Heparin versetzt, um die Blutgerinnung zu inaktivieren, und innerhalb von zwei Stunden unter einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus instruments) verarbeitet. Dabei wurde das Probenmaterial im Verhältnis 1:3 in Kulturmedium verdünnt und in 100 mm Zellkulturschalen (Corning Incorporated) ausplattiert. Ein Teil der Probe wurde dabei mit *Dulbecco's*

Modified Eagle Medium [(DMEM; Life Technologies GmbH), versetzt mit 10 % FBS (PAA Laboratories GmbH) und 10 % Gentamycin (Life Technologies GmbH)] kultiviert. Die restliche Menge der Probe wurde mit NH-Medium behandelt. Für das NH-Medium wurde ein standardmäßig verwendetes Nährmedium mit dem *CytoMix - MSC human* (Miltenyi Biotec GmbH) versetzt. Darin sind spezielle Zytokine (genaue Zusammensetzung unbekannt) zur Förderung des Wachstums von MSZ enthalten. Das Kulturmedium wurde vor der Verwendung stets auf 37 °C temperiert. Die Kultur erfolgte in einem Inkubator (Heraeus instruments) bei einer Temperatur von 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Alle drei bis vier Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Dabei wurde das verbrauchte Medium entfernt und durch 10 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Bei Erreichen einer Konfluenz von maximal 90 Prozent wurde das Wachstum der MSZ am Lichtmikroskop visualisiert und photographisch dokumentiert. Da die am Boden des Zellkulturgefäßes adhärenen MSZ bei Erreichen einer zu hohen Zelldichte nicht mehr weiterwachsen können bzw. ihre Proliferationsrate stark abnimmt, erfolgte bei einer Konfluenz von maximal 90 Prozent das sogenannte Passagieren der MSZ, d.h. die Zellen wurden enzymatisch von der Platte und aus dem Monolayer herausgelöst, in Suspension gebracht und nach entsprechender Verdünnung in größere Kulturgefäße [75 cm² Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co)] gebracht. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Wachstum der MSZ am Lichtmikroskop visualisiert und photographisch dokumentiert. Für die Expansion der Zellen auf die 75 cm² Zellkulturflaschen wurde das verbrauchte Kulturmedium aus den 100 mm² Zellkulturplatten entfernt und die Zellen wurden mit 10 ml sterilem calcium- und magnesiumfreiem PBS-Puffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gespült, um Rückstände des Kulturmediums zu entfernen. Um die adhärenen Zellen vom Schalenboden zu lösen, wurden die Zellen mit 2,5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung [0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in PBS] überschichtet und für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert und durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturschalen wurden die noch adhärenen Zellen gelöst. Zu den gelösten Zellen wurde 7,5 ml Kulturmedium gegeben, um die Enzymreaktion des Trypsins zu stoppen. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml Falcon (Corning Science) überführt und bei Raumtemperatur für sieben Minuten bei 1300 rpm (engl.: *rounds per minute* = Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in Kulturmedium resuspendiert. Die gelösten Zellen wurden anschließend zu je 10 ml in die 75 cm² Zellkulturflaschen gegeben und weiter kultiviert, wobei wiederum alle drei Tage ein

Mediumwechsel erfolgte. Sobald die Zellkulturflaschen ebenfalls zu etwa 90 Prozent bewachsen waren, erfolgte die Ernte der MSZ-Kulturen. Das Ablösen der adhären Zellen vom Flaschenboden erfolgte analog zu den Arbeitsschritten bei der Expansion der Zellen. Nach der Ernte wurden die Zellen in 10 ml PBS/ 2 % FBS gelöst und unter Verwendung eines Neubauer-Zählkammersystems (Brand GmbH + Co KG) gezählt.

4.2.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 80 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH) versetzt. Die Färbung mit Trypanblau ermöglicht eine Bestimmung der Zellvitalität, da lediglich avitale, d.h. bereits abgestorbene Zellen die Substanz aufnehmen und dadurch dunkelblau angefärbt werden. Diese konnten dadurch von der Zellzählung ausgeschlossen werden. Das Zählgitter der Neubauer-Zählkammer besteht aus zweimal 3 x 3 Großquadraten mit einer Fläche von jeweils 1 mm². Für die Zählung wurde das zentrale Großquadrat verwendet. Dieses setzt sich aus 5 x 5 kleinen Quadraten à 0,04 mm² Fläche zusammen. Die Zellzahl ergibt sich aus dem Mittelwert der beiden gezählten Zellzahlen in den zentralen Quadraten, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Zählkammerfaktor. Der Zählkammerfaktor errechnet sich aus dem Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mm}^3} = \frac{\text{Zellzahl oberes Zentralquadrat} + \text{Zellzahl unteres Zentralquadrat}}{2 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Zählkammerfaktor}}$$

4.2.3 Kryokonservierung

Um die Vitalität der Zellen möglichst lange aufrechtzuerhalten und sie bei Bedarf erneut verwenden zu können, wurden die Zellen kryokonserviert, d.h. in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierfür wurde die Zellsuspension zunächst sieben Minuten bei 4 °C und 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in Einfriermedium bestehend aus 90 % hitzeinaktiviertem FBS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) aufgenommen. Etwa 1,3 x 10⁶ Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium gelöst und in kältestabile Einfrierröhrchen (Thermo Fisher Scientific) gegeben. Zur langsamen Temperaturreduktion wurden die Zellen für eine Nacht bei einer Temperatur von -80 °C in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox (Nalgene) gelagert, bevor am nächsten Tag die endgültige Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C folgte.

4.2.4 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Um die Zellen für Experimente zu verwenden und wieder in Kultur zu nehmen wurden die konservierten MSZ zunächst in einem Wasserbad bei 37 °C angetaut, bis noch ein kleines Eiskristall blieb. Zu diesem wurde 1 ml Auftaumedium (DMEM, mit 30 % FBS und 100 U/ml Heparin) pro $1,3 \times 10^6$ Zellen gegeben. Um Überreste des zytotoxischen DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen, wurde die Zellsuspension für zehn Minuten bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und je nach Verwendung in Kulturmedium oder PBS-Puffer resuspendiert.

4.3 Charakterisierung der isolierten MSZ

Um sicherzustellen, dass es sich bei den kultivierten Zellen um MSZ handelt, wurden die MSZ hinsichtlich der Ausprägung der für MSZ typischen Oberflächenantigene sowie anschließend hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials in die mesenchymalen Stromazelllinien untersucht.

4.3.1 *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) - Analyse des Immunphänotyps der MSZ

Um zu verifizieren, dass die MSZ die von der ISCT geforderten Oberflächenmarker exprimieren, wurden durchflusszytometrische Messungen mit einem *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, bei der die Zellen hinsichtlich der Granularität, der relativen Größe und der Fluoreszenzintensität untersucht werden können. Dazu wird eine Suspension mit den zu untersuchenden Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert, und passiert so den Strahl eines Lasers. Das Licht des Laserstrahls wird durch die Zellpartikel gestreut. Hierbei wird eine Vorwärtsstreuung (engl.: *forward scatter*, FSC) von einer Seitwärtsstreuung (engl.: *side scatter*, SSC) unterschieden. Die Vorwärtsstreuung ist die Streuung in Richtung des Laserstrahls und ist proportional zur Zellgröße. Die Seitwärtsstreuung kommt durch Licht zustande, welches im 90 °C Winkel zum eintreffenden Laserstrahl gebrochen wird. Die Seitwärtsstrahlung ist abhängig von der Granularität der Zellen. Durch die Kopplung fluoreszierender Farbstoffe an Antikörper, die spezifisch gegen Zellepitope auf der Oberfläche der zu analysierenden Zellen gerichtet sind, kann die Ausprägung von Oberflächenantigenen untersucht werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren das Licht

einer bestimmten, für den jeweiligen Farbstoff charakteristischen Wellenlänge. Dadurch wird ein Elektron des Farbmoleküls auf ein höheres Energieniveau angehoben. Das Elektron geht jedoch sofort wieder in den Grundzustand über und emittiert dabei die überschüssige Energie in Form eines Lichtquants (Photon). Das gestreute und fluoreszierende Licht wird schließlich an spezielle Detektoren geleitet. Diese erzeugen elektronische Signale, die proportional zu den eintreffenden optischen Signalen sind. Im verwendeten Gerät FACSCalibur (BD Biosciences, USA) stehen ein Argonlaser und ein Heliumneonlaser zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung. Verwendete Fluorchrommoleküle sind hierbei standardmäßig FITC (Fluoreszeinisothiozyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridin Chlorophyll) und APC (Allophycocyanin). Die gemessenen Daten können anschließend mit Hilfe des *Cellquest* Programms (BD Biosciences, USA) durch Darstellung in Punktdiagrammen (dotplots) und Histogrammen analysiert werden. Die Auswertungen wurden jeweils mit der *FlowJo*® Software durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden die MSZ hinsichtlich der Expression von CD29, CD105, CD44 und CD73 sowie hinsichtlich der Expression der für hämatopoetische Zellen charakteristischen Oberflächenantigene CD34 und CD45 untersucht. Dafür wurden spezielle fluoreszenzgekoppelte Antikörper verwendet, wodurch die Expression anhand der im FACS gemessenen Fluoreszenz ermittelt werden kann. Die Kopplung der Antikörper an die Fluoreszenzfarbstoffe ist in Tabelle 3 aufgeführt. Nach dem Auftauen der in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen wurden jeweils 1×10^4 MSZ in 2 ml PBS 2 % FBS gelöst, in 5 ml FACS-Röhrchen (BD Biosciences, USA) gegeben und für sieben Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit je 25 μ l der 1:20 in PBS 2 % FBS verdünnten Antikörper gefärbt und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde jeweils eine ungefärbte Probe und eine Isotypkontrolle mitgeführt. Isotypkontrollen zeigen das Ausmaß unspezifischer Bindung an die untersuchten Zellen. Als Isotypkontrollen verwendet man Antikörper gegen ein Antigen, von dem angenommen wird, dass es in den untersuchten Zellen nicht auftritt. Nach der Färbung wurden die Zellen in 2 ml PBS 2 % FBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Zugabe von 100 μ l PBS 2 % FBS erfolgte die Fluoreszenzmessung am FACSCalibur.

Tab. 3: Konjugation der Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe

| Antikörper | Fluoreszenzfarbstoff |
|------------|---------------------------------------|
| CD29 | Alexa Fluor 488 (AF 488) |
| CD105 | Alexa Fluor 488 (AF 488) |
| CD44 | Phycoerythrin (PE) |
| CD90 | Phycoerythrin (PE) |
| CD45 | Peridinin-Chlorophyll-protein (PerCP) |
| CD34 | Allophycocyanin (APC) |
| CD73 | Allophycocyanin (APC) |

4.3.2 Funktionelle Charakterisierung der MSZ

Zur funktionellen Charakterisierung der MSZ erfolgte die Untersuchung des Differenzierungspotentials durch die Induktion der Differenzierung in Fettzellen (Adipozyten), Knochenzellen (Osteoblasten) und Knorpelzellen (Chondrozyten).

4.3.2.1 Differenzierung der MSZ in Adipozyten (Adipogenese)

Zur Untersuchung der MSZ hinsichtlich ihres adipogenen Differenzierungspotentials wurde das Reaktionskit *StemPro Adipogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen GmbH) verwendet. Um die Adipogenese der MSZ zu induzieren, wurden in einer 12-well Platte (Thermo Fisher Scientific) zweimal $3,8 \times 10^4$ MSZ in 1,5 ml Kulturmedium ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Nach vier Tagen wurde das MSZ-Medium entfernt und die Differenzierung durch Zugabe des Adipogenese-Mediums gestartet. Zur Negativkontrolle erfolgte zeitgleich die Kultivierung von MSZ in normalem Kulturmedium (NH-Medium bzw. DMEM). Die Differenzierung erfolgte binnen 14 Tagen, wobei alle drei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Für den Nachweis der bei der Differenzierung gebildeten Lipidvakuolen wurden die Zellen im Anschluss an die Differenzierung mit einer *Oil Red O*-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gefärbt. *Oil Red O* ist ein roter Azofarbstoff, der spezifisch Triglyceride anfärbt. Für die Färbung wurde zunächst das Adipogenese- bzw. das Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen durch 30-minütige Inkubation in einer 4 %-igen Formaldehyd-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG). Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, um die Rückstände der Formaldehyd-Lösung zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit je 750 µl *Oil Red O*-Lösung gefärbt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen etwaiger Färberückstände wurde im Anschluss

dreimal mit PBS-Puffer gespült. Die Visualisierung und Dokumentation erfolgte am Lichtmikroskop. Die erfolgreich differenzierten Adipozyten konnten dabei an den rot angefärbten Lipidvakuolen im Zytoplasma erkannt werden.

4.3.2.2 Differenzierung der MSZ in Osteoblasten (Osteogenese)

Für die Analyse des osteogenen Differenzierungspotentials der isolierten MSZ wurde das Reaktionskit *StemPro Osteogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen GmbH) verwendet. Zur Induktion der Differenzierung wurden in einer 12-well Platte zweimal $1,9 \times 10^4$ Zellen in 1,5 ml MSZ-Medium ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Nach zwei Tagen wurde das MSZ-Medium entfernt und durch Zugabe von Osteogenese Medium (*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*) wurde die Differenzierung der MSZ in Osteoblasten eingeleitet. Für die Negativkontrolle wurden zeitgleich MSZ des identischen Spenders mit dem gewöhnlichen MSZ-Medium (NH bzw. DMEM-Medium) kultiviert. Ebenso wie bei der Adipogenese erfolgte alle drei Tage ein Mediumwechsel. Nach 21 Tagen wurde das osteogene Differenzierungspotential mithilfe der sogenannten von Kossa-Färbung nachgewiesen. Die von Kossa-Färbung ist eine indirekte Färbemethode zum Nachweis von Kalzium in Karbonaten oder Phosphaten. Dabei werden die Kalziumionen gegen Silberionen eingetauscht, welche anschließend durch den Einfluss von UV-Strahlung zu metallischem Silber reduziert werden. Dadurch erscheinen kalziumhaltige Substanzen schwarz bzw. schwarzbraun und die Osteoblasten können anhand der schwarz angefärbten Kalzium-Ionen erkannt werden. Für die Färbung wurde zunächst das Medium entfernt, anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und durch Inkubation für 30 Minuten in 4 %-iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Rückstände der Formaldehyd-Lösung wurden durch zweimaliges Spülen mit destilliertem Wasser entfernt und im Anschluss wurden 750 µl pro well einer 3 %-igen Silbernitratlösung (Polysciences Europe GmbH) zugegeben. Nach einer 30-minütiger Einwirkzeit unter direkter Lichtexposition wurden die Rückstände der Silbernitrat-Lösung durch dreimaliges Spülen mit destilliertem Wasser entfernt und die Osteogenese konnte lichtmikroskopisch visualisiert und dokumentiert werden.

4.3.2.3 Differenzierung der MSZ in Chondrozyten (Chondrogenese)

Die Untersuchung des chondrogenen Differenzierungspotentials der MSZ erfolgte unter Verwendung des Reaktionskits *StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen GmbH). Für die Chondrogenese wurden insgesamt je $4,8 \times 10^5$ Zellen verwendet. Die Differenzierung in Chondrozyten wurde anhand der Bildung eines Zelltropfens aus

Chondrozyten (Droplet) und zusätzlich anhand der Bildung eines Chondrozyten-Zellrasens getestet. Für die Zelltropfen wurden in einer 12-well Platte 2-3 Tropfen à 5 µl Zellsuspension ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach zwei Stunden erfolgte die Induktion der Differenzierung durch Zugabe von Chondrogenese-Medium. Zur Negativkontrolle wurde ein well parallel mit Kulturmedium behandelt. Für die Bildung des Zellrasens wurden je $1,6 \times 10^5$ Zellen in 1,5 ml Chondrogenese- bzw. Kulturmedium gelöst und in einer 12-well Platte ausplattiert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel und nach 21 Tagen die spezifische Färbung mit Safranin O. Die Safranin O-Färbung stellt den Proteoglykangehalt der chondrogen differenzierten Zellen dar. Für die Färbung wurde zunächst das Medium entfernt, bevor die Zellen mit PBS-Puffer gespült und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert wurden. Die Formaldehyd-Lösung wurde anschließend durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Im Folgenden wurden die Zellen mit je 750 µl 0,5 %-iger Safranin O-Lösung (Morphisto) pro well gefärbt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung durch dreimaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Die Visualisierung und Dokumentation erfolgte, wie bei den anderen Färbungen, am Lichtmikroskop. Die Chondrozyten sind dabei anhand der Rotfärbung der gebildeten Proteoglykanschicht erkennbar.

4.4 Analyse der STC-1 mRNA-Expression in MSZ

4.4.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus MSZ

Die Untersuchung der Expression von STC-1 in den MSZ auf molekularer Ebene erfolgte unter Verwendung der quantitativen *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Dafür wurde in einem ersten Schritt Gesamt-RNA aus den MSZ extrahiert. Dies erfolgte unter Verwendung des Reaktionskits *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN GmbH). Nach dem Auftauen wurden die MSZ in 1 ml PBS Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reagiergefäß (Sarstedt AG & Co) überführt. Nach dem Zentrifugieren (10 Minuten bei 1300 rpm) wurde der Überstand entfernt und je 350 µl eines zuvor mit 1 % β-Mercaptoethanol (Invitrogen GmbH) versetzten RLT-Puffers aus dem Kit zu den Zellen gegeben. Zur Homogenisierung wurde das Lysat wiederholt mit einer 3 ml Spritze (BD Biosciences) durch eine 20-Gauge Kanüle (BD Biosciences) passiert. Um die Nukleinsäuren zu fällen, wurden im nächsten Schritt 350 µl einer 70 %-igen Ethanol-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG) zugegeben. Anschließend wurde das Homogenat auf die im Kit enthaltene Affinitätssäule überführt und für 15

Sekunden bei 8000 rpm zentrifugiert, wodurch die RNA an die Affinitätssäule gebunden wird. Nach Verwerfen der entstandenen Waschlösung wurden 700 µl eines im Kit enthaltenen RW1-Puffers auf die Säule pipettiert und nochmals zentrifugiert (15 Sekunden, 8000 rpm). Die Affinitätssäule wurde im Folgenden in ein frisches 2 ml Sammelgefäß aus dem Kit überführt, und mit 500 µl RPE-Puffer, ebenfalls aus dem Reaktionskit, resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 Sekunden, 8000 rpm) wurde der Überstand verworfen und nochmals 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Um die Membran zu trocknen, erfolgte eine weitere Zentrifugation (zwei Minuten, 8000 rpm). Die Säule wurde anschließend in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Um die RNA von der Affinitätssäule zu eluieren, wurden 32 µl deionisiertes Wasser auf die Säule gegeben und anschließend zentrifugiert (eine Minute, 8000 rpm). Die Konzentration der isolierten RNA wurde mithilfe des Nanodrop® Spektralphotometer (Nanodrop), der bereits geringste Mengen an Nukleinsäuren detektiert, bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei konnte zusätzlich eine Kontamination der Probe mit Proteinen ausgeschlossen werden. Für die Messung wurden je 0,5 µl der Proben eingesetzt.

4.4.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Um dem enzymatischen Abbau vorzubeugen, wurden je 1 µg der zuvor isolierten RNA unter Verwendung des *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories GmbH) in stabile Erststränge umgeschrieben. Die Umschreibung erfolgte mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase (RT). Dabei wird ein zur Ausgangs-RNA komplementärer DNA-Strang synthetisiert, die sogenannte komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*; cDNA). Die ursprünglichen Ribonukleinsäuren werden enzymatisch abgebaut und der zweite, zum erhaltenen Erststrang komplementäre, DNA-Strang wird von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase synthetisiert. Für den Reaktionsansatz (Übersicht siehe Tabelle 4) wurde 1 µg RNA mit 4 µl des im Kit enthaltenen fünffach konzentrierten *iScript* Reaktionsmix, 1 µl Reverser Transkriptase deionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl ergänzt und in 0,2 ml PCR Röhrchen gegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz gemäß Herstellerangaben in einem Thermo-Cycler fünf Minuten bei 25 °C (Annealing der Primer an das RNA-Template), 30 Minuten bei 42 °C (cDNA-Synthese durch die RT), nochmals fünf Minuten bei 85° C (Denaturierung der RT) und anschließend für unbestimmte Zeit bei 4° C (Schutz vor Degradation der cDNA) inkubiert.

Tab. 4: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

| Chemikalien | Konzentration/Volumen |
|--------------------------------|-----------------------|
| RNA-Template | 1 µg |
| Reverse Transkriptase | 1 µl |
| iScript-Reaktionsmix (5x) | 4 µl |
| Deionisiertes H ₂ O | ad. 20µl |

4.4.3 Quantitative *Real-Time* Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR) ermöglicht eine Quantifizierung von PCR-Produkten durch Fluoreszenzmessungen in Echtzeit (engl. *real-time*, rt). Dabei ist die Fluoreszenz proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes. Die qRT-PCR in der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung des *SSO Advanced Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) in 96-well Platten durchgeführt. *SYBR Green I* ist ein interkalierender Cyanin-Farbstoff, der doppelsträngige DNA bindet. Um eine Verfälschung des Ergebnisses durch Messfehler zu verhindern, wurde bei jeder Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Für die PCR wurden in die entsprechenden Vertiefungen einer 96-well Platte (Corning Incorporated) je 10 µl PCR-Reaktionsansatz pipettiert. Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatz ist aus Tabelle 5 zu entnehmen. Die Endkonzentration der verwendeten Primer betrug jeweils 0,5 µM, die spezifischen Sequenzen sind unter 3.3.3 aufgelistet. Die PCR wurde in 35 sich wiederholenden Zyklen durchgeführt. Dabei erfolgte zunächst eine Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95 °C für 30 Sekunden. Die PCR-Zyklen beinhalteten jeweils das Auftrennen der Wasserstoffbrückenbindungen (Denaturierungsreaktion; zehn Sekunden, 95 °C), das Anlagern der Primer an die DNA (Primer-Hybridisierung bzw. Annealing; zehn Sekunden, 60 °C) und das Auffüllen der fehlenden Nukleotide durch die DNA-Polymerase am 3'-Ende der Primer (Elongation; 30 Sekunden, 60 °C). Zur Unterscheidung des PCR-Produkts von unspezifischen Primer-Dimeren wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde die Temperatur schrittweise (0,5 °C pro Sekunde) von 65 °C auf 95 °C erhöht. Dadurch wurden unspezifische PCR Fragmente aufgeschmolzen, während das spezifische PCR Produkt erst ab höheren Temperaturen zerfällt. Bei der Auswertung wurde die STC-1-Expression prozentual zur Expression des mitbestimmten GAPDH, einem *Housekeeping*-Gen mit verhältnismäßig gleichbleibender Expression, berechnet.

Tab. 5: Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

| Chemikalien | Volumen | Konzentration |
|---|-----------|---------------|
| SsoAdvanced universal SYBR Green Super Mix (2x) | 5 µl | |
| Forward Primer (20 µM) | 0,25 µl | 0,5 µM |
| Reverse Primer (20 µM) | 0,25 µl | 0,5 µM |
| cDNA (~ 50 ng/µl) | 0,2 µl | 10 ng |
| Deionisiertes H ₂ O | ad. 10 µl | |

4.5 Analyse der STC-1 Proteinexpression in MSZ

4.5.1 Immunblotanalysen zum Nachweis der STC-1 Proteinexpression in MSZ-Lysaten

4.5.1.1 Isolation und Quantifizierung von Proteinen aus MSZ

Um die STC-1 Expression in den MSZ auf Proteinebene untersuchen und vergleichen zu können, wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt. Dafür wurden zunächst Gesamtprotein-homogenate aus MSZ hergestellt, indem die MSZ nach dem Auftauen in 100 bis 200 µl vorgekühltem Proteinlysepuffer [eine Tablette *Protease Inhibitor Cocktail* (Roche Diagnostics GmbH) in 7 ml 0,2 %-iger *Sodium dodecyl sulfate* (SDS)-Lösung] resuspendiert wurden. Die anschließende Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte unter Verwendung der Bicinchoninsäure (BCA) Methode. Diese beruht auf der Komplexbildung von zweiwertigem Kupfer mit den Peptidbindungen von Proteinen (Biuret-Reaktion). Dadurch wird zweiwertiges Kupfer reduziert und das einwertige Kupfer wird von zwei Molekülen BCA gebunden. Über das Absorptionsmaximum (562 nm) des entstandenen purpurfarbenen Komplexes kann der Proteingehalt bestimmt werden. Für die Quantifizierung der Proteinmenge wurden zunächst Kalibrierproben aus Rinderserumalbumin in Proteinlysepuffer in einem Konzentrationsbereich von 31,2 µg/ml bis 2000 µg/ml angefertigt. Die Zelllysate wurden im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 mit Proteinlysepuffer verdünnt. In eine 96-well Platte (Corning Incorporated) wurden je 200 µl des Reagenzgemisches bestehend aus einer Bicinchoninsäure-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), einer 4 %-igen Kupfer(II)-Sulfat-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG) und je 10 µl Probe bzw. Kalibrierstandard in die entsprechenden Vertiefungen der Zellkulturplatte pipettiert. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C erfolgte die photometrische Messung des entstandenen Farbkomplex bei 562 nm mithilfe des *Tecan microplate absorbance reader* (Tecan Ltd.) und der Magellan™ 5 Software (Tecan Ltd.). Unter

Verwendung der Kalibriergeraden mit den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen wurde die Gesamtproteinkonzentration in den MSZ-Lysaten quantifiziert.

4.5.1.2 Vorbehandlung der Proteine für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bevor die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, erfolgte eine Behandlung der MSZ-Lysate mit Lämmli-Puffer. Das darin enthaltene SDS ist ein anionisches Detergens, welches durch Aufheben hydrophober Wechselwirkungen zum Verlust höherer Proteinstrukturen (Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen) führt. Das ebenfalls enthaltene Dithiotreitol (DTT) reduziert die Disulfidbrücken von Peptidbindungen und induziert so die Denaturierung der Proteine. Dafür wurde die gewünschte Menge an Gesamtprotein ($\frac{12,5 \mu\text{g}}{20 \mu\text{l}}$) mit vierfach konzentriertem Lämmli-Puffer [1M TRIS-HCL, pH 6,8; 20 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 20 % 2M DTT (Invitrogen GmbH)] verdünnt und mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 30 μl ergänzt. Anschließend wurden die Proben in einem Heizblock für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert.

4.5.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die Vorbehandlung der Proben mit SDS wurden alle Proteine mit einer negativen Gesamtladung versehen. So wandern sie nach Anlegen einer Spannung an ein Polyacrylamidgel alle von der Kathode Richtung Anode und die Proteine werden nach der Größe aufgetrennt, da Proteine mit einem höheren Molekulargewicht das Gel langsamer passieren als Proteine mit geringerem Molekulargewicht. In der vorliegenden Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli¹⁰² durchgeführt. Dabei passieren die Proben vor dem Durchlaufen des 10 %-igen Trenngels zunächst ein 4 %-iges Sammelgel, um eine Fokussierung der Proteine zu erreichen. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist der Tabelle 6 zu entnehmen. Die Auspolymerisierung des 10 %-igen Trenngels wurde durch die Vernetzung der Acrylamidmonomere, ausgelöst durch Tetramethylethylendiamin (TEMED; Carl Roth GmbH + Co. KG) und Ammoniumpersulfat (APS; Merck-Millipore, Merck KGaA), ermöglicht. Nach etwa 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur konnte das 4 %-ige Sammelgel daraufgefüllt werden. Durch Einsetzen eines Kammes in das Sammelgel wurden Taschen freigelassen, in welche nach Auspolymerisation je 20 μl Probe bzw. 5 μl PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Größenordnung 10-250 kDa; Invitrogen GmbH) pipettiert wurden. Die Elektrophorese fand in einer mit Laufpuffer (25 mM Tris-Base,

200 mM Glycin, 3,5 mM SDS) gefüllten vertikalen Elektrophoresekammer statt. Dabei wurde eine konstante Spannung von 50 bis 70 Volt für das Sammelgel (ca. 15 Minuten) und 135 Volt für das Trenngel (ca. 90 Minuten) angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront, erkennbar an dem im Lämmli-Puffer enthaltenen Bromphenolblau, das untere Ende des Trenngels erreichte hatte. Das Sammelgel wurde nach der Elektrophorese entfernt.

Tab. 6: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (Volumenangaben für ein Gel)

| Chemikalien | Trenngel (10 %) | Sammelgel (4 %) |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|
| H ₂ O dest. | 2,05 ml | 1,525 ml |
| TRIS HCL 1,5 M (ph 8,8) | 1,25 ml | ∟ |
| TRIS HCL 0,5 M (ph 6,8) | ∟ | 625 µl |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 % | 50 µl | 25 µl |
| Acrylamid/Bisacrylamid 30 % | 1,65 ml | 325 µl |
| Ammoniumpersulfat (APS) 10 % | 25 µl | 12,5 µl |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | 2,5 µl | 2,5 µl |

4.5.1.4 Immunblotanalyse

Im Folgenden wurden die Proteine unter Verwendung der Semidry-Blot-Methode auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, um die spezifische Nachweisreaktion von STC-1 durchführen zu können. Dafür wurden das Acrylamid-Gel zusammen mit der Nitrocellulose-Membran (Whatman GmbH) und sechs Filterpapieren in zuvor angesetztem Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) getränkt und für 30 Minuten bei einer Stromstärke von 60 mA in eine Blotting-Kammer (Biometra GmbH) gegeben. Zum Überprüfen der Transfereffizienz wurden die transferierten Proteine unspezifisch mit Ponceau S-Lösung (0,2 % (v/v) Ponceau-S; 3 % (v/v) Trichloressigsäure, beides Carl Roth GmbH + Co. KG) gefärbt und mittels Kopie dokumentiert. Um die Membran wieder zu entfärben, wurde anschließend mit PBST-Puffer (PBS/0,1 % Tween 20) gewaschen. Im Folgenden wurde die Membran für eine Stunde in 5 %-iger Blocklösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST) inkubiert, um die freien Bindungsstellen mit Proteinen zu besetzen. Dies erhöht die Sensitivität des Immunoblots, da der Antikörper nur spezifisch an das gesuchte Protein bindet. Die Färbung der Membran mit dem in 5 %-igem Blockpuffer angesetzten, primären Antikörper gegen STC-1 (0,05 µg/ml; R&D systems GmbH) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst durch mehrere Waschschr

Puffer von ungebundenem Primärantikörper befreit und danach mit einem Merrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper (1:1000; R&D systems GmbH), der gegen die Spezies des Primärantikörpers (Maus) gerichtet war, gefärbt. Nachdem die Membran im Anschluss erneut mit PBST-Puffer gespült worden war, erfolgte die Visualisierung der nun spezifisch an STC-1 gebundenen Reagenzien mittels Chemilumineszenz. Dies erfolgte unter Anwendung der *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare Europe GmbH), in welchen die Membran unter Lichtausschluss für fünf Minuten inkubiert wurde. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Merrettichperoxidase, das nun ebenfalls an STC-1 gebunden ist, katalysiert die Umsetzung des in den Detektionsreagenzien enthaltenen Substrats Luminol. Dieses Reaktionsprodukt konnte über eine CCD-Kamera (GE Healthcare Europe GmbH) sichtbar gemacht werden. Für den als Positivkontrolle verwendeten Nachweis des verhältnismäßig gleichbleibend exprimierten β -Aktin wurde der Immunkomplex durch 15-minütige Inkubation bei 37 °C in *Restore WesternBlot Stripping Buffer* (Thermo Scientific) von der Membran entfernt. Danach wurde die Membran erneut für 15 Minuten in Blockpuffer inkubiert und für eine Stunde bei RT mit dem in Blockpuffer angesetzten β -Aktin-Antikörper (1:4000; HRP-gekoppelt; GenScript Biotech Corporation) gefärbt. Die Detektion der Antigen-Antikörper erfolgte nach erneutem Spülen mit PBST-Puffer ebenso wie bei der STC-1 Antigen-Antikörper-Bindung mit der CCD-Kamera. Die Mitbestimmung des Haushaltgens β -Aktin ermöglichte die semiquantitative Bestimmung der STC-1 Proteinexpression durch den densitometrischen Vergleich der Proteinbanden mithilfe der Software *Image Studio™ Lite Software 5.2*. (LI-COR Biotechnology – GmbH).

4.5.2 Immunhistochemischer Nachweis der STC-1 Proteinexpression im Knochenmark

Zum Nachweis der STC-1 Expression im Knochenmark sowie zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Färbungen wurden an formalinfixierten und paraffinebetteten Knochenmarksstanzen von knochenmarksgesunden Spendern ($n = 2$) sowie von AML-Patienten ($n = 2$) durchgeführt. Dabei wurde die Anleitung aus dem Histofine® *Simple Stain MAX PO* Protokoll befolgt.

Es wurden Präparate mit einer Schichtdicke von 3 μ m verwendet. Nach Entparaffinierung durch Xylol und Rehydrierung durch Inkubation in absteigenden Ethanol-Konzentrationen (100 % und 70 %) sowie in destilliertem Wasser erfolgte die Antigenmaskierung indem die Schnitte in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) im Dampfgerät erhitzt wurden. Zur Reduzierung unerwünschter Hintergrundfärbung in der Immunhistochemie durch die endogene Peroxidase-

Aktivität wurden die Schnitte anschließend in eine 3 %-ige H₂O₂-Lösung gebracht. Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung mit dem Primärantikörper gegen STC-1 (Kaninchen IgG, Santa Cruz) bzw. einem Isotyp-Antikörper zur Kontrolle (Kaninchen IgG, Abcam). Beide Antikörper wurden mit PBS 0,5 % BSA auf eine Zielkonzentration von 0,5 µg/ml verdünnt und zu je 100 µl auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer. Die Antigen-Antikörper-Bindung wurde am Folgetag mit dem Immuno-peroxidase Polymer MAX-PO und einer darauffolgenden Reaktion mit dem Chromogen *Bright-DAB* sichtbar gemacht. Dafür wurden die gefärbten Schnitte zunächst dreimal fünf Minuten in PBS 0,05 % Tween 20 inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem Sekundärantikörper (MAX PO, Histofine) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurde überschüssige Antikörperlösung mit PBS 0,05 % Tween 20 entfernt, ehe die Schnitte für acht Minuten in einer Lösung des Chromogens Bright-DAB (Medac) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Objektträger nochmals mit destilliertem Wasser gereinigt, eine Minute mit Hämalaun-Lösung (1:8) gefärbt und für 10 Minuten in lauwarmem Leitungswasser gebläut. Zur permanenten Fixierung wurden etwa 5 Tropfen *Permanent Aqueous Mounting Medium-Cell Marque* (Cell marque™, Sigma-Aldrich GmbH) auf die Objektträger gegeben und mit Deckgläsern verschlossen. Die Visualisierung erfolgte mit einem Zeiss Axioskop 2 Plus Mikroskop mit einer *AxioCam HRC* Kamera unter Verwendung der *Axiovision 4.7.2 Software* (alles Carl Zeiss Microscopy GmbH).

4.5.3 Immunhistochemischer Nachweis der STC-1 Proteinexpression in MSZ

Durch die immunhistochemische Färbung von Knochenmarksbiopsien konnte STC-1 im Knochenmark nachgewiesen werden. Um STC-1 spezifisch in den MSZ nachzuweisen, wurden sogenannte *Cytospins* angefertigt. Dafür wurden die Zellen durch Zentrifugation mit einer speziellen Cytozentrifuge auf einem Objektträger fixiert. Im Gegensatz zu der Behandlung der Knochenmarksschnitte entfiel bei den *Cytospins* die Entparaffinierung und Rehydrierung. Die restlichen Arbeitsschritte erfolgten analog zu der oben beschriebenen Methodik zur Untersuchung der Knochenmarksstanzen. Die Visualisierung und fotografische Dokumentation erfolgte ebenfalls mit dem Zeiss Axioskop 2 Plus Mikroskop.

4.6 Analyse der STC-1 Sekretion durch MSZ

Um die MSZ hinsichtlich der STC-1-Sekretion zu testen, wurde die aktive Sezernierung von STC-1 in das Medium mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untersucht. Der ELISA ist ein Nachweisverfahren von Proteinen z.B. im Plasma, Serum oder Zellkulturüberständen. In der vorliegenden Arbeit wurde die *Sandwich*-Methode des ELISA angewendet. Das Prinzip des *Sandwich*-ELISA ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Dabei wird die Probe auf eine Mikrotiterplatte gegeben, welche im Vorfeld mit dem Primärantikörper (Fänger-Antikörper, engl. *capture antibody*), der gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist, beschichtet worden war. Das in der Probe enthaltene Antigen bindet dann an den *Capture*-Antikörper auf der Mikrotiterplatte. Nach dem Entfernen von ungebundenem Antigen wird ein sekundärer, enzymgekoppelter Antikörper zur Detektion (engl. *detection antibody*) zugegeben. Der Detektionsantikörper bindet ebenfalls spezifisch an das zu untersuchende Antigen und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, in welchem das Antigen wie in einem Sandwich zwischen den beiden Antikörpern gebunden ist. Der Detektionsantikörper erkennt jedoch ein anderes Epitop als der für die Beschichtung der Platte verwendete *Capture*-Antikörper, da sich die beiden Antikörper andernfalls gegenseitig behindern würden. Das an den Detektionsantikörper gebundene Reporterenzym wird anschließend durch Zugabe eines Substrates (Chromogen) aktiviert, es photometrisch gemessen werden. Durch das Mitführen einer Standardreihe kann nun die Konzentration des gesuchten Antigens in der Probe berechnet werden.

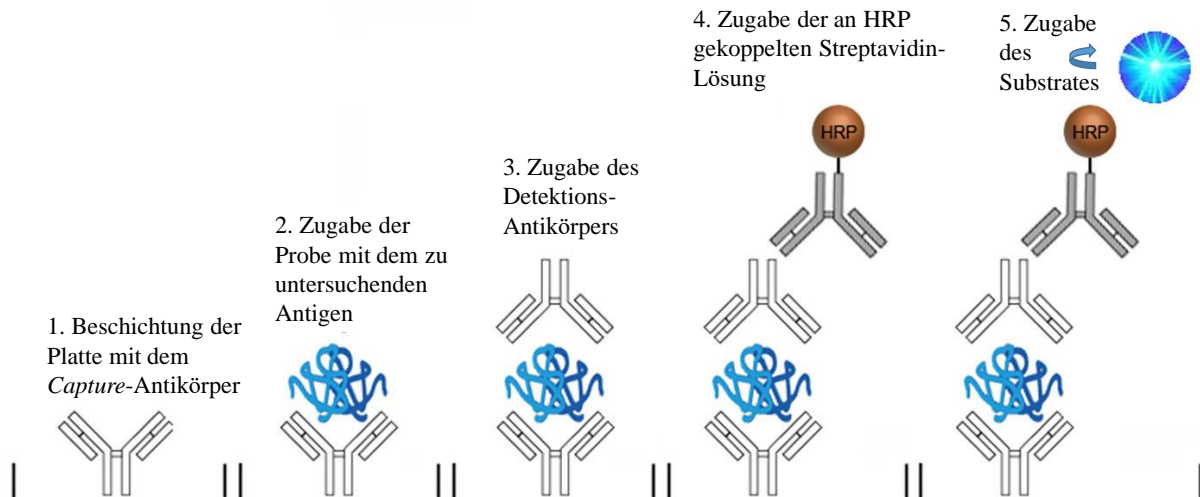


Abb. 2: Prinzip eines Sandwich-ELISA (modifiziert nach¹⁰³)

Dargestellt sind schematisch die einzelnen Schritte bei der Durchführung eines Sandwich-ELISA. Zunächst wird eine Mikrotiterplatte mit dem Primärantikörper, dem sogenannten *Capture*-Antikörper beschichtet (1). Anschließend wird die Probe mit dem zu untersuchenden Antigen zugegeben (2). Nachdem ungebundenes Antigen entfernt wird, erfolgt die Zugabe eines Sekundärantikörpers [Detektionsantikörper (3)]. Dieser bindet ebenfalls an das zu untersuchende Antigen, jedoch an ein anderes Epitop als der Primärantikörper. Anschließend erfolgt die Zugabe einer an das Enzym Merrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Streptavidin-Lösung (4). Durch die Zugabe eines Chromogens (5) wird die HRP aktiviert und katalysiert den Farbumschlag des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes. Die Intensität des Farbkomplexes wird anschließend photometrisch bestimmt.

Für die Durchführung des ELISA wurden die MSZ nach dem Auftauen in 1,5 ml Kulturmedium resuspendiert, zu je 76 000 Zellen pro well in 12-well Zellkulturplatten gegeben und im Brutschrank kultiviert. An Tag 2 und 5 erfolgte ein Mediumwechsel. Bei der Zellernte nach 10 Tagen wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen. Um zu gewährleisten, dass dieser frei von Zellfragmenten ist, wurde zentrifugiert und der Überstand anschließend nochmals vorsichtig abpipettiert. Der *Sandwich-Immunoassay* wurde unter Verwendung des Reaktionssystems *Human Stanniocalcin 1 DuoSet ELISA* (R&D Systems) bestimmt. Als ersten Schritt wurde eine 96-well Mikrotiterplatte aus Polystyrol (Corning Incorporated) mit je 100 µl/ well des *Capture*-Antikörpers (1,5 µg/ ml in PBS) beschichtet und mit Plastikklebefolie abgedichtet. Nach der Inkubation über Nacht bei RT erfolgten mehrere Waschschrte mit je 300 µl PBS 0,5 % Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und das Abblocken unspezifischer Bindestellen durch einstündige Inkubation bei RT in PBS 1 % BSA. Für die Quantifizierung der STC-1 Konzentration wurden Kalibrierproben mit rekombinantem STC-1 in einem Konzentrationsbereich von 62,5 pg/ml bis 4000 pg/ml angefertigt. Nach mehreren Waschschrten erfolgte die Zugabe von je 100 µl der Proben bzw. Standards, die Abdichtung der Platte und die Inkubation für 2 Stunden bei RT.

Anschließend erfolgten weitere Waschschrte, um ungebundene Bestandteile der Proben zu entfernen und danach die Zugabe von je 100 μ l der Detektionsantikörper-Lösung aus dem Kit (300 ng/ml in PBS 1 % BSA 2 % NGS). Die Platte wurde abgedichtet und für zwei Stunden bei RT inkubiert, gefolgt von einer 20-minütigen Inkubation unter Lichtausschluss in einer Lösung mit dem an Streptavidin gekoppelten Enzym Merrettichperoxidase (1:200 in PBS 1 % BSA). Im nächsten Schritt wurde die im Kit enthaltene Substratlösung bestehend aus 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und H₂O₂ zugegeben. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l *Stop-Solution* aus dem Kit beendet und es erfolgte ein Farbumschlag des entstanden Immunkomplexes von blau zu gelb, dessen Intensität anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt wurde. Die Messung und anschließende Auswertung erfolgte ebenso wie bei der Bestimmung der Proteinkonzentration im *BCA-Assay* (vgl. 4.5.1.1) unter Zuhilfenahme des *Tecan microplate absorbance reader* und der Magellan™ 5 Software. Unter Verwendung der Kalibriergeraden mit den Proteinstandards wurde mithilfe einer linearen Regressionsgerade die Konzentration an STC-1 in den Proben ermittelt. Zur Normierung des STC-1 Gehalts auf die Zellzahl waren die MSZ für den Versuch separat geerntet und gezählt worden.

4.7 Analyse der Wirkung von STC-1 auf AML-Zellen *in vitro*

Um die spezifische Wirkung von STC-1 auf AML-Zellen zu untersuchen, wurden *in vitro*-Kulturen von AML-Zellen mit Zugabe von rekombinantem STC-1 sowie Ko-Kulturen von AML-Zellen und MSZ gesunder und leukämischer Spender mit Blockade von STC-1 durchgeführt. Dafür wurden AML-Zellen von drei unterschiedlichen Spendern aus dem Bestand der Arbeitsgruppe verwendet. Nach dem Auftauen der in Stickstoff konservierten AML-Zellen erfolgte die Färbung mit Propidiumiodid (0,5 μ g/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und einem FITC-konjugierten CD45 Antikörper (1:40 in PBS 2 % FBS; BioLegend Inc.). Um sicherzustellen, dass ausschließlich Zellen bzw. AML Blasten mit geringer Expression von CD45 (CD45_{low}) für die Kultur verwendet werden, wurden die Zellen mit dem FACSaria IIu (BD Biosciences) sortiert, anschließend zentrifugiert, in PBS 2 % FBS resuspendiert, gezählt und in Kultur gegeben.

4.7.1 Flüssigkeitskultur von AML-Zellen mit Zugabe von rekombinantem STC-1

Zum Ansatz der AML-Flüssigkeitskultur wurden die AML-Zellen nach erfolgter Sortierung zentrifugiert und in IMDM-Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zusammensetzung des IMDM-Kulturmediums ist der Tabelle 7 zu entnehmen. In einer 24-well Platte wurden dann vier wells mit je 2×10^5 in IMDM-Medium gelösten Zellen befüllt und bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Zunächst wurden zwei Vorversuche zur Bestimmung der geeigneten rh-STC-1 Konzentration durchgeführt. Dabei diente ein well als Negativkontrolle und blieb unbehandelt, die restlichen drei wurden täglich mit 0,5, 5 oder 50 ng/ml rh-STC-1 (BioVendor) behandelt. Da die Behandlung mit 50 ng/ml dabei den größten Effekt auf Apoptose und Proliferation der AML-Zellen erzielte, wurden in der eigentlichen Versuchsreihe je zwei wells täglich mit 50 ng/ml rh-STC-1 behandelt, wobei in einem Ansatz zusätzlich die Gabe eines Antikörpers gegen STC-1 (0,1 µg/ml, R&D systems GmbH) erfolgte, um die spezifischen Auswirkungen von STC-1 WBBuntersuchen zu können. Eine schematische Darstellung der unterschiedlichen Behandlungen in den Flüssigkeitskulturen liefert Abbildung 3. Es wurde jeweils ein Ansatz zur Analyse von Proliferation und Zellzyklusaktivität sowie ein weiterer zur Untersuchung der Apoptose angefertigt. Die Auswirkungen der Zugabe von STC-1 wurden mittels durchflusszytometrischer Messung von Zellzyklusverteilung, Proliferationsaktivität und Apoptoserate der AML-Zellen analysiert.

Tab. 7: Zusammensetzung des IMDM-Kulturmediums

| Chemikalien | Anteil | Volumen (25 ml) |
|---------------------------------------|---------|-----------------|
| IMDM-Medium | 72 % | 18 ml |
| Fetales Rinderserum | 12,50 % | 3,125 ml |
| Pferdeserum | 12,50 % | 3,125 ml |
| Penicillin-Streptomycin (100 x) | 1 % | 250 µl |
| L-Glutamin (100 x) | 1 % | 250 µl |
| β-Mercaptoethanol | 57,2 µM | 28,6 µl |
| Hydrocortison (1 µM) | 1 % | 250 µl |
| IL-3, GCSF, TPO, FLT3, SCF (20 ng/ml) | 0,02 % | 5 µl |

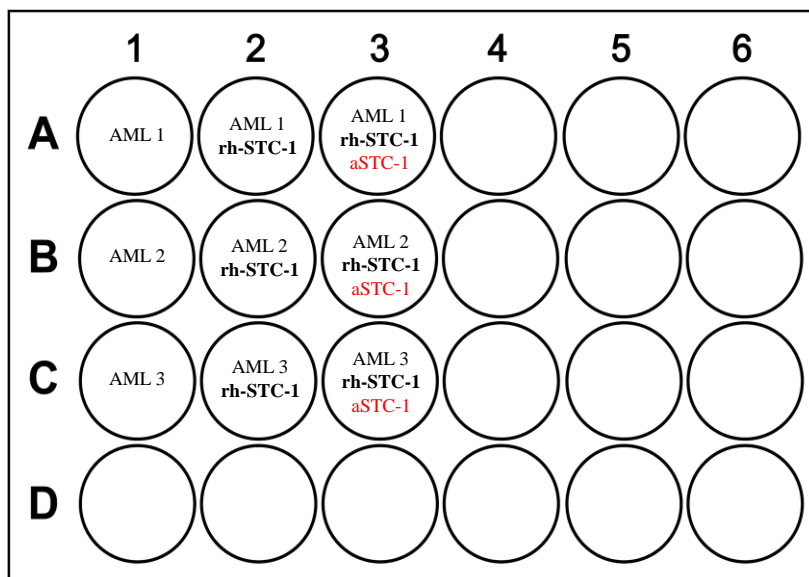


Abb. 3: Schema für den Ansatz der Flüssigkeitskulturen

Dargestellt ist das Schema für den Ansatz der Flüssigkeitskulturen. Spalte 1 (A-C): Negativkontrollen: unbehandelte AML-Zellen dreier unterschiedlicher Spender (AML 1, AML 2, AML 3); Spalte 2 (A-C): Kultur der AML-Zellen (AML 1, AML 2, AML 3) mit täglicher Zugabe von rekombinantem STC-1 (50 ng/ml); Spalte 3 (A-C): Kultur der AML-Zellen (AML 1, AML 2, AML 3) mit täglicher Zugabe von rekombinantem STC-1 (50 ng/ml) und anti-Stanniocalcin 1 (0,1 µg/ml); rh-STC-1: rekombinantes humanes Stanniocalcin 1; aSTC-1: anti-Stanniocalcin 1; AML: akute myeloische Leukämie.

4.7.1.1 Analyse der Zellzyklusaktivität der AML-Zellen nach der Flüssigkeitskultur mit rekombinantem STC-1

Für die Analyse der Zellzyklusaktivität wurden die Zellen nach der Kultur mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt. PI durchdringt die Zellmembran und lagert sich als Nukleinsäureinterkalator zwischen die Basen der nukleären DNA. Durch das zugefügte Enzym RNase wird doppelsträngige RNA gespalten und PI bindet spezifisch an doppelsträngige DNA. Die PI-Fluoreszenz der Zelle ist folglich proportional zum DNA-Gehalt der Zelle. Anhand des dadurch bestimmten DNA-Gehalts lässt sich feststellen, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle befindet. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der Zellzyklusanalyse am FACS. Dabei sind bei der Intensität der PI-Fluoreszenz zwei Peaks erkennbar, wobei der erste den Zellen mit einfachem DNA-Gehalt in der G₀/G₁-Phase und der zweite den Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt in der G₂/M-Phase entspricht. Zwischen den beiden Peaks liegt der Anteil der Zellen in der Phase der DNA-Replikation (S-Phase). An Tag 5 nach Kulturstart wurden die Zellen geerntet, mit eiskaltem Ethanol (1 ml/ 1 x 10⁶ Zellen; Carl Roth GmbH + Co. KG) behandelt und für vier Stunden unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Dadurch wurden die Zellen in ihrer derzeitigen

Zellzyklusphase fixiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation und die Färbung der Zellen mit einem Gemisch bestehend aus einer PI-Lösung (0,025 µg/ml), RNase (0,0125 µg/ml; AppliChem) und PBS-Puffer. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C erfolgte die Messung der Fluoreszenz am FACSCalibur.

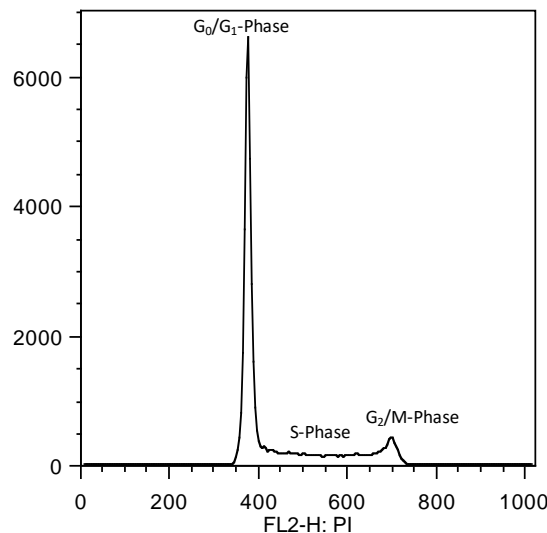


Abb. 4: FACS-Analyse der Zellzyklusverteilung

Dargestellt ist exemplarisch die am FACS durchgeführte Zellzyklusanalyse von AML-Zellen nach fünf Tagen Monokultur. Die Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenz ist gegen den Anteil der im FACS gemessenen Zellen aufgetragen. Die PI-Fluoreszenz entspricht dem DNA-Gehalt in den Zellen. Der erste Peak entspricht den Zellen mit einem einfachen DNA-Gehalt, d.h. den Zellen in der G₀/G₁-Phase. Der zweite, kleinere Peak entspricht den Zellen mit einem doppelten DNA-Gehalt in der G₂/M-Phase. Zwischen den beiden Peaks liegt der Anteil an Zellen, die sich in der Phase der DNA-Replikation (S-Phase) befinden.

4.7.1.2 Untersuchung der Zellproliferation der AML-Zellen nach der Flüssigkeitskultur mit rekombinantem STC-1

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurden die Zellen vor der Kultur mit Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester (CFSE) behandelt. Für die Färbung wurden die in PBS 0,5 % FBS gelösten Zellen vor der Kultur für zehn Minuten bei 37 °C mit 5 µM einer CFSE-Lösung gefärbt. Überschüssiges CFSE wurde durch Zugabe von eiskaltem PBS 20 % FBS ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, in PBS resuspendiert und am Fluoreszenzmikroskop visualisiert, wodurch die erfolgreiche Färbung überprüft werden konnte. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellproliferation erfolgte nach fünf Kulturtagen unter Anwendung des CFSE-Assays. Das zunächst farblose CFSE, mit welchem die Zellen vor der Kultur behandelt wurden, diffundiert in das Zytoplasma der Zellen und die beiden Acetat-Reste des Moleküls werden durch Esterasen entfernt. Das nun fluoreszierende Molekül Carboxyfluoreszin-Succinimidylester geht mit seiner Succinimidyl-Gruppe eine

kovalente Bindung mit freien Aminen im Zellinneren ein und wird so stabil an die Zelle gebunden. Bei jeder Zellteilung wird das Carboxyfluoreszin der Mutterzelle zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt. Folglich beträgt die Fluoreszenz der Tochterzellen jeweils genau die Hälfte der Fluoreszenz der Mutterzelle. Bei der Messung am FACSCalibur konnten die Zellen daher anhand ihrer Fluoreszenzintensität in verschieden weit proliferierte Zellgenerationen eingeteilt werden.

4.7.1.3 Analyse der Apoptose der AML-Zellen nach der Flüssigkeitskultur mit rekombinantem STC-1

Die Apoptoserate in einer Zellpopulation kann durch Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) ermittelt werden. Bei lebenden Zellen befindet sich das Molekül Phosphatidylserin (PS) in der inneren Phospholipidschicht der Zellmembran. Im Frühstadium der Apoptose wird PS durch einen Flip-Flop-Mechanismus an die Außenseite der Zellmembran transloziert. Das Protein Annexin V bindet spezifisch an PS, durch seine Kopplung an den Fluoreszenzfarbstoff FITC können so apoptotische Zellen durchflusszytometrisch detektiert werden. Zur Differenzierung apoptotischer und bereits nekrotischer Zellen dient die Behandlung mit PI. Dieser Farbstoff kann nur in nekrotische Zellen mit bereits durchlässiger Zellmembran eindringen. Daher werden vitale Zellen weder mit Annexin V, noch mit PI angefärbt. Apoptotische Zellen hingegen sind positiv für Annexin V, aber negativ für PI, da die Zellmembran apoptotischer Zellen noch intakt ist. Nekrotische Zellen werden sowohl mit Annexin V, als auch mit PI angefärbt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose der AML-Zellen unter Verwendung des *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Biosciences) bestimmt. Nach sechs Tagen Kultur bei 37 °C unter unterschiedlichen Bedingungen wurden die AML-Zellen geerntet, zentrifugiert, in PBS resuspendiert und zu je 150 000 Zellen in 5 ml FACS-Röhrchen (BD Falcon) überführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenepitope (alle von BioLegend Inc.). Für die Geräteeinstellung erfolgte zunächst die Färbung aller Zellen mit einem an die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe APC und FITC gekoppelten CD45- bzw. Isotyp-Antikörper. Dabei wurden jeweils 25 µl Antikörper-Lösung verwendet. Die Verdünnungen der Kompensations-Antikörper für die Geräteeinstellung ist der Tabelle 8 zu entnehmen. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Für die Analyse der Apoptose wurden die Zellen mit je 100 µl *Annexin V Binding Puffer* (1:10 in Aqua dest.) und danach mit je 5 µl Annexin V und PI (alles

im Kit enthalten) behandelt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT in Dunkelheit erfolgte die Fluoreszenzmessung am FACSCalibur.

Tab. 8: Verdünnung der Kompensations-Antikörper für die Geräteeinstellung

| Antikörper | Verdünnung |
|-------------|----------------------|
| CD45 APC | 1:40 in PBS 2 % FBS |
| CD45 FITC | 1:40 in PBS 2 % FBS |
| Isotyp APC | 1:25 in PBS 2 % FBS |
| Isotyp FITC | 1:200 in PBS 2 % FBS |

4.7.2 Ko-Kultur von AML-Zellen und MSZ mit STC-1 Blockade

4.7.2.1 Ansatz der Ko-Kulturen

Um die Auswirkungen von STC-1 auf die Interaktion von AML-Zellen und MSZ zu untersuchen, wurden *in vitro* Kulturen von MSZ eines knochenmarksgesunden und eines Patienten mit AML zusammen mit primären AML-Zellen dreier unterschiedlicher Spender (Spendercharakteristika unter 3.1.2) durchgeführt. Zur spezifischen Untersuchung der Effekte des von den MSZ sezernierten STC-1 erfolgte in der Hälfte der Kulturen zusätzlich die Gabe eines anti-STC-1 Antikörpers. Um Proliferation und Apoptose der AML-Zellen gesondert untersuchen zu können, wurden von allen Kulturen zwei Ansätze angefertigt. Zunächst wurden in zwei Vertiefungen einer 24-well Platte je $3,8 \times 10^5$ MSZ in 1,5 ml IMDM-Medium in Kultur gegeben. Nach sechs Tagen wurden die ebenso wie in den Flüssigkeitskulturen vorbehandelten AML-Zellen zu den MSZ mit in Kultur gegeben. Dafür wurde das MSZ-Medium entfernt und es wurden je 2×10^5 in 1,5 ml IMDM-Medium gelöste AML-Zellen auf die adhärennten MSZ gegeben. In allen Kulturansätzen wurde jeweils eines der beiden wells täglich mit einem neutralisierenden STC-1 Antikörper (0,1 µg/ml; R&D systems GmbH) behandelt. Ein Schema der unterschiedlichen Ko-Kultur-Ansätze ist in Abbildung 5 gezeigt.

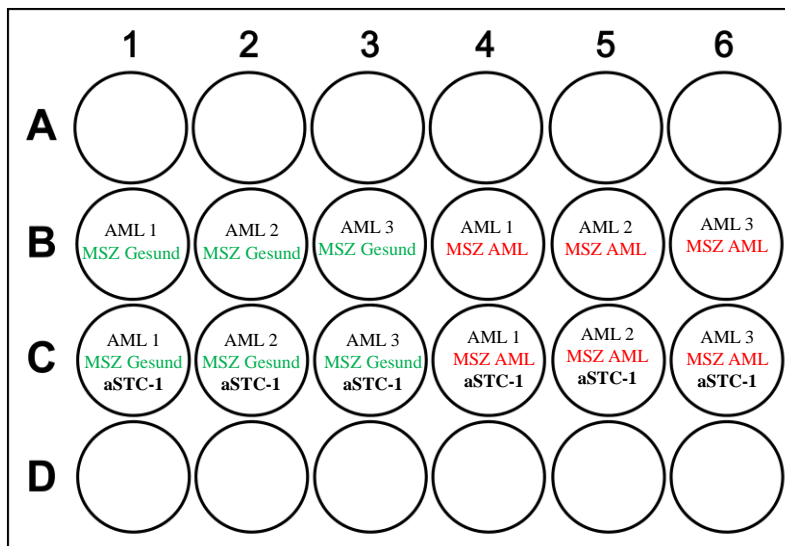


Abb. 5: Schema für den Ansatz der Ko-Kulturen

Dargestellt ist das Schema für den Ansatz der Ko-Kulturen. Reihe B (Negativkontrolle): Ko-Kultur von AML-Zellen dreier unterschiedlicher Spender (AML 1, AML 2, AML 3) und gesunden MSZ (grün) bzw. leukämischen MSZ (rot) ohne Blockade von STC-1. Reihe C: Ko-Kultur von AML-Zellen dreier unterschiedlicher Spender (AML 1, AML 2, AML 3) mit gesunden MSZ (grün) bzw. leukämischen MSZ (rot) und täglicher Zugabe eines anti-STC-1 Antikörpers (0,1 µg/ml, R&D systems). aSTC-1: anti Stanniocalcin; MSZ: Multipotente Mesenchymale Stromazellen; AML: akute myeloische Leukämie.

4.7.2.2 Analyse der AML-Zellen nach Ko-Kultur mit MSZ und STC-1 Blockade

Die Auswirkungen der STC-1-Blockade in der Ko-Kultur von AML-Zellen und MSZ wurden mittels FACS-Analyse der AML-Zellen hinsichtlich Proliferationsaktivität (nach fünf Kulturtagen) und Apoptoserate (nach sechs Kulturtagen) ermittelt. Bei der Zellernte wurde zunächst der Überstand mit den nicht adhären AML-Zellen abgenommen, anschließend wurden die adhären MSZ mit Trypsin-EDTA vom Plattenboden gelöst und gemeinsam mit den AML-Zellen in 15 ml Röhren aus Polypropylen (BD Biosciences) überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, mit PBS-Puffer gewaschen und mit je 25 µl eines APC-gekoppelten CD45-Antikörpers (1:40 in PBS 2 % FBS; BioLegend Inc.) gefärbt. Dadurch können die AML-Zellen (CD45⁺) von den MSZ (CD45⁻) unterschieden werden. Die FACS-Analysen erfolgten analog wie bei den Flüssigkulturen.

4.8 Statistische Analyse

Die Berechnung der Mittelwerte sowie die Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde unter Verwendung der *GraphPad Prism 7* Software (GraphPad Software Inc.) durchgeführt. Die Signifikanzen wurden anhand des ungepaarten oder zweiseitig gepaarten studentischen t-Tests berechnet. Der angegebene p-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der das berechnete Ereignis eintritt. Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm *standard error of the mean* (S.E.M.) oder als Mittelwerte \pm *standard deviation* (S.D.) angegeben. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Expression von STC-1 in DMEM-MSZ (Mikroarray-Analyse)

Im Vorfeld dieser Arbeit ließ die AG Stammzellen vom Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) einen *GeneChip*[®] zur Analyse des Genexpressionsprofils von MSZ anfertigen. Dabei wurden in DMEM kultivierte MSZ von AML-Patienten (n = 3) und gesunden Spendern (n = 3) im Vergleich analysiert, um potentielle Unterschiede im Genexpressionsprofil zu ermitteln. Insgesamt wurden 48 144 Gene analysiert, wovon 141 eine signifikante Über- bzw. Unterexpression in den MSZ der Leukämiepatienten zeigten. In Tabelle 9 sind die am stärksten hoch- bzw. herunterregulierten Gene in den DMEM-MSZ der AML-Patienten aufgelistet. Das am stärksten hochregulierte Gen in den MSZ der AML-Patienten kodiert das Protein STC-1 (in Tabelle 9 an erster Stelle und in roter Schrift) und war in den MSZ der AML-Patienten 3,3-mal so stark exprimiert wie in den MSZ hämatologisch gesunder Spender.

Tab. 9: Unterschiede im Genexpressionsprofil leukämischer und gesunder MSZ (DMEM)

| Genbezeichnung | Abkürzung | MSZ AML vs. MSZ Gesund |
|---|--------------|------------------------|
| stanniocalcin 1 | STC-1 | 3,33 |
| membrane-spanning 4 domains, subfamily A, member 7 | MS4A7 | 3,29 |
| pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1 | PAPPA | 3,28 |
| WNT inducible signaling pathway protein 3 | WISP3 | 2,97 |
| endothelin 1 | EDN1 | 2,82 |
| MARVEL domain containing 2 | MARVELD2 | 2,76 |
| ephrin-A5 | EFNA5 | -2,01 |
| family with sequence similarity 221, member A | FAM221A | -2,02 |
| chloride channel, coltage-sensitive 6 | CLCN6 | -2,03 |
| CD9 molecule | CD9 | -2,04 |
| DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46 | DDX46 | -2,04 |
| ankyrin repeat domain 10 | ANKRD10 | -2,04 |

Aufgelistet sind jeweils die sechs Gene mit der stärksten Über- bzw. Unterexpression in den MSZ von AML-Patienten (n = 3) verglichen mit den MSZ knochenmarksgesunder Spender (n = 3). Die für die Analyse verwendeten MSZ wurden in DMEM kultiviert. Angegeben ist der Wert, um den sich die Expression in den leukämischen von der Expression in den gesunden MSZ unterscheidet. MSZ: multipotente mesenchymale Stromazellen; AML: Akute myeloische Leukämie; DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*.

5.2 Kultivierung von MSZ

Um die in der Analyse des Genexpressionsprofils ermittelte Überexpression von *STC-1* in den MSZ von AML-Patienten zu verifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit *STC-1*-Expressionsanalysen von weiteren MSZ-Proben durchgeführt. Dafür wurden in einem ersten Schritt MSZ aus Knochenmarksproben gesunder und leukämischer Spender gewonnen und *in vitro* kultiviert. Mit der Adhärenz am Boden der Zellkulturflaschen erfüllten die Zellen bereits ein erstes wichtiges Kriterium für die Definition von MSZ. Bei einer Konfluenz von etwa 70 % erfolgte das Passagieren der MSZ-Kulturen in größere Kulturflaschen, um den MSZ ein noch stärkeres Wachstum zu ermöglichen. Zur Dokumentation wurden lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt. In Abbildung 6 sind exemplarische Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten an Tag 14 nach Kulturstart dargestellt. Die Zellen besitzen einen für MSZ charakteristischen Phänotyp mit länglichem Zytoplasma und spindelförmigen Zellausläufern. Auch die parallele Anordnung der Zellen ist ein typisches Merkmal von MSZ. Die linke Aufnahme zeigt MSZ, die in DMEM, einem von uns standardmäßig verwendeten Nährmedium, kultiviert wurden (DMEM-MSZ). Demgegenüber sind rechts MSZ des gleichen Spenders abgebildet, die in NH-Medium kultiviert wurden (NH-MSZ). Das NH-Medium enthält einen speziell für die Kultivierung von MSZ entwickelten Zytokinmix. Der Vergleich von DMEM-MSZ und NH-MSZ ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellmorphologie.

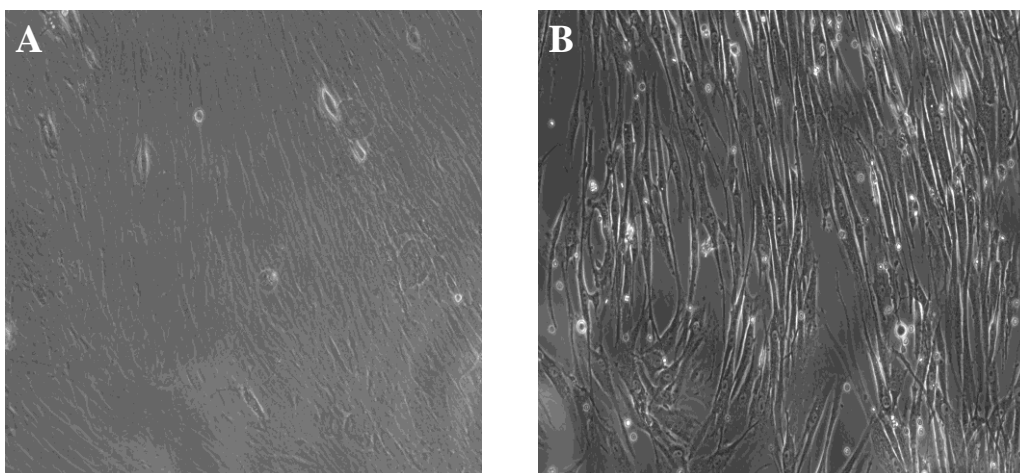


Abb. 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ zum Zeitpunkt der Expansion

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen repräsentativ den Phänotyp von MSZ eines AML-Patienten in DMEM (A) und NH-Medium (B) zum Zeitpunkt der Expansion in größere Zellkulturgefäße (Tag 14 nach Kulturstart). Die adhärenenten MSZ besitzen ein für ihren Zelltyp charakteristisches spindelförmiges Zytoplasma mit länglichen Zellausläufern. Ein weiteres MSZ-typisches Merkmal ist die dichte parallele Anordnung der Zellen.

5.2.1 Einfluss des Kulturmediums auf das Wachstum von MSZ

Um den Einfluss des Nährmediums auf das Expansionsverhalten der MSZ zu untersuchen, wurde jeweils eine DMEM- und eine NH-Kultur angefertigt. Bezüglich der Anordnung der Zellen zueinander konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den in DMEM und den in NH-Medium kultivierten MSZ beobachtet werden, sowohl die DMEM- als auch die NH-MSZ waren überwiegend parallel zueinander ausgerichtet. Die Zelldichte war bei den NH-MSZ jedoch deutlich höher als bei den DMEM-MSZ, d.h. der Boden des Zellkulturgefäßes war bei den NH-Kulturen deutlich schneller komplett von adhärenen MSZ bedeckt. Das Passagieren der MSZ von den 100 mm² Zellkulturschalen in die größeren 75 cm²-Zellkulturflaschen erfolgte bei den DMEM-MSZ (n = 7) im Durchschnitt nach $20,1 \pm 6,7$ Tagen, bei den NH-MSZ (n = 7) nach $17,6 \pm 4,1$ Tagen. Diese Diskrepanz deutet bereits auf einen Vorteil des NH-Mediums hin, war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Ernte der MSZ erfolgte, sobald der Boden der Zellkulturflasche zu etwa 90 % von den adhärenen MSZ bewachsen war. Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, war die Expansionsdauer (Zeit bis zur Ernte der MSZ) bei den NH-MSZ signifikant kürzer als bei den DMEM-MSZ. So konnten die NH-MSZ (schwarzer Balken) bereits nach durchschnittlich $24 \pm 4,7$ Tagen geerntet werden, während die Ernte der DMEM-MSZ (grauer Balken) im Mittel erst nach $31,7 \pm 6,2$ Tagen erfolgte ($p = 0,0318$; n = 7).

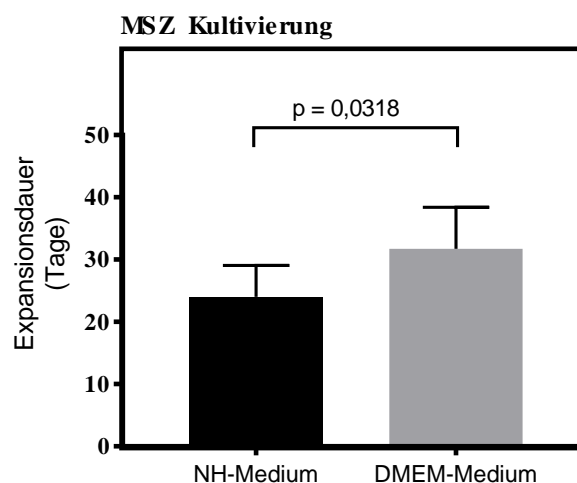


Abb. 7: Expansionszeit von NH-MSZ und DMEM-MSZ

Es wurde die Expansionsdauer (Tage von Kulturstart bis zur Zellernte) von NH-MSZ (schwarzer Balken) und DMEM-MSZ (grauer Balken) verglichen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM aus 7 MSZ-Kulturen; $p = 0,0318$. Der p-Wert wurde unter Anwendung des ungepaarten studentischen t-Tests bestimmt. NH-Medium: MSZ-Medium mit speziellen Zytokinen zur Unterstützung des Wachstums von MSZ, DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium* (Standard-Nährmedium).

Weiterhin war die Zellzahl zum Zeitpunkt der Ernte bei den NH-MSZ signifikant erhöht im Vergleich zu den DMEM-MSZ [$2,43 \times 10^7$ vs. $4,19 \times 10^6$ ($p < 0,0051$; $n = 7$)]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt (schwarzer Balken: NH-MSZ; grauer Balken: DMEM-MSZ) und belegen die deutlich stärkere Potenz des NH-Mediums verglichen mit dem Nährmedium DMEM. Für die nachfolgenden STC-1-Expressionsanalysen und die *in vitro* Kulturen wurden daher ausschließlich MSZ verwendet, die in NH-Medium kultiviert worden waren.

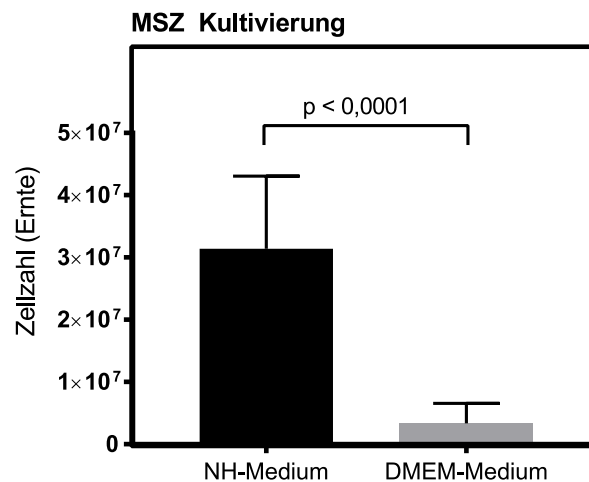


Abb. 8: Zellzahlen von NH-MSZ und DMEM-MSZ zum Zeitpunkt der Ernte

Es wurden die Zellzahlen der NH-MSZ (schwarzer Balken) mit den Zellzahlen der DMEM-MSZ (grauer Balken) verglichen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM aus 7 MSZ-Kulturen, $p < 0,0001$. Der p-Wert wurde unter Anwendung des ungepaarten studentischen t-Tests bestimmt. NH-Medium: MSZ-Medium mit speziellen Zytokinen zur Unterstützung des Wachstums von MSZ, DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium* (Standard-Nährmedium).

5.2.2 Unterschiede zwischen MSZ von AML-Patienten und hämatologisch gesunden Spendern

Zusätzlich wurden potentielle Unterschiede im Phänotyp und der Expansionsgeschwindigkeit von MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten (AML-MSZ) und knochenmarksgesunden Spendern untersucht. Bezüglich der Zellmorphologie konnten bei dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Kollektiv an MSZ-Proben insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den leukämischen MSZ und den MSZ gesunder Probanden beobachtet werden. Auch die Expansionsdauer war bei beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich, es zeigte sich jedoch ein leichter Trend zugunsten einer schnelleren Expansion der AML-MSZ.

5.3 Charakterisierung der isolierten MSZ

5.3.1 Immunphänotypische Charakterisierung der MSZ

Die immunphänotypische Charakterisierung der MSZ erfolgte anhand von durchflusszytometrischen Messungen. Dafür wurden die MSZ zunächst mit spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und anschließend die Fluoreszenzintensitäten mit dem FACSCalibur ermittelt. Für die vorliegende Arbeit wurden MSZ von insgesamt sieben unterschiedlichen Spendern kultiviert, dabei konnte die Expression der von der ISCT geforderten Oberflächenantigene bei allen MSZ nachgewiesen werden. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den AML-MSZ und den MSZ von hämatologisch gesunden Patienten. Auch die Kultivierung in unterschiedlichen Nährmedien (DMEM bzw. NH-Medium) beeinflusste das Oberflächenexpressionsprofil der MSZ nicht maßgeblich. In Abbildung 9 sind repräsentativ anhand eines AML-Patienten die mit *FlowJo* erstellten Grafiken der FACS-Analyse der Oberflächenantigene der MSZ dargestellt. Dabei sind jeweils die Fluoreszenzintensitäten auf der Abszisse gegen den Anteil an der Gesamtheit der im FACS gemessenen Zahlen auf der Ordinatenachse aufgetragen. Wie erwartet, exprimierten die MSZ die Antigene CD73 (Abbildung 9D, blauer Graph), CD44 (Abbildung 9B, blauer Graph), CD90 (Abbildung 9B, roter Graph), CD29 (Abbildung 9C, blauer Graph) und CD105 (Abbildung 9C, roter Graph). Ebenso waren die für hämatopoetische Zellen spezifischen Oberflächenantigene CD45 (Abbildung 9A, roter Graph) und CD34 (Abbildung 9C, roter Graph), konform den ISCT-Kriterien, nicht auf den Zellen exprimiert.

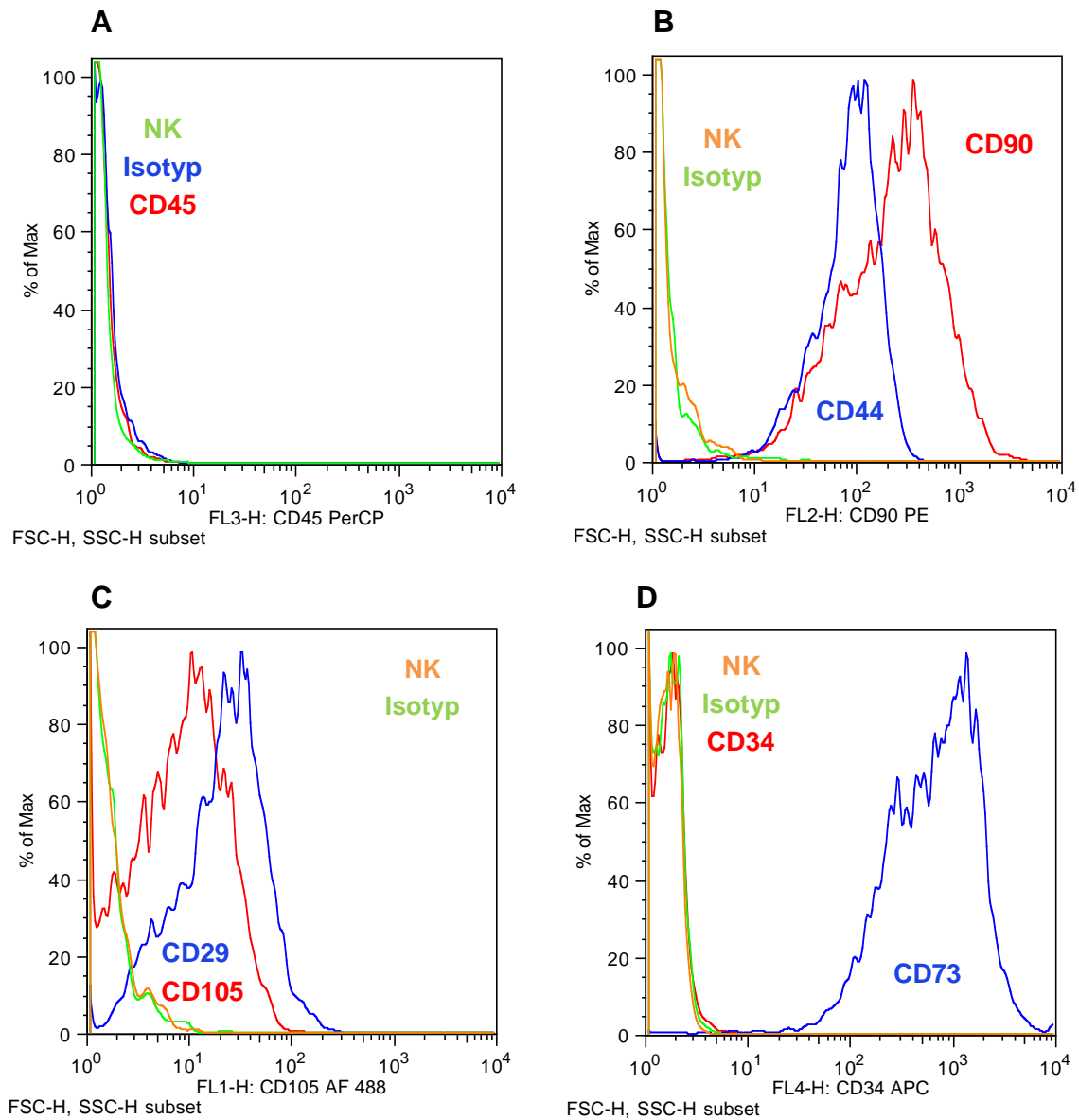


Abb. 9: FACS-Analyse des Oberflächenexpressionsprofils der MSZ

Dargestellt ist exemplarisch die durchflusszytometrisch bestimmte Verteilung der Oberflächenantigene einer MSZ-Kultur. Die Analyse erfolgte im Anschluss an die Ernte der Kultur (Tag 22 nach Kulturstart). Wie erwartet zeigten die Zellen einen MSZ-spezifischen Immunphänotyp mit Expression von CD44, CD90, CD29, CD105 und CD73, sowie fehlender Expression der hämatologischen Marker CD34 und CD45. In den Diagrammen sind jeweils die Fluoreszenzintensitäten gegen den Anteil der Zellen an der Gesamtzahl der im FACS gemessenen Zellen aufgetragen. A) Fehlende Expression von CD45 (rot); ungefärbte Kontrolle (NK): grün; Isotypkontrolle: blau. B) Expression von CD44 (blau) und CD90 (rot); ungefärbte Kontrolle (NK): orange; Isotypkontrolle (grün). C) Expression von CD29 (blau) und CD105 (rot); ungefärbte Kontrolle (NK) orange; Isotypkontrolle: grün. D) Expression von CD73 (blau); fehlende Expression von CD34 (rot); ungefärbte Kontrolle (NK) orange; Isotypkontrolle: grün; NK: Negativkontrolle; CD: *cluster of differentiation*.

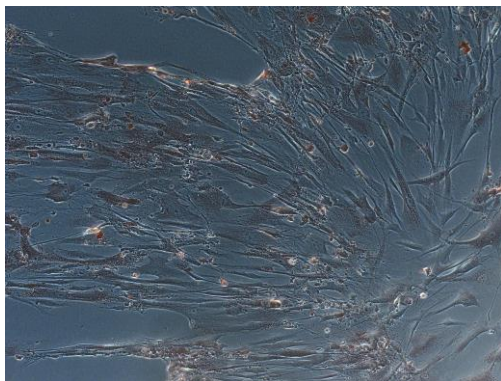
5.3.2 Nachweis des Differenzierungspotentials der MSZ

Zur funktionellen Charakterisierung der MSZ wurde im nächsten Schritt das Potential zur Differenzierung in die drei klassischen mesenchymalen Zelllinien Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten getestet. Die Induktion der Differenzierung erfolgte durch Kultivierung in speziellen Differenzierungsmedien und wurde im Anschluss durch eine spezifische Färbung visualisiert und mikroskopisch dokumentiert.

5.3.2.1 Adipogenes Differenzierungspotential

Nach 14 Tagen differenzierten die MSZ in Adipozyten und konnten spezifisch mit *Oil-Red-O* rot angefärbt werden. Abbildung 10 zeigt beispielhafte Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten, die mit Adipogenese-Medium (B) bzw. mit Standard-Kulturmedium (Negativ-Kontrolle, A) behandelt und anschließend mit *Oil-Red-O* gefärbt wurden. Im Zytoplasma der entstandenen Fettzellen (B) sind die während der Differenzierung gebildeten Lipidvakuolen zu erkennen.

Negativkontrolle (A)



Adipogenese (B)

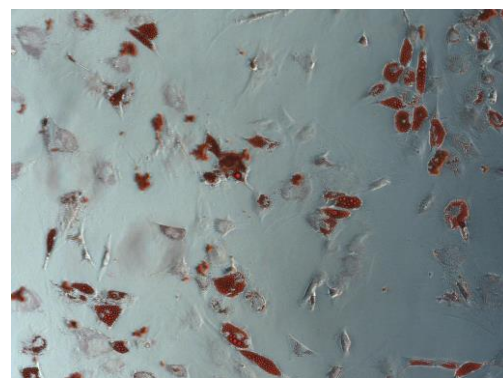
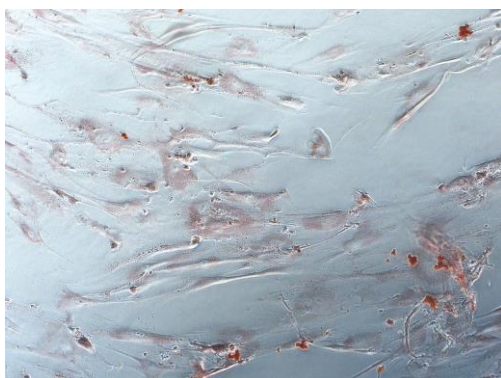
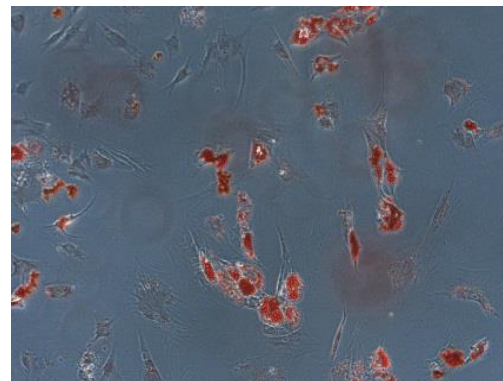


Abb. 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten nach der Adipogenese

Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten nach 14 Tagen Kultur in MSZ-Medium (Negativkontrolle) bzw. Adipogenese-Medium und spezifischer Färbung. Die Adipozyten sind durch die mit *Oil-Red-O* rot angefärbten Lipidvakuolen im Zytoplasma zu erkennen.

5.3.2.2 Osteogenes Differenzierungspotential

Nach 21 Tagen differenzierten die MSZ in Osteoblasten und wurden spezifisch nach der von Kossa-Methode mit Silbernitrat angefärbt. Repräsentative Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten nach osteogener Differenzierung und spezifischer Färbung mit Silbernitrat sind in Abbildung 11 gezeigt. In 11A sind Aufnahmen der Negativkontrolle gezeigt, d.h. von MSZ, die für 21 Tage in Standard-Nährmedium (NH-Medium) kultiviert wurden. In Abbildung 11B sind die Aufnahmen der mit Osteogenese-Medium behandelten MSZ dargestellt. Die kleinen schwarzen Punkte im Zytoplasma der Osteoblasten (B) sind bei der osteogenen Differenzierung entstandene Kalziumionen.

Negativkontrolle (A)



Osteogenese (B)

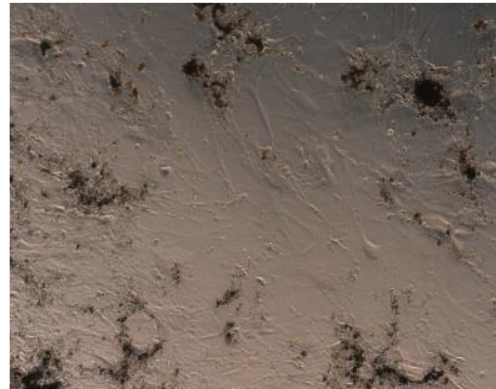


Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten nach der Osteogenese
Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten nach 21 Tagen Kultur in MSZ-Medium (Negativkontrolle, A) bzw. Osteogenese-Medium (B) und spezifischer Färbung mit Silbernitrat. Die schwarzen Punkte stellen Kalziumionen dar und beweisen die erfolgreiche Differenzierung der MSZ in Osteoblasten.

5.3.2.3 Chondrogenes Differenzierungspotential

Die Differenzierung der MSZ in Knorpelzellen erfolgte ebenfalls binnen 21 Tagen und konnte durch die Behandlung mit dem Farbstoff Safranin-O visualisiert werden. Abbildung 12 zeigt repräsentativ je zwei lichtmikroskopische Aufnahmen der MSZ eines AML-Patienten nach

der 21-tägigen Kultur in Standard-Kulturmedium (12A) bzw. Chondrogenese-Medium (12B). Das chondrogene Differenzierungspotential wurde anhand der Bildung eines Zellrasens aus Knorpelzellen (Abbildung 12.1) und zusätzlich anhand der Bildung eines großen Tropfens bestehend aus Knorpelzellen (*Chondrozyten-Droplet*, Abbildung 12.2) nachgewiesen. Durch die Färbung mit Safranin-O wurden die Chondrozyten (12B) rot bzw. rotschwarz angefärbt und die bei der chondrogenen Differenzierung gebildete Proteoglykanschicht im Zytoplasma der Knorpelzellen sichtbar gemacht.

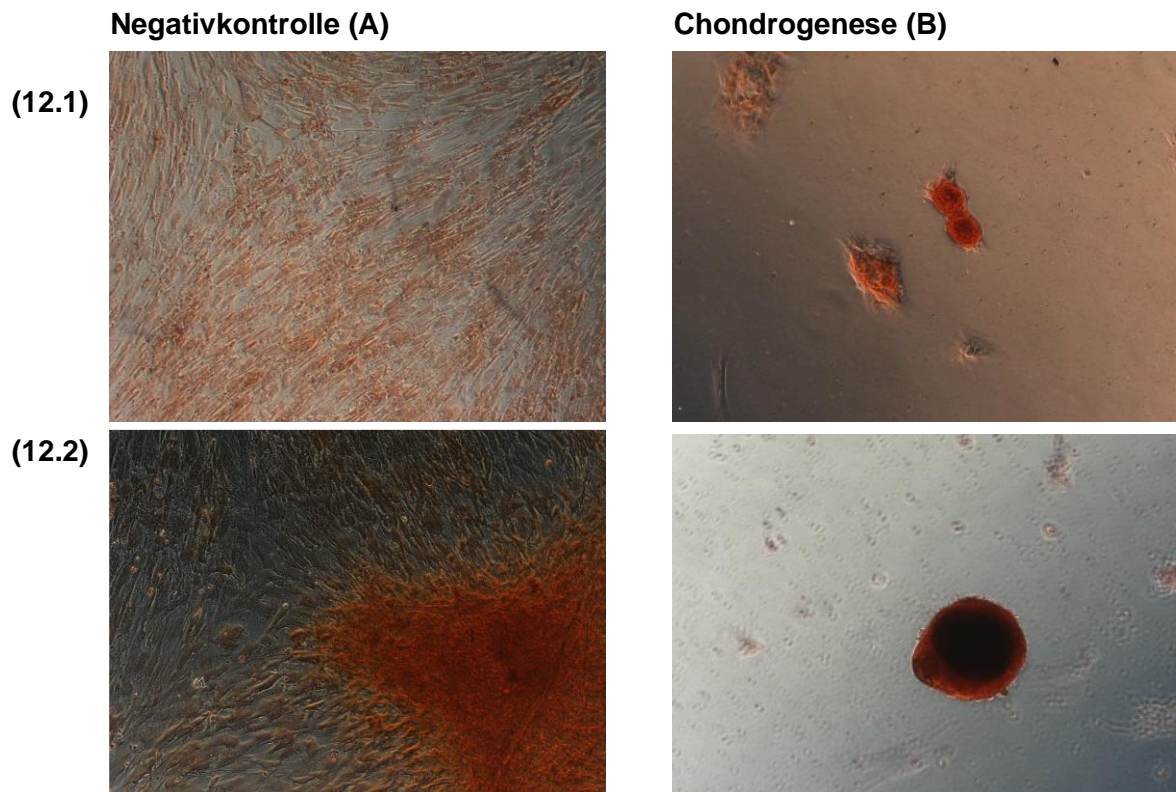


Abb. 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten nach der Chondrogenese

Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ eines AML-Patienten nach 21-tägiger Kultivierung in MSZ-Medium (Negativkontrolle, A) bzw. Chondrogenese-Medium (B) und spezifischer Färbung mit Safranin-O. 12.1: Nachweis des chondrogenen Differenzierungspotential anhand der Bildung eines Zellrasens aus Chondrozyten. 12.2: Nachweis des chondrogenen Differenzierungspotential anhand der Bildung eines *Chondrozyten-Droplets*.

Ebenso wie der spezifische Immunphänotyp konnte auch das für die MSZ charakteristische Differenzierungspotential bei allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSZ nachgewiesen werden. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den MSZ der AML-Patienten verglichen mit den MSZ von knochenmarksgesunden Spendern.

Auch die Behandlung der MSZ mit den unterschiedlichen Nährmedien (DMEM bzw. NH-Medium) wirkte sich nicht signifikant auf das Differenzierungspotential der MSZ aus.

5.4 STC-1 mRNA-Expression in MSZ

Die eingangs durchgeführte *Microarray*-Analyse zum Vergleich des Genexpressionsprofils von MSZ knochenmarksgesunder und Spendern mit AML ergab eine signifikante ($p = 0,03$) Überexpression von STC-1 in den MSZ der AML-Patienten. Um dieses Resultat zu verifizieren, wurde zunächst die mRNA-Expression von STC-1 in den MSZ mittels quantitativer *real-time* PCR analysiert und anschließend mit der Expression des *Housekeeping*-Gens GAPDH verglichen. Die relative STC-1 mRNA-Expression in den MSZ ist in Abbildung 13 dargestellt. In 13A ist die mRNA-Expression der einzelnen MSZ-Proben dargestellt, in 13B der Mittelwert der gesunden MSZ (grauer Balken) und leukämischen MSZ (schwarzer Balken). Entgegen den Erwartungen war die STC-1 mRNA-Expression in den MSZ der AML-Patienten ($n=10$) nicht signifikant erhöht verglichen mit der STC-1 Expression in den MSZ von hämatologisch gesunden Spendern ($n=6$). Dennoch zeigte sich ein erkennbarer Trend zugunsten einer verstärkten STC-1 mRNA-Expression in den MSZ der Leukämiepatienten.

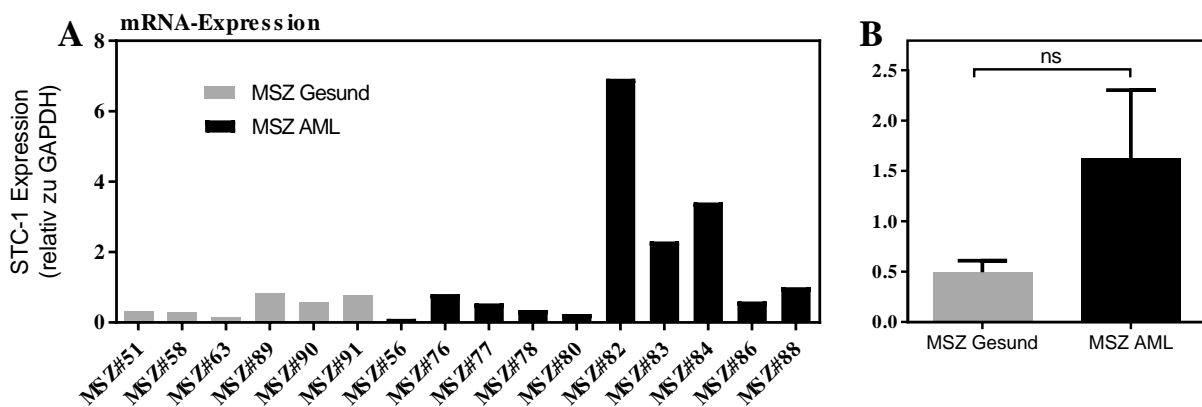


Abb. 13: STC-1 mRNA-Expression in MSZ von AML-Patienten und knochenmarksgesunden Spendern

Dargestellt ist die mittels qRT-PCR bestimmte STC-1 mRNA-Expression der einzelnen MSZ (A) bzw. der Mittelwert der gesunden und AML-MSZ (B). Graue Balken: MSZ von knochenmarksgesunden Spendern; schwarze Balken: MSZ von AML-Patienten. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. ($n_{\text{gesund}} = 6$, $n_{\text{AML}} = 10$) $p > 0,05$. Der p-Wert wurde unter Anwendung des ungepaarten studentischen t-Tests bestimmt. qRT-PCR: quantitative *Real-Time* PCR; STC-1: Stanniocalcin 1; mRNA: *messenger* Ribonukleinsäure; ns: nicht signifikant.

5.5 STC-1 Proteinexpression in MSZ und im Knochenmark

Um die Expression von STC-1 auf Proteinebene nachzuweisen, wurden Immunoblotanalysen von MSZ-Lysaten sowie immunhistochemische Untersuchungen von Knochenmarksstanzen und *Cytospins* durchgeführt.

5.5.1 STC-1 Proteinexpression in MSZ-Lysaten

Die Proteinexpression von STC-1 in den MSZ wurde zunächst mittels Immunoblotanalysen von MSZ-Lysaten untersucht. In Abbildung 14 sind exemplarisch die Ergebnisse der vergleichenden Immunblotanalyse von leukämischen (n = 5) und gesunden (n = 3) MSZ-Proben dargestellt. In 14A ist jeweils die STC-1 Proteinexpression der einzelnen MSZ-Proben prozentual zur Expression von β -Aktin dargestellt; die Werte gesunder MSZ-Proben sind durch graue Balken, die Werte der leukämischen MSZ durch schwarze Balken repräsentiert. Darunter ist die Membran nach der Behandlung mit den spezifischen Antikörpern gegen STC-1 (oben) und β -Aktin (unten) gezeigt. Erwartungsgemäß zeigte sich bei allen untersuchten MSZ-Proben eine spezifische Proteinbande bei 35 kDa, dem Molekulargewicht von STC-1 und eine weitere Bande bei 42 kDa, dem Molekulargewicht des mitbestimmten β -Aktins. Das Haushalts-Gen β -Aktin ist in jeder Zelle verhältnismäßig gleich stark exprimiert und ermöglichte eine Bestimmung der STC-1 Expression durch den densitometrischen Vergleich der Proteinbanden. Die Mittelwerte der STC-1 Proteinexpression (Angaben ebenfalls in Prozent der Expression von β -Aktin) der gesunden (grauer Balken) bzw. leukämischen MSZ (schwarzer Balken) sind in 14B abgebildet. Dabei konnten insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den MSZ gesunder Spender und den MSZ von Spendern mit AML detektiert werden, es zeigte sich jedoch ein Trend zugunsten einer gesteigerten STC-1 Proteinexpression bei den MSZ der AML-Patienten.

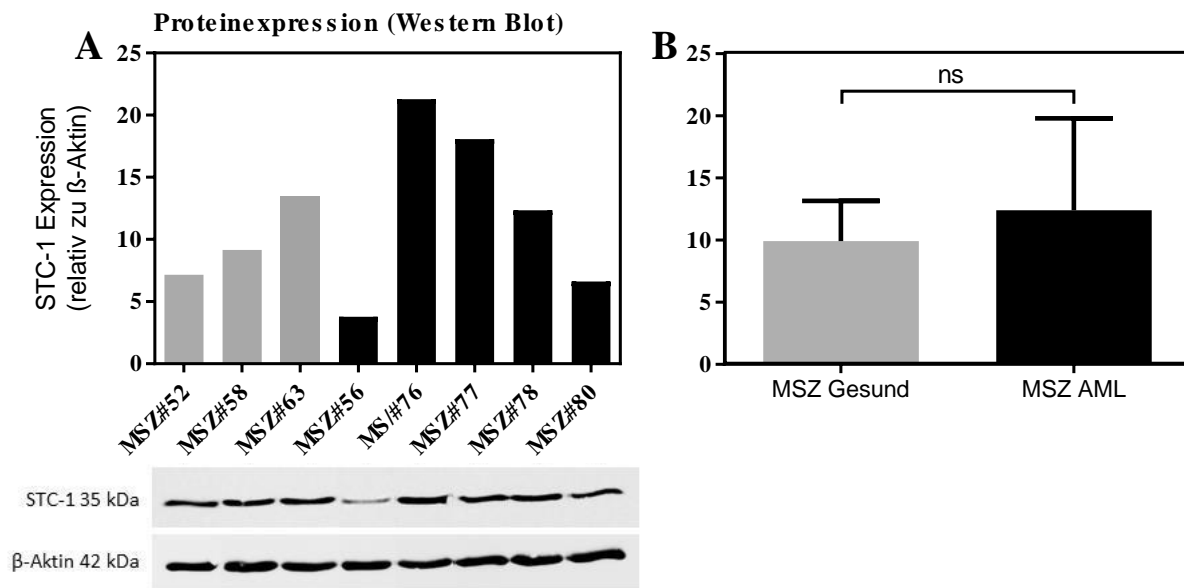


Abb. 14: STC-1 Proteinexpression in MSZ-Lysaten gesunder und leukämischer Spender

Dargestellt ist exemplarisch das Ergebnis der Immunoblotanalyse zur Untersuchung der Expression des Proteins STC-1 in MSZ-Proben gesunder (n=3) und leukämischer (n=5) Spender. A: Einzelwerte der STC-1-Expression in den gesunden (graue Balken) und leukämischen (schwarze Balken) MSZ-Proben. Die Expression wurde jeweils prozentual zur Expression von β -Aktin berechnet. Links unten: spezifische Proteinbanden von STC-1 bei 35 kDa und β -Aktin bei 42 kDa. B: Mittelwerte \pm SEM der STC-1 Proteinexpression in gesunden (grauer Balken) und MSZ von AML-Patienten (schwarzer Balken). Die Signifikanzbestimmung erfolgte unter Verwendung des ungepaarten studentischen t-Tests. ns: nicht signifikant; STC-1: Stanniocalcin-1; MSZ: mesenchymale Stromazellen; AML: akute myeloische Leukämie; kDa: kilo Dalton

5.5.2 STC-1 Proteinexpression in Knochenmarksbiopsien

Zum weiteren Nachweis der STC-1 Proteinexpression wurden immunhistochemische Untersuchungen von Knochenmarksstanzen sowie von MSZ-Cytospinpräparaten durchgeführt und anschließend am Mikroskop dokumentiert.

Die immunhistochemischen Färbungen sollten zudem die Frage klären, ob sich ein Unterschied in der Expression von STC-1 im Knochenmark von Patienten mit AML im Vergleich zu Patienten mit gesundem Knochenmark zeigt. Abbildung 15 zeigt repräsentativ das Ergebnis jeweils einer Färbung an gesundem (linke Bildreihe) und an leukämischem (rechte Bildreihe) Knochenmark. Das oberste Bild zeigt jeweils die mit einem Isotyp-Antikörper gefärbten Präparate, die beiden unteren Bilder zeigen die mit dem STC-1 Antikörper behandelten Präparate. Die Expression von STC-1 ist an der Braunfärbung zu erkennen. Es zeigte sich eine deutlich verstärkte Färbung von STC-1 in den leukämischen Knochenmarksproben im Vergleich zu den Proben gesunder Kontrollen.

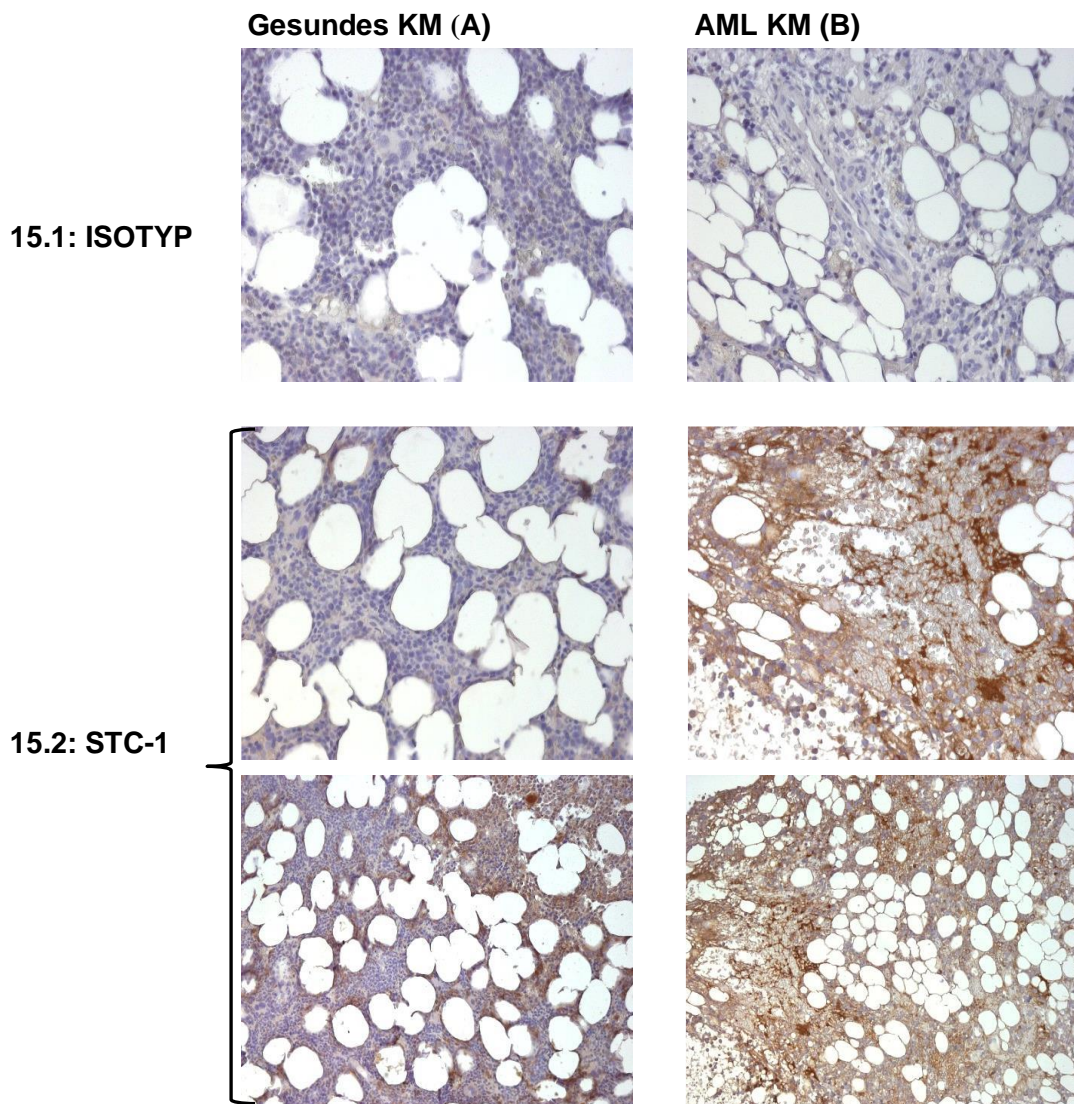


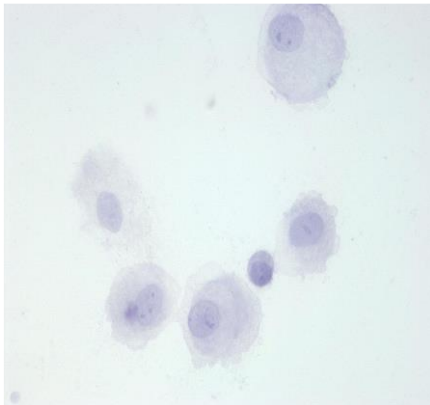
Abb. 15: Immunhistochemische Untersuchung der STC-1 Proteinexpression in der Knochenmarksbiopsie eines hämatologisch gesunden Patienten (A) und eines Patienten mit AML (B)

Es wurde mit spezifischen Antikörpern gegen STC-1 (0,5 µg/ml) bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle (0,5µg/ml) gefärbt und im Durchlichtmikroskop analysiert. STC-1 ist braun angefärbt. A: Aufnahmen der Probe eines hämatologisch gesunden Spenders nach spezifischer Färbung. B: Aufnahmen der Knochenmarksbiopsie eines AML-Patienten nach spezifischer Färbung. 15.1: Isotypkontrolle. 15.2: mit anti-STC-1 gefärbte Präparate. AML: akute myeloische Leukämie; STC-1: Stanniocalcin 1; KM: Knochenmark

5.5.3 STC-1 Proteinexpression in MSZ (*Cytospins*)

Im vorangehenden Versuch konnte gezeigt werden, dass STC-1 im Knochenmark von Leukämiepatienten verstärkt exprimiert ist. Um zu testen, ob STC-1 auch spezifisch in den MSZ exprimiert ist, erfolgten immunhistochemische Untersuchungen von MSZ, welche mittels Zentrifugation auf einem Objektträger fixiert und ebenso wie die Gesamtknochenmarksbiopsien mit einem Antikörper gegen STC-1 gefärbt wurden. Abbildung 16 zeigt exemplarisch je eine lichtmikroskopische Aufnahme von MSZ eines hämatologisch gesunden Spenders, die mit einem Isotyp-Antikörper (16A) bzw. einem STC-1 Antikörper (16B) behandelt wurden. Die STC-1 Expression im Zytoplasma der MSZ konnte anhand der Braunfärbung identifiziert werden. Im Vergleich zur Isotypkontrolle (links) zeigte sich eine deutliche Färbung der mit dem STC-1 Antikörper behandelten MSZ-Präparate. Damit konnte die Expression von STC-1 spezifisch im Zytoplasma der MSZ nachgewiesen werden.

ISOTYP (A)



STC-1 (B)

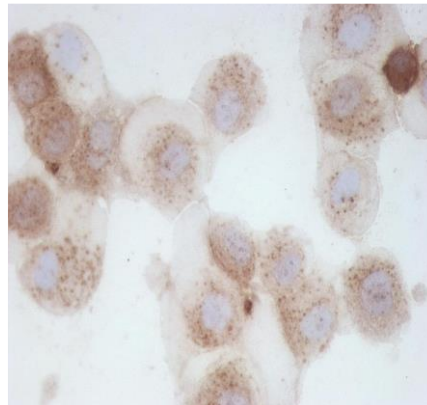


Abb. 16: Immunhistochemische Untersuchung der STC-1 Proteinexpression in MSZ (*Cytospins*)

Es wurden *Cytospins* von MSZ eines hämatologisch gesunden Spenders angefertigt. Dafür wurden die MSZ mithilfe einer Cytozentrifuge auf einem Objektträger fixiert und anschließend mit einem anti-STC-1 Antikörper (0,5 µg/ml; 16B) bzw. einer Isotypkontrolle (0,5 µg/ml; 16A) gefärbt und im Durchlichtmikroskop analysiert. Die STC-1-Expression ist anhand der Braunfärbung erkennbar.

5.6 Sekretion von STC-1 durch MSZ

In der Literatur ist STC-1 als sezerniertes Glykoprotein beschrieben, welches parakrin, d.h. ohne Zwischenschaltung des Blutstroms, auf die Zellen in der Umgebung wirkt. Ob STC-1 auch spezifisch von den MSZ sezerniert wird, ist bislang nur unzureichend untersucht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* die aktive Sezernierung von STC-1 durch MSZ getestet. Dazu wurde die STC-1 Konzentration im Überstand von Monokulturen gesunder MSZ bzw. den MSZ von AML-Patienten mittels ELISA bestimmt. In Abbildung 17 ist das Ergebnis der STC-1-Konzentrationsmessung im Überstand der MSZ-Kulturen von neun gesunden (graue Balken) und zehn leukämischen (schwarze Balken) Spendern graphisch dargestellt. In Abbildung 17A ist die STC-1-Sekretion der einzelnen MSZ Proben gezeigt, in 17B die gemittelte Sekretion von gesunden (grauer Balken) bzw. leukämischen (schwarzer Balken) MSZ. Die Analyse der STC-1 Sekretion durch MSZ ergab eine signifikant ($p = 0,0379$) höhere STC-1 Sekretion der MSZ von AML-Patienten. So betrug die STC-1 Konzentration im Überstand der leukämischen MSZ-Kulturen ($n=10$) $2446 \text{ pg/ml} \pm 408$ pro einer Million MSZ, während die STC-1 Konzentration im Überstand der gesunden MSZ-Kulturen ($n=9$) lediglich $1330 \text{ pg/ml} \pm 258,6$ STC-1 pro einer Million Zellen betrug.

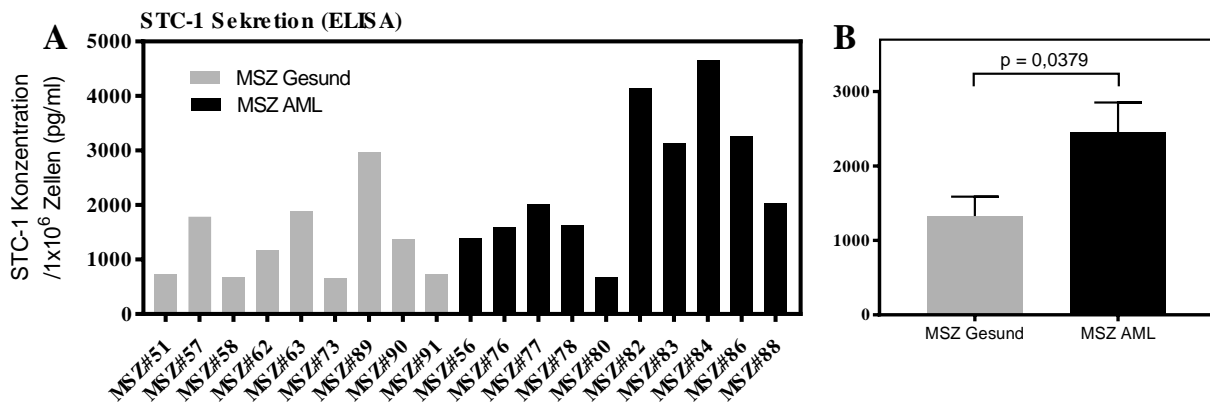


Abb. 17: Aktive Sekretion von STC-1 durch MSZ

Dargestellt ist die STC-1 Konzentration im Zellkulturüberstand von MSZ nach fünf Tagen Monokultur. Es ist jeweils die STC-1 Konzentration (pg/ml) pro 1×10^6 MSZ angegeben. Graue Balken: MSZ-Proben von hämatologisch gesunden Spendern; schwarze Balken: MSZ-Proben von AML-Patienten. A: STC-1 Konzentration der einzelnen MSZ-Proben; B: Mittelwerte \pm SEM gesunder und leukämischer MSZ ($n_{\text{gesund}}=9$; $n_{\text{AML}}=10$; $p = 0,0379$). Signifikanzbestimmung unter Verwendung des ungepaarten studentischen t-Tests. STC-1: Stanniocalcin 1; MSZ: Mesenchymale Stromazellen; AML: Akute Myeloische Leukämie

5.7 Auswirkungen von STC-1 auf AML-Zellen *in vitro*

Zur Untersuchung der spezifischen Wirkung von STC-1 auf AML-Zellen wurden *in vitro* Kulturen von AML-Zellen mit Zugabe von rekombinantem STC-1 durchgeführt. Da in den vorangehenden Versuchen dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass STC-1 von MSZ exprimiert und aktiv sezerniert wird, erfolgten im nächsten Schritt Ko-Kulturen von AML-Zellen und MSZ mit spezifischer Blockade von STC-1 durch einen neutralisierenden Antikörper.

5.7.1 Auswirkungen von rekombinantem STC-1 in der AML-Flüssigkeitskultur

Um die rh-STC-1-Konzentration mit dem maximalen Effekt auf die AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur zu bestimmen, wurden zunächst zwei Vorversuche durchgeführt. Dabei wurden AML-Zellen von zwei unterschiedlichen Spendern mit aufsteigenden Konzentrationen an rekombinantem STC-1 (0,5 ng/ml; 5 ng/ml und 50 ng/ml rh-STC-1) behandelt, für sechs Tage kultiviert und anschließend hinsichtlich des Anteils an apoptotischen Zellen untersucht. Da die Behandlung mit 50 ng/ml rh-STC-1 die Apoptoserate der AML-Zellen um das 2,1-fache minimierte und damit den größten Effekt zeigte, wurden die AML-Kulturen in den drei Folgeversuchen mit 50 ng/ml rh-STC-1 behandelt. Um den spezifischen Effekt von rh-STC-1 nachzuweisen, wurde in der Hälfte der Kulturen zusätzlich ein anti-SCT-1 Antikörper hinzugegeben. Nach fünf bzw. sechs Tagen Kultur erfolgte die Ernte der AML-Zellen. Anschließend wurden die Zellen im FACS hinsichtlich Proliferation, Zellzyklusaktivität und Apoptoserate analysiert. Die Ergebnisse der FACS-Analysen sind in den nächsten Abschnitten aufgeführt.

5.7.1.1 Auswirkungen von rekombinantem STC-1 auf die Zellzyklusprogression von AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur

Nach einer Kulturdauer von fünf Tagen erfolgte die Untersuchung der AML-Zellen hinsichtlich der Zellzyklusprogression. Hierfür wurde der DNA-Gehalt der AML-Zellen im Durchflusszytometer anhand der PI-Fluoreszenz bestimmt und untersucht, ob sich Unterschiede zwischen den unbehandelten und den mit rh-STC-1 bzw. mit rh-STC-1 und anti-STC-1 behandelten AML-Zellen zeigen. Abbildung 18 zeigt repräsentativ die mithilfe der *FlowJo* Software erstellten Diagramme zur Zellzyklusprogression der AML-Zellen eines Spenders nach der Flüssigkeitskultur. Die obere Abbildung zeigt jeweils, dass durch Setzen eines Gates sichergestellt wurde, Zelldebris von der weiteren Analyse auszuschließen. Die

Diagramme der unteren Reihe zeigen jeweils das Ergebnis der Zellzyklusanalyse, wobei der erste Peak den Zellen in der G₀/G₁-Phase, der zweite Peak den Zellen in der G₂/M-Phase und der flache Bereich den Zellen in der S-Phase des Zellzyklus entspricht. Dabei ist zu erkennen, dass der Anteil der AML-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bei den mit rh-STC-1 behandelten (B) wie auch bei den mit rh-STC-1 und anti-STC-1 behandelten Zellen (C) in etwa dem Anteil der Kontrolle bestehend aus unbehandelten AML-Zellen (A) entspricht.

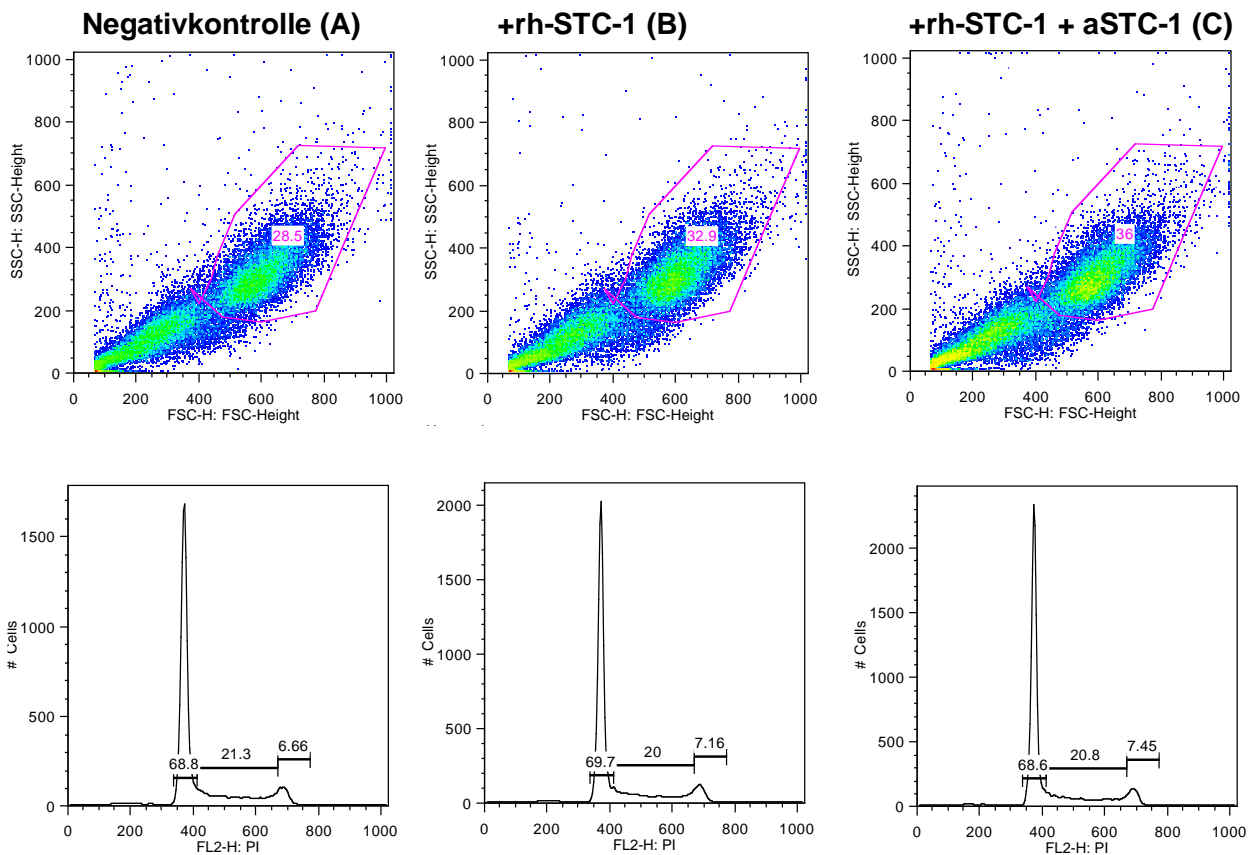


Abb. 18: FACS-Analyse der Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Zellzyklusprogression von AML-Zellen

Dargestellt ist exemplarisch das Ergebnis der FACS-Analysen zur Zellzyklusprogression der AML-Zellen eines Patienten nach fünf Tagen Flüssigkeitskultur. Negativkontrolle (A): unbehandelte AML-Zellen; B: Behandlung mit 50 ng/ml rh-STC-1; C: Behandlung mit 50 ng/ml rh-STC-1 und 0,1 µg/ml anti-STC-1. Obere Reihe: Eingrenzung der zu untersuchenden Zellpopulation; Untere Reihe: Zellzyklusanalyse: PI-Fluoreszenz (x-Achse), Zellzahl (y-Achse). Der 1. Peak entspricht den Zellen mit einfachem DNA Gehalt in der G₀/G₁-Phase, der 2. Peak den Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt in der G₂/M-Phase. Dazwischen liegt der Anteil der Zellen in der Phase der DNA-Replikation (S-Phase). Rh-STC-1: rekombinantes humanes Stanniocalcin 1; aSTC-1: anti Stanniocalcin 1.

Bei der Auswertung wurden die AML-Zellen hinsichtlich des Anteils an Zellen in der G2- und S-Phase des Zellzyklus mit der Kontrolle (unbehandelte AML-Zellen) verglichen. In Abbildung 19 sind die Mittelwerte der drei Flüssigkeitskulturen dargestellt. Verglichen mit der Kontrolle (unbehandelte AML-Zellen) wurde dieser Anteil durch die Behandlung der Zellen mit rh-STC-1 (schwarzer) bzw. mit rh-STC-1 und anti-STC-1 (grauer Balken) nicht signifikant verändert und konnte daher eine durch STC-1 ausgelöste beschleunigte Zellzyklusprogression der AML Zellen nicht eindeutig belegen.

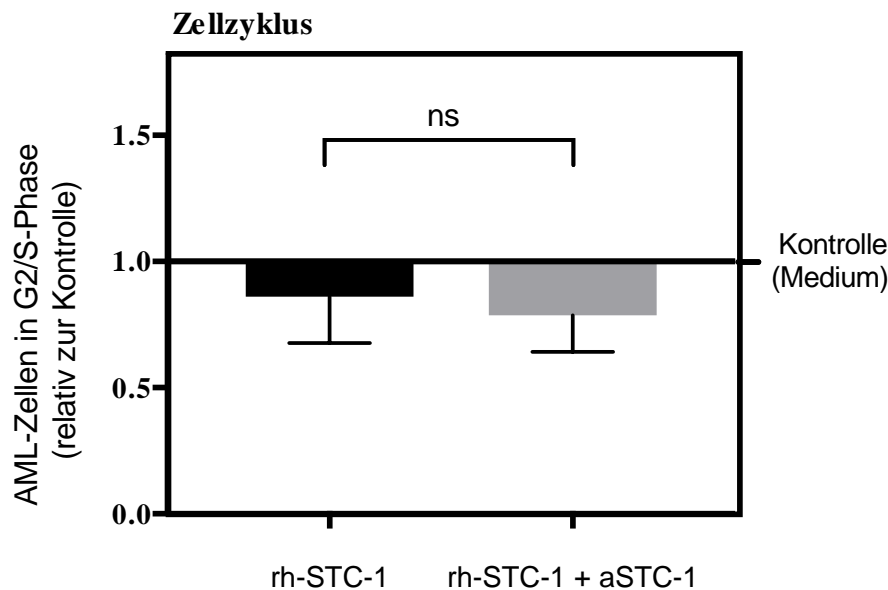


Abb. 19: Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Zellzyklusprogression von AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur

Dargestellt ist die relative Änderung des Anteils an AML-Zellen in der G2- und S-Phase bei den rh-STC-1 behandelten (schwarzer Balken) bzw. den mit rh-STC-1 und anti-STC-1 behandelten AML-Zellen (grauer Balken) im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelten AML-Zellen). Zum Vergleich der Mittelwerte aus den drei Flüssigkeitskulturen wurde der gepaarte studentische t-Test verwendet. AML: akute myeloische Leukämie; rh-STC-1: rekombinantes humanes Stanniocalcin 1; aSTC-1: anti-Stanniocalcin 1; ns: nicht signifikant.

5.7.1.2 Auswirkungen von rekombinatem STC-1 auf die Proliferation von AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur

Die Proliferation der AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur wurde unter Verwendung des *CFSE-Assays* analysiert. Die Zellen wurden vor der Kultur mit dem fluoreszierenden Molekül CFSE behandelt, welches bei jeder Zellteilung zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen aufgeteilt wird. Folglich beträgt die Fluoreszenz der Tochterzellen jeweils genau die Hälfte der Fluoreszenz der Mutterzelle. In Abbildung 20 sind repräsentativ anhand eines Patienten die Ergebnisse der FACS-Analysen zur Proliferation der AML-Zellen nach der Flüssigkeitskultur dargestellt. In der oberen Reihe ist jeweils gezeigt, wie durch Setzen eines Gates die

AML-Zellpopulation eingegrenzt wurde und Zelldebris für die weitere Analyse ausgeschlossen wurden. Die untere Reihe zeigt jeweils die Messung der CFSE-Intensität, anhand derer die Zellen in sieben unterschiedlich stark proliferierende Zellgenerationen (G0-G6) eingeteilt wurden. Dabei befindet sich ganz links die Zellpopulation mit dem geringsten CFSE-Gehalt und damit der stärksten Proliferationsrate (G6), ganz rechts befinden sich die Zellen mit dem höchsten CFSE-Gehalt und damit der geringsten Proliferationsrate (G0). Wie der Abbildung zu entnehmen ist, unterschied sich die Proliferationsrate der mit rh-STC-1 (B, mittlere Spalte) bzw. der zeitgleich mit rh-STC-1 und anti-STC-1 behandelten AML-Zellen (C, rechte Spalte) nur geringfügig von der Proliferationsrate der unbehandelten AML-Zellen (A, linke Spalte).

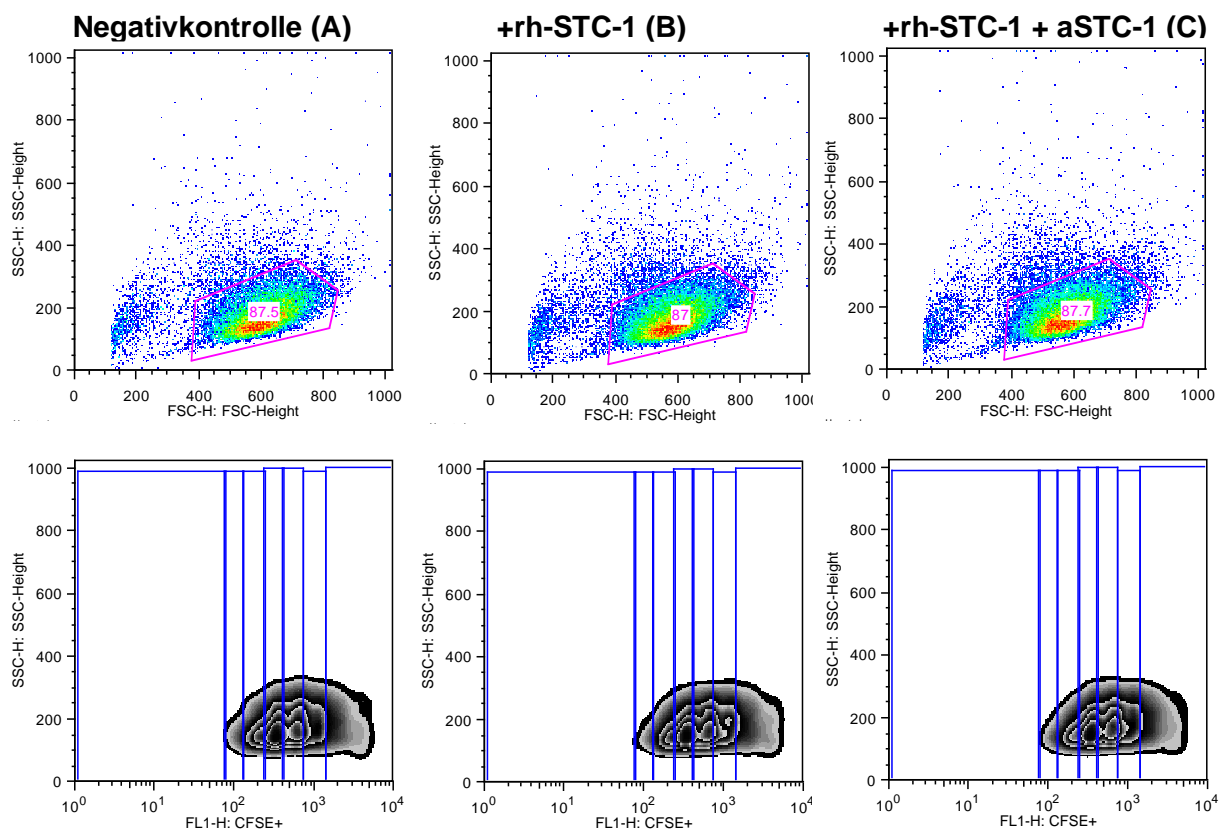


Abb. 20: FACS-Analyse der Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Proliferation von AML-Zellen

Dargestellt ist exemplarisch das Ergebnis der FACS-Analysen zur Zellproliferation der AML-Zellen eines Patienten nach fünf Tagen Flüssigkeitskultur. Negativkontrolle (A): unbehandelte AML-Zellen; B: Behandlung mit 50 ng/ml rh-STC-1; C: Behandlung mit 50 ng/ml rh-STC-1 und 0,1 µg/ml anti-STC-1. Obere Reihe: Eingrenzung der zu untersuchenden Zellpopulation; Untere Reihe: Einteilung der Zellen in sieben unterschiedlich stark proliferierende Generationen G0-G6 (G0: höchster CFSE-Gehalt = geringste Proliferationsaktivität; G6: geringster CFSE-Gehalt = stärkste Proliferationsaktivität) eingeteilt. Rh-STC-1: rekombinantes humanes Stanniocalcin 1; aSTC-1: anti Stanniocalcin 1.

Abbildung 21 zeigt die relative Proliferationsaktivität der mit rh-STC-1 (schwarze Balken) bzw. zeitgleich mit anti-STC-1 behandelten AML-Zellen (graue Balken) im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte AML-Zellen). Wie aus dem Diagramm hervorgeht, wirkte sich weder die alleinige Gabe von rh-STC-1, noch die zusätzliche Blockade durch einen anti-STC-1 Antikörper signifikant auf die Proliferationsaktivität der AML-Zellen aus; somit konnte ein förderlicher Effekt von rh-STC-1 auf die Proliferation von AML-Zellen nicht nachgewiesen werden.

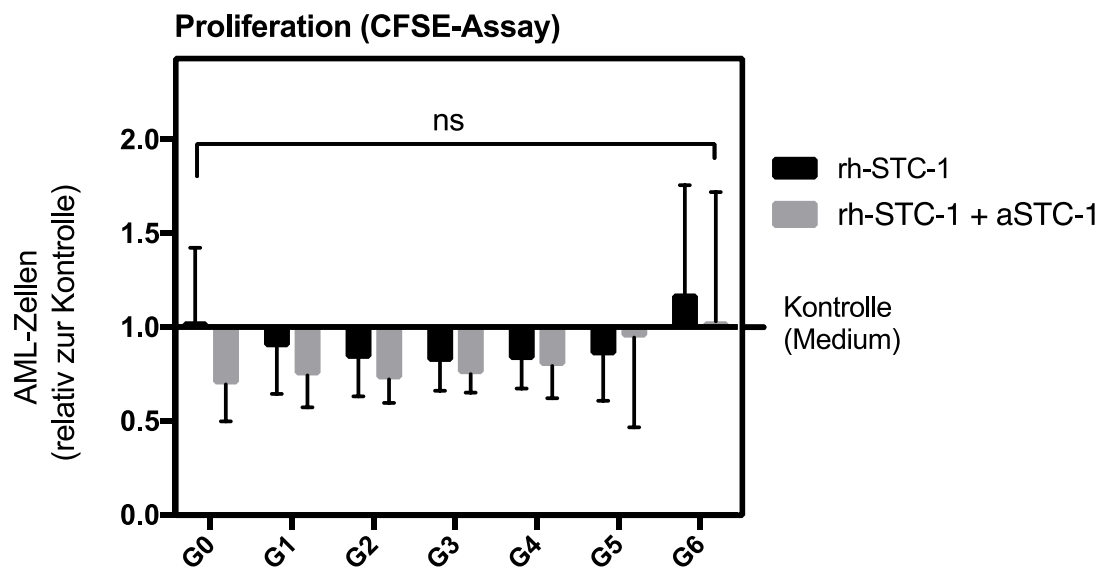


Abb. 21: Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Proliferation von AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur

Das Diagramm zeigt die relative Änderung der Proliferationsaktivität der mit rh-STC-1 behandelten AML-Zellen (schwarze Balken) bzw. der mit rh-STC-1 und aSTC-1 behandelten AML-Zellen (graue Balken) im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte AML-Zellen). Zum Vergleich der Mittelwerte der drei Flüssigkeitskulturen wurde der gepaarte studentische t-Test verwendet. AML: akute myeloische Leukämie; rh-STC-1: rekombinantes humanes Stanniocalcin 1; aSTC-1: anti-Stanniocalcin 1; ns: nicht signifikant.

5.7.1.3 Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Apoptose von AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur

Die Auswirkungen von rh-STC-1 bzw. anti-STC-1 auf die Apoptose der AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur wurden mittels Färbung der Zellen mit Annexin V und PI und anschließenden FACS-Analysen untersucht. Abbildung 22 zeigt repräsentativ das Ergebnis der FACS-Analysen der unterschiedlich behandelten AML-Zellen eines Patienten nach sechs Tagen Flüssigkeitskultur. In der oberen Reihe ist jeweils dargestellt, wie durch Setzen eines Gates Zelldebris von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde, in der Mitte ist die Eingrenzung der Zellen auf AML-Zellen (CD45⁺ Zellen) gezeigt und in der unteren Reihe ist die Annexin V-Fluoreszenz gegen die PI-Fluoreszenz aufgetragen. Durch die Bestimmung der Annexin-V und PI-Fluoreszenz konnte der Anteil an vitalen [linker unterer Quadrant (Annexin-V-negativ, PI-negativ)], apoptotischen [rechter unterer Quadrant (Annexin-V-positiv, PI-negativ)] und nekrotischen [rechter oberer Quadrant (Annexin-V-positiv, PI-positiv)] AML-Zellen bestimmt werden. Die Apoptoserate der AML-Zellen nach der Flüssigkeitskultur betrug bei den unterschiedlich behandelten AML-Zellen jeweils etwa ein Prozent und war damit bei den mit rh-STC-1 behandelten AML-Zellen (mittlere Spalte, B) und den zeitgleich mit rh-STC-1 und anti-STC-1 behandelten AML-Zellen in etwa gleich hoch wie bei den unbehandelten AML-Zellen (linke Spalte, A).

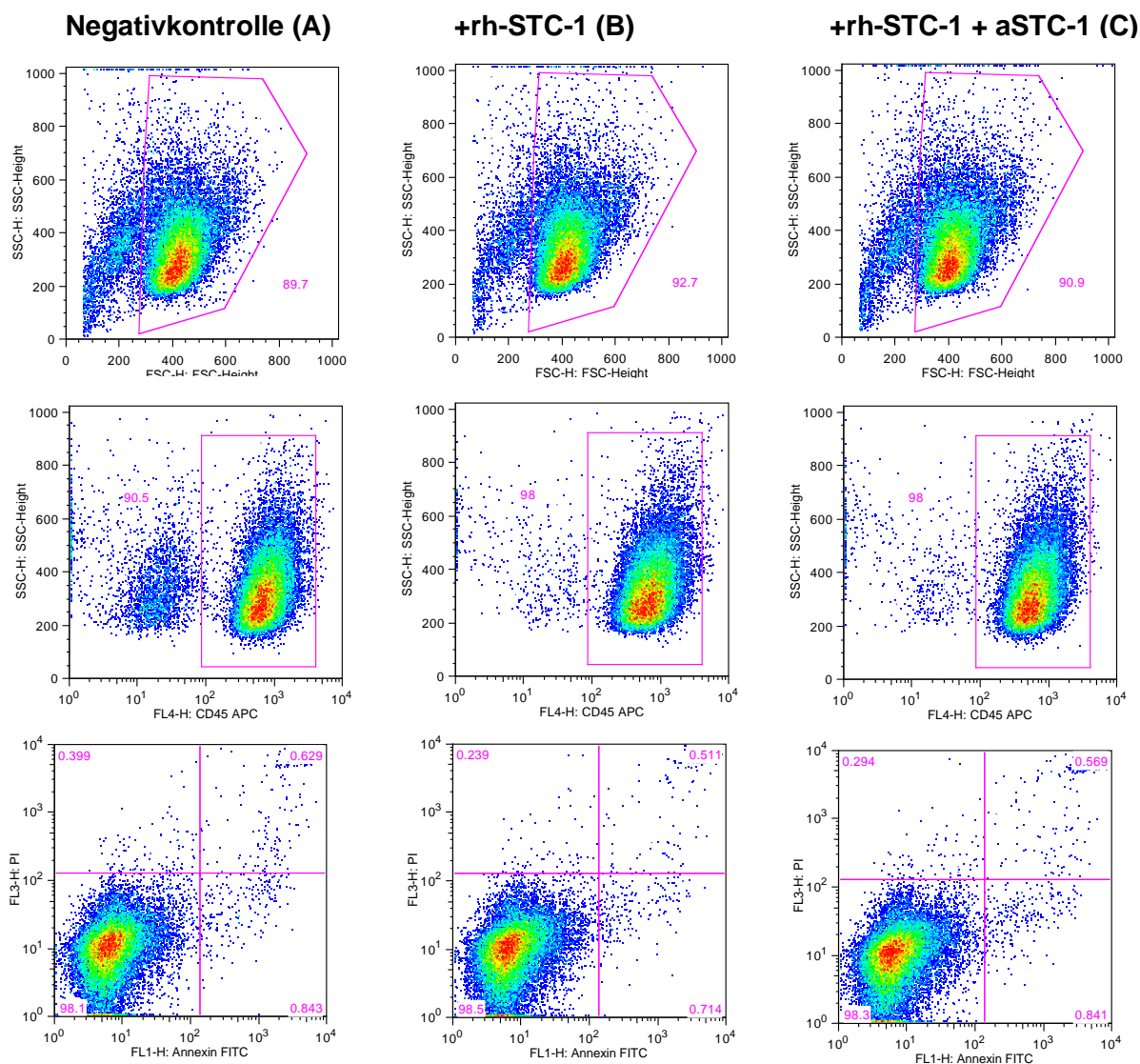


Abb. 22: FACS-Analyse der Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Apoptoserate von AML-Zellen

Dargestellt ist exemplarisch das Ergebnis der FACS-Analysen zur Apoptoserate der AML-Zellen eines Patienten nach sechs Tagen Flüssigkeitskultur. Negativkontrolle (A): unbehandelte AML-Zellen; B: Behandlung mit 50 ng/ml rh-STC-1; C: Behandlung mit 50 ng/ml rh-STC-1 und 0,1 µg/ml anti-STC-1. Obere Reihe: Eingrenzung der zu untersuchenden Zellpopulation durch Ausschluss von Zelldebris; mittlere Reihe: Eingrenzung auf CD45-positive Zellen; untere Reihe: Annexin V-Fluoreszenz (x-Achse), PI-Fluoreszenz (y-Achse): vitale Zellen: Annexin V-negativ, PI-negativ (Quadrant links unten); nekrotische Zellen: Annexin V-positiv, PI-positiv (Quadrant rechts oben); apoptotische Zellen: Annexin V-positiv, PI-negativ (Quadrant rechts unten). Rh-STC-1: rekombinantes humanes Stanniocalcin 1; aSTC-1: anti Stanniocalcin 1

In Abbildung 23 ist die mittlere Änderung der Apoptoserate der mit rh-STC-1 behandelten (schwarzer Balken) bzw. zeitgleich mit anti-STC-1 behandelten AML-Zellen (grauer Balken) im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte AML-Zellen) dargestellt. Die Gabe von rh-STC-1 beeinflusste den Anteil an apoptotischen AML-Zellen nicht signifikant, während die zeitgleiche Behandlung mit anti-STC-1 den Anteil geringfügig, jedoch ebenfalls nicht signifikant reduzierte.

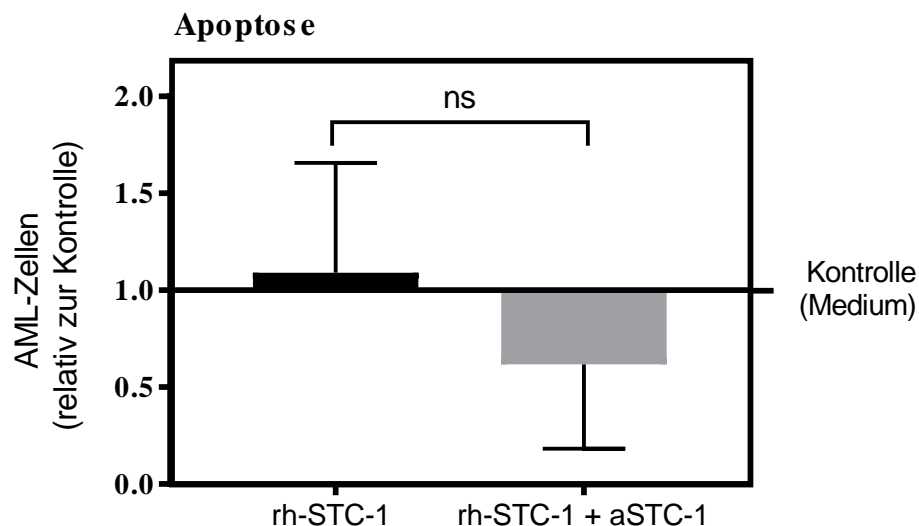


Abb. 23: Auswirkungen von rh-STC-1 auf die Apoptose von AML-Zellen in der Flüssigkeitskultur

Dargestellt ist relative Änderung der Apoptoserate der rh-STC-1 behandelten AML-Zellen (schwarze Balken) bzw. der mit rh-STC-1 und aSTC-1 behandelten AML-Zellen (graue Balken) im Vergleich zur Kontrolle aus unbehandelten AML-Zellen. Zum Vergleich der Mittelwerte aus den drei Flüssigkeitskulturen wurde der gepaarte studentische t-Test verwendet. AML: akute myeloische Leukämie; rh-STC-1: rekombinantes humanes Stanniocalcin 1; aSTC-1: anti-Stanniocalcin 1; ns: nicht signifikant.

5.7.2 Auswirkungen der STC-1 Blockade in der Ko-Kultur von AML-Zellen und MSZ

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass MSZ eine wichtige Rolle im Mikromilieu des Knochenmarks spielen und zur Progression von Leukämien beitragen können.¹⁰⁴ Da durch die Versuche dieser Arbeit bereits nachgewiesen werden konnte, dass STC-1 von den MSZ exprimiert und aktiv sezerniert wird, wurden im nächsten Schritt *in vitro* Kulturen von AML-Zellen (n = 3) und MSZ durchgeführt, wobei in der Hälfte der Kulturen ein anti-STC-1 Antikörper zugegeben wurde, um den spezifischen Effekt von STC-1 darstellen zu können. Zur Berücksichtigung von potentiellen, durch die Leukämie induzierten Veränderungen in den MSZ, wurde dabei jeweils die Hälfte der AML-Zellen mit leukämischen und die andere Hälfte mit gesunden MSZ in Kultur gebracht. Die Untersuchung

der AML-Zellen hinsichtlich Zellproliferation und Apoptoserate erfolgte analog zur Analyse der AML-Zellen nach der Flüssigkeitskultur.

5.7.2.1 Auswirkungen der STC-1 Blockade auf die Proliferation von AML-Zellen in der Ko-Kultur mit MSZ

Nach der fünftägigen Kultivierung mit MSZ erfolgte die Analyse der AML-Zellen hinsichtlich der Proliferationsaktivität. Dafür wurden die AML-Zellen anhand der CFSE-Fluoreszenz in sieben unterschiedlich stark proliferierende Zellgenerationen (G0-G6) eingeteilt. Anschließend wurde die Proliferation der AML-Zellen in der mit anti-STC-1 behandelten Ko-Kultur mit der Kontrolle (Ko-Kultur ohne STC-1 Blockade) verglichen. Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, bewirkte die STC-1 Blockade keine signifikante Beeinflussung der Proliferation der AML-Zellen, unter anderem aufgrund von spenderabhängigen Einflüssen konnten auch keine eindeutigen Unterschiede in der Proliferation der AML-Zellen, die mit gesunden MSZ (graue Balken) und derjenigen von AML-Zellen, welche mit leukämischen MSZ (schwarze Balken) ko-kultiviert worden waren, beobachtet werden.

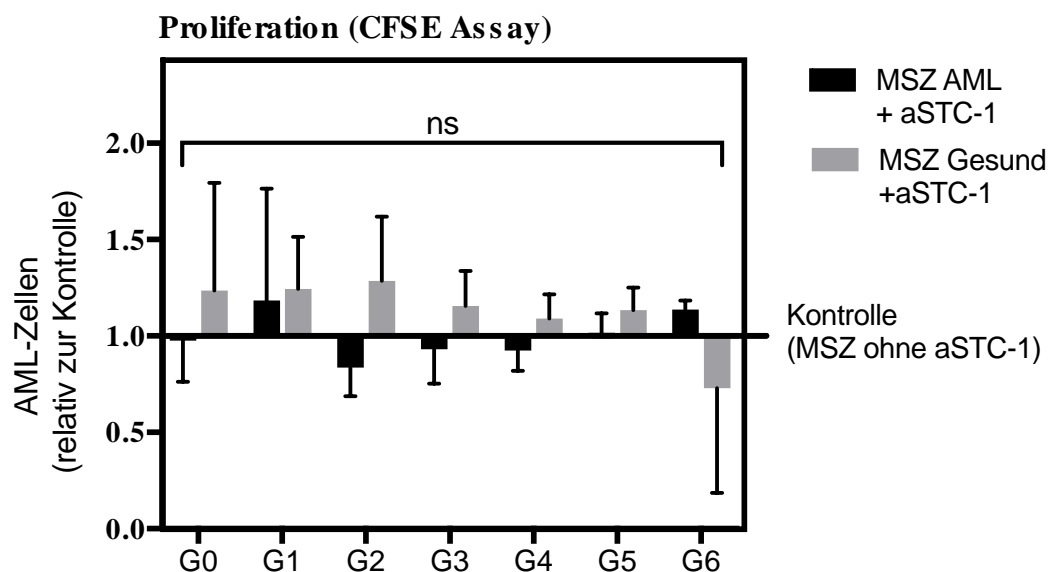


Abb. 24: Auswirkungen der STC-1-Blockade auf die Proliferation von AML-Zellen in der Ko-Kultur mit MSZ

Das Diagramm zeigt die relative Änderung der AML-Proliferationsaktivität (Anteil der Zellen in den Generationen G0-G6) in der Ko-Kultur mit STC-1 Blockade im Vergleich zur Kontrolle (Ko-Kultur ohne STC-1 Blockade). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der drei Ko-Kultur-Versuche. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der zweiseitig gepaarte studentische t-Test verwendet. AML: akute myeloische Leukämie; MSZ: multipotente mesenchymale Stromazellen; rh-STC-1: rekombinantes humanes Stanniocalcin 1; aSTC-1: anti-Stanniocalcin 1; ns: nicht signifikant.

5.7.2.2 Auswirkungen der STC-1-Blockade auf die Apoptose von AML-Zellen in der Ko-Kultur mit MSZ

Ohkouchi et al. konnten nachweisen, dass von den MSZ sezerniertes STC-1 *in vitro* die Apoptose von Lungenkarzinomzellen reduziert, und dieser Effekt durch die Blockade von STC-1 durch einen anti-STC-1 Antikörper inhibiert werden kann. Um zu testen, ob STC-1 eine ähnliche Wirkung auf AML-Zellen ausübt, wurden die AML-Zellen nach sechs Tagen Ko-Kultur mit MSZ und spezifischer STC-1 Blockade hinsichtlich der Apoptoserate untersucht. Dafür wurde der Anteil an apoptotischen Zellen anhand der im Durchflusszytometer gemessenen Intensität von Annexin-V und PI bestimmt. Anschließend wurde die Apoptoserate in der mit anti-STC-1 behandelten Ko-Kultur mit der Kontrolle (Ko-Kultur ohne STC-1 Blockade) verglichen. Wie der Abbildung 25 zu entnehmen ist, bewirkte die STC-1 Blockade eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Reduktion des Anteils an apoptotischen AML-Zellen. Dies galt sowohl für die Ko-Kulturen mit MSZ knochenmarksgesunder Spender (graue Balken) als auch für die Ko-Kulturen mit MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten (schwarze Balken).

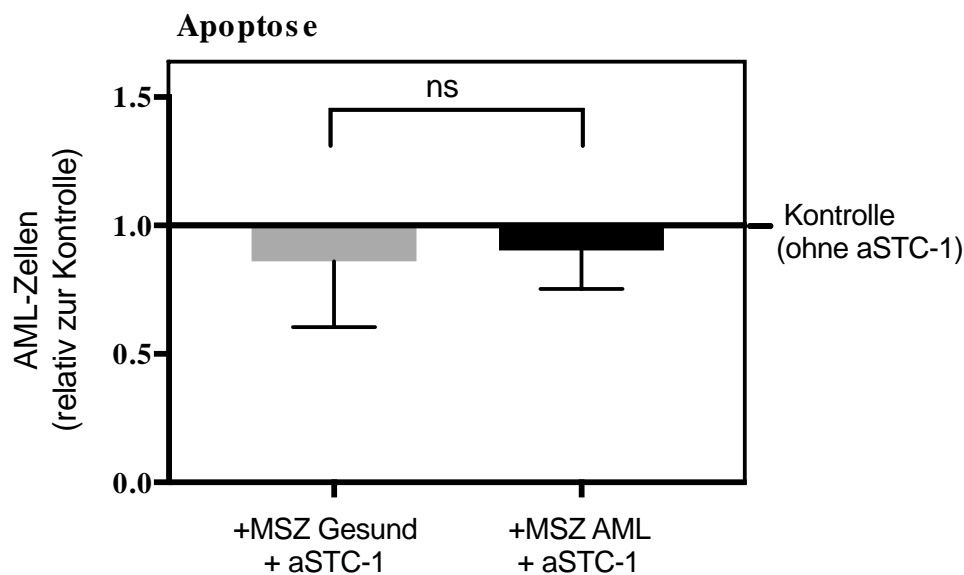


Abb. 25: Auswirkungen der STC-1 Blockade auf die Apoptoserate von AML-Zellen in der Ko-Kultur mit MSZ

Das Diagramm zeigt die relative Änderung des Anteils an apoptotischen AML-Zellen in der Ko-Kultur mit STC-1 Blockade im Vergleich zur Kontrolle (Ko-Kultur ohne STC-1 Blockade). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der drei Ko-Kultur-Versuche. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der zweiseitig gepaarte studentische t-Test verwendet. AML: akute myeloische Leukämie; MSZ: multipotente mesenchymale Stromazellen; rh-STC-1: rekombinantes humanes Stanniocalcin 1; aSTC-1: anti-Stanniocalcin 1; ns: nicht signifikant.

Insgesamt erzielte der Versuch der Blockade des von den MSZ sezernierten Proteins STC-1 durch die Zugabe eines anti-STC-1 Antikörpers in den drei durchgeführten Ko-Kultur-Versuchen keine relevante Änderung von Proliferationsaktivität und Apoptoserate der AML-Zellen. Dies galt sowohl für die Ko-Kulturen von AML-Zellen mit MSZ von hämatologisch gesunden Patienten, als auch für die Ko-Kulturen von AML-Zellen mit MSZ von AML-Patienten.

5.8 Expression von STC-1 in NH-MSZ (Mikroarray-Analyse)

Da die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen die verstärkte Expression von STC-1 in leukämischen MSZ nicht bestätigen konnten, erfolgte eine erneute Analyse des Transkriptoms von leukämischen und gesunden MSZ. Statt DMEM-MSZ, wie bei der im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Analyse, wurden nun NH-MSZ analysiert, da diese auch für die weiteren STC-1 Expressionsanalysen und die *in vitro* Kulturen in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die Untersuchung der in NH-Medium kultivierten MSZ ergab keine signifikant ($p = 0,084$) höhere Expression von STC-1 in den MSZ von AML-Patienten verglichen mit den MSZ knochenmarksgesunder Spender. In Tabelle 10 sind die Gene mit der stärksten Über- bzw. Unterexpression in leukämischen MSZ aufgelistet. Wie aus der Tabelle hervorgeht, war STC-1 (in roter Schrift) bei den NH-MSZ von AML-Patienten lediglich 1,4-fach, d.h. nicht signifikant, höher exprimiert als in den MSZ von hämatologisch gesunden Spendern. Dies deutet darauf hin, dass bestimmte Faktoren des NH-Mediums das Genexpressionsprofil der leukämischen MSZ entscheidend verändern und damit die Überexpression von STC-1 in den leukämischen MSZ unterdrücken könnten.

Tab. 10: Unterschiede im Genexpressionsprofil von gesunden und AML-MSZ (NH-Medium)

| Genbezeichnung | Abkürzung | MSZ AML vs. MSZ Gesund |
|---|------------------|-------------------------------|
| endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 | ERAP2 | 6,01 |
| cystatin SA | CST2 | 4,95 |
| apolipoprotein D | APOD | 4,35 |
| STEAP family member 4 | STEAP4 | 3,56 |
| platelet-derived growth factor receptor-like | PDGFRL | 3,47 |
| prolactin-induced protein | PIP | 3,37 |
| histone cluster 1, H2bm | HIST1H2BM | -3,68 |
| cancer susceptibility candidate 5 | CASC5 | -3,85 |
| family with sequence similarity 111, member B | FAM111B | -4,10 |
| histone cluster 1, H3j | HIST1H3J | -4,22 |
| zinc finger protein 257 | ZNF257 | -4,24 |
| histone cluster 1, H2bi | HIST1H2BI | -4,52 |
| stanniocalcin 1 | STC-1 | 1,41 |

Aufgelistet sind jeweils die sechs Gene mit der stärksten Über- bzw. Unterexpression in leukämischen MSZ (n=5) verglichen mit MSZ gesunder Spender (n=4). Die für die Analyse verwendeten MSZ wurden in NH-Medium kultiviert. Angegeben ist der Wert, um den sich die Expression in den leukämischen von der Expression in den gesunden MSZ unterscheidet. MSZ: multipotente mesenchymale Stromazellen; AML: akute myeloische Leukämie.

6 Diskussion

Die bereits 1978 von Schofield entdeckte Stammzellnische im Knochenmark nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation von HSZ ein.^{13,16,32,46,105} Veränderungen in der Nische stören die physiologischen Abläufe im Knochenmark und können so zur Entstehung maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems beitragen. Die vorliegende Dissertation hatte zum Ziel, die Bedeutung der Stammzellnische im Knochenmark und dabei insbesondere die Bedeutung der MSZ in der Pathogenese der AML zu untersuchen. Im Mittelpunkt stand die Untersuchung von STC-1, einem von den MSZ sezernierten Protein.

6.1 Isolierung und primäre Kultivierung von MSZ

Für die Experimente dieser Arbeit wurden MSZ aus Knochenmarksproben isoliert und *in vitro* kultiviert. Die Kultur erfolgte in DMEM und parallel in NH-Medium, welches eine speziell für die Expansion von MSZ entwickelte Zytokin-Zusammensetzung enthält. Sowohl die MSZ von hämatologisch gesunden Spendern (n = 3) als auch die MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten (n = 5) zeigten ein für ihren Zelltyp charakteristisches längliches Zytoplasma mit spindelförmigen Zellausläufern. Interessanterweise war die Expansionszeit der NH-MSZ kürzer und zugleich die Zellausbeute deutlich höher als bei den DMEM-MSZ. Dies spricht für eine deutlich stärkere Potenz des NH-Mediums. Der Vergleich von leukämischen und gesunden MSZ ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Zellmorphologie und Expansionszeit. Im Gegensatz dazu zeigen Vordaten unserer Arbeitsgruppe funktionelle Unterschiede zwischen MSZ aus dem KM von AML Patienten und MSZ aus dem KM von hämatologisch gesunden Kontrollen. Auch Geyh und Kollegen beobachteten eine gestörte Wachstumsarchitektur bei MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten.¹⁰⁶ Ferner beobachteten sie bei den von ihnen kultivierten leukämischen MSZ deutliche Abweichungen vom normalen, für MSZ charakteristischen Phänotyp.¹⁰⁶ Im Gegensatz zu den Befunden der vorliegenden Arbeit, dass sich leukämische und gesunde MSZ nicht signifikant hinsichtlich der Expansionszeit unterscheiden, wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe eine signifikant kürzere Expansionszeit von gesunden MSZ beobachtet (Daten noch nicht publiziert). Eine Ursache für diese abweichenden Ergebnisse könnte zum einen die geringere Stichprobengröße (fünf leukämische MSZ-Proben, drei Proben knochenmarksgesunder Spender) in der vorliegenden Arbeit sein. Um eine valide Aussage bezüglich etwaigen Unterschieden in der Expansionsdauer von leukämischen und gesunden

MSZ treffen zu können, bedarf es daher der Untersuchung weiterer MSZ-Proben. Überdies belegen die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede zwischen den NH-MSZ und den DMEM-MSZ eine signifikante Beeinflussung der MSZ durch das für die Expansion und Kultur verwendete Nährmedium. Zurückzuführen ist diese Diskrepanz zwischen NH-MSZ und DMEM-MSZ mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die spezielle, jedoch unbekannte Zytokin-Zusammensetzung des NH-Mediums. Bisher fehlt es jedoch an Studien, die sich mit den Auswirkungen unterschiedlicher Nährmedien auf den Phänotyp und die Expansionsgeschwindigkeit von MSZ eingehend befassen.

6.2 Funktionelle Charakterisierung von MSZ

Eine Ursache für divergierende Erkenntnisse bezüglich des Stellenwerts und der Auswirkungen von MSZ auf die hämatopoetischen Zellen im Knochenmark lag lange Zeit in funktionellen Unterschieden der für die Experimente verwendeten MSZ.⁵² Um diesen Einflussfaktor zu begrenzen, definierte die ISCT im Jahr 2006 Minimalkriterien für MSZ.^{53,54} Diese wurden von allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSZ erfüllt. So konnte in der durchflusszytometrischen Untersuchung der expandierten MSZ die Expression von CD105, CD29, CD73, CD44 und CD90 sowie das Fehlen der Expression der hämatologischen Marker CD45 und CD34 nachgewiesen werden. Daneben konnte bei allen isolierten MSZ die multipotente Differenzierungsfähigkeit in Knorpel-, Knochen-, und Fettzellen gezeigt werden. Sowohl bezüglich des Immunphänotyps, als auch bezüglich des Differenzierungspotentials ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten und den MSZ aus dem Knochenmark von hämatologisch gesunden Probanden. Auch die Verwendung unterschiedlicher Nährmedien (NH-Medium und DMEM-Medium) beeinflusste weder das Differenzierungspotential noch die Ausprägung der von der ISCT geforderten Oberflächenmarker der MSZ.

6.3 STC-1 Expression im Knochenmark und den MSZ von AML-Patienten und hämatologisch gesunden Spendern

Im Anschluss an die Charakterisierung der aus Knochenmarksproben isolierten MSZ erfolgte der Vergleich der STC-1 Expression in den gesunden und leukämischen MSZ. STC-1 ist ein vermutlich anti-apoptotisch wirkendes Glykoprotein mit vielfältigen Effekten, deren Ausmaß noch immer nicht vollständig geklärt ist. In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass STC-1 durch Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette die Resistenz von Zellen gegenüber hypoxischer Schädigung verbessert.^{99,107,108} Basierend auf dem von Otto Warburg postulierten Konzept der Karzinogenese durch die bevorzugt fermentative, d.h. nicht-oxidative Energiegewinnung¹⁰⁹ von Krebszellen könnte STC-1 durch die Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies Tumorzellen zu einem gesteigerten Überleben in Sauerstoffmangelsituationen verhelfen. So wurde STC-1 bereits in Zusammenhang mit der Entstehung und Progression von soliden Tumoren genannt. Chang et al. zeigten 2015 in einem Mausmodell, dass STC-1 die Proliferationsrate und das Metastasierungspotential einer Brustkrebszelllinie steigert.⁹⁷ Ähnliches berichten Ohkouchi und Kollegen bei der *in vitro* Untersuchung der Effekte von STC-1 auf eine Bronchialkarzinomzelllinie.⁹⁹ Evidenz für eine mögliche Rolle von STC-1 in der Pathogenese von Tumorerkrankungen liefern zudem klinische Daten, die eine signifikant erhöhte Konzentration von STC-1 im peripheren Blut von Patienten mit Adenokarzinom nachweisen.⁹⁸ In den Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen wurde STC-1 unter anderem durch klinische Daten von Tohmiya et al. 2004 gebracht. Sie zeigten, dass ein erhöhtes STC-1-Level bei AML-Patienten mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Rezidivrate assoziiert ist.¹⁰¹ In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine mögliche Rolle von STC-1 in der Pathogenese der AML untersucht. In einer Genexpressionsanalyse von Knochenmarks-MSZ konnte STC-1 als Gen mit der stärksten Über-Expression (3,3-fach höher) bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse liefern bereits erste Hinweise, dass STC-1 ein Kandidat-Gen mit potentieller Beteiligung in der Pathogenese der AML ist, was in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht wurde. Da gezeigt werden konnte, dass ein aberrantes Mikromilieu im Knochenmark mitverantwortlich für die Entstehung und Progression von hämatologischen Erkrankungen wie der AML sein kann^{58,104}, wurde der Fokus der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung der Expression von STC-1 im Knochenmarksstroma und dabei insbesondere in den MSZ, einer zentralen Population in der Stammzellnische gelegt. Mithilfe von

immunhistochemischen Färbungen von Knochenmarksstanzen konnten wir zunächst zeigen, dass STC-1 in relevanter Menge im Knochenmark exprimiert ist und der Gehalt von STC-1 im Knochenmark von AML-Patienten deutlich höher ist als bei Vergleichspräparaten von gesunden Spendern. Dies deutet bereits darauf hin, dass STC-1 an der Entstehung der AML beteiligt sein könnte. Die Bestätigung, dass STC-1 auch wirklich von den MSZ gebildet wird, gelang anschließend durch immunhistochemische Färbungen von *Cytospins*. Die Expression von STC-1 in den MSZ, einer zentralen Population in der hämatopoetischen Stammzellnische, erhärtet die Hypothese, dass ein aberrantes Mikromilieu im Knochenmark die Entstehung und Progression der AML begünstigen kann. Analog zu unseren Ergebnissen konnten Du et al. anhand von immunhistochemischen Färbungen von Lungengewebschnitten zeigen, dass STC-1 in tumorhaltigem Lungengewebe deutlich stärker exprimiert ist als in den Vergleichspräparaten von gesunden Spendern.¹¹⁰ Um die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen weiter zu bestätigen, analysierten wir die Expression von STC-1 in den MSZ auf mRNA-, Protein- und humoraler Ebene. Dabei konnte zwar eine signifikant erhöhte STC-1 Sekretion der leukämischen MSZ im Vergleich zu den gesunden MSZ bestätigt werden, interessanterweise ging dies jedoch nicht mit einer erhöhten mRNA-Expression von STC-1 einher. Ebenso zeigten sich in Western-Blot Untersuchungen zur Proteinexpression von STC-1 in den MSZ keine signifikanten Unterschiede zwischen den MSZ von AML-Patienten und den MSZ von Spendern mit gesundem Knochenmark. Ohkouchi und Kollegen führten ebenfalls *in vitro*-Analysen zur Expression von STC-1 in MSZ durch.⁹⁹ Sie verglichen dabei jedoch unbehandelte MSZ mit MSZ, die durch 24-stündige Inkubation in einer H₂O₂-haltigen Lösung geschädigt wurden und fanden einen deutlich höheren STC-1-Gehalt in den mit H₂O₂ behandelten MSZ.⁹⁹ Analog dazu berichten Nguyen et al. von einer Zunahme der STC-1 Expression unter hypoxischen Bedingungen sowie einer um den Faktor 40 erhöhten mRNA-Menge von STC-1 in Zellen mit H₂O₂ Exposition.⁹³ Diese Befunde legen nahe, dass nahezu ausschließlich beschädigte Tumorzellen die sie umgebenden MSZ zu einer forcierten STC-1 Produktion anregen können. Dass in der vorliegenden Arbeit jedoch lediglich native, d.h. unbehandelte MSZ untersucht wurden, stellt daher einen Erklärungsansatz für die insgesamt niedrigere STC-1 Expression in den MSZ dar. Der Vergleich der STC-1 Expression in gesunden und leukämischen MSZ ergab entgegen unseren Erwartungen keine signifikant unterschiedlichen Werte. Da die Gesamtheit der Versuche in der vorliegenden Arbeit mit NH-MSZ durchgeführt wurde, die initiale *Microarray*-Analyse zum Vergleich des Transkriptoms gesunder und leukämischer MSZ jedoch mit DMEM-MSZ durchgeführt

worden war, wiederholten wir die Analyse mit NH-MSZ. In Einklang mit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten mRNA- und Proteinexpression von STC-1 in den NH-MSZ ergab die Analyse des Genexpressionsprofils von NH-MSZ im Gegensatz zu den initial untersuchten DMEM-MSZ keine signifikant höhere Expression von STC-1 in den leukämischen MSZ. Diese kontroversen Befunde sind ein Anzeichen dafür, dass Faktoren, wie z.B. die Zusammensetzung des Nährmediums Eigenschaften und Funktionen der MSZ maßgeblich beeinflussen können. Bestimmte Zytokine des NH-Mediums könnten Veränderungen der leukämischen MSZ kompensieren und erklären, warum die Expression von STC-1 in leukämischen NH-MSZ im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nicht erhöht ist. Zudem konnte in den leukämischen Knochenmarkspräparaten eine erhöhte STC-1 Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den MSZ, die *in vitro* expandiert wurde, unterlag die Untersuchung der Knochenmarksschnitte keiner möglichen Beeinflussung durch ein Nährmedium. Ferner ist es durchaus denkbar, dass die leukämischen MSZ einige der im Rahmen der Leukämogenese erworbenen Veränderungen durch die *in vitro* Kultur zurückbilden. Hierzu könnte auch das fehlende Knochenmarks-Mikroenvironment, darunter vor allem die fehlende Interaktion der MSZ mit AML-Zellen und weiteren Stroma-Komponenten beitragen. Ein sinnvoller Ansatz, um, basierend auf den Befunden der vorliegenden Arbeit, eine eindeutige Aussage über eine potentiell erhöhte Expression von STC-1 in leukämischen MSZ zu treffen, wäre daher die Wiederholung der STC-1 Expressionsanalysen auf mRNA-, Protein und humoraler Ebene mit DMEM-MSZ, da die eingangs durchgeführte Analyse des Genexpressionsprofils der DMEM-MSZ signifikant erhöhte Werte der STC-1 Expression in den MSZ von AML-Patienten ergab. Zudem sollte eine größere Anzahl an MSZ-Proben untersucht werden, da so auch geringere Expressionsunterschiede zwischen gesunden und leukämischen MSZ eruiert werden könnten.

6.4 Auswirkungen von STC-1 auf AML-Zellen *in vitro*

6.4.1 Auswirkungen von rekombinantem STC-1 auf AML-Zellen

Anknüpfend an die Untersuchungen zur Expression von STC-1 wurden im letzten Teil der Arbeit die Auswirkungen von STC-1 auf AML-Zellen *in vitro* getestet. In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass STC-1 die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen begünstigt.^{97,99} Um die Relevanz von STC-1 in hämatologischen Erkrankungen zu examinieren, führten wir *in vitro* Kulturen von AML-Zellen durch und untersuchten den Effekt von STC-1 durch die Behandlung der AML-Zellen mit rekombinantem STC-1 (50 ng/ml). Um die Wirkung von STC-1 noch spezifischer untersuchen zu können, wurde in der Hälfte der Kulturen zusätzlich ein anti-STC-1 Antikörper zugegeben. Die Behandlung mit rekombinantem STC-1 konnte dabei weder die Proliferation und die Zellzyklusaktivität noch die Apoptose der AML-Zellen signifikant verändern. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die unzureichende Wirkung der alleinigen Gabe von rekombinantem STC-1 darstellen. So ist es möglich, dass bestimmte Ko-Faktoren in der Stammzellnische und insbesondere in den MSZ die Auswirkungen von STC-1 erst in Gang setzen. Demnach könnten die Folgen, die einzig durch die Zugabe von rekombinantem STC-1 hervorgerufen werden, nicht ausreichen, um das Wachstumsverhalten der AML-Zellen in signifikantem Ausmaß zu beeinflussen. Die Konsequenzen der Gabe von rekombinantem STC-1 wurde auch bereits von anderen Gruppen untersucht. So analysierten Block et al. den Effekt von rekombinantem STC-1 (50 bzw. 100 ng/ml) auf strahlengeschädigte Fibroblasten und A549-Zellen, eine Linie von Bronchialkarzinomzellen (Adenokarzinom). Im Einklang mit unseren Befunden, konnte die Zugabe von rh-STC-1 die Apoptose weder bei den Fibroblasten noch bei den A549-Zellen reduzieren. Die Zugabe von 100 ng/ml rekombinantem STC-1 bewirkt sogar einen Anstieg der Rate an apoptotischen Zellen.¹¹¹ Im Widerspruch zu diesen Befunden konnten Ohkouchi und Kollegen in ihrer Studie zeigen, dass die Zugabe von rekombinantem STC-1 (12,5; 25 bzw. 50 ng/ml) das Überleben von A549-Zellen fördert. Zudem untersuchte die Gruppe um Ohkouchi den Effekt von rekombinantem STC-1 auf zwei weitere Adeno- und eine Plattenepithelkarzinom-Zelllinie. Bei der Untersuchung der Adenokarzinomzellen konnte der anti-apoptotische Effekt von STC-1 bestätigt werden, bei den Plattenepithelkarzinomzellen hingegen konnte, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, keine signifikante Beeinflussung des Tumorzellwachstums durch die Behandlung mit rekombinantem STC-1 beobachtet werden.⁹⁹ Da Ohkouchi und Kollegen in ihrer Studie bereits bei geringeren (12,5 und 25 ng/ml) als der

in der vorliegenden Arbeit verwendeten rh-STC-1-Konzentration (50 ng/ml) deutliche Effekte verzeichneten, ist es unwahrscheinlich, dass der geringe Einfluss von rh-STC-1 auf die AML-Zellen auf eine zu gering gewählte rh-STC-1-Konzentration zurückzuführen ist. Eine potentielle Erklärung für divergierende Resultate diesbezüglich stellen jedoch Unterschiede zwischen den für die Kultur verwendeten Tumorzellen dar: so wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte von STC-1 auf primäre, d.h. direkt aus Knochenmarksproben isolierte AML-Zellen getestet, während in den Studien anderer Arbeitsgruppen, so auch bei Ohkouchi und Kollegen, permanente Zelllinien verwendet wurden. Da die Verwendung von primären Zellen einer Vielzahl an spenderabhängigen Einflussfaktoren unterliegt, sind die Befunde der vorliegenden Arbeit kritisch zu betrachten und nicht vollständig mit den von Ohkouchi et al. publizierten Daten vergleichbar. Ein weiterer Unterschied zwischen der vorliegenden Arbeit und den Versuchen von Ohkouchi et al. besteht darin, dass in dieser Arbeit native AML-Zellen in Kultur gegeben wurden, während Ohkouchi et al. für die Kultur Zellen verwendeten, die zuvor in H_2O_2 inkubiert worden waren. Durch die H_2O_2 -Behandlung betrug die Apoptoserate der Tumorzellen nach der Kultur etwa 20 Prozent, während in der vorliegenden Arbeit nach der Kultur stets nur sehr wenige AML-Zellen (etwa ein Prozent) apoptotisch waren. Daher war es schwierig, diesen ohnehin sehr geringen Anteil an apoptotischen Zellen durch die Behandlung mit rh-STC-1 nochmals derart stark zu reduzieren, dass sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kulturen ohne rh-STC-1 Behandlung ergibt. Ein weiterer sinnvoller Ansatz, um die Wirkung von STC-1 auf AML-Zellen detaillierter als durch die Anwendung des - möglicherweise unzureichend wirksamen – rekombinanten STC-1 beurteilen zu können, besteht in der genetischen Manipulation von AML-Zellen zur Induktion einer stabilen Überexpression bzw. dauerhaften Inaktivierung von STC-1. So untersuchten Du et al. die Wirkung von STC-1 auf Proliferation und Zellzyklusaktivität einer Lungenkrebszelllinie. Mittels Transfektion generierten sie Zellen mit stabiler Überexpression von STC-1 bzw. dauerhafter Inaktivierung von STC-1. In *colony-forming assays* stellten sie fest, dass das Wachstum der Zellen mit Überexpression von STC-1 deutlich gesteigert war.¹¹⁰ Weiterhin zeigten die Zellen, in denen STC-1 inaktiviert worden war, eine deutlich geschwächte Entwicklung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die Überexpression von STC-1 erhöhte den Anteil der Zellen in der S- bzw. G2- Phase, während die Inaktivierung von STC-1 einen deutlich erkennbaren Arrest der Zellen in der G1- Phase bewirkte. Daraus folgerten sie, dass STC-1 den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus beschleunigt und daher die Proliferation der Zellen fördert.¹¹⁰ Demgegenüber charakterisieren Nguyen et al. STC-1

aufgrund einer von STC-1 herabgesetzten Aktivität des überlebensfördernden ERK1/2 Signalweges¹¹² als pro-apoptotisches Protein. Durch genetische Manipulation generierten sie embryonale Mausfibroblasten mit dauerhaft abgeschalteter STC-1 Expression. Bei diesen Zellen beobachteten sie ein deutlich gesteigertes Zellüberleben unter oxidativen Stressbedingungen (20 % Sauerstoff, d.h. hyperoxisch für die Zellen). Dieser Überlebensvorteil konnte durch exogene Zufuhr von STC-1 revidiert werden. Unter zellphysiologischen Bedingungen war dieser Effekt jedoch nicht replizierbar. Daher folgerten sie, dass STC-1 zu reduziertem Zellüberleben, jedoch lediglich unter oxidativen Stressbedingungen, führt.⁹³ Die Daten von Nguyen et al., die einen Effekt von STC-1 lediglich unter Sauerstoffmangelsituationen belegen, stehen im Einklang mit den Befunden der vorliegenden Arbeit, dass die Behandlung von AML-Kulturen mit STC-1 unter zellphysiologischen Bedingungen nicht in der Lage ist, das Wachstum der AML-Zellen signifikant zu beeinflussen.

6.4.2 Effekt der Blockade von STC-1 in der Ko-Kultur von MSZ und AML-Zellen

MSZ sind eine zentrale Komponente der Stammzellnische im Knochenmark. Durch die Erhaltung ruhender sowie die Freisetzung aktivierter HSZ in den Blutstrom garantieren sie einen geregelten Ablauf der Hämatopoese.³² Daneben können MSZ aber auch die Proliferation maligner hämatopoetischer Zellen fördern.^{99,100,104,113} Zur Untersuchung der Effekte von MSZ auf AML-Zellen erfolgten in der vorliegenden Arbeit Ko-Kulturversuche, wobei primäre AML-Zellen von insgesamt drei Spendern je einmal zusammen mit MSZ aus dem Knochenmark eines AML-Patienten und in einer zweiten Versuchsreihe zusammen mit den MSZ von hämatologisch gesunden Spendern in Kultur gegeben wurden. Um die spezifischen Effekte des von den MSZ sezernierten Proteins STC-1 zu analysieren, wurde die Hälfte der Kulturen mit einem anti-STC-1 Antikörper behandelt.

Die Blockade von STC-1 in der Ko-Kultur mit MSZ konnte weder die Apoptose noch die Proliferation der AML-Zellen signifikant beeinflussen. Dabei war es unerheblich, ob die Tumorzellen zusammen mit den MSZ des AML-Patienten oder zusammen mit den MSZ des knochenmarksgesunden Spenders in Kultur gegeben wurden. Demgegenüber konnten Samudio et al. mit ihren Ergebnissen zeigen, dass MSZ durch die Ko-Kultur mit AML-Zellen zur Hoch-Regulation von UCP-2, einem Protein zur Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette angeregt werden, was sich positiv auf das Überleben der Tumorzellen auswirkte.¹¹³ Auch in der Arbeit von Ohkouchi und Kollegen konnte nachgewiesen werden, dass die Ko-Kultur mit MSZ die Apoptose von A549-Zellen begrenzt und dieser Effekt durch

die Blockade von STC-1 revidiert werden kann.⁹⁹ Was diese Studie jedoch grundlegend von den Experimenten der vorliegenden Arbeit unterscheidet, ist die Behandlung der A549-Zellen mit H₂O₂ bzw. dem Chemotherapeutikum Paclitaxel. Dadurch wurde ein bedeutender Anteil der Zellen apoptotisch, was, wie bereits erläutert, einen wichtigen Stimulus für eine verstärkte STC-1 Expression darstellt. Block et al. berichten in einer ähnlichen Studie, dass die Ko-Kultur mit MSZ die Apoptose von UV-geschädigten Fibroblasten etwa um die Hälfte reduzieren konnte. Im Einklang mit unseren Resultaten stellten sie fest, dass diese anti-apoptotischen Effekte von MSZ nur bei Kultivierung mit zuvor geschädigten Zellen zu tragen kommen. In der von Block et al. durchgeführten Ko-Kultur von MSZ und Fibroblasten, welche zuvor nicht durch UV-Strahlung beschädigt wurden, konnten die MSZ, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, die Apoptoserate nicht signifikant reduzieren. Ferner konnte die Gruppe in den Ko-Kulturen von MSZ und strahlengeschädigten Fibroblasten deutlich höhere STC-1-Levels feststellen, als in den analog durchgeführten Kulturen mit unbehandelten Fibroblasten. Die Zugabe des Zellkulturüberstands von MSZ-Kulturen, die nicht zusammen mit den apoptotischen Zellen in Kultur gegeben wurden, hingegen hatte keinen Effekt auf die Apoptose der strahlengeschädigten Fibroblasten. Auch bei der parallel durchgeführten Ko-Kultur von MSZ und A549 konnte die Gruppe um Block einen ähnlichen Effekt beobachten: im Gegensatz zur Ko-Kultur von MSZ und A549-Zellen unter hypoxischen Bedingungen und niedrigem pH-Wert waren in der Ko-Kultur von MSZ und A549-Zellen unter physiologischen Bedingungen keine erhöhten STC-1 Levels im Überstand zu finden. Sie postulieren ebenfalls, dass apoptotische bzw. stark beschädigte Zellen bestimmte Zytokine sezernieren, welche die STC-1-Sekretion in MSZ fördern.¹¹¹ Diese Befunde legen nahe, dass die Ko-Kultur mit nativen AML-Zellen keinen ausreichenden Stimulus für eine gesteigerte STC-1 Sekretion in den MSZ darstellt und somit auch die Blockade von STC-1 in den Ko-Kulturen keine relevanten Auswirkungen auf die Apoptose und Proliferation der AML-Zellen hervorruft. Eine Möglichkeit zur weiteren Untersuchung der Rolle von STC-1 in der AML besteht daher in der Durchführung von Ko-Kulturen von MSZ mit AML-Zellen, die vor der Kultur mit H₂O₂ oder Zytostatika behandelt werden. Problematisch bei der Auswertung der Daten der vorliegenden Arbeit war zudem die hohe Varianz von Apoptose und Proliferation der AML-Zellen je nach AML-Spender, ein Einflussfaktor den Ohkouchi et al. durch Verwendung der etablierten A549-Zelllinie minimieren konnten. Um daher ungeachtet einer hohen Variabilität zwischen den einzelnen AML-Spendern eine allgemeingültige Aussage treffen zu können, bedarf es daher der Vergrößerung der Stichprobengröße, d.h. der Untersuchung von AML-

Zellen mehrerer unterschiedlicher Spender. Überdies wäre es sinnvoll, die *in vitro* Kulturen, ebenso wie die Analysen der Expression von STC-1 in den MSZ, mit DMEM-MSZ zu wiederholen, wodurch die unter 5.3 erläuterten, durch das NH-Medium induzierten Veränderungen im Genexpressionsprofil der MSZ revidiert werden könnten.

7 Zusammenfassung

Die Stammzellnische im Knochenmark spielt eine zentrale Rolle in der lebenslangen Regulation der Blutbildung. Als eine der wichtigsten Zellpopulationen in der Nische konnten multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) identifiziert werden. Durch die direkte Interaktion mit benachbarten Zellen und die Sekretion löslicher Signalmoleküle leisten MSZ einen wichtigen Beitrag in der Aufrechterhaltung der Homöostase im Knochenmark. Veränderungen in den MSZ können aber auch die Entartung hämatopoetischer Zellen fördern und so potentiell zur Entstehung maligner Knochenmarkserkrankungen beitragen. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte Stanniocalcin 1 (STC-1) mithilfe einer Genexpressionsanalyse als Gen mit der stärksten Überexpression in den MSZ von AML-Patienten verglichen mit den MSZ hämatologisch gesunder Kontrollen bestimmt werden. Anknüpfend daran hatte die vorliegende Dissertation zum Ziel, die Überexpression von STC-1 in leukämischen MSZ zu verifizieren und mögliche Auswirkungen von STC-1 auf das Wachstum von AML-Zellen zu analysieren.

Dafür wurden zunächst MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten und hämatologisch gesunden Spendern isoliert und *in vitro* expandiert. Um sicherzustellen, dass es sich um MSZ handelt, wurden die Zellen hinsichtlich des Oberflächenexpressionsprofils sowie des Differenzierungspotentials in Fett-, Knorpel- und Knochenzellen untersucht. Anschließend wurde die STC-1 Expression in den MSZ auf mRNA-, Protein- und humoraler Ebene analysiert, um mögliche Unterschiede zwischen den leukämischen und gesunden MSZ darstellen zu können. Zusätzlich wurden immunhistochemische Färbungen zur Untersuchung der STC-1 Expression in Knochenmarksschnitten von AML-Patienten und hämatologisch gesunden Spendern sowie in MSZ-Cytospinpräparaten durchgeführt. Im letzten Teil der Arbeit erfolgten *in vitro* Kulturen von AML-Zellen mit rekombinantem STC-1 sowie Ko-Kulturen von AML-Zellen und MSZ, wobei in einem Teil der Kulturen zusätzlich die Blockade von STC-1 durch die Gabe eines Antikörpers vorgenommen wurde. Anschließend erfolgte die Untersuchung der AML-Zellen hinsichtlich Apoptoserate und Zellproliferation.

Dabei konnten wir in den immunhistochemischen Untersuchungen eine deutlich verstärkte Expression von STC-1 im Knochenmark von AML-Patienten nachweisen und durch die immunhistochemische Färbung von *Cytospins* wurde bewiesen, dass STC-1 spezifisch von den MSZ exprimiert und gebildet wird. Bezüglich der mRNA- und Proteinexpression von STC-1 konnten in dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Kollektiv von MSZ-Proben keine

signifikanten Unterschiede zwischen den MSZ von AML-Patienten und den Kontrollen aus dem Knochenmark von hämatologisch gesunden Patienten beobachtet werden, es zeigte sich jedoch ein Trend zugunsten einer Überexpression von STC-1 in den MSZ von AML-Patienten. Bei der aktiven Sezernierung von STC-1 in das Kulturmedium hingegen wurde ein signifikant höherer Wert der AML-MSZ im Vergleich zu den MSZ knochenmarksgesunder Spender gefunden. Die Behandlung mit rekombinantem STC-1 in der AML-Primärkultur erzielte insgesamt keine signifikante Beeinflussung des Tumorzellwachstums, ebenso wirkte sich auch die Blockade von STC-1 in der Ko-Kultur mit MSZ nicht signifikant auf Proliferation und Apoptose der AML-Zellen aus.

Bezüglich der Rolle von STC-1 in der Tumorentstehung und -progression finden sich in der Literatur zum Teil Ergebnisse, die nicht vollständig mit den Ergebnissen dieser Dissertation übereinstimmen. So wurde eine von STC-1 vermittelte Reduktion der Apoptoserate⁹⁹ sowie eine durch die Ko-Kultur mit MSZ gesteigerte Proliferationsrate von Tumorzellen beschrieben¹⁰⁰, was in den Experimenten dieser Arbeit nicht beobachtet wurde. Diese Befunde sind jedoch kritisch zu betrachten, da in den entsprechenden Studien stets mit permanenten Zelllinien gearbeitet wurde, während in der vorliegenden Arbeit ausschließlich primäre Zellen zur Verwendung kamen. Daneben unterschieden sich die Versuchsbedingungen in der vorliegenden Arbeit zum Teil erheblich von denjenigen der bisher existierenden Arbeiten auf diesem Themengebiet.

Inwieweit die Überexpression von STC-1 in MSZ in die Entstehung und Progression der AML involviert ist, konnte in der vorliegenden Dissertation nicht abschließend geklärt werden. Mithilfe einer erneuten Genchip-Analyse zur Untersuchung des Transkriptoms von MSZ aus dem Knochenmark von AML-Patienten und hämatologisch gesunden Spendern konnten wir jedoch belegen, dass Einflüsse des in der vorliegenden Dissertation verwendeten Nährmediums (NH-Medium) eine mögliche Ursache für die geringen Unterschiede in den Untersuchungen der Expression von STC-1 in den MSZ von AML-Patienten und gesunden Kontrollen sowie die fehlenden Auswirkungen von STC-1 in der Ko-Kultur mit MSZ darstellen. Da sich bei einer im Vorfeld durchgeführten Genchipanalyse von MSZ, die in dem Nährmedium DMEM kultiviert worden waren, eine deutliche Überexpression von STC-1 bei AML-Patienten zeigte, wäre neben einer Erhöhung der Stichprobengröße die Wiederholung der Experimente dieser Dissertation mit dem Nährmedium DMEM ein sinnvoller Ansatz, um die Rolle des von den MSZ sezernierten Proteins STC-1 in der Pathogenese der AML weiter abklären zu können.

Literaturverzeichnis

1. Müller-Neben, G. & Petrides, P.E. *Blut- Hämatopoese und Erythrocyten*, (Löffler/Petrides, 2014).
2. Herold, G. Herold Innere Medizin. (2017).
3. Civin, C.I., *et al.* Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* **14**, 2224-2233 (1996).
4. Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I. & May, W.S. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* **87**, 1-13 (1996).
5. Yin, A.H., *et al.* AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**, 5002-5012 (1997).
6. Ogawa, M. Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **30**, 3-6 (2002).
7. Novelli, E.M., Ramirez, M. & Civin, C.I. Biology of CD34+CD38- cells in lymphohematopoiesis. *Leuk Lymphoma* **31**, 285-293 (1998).
8. Seita, J. & Weissman, I.L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**, 640-653 (2010).
9. Ravandi, F. & Estrov, Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. *Clin Cancer Res* **12**, 340-344 (2006).
10. Boulais, P.E. & Frenette, P.S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* **125**, 2621-2629 (2015).
11. Ivanova, N.B., *et al.* A stem cell molecular signature. *Science* **298**, 601-604 (2002).
12. Mercer, E.M., Lin, Y.C. & Murre, C. Factors and networks that underpin early hematopoiesis. *Semin Immunol* **23**, 317-325 (2011).
13. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7-25 (1978).
14. Dexter, T.M., Allen, T.D. & Lajtha, L.G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* **91**, 335-344 (1977).
15. Morrison, S.J. & Spradling, A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132**, 598-611 (2008).
16. Scadden, D.T. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol* **20**, 19-27 (2007).
17. Scadden, D.T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**, 1075-1079 (2006).
18. Lo Celso, C., *et al.* Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* **457**, 92-96 (2009).
19. Lord, B.I., Testa, N.G. & Hendry, J.H. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood* **46**, 65-72 (1975).
20. Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Terhorst, C. & Morrison, S.J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109-1121 (2005).
21. Ehniger, A. & Trumpp, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med* **208**, 421-428 (2011).
22. Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T. & Gutierrez-Ramos, J.C. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* **185**, 111-120 (1997).

23. Tzeng, Y.S., *et al.* Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood* **117**, 429-439 (2011).
24. Jung, Y., *et al.* Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* **38**, 497-508 (2006).
25. Peled, A., *et al.* Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* **283**, 845-848 (1999).
26. Ara, T., *et al.* Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* **19**, 257-267 (2003).
27. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977-988 (2006).
28. Xie, Y., *et al.* Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* **457**, 97-101 (2009).
29. Calvi, L.M., *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846 (2003).
30. Zhang, J., *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841 (2003).
31. Kunisaki, Y., *et al.* Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* **502**, 637-643 (2013).
32. Méndez-Ferrer, S., *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829-834 (2010).
33. Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G. & Morrison, S.J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457-462 (2012).
34. Bromberg, O. Osteoblastic N-cadherin is not required for microenvironmental support and regulation of **hematopoietic stem** and progenitor cells. (ed. Frisch) (*Blood*, 2012).
35. Kiel, M.J., Radice, G.L. & Morrison, S.J. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell* **1**, 204-217 (2007).
36. Chow, A., *et al.* Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* **208**, 261-271 (2011).
37. Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M. & Frenette, P.S. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* **452**, 442-447 (2008).
38. Lucas, D., *et al.* Chemotherapy-induced bone marrow nerve injury impairs hematopoietic regeneration. *Nat Med* **19**, 695-703 (2013).
39. Katayama, Y., *et al.* Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* **124**, 407-421 (2006).
40. Pietras, E.M., Warr, M.R. & Passegué, E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* **195**, 709-720 (2011).
41. Fortunel, N.O., Hatzfeld, A. & Hatzfeld, J.A. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* **96**, 2022-2036 (2000).
42. Ruscetti, F.W., Akel, S. & Bartelmez, S.H. Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene* **24**, 5751-5763 (2005).
43. Schepers, K., Campbell, T.B. & Passegué, E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* **16**, 254-267 (2015).

44. Bruns, I., *et al.* Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med* **20**, 1315-1320 (2014).
45. Arai, F., *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149-161 (2004).
46. Morrison, S.J. & Scadden, D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327-334 (2014).
47. Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I. & Frolova, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230-247 (1968).
48. Via, A.G., Frizziero, A. & Oliva, F. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles Ligaments Tendons J* **2**, 154-162 (2012).
49. Le Blanc, K. & Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* **12**, 383-396 (2012).
50. Mouisseddine, M., *et al.* Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. *Br J Radiol* **80 Spec No 1**, S49-55 (2007).
51. Frenette, P.S., Pinho, S., Lucas, D. & Scheiermann, C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol* **31**, 285-316 (2013).
52. Horwitz, E.M. & Keating, A. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells: what are they? *Cytotherapy* **2**, 387-388 (2000).
53. Horwitz, E.M., *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393-395 (2005).
54. Dominici, M., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317 (2006).
55. Crisan, M., *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301-313 (2008).
56. Greenbaum, A., *et al.* CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227-230 (2013).
57. Anthony, B.A. & Link, D.C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol* **35**, 32-37 (2014).
58. Raaijmakers, M.H., *et al.* Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* **464**, 852-857 (2010).
59. Omatsu, Y., *et al.* The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* **33**, 387-399 (2010).
60. Walkley, C.R., *et al.* A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell* **129**, 1097-1110 (2007).
61. Walkley, C.R., Shea, J.M., Sims, N.A., Purton, L.E. & Orkin, S.H. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell* **129**, 1081-1095 (2007).
62. Kode, A., *et al.* Leukaemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. *Nature* **506**, 240-244 (2014).
63. SOUTHAM, C.M., CRAVER, L.F., DARGEON, H.W. & BURCHENAL, J.H. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer* **4**, 39-59 (1951).
64. Estey, E. & Döhner, H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* **368**, 1894-1907 (2006).
65. Braess, J. [Acute myeloid Leukemia]. *Dtsch Med Wochenschr* **141**, 1748-1751 (2016).

66. Juliusson, G., *et al.* Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood* **119**, 3890-3899 (2012).
67. Lane, S.W., Scadden, D.T. & Gilliland, D.G. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* **114**, 1150-1157 (2009).
68. Vardiman, J.W., *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937-951 (2009).
69. Metzeler, K.H., *et al.* Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* **128**, 686-698 (2016).
70. Papaemmanuil, E., *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **374**, 2209-2221 (2016).
71. Swerdlow, S.H., *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375-2390 (2016).
72. Sekeres, M.A., *et al.* Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood* **113**, 28-36 (2009).
73. Döhner, H., *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424-447 (2017).
74. Lapidot, T., *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-648 (1994).
75. Bonnet, D. & Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**, 730-737 (1997).
76. Passegué, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E. & Weissman, I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11842-11849 (2003).
77. Ishikawa, F., *et al.* Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol* **25**, 1315-1321 (2007).
78. Sipkins, D.A. Rendering the leukemia cell susceptible to attack. *N Engl J Med* **361**, 1307-1309 (2009).
79. Colmone, A., *et al.* Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* **322**, 1861-1865 (2008).
80. Wiseman, D.H. Donor cell leukemia: a review. *Biol Blood Marrow Transplant* **17**, 771-789 (2011).
81. Dührsen, U. & Hossfeld, D.K. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann Hematol* **73**, 53-70 (1996).
82. Schepers, K., *et al.* Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell* **13**, 285-299 (2013).
83. Ge, J., Hou, R., Liu, Q., Zhu, R. & Liu, K. Stromal-derived factor-1 deficiency in the bone marrow of acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* **93**, 750-759 (2011).
84. Griffin, J.D., *et al.* Secretion of interleukin-1 by acute myeloblastic leukemia cells in vitro induces endothelial cells to secrete colony stimulating factors. *Blood* **70**, 1218-1221 (1987).
85. Sipkins, D.A., *et al.* In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* **435**, 969-973 (2005).
86. Chang, A.C., Jellinek, D.A. & Reddel, R.R. Mammalian stanniocalcins and cancer. *Endocr Relat Cancer* **10**, 359-373 (2003).
87. Yeung, B.H., Law, A.Y. & Wong, C.K. Evolution and roles of stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol* **349**, 272-280 (2012).

88. Wagner, G.F. & Dimattia, G.E. The stanniocalcin family of proteins. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* **305**, 769-780 (2006).
89. Wagner, G.F., *et al.* Comparative biochemistry and physiology of teleocalcin from sockeye and coho salmon. *Gen Comp Endocrinol* **72**, 237-246 (1988).
90. Sundell, K., Björnsson, B.T., Itoh, H. & Kawauchi, H. Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) stanniocalcin inhibits in vitro intestinal calcium uptake in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J Comp Physiol B* **162**, 489-495 (1992).
91. Jellinek, D.A., *et al.* Stanniocalcin 1 and 2 are secreted as phosphoproteins from human fibrosarcoma cells. *Biochem J* **350 Pt 2**, 453-461 (2000).
92. Zhang, K., *et al.* Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3637-3642 (2000).
93. Nguyen, A., Chang, A.C. & Reddel, R.R. Stanniocalcin-1 acts in a negative feedback loop in the prosurvival ERK1/2 signaling pathway during oxidative stress. *Oncogene* **28**, 1982-1992 (2009).
94. Chang, A.C., *et al.* A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol* **112**, 241-247 (1995).
95. Lal, A., *et al.* Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1337-1343 (2001).
96. Sheikh-Hamad, D., Rouse, D. & Yang, Y. Regulation of stanniocalcin in MDCK cells by hypertonicity and extracellular calcium. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F417-424 (2000).
97. Chang, A.C., *et al.* STC1 expression is associated with tumor growth and metastasis in breast cancer. *Clin Exp Metastasis* **32**, 15-27 (2015).
98. Du, Y.Z., Gu, X.H., Li, L. & Gao, F. The diagnostic value of circulating stanniocalcin-1 mRNA in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* **104**, 836-840 (2011).
99. Ohkouchi, S., *et al.* Mesenchymal stromal cells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC1. *Mol Ther* **20**, 417-423 (2012).
100. Samudio, I., Fiegl, M. & Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res* **69**, 2163-2166 (2009).
101. Tohmiya, Y., *et al.* Stanniocalcin-1 as a novel marker to detect minimal residual disease of human leukemia. *Tohoku J Exp Med* **204**, 125-133 (2004).
102. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
103. LifeSpan BioSciences, I. R^{at PRL / Prolactin ELISA Kit (Sandwich ELISA) - LS-F10462}. Vol. 2017.
104. Konopleva, M., *et al.* Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* **16**, 1713-1724 (2002).
105. Shiozawa, Y., Havens, A.M., Pienta, K.J. & Taichman, R.S. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia* **22**, 941-950 (2008).
106. Geyh, S., *et al.* Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **30**, 683-691 (2016).
107. Ellard, J.P., *et al.* The respiratory effects of stanniocalcin-1 (STC-1) on intact mitochondria and cells: STC-1 uncouples oxidative phosphorylation and its actions are modulated by nucleotide triphosphates. *Mol Cell Endocrinol* **264**, 90-101 (2007).
108. Yeung, H.Y., *et al.* Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells. *Endocrinology* **146**, 4951-4960 (2005).
109. WARBURG, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314 (1956).

110. Du, Y.Z., *et al.* The oncogenetic role of stanniocalcin 1 in lung adenocarcinoma: a promising serum candidate biomarker for tracking lung adenocarcinoma progression. *Tumour Biol* **37**, 5633-5644 (2016).
111. Block, G.J., *et al.* Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells* **27**, 670-681 (2009).
112. Wang, X., Martindale, J.L., Liu, Y. & Holbrook, N.J. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* **333** (Pt 2), 291-300 (1998).
113. Samudio, I., Fiegl, M., McQueen, T., Clise-Dwyer, K. & Andreeff, M. The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. *Cancer Res* **68**, 5198-5205 (2008).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jochen Grassinger für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Dissertation in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie der Universität Regensburg durchzuführen.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei meinen Betreuern Herrn Dr. med Roland Schelker, Frau Dr. rer. nat. Sabine Iberl und Herrn Gunnar Müller für die hervorragende Betreuung und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente für diese Arbeit sowie für die zu jedem Zeitpunkt aufgebrachte große Geduld.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, meinem Bruder Markus und meinen Freunden, die mir in der gesamten Ausbildungszeit eine große Stütze waren und die mein Studium zu einem sehr besonderen Lebensabschnitt gemacht haben.