

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Isabel Taubert
aus: Weimar

Tag der mündlichen Prüfung:

Einfluss der CD44-Standardisoform und der CD44-varianten Isoformen auf den Erhalt des hämatopoetischen und leukämischen Stammzellpotenzials

Gutachter: Prof. Dr. Werner Buselmaier

Prof. Dr. Anthony D. Ho

Zusammenfassung

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) und leukämische Stammzellen (LSCs) benötigen ein spezielles Mikromilieu im Knochenmark, die sogenannte Stammzellnische, um ihre Stammzeleigenschaften, wie beispielsweise die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihre niedrige Proliferationsrate, aufrecht zu erhalten. Eine Verdrängung der Stammzellen aus ihrer Nische geht mit einem Verlust dieser Eigenschaften einher und könnte daher die Therapieresistenz der LSCs durchbrechen. Für die Regulationsmechanismen innerhalb der Stammzellnische spielen eine Vielzahl von Molekülen, unter anderem auch das Adhäsionsmolekül CD44, eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der CD44-Standardisoform (CD44s) und der CD44-varianten Isoformen (CD44v) auf die Interaktion von HSCs und LSCs mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und Hyaluronsäure, als Bestandteilen der Stammzellnische, untersucht.

Dazu wurden zunächst verschiedene Subpopulationen gesunder humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut, mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark, sowie verschiedene leukämische Stammzellkandidaten aus Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) auf ihre CD44s- und CD44v-Expression untersucht. Sowohl in gesunden als auch in leukämischen Zellen wurden dieselben alternativ gespleißten variablen CD44-Exonprodukte gefunden. In HSCs fand man generell nur eine schwache CD44v-Expression, die aber in den Zellen aus Knochenmark, also in HSCs, die in Kontakt zu ihrer Nische waren, im Vergleich zu denen aus Nabelschnurblut und mobilisiertem Peripherblut höher war. In LSCs aus AML-Patienten fand man eine sehr heterogene Verteilung der CD44v-Expression, die entweder niedriger, gleichhoch, höher oder viel höher war im Vergleich zu den HSCs. In leukämischen Zelllinien konnte eine zellzyklusabhängige CD44v-Expression festgestellt werden. Diese Beobachtung war auch in Übereinstimmung mit dem Anstieg der CD44v-Expression, der bei HSCs mit zunehmender Differenzierung beobachtet werden konnte. Im Falle von CD44v7 war dieser Anstieg nach Kokultur mit MSCs sogar noch höher als bei HSCs, die ohne MSCs kultiviert wurden. Die CD44v-Expression ist somit eine im Differenzierungsprozess erworbene Eigenschaft, wobei myeloide Zellen eine höhere Expression der CD44-Varianten zeigten als lymphoide. Grundsätzlich förderte die Kokultur mit MSCs bzw. Hyaluronsäure den Selbsterhalt, aber auch die Differenzierung von HSCs. Die Ligation von CD44s mit

dem Antikörper A3D8 induzierte Apoptose in HSCs und leukämischen Zelllinien, wobei der Effekt in den leukämischen Zellen stärker war als in den gesunden Zellen. Nach Kokultur mit MSCs konnte der apoptotische Effekt durch A3D8 auf die HSCs noch verstärkt werden. Unter Verwendung eines Mikrofluidik-Assays konnte gezeigt werden, dass Scherströmung die Adhäsion und das Rolling von CD44-exprimierenden leukämischen Zelllinien und HSCs an Hyaluronsäure induziert, was für verschiedene Prozesse wie beispielsweise Homing, Engraftment und das Verbleiben der Stammzellen in ihrer Nische von Bedeutung sein könnte.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die CD44-Standardisoform und die CD44-varianten Isoformen zur Erhaltung der Stammzeleigenschaften beitragen und dass es zwischen HSCs und LSCs Unterschiede in der CD44v-Expression sowie in ihrer Reaktion auf CD44-Ligation gibt, die wichtig für die Prognose in AML-Patienten sowie für die Entwicklung neuer AML-Therapien sein könnten.

Summary

Hematopoietic stem cells (HSCs) and leukemic stem cells (LSCs) need a special microenvironment in the bone marrow, the so-called stem cell niche, to sustain their stem cell properties, like their ability to self-renew and their low proliferation rate. An extrusion of the stem cells out of their niche leads to a loss of the properties and could therefore burst the therapy resistance of the LSCs. To regulate the different mechanisms in the stem cell niche a lot of molecules, like the adhesion molecule CD44, are involved. In this work the influence of the CD44 standard form (CD44s) and the CD44 variant isoforms on the interaction of HSCs and LSCs with mesenchymal stem cells (MSCs) and hyaluronic acid, both parts of the stem cell niche, was investigated.

Therefore we analyzed the CD44s and CD44 variant isoform expression in different healthy subpopulations of human hematopoietic progenitor cells from cord blood, mobilized peripheral blood and bone marrow, as well as of leukemic stem cell candidates from patients with acute myeloid leukemia (AML). Both healthy and leukemic cells expressed the same alternatively spliced variant CD44 exon products. In HSCs there was only a weak CD44 variant isoform expression detectable, which was higher in cells from bone marrow, i.e. in HSCs which were in contact with their niche, in comparison to cells from cord blood or mobilized peripheral blood. LSCs from patients with AML showed a quite heterogeneous distribution in the expression of the CD44 variant isoforms, which was lower, equal, higher or much higher in comparison to the HSCs. Leukemic cell lines showed a cell cycle dependent expression of the CD44 variant isoforms. This observation was in line with the increase of the CD44 variant isoform expression in HSCs during differentiation. In the case of CD44v7 this increase was even higher after co-culture with MSCs. Thus the CD44 variant isoform expression is a property of differentiation and is higher in myeloid than in lymphoid cells. In general the co-culture with MSCs or rather hyaluronic acid was important for the HSCs to self-renew but also to differentiate. Ligation of CD44s with the antibody A3D8 induced apoptosis in HSCs and leukemic cell lines, but the effect in leukemic cells was stronger than in healthy cells. After co-culture with MSCs the apoptotic effect of A3D8 on the HSCs was even higher. By using a microfluidic system it was shown that shear stress induced adhesion and rolling of CD44 expressing leukemic cell lines and HSCs on hyaluronic acid. This

could be important for different processes, like homing, engraftment and retention of stem cells in their niche.

Altogether the results of this work show the participation of CD44s and CD44 variant isoforms in the maintenance of the stem cell properties. Furthermore there are differences in the expression of CD44 variant isoforms between HSCs and LSCs as well as in their reaction to CD44 ligation, which could be important for the prognosis of patients with AML and for the development of new therapies for AML.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hämatopoetische Stammzellen und ihre Stammzellnische	1
1.2	Akute myeloische Leukämie und leukämische Stammzellen	4
1.2.1	Akute myeloische Leukämie	4
1.2.2	Leukämische Stammzellen	5
1.3	CD44	8
1.3.1	Aufbau von CD44 und CD44-varianten Isoformen	8
1.3.2	Rolle von CD44 und CD44-varianten Isoformen in Hämatopoese und Leukämie	11
1.3.3	CD44-Hyaluronsäure-Interaktion	13
1.4	Ziel der Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Hersteller	17
2.1.2	Primärmaterial	19
2.1.2.1	Nabelschnurblut	19
2.1.2.2	Mobilisiertes Peripherblut	19
2.1.2.3	Knochenmark	20
2.1.2.4	Peripherblut und Knochenmark von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie	20
2.1.3	Zelllinien	21
2.1.4	Kulturmedien	21
2.1.4.1	HSC-Medium (LTBMC-Medium)	21
2.1.4.2	MSC-Medien	22
2.1.4.3	Zelllinien-Medium	23

2.1.4.4	Adhäsionsmedien	24
2.1.5	Chemikalien	24
2.1.6	Primer	26
2.1.6.1	Standard-PCR	26
2.1.6.2	Real-time PCR.....	26
2.1.7	Antikörper für Durchflusszytometrie und Immunofluoreszenz	28
2.1.8	Kits und Farbstoffe.....	29
2.1.9	Puffer und Lösungen	30
2.1.10	Geräte und Zubehör	30
2.1.11	Software.....	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Isolierung von HSCs	32
2.2.1.1	Gewinnung mononukleärer Zellen aus NB, mPB und KM	32
2.2.1.2	Magnetische Zellseparation	33
2.2.2	Isolierung von MSCs.....	33
2.2.3	Kultivierung von HSCs	34
2.2.4	Kultivierung von MSCs.....	34
2.2.5	Kultivierung von Zelllinien	35
2.2.6	Kryokonservierung von Zellen	35
2.2.7	Zellkulturassays	36
2.2.7.1	Kokultur von HSCs und MSCs.....	36
2.2.7.2	Kokultur von HSCs und Hyaluronsäure	37
2.2.8	Migrationsassay im Transwell.....	37
2.2.9	Zellzyklustests	38
2.2.9.1	Cycle Test™ Plus DNA Reagent Kit.....	38
2.2.9.2	Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain	39
2.2.10	Isolierung von Gesamt-RNA	39

2.2.11	cDNA-Synthese	40
2.2.12	Standard-PCR	41
2.2.13	Real-time PCR	42
2.2.14	Gelelektrophorese	43
2.2.15	Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte	43
2.2.16	Aldefluor-Färbung	44
2.2.17	CFDA-SE-Färbung	45
2.2.18	PKH26-Färbung	45
2.2.19	Annexin V/Pi-Färbung	46
2.2.20	Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Analyse	47
2.2.20.1	Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen	47
2.2.20.2	Antikörperfärbung von intrazellulären Antigenen nach Fixierung und Permeabilisierung	47
2.2.21	Immunofluoreszenzfärbung	48
2.2.22	Adhäsionsassays	49
2.2.22.1	Objektträgerassay	49
2.2.22.2	96-Well-Assay	50
2.2.23	Mikrofluidik: Adhäsion von leukämischen Zelllinien und HSCs an Hyaluronsäure	52
2.2.24	Statistische Auswertung	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Profil von CD44s bzw. CD44pan und CD44v auf mRNA-Ebene mittels exonspezifischer PCR	55
3.1.1	Standard-PCR	56
3.1.1.1	CD44s- und CD44v-Expression in leukämischen Zelllinien ...	56
3.1.1.2	CD44s- und CD44v-Expression in verschiedenen Subpopulationen von primären Zellen	58

3.1.1.3	Sequenzierung der PCR-Produkte für CD44s und CD44v	62
3.1.2	Real-time PCR.....	63
3.1.2.1	CD44pan- und CD44v-Expression in leukämischen Zelllinien	63
3.1.2.2	CD44pan- und CD44v-Expression in verschiedenen Subpopulationen von primären Zellen	65
3.2	Profil von CD44pan und CD44v auf Protein-Ebene mittels Durchflusszytometrie.....	71
3.2.1	CD44pan- und CD44v-Expression in leukämischen Zelllinien	71
3.2.2	CD44pan- und CD44v-Expression in verschiedenen Subpopulationen von primären Zellen	73
3.2.2.1	CD44v-Expression in CD34 ⁺ , ALDH ⁺ und ALDH ⁺ /CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark von gesunden Spendern und AML- Patienten.....	74
3.2.2.2	CD44pan-Expression in CD34 ⁺ , ALDH ⁺ und ALDH ⁺ /CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark von gesunden Spendern und AML-Patienten	78
3.2.2.3	CD44pan- und CD44v-Expression in SDF und FDF	80
3.2.2.4	CD44pan- und CD44v-Expression in Leukozyten.....	82
3.2.2.5	CD44pan- und CD44v-Expression in MSCs	84
3.3	Zellzyklusabhängige Expression von CD44v in leukämischen Zelllinien 85	
3.3.1	Zellzyklusabhängige CD44v-Expression in KG-1a	85
3.3.2	Zellzyklusabhängige CD44v- und ALDH-Expression in K-562.....	88
3.4	Einfluss der Kokultur auf die CD44pan- und CD44v-Expression und den Selbsterhalt und die Differenzierung von HSCs.....	90
3.4.1	Kokultur mit MSCs führt zu einer Erhöhung der CD44v7-Expression	90

3.4.2	Kokultur mit MSCs verstärkt apoptotischen Effekt von A3D8 in CD34 ⁺ Zellen	94
3.4.3	Erhöhung der p27-Expression in mit anti-CD44v7-behandelten NB-4	101
3.4.4	Kokultur mit Hyaluronsäure führt zu einer Erhöhung der CD34-Expression	103
3.4.5	CD34 ⁺ Zellen, die in Kontakt mit Hyaluronsäure sind, migrieren schlechter	105
3.5	Einfluss von Antikörpern gegen CD44pan und CD44v auf die Adhäsion an MSCs und Hyaluronsäure	105
3.5.1	Objektträgerassay.....	106
3.5.2	96-Well-Assay.....	107
3.6	Mikrofluidik: Scherströmung induziert Adhäsion und Rolling von leukämischen Zelllinien und CD34⁺ Zellen, die CD44 exprimieren, an Hyaluronsäure	108
3.6.1	KG-1a zeigen Scherstrom-induzierte Anhaftung an Hyaluronsäure im Gegensatz zu Jurkat	108
3.6.2	Einfluss von A3D8 auf die Scherstrom-induzierte Adhäsion von KG-1a an Hyaluronsäure.....	110
3.6.3	Scherstrom-induzierte Anhaftung von leukämischen Zelllinien an Hyaluronsäure in Abhängigkeit von ihrer CD44-Expression	112
3.6.4	CD34 ⁺ Zellen zeigen Scherstrom-induzierte Anhaftung an Hyaluronsäure	113
4	Diskussion	115
4.1	Leukämische Zelllinien, HSCs und LSCs exprimieren dieselben alternativ gespleißten variablen CD44-Exon-Produkte	115
4.2	Unterschiedliche und zellzyklusabhängige CD44s- und CD44v-Expression in leukämischen Zelllinien.....	116

4.3	Schwache CD44v-Expression in HSCs im Gegensatz zu einer starken Expression in myeloiden Leukozyten	117
4.4	Heterogene CD44s- und CD44v -Expression in AML-Patienten auf mRNA- und Proteinebene.....	121
4.5	Mobilisierung mit G-CSF allein und in Kombination mit Plerixafor erhöht die CD44v-Expression auf mRNA-Ebene	123
4.6	Kokultur mit MSCs führt zu einer Erhöhung der CD44v7-Expression und verstärkt Apoptose nach Ligation mit dem CD44-Antikörper A3D8	125
4.7	Kokultur mit Hyaluronsäure führt zu einer Erhöhung der CD34-Expression und inhibiert die Migration von HSCs	129
4.8	Kein direkter Einfluss von Antikörpern gegen CD44pan und CD44v auf die Adhäsion von leukämischen Zelllinien und HSCs	131
4.9	Scherströmung induziert Adhäsion und Rolling von CD44-exprimierenden leukämischen Zelllinien und HSCs an Hyaluronsäure	133
5	Literaturverzeichnis	137
6	Veröffentlichungen.....	147
6.1	Publikationen.....	147
6.2	Präsentationen	148
6.2.1	Vorträge	148
6.2.2	Poster	148
7	Danksagung.....	150

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Hämatopoetische Stammzellnische (Yin und Li 2006).	3
Abbildung 1-2 Modell zur Tumorinitiation und zum Fortschreiten des Tumors (Dick 2008).	7
Abbildung 1-3 Übersicht über 2 Therapieansätze zur Behandlung von Tumoren, die durch Krebsstammzellen entstanden sind (Reya, Morrison et al. 2001).	8
Abbildung 1-4 CD44-Proteinstruktur der Standardisoform und der varianten Isoformen (Goodison, Urquidi et al. 1999).	10
Abbildung 1-5 Aufbau von Hyaluronsäure: Poly(β -D-Glucuronsäure-[1 $\rightarrow$ 3]- β -N-Acetyl-D-Glucosamin-[1 $\rightarrow$ 4]-).	13
Abbildung 2-1 Aufbau der Mikrofluidikapparatur (a) und des Kanalsystems (b) (Christophis, Grunze et al. 2010).	53
Abbildung 3-1 Übersicht über die CD44-Exons und die Lage der Primer für Standard- und Real-time PCR. EZ, extrazelluläre Region; TM, Transmembranregion; ZP, zytoplasmatische Region. S1-S10, Standardexons (1-10, schwarz); V1-V10, variable Exons (1-10, rot), V1 wird im Menschen nicht transkribiert.	56
Abbildung 3-2 Gelbilder von den GAPDH-, CD44s- und CD44v-Banden in den leukämischen Zelllinien.	57
Abbildung 3-3 Relative CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in den leukämischen Zelllinien.	58
Abbildung 3-4 CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in CD34 ⁺ (linke Bande) versus CD34 ⁻ Zellen (rechte Bande) aus Nabelschnurblut (NB 208-209) und Knochenmark von einem AML-Patienten (KM 69).	59
Abbildung 3-5 CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in ALDH ⁺ (linke Bande) versus ALDH ⁻ Zellen (rechte Bande) aus Nabelschnurblut (NB 159) und Knochenmark von einem AML-Patienten (KM 72).	60
Abbildung 3-6 Relative CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in ALDH ⁺ versus ALDH ⁻ Zellen aus Nabelschnurblut (NB 159), Knochenmark von AML-Patienten (KM 72 und 96) und mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut (mPB8).	60

Abbildung 3-7 CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in SDF (linke Bande) versus FDF (rechte Bande) aus Nabelschnurblut (NB 226-228) und Peripherblut von einem AML-Patienten (PB 75).....	61
Abbildung 3-8 Relative CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in SDF versus FDF aus Nabelschnurblut (NB 200-201 und 226-228) und aus Peripherblut und Knochenmark von AML-Patienten (PB 75 und 97 und KM 100).....	61
Abbildung 3-9 Übersicht über die aus dem Agarosegel extrahierten PCR-Produkte (rotes Viereck) von CD34 ⁺ (linke Bande) und CD34 ⁻ Zellen (rechte Bande) von NB 256 und die nach Sequenzierung erhaltene Verteilung der exprimierten variablen Exons (rote Schrift).....	63
Abbildung 3-10 PCR-Produkte für GAPDH, CD44pan und CD44v nach Real-time PCR mit neuen Primern am Beispiel von KG-1a.	64
Abbildung 3-11 Relative CD44pan- und CD44v-Expression in den leukämischen Zelllinien in Relation zu KG-1a.	64
Abbildung 3-12 Übersicht über die negativ korrelierende ALDH- und CD44s-Expression in ALDH ⁺ versus ALDH ⁻ Zellen (A) und SDF versus FDF (B) in verschiedenen Proben aus Nabelschnurblut, Knochenmark von AML-Patienten und gesundem Spender und mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut.	66
Abbildung 3-13 Relative CD44pan- und CD44v-Expression in CD34 ⁺ Zellen aus Knochenmark von AML-Patienten. Bezogen wurden die Werte jeweils auf Probe KM 77, die 1 gesetzt wurde.....	67
Abbildung 3-14 Relative CD44pan- und CD44v-Expression in ALDH ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark von AML-Patienten. Bezogen wurden die Werte auf eine Nabelschnurblutprobe, die 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind der Mittelwert aus jeweils 3 (NB) bzw. 4 (KM AML) Proben und die Standardabweichung.....	68
Abbildung 3-15 Relative CD44pan- und CD44v-Expression in CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut. Bezogen wurden die Werte auf eine Nabelschnurblutprobe, die 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind der Mittelwert aus jeweils 3 Proben und die Standardabweichung. Bis auf CD44v3 waren alle Werte in mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut signifikant erhöht im Vergleich zu Nabelschnurblut (p<0,05).	69

Abbildung 3-16 Relative CD44pan- und CD44v-Expression in ALDH ⁺ und CD34 ⁺ Zellen vor versus nach Plerixafor. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils 4 Patienten. Die Werte für CD44v2, v4, v5, v6, v8 und v10 in ALDH ⁺ Zellen vor versus nach Plerixafor waren statistisch signifikant ($p < 0,05$).	70
Abbildung 3-17 CD44pan-Oberflächenexpression in den 6 leukämischen Zelllinien. Dargestellt ist jeweils ein Dot blot mit zugehöriger CD44pan-Expression (CD44-PE).	72
Abbildung 3-18 Immunofluoreszenzmikroskopiebilder von CD44pan auf der Oberfläche der 6 leukämischen Zelllinien. DNA wurde mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt und CD44pan mit dem clone A3D8 und chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (grün).	72
Abbildung 3-19 CD44pan- (CD44s-) und CD44v-Oberflächenexpression in den 6 leukämischen Zelllinien. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens 3 Versuchen ($n=3$ bis $n=10$).	73
Abbildung 3-20 Übersicht über die Kombination der verschiedenen Färbungen von ALDH und deren Kontrolle DEAB, CD34 und CD44v7 in MNCs von AML 10. Die CD44pan- und CD44v-Expression wurden jeweils in ALDH ⁺ , CD34 ⁺ und ALDH ⁺ /CD34 ⁺ analysiert.	74
Abbildung 3-21 CD44v-Expression in ALDH ⁺ (A), CD34 ⁺ (B) und ALDH ⁺ /CD34 ⁺ (C) Zellen aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut von gesunden Spendern ($n=3$), Nabelschnurblut ($n=3$) und Knochenmark von gesunden Spendern ($n=4$). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Die mit * versehenen Werte waren jeweils statistisch signifikant verschieden von denen in Knochenmark ($p \leq 0,05$).	75
Abbildung 3-22 CD44v-Expression in ALDH ⁺ (A), CD34 ⁺ (B) und ALDH ⁺ /CD34 ⁺ (C) Zellen aus Knochenmark von gesunden Spendern ($n=4$) und Knochenmark von AML-Patienten ($n=12$). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.	76
Abbildung 3-23 CD44v7-Expression in ALDH ⁺ (A), CD34 ⁺ (B) und ALDH ⁺ /CD34 ⁺ (C) Zellen aus Knochenmark von gesunden Spendern ($n=4$) und Knochenmark von AML-Patienten (AML 1-12). Die Werte für das Knochenmark von gesunden	

Spendern sind jeweils als Mittelwert und deren Standardabweichung dargestellt. Die Werte für das Knochenmark von AML-Patienten sind jeweils einzeln dargestellt.....	77
Abbildung 3-24 Übersicht über die negative Korrelation zwischen der Anzahl an CD34 ⁺ Blasten im Knochenmark und der CD44v7-Expression in den CD34 ⁺ Blasten (n=11, Spearman r=-0,7182, P=0,0128).....	78
Abbildung 3-25 Übersicht über negative Korrelation zwischen der Anzahl an ALDH ⁺ Zellen im Knochenmark und der CD44pan-Expression in den ALDH ⁺ Zellen in Patienten der cHRG (A) (n=12, Spearman r=-0,8301, P=0,0008) und über die positive Korrelation zwischen der Anzahl an CD34 ⁺ Blasten im Knochenmark und der CD44pan-Expression in den CD34 ⁺ Blasten in Patienten der cIRG (B) (n=13, Spearman r=0,5599, P=0,0466).	80
Abbildung 3-26 CD44pan- (CD44s-) und CD44v-Expression in SDF und FDF aus Nabelschnurblut (n=3 bzw. n=5). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Der Unterschied in der CD44v6-Expression zwischen SDF und FDF war statistisch signifikant (p<0,05).....	81
Abbildung 3-27 Übersicht über CD34 ⁺ Zellen aus G-CSF-mobilisiertem Peripherblut (mPB 14), die nach 7 Tagen in SDF (R4) und FDF (R5) aufgeteilt und zusätzlich mit Aldefluor gefärbt wurden. Dargestellt sind ALDH ⁺ Zellen (R6) im Vergleich zur DEAB-Kontrolle. In SDF waren 97,36 % der ALDH ⁺ und 57,56 % der ALDH ⁻ Zellen zu finden.....	82
Abbildung 3-28 Übersicht über die durchflusszytometrische Darstellung von Granulozyten, Monozyten, T- und B-Lymphozyten und deren jeweilige CD44v7-Expression am Beispiel von mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut (mPB 62).	83
Abbildung 3-29 Übersicht über die CD44pan- (CD44s-) und CD44v-Expression in Monozyten (A), Granulozyten (B), T- (C) und B-Lymphozyten (D) aus normalem, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark von gesunden Spendern (jeweils n=3). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.	84
Abbildung 3-30 CD44v- (großes Diagramm A) und CD44pan- (CD44s-) (kleines Diagramm B) Expression in MSCs, die in 3 verschiedenen Medien (PL, 7er und 6er) kultiviert wurden. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus jeweils 3 Versuchen.	85

Abbildung 3-31 Zellzyklusverteilung von CD44v7 ⁺ und CD44v7 ⁻ KG-1a nach Zellsortierung. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die Anzahl der CD44v7 ⁺ Zellen in G ₁ -, S- und G ₂ /M-Phase war jeweils statistisch signifikant verschieden im Vergleich zu der Anzahl der CD44v7 ⁻ Zellen in den zugehörigen Zellzyklusphasen (p<0,05).....	86
Abbildung 3-32 Übersicht über die durchflusszytometrische Messung des Zellzyklus mit Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain und CD44v7 in KG-1a. Dargestellt ist die Zellzyklusverteilung und die Expression von CD44v7 in G ₁ -, S- und G ₂ /M-Phase. ..	87
Abbildung 3-33 CD44v-Expression in G ₁ -, S- und G ₂ /M-Phase in KG-1a nach gemeinsamer Färbung der Zellen mit Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen.....	88
Abbildung 3-34 Übersicht über die durchflusszytometrische Messung der ALDH-Expression mit zugehöriger DEAB-Kontrolle und CD44v7-Expression in verschiedenen ALDH-Subpopulationen (ALDH ⁻ , ALDH ⁻ , ALDH ⁺ und ALDH ⁺⁺) in K-562.	89
Abbildung 3-35 CD44pan- (CD44s-) und CD44v-Expression in ALDH ⁻ , ALDH ⁻ , ALDH ⁺ und ALDH ⁺⁺ K-562. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen.	90
Abbildung 3-36 Übersicht über die durchflusszytometrische Messung von CFSE (A-C), CD34 (A), CD44pan (B) und CD44v7 (C) in CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut nach 7 Tagen in Kultur mit und ohne MSCs. Das obere linke Bild zeigt die Verteilung von insgesamt 10 Zellteilungen (1-10).....	92
Abbildung 3-37 Übersicht der CD34-, CD11b-, CD44pan- und CD44v7-Expression in den Zellteilungen 2 bis 11 in CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, die 7 Tage ohne MSC (A) bzw. mit MSC (B) kultiviert wurden. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3 bzw. 4 Versuchen.	92
Abbildung 3-38 Übersicht über die prozentuale Änderung der CD44pan- (CD44s-), CD11b-, CD34- und CD44v7-Expression in CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut, die 7 Tage mit MSCs kultiviert wurden im Vergleich zu Zellen, die ohne MSCs kultiviert wurden. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 9 (für CD11b), 12 (für CD44v7), 15 (für CD44pan) bzw. 16 (für CD34) Versuchen.	94

Abbildung 3-39 Übersicht über die durchflusszytometrische Messung von Annexin V/Pi in NB-4, die 3 Tage mit je 2 µg/ml A3D8, anti-CD44v7 bzw. ohne etwas (Kontrolle) inkubiert wurden. Die Unterteilung in lebend, früh-, spätapoptotisch und nekrotisch erfolgte im Gesamtgate (alle) bzw. im Zellgate (R1).	95
Abbildung 3-40 Übersicht über die Anzahl lebender, früh-, spätapoptotischer und nekrotischer NB-4 nach 3 Tagen Inkubation mit je 2 µg/ml A3D8 oder anti-CD44v7 und/oder 25 µM ZVAD-FMK. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die mit * versehenen Werte waren jeweils statistisch signifikant verschieden von der unbehandelten Kontrolle ($p \leq 0,05$).	96
Abbildung 3-41 Übersicht über die Anzahl lebender, früh-, spätapoptotischer und nekrotischer CD34 ⁺ (A) und CD34 ⁻ (B) Zellen aus Nabelschnurblut, die 7 Tage mit je 2 µg/ml A3D8 und mit bzw. ohne MSCs kultiviert wurden. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die mit * versehenen Werte waren jeweils statistisch signifikant verschieden von der unbehandelten Kontrolle ($p \leq 0,05$).	98
Abbildung 3-42 Übersicht über die Anzahl an CD34 ⁺ Zellen nach Kultivierung von CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut mit A3D8 und/oder MSCs für 7 Tage. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen.	99
Abbildung 3-43 Übersicht über die Anzahl lebender, früh-, spätapoptotischer und nekrotischer CD34 ⁺ Zellen nach 5 Tagen Inkubation mit je 2 µg/ml A3D8 und/oder 25 µM ZVAD-FMK ohne (A) bzw. mit (B) Kokultur mit MSCs. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die mit * versehenen Werte waren jeweils statistisch signifikant verschieden von der unbehandelten Kontrolle ($p \leq 0,05$).	100
Abbildung 3-44 Übersicht über die durchflusszytometrische Messung von p27 in NB-4, die 3 Tage mit je 2 µg/ml A3D8, anti-CD44v7 bzw. ohne Zusatz (Kontrolle) inkubiert wurden. Dargestellt sind unter anderem jeweils die sekundäre Antikörperkontrolle (grau) und die eigentliche p27-Färbung (pink).	102
Abbildung 3-45 Übersicht über die p27-Expression in NB-4 nach Inkubation mit 2 µg/ml anti-CD44v7 und/oder 25 µM ZVAD-FMK für 3 Tage. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die Erhöhung der p27-	

Expression nach anti-CD44v7-Inkubation war statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$).....	103
Abbildung 3-46 Übersicht über die prozentuale Änderung der CD34-Expression in CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut, die 7 Tage mit 40 µg oder 80 µg HA bzw. in zuvor mit HA beschichteten Gefäßen kultiviert wurden im Vergleich zu Zellen, die ohne HA kultiviert wurden. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 4 (für 40 µg HA und gecoatete HA) bzw. 9 (für 80 µg HA) Versuchen.....	104
Abbildung 3-47 Übersicht über die Anzahl der migrierten CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut durch Membranen, die ohne bzw. mit 200 µg/ml HA beschichtet wurden, nach einer Inkubationszeit von 24 h. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen.	105
Abbildung 3-48 Übersicht über die an HA haftenden KG-1a und Jurkat nach 3 h Inkubationsdauer. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 2 Versuchen.	106
Abbildung 3-49 Übersicht über die relative Adhäsion von KG-1a an MSCs nach Inkubation mit anti-CD44v3, v4, v5, v6, v7 und A3D8 nach 1 h in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen.	107
Abbildung 3-50 Übersicht über die relative Adhäsion von KG-1a (A) und CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut (B) an MSCs nach Inkubation mit A3D8 bzw. anti-CD44v7 für 2 bzw. 23 h in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die mit * versehenen Werte waren jeweils statistisch signifikant verschieden von der unbehandelten Kontrolle ($p \leq 0,01$).	108
Abbildung 3-51 Übersicht über die Abreißkurven von Jurkat (A) und KG-1a (B) auf Glas, Alginat (Argininsäure) und Hyaluron (Hyaluronsäure). Die Abreißkurven wurden auf die initiale Zellzahl im Blickfeld (~600) normalisiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3 bis 6 Versuchen.....	110
Abbildung 3-52 Übersicht über die Anzahl von KG-1a, die aus dem Fluss (0,175 bzw. 0,25 dyn/cm ²) an HA anhaften nach A3D8-Vorinkubation für 1 h (A und B) bzw. für 24 h (C und D).	111

Abbildung 3-53 Übersicht über die Anhaftung von leukämischen Zelllinien (KG-1a, K-562, HL-60, Jurkat und Kasumi-1) aus dem Fluss ($\sim 0,2 \text{ dyn/cm}^2$) an Hyaluronsäure. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 6 bis 10 Versuchen. ..	113
Abbildung 3-54 Bildersequenz einer rollenden CD34^+ Zelle auf Hyaluronsäure bei 2 dyn/cm^2 (a-c). Die Pfeile verdeutlichen die Flussrichtung.....	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Leukämische Zelllinien.....	21
Tabelle 2 Zusammensetzung des LTBM-Mediums für HSC	21
Tabelle 3 Zusammensetzung des 7er Mediums für MSC	22
Tabelle 4 Zusammensetzung des 6er Mediums für MSC	23
Tabelle 5 Zusammensetzung des PL-Mediums für MSC.....	23
Tabelle 6 Zusammensetzung des Mediums für Zelllinien	23
Tabelle 7 Zusammensetzung des Adhäsionsmediums für Objektträgerassay	24
Tabelle 8 Zusammensetzung des Adhäsionsmediums für 96-Well-Assay	24
Tabelle 9 Primer für Standard-PCR.....	26
Tabelle 10 Primer für Real-time PCR	26
Tabelle 11 Antikörper für Durchflusszytometrie und Immunofluoreszenz	28
Tabelle 12 Kits und Farbstoffe	29

Abkürzungsverzeichnis

ALDH	Aldehyddehydrogenase
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin, bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CaCl₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
CD44s	CD44-Standardisoform
CD44v	CD44-Varianten (CD44-variante Isoformen)
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
cHRG	cytogenetic High Risk Group, zytogenetische Hochrisikogruppe
cIRG	cytogenetic Intermediate Risk Group, zytogenetische Intermediärrisikogruppe
CML	Chronische myeloische Leukämie
CO₂	Kohlendioxid
CXCR4	CXC Chemokinrezeptor Typ 4
Cy3	Cytochrom-3
DEAB	Diethylaminobenzaldehyd
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum, fötales bovines Serum
FCS	Fetal Calf Serum, fötales Kälberserum

FDF	Fast dividing fraction, schnellteilende Zellfraktion
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
Flt-3L	Fms-like tyrosine kinase-3 Ligand
for	forward
FSC	Forward Scatter Channel
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulocyte Monocyte-Colony-Stimulating Factor, Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
Hepes	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPC	Hematopoietic Progenitor Cell, hämatopoetische Vorläuferzelle
HSC	Hematopoietic Stem Cell, hämatopoetische Stammzelle
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
kDa	kilo Dalton
KM	Knochenmark
LSC	Leukemic Stem Cell, leukämische Stammzelle
LTBMC	Long-term Bone Marrow Culture
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
min	Minute
MNC	Mononuclear Cell, mononukleäre Zelle
mPB	Mobilisiertes Peripherblut
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MSC	Mesenchymal Stem Cell, mesenchymale Stammzelle
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
NB	Nabelschnurblut
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency, Nicht-fettleibig diabetisch/schwerer kombinierter Immundefekt
PB	Peripherblut
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidiumiodid
rev	reverse
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction, Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCF	Stem Cell Factor, Stammzellfaktor
SDF	Slow dividing fraction, langsameilende Zellfraktion
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
sec	Sekunde
SSC	Side Scatter Channel
TPO	Thrombopoetin
TRISMA	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
ÜN	über Nacht

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzellen und ihre Stammzellnische

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) sind Stammzellen im Knochenmark, aus denen alle Blutzelltypen gebildet werden, d.h. sie können sowohl in myeloische (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten) als auch in lymphatische Zellen (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen) ausreifen. Sie besitzen sowohl die Fähigkeit sich selbst zu erneuern, als auch in alle hämatopoetischen Zelllinien zu differenzieren. Erstmalig konnten diese Stammzellen von Till und McCulloch beschrieben werden, nachdem sie beobachteten, dass murine Knochenmarkszellen, die in bestrahlte Mäuse injiziert wurden, Kolonien mit proliferierenden Zellen in der Milz dieser Mäuse bildeten (Till und McCulloch 1961). Ein Teil dieser Zellen war in der Lage, wenn in sekundäre Empfänger injiziert, dort alle Blutzellen bilden zu können (Siminovitch, McCulloch et al. 1963).

Das Oberflächenantigen CD34 ist der bis heute wichtigste Marker zur Charakterisierung von humanen HSCs (Civin, Strauss et al. 1984; Katz, Tindle et al. 1985). CD34-angereicherte Zellpopulationen sind jedoch sehr heterogen und zusätzliche Marker, wie z.B. CD38 und CD133 werden zur Aufreinigung verwendet, wobei CD34⁺/CD38⁻ Zellen (Terstappen, Huang et al. 1991) und auch CD133⁺ Zellen (Freund, Oswald et al. 2006) einen höheren Anteil an primitiven Stammzellen aufweisen, als die gesamte CD34⁺ Zellpopulation. Die Expression von Oberflächenmarkern allein ist aber kein angemessener Indikator für die Stammzellfunktion. Dazu werden Funktions- (z.B. Langzeitkulturassays) oder Xenografttransplantationsmodelle verwendet. Zusätzlich kann die Charakterisierung von Stammzellen auch über ihre Teilungskinetik erfolgen. Wagner *et al.* untersuchten die Expressionsprofile von langsam- und schnellteilenden Zellen, die beide von CD34⁺/CD38⁻ Zellen abstammten und konnten zeigen, dass verschiedene Marker, die mit HSCs assoziiert sind, wie z.B. CD133, in den langsamteilenden Zellen stark exprimiert wurden (Wagner, Ansorge et al. 2004). Auch die Verwendung von funktionellen Markern zusammen mit Oberflächenmarkern oder allein kommt mehr

und mehr zum Einsatz. Die Aldehyddehydrogenasen (ALDH) sind hierfür ein vielversprechendes Beispiel. ALDH gehören zu einer Familie zytosolischer Enzyme, die an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt sind (Yoshida, Rzhetsky et al. 1998; Duester 2000). Es wurde gezeigt, dass sowohl primitive HSCs als auch leukämische Stammzellen (LSCs) eine hohe ALDH-Expression zeigen (Storms, Trujillo et al. 1999; Pearce, Taussig et al. 2005; Hess, Wirthlin et al. 2006; Cheung, Wan et al. 2007; Christ, Lucke et al. 2007) und dass diese eine wichtige Rolle für die Stammzellfunktion, inklusive der Chemotherapieresistenz, spielt (Wang, Fang et al. 2001; Chute, Muramoto et al. 2006).

Das Schicksal und die Entwicklung von HSCs werden von einem speziellen Mikromilieu des Knochenmarks, der Stammzellnische, reguliert. Es spielen hierbei sowohl Zell-Zell-Kontakte, Kontakte zur extrazellulären Matrix, als auch lösliche Faktoren eine wichtige Rolle (Moore und Lemischka 2006). Das Konzept der Stammzellnische wurde erstmals 1978 von Schofield als physiologisch beschränkte Mikroumgebung vorgeschlagen, in der sich die Stammzellen befinden (Schofield 1978). Die HSC-Stammzellnische besteht vermutlich aus 2 Bereichen, der osteoblastischen und der vaskulären Nische (Yin und Li 2006) (Abbildung 1-1). Die osteoblastische Nische besteht aus einer Subpopulation von Osteoblasten (spindle-shaped N-Cadherin⁺ CD45⁻ osteoblastic cells, SNO), die zur Erhaltung der HSCs beitragen (Zhang, Niu et al. 2003). Die vaskuläre Nische besteht aus Endothelzellen von sinusoidalen Gefäßen, die unter anderem die Proliferation und die Differenzierung von HSCs unterstützen (Kopp, Avecilla et al. 2005). Auch die Kontrolle über die asymmetrische oder symmetrische Zellteilung der HSCs erfolgt in der Stammzellnische. Bei der asymmetrischen Zellteilung teilt sich die HSC in 2 Tochterzellen, wobei eine in der Nische als Stammzelle verbleibt und die andere die Nische verlässt, um viele Nachkommen zu bilden (Ho 2005; Yin und Li 2006). Zusätzlich zu Osteoblasten und Endothelzellen sind auch mesenchymale Stammzellen (MSCs) in der Stammzellnische zu finden. Neben anderen Gruppen verwendet auch unsere Arbeitsgruppe HSCs und MSCs als Surrogatmodell, um die Interaktionen zwischen HSCs und ihrer Nische genauer zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass der direkte Zellkontakt zwischen HSC und MSC die Selbsterneuerung und die Proliferation von HSCs unterstützt (Walenda, Bork et al. 2010).

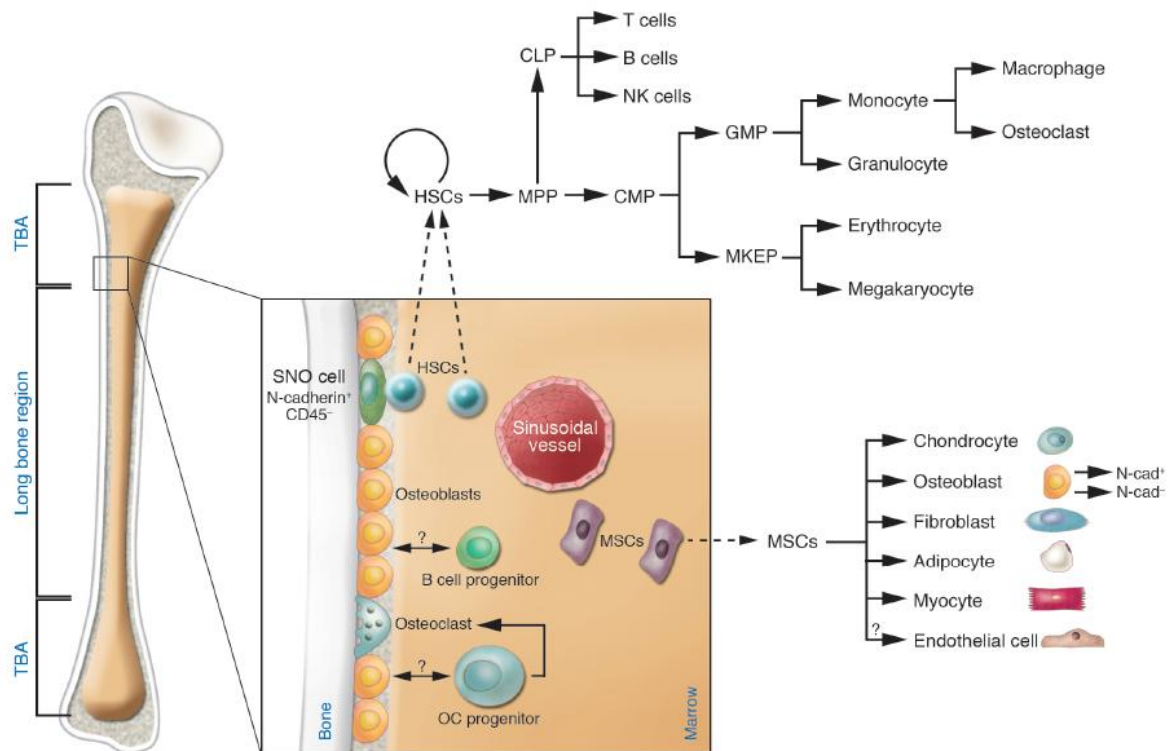


Abbildung 1-1 Hämatopoetische Stammzellnische (Yin und Li 2006).

CMP, common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; GMP, granulocyte/macrophage progenitor; MKEP, megakaryocyte erythrocyte progenitor; MPP, multipotent progenitor stem cell; MSC, mesenchymal stem cell; OC, osteoclast; SNO cell, spindle-shaped N-cadherin⁺CD45⁻ osteoblastic cell; TBA, trabecular bone area.

Neben ihren wichtigen Aufgaben im gesunden Organismus, haben HSCs auch eine große Bedeutung in der Therapie maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems. Die Transplantation von HSCs, entweder patienteneigenen (autolog) oder von gesunden Fremdspendern (allogen), zur Behandlung von Leukämien, Lymphomen und anderen hämatologischen Erkrankungen, ist inzwischen weit verbreitet. Anfänglich wurden dafür die HSCs aus dem Knochenmark gewonnen, inzwischen erfolgt die Gewinnung hauptsächlich aus mobilisiertem Peripherblut. Verschiedene Mobilisierungsstrategien wurden bisher getestet, doch eine optimale konnte bislang nicht definiert werden. Neben der klassischen Strategie unter Verwendung von Chemotherapie in Kombination mit dem Wachstumsfaktor G-CSF, hat sich Plerixafor (AMD3100) als neue vielversprechende Substanz zur Mobilisierung von HSCs in Patienten mit Multiplem Myelom und Non-Hodgkin-Lymphom gezeigt (Devine, Flomenberg et al. 2004). Plerixafor ist ein spezifischer Antagonist des Rezeptors CXCR4, der reversibel die Bindung von SDF-1 blockiert (Fricker, Anastassov et al.

2006). Durch die Verwendung von Plerixafor in Kombination mit G-CSF wurden zahlenmäßig mehr und primitivere HSCs mobilisiert, im Vergleich zur Verwendung von G-CSF allein (Flomenberg, Devine et al. 2005; DiPersio, Stadtmauer et al. 2009; Fruehauf, Veldwijk et al. 2009). Unsere Arbeitsgruppe konnte neben einer Erhöhung von CD34⁺ Zellen im peripheren Blut auch eine Zunahme an ALDH⁺ Zellen durch Plerixafor in Kombination mit G-CSF, im Vergleich zu G-CSF allein, zeigen (Taubert, Saffrich et al. 2011).

1.2 Akute myeloische Leukämie und leukämische Stammzellen

1.2.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist die am häufigsten auftretende akute Leukämie beim Erwachsenen. Pro Jahr kommt es durchschnittlich zu 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren. Bei der AML handelt es sich um eine bösartige Erkrankung des Knochenmarks, bei der sich myeloische Blasten, die die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung verloren haben, ungebremst vermehren, die normale Blutbildung verdrängen und somit zur hämatopoetischen Insuffizienz führen. Mögliche Ursachen für die Entstehung einer AML sind unter anderem exogene Faktoren, wie Chemikalien (z.B. Benzol), ionisierende Strahlung, Rauchen oder Chemotherapeutika, sowie angeborene oder erworbene Erkrankungen (z.B. myelodysplastisches Syndrom, MDS). Die AML ist eine sehr heterogene Erkrankung und die Diagnose beruht auf einer Kombination aus Zytomorphologie und Immunphänotypisierung und wird durch zytogenetische und molekularbiologische Analysen ergänzt. Die zwei meist verwendeten Klassifikationsschemata, zur Einteilung der AML, sind das ältere French-American-British- (FAB-) System (Bennett, Catovsky et al. 1982) und das neuere World Health Organization- (WHO-) System (Harris, Jaffe et al. 1999; Vardiman, Harris et al. 2002). Beim FAB-System wird die AML in 8 verschiedene Subtypen (M0-M7) unterteilt, basierend auf der involvierten myeloiden Linie und dem Grad an Differenzierung der Blasten. Im WHO-System wird versucht, neben den Kriterien, die für das FAB-System festgelegt wurden, biologische Entitäten zu definieren und so Gruppen mit spezifischen zytogenetischen Aberrationen von solchen zu trennen, die durch ihre Vorgeschichte

oder Morphologie bestimmt werden. AML können des Weiteren in de-novo-AML, bei der es sich um eine primäre Erkrankung handelt, und sekundäre AML unterteilt werden, bei der z.B. ein MDS oder eine Chemo- oder Radiotherapie der AML vorausgegangen ist. Eine Aussage über die Prognose der AML-Erkrankung kann durch die Einteilung in verschiedene Risikogruppen erfolgen. Dies geschieht nach den aktuellen Richtlinien der German AML Intergroup in die zytogenetische Niedrig-, Intermediär- oder Hochrisikogruppe, je nachdem ob günstige, keine oder ungünstige zytogenetische und molekulargenetische Aberrationen vorliegen.

Die Behandlung der AML gliedert sich in die Induktionstherapie, mit ein bis zwei Intervallen intensiver Chemotherapie, die in der Regel aus Cytarabin in Kombination mit einem Antrazyklin besteht, gefolgt von der Konsolidierungstherapie. Darüber hinaus wird bei Patienten der Intermediär- und Hochrisikogruppe eine allogene Stammzelltransplantation nach konditionierender Chemotherapie angestrebt.

1.2.2 Leukämische Stammzellen

Die Remissionsrate (Rate für das Nachlassen von Krankheitssymptomen) bei AML in Patienten, die älter als 60 Jahre sind, liegt bei 30-50 %, die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit bei 10-15 % und die Rezidivrate (Rate für das Wiederauftreten der Krankheit) bei 80 %. Ursache für das häufige Auftreten von Rezidiven sind wahrscheinlich leukämische Stammzellen (LSCs), die durch die Therapie nicht eliminiert werden konnten (van Rhenen, Feller et al. 2005). Lapidot und Kollegen konnten diese LSCs als $CD34^{+}/CD38^{-}$ identifizieren (Lapidot, Sirard et al. 1994). Diese Zellen, auch SCID leukemia-initiating cells (SL-ICs) genannt, waren in Lage in SCID-Mäusen zu engraften und AML in diesen Tieren zu initiieren. Anschließende Untersuchungen zeigten, dass diese LSCs verschiedenen hierarchisch angeordneten LSC-Klassen zugeordnet werden konnten, die jeweils ein heterogenes Selbsterneuerungspotential aufwiesen (Hope, Jin et al. 2004). Eine kleine Anzahl von proliferierenden Progenitoren ersetzt also stetig die Masse an leukämischen Blasten. Neben $CD34^{+}/CD38^{-}$ als möglichen Phänotyp für die LSCs konnte auch die ALDH-Aktivität als potentieller LSC-Marker identifiziert werden (Ran, Schubert et al. 2009). $CD34^{+}/ALDH^{+}$ Zellen zeigten funktionelle Charakteristika von LSCs und ein hoher Prozentsatz an $ALDH^{+}$ Zellen in AML-Patienten korrelierte mit einem signifikant schlechteren klinischen Verlauf (Ran, Schubert et al. 2009).

Ähnliche Ergebnisse von van Rhenen *et al.* zeigten, dass in AML-Patienten, die einen hohen Prozentsatz an CD34⁺/CD38⁻ Zellen zum Zeitpunkt der Diagnose hatten, eine signifikante Korrelation mit einer hohen minimalen Resterkrankungsfrequenz (MRD; minimal residual disease) und einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit existierte (van Rhenen, Feller *et al.* 2005).

LSCs und HSCs teilen zentrale Eigenschaften, wie unter anderem die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die Chemotherapieresistenz und sie stehen in enger Wechselwirkung mit der osteoblastischen Nische im Knochenmark (Ishikawa, Yoshida *et al.* 2007). LSCs unterscheiden sich somit stark von der Vielzahl an leukämischen Blasten, welche zwar die Hauptmasse der leukämischen Zellen darstellen, aber kein Selbsterneuerungspotenzial besitzen.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Ursprung der LSC in einer durch Anhäufung von Mutationen leukämisch entarteten HSC liegen könnte. Dem gegenüber steht die Theorie, dass die LSC von einem differenzierteren Zelltyp und/oder Progenitor abstammt, der zuerst die Fähigkeit zur Selbsterneuerung erworben hat, bevor sich weitere Mutationen angehäuft haben. Für die 2. Theorie sprechen die Ergebnisse von Cozzio *et al.*, die zeigen, dass das wirksame leukämische Fusionsgen MLL, dieselbe Leukämie induzieren konnte, egal ob es in HSCs, oder in myeloide Progenitoren transduziert wurde (Cozzio, Passegue *et al.* 2003). Eine Zusammenfassung über die möglichen Wege, die zur Krebs- bzw. Leukämienstammzelle führen können, wurde unter anderem von John E. Dick zusammengestellt und ist in Abbildung 1-2 dargestellt (Dick 2008). Selbst wenn die initiale Mutation in der Stammzelle oder in einem Progenitor stattfindet, sind weitere genetische und/oder epigenetische Veränderungen in der Stammzelle oder in den folgenden Progenitoren notwendig, um Krebs auszulösen. Das Fortschreiten des Krebses ist aber primär an die Selbsterneuerungsfähigkeit der Krebsstammzelle gebunden. Ob diese nun als Eigenschaft der gesunden Stammzelle übernommen wurde, oder von den Progenitoren erworben wurde, spielt dabei keine Rolle.

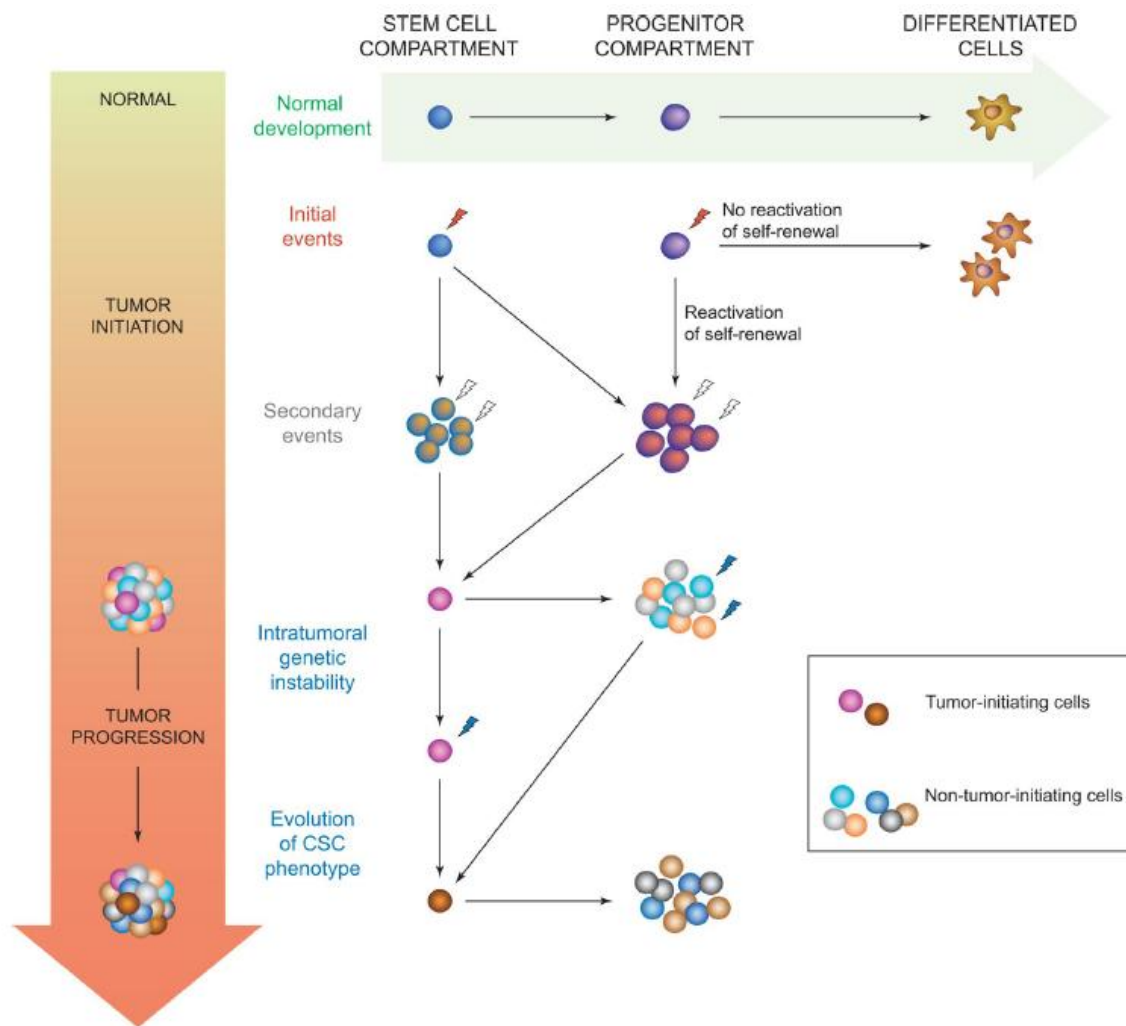


Abbildung 1-2 Modell zur Tumorinitiation und zum Fortschreiten des Tumors (Dick 2008).

Zukünftige Krebs- bzw. Leukämietherapien müssen auf die Beseitigung der Krebs- bzw. Leukämienstammzellen abzielen, um eine Heilung der Krankheit zu ermöglichen und ein Wiederkehren zu verhindern (siehe Abbildung 1-3). Bisherige Therapien beseitigen die Tumorzellen, aber nicht die Krebsstammzellen, was zwar zu einer Verringerung der Tumormasse führt, aber die Wiederkehr des Tumors nicht verhindern kann.

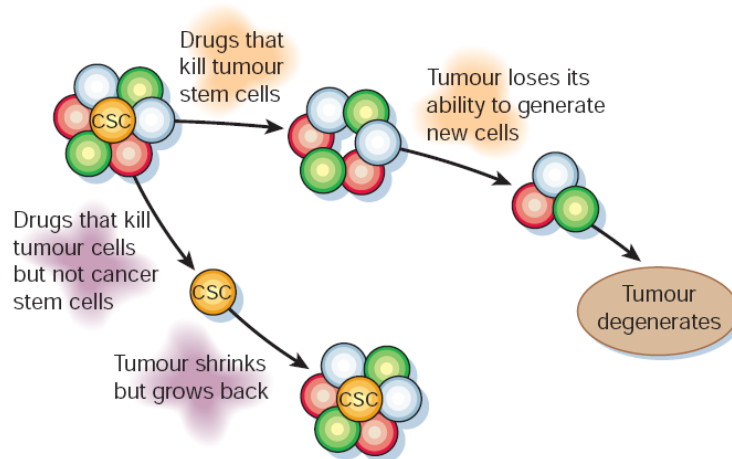


Abbildung 1-3 Übersicht über 2 Therapieansätze zur Behandlung von Tumoren, die durch Krebsstammzellen entstanden sind (Reya, Morrison et al. 2001).

1.3 CD44

CD44-Glykoproteine sind eine Familie von ubiquitär exprimierten Adhäsionsmolekülen der Zelloberfläche. Beschrieben wurde CD44 ursprünglich als Homing-Rezeptor in Lymphozyten (Gallatin, Weissman et al. 1983). Inzwischen wurden vielfältige Funktionen von CD44 berichtet, unter anderem in der Morphogenese und Organogenese (Knudson und Knudson 1993; Ruiz, Schwarzler et al. 1995; Goshen, Ariel et al. 1996), der Hämatopoese (Gunthert, Schwarzler et al. 1998; Ghaffari, Smadja-Joffe et al. 1999), der Migration (Pure und Cuff 2001) und der Aktivierung von Leukozyten (Gunthert, Schwarzler et al. 1998).

1.3.1 Aufbau von CD44 und CD44-varianten Isoformen

CD44 wird von einem Gen kodiert, welches hochkonserviert ist und 20 Exons enthält (Screaton, Bell et al. 1992; Tolg, Hofmann et al. 1993). Das CD44-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 im Menschen und auf Chromosom 2 in der Maus lokalisiert (Goodfellow, Banting et al. 1982; Francke, Foellmer et al. 1983). Die Größe des Moleküls variiert zwischen 80 und 200 kDa. Ursachen für diese Heterogenität sind variable N- und O-Glykosylierungen (Jalkanen, Bargatze et al. 1986; Omary, Trowbridge et al. 1988; Kansas, Wood et al. 1989; Zhou, Ding et al. 1989; Quackenbush, Vera et al. 1990; Camp, Kraus et al. 1991; Lokeshwar und Bourguignon 1991) und alternatives mRNA-Spleißen von variablen Exons in die extrazelluläre, nahe der Membran gelegene Region des Moleküls. Die insgesamt 20 Exons bestehen aus 2 verschiedenen Gruppen. Exons 1-5 und 16-20 sind

Standardexons (S1-S10), die wenn zusammen gefügt, die Standardisoform (CD44s), oder auch hämatopoetische Isoform genannt, kodieren. Sie stellt die kleinste und ubiquitär verbreitete Isoform dar. Zwischen den Standardexons 5 und 16 können nun durch alternatives Spleißen bis zu 10 variable Exons (Exons 6-15, V1-V10) eingebaut werden (Jackson, Buckley et al. 1992; Screaton, Bell et al. 1992; Screaton, Bell et al. 1993; Tolg, Hofmann et al. 1993). Im humanen Gen enthält Exon 6 (V1) ein Stoppcodon und wird somit, im Gegensatz zu V1 in Mäusen, nicht transkribiert (Screaton, Bell et al. 1993). Obwohl zahlreiche Kombinationen von variablen Exonprodukten beschrieben wurden, gibt es für bestimmte Gewebe dominante variable Exonprodukte wie z.B. die epitheliale Form (Cooper, Dougherty et al. 1992) oder den Keratinozytentyp (Brown, Bouchard et al. 1991; Haggerty, Bretton et al. 1992). Diese multiplen variablen Exonprodukte scheinen auch vielfältige Funktionen auszuüben (Haynes, Liao et al. 1991; Hardingham und Fosang 1992; Gunthert 1993).

CD44-Proteine bestehen aus einer extrazellulären Linkdomäne (N-terminale globuläre Domäne), einer Stielregion in der extrazellulären Domäne nahe der Transmembranregion, in die variablen Exons eingebaut sind, einer Transmembran- und einer zytoplasmatischen Domäne (siehe Abbildung 1-4). Wichtig für die Stabilität der Linkdomäne sind 4 konservierte Cysteinreste, die Disulfidbrücken bilden (Day und Sheehan 2001). Zwei zusätzliche Cysteinreste sind nötig für die richtige Proteinfaltung (Banerji, Day et al. 1998). Die extrazelluläre Region enthält 6 mögliche Stellen für N-Glykosylierungen, 5 davon befinden sich in der Linkdomäne (Goldstein, Zhou et al. 1989; Stamenkovic, Amiot et al. 1989). Die Stielregion, in die die variablen Exons eingebaut sind und durch die sich das Repertoire an posttranslationalen Modifikationen noch erhöht, enthält mehrere Serin- und Threoninreste, welche potenzielle Stellen für O-Glykosylierungen sind und 4 Serin-Glycin-Motive, welche Bindungsstellen für Chondroitinsulfat oder Heparansulfat sind (Goldstein, Zhou et al. 1989; Stamenkovic, Amiot et al. 1989; Brown, Bouchard et al. 1991).

CD44, als Adhäsionsmolekül, besitzt Bindedomänen für Hyaluronsäure (Aruffo, Stamenkovic et al. 1990; Miyake und Kincade 1990; Miyake, Medina et al. 1990), und andere Glykosaminoglykane (Toyama-Sorimachi und Miyasaka 1994), Kollagen (Ishii, Ford et al. 1993), Laminin (Ishii, Ford et al. 1993), Fibronectin (Jalkanen und

Jalkanen 1992), Osteopontin (Weber, Ashkar et al. 1996) und CD44 selbst (Droll, Dougherty et al. 1995). Die zytoplasmatische Region ist mit verschiedenen Partnermolekülen assoziiert: Ankyrin, als Zytoskelettelement (Lokeshwar und Bourguignon 1991), ERM Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin) und Merlin. Der C-Terminus von aktivierten ERM Proteinen bindet an F-Aktin und verbindet so Transmembranmoleküle mit dem Aktinzytoskelett (Ishikawa, Tamura et al. 2001). Durch diese Verbindung ist CD44 an Zellmigrationsprozessen beteiligt. Die zytoplasmatische Region besitzt 6 Serinreste, die durch die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden können (Lesley, Hyman et al. 1993; Legg, Lewis et al. 2002). Darüber hinaus ist die zytoplasmatische Region mit den Phosphotyrosinkinase (PTKs) Lck, Fyn und Lyn assoziiert (Taher, Smit et al. 1996; Ilanguvaran, Briol et al. 1998; Bates, Edwards et al. 2001). CD44 hat somit auch Einfluss auf die Signaltransduktion. Durch die Spaltung der zytoplasmatischen Region von CD44 entsteht ein Transkriptionsfaktor, der die eigene Genexpression und die von anderen Molekülen regulieren kann (Okamoto, Kawano et al. 2001). Darüber hinaus wurden auch lösliche Formen von CD44 im Plasma von Mäusen (Kato, McCarthy et al. 1994), Schweinen (Yang und Binns 1993) und Menschen (Picker, Nakache et al. 1989; Ristamaki, Joensuu et al. 1994) gefunden.

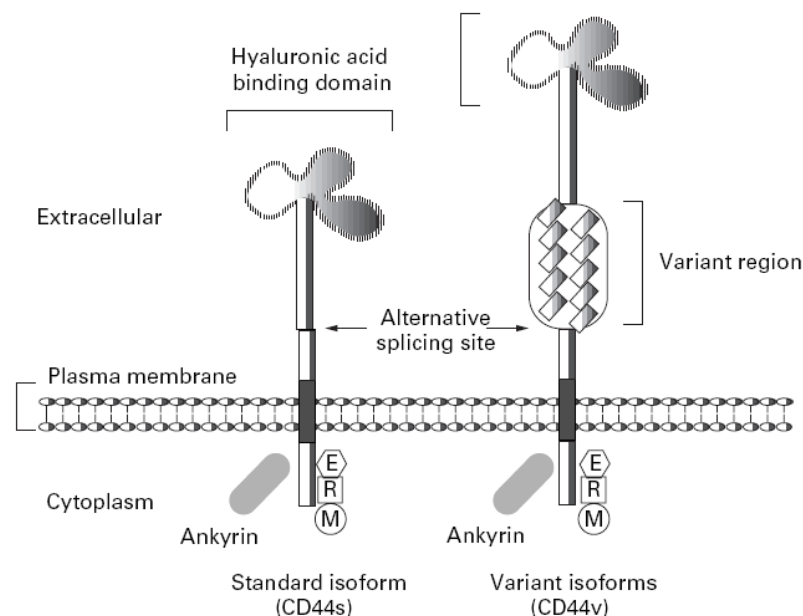


Abbildung 1-4 CD44-Proteinstruktur der Standardisoform und der varianten Isoformen (Goodison, Urquidi et al. 1999).

1.3.2 Rolle von CD44 und CD44-varianten Isoformen in Hämatopoese und Leukämie

Fehlfunktionen von CD44 wurden bereits für hämatologische Malignitäten, Autoimmunkrankheiten und in der Tumorentwicklung beschrieben (Hofmann, Rudy et al. 1991; Seiter, Arch et al. 1993; Naor, Sionov et al. 1997). Morphogenese und Organogenese hingegen waren in CD44-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt und sie entwickelten sich normal. In diesen CD44-defizienten Mäusen konnten jedoch Beeinträchtigungen in der Rezirkulierung von Lymphozyten in den adulten Thymus beobachtet werden, die Entwicklung der Lymphozyten war aber unverändert (Protin, Schweighoffer et al. 1999). Das Fehlen von CD44 in der frühen Entwicklung konnte also durch andere Mechanismen kompensiert werden. Demgegenüber steht das eher transiente und weniger starke Expressionsprofil der CD44-Varianten. Für diese wird vermutet, dass genetische Deletionen nicht kompensiert werden können, aufgrund ihrer nur vorübergehenden Expression.

CD44 ist auf allen reifen Blutzellen (Lesley, Hyman et al. 1993) und CD34⁺ hämatopoetischen Progenitoren zu finden (Lewinsohn, Nagler et al. 1990). Die CD44-Expression ist jedoch in CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark signifikant niedriger im Vergleich zu zirkulierenden CD34⁺ Zellen aus Nabelschnur- oder Peripherblut (Deguchi und Komada 2000). Myeloide und erythroide Vorläuferzellen sind CD34⁺ und CD44⁺, wohingegen ein Teil der B-Lymphozytenvorläufer CD34⁺ und CD44⁻ ist (Ghaffari, Dougherty et al. 1995; Deguchi und Komada 2000). Antikörper gegen CD44 und CD44v6 haben in humanen Langzeit-Knochenmarkkulturen die Myelopoese inhibiert (Moll, Khaldoyanidi et al. 1998). Weitere monoklonale Antikörper gegen Epitope von CD44v4 und CD44v6 stimulierten die Myelopoese und Antikörper gegen CD44v6 allein die Lymphopoese, indem diese auf Makrophagen aus dem Knochenmark wirkten und so die Produktion von GM-CSF (anti-CD44v4 und anti-CD44v6) und IL-6 (anti-CD44v6) stimulierten (Khaldoyanidi, Karakhanova et al. 2002).

Die Expression von CD44v10 ist nur in einer kleinen Subpopulation von reifen CD34⁻ myeloiden Zellen (4-8 %) zu finden. In chronischer myeloischer Leukämie (CML) zeigten die zirkulierenden neoplastischen myeloiden Vorläuferzellen eine hohe Expression von CD44 und auch die Expression von CD44v10 ist in diesen Zellen erhöht (Ghaffari, Dougherty et al. 1995). Mononukleäre Zellen aus Knochenmark und

Peripherblut, sowie CD34⁺ Zellen aus Knochenmark zeigen keinerlei durchflusszytometrisch detektierbare CD44-Varianten-Expression, im Gegensatz zu Blasten aus Patienten mit AML, in denen eine CD44v3- (13 %), v4- (67 %), v5- (19 %), v6- (7 %) und v7-Expression (in 65 % der Patienten) zu finden ist (Bendall, Bradstock et al. 2000). Ein viel komplexeres Profil der CD44-Varianten-Expression in leukämischen Proben im Gegensatz zu normalen hämatopoetischen Zellen konnte mittels RT-PCR und Southern Blot gezeigt werden (Bendall, Bradstock et al. 2000). Eine starke CD44v6-Expression, mehr als 20 %, korrelierte in Patienten mit AML mit einem kürzeren Überleben dieser Patienten und könnte daher als prognostischer Faktor in AML dienen (Legras, Gunthert et al. 1998). Monoklonale aktivierende Antikörper gegen CD44 (H90 und A3D8) induzierten die terminale Differenzierung in den AML-Zelllinien THP-1, HL-60 und NB-4 und inhibierten deren Proliferation (Charrad, Gadhoum et al. 2002). Ursache für den Zellzyklusarrest in AML-Zellen ist die Stabilisierung des zyklin-abhängigen Kinaseinhibitors p27^{kip1} (Gadhoum, Leibovitch et al. 2004). Darüber hinaus induzierte A3D8 Apoptose in THP-1, HL-60 und besonders in NB-4 (Charrad, Gadhoum et al. 2002). H90 konnte auch die leukämische Repopulation in NOD/SCID-Mäusen reduzieren, nachdem diesen LSCs aus AML-Patienten injiziert wurden (Jin, Hope et al. 2006). Ursachen hierfür waren unter anderem ein gestörter Transport der LSCs zu ihren schützenden Nischen und eine Veränderung des Schicksals der LSCs.

Die Serumspiegel von löslichem CD44 und löslichem CD44v6 waren signifikant erhöht in B-Zell chronisch lymphatischer Leukämie (B-CLL) (Eisterer, Bechter et al. 2004). Diese erhöhten Werte waren mit einer fortgeschrittenen Erkrankung verbunden. Erhöhte Werte an löslichem CD44 wurden auch in Patienten mit Hodgkin-Lymphom, Non-Hodgkin-Lymphom, Burkitt-Lymphom und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) gefunden, aber nicht in Patienten mit AML im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tacyildiz, Cavdar et al. 2001). In CML und in Lymphomen konnte mittels RT-PCR mRNA, die CD44v6-v10, enthielt detektiert werden nicht aber in der Kontrollgruppe (Akisik, Bavbek et al. 2002). Es wird daher vermutet, dass die Expression von CD44v6-v10, mit hämatologischen Malignitäten assoziiert sein kann.

1.3.3 CD44-Hyaluronsäure-Interaktion

Hyaluronsäure, ein Glykosaminoglykan, ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (Lee und Spicer 2000) und kommt als langkettiges, lineares Polysaccharid vor. Aufgebaut ist es aus Disaccharidbausteinen, die aus 2 Glucosederivaten bestehen: D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin, die über alternierende β -1,4- und β -1,3- glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind (Abbildung 1-5).

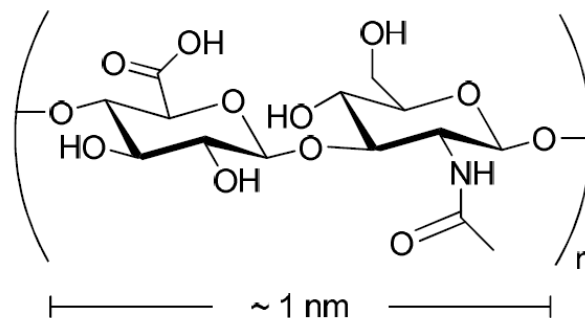


Abbildung 1-5 Aufbau von Hyaluronsäure: Poly(β -D-Glucuronsäure-[1 $\rightarrow$ 3]- β -N-Acetyl-D-Glucosamin-[1 $\rightarrow$ 4]-).

Gebunden wird Hyaluronsäure von einer Reihe von Proteinen, die Hyaladherine genannt werden. Die Interaktion von Hyaluronsäure mit diesen Proteinen ist an einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie beispielsweise Wundheilung, Entzündung, Tumorwachstum und Zellproliferation beteiligt (Evanko, Angello et al. 1999; Morra 2005; Jiang, Liang et al. 2007). Einer der wichtigsten und am besten untersuchten Rezeptoren ist aber CD44 (Aruffo, Stamenkovic et al. 1990; Lesley, Hyman et al. 1993; Isacke und Yarwood 2002; Lesley, English et al. 2002). Die Bindung von Hyaluronsäure wird durch die CD44-Standardisoform (CD44s) vermittelt, kann aber durch das Einfügen von variablen Exons und/oder den Grad an Glykosylierung moduliert werden (Skelton, Zeng et al. 1998). Obwohl mehrere CD44-Varianten Hyaluronsäure binden können, sind diese Interaktionen aber schwächer im Vergleich mit der Bindung zwischen Hyaluronsäure und CD44s (Bennett, Modrell et al. 1995). Grund für die schwächere Bindung der CD44-Varianten an Hyaluronsäure ist ihr höherer Grad an Glykosylierung, welcher somit ein wichtiger Faktor in der Regulierung der Hyaluronsäure-Bindungsaktivität darstellt (Bennett, Modrell et al. 1995; Katoh, Zheng et al. 1995; Lesley, English et al. 1995). Darüber hinaus regulieren auch Mitogene und die Phosphorylierung spezifischer Serinreste in der zytoplasmatischen Region die Affinität von CD44 zu Hyaluronsäure (Naor, Sionov et

al. 1997). In CD34⁺ hämatopoetischen Progenitoren beispielsweise, verstärken unter anderem Zytokine, wie GM-CSF, IL-3 und SCF die CD44-vermittelte Adhäsion an Hyaluronsäure (Legras, Levesque et al. 1997). Die Bindung von CD44 an Hyaluronsäure kann konstitutiv, induzierbar z.B. mit Antikörpern (Lesley, Kincade et al. 1993) oder nichtexistent sein. Eine erfolgreiche Bindung von CD44 an Hyaluronsäure benötigt 3 bis 5 Dissaccharidbausteine und lokale ionische Wechselwirkungen zwischen Hyaluronsäure und Arginin und Tyrosin von CD44 (Bajorath, Greenfield et al. 1998). CD44 kann nicht nur Hyaluronsäure binden, der Rezeptor reguliert auch die Homöostase von Hyaluronsäure, indem es deren Aufnahme in die Zelle mittels Endozytose vermittelt (Culty, Nguyen et al. 1992; Knudson, Chow et al. 2002). Auch die Aktivität der Hyaluronidasen, die die Hyaluronsäure abbauen, ist abhängig von CD44 (Harada und Takahashi 2007).

Damit Leukozyten aus dem Blutgefäß ins Gewebe wandern können (Homing), müssen sie zunächst entlang des Gefäßendotheliums rollen (Picker und Butcher 1992). Dieses Rollen wird unter anderem auch von CD44 vermittelt, das an Hyaluronsäure bindet, die auf der Oberfläche von Endothelzellen gebunden ist (DeGrendele, Estess et al. 1996). Clark *et al.* konnten zeigen, dass auch das Rollen von Lymphozyten auf tonsillären Stromazellen abhängig ist von den Interaktionen zwischen CD44 und Hyaluronsäure, indem sie das Rollen mithilfe von monoklonalen CD44-Antikörpern, löslicher Hyaluronsäure und Hyaluronidase-Behandlung des Substrates reduzieren konnten (Clark, Alon et al. 1996). Weiterhin ist die Bindung von CD44 und Hyaluronsäure bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren beteiligt, z.B. beim Dickdarmkrebs (Kim, Wheeler et al. 2004). Eine humane Melanomzelllinie, die mit CD44s transfiziert wurde, zeigte eine verstärkte Motilität auf Oberflächen, die mit Hyaluronsäure beschichtet wurden (Thomas, Byers et al. 1992). Somit spielt CD44 eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellmigration auf Hyaluronsäure. Eine Studie mit einer humanen Pankreaskarzinomzelllinie zeigte, dass die Tumorzellen Hyaluronidasen sekretierten, die Hyaluronsäureoligomere (low molecular weight HA) bildeten, die wiederum die Spaltung von CD44 und somit die Tumorzellmotilität verstärkten (Sugahara, Hirata et al. 2006).

CD44 und Hyaluronsäure sind ebenfalls essentiell für das Homing und Engraften von CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen in das Knochenmark und die Milz von NOD/SCID-Mäusen (Avigdor, Goichberg et al. 2004). Zusätzlich verstärkt die

Interaktion von CD44 und Hyaluronsäure die Hämatopoese, indem nach der Bindung von Hyaluronsäure an CD44-Rezeptoren auf Knochenmarkmakrophagen IL-1 β ausgeschüttet wird (Khalidoyanidi, Moll et al. 1999).

1.4 Ziel der Arbeit

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in alle Blutzellbestandteile. Weiterhin sind sie durch eine niedrige Proliferationsrate charakterisiert. Diese Funktionen werden durch ein spezielles Mikromilieu im Knochenmark, die Stammzellnische, reguliert, wobei eine Verdrängung aus der Nische mit dem Verlust der Stammzeleigenschaften einhergeht. Für die Regulation der Stammzellen in ihrer Nische spielen eine Vielzahl von Molekülen, unter anderem Chemokine und Chemokinrezeptoren, aber auch Adhäsionsmoleküle wie CD44, eine wichtige Rolle. Leukämische Stammzellen (LSCs) scheinen im Hinblick auf die niedrige Proliferationsrate und den Schutz durch eine Stammzellnische ähnliche Eigenschaften wie HSCs zu besitzen. Dies könnte auch erklären, warum die LSCs im besonderen Maße therapieresistent sind.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss der CD44-Standardisoform (CD44s) und der CD44-varianten Isoformen (CD44v) auf die Interaktion von HSCs und LSCs mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und Hyaluronsäure, als Bestandteilen der Stammzellnische, untersucht werden. Zu diesem Zweck sollen zunächst verschiedene Subpopulationen von humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut, mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark, sowie von leukämischen Stammzellkandidaten aus Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (CD34⁺, CD34⁺/CD38⁻, ALDH⁺, ALDH⁺/CD34⁺ und SDF) anhand ihrer CD44s- und CD44v-Expression charakterisiert werden. Im Anschluss daran soll unter Verwendung von Kokulturversuchen mit MSCs der Einfluss von CD44s und CD44-varianten Isoformen auf den Selbsterhalt und die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollen auch verschiedene Antikörper gegen CD44s und die CD44-varianten Isoformen zum Einsatz kommen. Des Weiteren soll die Bedeutung von CD44s und CD44-varianten Isoformen im Hinblick auf die Adhäsion und das Rolling von hämatopoetischen Vorläuferzellen und leukämischen Zellen von Zelllinien an MSCs und Hyaluronsäure untersucht und bewertet werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen besseren Einblick in die unterschiedlichen Regulationsmechanismen von HSCs und LSCs in ihrer Nische und die Bedeutung von CD44s und CD44-varianten Isoformen für die Aufrechterhaltung von deren Stammzeleigenschaften zu erhalten. Die erzielten Ergebnisse könnten langfristig gesehen sowohl auf die Transplantation von HSCs, als auch auf die Leukämietherapie Einfluss haben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Hersteller

Die verwendeten Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen. Ihre jeweiligen Standorte sind dahinter angegeben.

Aldagen Inc.	Durham, NC, USA
AppliChem GmbH	Darmstadt
Applied Biosystems Inc.	Carlsbad, CA, USA
ATCC Cell Biology Collection	Wesel
B. Braun Melsungen AG	Melsungen
BD Biosciences	Heidelberg
BD Pharmingen	Heidelberg
Becton Dickinson	Heidelberg
Bender MedSystems GmbH	Wien, Österreich
Biochrom AG	Berlin
Biometra GmbH	Göttingen
Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Carl Zeiss Jena GmbH	Jena
Corning Holding GmbH	Wiesbaden
Dako Deutschland GmbH	Hamburg
DSMZ GmbH	Braunschweig
Eppendorf AG	Hamburg
Eurofins MWG Operon GmbH	Ebersberg
Febrikon Feinmechanik GmbH	Köln
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Fluka Chemi AG	Taufkirchen
GATC Biotech AG	Konstanz

Genzyme Virotech GmbH	Rüsselsheim
GraphPad Software Inc	San Diego, CA, USA
Heraeus Instruments GmbH	Osterode
Integra Biosciences GmbH	Fernwald
Invitrogen GmbH	Darmstadt
J.T. Baker	Deventer, Niederlande
Kendro Laboratory Products GmbH	Langenselbold
Lonza Group AG	Basel, Schweiz
Merck	Darmstadt
Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach
Molecular Devices GmbH	Ismaning
Molecular Probes Inc.	Eugene, OR, USA
Neupogen®	München
Nikon GmbH	Düsseldorf
Olympus Deutschland GmbH	Hamburg
Olympus Soft Imaging Solutions GmbH	Münster
PAA Laboratories GmbH	Cölbe
PeqLab Biotechnologie GmbH Biotechnik	Erlangen
PI Physikinstrumente GmbH & Co.	Karlsruhe
Qiagen GmbH	Hilden
Ratiopharm GmbH	Ulm
R&D Systems GmbH	Wiesbaden
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk	Trittau
Schott AG	Mainz
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen
Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode
Southern Biotechnology Associates Inc.	Birmingham, AL, USA
Stemcell Technologies	Vancouver, BC, Kanada

2.1.2 Primärmaterial

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) wurden aus Nabelschnurblut (NB), mobilisiertem Peripherblut (PB) und Knochenmark (KM) isoliert. Mesenchymale Stammzellen (MSCs) wurden aus Knochenmark gewonnen. Leukämische Stammzellen (LSCs) wurden aus Knochenmark und Peripherblut von Patienten mit neudiagnostizierter akuter myeloischer Leukämie (AML) isoliert. Bei jedem verwendeten Patientenmaterial lag eine schriftliche Aufklärung, sowie das Einverständnis des Spenders entsprechend der Richtlinien der Universität Heidelberg vor. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Heidelberg war gegeben.

2.1.2.1 Nabelschnurblut

Nabelschnurblut wurde von der Klinik Sankt Elisabeth Heidelberg, der Universitätsfrauenklinik Heidelberg und dem Universitätsklinikum Mannheim zur Verfügung gestellt. Die Abnahme der Proben erfolgte direkt nach termingerechter Entbindung von gesunden Neugeborenen von den jeweils tätigen Hebammen. Das Nabelschnurblut wurde durch Kompression der Vena umbilicalis in Richtung Abnabelungsschnitt in ein 50 ml Röhrchen überführt. Zur Antikoagulation wurden pro Röhrchen jeweils 10 ml PBS mit 10% Heparin/Natrium2500 vorgelegt. Die Zwischenlagerung erfolgte bei 4-8°C bis die Proben weiter verarbeitet wurden.

2.1.2.2 Mobilisiertes Peripherblut

2.1.2.2.1 Mobilisierung mit G-CSF

Mobilisiertes Peripherblut wurde von freiwilligen, gesunden Spendern gewonnen, die sich zur Zellspende für eine allogene Stammzelltransplantation bereiterklärt haben. Zur Mobilisierung wurden dem Spender 4 Tage lang 10 µg/kg Körpergewicht G-CSF verabreicht. Anschließend wurden dem Patienten im Rahmen einer Leukapherese in der Medizinischen Klinik V eine Probe von 20-60 ml periphervenösen Blutes entnommen. Das Blut wurde in eine Na-Heparin-haltige Monovette überführt und durch Inversion mit dem Antikoagulant gemischt. Die Weiterverarbeitung erfolgte umgehend.

2.1.2.2.2 Mobilisierung mit Plerixafor

Im Rahmen einer Phase IIIb Studie in der Medizinischen Klinik V, in der die Mobilisierung mit Plerixafor (AMD3100) plus G-CSF in Patienten mit Multiplem Myelom, Hodgkin- oder Non-Hodgkin-Lymphom untersucht werden sollte, wurde mobilisiertes Peripherblut von 8 Patienten mit Multiplem Myelom im Stadium IIIA nach Durie und Salmon (Durie und Salmon 1975) für verschiedene Untersuchungen der Forschung zur Verfügung gestellt. Zur Mobilisierung erhielten die Patienten 4 Tage lang 10 µg/kg Körpergewicht G-CSF, gefolgt von einer Gabe Plerixafor (240 µg/kg Körpergewicht) spät am Abend von Tag 4. Die erste Probenentnahme von periphervenösem Blut erfolgte am Abend von Tag 4, 1 h vor der Gabe von Plerixafor. Am Morgen von Tag 5 wurde eine weitere Injektion von G-CSF verabreicht. 10 h nach Plerixaforgabe wurde erneut periphervenöses Blut abgenommen und die Leukapherese durchgeführt. Das vor und nach Plerixafor entnommene Blut wurde jeweils in eine Na-Heparin-haltige Monovette überführt und durch Inversion mit dem Antikoagulant gemischt. Die Weiterverarbeitung erfolgte umgehend.

2.1.2.3 Knochenmark

Knochenmark von freiwilligen, gesunden Spendern wurde durch Punktion der Crista iliaca gewonnen. Unter Lokalanästhesie wurde hierzu die Corticalis mit einer Punktionsnadel durchbohrt und Knochenmark mittels kontinuierlicher Aspiration gewonnen. Dazu wurden 20 ml Spritzen verwendet, die bereits 10.000IE Heparin enthielten. Knochenmark und Antikoagulant wurden durchmischt und die Probe umgehend weiterverarbeitet.

2.1.2.4 Peripherblut und Knochenmark von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

Knochenmark und Peripherblut von Patienten mit neudiagnostizierter AML wurden, wie bereits für gesundes Knochenmark und Peripherblut beschrieben, gewonnen und umgehend weiterverarbeitet.

2.1.3 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (siehe Tabelle 1) stammen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH und der ATCC Cell Biology Collection.

Tabelle 1 Leukämische Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung
HL-60	humane akute myeloische Leukämie
Jurkat	humane T-Zell-Leukämie
Kasumi-1	humane akute myeloische Leukämie
K-562	humane chronische myeloische Leukämie in Blastenkrise
KG-1a	humane akute myeloische Leukämie
NB-4	humane akute promyelozytische Leukämie

2.1.4 Kulturmedien

2.1.4.1 HSC-Medium (LTBMC-Medium)

Zur Kultivierung der aus Nabelschnurblut, mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark isolierten HSC, diente Long-term Bone Marrow Culture Medium (LTBMC) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 Zusammensetzung des LTBMC-Mediums für HSC

Komponente	Konzentration	Hersteller
IMDM	75 %	PAA Laboratories GmbH
FCS	12,5 %	Stemcell Technologies
Horse Serum	12,5 %	Stemcell Technologies
Penicillin/Streptomycin	1 %	PAA Laboratories GmbH
Hydrocortison 100	0,05 %	Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk
L-Glutamin	1 %	PAA Laboratories GmbH
Flt-3L	10 ng/ml	R&D Systems GmbH
TPO	10 ng/ml	R&D Systems GmbH

2.1.4.2 MSC-Medien

2.1.4.2.1 *Medium-1 (7er Medium)*

Medium-1 (M1 bzw. 7er Medium) wurde nach Reyes *et al.* hergestellt (Zhao, Duan *et al.* 2002) (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Zusammensetzung des 7er Mediums für MSC

Komponente	Konzentration	Hersteller
DMEM Low Glucose	60 %	PAA Laboratories GmbH
MCDB-201 Basismedium	38 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FCS (ESC tested)	2 %	Stemcell Technologies
L-Glutamin 200 mM	2 mM	PAA Laboratories GmbH
Penicillin 10.000 U/ml + Streptomycin 10 mg/ml	100 U/ml	PAA Laboratories GmbH
Insulin 1,0 mg/ml + Transferin 0,55 mg/ml + Selen 0,5 µg/ml Liquid Media Supplement	1 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Linolensäure	1 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dexamethason (in PBS)	20 nM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Ascorbinsäure (in PBS)	0,1 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PDGF-bb	10 ng/ml	R&D Systems GmbH
EGF	10 ng/ml	R&D Systems GmbH

2.1.4.2.2 *Medium-2 (6er Medium)*

Medium-2 (M2 bzw. 6er Medium) ist das kommerziell erhältliche Medium MSCGM™ (mesenchymal stem cell growth media) von der Lonza Group AG. Es besteht aus Basalmmedium (MSCBM) zusammen mit 4 mM L-Glutamin, 0,5 ml Penicillin/Streptomycin und 50 ml Growth Supplement (MCGS) (siehe Tabelle 4). Laut Angaben der Firma enthält es 10 % FCS.

Tabelle 4 Zusammensetzung des 6er Mediums für MSC

Komponente	Konzentration
MSCBM	90 %
MCGS	10 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
L-Glutamin	4 mM

2.1.4.2.3 *Medium-3 (PL-Medium)*

Medium-3 (M3 bzw. PL-Medium) wurde nach dem Protokoll von Kocaoemer *et al.* in der Forschungsgruppe von Dr. Bieback in Mannheim hergestellt (Kocaoemer, Kern *et al.* 2007) (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 Zusammensetzung des PL-Mediums für MSC

Komponente	Konzentration	Hersteller
DMEM		PAA Laboratories GmbH
L-Glutamin	2 mM	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml	PAA Laboratories GmbH
Heparin 2500 I.E.	500 U/μl	B. Braun Melsungen AG
HPL	10 %	Mannheim Start up MSC Projekt

Das humane Plättchenlysate (HPL) wurde aus der Kooperation im Rahmen des nationalen MSC START-UP Projekts von der Universitätsklinik Mannheim bereitgestellt und dient dort als Grundlage für weitere national vereinheitlichte Stammzellforschung. Das Medium enthält ausschließlich Substanzen aus humanem Material.

2.1.4.3 Zelllinien-Medium

Tabelle 6 Zusammensetzung des Mediums für Zelllinien

Komponente	Konzentration	Hersteller
RPMI 1640	88 %	PAA Laboratories GmbH
FCS	10 %	PAA Laboratories GmbH
L-Glutamin	1 %	PAA Laboratories GmbH

Komponente	Konzentration	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	1 %	PAA Laboratories GmbH

2.1.4.4 Adhäsionsmedien

2.1.4.4.1 *Adhäsionsmedium für Objektträgerassay*

Tabelle 7 Zusammensetzung des Adhäsionsmediums für Objektträgerassay

Komponente	Konzentration	Hersteller
IMDM	79 %	PAA Laboratories GmbH
FCS	20 %	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin	1 %	PAA Laboratories GmbH

2.1.4.4.2 *Adhäsionsmedium für 96-Well-Assay*

Tabelle 8 Zusammensetzung des Adhäsionsmediums für 96-Well-Assay

Komponente	Konzentration	Hersteller
RPMI 1640 phenolrotfrei	88 %	PAA Laboratories GmbH
FCS	10 %	PAA Laboratories GmbH
L-Glutamin	1 %	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin	1 %	PAA Laboratories GmbH

2.1.5 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Merck
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH
Aqua	B. Braun Melsungen AG
Argininsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
BD FACSClean™	BD Biosciences
BD FACSTlow™	BD Biosciences
BD FACSRinse™	BD Biosciences
Biocoll Separation Solution	Biochrom AG
Borsäure	J. T. Baker
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH

Caspase Inhibitor ZVAD-FMK (20 mM)	R&D Systems GmbH
Chloroform	Fluka Chemie AG
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH
D-PBS	PAA Laboratories GmbH
EDTA	AppliChem GmbH
Ethanol (Rotipuran $\geq 99,8$ % p.a.)	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
FBS Gold	PAA Laboratories GmbH
Fluoromount-G	Southern Biotechnology Associates Inc.
G-CSF	Neupogen®
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH
Glykogen	Roche Diagnostics GmbH
Heparin/Natrium2500	Ratiopharm GmbH
Hoechst 33342	Roche Diagnostics GmbH
Hyaluronsäure aus Nabelschnüren	Fluka Chemie AG
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH
O´Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Plerixafor	Genzyme Virotech GmbH
Propidiumiodid	BD Pharmingen
RNase out	Qiagen
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trizma	Carl Roth GmbH
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH

2.1.6 Primer

Die für die Standard-PCR und die Real-time PCR verwendeten Primer wurden mittels der Primer3-Software entworfen und von der Firma Eurofins MWG Operon GmbH synthetisiert.

2.1.6.1 Standard-PCR

Tabelle 9 Primer für Standard-PCR

Primer	Sequenz (5'→3')	Schmelztemperatur
CD44s_for	AATGCCTTTGATGGACCAAT	59.25 °C
CD44s_rev	TGTTTGCTCCACCTTCTTGA	59.41 °C
CD44v2_rev	GGTTTCTTGCCTCTTGGTTG	59.71 °C
CD44v3_rev	CATCAATGCCTGATCCAGAA	59.60 °C
CD44v4_rev	GATTTGAATGGCTTGGGTTC	59.37 °C
CD44v5_rev	TGGGTTCCAGTTTCCTTCAT	59.38 °C
CD44v6_rev	CGAATGGGAGTCTTCTCTGG	59.80 °C
CD44v7_rev	TGTTGTCCTTCCTTGCATTG	59.69 °C
CD44v8_rev	AGAGGTCCTGTCCTGTCCAA	59.68 °C
CD44v9_rev	TCTTCCAAGCCTTCATGTGAT	59.69 °C
CD44v10_rev	TCCTTCGTGTGTGGGTAATG	59.41 °C
GAPDH_for	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	58,4 °C
GAPDH_rev	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	60,5 °C

2.1.6.2 Real-time PCR

Tabelle 10 Primer für Real-time PCR

Primer	Sequenz (5'→3')	Produktgröße	Schmelztemperatur
CD44pan	for TCCAACACCTCCCAGTATGA	83 bp	58.93 °C
	rev GGCAGGTCTGTGACTGATGT		58.67 °C

Primer	Sequenz (5'→3')	Produktgröße	Schmelztemperatur
CD44v2	for CAAGAAACCTGGGATTGGTT rev CAGCCATTTGTGTTGTTGTG	82 bp	58.88 °C 58.60 °C
CD44v3	for GGGAGCCAAATGAAGAAAAT rev TGCCTGATCCAGAAAACTG	63 bp	58.11 °C 58.85 °C
CD44v4	for GGCTTTTGACCACACAAAAC rev GATTTGAATGGCTTGGGTTC	62 bp	58.10 °C 59.37 °C
CD44v5	for GAAGGAAACTGGAACCCAGA rev GATGCTCATGGTGAATGAGG	52 bp	59.11 °C 59.04 °C
CD44v6	for CCCAGAAGGAACAGTGGTTT rev TGGGAGTCTTCTCTGGGTGT	70 bp	59.04 °C 59.68 °C
CD44v7	for CTCATACCAGCCATCCAATG rev TCAGTCCAGGAACTGTCCTCT	64 bp	58.95 °C 58.88 °C
CD44v8	for CAGCCTACTGCAAATCCAAA rev TGTCTGTCCAAATCTTCCA	51 bp	58.92 °C 59.06 °C
CD44v10	for CCTCTCATTACCCACACACG rev GAGGTCACTGGGATGAAGGT	52 bp	59.01 °C 58.95 °C
GAPDH	for TTCGTCATGGGTGTGAACCA rev CTGTGGTCATGAGTCCTTCCA	142 bp	58,4 °C 60,2 °C

Primer	Sequenz (5'→3')	Produktgröße	Schmelztemperatur
ALDH A1	for CTGAAATGTGACCCCCAAG	274 bp	57,5 °C
	rev GCAGACATGACATCCTAGG		57,5 °C

2.1.7 Antikörper für Durchflusszytometrie und Immunofluoreszenz

Tabelle 11 Antikörper für Durchflusszytometrie und Immunofluoreszenz

Antikörper	Clone	Konjugat	Konzentration	Hersteller
CD44 Mouse IgG2b,k	G44-26	PE APC	-	BD Pharmingen
CD44 Mouse IgG1	A3D8	-	200 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
CD44var (v3) Mouse IgG1	VFF-327v3	Biotin	104 µg/ml	Bender MedSystems GmbH
CD44var (v4) Mouse IgG1	VFF-11	Biotin FITC	100 µg/ml 130 µg/ml	Bender MedSystems GmbH
CD44var (v5) Mouse IgG1	VFF-8	Biotin	52 µg/ml	Bender MedSystems GmbH
CD44var (v6) Mouse IgG1	VFF-7	Biotin FITC	104 µg/ml 104 µg/ml	Bender MedSystems GmbH
CD44var (v7) Mouse IgG1	VFF-9	Biotin FITC	100 µg/ml 182 µg/ml	Bender MedSystems GmbH
P27/Kip1 Mouse IgG2B	225501	-	500 µg/ml	R&D Systems GmbH
CD11b/Mac-1 Mouse IgG1k	ICRF44	PE	-	BD Pharmingen
CD34 Mouse IgG1k	8G12	FITC PE PerCP APC	25 µg/ml 25 µg/ml 50 µg/ml 100 µg/ml	Becton Dickinson
CD38 Mouse IgG1, κ	HB7	FITC PE APC	6 µg/ml 12,5 µg/ml 25 µg/ml	Becton Dickinson

Antikörper	Clone	Konjugat	Konzentration	Hersteller
CD45	2D1	APC-H7	100 µg/ml	Becton Dickinson
CD3	SK7	FITC	-	Becton Dickinson
Streptavidin PE	-	PE	-	Becton Dickinson
Streptavidin FITC	-	FITC	0,5 mg/ml	BD Pharmingen
Streptavidin APC	-	APC	-	Becton Dickinson
goat anti-mouse IgG (γ) FITC	-	FITC	900 µg/ml	Invitrogen GmbH
chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 488	-	Alexa 488	2 mg/ml	Molecular Probes Inc.
Isotypkontrolle Purified mouse IgG1, κ	MOPC-31C	-	0,5 mg/ml	BD Biosciences

2.1.8 Kits und Farbstoffe

Tabelle 12 Kits und Farbstoffe

Kit	Hersteller
ALDEFLUOR Reagent	Aldagen Inc.
Annexin-V-Fluos	Roche Diagnostics GmbH
BD Parm Lyse™	Becton Dickinson
CD34 MicroBead Kit	Miltenyi Biotech GmbH
Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
CFDA-SE	Sigma Aldrich Chemie GmbH
CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit	Becton Dickinson
Fluoromount-G	Southern Biotechnology Associates Inc.
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems Inc.
HotStar Taq Plus DNA Polymerase	Qiagen GmbH
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma Aldrich Chemie GmbH

Kit	Hersteller
Power SYBR® Green PCR Mastermix	Applied Biosystems Inc.
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH
TRIZOL® Reagent	Invitrogen GmbH
Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain	Invitrogen GmbH

2.1.9 Puffer und Lösungen

HBS-Puffer: 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5

Inkubationspuffer für Annexin V/Pi-Färbung: 10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂

5x TBE-Puffer (Laufpuffer für Gelelektrophorese): 445 mM (53,9 g) Trizma, 445 mM (27,5 g) Borsäure, 7,79 mM (2,9 g) EDTA

MACS-Puffer: 98,6 % PBS, 1 % FCS, 0,4 % EDTA

2.1.10 Geräte und Zubehör

AutoMACS™ Separator	Miltenyi Biotech GmbH
AutoMACS separation columns	Miltenyi Biotech GmbH
BD FACSCalibur™ Flow Cytometer	BD Biosciences
BD FACScan™ Flow Cytometer	BD Biosciences
BD FACS-Vantage SE® Cell Sorter	BD Biosciences
BioDoc Analyze Geldoku	Biometra GmbH
Brutschrank 'Hera cell' 150	Kendro Laboratory Products GmbH
Colorview-12 Kamera	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH
Diagnostic Microscope Slides (8 Wells, 6 mm, numbered)	Thermo Scientific Menzel
DNA Engine® Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
Elisa plate reader	Molecular Devices GmbH
Gelkammer	Febrikon Feinmechanik GmbH
Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific
Multifuge 3S-R	Heraeus Instruments GmbH

Nano Drop ND-1000 (UV/VIS-Spektralphotometer)	PeqLab Biotechnologie GmbH Biotechnik
Nexterion B®-Glasobjektträger	Schott AG
Olympus IX70	Olympus Deutschland GmbH
PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH
Press-to-Seal™ silicone isolator (with adhesive, eight wells, 9 mm diameter, 1.0 mm deep)	Invitrogen GmbH
Sigma 1-15PK Mikrokühlzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH
StepOne™ Plus Real-time PCR System	Applied Biosystems Inc.
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus Instruments GmbH
TE-2000	Nikon GmbH
Transwell (6.5 mm Diameter, 0.4 µm and 3.0 µm Pore size)	Corning Holding GmbH
Vacusafe comfort	IBS Integra Biosciences
Zeiss Immersionsöl 518N	Carl Zeiss Jena GmbH

2.1.11 Software

Biodoc Analyze	Biometra GmbH
Cell [^] F	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH
Cell [^] P	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH
CellQuest 3.3	BD Biosciences
ChromasPro Version 1.34	http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html
Entrez cross database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc.
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/
MultAlign	http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin
NIS-Elements	Nikon GmbH
PI Micromove	PI Physikinstrumente GmbH & Co.
Primer3 : WWW primer tool	http://biotools.unassmed.edu/bioapps/primer3 www.cgi

StepOne™ Plus Real-time Applied Biosystems Inc.
PCR Software

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von HSCs

Die Isolierung der humanen HSCs aus den verschiedenen Ausgangsmaterialien erfolgte durch eine Kombination aus Dichtegradientenzentrifugation und anschließender magnetischer Zellseparation.

2.2.1.1 Gewinnung mononukleärer Zellen aus NB, mPB und KM

Die Gewinnung mononukleärer Zellen (MNCs) aus NB, mPB und KM erfolgte, abhängig vom weiteren Verwendungszweck der MNCs, entweder mittels Dichtegradientenzentrifugation oder Erythrozytenlyse.

2.2.1.1.1 *Dichtegradientenzentrifugation*

Mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll (Ficoll) Separation Solution können die verschiedenen Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt und damit separiert werden. Man erhält 3 voneinander getrennte Schichten: Die obere Schicht besteht aus einem Serum/Biocoll-Gemisch, die mittlere aus den MNCs und die untere aus Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten.

In ein mit 20 ml Biocoll Separation Solution vorgelegtes 50 ml Röhrchen wurden 30 ml Vollblut, welches gegebenenfalls mit PBS verdünnt wurde, aufgeschichtet, so dass ein Zweiphasengemisch entstand. Anschließend wurde das Röhrchen 20 min bei einer Geschwindigkeit von 950 x g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde der Interphasenring mit den MNCs vorsichtig abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und bei 580 x g bei RT für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Zellpellet resuspendiert und das Röhrchen anschließend mit MACS-Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Parallel dazu wurde ein Teil der Zellsuspension entnommen und die Zellzahl bestimmt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mittels magnetischer Zellseparation.

2.2.1.1.2 Erythrozytenlyse

Die Erythrozytenlyse mittels BD Parm Lyse™-Reagenz von BD bietet gegenüber der Dichtegradientenzentrifugation den Vorteil, dass in den MNCs auch Granulozyten enthalten sind, die für bestimmte Fragestellungen auch analysiert wurden.

1 ml Vollblut wurde mit 10 ml 1x Lysing Buffer versetzt, gevortext und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Vor jeder Benutzung musste zunächst der 10x Lysing Buffer mit destilliertem Wasser 1:10 auf Arbeitskonzentration verdünnt werden. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation (580 x g, 7 min, RT). Der Überstand wurde abgekippt, das Zellpellet resuspendiert und die Zellen zweimal in MACS-Puffer gewaschen (580 x g, 7 min, RT). Danach wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen je nach Folgeversuch weiter verarbeitet.

2.2.1.2 Magnetische Zellseparation

Die weitere Anreicherung von HSCs aus MNCs erfolgte mittels magnetischer Zellseparation unter Verwendung von magnetischen CD34 MicroBeads. Bei dieser Separationsmethode werden mithilfe eines magnetischen Feldes Zellen, die die CD34-Oberflächenmarker tragen, von denen getrennt, die diese nicht tragen.

Zunächst wurde zum resuspendierten Pellet aus MNCs zellzahlabhängig ein Blocking Reagent (100 µl/1x10⁸ Zellen) gegeben, zum Blockieren unspezifischer Bindestellen. Anschließend wurden die CD34 MicroBeads (100 µl/1x10⁸ Zellen) dazu pipettiert und der Ansatz bei 4 °C im Kühlschrank für 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen in MACS-Puffer gewaschen und das Zellpellet in etwa 5 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die eigentliche Zellseparation erfolgte nun im AutoMACS™ Separator. Im Anschluss wurden die CD34-angereicherten HSCs gezählt und ihre Reinheit mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Fluorochrom-gekoppelten CD34-Antikörpern überprüft.

2.2.2 Isolierung von MSCs

Zunächst wurden MNCs aus dem Knochenmark von gesunden Spendern mit der eben beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.2.1.1.1) isoliert. Als nächstes machte man sich die Plastikadhärenz der MSCs zunutze, indem man die MNCs zellzahlabhängig (1x10⁶ Zellen pro Quadratzentimeter, minimal 1x10⁷ Zellen)

in 10 ml Medium in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführte und wartete bis sich die MSCs am Boden der Zellkulturflasche festgesetzt haben. Abhängig von der Geschwindigkeit, mit der sich die MSCs absetzten, wurde das Medium mit den nicht-adhären Zellen nach 5 bis 10 Tagen durch neues ersetzt.

2.2.3 Kultivierung von HSCs

Die aus NB, mPB oder KM angereicherten CD34⁺ Zellen wurden nach ihrer Isolierung in Long-term Bone Marrow Culture Medium (LTBMC) kultiviert. LTBMC wurde vor dem Gebrauch sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen bei 30°C wurde das Medium bei 1600 x g für 10 min bei RT zentrifugiert und nur der Überstand zur Kultivierung der Zellen verwendet. Die Kultivierung erfolgte in 6-, 12-, 24-, oder 96-Well-Platten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre.

2.2.4 Kultivierung von MSCs

MSCs wurden in 3 verschiedenen Medien kultiviert, um den Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen auf die Eigenschaften der MSCs zu untersuchen. 7er (Medium-1) und 6er Medium (Medium-2) enthielten FCS, während PL-Medium (Medium-3) humanes Plättchenlysat zugegeben wurde.

Bei der Kultivierung von MSCs in 7er Medium wurden initial je 7,5x10⁵ Zellen pro 75 cm² Kulturflasche ausgesät. Dies entspricht einer Dichte von 1x10⁴ Zellen/cm². Bei der Kultivierung in 6er und PL-Medium wurden initial 3,75x10⁵ Zellen pro 75 cm² Kulturflasche ausgesät, was einer Dichte von 5x10³ Zellen/cm² entspricht. Die Kultivierung der Zellkulturflaschen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre.

Das Passagieren der MSCs erfolgte bei 80-95 % Konfluenz, welche im 7er Medium nach 3-5 Tagen, in 6er und PL-Medium nach 5-7 Tagen erreicht wurde.

Dazu wurde das alte Medium zuerst vorsichtig aus den Flaschen pipettiert und die noch adhären Zellen mit warmem PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden 3 ml 0,25 % Trypsin-EDTA zugegeben. Nach 3-5 min hatten sich die MSCs vollständig vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und die Enzymreaktion des Trypsins wurde wie folgt abgestoppt: bei MSCs, die in 7er und 6er Medium kultiviert

wurden, erfolgte dies mit je 3 ml FCS und bei MSCs, die in PL-Medium kultiviert wurden, mit dem gleichen Medium, damit die Zellen nicht in Kontakt mit tierischem Serum kamen. Anschließend wurden die Zellen in Röhrchen überführt, die mit PBS aufgefüllt und bei 580 x g für 7 min bei RT zentrifugiert wurden. Parallel dazu wurde die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde der Überstand abgekippt, die Zellen in neues Medium aufgenommen und entsprechend der oben erwähnten Zellzahlen in neue 75 cm² Zellkulturflaschen überführt. Frisch passagierte MSC in PL-Medium wurden in frischem Medium zusammen mit 5 % altem Medium weiterkultiviert.

2.2.5 Kultivierung von Zelllinien

Die Suspensions-Zelllinien KG-1a, K-562, Jurkat, Kasumi-1, NB-4 und HL-60 wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in je 10 ml Zelllinien-Medium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer mit Wasserstoff gesättigten Atmosphäre kultiviert. Zunächst mussten dafür Kryoröhrchen mit tief eingefrorenen Zellen aller verwendeten Zelllinien aus Stickstoffbehältern entnommen und aufgetaut werden. Dazu wurde Kryoröhrchen in lauwarmem Wasser aufgetaut und der Inhalt in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt und mit 6 ml frischem Medium versetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um das restliche giftige DMSO zu beseitigen und die Zellen wurden jeweils in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Alle 3-4 Tage erfolgte das Passagieren der Zellen im Verhältnis 1:5.

2.2.6 Kryokonservierung von Zellen

Für eine spätere Verwendung wurden MSCs und Zellen von Zelllinien eingefroren.

Dazu wurden 1x10⁶ MSCs in je 500 µl zugehörigem Medium mit 400 µl FCS und 100 µl DMSO in Kryoröhrchen überführt. Im Gegensatz dazu wurden 1x10⁶ Zellen der jeweiligen Zelllinie in 800 µl FCS und 200 µl DMSO in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in ein Vorfriergefäß (Mr. Frosty) eingesetzt, dessen Doppelwand mit Isopropanol (RT) befüllt war. Im Vorfriergefäß erfolgte nun die Lagerung bei -80°C für 24 h (Abkühlrate in Isopropanol 1°C/ min). Zur Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen in mit flüssigem Stickstoff befüllte Behälter überführt.

2.2.7 Zellkulturassays

2.2.7.1 Kokultur von HSCs und MSCs

Für die Untersuchungen der Interaktionen von HSCs und MSCs wurde die gemeinsame Kokultur als ein Modell für die Stammzellnische im Knochenmark benutzt. Dazu wurden HSCs in ihrem Kultivierungsmedium auf einem MSC-Feederlayer (Monolayer aus MSCs) für maximal 7 Tage kultiviert, der zuvor durch Bestrahlen konserviert d.h. haltbar gemacht wurde.

2.2.7.1.1 Vorbereitung des MSC-Feederlayers

Für die Kokultur wurden initial 1×10^4 MSCs pro 96-Well und 3×10^4 MSCs pro 24-Well in jeweils 100 bzw. 400 μ l zugehörigem MSC-Medium ausgesät. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert bis die Wells nahezu konfluent bewachsen waren. Als nächstes wurden die Platten mit den MSCs in der Blutbank Heidelberg mit einer Gesamtstrahlendosis von 20 Gray in einem Cäsium-Irradiator bestrahlt. Nach ÜN-Kultivierung der Zellen bzw. nach mindestens 8 h wurde das Medium der bestrahlten gewechselt und sie konnten für die Kokulturversuche verwendet werden.

2.2.7.1.2 Durchführung der Kokultur

Nach der Vorbereitung des MSC-Feederlayers, wurde das MSC-Medium entfernt und pro 96-Well 5 bis $7,5 \times 10^4$ und pro 24 Well 1 bis $2,5 \times 10^5$ CD34⁺ Zellen in 200 bzw. 500 bis 1000 μ l LTBMCM dazugegeben und für maximal 7 Tage zusammen kultiviert. Danach erfolgte die mechanische Trennung von HSCs und MSCs durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren des Kulturmediums, wodurch die HSCs, die an den MSCs gehaftet haben, abgelöst wurden. Im Anschluss wurden weitere Experimente, in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Fragestellung, durchgeführt.

Parallel zur einfachen Kokultur von HSCs und MSCs wurde auch der Einfluss verschiedener CD44-Antikörper auf die Interaktion von HSCs und MSCs untersucht, indem diese zusammen mit den Zellen kultiviert wurden. Zusätzlich zu einer Kokultur mit direktem Zellkontakt zwischen HSCs und MSCs, wurde auch der indirekte Kontakt, d.h. der Einfluss von MSCs ausgeschütteten Mediatoren, beispielsweise

Zytokinen, auf die HSCs untersucht. Dazu wurden 24-Well-Transwell-Inserts mit einer Polycarbonatmembran und einer Porengröße von 0,4 μm benutzt, in denen die HSCs in je 100 μl LTBMK kultiviert wurden. Die Kultivierung der MSCs im 24-Well erfolgte in je 600 μl LTBMK.

2.2.7.2 Kokultur von HSCs und Hyaluronsäure

Um den Einfluss von Hyaluronsäure auf den Selbsterhalt und die Differenzierung von HSCs zu untersuchen, wurden CD34^+ Zellen aus Nabelschnurblut oder mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut jeweils mit und ohne 40 μg bzw. 80 μg Hyaluronsäure in LTBMK für 5 bis 7 Tage im 24-Well inkubiert. Zusätzlich wurde die Kokultur auch in 24-Well durchgeführt, deren Boden zuvor mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Hyaluronsäure beschichtet wurde. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie unter anderem auf ihre CD44 - und CD34 -Expression untersucht.

2.2.8 Migrationsassay im Transwell

Um den Einfluss von Hyaluronsäure auf das Migrationsverhalten von HSCs zu untersuchen, wurden Transwell-Inserts mit einer Polycarbonatmembran und einer Porengröße von 3,0 μm verwendet. Zunächst wurden pro 24-Well 3×10^4 MSCs in 7er Medium ausgesät und ÜN im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und durch 600 μl LTBMK ersetzt. Parallel dazu wurden die Transwell-Inserts vorbereitet. Zu diesem Zweck wurden bei einen Teil der Transwells-Inserts jeweils 100 μl von 200 $\mu\text{g/ml}$ Hyaluronsäure auf die Membran gegeben und diese dann 30 min bei 45 °C auf einer Heizplatte erhitzt, um die Hyaluronsäure zu trocknen. Anschließend wurden die Transwell-Inserts in die mit den MSCs vorbereiteten Wells überführt und mit je 100 μl LTBMK befüllt. Als Kontrolle wurden unbeschichtete Transwell-Inserts mitgeführt. Die so vorbereiteten Platten wurden ÜN im Brutschrank inkubiert, damit die MSCs genügend Zytokine in das LTBMK abgeben konnten, um die Migration der HSCs zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurden CD34^+ Zellen aus Nabelschnurblut zunächst mit PKH26 gefärbt (siehe Abschnitt 2.2.18). Pro Ansatz wurden dann 5×10^4 bis 1×10^5 CD34^+ Zellen in je 100 μl LTBMK auf die Membranen gegeben, nachdem das alte Medium aus dem Transwell-Insert entfernt wurde. Die Inkubation erfolgte für 24 h im

Brutschrank. Danach wurden die 600 µl LTBMCM unten im Well, die die migrierten HSCs enthielten, entfernt und zentrifugiert (950 x g, 7 min, RT). Die Auszählung der migrierten HSCs erfolgte in einer Neubauer Zählkammer unter einem Fluoreszenzmikroskop, da so die zuvor mit PKH26-gefärbten HSCs gut von eventuell abgelösten MSCs abgegrenzt werden konnten.

2.2.9 Zellzyklustests

2.2.9.1 Cycle Test™ Plus DNA Reagent Kit

Die Untersuchung des Zellzyklus in verschiedenen leukämischen Zelllinien erfolgte unter anderem mit dem CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit nach Angaben des Herstellers. Prinzipien dieses Kits sind die Lyse der Zellmembranlipide mit nichtionischen Detergenzien und der Abbau des Zytoskeletts und der Kernproteine mit Trypsin. Die RNA wird enzymatisch durch die Ribonuklease A verdaut und das Chromatin mithilfe von Spermin stabilisiert. Propidiumiodid (Pi), ein Fluoreszenzfarbstoff, interkaliert mit der DNA der isolierten Kerne. Propidiumiodid-DNA-Komplexe emittieren Licht bei Wellenlängen zwischen 580 und 650 nm, welches zytometrisch detektiert werden kann.

Die zu färbenden Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen (580 x g, 7 min, RT). Anschließend wurde der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 1 ml Buffer Solution resuspendiert. Als nächstes wurde die Zellsuspension in Eppendorf-Röhrchen überführt und 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Zellpellet erneut in 1 ml Buffer Solution aufgenommen und das Röhrchen wieder zentrifugiert. Diese Waschprozedur mit der Buffer Solution wurde insgesamt dreimal durchgeführt, wobei beim letzten Waschen mit 400 x g für 5 min bei RT zentrifugiert wurde. Im Folgenden wird die weitere Durchführung des Zellzyklustests für 5×10^5 Zellen beschrieben. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 250 µl Lösung A. Nach behutsamem Mischen inkubierte der Ansatz für 10 min bei RT. Anschließend wurden 200 µl Lösung B zugegeben, ohne Lösung A vorher zu entfernen. Wieder wurde der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. Zum Schluss wurden 200 µl kalte Lösung C auf die Zellen gegeben und die abschließende Inkubation erfolgte im Kühlschrank für 10 min im Dunkeln.

Danach wurde die Probe filtriert, in Röhrchen überführt und innerhalb der nächsten 3 h durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.9.2 Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain

Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain wurde zur Analyse des Zellzyklus in lebenden Zellen verwendet und erlaubte eine gleichzeitige Färbung anderer Zellparameter, wie z.B. von verschiedenen Oberflächenmarkern, zusammen mit der DNA der Zelle. Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain ist membrangängig, selektiv für DNA und fluoresziert erst wenn es an doppelsträngige DNA gebunden hat. Die Anregung des Farbstoffes kann im Wellenlängenbereich von 488 nm bis 690 nm erfolgen und die Emission erfolgt nahe dem Infrarotbereich bei >670 nm. Die Detektion erfolgt in einem Durchflusszytometer.

Dieser Zellzyklustest wurde ebenfalls in verschiedenen leukämischen Zelllinien durchgeführt. Für jede Zelllinie musste die Färbung angepasst und optimiert werden, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen. Im Folgenden wird die Färbung am Beispiel von KG-1a beschrieben. KG-1a wurden in HBS-Puffer gewaschen (580 x g, 7 min, RT) und gezählt. Für einen Ansatz wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 500 µl HBS-Puffer in ein FACS-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde 1 µl Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain (Endkonzentration 5 µM) dazupipettiert, gevortext und der Ansatz 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Wenn gleichzeitig die Analyse von Oberflächenmarkern erfolgen sollte, wurde die Antikörperinkubation vor der Färbung mit Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain durchgeführt. Zum Schluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse, ohne die Zellen vorher zu waschen.

2.2.10 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde mit TRIZOL® Reagent nach Angaben des Herstellers isoliert. TRIZOL® Reagent ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, welche die Integrität von RNA aufrecht erhält, während sie Zellen und Zellbestandteile auflöst. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation gibt es eine Phasentrennung in eine wässrige Phase, die die RNA enthält, eine organische Phase, die die Proteine enthält und eine Interphase, die die DNA enthält. Die RNA in der wässrigen Phase wird mit

Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen. Mit zusätzlichen Separationsschritten können parallel auch DNA und Proteine isoliert werden.

Zunächst wurden die Zellen, aus denen RNA isoliert werden sollte, in PBS gewaschen (580 x g, 7 min, RT). Anschließend wurde der Überstand entfernt, 1 ml TRIZOL® Reagent zu den Zellen gegeben, alles in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Für eine kleine Zellzahl ($<2 \times 10^4$) wurden nur 800 µl TRIZOL® Reagent verwendet, und alle anderen zu verwendenden Komponenten wurden ebenfalls dementsprechend angepasst. Ab hier wurde die Probe entweder bei -80 °C eingefroren bis zur weiteren Verwendung oder die RNA wurde sofort isoliert. Zum 1 ml Zelllysat/TRIZOL® Reagent-Gemisch wurden 200 µl Chloroform gegeben und das Röhrchen 15 sec mit der Hand geschüttelt und danach 2-3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 12000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurde die wässrige Phase, die die RNA enthält, in ein neues Röhrchen überführt und mit 500 µl Isopropanol gefällt. Bei sehr geringen Zellzahlen ($<1 \times 10^4$) wurden 5 µg RNase-freies Glykogen zur wässrigen Phase vor der Isopropanolfällung dazugegeben, welches durch Fällung mit der RNA zur Sichtbarmachung des RNA-Pellets führte und somit den Verlust der RNA während der weiteren Aufarbeitungsschritte reduzierte. Nach Zugabe des Isopropanols folgte eine Inkubation für 10 min bei RT und danach eine Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde entfernt und die RNA mit 1 ml 75 % Ethanol gut vermischt und bei 7500 x g für 8 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das RNA-Pellet an der Luft für 10 min getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst. Die RNA-Konzentration wurde mit einem UV/VIS-Spektralphotometer (Nano Drop ND-1000) gemessen. Die anschließende Lagerung der isolierten RNA bis zur cDNA-Synthese erfolgte bei -80 °C.

2.2.11 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit durchgeführt. Ausgehend von Random Primern synthetisiert die MultiScribe™ Reverse Transkriptase einen zur RNA-Matrize komplementären Strang. Random Primer sind ein Gemisch aus Hexanukleotiden, die an verschiedene Stellen der RNA

binden können und dadurch kann von nahezu allen mRNA-Molekülen eine cDNA synthetisiert werden.

Für die Reaktion wurde pro Ansatz maximal 2 µg RNA eingesetzt. Diese wurde in insgesamt 10 µl Wasser aufgenommen. Bei mehreren Proben, die in cDNA umgeschrieben werden sollten, wurde ein Mastermix vorbereitet. Dieser bestand pro Ansatz aus folgenden Komponenten: 2 µl 10x RT Buffer, 0,8 µl 25x dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10x RT Random Primer, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 0,7 µl RNase Inhibitor RNaseOut (30 U/µl) und 3,5 µl Wasser. Anschließend wurden pro Ansatz 10 µl Mastermix zur RNA dazugegeben und die Röhrchen mit einem Gesamtvolumen von 20 µl in den Thermocycler transferiert und bei folgendem Programm inkubiert: 10 min bei 25 °C, 120 min bei 37 °C und 5 sec bei 85 °C. Die synthetisierte cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.12 Standard-PCR

Zur Analyse der Verteilung der verschiedenen variablen CD44-Exons in den leukämischen Zelllinien bzw. in verschiedenen Subpopulationen von primärem Material wurde eine Standard-PCR mit der HotStar Taq Plus DNA Polymerase durchgeführt. Als Referenzgen diente GAPDH. Für jeden der zu testenden Primerpaare wurde ein separater Mastermix hergestellt, der pro Ansatz aus 2,5 µl 10x PCR Buffer, 0,5 µl dNTP Mix (je 10 mM), je 1 µl forward und reverse Primer (10 µM), 0,5 µl HotStar Taq Plus DNA Polymerase (5 U/µl) und 18,5 µl Wasser bestand. Anschließend wurden jeweils 24 µl Mastermix auf die Röhrchen verteilt und jeweils 1 µl cDNA (100 ng, minimal 50 ng, abhängig von der zur Verfügung stehenden Konzentration) dazugegeben. Pro Ansatz ergab das ein Gesamtvolumen von 25 µl. Anschließend wurden die Proben in einen Thermocycler gestellt und die Analyse mit folgendem Programm gestartet: 5 min Vorinkubation bei 95 °C, um die DNA-Polymerase zu aktivieren und die DNA zu denaturieren. Anschließend folgte die Amplifikationsphase mit 35 bis 40 Zyklen, die sich aus Denaturierung (30 sec bei 94 °C), Annealing (30 sec bei 58 °C) und Extension (1 min bei 72 °C) zusammensetzte. Zum Schluss folgte eine finale Extensionsphase (10 min bei 72 °C).

2.2.13 Real-time PCR

Real-time PCR ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, aber zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung der eingesetzten Nukleinsäuren bietet. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe von Fluoreszenz-Messungen während des gesamten Prozesses. Als Fluoreszenzfarbstoff wird häufig SYBR Green eingesetzt. SYBR Green ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der doppelsträngige DNA bindet. Der gebildete DNA-SYBR-Green-Komplex absorbiert blaues Licht (bei $\lambda_{\text{max}}=498 \text{ nm}$) und emittiert grünes Licht (bei $\lambda_{\text{max}}=522 \text{ nm}$).

Die synthetisierte cDNA wurde verwendet, um mit dem Power SYBR® Green PCR Mastermix die Expression der verschiedenen CD44-Varianten in den leukämischen Zelllinien bzw. in verschiedenen Subpopulationen von primärem Material zu quantifizieren. Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA auszugleichen, musste ein Referenz-Gen, in dem Fall GAPDH, für jede Probe mit amplifiziert und quantifiziert werden. Für jeden der zu testenden Primerpaare wurde ein separater Mastermix angesetzt, der pro Ansatz aus 10 μl 2x Power SYBR Green PCR Mastermix, je 1 μl forward und reverse Primer (10 μM) und 6 μl Wasser bestand. Jeweils 18 μl Mastermix wurden pro zugehörigem Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Im Anschluss wurden pro Well 2 μl der jeweils zugehörigen cDNA (10 $\text{ng}/\mu\text{l}$) auf den Mastermix pipettiert. Pro Ansatz ergab das ein Gesamtvolumen von 20 μl . Danach wurde die Mikrotiterplatte mit einer selbstklebenden Folie beklebt, anzentrifugiert, gevortext und erneut anzentrifugiert, um den kompletten Ansatz gut vermischt am Boden des Wells zu vereinigen. Die Mikrotiterplatte wurde nun in das StepOne™ Plus Real-time PCR System gestellt und die Analyse mit folgendem Programm gestartet: 10 min Vorinkubation bei 95 °C, um die DNA-Polymerase zu aktivieren und die DNA zu denaturieren. Anschließend folgte die Amplifikationsphase mit 40 Zyklen, die sich aus Denaturierung (15 sec bei 95 °C), Annealing und Extension (1 min bei 60 °C) zusammensetzte. Um eine Schmelzkurve erstellen zu können, wurde im letzten Schritt erneut auf 95 °C für 15 sec erhitzt, danach folgten 60 °C für 1 min und abschließend wurde die Temperatur in 0,3 °C Schritten auf 95 °C erhöht. Im Anschluss wurden die erhaltenen Werte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet.

2.2.14 Gelelektrophorese

Die PCR-Proben, die nach Standard- oder Real-time PCR erhalten wurden, wurden in 1,5-2 %igen, mit Ethidiumbromid gefärbten, Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 0,5 %iger TBE-Puffer verwendet. Je nach Probe und weiterem Verwendungszweck wurden zwischen 20 µl und 40 µl Probe aufgetragen. Die Gele wurden in einer Geldokumentation mit dem Programm Biodoc Analyze fotografiert. Die Analyse der Banden erfolgte mit der ImageJ-Software.

2.2.15 Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Ein Teil der erhaltenen Banden für die verschiedenen CD44-varianten Isoformen wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt, um sie anschließend von der Firma GATC Biotech sequenzieren zu lassen.

Zuerst wurden die zu sequenzierenden Banden aus dem Gel mithilfe eines Skalpells geschnitten, in jeweils ein Röhrchen überführt und gewogen. Bei einem Gewicht von beispielsweise 100 mg wurden 300 µl Buffer QG zugegeben. Anschließend wurde das Röhrchen für 10 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert, bis sich das Gelstück komplett gelöst hat. Danach wurden für 100 mg Ausgangsgewicht fürs Gelstück 100 µl Isopropanol dazugegeben und vermischt, um die Ausbeute von DNA-Fragmenten, die <500 bp sind, zu erhöhen. Parallel dazu wurde eine QIAquick spin Säule in ein 2 ml Sammelröhrchen gestellt und die Probe auf die Säule gegeben und bei 10000 x g für 1 min bei RT zentrifugiert, wodurch die Bindung der DNA an die Säule erfolgte. Der Durchlauf wurde verworfen und 500 µl Buffer QG auf die Säule gegeben. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 10000 x g für 1 min bei RT. Anschließend wurde mit 750 µl Buffer PE für 3 min inkubiert und danach zentrifugiert (10000 x g, 1 min, RT). Der Durchlauf wurde verworfen und das Röhrchen nochmals zentrifugiert (10000 x g, 1 min, RT), um den restlichen Ethanol zu beseitigen. Im Anschluss wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Röhrchen gesetzt und die DNA mit 30 µl Wasser eluiert. Dazu wurde das Wasser zunächst auf die Membran der Säule gegeben, für 1 min inkubiert, um die DNA-Konzentration zu erhöhen, und danach erfolgte die Zentrifugation (10000 x g, 1 min, RT). Die DNA-Konzentration wurde mit einem UV/VIS-Spektralphotometer (Nano Drop ND-1000) gemessen. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die DNA bei -20 °C gelagert. Für die Sequenzierung wurden 10–50 ng/µl DNA in je 30 µl Wasser benötigt.

2.2.16 Aldefluor-Färbung

Zur Familie der Aldehyddehydrogenasen (ALDH) gehören insgesamt 17 zytosolische Enzyme, die an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt sind und die die Oxidation von Aldehyden katalysieren. Eine hohe ALDH-Expression findet man sowohl in primitiven HSCs als auch in LSCs und diese soll zu verschiedenen Stammzellfunktionen, wie z.B. die Chemotherapieresistenz beitragen. ALDEFLUOR Reagent ist ein nichttoxisches, frei in die Zelle diffundierendes fluoreszierendes Substrat der ALDH1A1, welches von dieser umgesetzt wird, in der Zelle akkumuliert und so zur Identifikation und Isolierung von Zellen mit funktionellen Stammzeleigenschaften mittels Durchflusszytometer benutzt werden kann. Als Kontrolle dienen mit ALDEFLOUR Reagent behandelte Zellen, denen gleichzeitig Diethylaminobenzaldehyd (DEAB), ein spezifischer ALDH-Inhibitor, zugesetzt wurde.

MNCs aus Nabelschnurblut, mobilisiertem Peripherblut oder Knochenmark, die nach Dichtegradientenzentrifugation oder Erythrozytenlyse erhalten wurden, wurden zunächst in FACS-Röhrchen überführt und in MACS-Puffer gewaschen (580 x g, 6 min, RT). Anschließend wurde der Überstand abgekippt und die Zellen, entsprechend ihrer Zellzahl in Assay-Puffer aufgenommen. Im Folgenden wird die Färbung am Beispiel von 2×10^6 Zellen beschrieben. Die 2×10^6 MNCs wurden in 1 ml Assay-Puffer aufgenommen. Danach wurde ein weiteres FACS-Röhrchen für die DEAB-Kontrolle vorbereitet. In dieses wurden 2,5 µl DEAB vorgelegt und schnell mit einem Deckel verschlossen, um die Verdunstung des in der Lösung enthaltenen Alkohols zu verhindern. Anschließend wurden 5 µl ALDEFLUOR Reagent zur Zellsuspension gegeben, alles gut vermischt und sofort 200 µl davon in das Röhrchen, in das DEAB vorgelegt wurde, pipettiert und ebenfalls gut vermischt. Beide Ansätze wurden anschließend 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, anschließend zentrifugiert (580 x g, 6 min, RT), in neuem Assay-Puffer aufgenommen und sofort durchflusszytometrisch analysiert. ALDH⁺ Zellen, also solche mit einer ALDH-Expression, wurden als ALDH^{bright} und SSC^{low} definiert und entweder nur analysiert oder auch sortiert, um sie für weitere Versuche verwenden zu können. Die gleichzeitige Antikörperfärbung mit verschiedenen Oberflächenmarkern wurde im Anschluss an die Färbung mit ALDEFLUOR Reagent, wie unter Abschnitt 2.2.20.1 beschrieben, durchgeführt. Nur das Waschen der Zellen erfolgte im Vergleich zur herkömmlichen Färbung in einer Mischung aus Assay-

Puffer und MACS-Puffer, beide 4 °C kalt, um den Efflux des gebildeten ALDEFLUOR-Produktes durch die ABC-Transporter der Zellen zu verhindern.

2.2.17 CFDA-SE-Färbung

Um das Proliferationsverhalten von HSCs untersuchen zu können, wurden CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut mit dem Farbstoff Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) gefärbt. Dieser diffundiert durch die Zellmembran ins Zellinnere und wird dort durch zelleigene Esterasen aktiviert und zu dem fluoreszierenden Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) umgesetzt. Dieser bindet irreversibel an Amine wie beispielsweise freie Lysinketten und wird bei jeder Zellteilungen gleichmäßig zwischen den beiden Tochterzellen aufgeteilt, wodurch sich die Fluoreszenzintensität verringert. Diese gleichmäßige Abnahme der Fluoreszenzintensität in jeder neuen Generation kann durchflusszytometrisch gemessen werden.

CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, mobilisiertem Peripherblut und gesundem Knochenmark wurden zu Beginn in MACS-Puffer gewaschen (580 x g, 7 min, RT). Anschließend wurde der Überstand abgekippt und die Zellen in 750 µl PBS mit 0,1% FCS resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl 10 µM CFDA-SE zugegeben (Endkonzentration: 2,5 µM), gemischt und bei 37°C im Wasserbad für 10 min inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 7 ml eiskaltes RPMI 1640 mit 10% FCS zu den Zellen dazugegeben und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in MACS-Puffer gewaschen (580 x g, 7 min, RT), in LTBMK resuspendiert und entsprechend den experimentellen Anforderungen für maximal 7 Tage kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde ungefärbt und separat in einem Well in LTBMK kultiviert. Dieser diente nach Beendigung der Kultivierung als Autofluoreszenzkontrolle für die anschließende durchflusszytometrische Analyse.

2.2.18 PKH26-Färbung

Das PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit wurde zum einen verwendet, um das Proliferationsverhalten von HSCs zu untersuchen, aber auch zur generellen Markierung von Zellen aller Art, um sie im Rahmen verschiedener Experimente im Fluoreszenzmikroskop detektieren zu können. PKH26 ist ein Fluoreszenzfarbstoff,

der sich in Lipidregionen der Zellmembran einbaut und sich mit jeder Zellteilung zwischen den beiden Tochterzellen aufteilt.

Die zu färbenden Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen (580 x g, 6 min, RT). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Diluent C aufgenommen. Parallel dazu wurde eine zellzahlabhängige Menge (5 µl ab 1×10^6 Zellen) vom PKH26 Färbe-Stock in 1 ml Diluent C verdünnt, nach guter Durchmischung auf die in Diluent C vorgelegte Zellsuspension gegeben und sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 5 min im Dunkeln. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 2 ml FCS dazugegeben und für 1 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in MACS-Puffer gewaschen (580 x g, 6 min, RT) und für die jeweiligen Anschlussversuche weiterverwendet. Um das Proliferationsverhalten der HSCs zu untersuchen, wurden diese, nachdem sie mit PKH26 gefärbt wurden, 7 Tage in LTBMCMedium kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie in die langsamteilende (SDF) und in die schnellteilende Zellfraktion (FDF) sortiert und weiter analysiert.

2.2.19 Annexin V/Pi-Färbung

Zur Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte die Annexin V/PI-Färbung mithilfe von Annexin-V-Fluos. Die anschließende Detektion erfolgte mit einem Durchflusszytometer. In frühen Stadien der Apoptose kommt es unter anderem zur Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der inneren Seite der Plasmamembran nach außen. Annexin V bindet an Phosphatidylserin und eine gleichzeitige Färbung mit Propidiumiodid (Pi) erlaubt eine Unterscheidung zwischen frühapoptotischen, spätapoptotischen und nekrotischen Zellen. Lebende Zellen sind Annexin V und Pi negativ, frühapoptotische Zellen sind Annexin V positiv und Pi negativ, spätapoptotische Zellen sind Annexin V und Pi positiv und nekrotische Zellen sind Annexin V negativ und Pi positiv. Pi dringt dabei nur in Zellen mit durchlässiger Membran ein.

Die zu färbenden Zellen, entweder Zellen aus primärem Material oder leukämische Zelllinien, wurden in je 97 µl Inkubationspuffer (10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl_2) zusammen mit 1 µl Annexin V-FITC und 2 µl Pi für 20 min bei RT inkubiert. Je nach verwendeten Zellen und verwendeter Versuchsplanung wurden gleichzeitig Antikörper gegen verschiedene Oberflächenantigene der Zellen

mitgefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen (580 x g, 7 min, RT) und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.20 Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Analyse

2.2.20.1 Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen

Zunächst wurden die zu färbenden Zellen in MACS-Puffer gewaschen (580 x g, 7 min, RT) und gezählt. Danach wurde pro Ansatz eine definierte Menge an Zellen in FACS-Röhrchen überführt und erneut in MACS-Puffer gewaschen (580 x g, 6 min, RT). Der Überstand wurde abgekippt und ein Restvolumen von etwa 100 µl wurde übrig gelassen, in dem anschließend die Antikörperfärbung erfolgte. Für jede Färbung wurde eine ungefärbte Kontrolle, die zur Einstellung der Autofluoreszenz diente, vorbereitet. Sollten mehrere Antikörper zusammen gefärbt werden, wurde von jedem Antikörper eine Einzelfärbung vorbereitet, um die Überlappungen der Emissionskurven der verschiedenen Fluorochrome kompensieren zu können. Als nächstes wurden zu jedem Ansatz die zugehörigen Antikörper zellzahlabhängig, nach Angaben des Herstellers, dazupipettiert, gut gemischt und für 30 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in MACS-Puffer gewaschen (580 x g, 6 min, RT), der Überstand wurde abgekippt und die Zellen resuspendiert, in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Wurden für die Färbung biotinylierte Antikörper verwendet, folgte ein weiterer Inkubations- (30 min bei 4 °C im Kühlschrank) und Waschschrift (580 x g, 6 min, RT) nach Zugabe eines Streptavidin-Fluorochrom-Konjugates, bevor die Zellen analysiert werden konnten. Der Ausschluss toter Zellen während der Analyse erfolgte mit Pi.

2.2.20.2 Antikörperfärbung von intrazellulären Antigenen nach Fixierung und Permeabilisierung

Um Moleküle auch intrazellulär mit Antikörpern färben zu können, wurden die Zellen, die zuvor in PBS gewaschen (580 x g, 7 min, RT) und gezählt wurden, zunächst in 2 % Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert und anschließend in PBS gewaschen (580 x g, 7 min, RT). Das darauffolgende Permeabilisieren der Zellen

erfolgte durch Waschen in 0,1 % Saponin, 0,4 % EDTA und 5 % FSC in PBS (580 x g, 7 min, RT). Danach wurden die Zellen auf die verschiedenen Ansätze aufgeteilt und in FACS-Röhrchen überführt. In einem Restvolumen von etwa 100 µl erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, beispielsweise gegen p27 (jeweils 10 µl), für 30 min bei 4 °C im Kühlschrank. Anschließend wurden die Zellen in 0,1 % Saponin, 0,4 % EDTA und 5 % FSC in PBS gewaschen (580 x g, 6 min, RT). Der Überstand wurde abgekippt, die Zellen resuspendiert und mit dem sekundären Antikörper (beispielsweise goat anti-mouse IgG-FITC, jeweils 1 µl einer 1:10 Verdünnung bei anti-p27 als primärem Antikörper) für 30 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Zellen in 0,1 % Saponin, 0,4 % EDTA und 5 % FSC in PBS (580 x g, 6 min, RT), wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.21 Immunofluoreszenzfärbung

Um die Verteilung der Oberflächenmoleküle auf der Zelle sichtbar zu machen, wurden Immunofluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dazu wurden Zellen der leukämischen Zelllinien zunächst in 2 % Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert und anschließend in PBS gewaschen (580 x g, 7 min, RT). Anschließend wurden die Zellen gezählt und je 5×10^3 Zellen pro Well eines mit insgesamt 8 Wells versehenen Objektträgers in etwa 25 µl PBS zugegeben. Die Wells wurden zuvor mit einem Dako Pen nachgezeichnet, um ein Auslaufen der Zellsuspension aus dem Well zu verhindern. Als nächstes wurde die Zellsuspension in den Wells unter der Sterilwerkbank getrocknet. Danach wurden die getrockneten Zellpellets mit je 50 µl Wasser beschichtet. Dieses wurde sofort wieder abgesaugt und der 1. Antikörper in je 20 µl PBS pro Well dazugegeben. Der Objektträger wurde für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger 3x 5 min in mit PBS gefüllten Glasbehältern gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (pro Well 20 µl in PBS) für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Danach wurde der Objektträger erneut 3x 5 min in PBS gewaschen. Zum Schluss erfolgte die Färbung der DNA mit dem membrangängigen Hoechst 33342 (1 µM), um die Viabilität der Zellen überprüfen zu können. Dazu wurden pro Well 50 µl Hoechst 33342 dazugegeben und der Objektträger 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte das letzte Waschen des Objektträgers in

PBS (3x 5 min). Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit wurden pro Well 1 Tropfen Fluoromount-G dazugegeben und die Wells mit einem Deckglas abgedeckt (24x50 mm). Die Lagerung des Objektträgers bis und nach dem Mikroskopieren erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C. Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus IX70 (Numerische Apparatur 1,0, 40x Öl) unter Verwendung von Immersionsöl 518N.

2.2.22 Adhäsionsassays

2.2.22.1 Objektträgerassay

Zur Untersuchung der Adhäsionseigenschaften von leukämischen Zelllinien und CD34⁺ Zellen, wurde das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Objektträgerassay mit MSCs als Modell (Wagner, Wein et al. 2007) für die Knochenmarksnische oder mit Hyaluronsäure, als Komponente der Extrazellulären Matrix, verwendet. Zunächst wurden die zu testenden Zellen zusammen mit den MSCs oder der Hyaluronsäure inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger um 180 ° gedreht und mithilfe der Schwerkraft erfolgte die Unterscheidung zwischen adhärenenten und nicht-adhärenenten Zellen. Durch die Auszählung von Fotos, die nach dem Drehen des Objektträgers in verschiedenen Fokusebenen gemacht wurden, erfolgte die Quantifizierung der adhärenenten und nicht-adhärenenten Zellen.

Zur Durchführung des Assays mit MSCs, wurde zunächst ein selbstklebender Silikonsticker mit 8 ausgestanzten Wells definierter Größe und Höhe (Press-to-Seal™ silicone isolator with adhesive, eight wells, 9 mm diameter, 1.0 mm deep) auf einen sauberen Objektträger aus Plastik geklebt. Anschließend wurden pro Well 1x10⁴ MSCs im zugehörigen Medium ausgesät und ÜN im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Konfluenz inkubiert. Am nächsten Tag wurden die zu testenden Zellen zunächst in PBS gewaschen (580 x g, 7 min, RT), gezählt und mit PKH26 gefärbt (siehe Abschnitt 2.2.18) und entsprechend der Fragestellung mit verschiedenen Antikörpern gegen CD44 und CD44-variante Isoformen behandelt. Anschließend wurde das Medium der MSCs aus den Silikonwells entfernt und pro Well 1x10⁴ der zu testenden Zellen in je 80 µl IMDM mit 20 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin dazugegeben. Danach wurde der Objektträger für 15 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, damit die Zellen auf die MSCs

absinken konnten. Als nächstes wurde ein Deckgläschen vorsichtig auf die Wells gelegt und der Objektträger wurde für weitere 45 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger um 180 ° gedreht und so für 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop, welches mit einer Kamera versehen war, von jedem Well Fotos von den adhärenenten, an den MSCs haftenden Zellen und von den nicht-adhärenenten, in der Fokusebene vom Deckgläschen befindlichen Zellen, gemacht. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit der ImageJ-Software.

Bei der Verwendung von mit Hyaluronsäure beschichteten Objektträgern, die freundlicherweise vom Institut für angewandte physikalische Chemie in Heidelberg bereitgestellt wurden, wurde die Durchführung analog zum Assay mit MSCs durchgeführt, außer dass der Silikonsticker mit einem speziellen biokompatiblen Zweikomponentenkleber befestigt werden musste, der ebenfalls vom Institut für angewandte physikalische Chemie in Heidelberg zur Verfügung gestellt wurde.

2.2.22.2 96-Well-Assay

Als ein weiteres von unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Adhäsionsassay bietet das 96-Well-Assay verschiedene Vorteile im Vergleich zum Objektträgerassay (Zepeda-Moreno, Taubert et al. 2011). Zwar verwendet man in diesem Assay ebenfalls MSCs als Modell für die Stammzellnische und die Schwerkraft wird auch hier zur Unterscheidung adhärenenten und nicht-adhärenenten Zellen verwendet, aber die Quantifizierung der nichtadhärenenten Zellen erfolgt über einen colorimetrischen Assay, im Gegensatz zur Auszählung von fluoreszenzmarkierten Zellen im Objektträgerassay. Der Vorteil besteht darin, dass nur lebende Zellen analysiert und quantifiziert werden. Für diese Versuche wurde das Cell Counting Kit-8 (CCK-8) verwendet. Vitale Zellen setzen das in CCK-8 enthaltene Tetrazoliumsalz WST-8 durch Dehydrogenasen in Formazan um. Das gebildete Formazan ist dabei direkt proportional zur Zellzahl und kann in einem Elisa plate reader bei 450 nm gemessen werden.

Zunächst wurden in eine 96-Well-Platte pro Well 1×10^4 MSCs im zugehörigen Medium ausgesät und ÜN im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden die zu testenden Zellen zentrifugiert (580 x g, 7 min, RT) und gezählt. Anschließend wurden die Zellen auf verschiedene Ansätze verteilt,

z.B. mit verschiedenen Antikörpern gegen CD44 und CD44-variante Isoformen in verschiedenen Konzentrationen, um einen eventuellen Einfluss dieser auf die Adhäsionsstärke zu untersuchen. Das Medium der MSCs in der am Vortag vorbereiteten 96-Well-Platte wurde entfernt und pro 96-Well durch $5-7,5 \times 10^4$ zu testende Zellen in je 300-350 μl phenolrotfreiem RPMI 1640 mit 10 % FCS, 1% L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin ersetzt. Dabei war es wichtig, das 96-Well komplett mit Medium zu füllen, um nach anschließendem Drehen der 96-Well-Platte das Entstehen von Luftblasen zu verhindern. Pro Ansatz wurden mindestens 4 Wiederholungen durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation der behandelten Zellen auf den MSCs im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2 bzw. 23 h, in Abhängigkeit von der Fragestellung. Anschließend wurde die 96-Well-Platte um 180 ° gedreht und erneut im Brutschrank für 1,5 h inkubiert, damit alle nichtadhärenten Zellen durch die Schwerkraft nach unten ins Medium fallen konnten. Vor dem Umdrehen der Platte wurde sichergestellt, dass sich in keinen Well eine Luftblase befand. Im Anschluss an die 1,5-stündige Inkubation wurde die 96-Well-Platte aus dem Brutschrank geholt, vom Plattendeckel abgehoben und in einem 45-75 ° Winkel gehalten. Mit einer Multikanalpipette wurde aus jeder Reihe der komplette Überstand mit den nicht-adhären Zellen in neue Reihen einer korrespondierenden 96-Well-Platte pipettiert. Dabei musste sichergestellt werden, dass die Pipettenspitzen nicht am Boden des Wells, wo sich die MSCs befanden, sondern in der Mitte des Wells platziert wurden. Anschließend wurde die neu bestückte 96-Well-Platte zentrifugiert (580 x g, 5 min, RT). Anschließend wurde aus jedem Well so viel Medium entfernt, damit ein Restvolumen von circa 100 μl übrig blieb. Die nicht-adhären Zellen wurden nun mit CCK-8 quantifiziert. Dazu wurden pro Well und 100 μl Restvolumen je 10 μl CCK-8 dazugegeben, vermischt und für 3-5 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Messung des gebildeten Formazans erfolgte in einem Elisa plate reader bei 450 nm. Als Referenzwellenlänge diente 650 nm. Parallel zur Quantifizierung der nicht-adhären Zellen, wurde eine Standardkurve mit definierten Zellzahlen der gleichen Zellart (0, 2×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 3×10^4 und 5×10^4 , jeweils als Dreifachbestimmung) mit analysiert, um eine genaue Berechnung der Zellzahlen zu ermöglichen.

2.2.23 Mikrofluidik: Adhäsion von leukämischen Zelllinien und HSCs an Hyaluronsäure

Zur Bestimmung der Adhäsionsstärke von leukämischen Zelllinien und CD34⁺ Zellen an Hyaluronsäure und zur Untersuchung des Einflusses von CD44 für diese Interaktion wurde ein von Christof Christophis (Institut für angewandte physikalische Chemie Heidelberg) entwickeltes Mikrofluidiksystem verwendet, unter dessen Anleitung die folgenden Experimente auch stattfanden (siehe Abbildung 2-1) (Christophis, Grunze et al. 2010).

Der Kanal bestand aus einem PDMS-Ring, der Form und Abmessungen des Kanals definiert (25,0 mm x 1,5 mm x 130,0 µm). Dieser war auf einem Glasstück aufgelegt, aus dem die Schlauchanschlüsse durch eine zusätzliche PDMS-Auflage hinausführten. Die zu untersuchende Probe wurde mittels zweier Aluminiumscheiben gegengeschaubt und das so erhaltene Sandwichsystem auf einem Mikroskop des Typs TE-2000 unter einem Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) montiert. Die Anschlüsse wurden auf einer Seite an 0,5 bar Stickstoff-Überdrucks und an der anderen Seite an eine in der Arbeitsgruppe entwickelte Spritzenpumpe angeschlossen. Der Überdruck verhinderte eine Blasenbildung im System und erzeugte die für die Strömung notwendige treibende Kraft. Die Einstellung der gewünschten Scherkraft erfolgte durch Ansteuern des Stelltisches der Spritzenpumpe mit der Software PI Micromove. Das verwendete Programm für den Stelltisch erhöhte die Flussrate ausgehend von 300 nL/min in 5-sekündigen Schritten jeweils um 26 %. Adhäsion und Abreißverhalten wurden mittels digitaler Mikroskopie verfolgt. Hierzu wurden Videos bei einer Bildrate von ~1 Bild pro sec mit einem 4x Phasenkontrast-Objektiv aufgenommen und mittels NIS-Elements ausgewertet. Die Zahl der adhärenenten Zellen wurde durch manuelles Auszählen der einzelnen Bilder ermittelt und als Funktion der Scherströmung aufgetragen.

Zu Beginn sollten die Adhäsionsstärke und das Abreißverhalten von KG-1a und Jurkat an Hyaluronsäure und Argininsäure beschrieben werden. Als Standard diente ein Nexterion B®-Glasobjektträger. Zunächst wurden die Zellen in das Kanalsystem injiziert und es erfolgte eine Inkubation für 3 h im Zellkulturmedium in Dunkelheit, wodurch Adhäsion an die Oberfläche ermöglicht wurde. Anschließend wurden, durch Anlegen einer logarithmisch ansteigenden Scherströmung, die nicht-adhärenenten

Zellen weggespült. Mit zunehmender Scherströmung wurden schließlich die adhärennten Zellen schrittweise von der Oberfläche gelöst, was durch digitale Mikroskopie verfolgt wurde. Die Durchführung dieser Abreißexperimente wurde zwischen den verschiedenen Versuchen teilweise abgewandelt. So wurden die Zellen teilweise nur 5 min vorinkubiert, bevor der Fluss gestartet wurde. Neben KG-1a und Jurkat wurden auch $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut in diesen Versuchen auf ihre Adhäsion an Hyaluronsäure untersucht.

In weiteren Versuchen wurden neben den bisher getesteten leukämischen Zelllinien (KG-1a und Jurkat) weitere leukämische Zelllinien (HL-60, K-562, Kasumi-1), die sich anhand ihrer CD44-Expression unterschieden, näher charakterisiert. Auf eine statische Inkubation der Zellen wurde nun verzichtet, ein konstanter Fluss mit einer Scherspannung von $0,2 \text{ dyn/cm}^2$ wurde gewählt, um nur die Fluss-induzierte Adhäsion zu stimulieren, deren Vorhandensein sich bereits in den Abreißexperimenten zeigte und die in dieser Versuchsreihe genauer charakterisiert werden sollte. Zusätzlich wurde auch der Einfluss von den monoklonalen Antikörpern A3D8 gegen CD44 und anti-CD44v7 auf die Adhäsion und das Rolling von KG-1a untersucht. Dazu wurden die Zellen 1 bzw. 24 h mit je $2 \mu\text{g/ml}$ A3D8 bzw. anti-CD44v7 vorinkubiert, bevor sie in das Kanalsystem überführt wurden und ein konstanter Fluss von $0,175$ bzw. $0,25 \text{ dyn/cm}^2$ angelegt wurde.

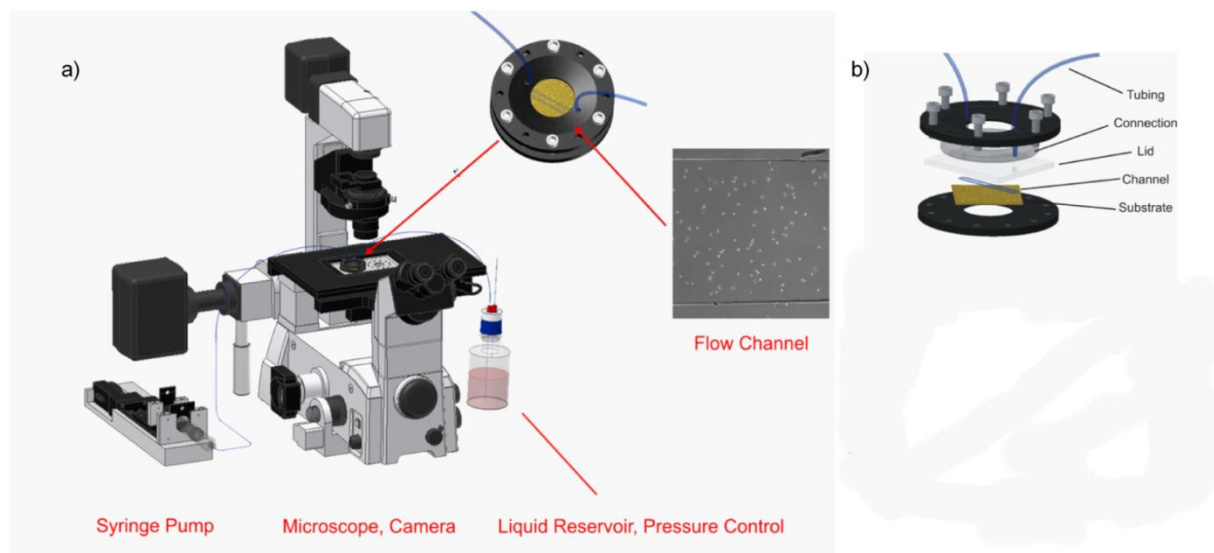


Abbildung 2-1 Aufbau der Mikrofluidikapparatur (a) und des Kanalsystems (b) (Christophis, Grunze et al. 2010).

2.2.24 Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwerte und deren Standardabweichung bzw. deren Standardfehler dargestellt. Zur statistischen Auswertung der erhaltenen Ergebnisse wurde der T-Test für 2 verbundene oder unverbundene Stichproben, je nachdem welche Datensätze miteinander verglichen werden sollten, verwendet. Werte mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Die Gegenüberstellung verschiedener Datensätze von Patienten mit AML erfolgte über die Bestimmung des zweiseitigen Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten. Werte mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Profil von CD44s bzw. CD44pan und CD44v auf mRNA-Ebene mittels exonspezifischer PCR

Zur Untersuchung der mRNA-Expression von CD44 und der CD44-Varianten wurden je nach Aufgabenstellung verschiedene Primer entworfen (siehe Abbildung 3-1). Für die Analyse der Verteilung der verschiedenen variablen Exons wurde der Forward-Primer immer in das Standard-Exon S3 gelegt und der Reverse-Primer in jeweils ein variables Exon (V2 bis V10) bzw. in das Standard-Exon S6, um die Expression der dominanten CD44-Standardisoform (CD44s) zu untersuchen. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Je nachdem wie viele und welche variablen Exons zwischen das Standard-Exon und das jeweilige untersuchte variable Exon eingebaut waren, desto mehr und verschieden große Banden erhielt man.

Zur Quantifizierung der mRNA mittels Real-time PCR waren diese Primer nicht geeignet, da man kein spezifisches Produkt, sondern mehrere Banden für jedes Primerpaar erhielt. Deswegen wurden für die Quantifizierung mittels SYBR-Green alternative Primer entworfen. Zur Quantifizierung von CD44pan wurde der Forward-Primer in das Standard-Exon S3 und der Reverse-Primer in das Standard-Exon S4 gelegt. Mit diesem Primerpaar konnten alle CD44-mRNA-Produkte, sowohl die CD44-Standardisoform als auch alle CD44-varianten Isoformen, zusammen analysiert werden. Zur Quantifizierung der einzelnen CD44-Varianten wurde sowohl der Forward- als auch der Reverse-Primer in das jeweilige variable Exon gelegt. Für das variable Exon V9 konnten keine Primer entworfen werden, da dieses Exon zu kurz war, um beide Primer in dieses zu legen und ein spezifisches Produkt zu erhalten.

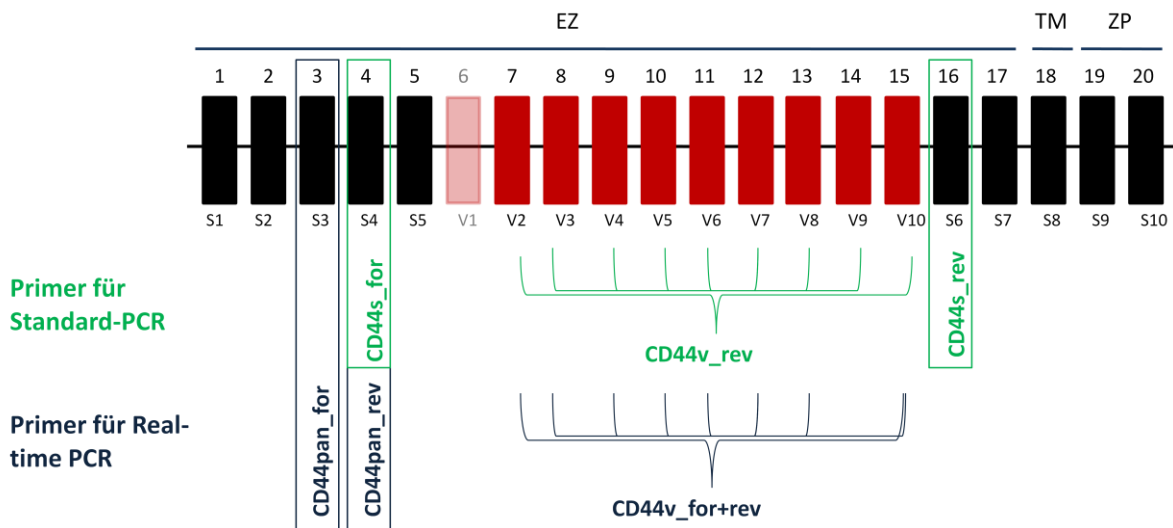


Abbildung 3-1 Übersicht über die CD44-Exons und die Lage der Primer für Standard- und Real-time PCR. EZ, extrazelluläre Region; TM, Transmembranregion; ZP, zytoplasmatische Region. S1-S10, Standardexons (1-10, schwarz); V1-V10, variable Exons (1-10, rot), V1 wird im Menschen nicht transkribiert.

3.1.1 Standard-PCR

3.1.1.1 CD44s- und CD44v-Expression in leukämischen Zelllinien

Zur Etablierung der PCR-Bedingungen wurden die Primer zunächst in leukämischen Zelllinien ausgetestet und im Anschluss die Verteilung der CD44-Varianten in diesen analysiert (siehe Abbildung 3-2). Als Haushaltsgen (Kontrollgen) wurde GAPDH verwendet. Als optimal erwies sich eine Annealing-Temperatur von 58 °C und 35 bis 40 Zyklen. In KG-1a, HL-60, NB-4 und K-562 fand man sowohl eine Expression von CD44s als auch von CD44v, bis auf CD44v5 und CD44v7, die teilweise sehr schwach bzw. gar nicht exprimiert wurden. In K-562 war die CD44s- und CD44v-Expression schwächer als in KG-1a, HL-60 und NB-4. In Jurkat und Kasumi-1 war nur eine sehr schwache CD44s-Expression detektierbar und keine CD44v-Expression, außer einer sehr schwachen CD44v8-Expression in Jurkat. Für CD44s erhielt man eine Hauptbande bei rund 350 bp. Für CD44v erhielt man ebenso meist eine dominante Bande und mal mehr oder weniger starke Banden in verschiedenen Größen, die auf das Einbauen verschiedener variabler Exons hindeuten. In Zelllinien mit CD44v-Expression erhielt man gleich große Banden, die sich nur hinsichtlich ihrer Expressionsstärke unterschieden, was darauf hindeutet, dass dieselben variablen Exons eingebaut wurden. Um eine Aussage über die Expressionsstärke

von CD44s und CD44v in Bezug zum Haushaltsgen GAPDH treffen zu können, wurde jeweils die Farbdichte der am stärksten exprimierten Bande mittels ImageJ bestimmt und in Bezug auf die der GAPDH-Bande gesetzt. Natürlich ist die Aussagekraft dieser Quantifizierung gering, dennoch gibt sie einen kleinen Einblick in die Expressionverhältnisse in den leukämischen Zelllinien (siehe Abbildung 3-3). GAPDH ist das in allen Zelllinien am stärksten exprimierte Gen, gefolgt von CD44s und, falls exprimiert, CD44v.

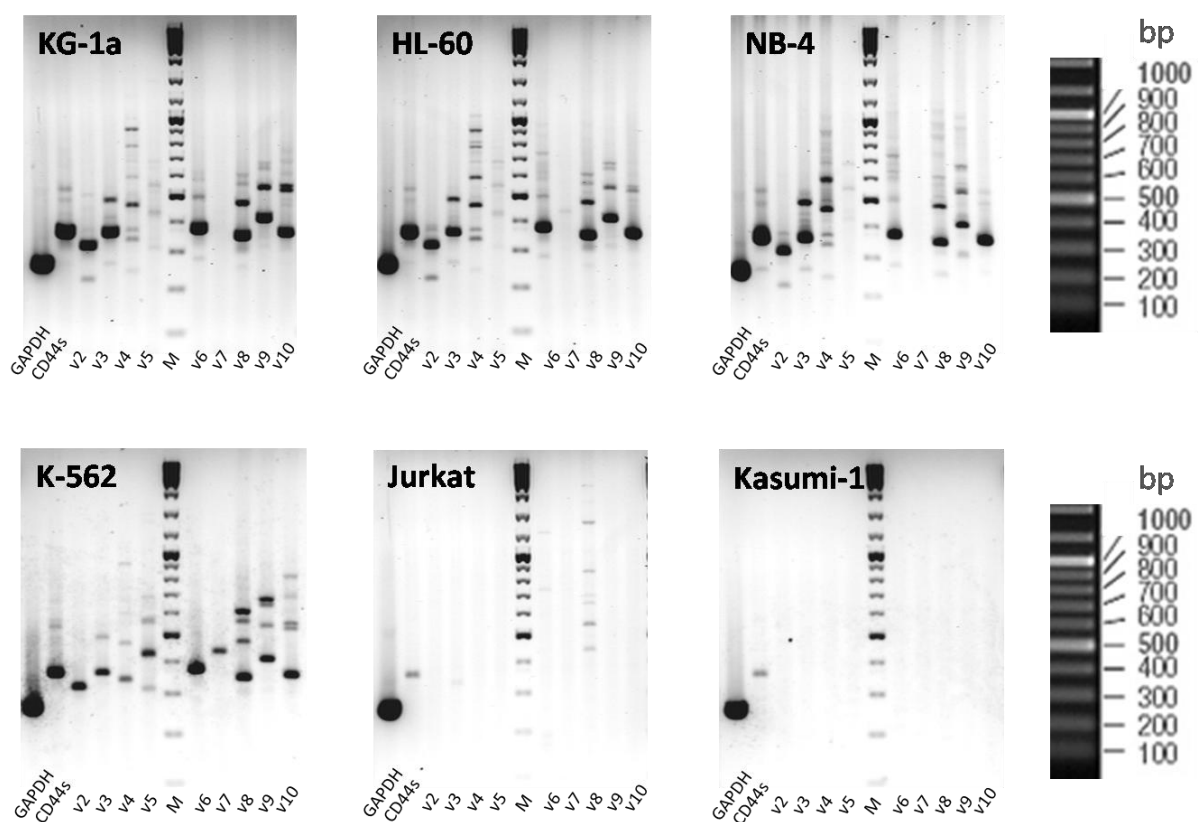


Abbildung 3-2 Gelbilder von den GAPDH-, CD44s- und CD44v-Banden in den leukämischen Zelllinien.

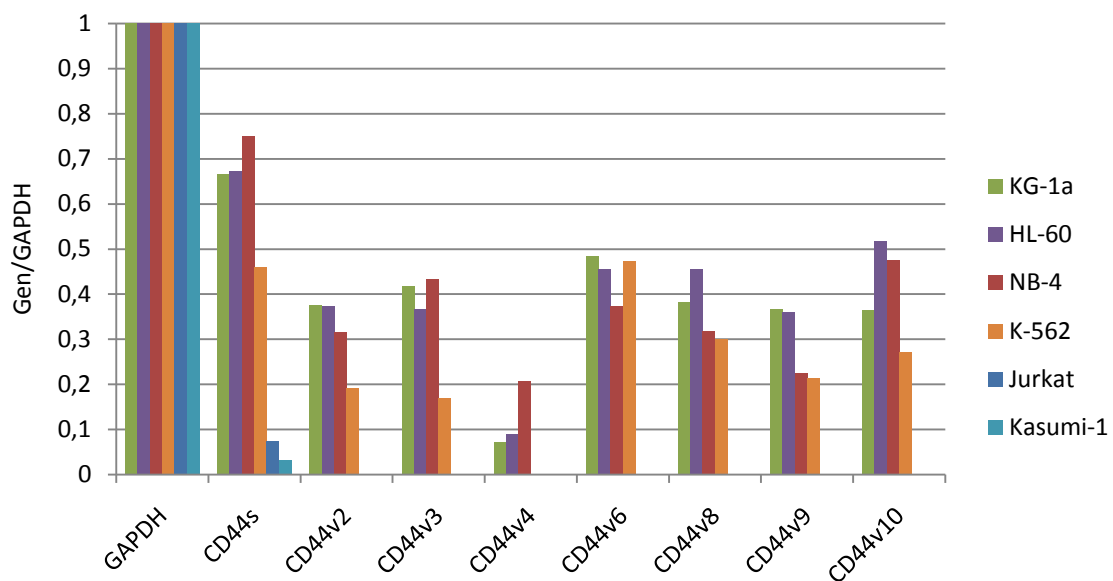


Abbildung 3-3 Relative CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in den leukämischen Zelllinien.

3.1.1.2 CD44s- und CD44v-Expression in verschiedenen Subpopulationen von primären Zellen

Analog zu den leukämischen Zelllinien wurde die CD44s- und CD44v-Expression mit den gleichen Primern auch in verschiedenen Subpopulationen von primären Zellen untersucht. Dabei wurden jeweils aus Nabelschnurblut, Knochenmark oder Peripherblut von Patienten mit neudiagnostizierter AML und/oder aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut von gesunden Spendern zum einen über magnetische Zellseparation angereicherte $CD34^+$ und $CD34^-$ Zellen, $ALDH^+$ und $ALDH^-$ sortierte Zellen und langsam- (SDF) und schnellteilende Zellen (FDF), die nach PHK26-Färbung und Kultivierung nach 7 Tagen sortiert wurden, auf ihre CD44s- und CD44v-Expression hin untersucht. Ähnlich zu den Ergebnissen in leukämischen Zelllinien war auch in den verschiedenen Subpopulationen aus primärem Material eine starke Expression von CD44s und eine unterschiedlich starke Expression für die verschiedenen Produkte für CD44v zu finden, die in ihren Größen denen in den Zelllinien entsprachen. In primären Zellen waren vor allem die Varianten CD44v4 und CD44v5 sehr schwach exprimiert. Abbildung 3-4 zeigt eine Übersicht über die Expression in $CD34^+$ versus $CD34^-$ Zellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark eines AML-Patienten. Sowohl in den $CD34^+$ als auch in den $CD34^-$ Zellen wurden

dieselben Spleißvarianten exprimiert und zumindest in den Zellen aus KM 69 schienen die CD44-Varianten in den CD34⁺ und CD34⁻ Zellen nicht unterschiedlich stark exprimiert zu werden. Generell kann man sagen, dass die Ergebnisse für CD34⁺ und CD34⁻ Zellen in den 3 untersuchten Proben aus Nabelschnurblut und den 2 aus Knochenmark eher heterogen waren. Man fand Proben, in denen sich die CD44v-Expression zwischen CD34⁺ versus CD34⁻ nicht unterschied, sowie Proben, in denen sie mal in den CD34⁺ Zellen und mal in den CD34⁻ Zellen höher war.

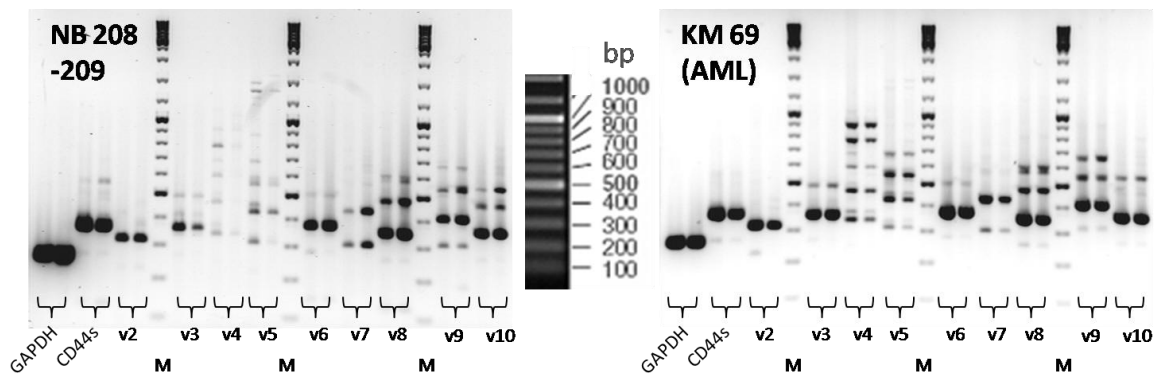


Abbildung 3-4 CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in CD34⁺ (linke Bande) versus CD34⁻ Zellen (rechte Bande) aus Nabelschnurblut (NB 208-209) und Knochenmark von einem AML-Patienten (KM 69).

Abbildung 3-5 zeigt ebenfalls eine Übersicht über die Expression von CD44s und CD44v in ALDH⁺ versus ALDH⁻ Zellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark eines AML-Patienten. In beiden Beispielen sieht man eindeutig, dass die CD44v-Expression in den ALDH⁻ Zellen wesentlich stärker war als in den ALDH⁺, in denen man nur eine sehr schwache bzw. keine CD44v-Expression finden konnte. In Abbildung 3-6 sieht man eine Zusammenstellung der Ergebnisse für relative Farbdichte der stärksten Bande für die jeweilige getestete CD44-Variante in ALDH⁺ in Relation zu ALDH⁻ Zellen von allen untersuchten Proben. In allen Proben, sowohl aus Nabelschnurblut, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut von einem gesunden Spender, als auch aus dem Knochenmark von AML-Patienten, waren die CD44-Varianten in den ALDH⁺ Zellen viel schwächer exprimiert als in den ALDH⁻.

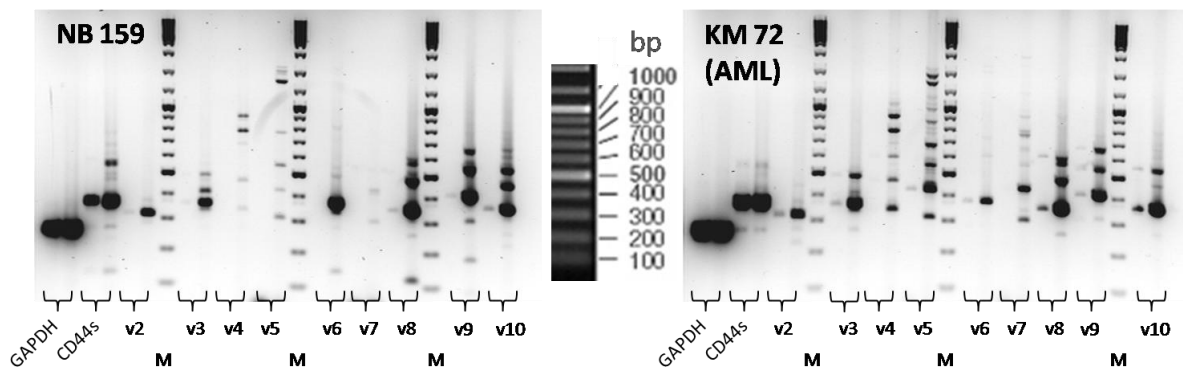


Abbildung 3-5 CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in ALDH⁺ (linke Bande) versus ALDH⁻ Zellen (rechte Bande) aus Nabelschnurblut (NB 159) und Knochenmark von einem AML-Patienten (KM 72).

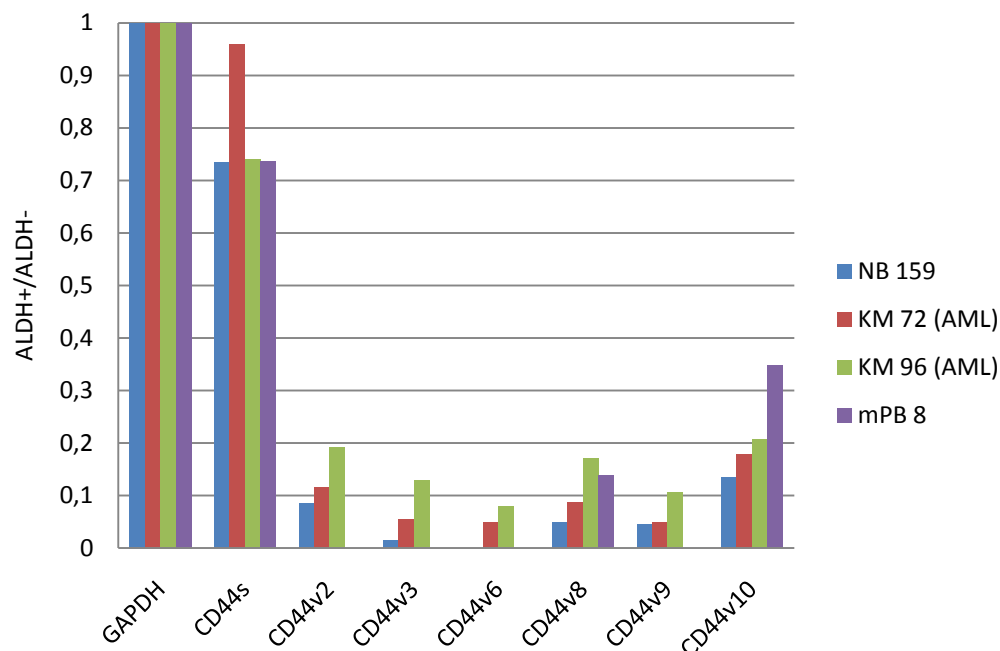


Abbildung 3-6 Relative CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in ALDH⁺ versus ALDH⁻ Zellen aus Nabelschnurblut (NB 159), Knochenmark von AML-Patienten (KM 72 und 96) und mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut (mPB8).

In Abbildung 3-7 ist eine Übersicht über die Expression von CD44s und CD44v in langsamteilenden Zellen (SDF) versus schnellteilenden Zellen (FDF) aus Nabelschnurblut und Peripherblut eines AML-Patienten dargestellt. In SDF war meist eine stärkere CD44v-Expression im Vergleich zu FDF zu finden. Abbildung 3-8 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse für die relative Farbdichte der stärksten Bande für die jeweilige getestete CD44-Variante in SDF in Relation zu FDF von allen untersuchten Proben. Die Expression von CD44s unterschied sich nicht in SDF

versus FDF, im Gegensatz zur CD44v-Expression. In fast allen Proben aus Nabelschnurblut, Peripherblut und Knochenmark von AML-Patienten wurden die CD44-Varianten in SDF stärker exprimiert als in FDF. Die Ergebnisse von PB 97 und KM 100 stellten teilweise eine Ausnahme dar, da bei diesen Proben in SDF nicht alle CD44-Varianten stärker exprimiert waren im Vergleich zu FDF.

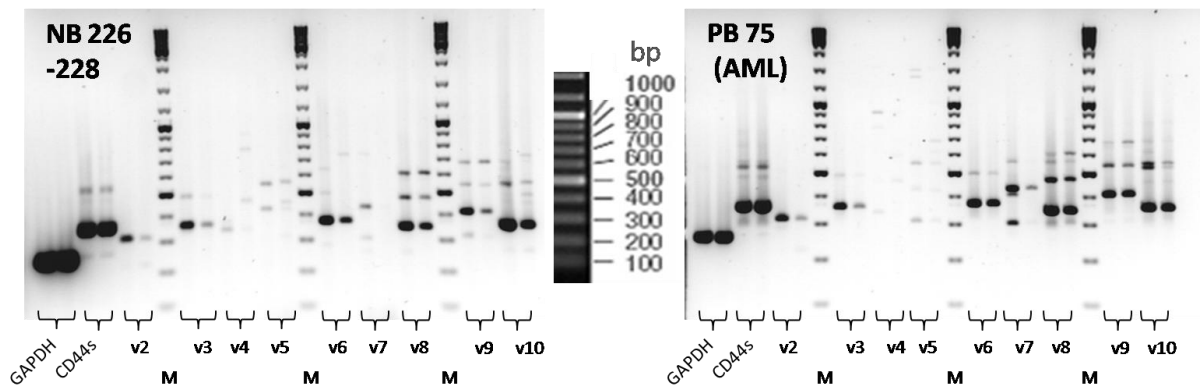


Abbildung 3-7 CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in SDF (linke Bande) versus FDF (rechte Bande) aus Nabelschnurblut (NB 226-228) und Peripherblut von einem AML-Patienten (PB 75).

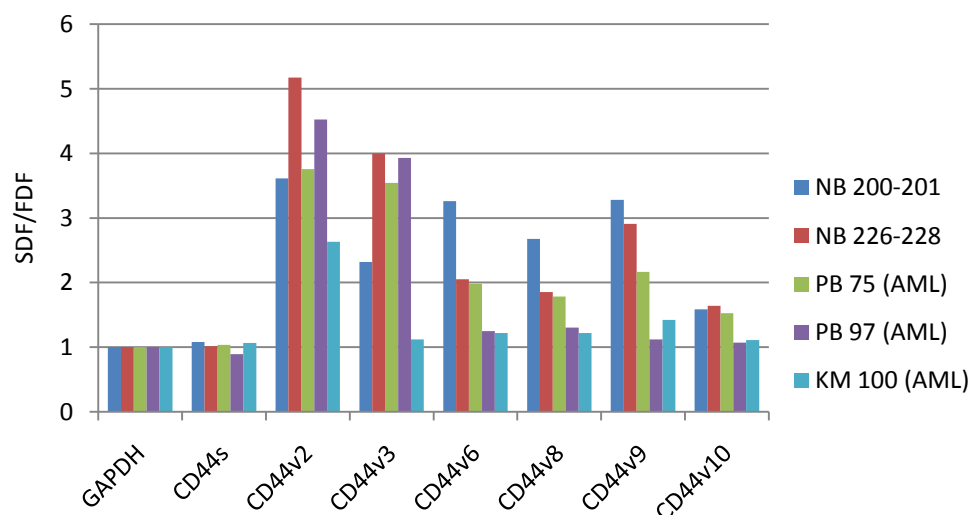


Abbildung 3-8 Relative CD44s- und CD44v-Expression in Bezug auf GAPDH in SDF versus FDF aus Nabelschnurblut (NB 200-201 und 226-228) und aus Peripherblut und Knochenmark von AML-Patienten (PB 75 und 97 und KM 100).

3.1.1.3 Sequenzierung der PCR-Produkte für CD44s und CD44v

Um nun eine Aussage darüber treffen zu können, welche variablen Exons in den verschieden großen Banden durch alternatives Spleißen eingebaut wurden, wurde ein Teil der erhaltenen Banden aus dem Agarosegel extrahiert, die DNA isoliert und sequenziert. Aufgrund der teilweise sehr schwachen Expression, konnte nicht von allen Banden genügend DNA isoliert werden, um eine Sequenzierung durchführen zu können. In Abbildung 3-9 ist eine Zusammenstellung der erhaltenen Sequenzierungsergebnisse aus NB 256 für CD34⁺ und CD34⁻ Zellen dargestellt. Wie erwartet enthielt die dominante Bande für CD44s kein variables Exon zwischen den 2 Primerbindungsstellen, die jeweils in ein Standardexon gelegt wurden. Die jeweils starke Bande, die für die verschiedenen CD44-Varianten gefunden wurde, entsprach bei allen Varianten, bis auf CD44v9, dem einzelnen variablen Exon, das direkt nach dem Standardexon eingebaut wurde. In der starken Bande für CD44v9 war vor dem variablen Exon V9 noch V8 eingebaut. In der nächsthöheren Bande, die man nach Amplifikation mit den CD44v3-, CD44v4-, CD44v7-Reverse-Primern erhielt, war das jeweils davorliegende variable Exon eingebaut. Für den CD44v3-Reverse-Primer bedeutete dies beispielsweise, dass nach dem Standardexon, das variable Exon CD44v2 und im Anschluss das variable Exon CD44v3 durch alternatives Spleißen eingebaut wurde. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die variablen Exons der Reihenfolge nach eingebaut werden.

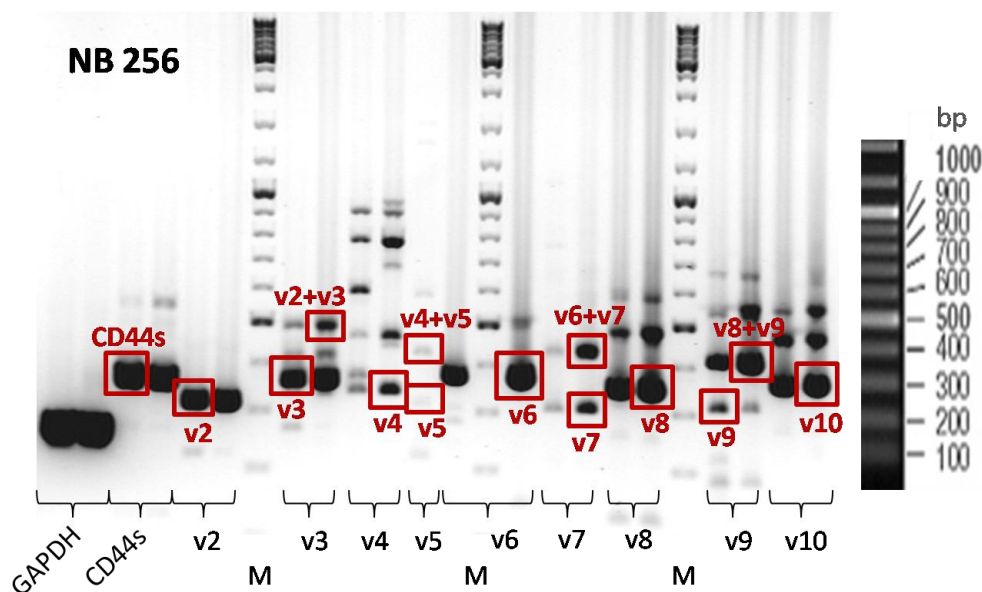


Abbildung 3-9 Übersicht über die aus dem Agarosegel extrahierten PCR-Produkte (rotes Viereck) von CD34⁺ (linke Bande) und CD34⁻ Zellen (rechte Bande) von NB 256 und die nach Sequenzierung erhaltene Verteilung der exprimierten variablen Exons (rote Schrift).

3.1.2 Real-time PCR

3.1.2.1 CD44pan- und CD44v-Expression in leukämischen Zelllinien

Um die CD44v-Expression auch eindeutig quantifizieren zu können, wurden neue Forward- und Reverse-Primer entworfen, die beide im jeweiligen variablen Exon lagen, damit nur ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wurde, welches mit SYBR-Green quantifiziert werden konnte. Für GAPDH und CD44pan wurden ebenfalls neue für Real-time PCR geeignete Primer entworfen. In Abbildung 3-10 sind die erhaltenen spezifischen PCR-Produkte für alle neuen Primerpaare nach Real-time PCR mit SYBR-Green am Beispiel von KG-1a dargestellt. Die Größen der erhaltenen Produkte stimmten mit den theoretisch berechneten überein. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode mit GAPDH als Kontrollgen.

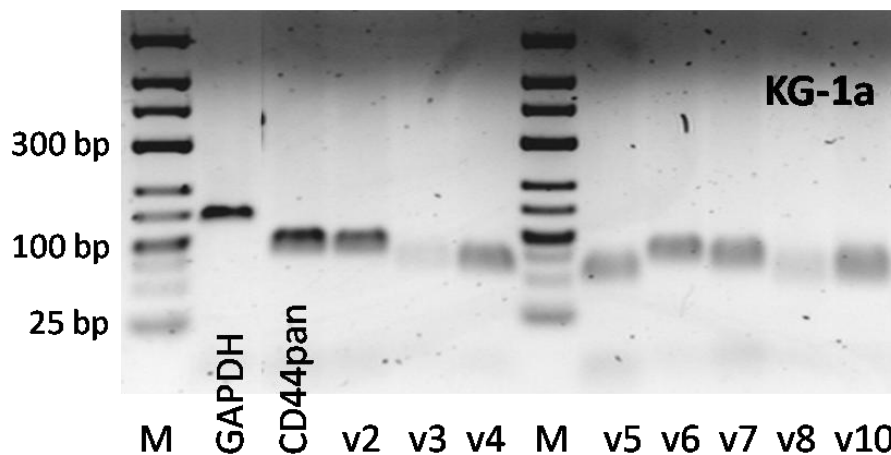


Abbildung 3-10 PCR-Produkte für GAPDH, CD44pan und CD44v nach Real-time PCR mit neuen Primern am Beispiel von KG-1a.

In Abbildung 3-11 ist die relative CD44pan- und CD44v-Expression in den 6 leukämischen Zelllinien in Relation zu KG-1a dargestellt. KG-1a zeigte die stärkste CD44pan- und CD44v-Expression. HL-60, NB-4 und K-562 zeigten ähnliche Expressionslevel von CD44pan, CD44v2, CD44v3, CD44v4 und CD44v5. In K-562 waren jedoch CD44v6, CD44v7, CD44v8 und CD44v10 stärker exprimiert als in HL-60 und NB-4 und erreichten fast die Level von KG-1a. In Jurkat und Kasumi-1 fand man keinerlei CD44-Expression, weder CD44pan noch CD44v.

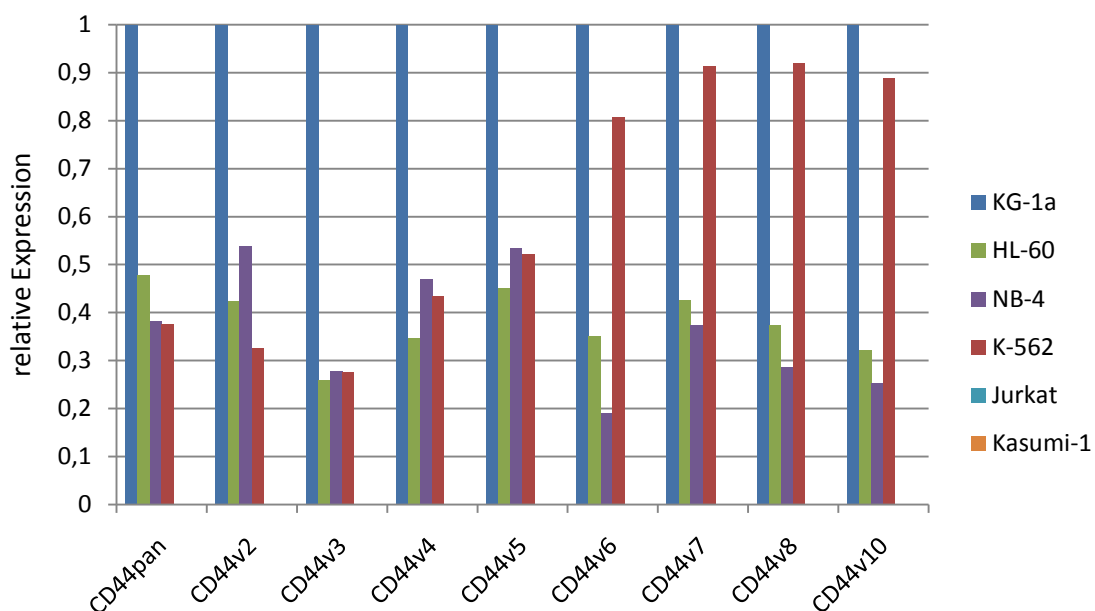


Abbildung 3-11 Relative CD44pan- und CD44v-Expression in den leukämischen Zelllinien in Relation zu KG-1a.

3.1.2.2 CD44pan- und CD44v-Expression in verschiedenen Subpopulationen von primären Zellen

In verschiedenen Subpopulationen primärer Zellen wurde ebenfalls mittels SYBR-Green und für Real-time PCR geeigneten Primern die CD44pan-, CD44v- und ALDH-Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Jeweils aus Nabelschnurblut, aus Knochenmark von Patienten mit neudiagnostizierter AML und aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut gesunder Spender, wurden zum einen CD34⁺ und CD34⁻ Zellen, ALDH⁺ und ALDH⁻ Zellen und langsam- (SDF) und schnellteilende Zellen (FDF) auf ihre Expression hin untersucht.

3.1.2.2.1 *Negative Korrelation zwischen der ALDH- und CD44-Expression in verschiedenen Subpopulationen von primären Zellen*

ALDH⁺ und ALDH⁻ Zellen, sowie SDF und FDF jeweils aus Nabelschnurblut, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut, Knochenmark eines gesunden Spenders und von AML-Patienten wurden auf ihre relative ALDH- und CD44s-Expression mittels Real-time PCR untersucht (siehe Abbildung 3-12). Für diese Untersuchung wurden die Primer für CD44s, die für die Standard-PCR verwendet wurden, benutzt. Sowohl in den nach ALDH⁺ und ALDH⁻ sortierten als auch in SDF und FDF war ein sehr heterogenes Verhältnis in der ALDH-Expression zu finden. Beispielsweise war in NB 773-76 eine nur 3,56-fache Erhöhung in der ALDH-Expression zwischen ALDH⁺ in Relation zu ALDH⁻ Zellen zu beobachten, im Gegensatz zu einer fast 160-fachen Erhöhung in den Zellen aus KM 2 gesund. Dem entgegengesetzt stand eine negativ korrelierende CD44s-Expression. In den Proben mit einer starken Erhöhung der ALDH-Expression in ALDH⁺ versus ALDH⁻ Zellen bzw. in SDF versus FDF fand man eine Erniedrigung der CD44s-Expression und umgekehrt.

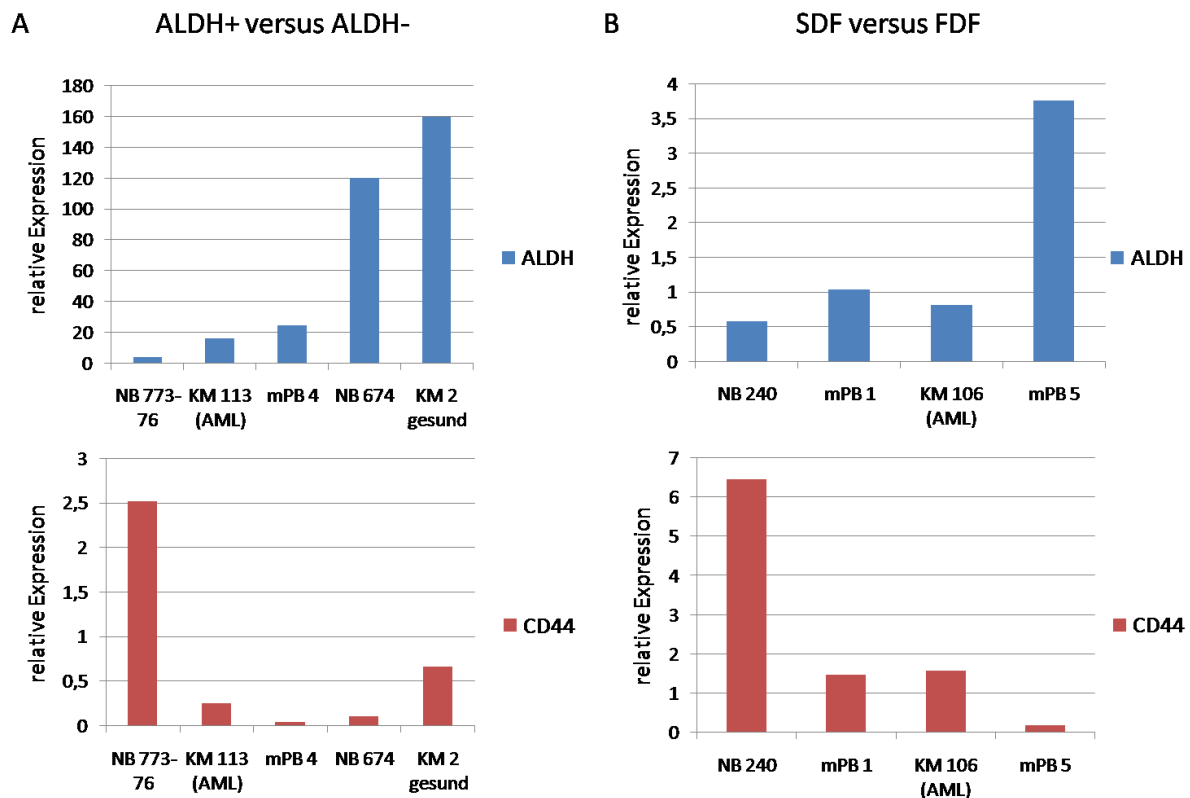


Abbildung 3-12 Übersicht über die negativ korrelierende ALDH- und CD44s-Expression in ALDH⁺ versus ALDH⁻ Zellen (A) und SDF versus FDF (B) in verschiedenen Proben aus Nabelschnurblut, Knochenmark von AML-Patienten und gesundem Spender und mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut.

3.1.2.2.2 *Heterogene CD44pan- und CD44v-Expression in CD34⁺ Zellen aus Knochenmark von Patienten mit AML*

Die CD44pan- und CD44v-Expression wurde in CD34⁺ Knochenmarkszellen von 5 verschiedenen Patienten mit AML untersucht. Die Werte für die einzelnen Proben wurden jeweils auf Probe KM 77, die 1 gesetzt wurde, bezogen und in Abbildung 3-13 dargestellt. KM 77, 67 und 69 zeigten etwa ähnliche Werte für die CD44v-Expression im Gegensatz zu KM 112 und 72, in denen die CD44v-Expression teilweise bis zu 8-fach (für CD44v7) erhöht war im Vergleich zu KM 77.

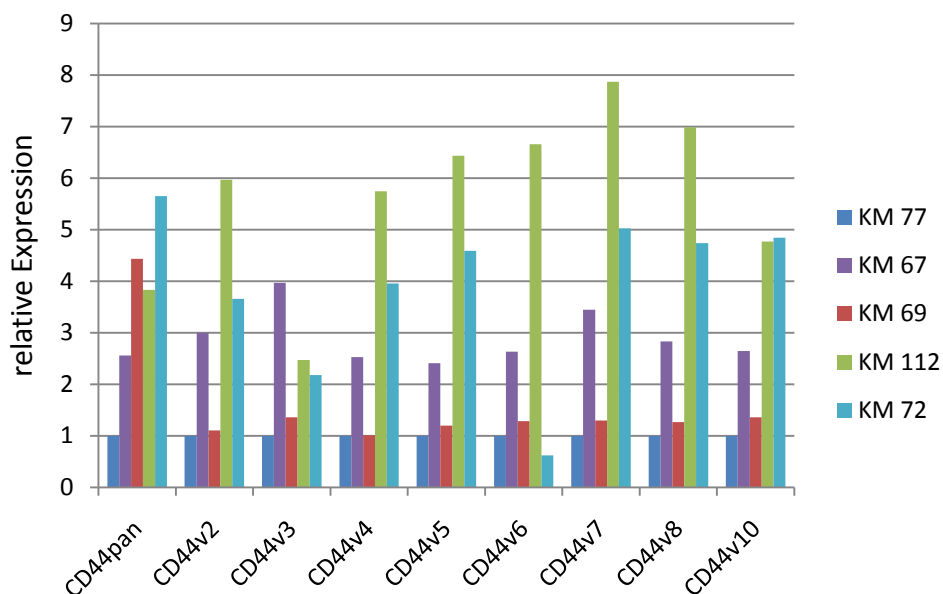


Abbildung 3-13 Relative CD44pan- und CD44v-Expression in CD34⁺ Zellen aus Knochenmark von AML-Patienten. Bezogen wurden die Werte jeweils auf Probe KM 77, die 1 gesetzt wurde.

Hat man im Folgenden nun die Werte für die einzelnen AML-Proben in Relation zu der gleichen Nabelschnurblutprobe gesetzt, wie unter 3.1.2.2.4, und die Mittelwerte der AML-Proben mit denen aus Nabelschnurblut verglichen, so stellte man fest, dass die CD44v-Expression in CD34⁺ Zellen aus Knochenmark von AML-Patienten teilweise deutlich höher war als in denen aus Nabelschnurblut (Daten nicht dargestellt). Diese Erhöhungen waren jedoch statistisch nicht signifikant, da die AML-Proben, wie bereits erwähnt, teilweise sehr heterogene Ergebnisse zeigten.

3.1.2.2.3 Heterogene CD44pan- und CD44v-Expression in ALDH⁺ Zellen aus Knochenmark von Patienten mit AML

Analog zur Real-time PCR in CD34⁺ Zellen wurden auch ALDH⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark von AML-Patienten, jeweils 3 bzw. 4 Proben, auf ihre CD44pan- und CD44v-Expression untersucht. Die Ergebnisse für eine Nabelschnurblutprobe wurden 1 gesetzt und alle anderen Nabelschnurblut- und Knochenmarkproben von AML-Patienten wurden darauf bezogen. Anschließend wurde jeweils der Mittelwert für Nabelschnurblut und Knochenmark von AML-Patienten berechnet und in Abbildung 3-14 dargestellt. Die Werte für die CD44pan- und CD44v-Expression in den 3 Proben aus Nabelschnurblut zeigten nur geringe Schwankungen im Gegensatz zu den Werten in den 4 Proben aus Knochenmark von

AML-Patienten, die deutlich voneinander abwichen, was man anhand der hohen Standardabweichung in Abbildung 3-14 gut erkennen kann. In den Proben KM 83 und 96 waren die CD44-Varianten geringer, in KM 113 nahezu unverändert und in KM 77 stärker exprimiert im Vergleich zu den Nabelschnurblutproben.

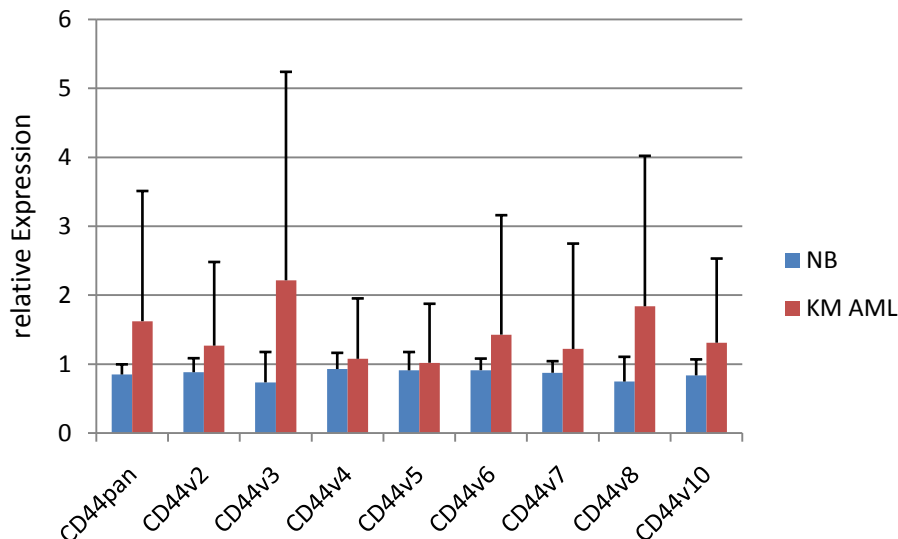


Abbildung 3-14 Relative CD44pan- und CD44v-Expression in ALDH⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark von AML-Patienten. Bezogen wurden die Werte auf eine Nabelschnurblutprobe, die 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind der Mittelwert aus jeweils 3 (NB) bzw. 4 (KM AML) Proben und die Standardabweichung.

3.1.2.2.4 Hochregulation der CD44v-Expression in CD34⁺ Zellen aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut im Gegensatz zu Nabelschnurblut

CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut von gesunden Spendern, jeweils 3 Proben, wurden auf ihre CD44pan- und CD44v-Expression untersucht. Die Ergebnisse einer Nabelschnurblutprobe wurden 1 gesetzt und alle anderen Nabelschnurblut- und mit G-CSF mobilisierten Peripherblutproben wurden darauf bezogen. Anschließend wurde jeweils der Mittelwert für Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut berechnet und in Abbildung 3-15 dargestellt. Sowohl die CD44pan- als auch die CD44v-Expression war in CD34⁺ Zellen aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut im Gegensatz zu Nabelschnurblut erhöht, wobei vor allem die Erhöhung der CD44v-Expression sehr stark war. Die stärksten Erhöhungen waren für CD44v2, v4, v5, v6, v7 und v8 zu

beobachten. Bis auf die CD44v3-Expression waren alle Expressionserhöhungen statistisch signifikant. Interessanterweise schwankten die Werte für Nabelschnurblut kaum zwischen den verschiedenen Proben, im Gegensatz zu teilweise hohen Schwankungen in den verschiedenen Proben aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut.

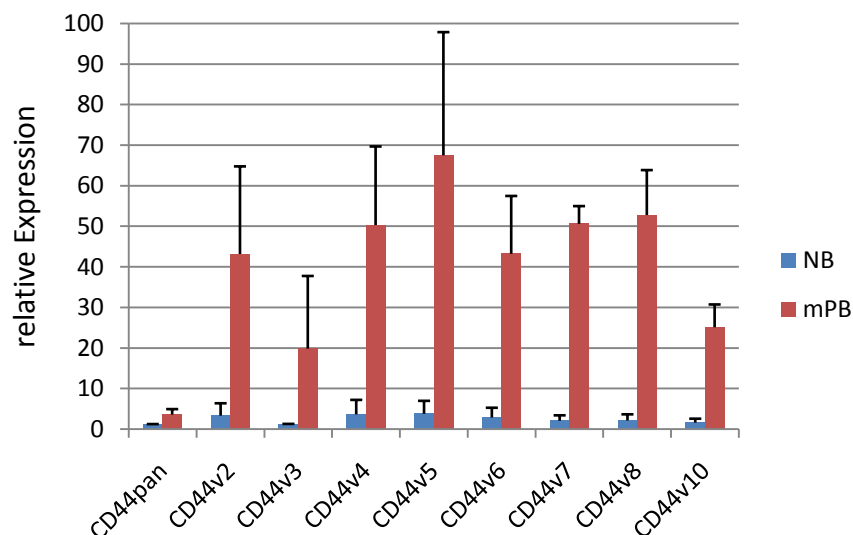


Abbildung 3-15 Relative CD44pan- und CD44v-Expression in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut. Bezogen wurden die Werte auf eine Nabelschnurblutprobe, die 1 gesetzt wurde. Dargestellt sind der Mittelwert aus jeweils 3 Proben und die Standardabweichung. Bis auf CD44v3 waren alle Werte in mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut signifikant erhöht im Vergleich zu Nabelschnurblut ($p < 0,05$).

3.1.2.2.5 Höhere CD44pan- und CD44v-Expression in ALDH⁺ Zellen nach Mobilisierung mit Plerixafor

Im Rahmen einer Phase IIIb Studie wurden Zellen aus 8 Patienten mit Multiplem Myelom im Stadium IIIA nach Salmon und Durie (Durie und Salmon 1975) mit G-CSF und Plerixafor mobilisiert und mithilfe von verschiedenen Untersuchungen charakterisiert (Taubert, Saffrich et al. 2011). Ein Teil der Ergebnisse soll an dieser Stelle nur kurz erwähnt werden, da sie nicht im direkten Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen. Nach Mobilisierung mit Plerixafor erhielt man höhere Prozentzahlen an ALDH⁺ und CD34⁺ Zellen sowie an den primitiveren ALDH⁺/CD34⁺/CD38⁻ und CD34⁺/CD38⁻ Zellen im Vergleich zur Mobilisierung mit G-CSF allein. Darüber hinaus exprimierten die ALDH⁺ und CD34⁺ Zellen mehr CD133 nach Plerixaforgabe und es konnten mehr CXCR4⁺ Zellen detektiert werden nach Verabreichung von Plerixafor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ALDH⁺ und CD34⁺ Zellen aus mit G-CSF und Plerixafor mobilisiertem Peripherblut auf ihre CD44pan- und CD44v-Expression untersucht. Dabei wurden jeweils Zellen aus mobilisiertem Peripherblut vor Plerixafor- und nach G-CSF-Gabe (vor Plerixafor) und 10 h nach Plerixaforgabe (nach Plerixafor) untersucht. Abbildung 3-16 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse für ALDH⁺ und CD34⁺ Zellen vor versus nach Plerixafor von jeweils 4 Patienten. In ALDH⁺ Zellen vor Plerixaforgabe fand man eine niedrigere CD44pan- und CD44v-Expression im Vergleich zu ALDH⁺ Zellen nach Plerixaforgabe. Für CD44v2, v4, v5, v6, v8 und v10 waren diese Änderungen nach Plerixaforgabe statistisch signifikant ($p < 0,05$). Plerixafor führte also in den ALDH⁺ Zellen zu einer Hochregulation der CD44-Expression auf mRNA-Ebene. CD34⁺ Zellen zeigten die gegenläufige Tendenz. Statistisch signifikant war die Erniedrigung der CD44pan- und CD44v-Expression nach Plerixaforgabe nicht, da die Ergebnisse in die 4 getesteten Proben sehr heterogen waren. Eine Probe zeigte kaum Unterschiede, 1 Probe eine Erhöhung und 2 Proben eine Erniedrigung der Expression nach Plerixaforgabe.

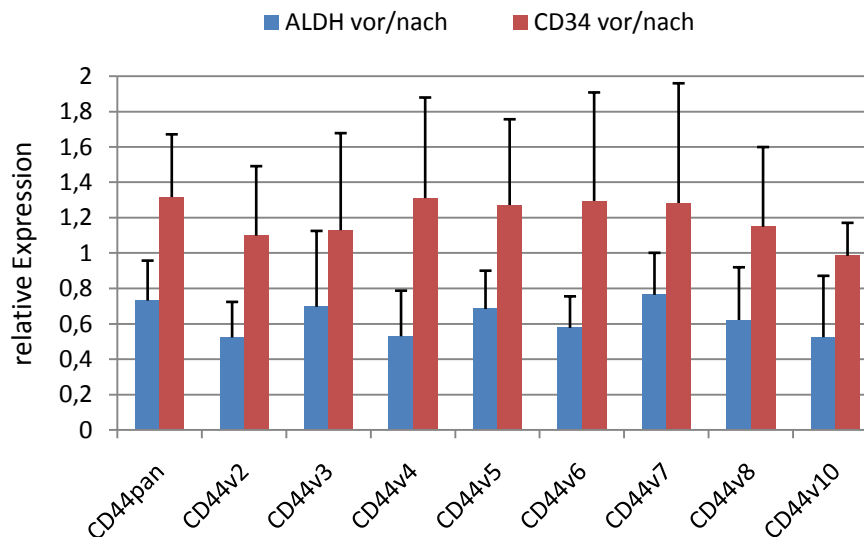


Abbildung 3-16 Relative CD44pan- und CD44v-Expression in ALDH⁺ und CD34⁺ Zellen vor versus nach Plerixafor. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils 4 Patienten. Die Werte für CD44v2, v4, v5, v6, v8 und v10 in ALDH⁺ Zellen vor versus nach Plerixafor waren statistisch signifikant ($p < 0,05$).

3.2 Profil von CD44pan und CD44v auf Protein-Ebene mittels Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Oberflächenexpression von CD44pan (Gesamt-CD44) und CD44v mittels Durchflusszytometer erfolgte mit kommerziell erhältlichen Antikörpern. Die Begriffe CD44pan und CD44s wurden teilweise simultan verwendet, da die CD44v-Expression teilweise so niedrig war, dass die Expression von CD44s den Hauptbestandteil der CD44pan-Expression darstellte. CD44pan wurde dabei mit einem PE- bzw. APC-gekoppelten Antikörper detektiert und CD44v3, v4, v5, v6 und v7 mit Biotin-gekoppelten Antikörpern, deren Detektion mit Streptavidin-Konjugaten erfolgte, die FITC-, PE- oder APC-markiert waren. Antikörper gegen CD44v2, v8, v9 und v10 waren leider nicht erhältlich und somit konnte deren Oberflächenexpression nicht untersucht werden.

3.2.1 CD44pan- und CD44v-Expression in leukämischen Zelllinien

Analog zur mRNA-Ebene wurden die leukämischen Zellen auch auf Proteinebene hinsichtlich ihrer CD44pan- und CD44v-Expression untersucht. Dabei wurde jedes Molekül auf jeder Zelllinie mindestens 3x gemessen (n=3 bis n=10). Abbildung 3-17 zeigt eine Übersicht über die in den leukämischen Zelllinien gefundene CD44pan-Expression, die mittels Durchflusszytometrie detektiert wurde. Zugehörige Immunofluoreszenzmikroskopieaufnahmen der CD44pan-Expression sind in Abbildung 3-18 zu sehen. In Jurkat und Kasumi-1 konnten auf der Oberfläche keinerlei CD44-Moleküle gemessen werden, was auch mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene korrelierte (siehe Abbildung 3-19). KG-1a, HL-60, NB-4 und K-562 zeigten eine durchgehend starke CD44pan-Oberflächenexpression, die bei KG-1a, HL-60 und NB-4 nahezu 100 % betrug und bei K-562 91,4 %. K-562 zeigte eine sehr heterogene Verteilung der CD44pan-Expression. Es gab Zellen mit viel, wenig und keinem CD44pan auf der Oberfläche. CD44v7 wurde in Zellen, die CD44-Varianten auf ihrer Oberfläche zeigten, am stärksten exprimiert. Generell war die CD44v-Expression, besonders in KG-1a und K-562, sehr heterogen, was an der hohen Standardabweichung im Diagramm erkennbar ist. Die Ursache für diese starken Schwankungen in der CD44v-Expression, wurde in weiteren Versuchen genauer untersucht.

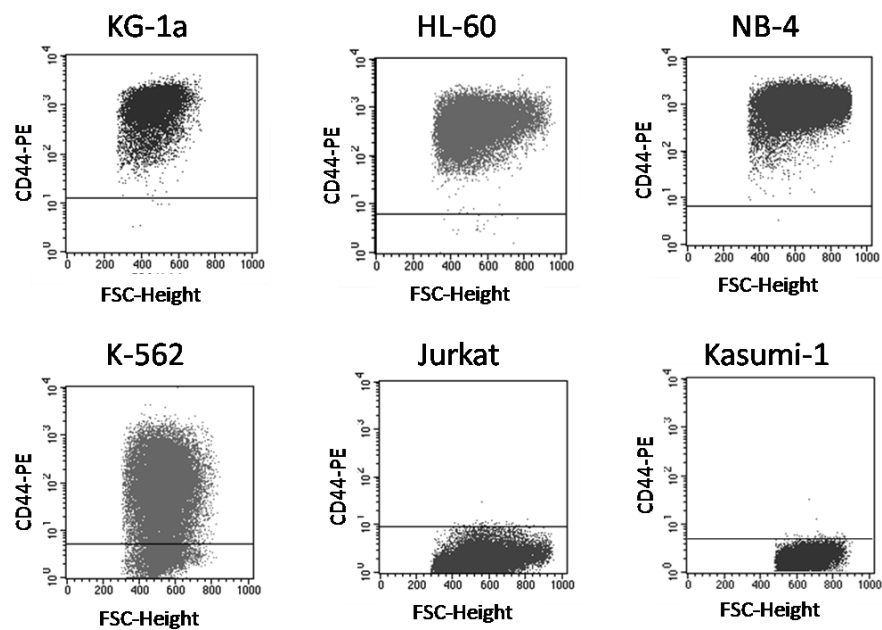


Abbildung 3-17 CD44pan-Oberflächenexpression in den 6 leukämischen Zelllinien. Dargestellt ist jeweils ein Dot blot mit zugehöriger CD44pan-Expression (CD44-PE).

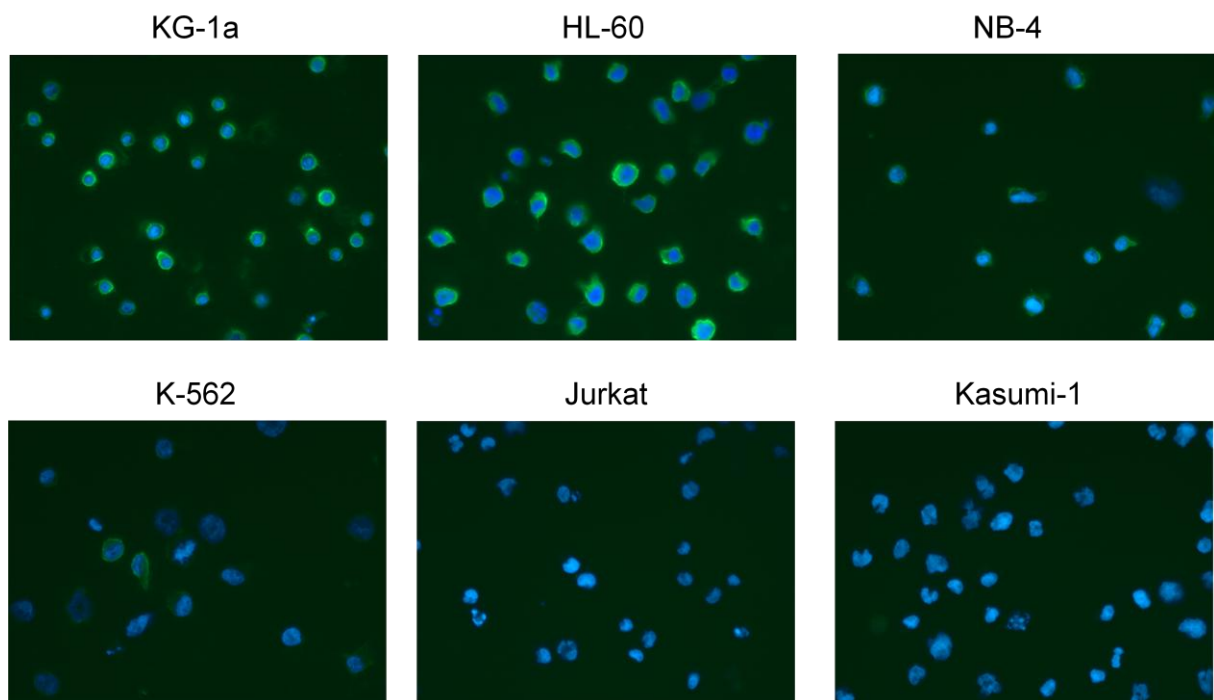


Abbildung 3-18 Immunofluoreszenzmikroskopiebilder von CD44pan auf der Oberfläche der 6 leukämischen Zelllinien. DNA wurde mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt und CD44pan mit dem clone A3D8 und chicken anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (grün).

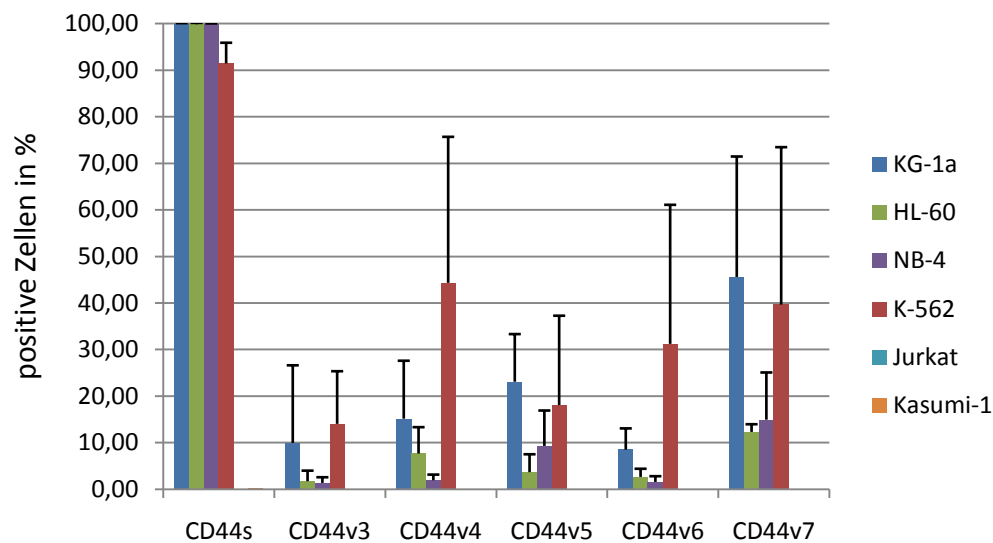


Abbildung 3-19 CD44pan- (CD44s-) und CD44v-Oberflächenexpression in den 6 leukämischen Zelllinien. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens 3 Versuchen (n=3 bis n=10).

3.2.2 CD44pan- und CD44v-Expression in verschiedenen Subpopulationen von primären Zellen

Analog zur mRNA-Ebene wurde die CD44pan- und CD44v-Oberflächenexpression auch in verschiedenen Subpopulationen von primärem humanem Material untersucht. Dafür wurden jeweils Zellen aus Nabelschnurblut, aus Knochenmark oder Peripherblut von gesunden Spendern oder Patienten mit neudiagnostizierter AML und aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut von gesunden Spendern analysiert. Dabei wurden zum einen MNCs mit Aldefluor, Antikörpern gegen CD34, CD44pan und CD44-Varianten gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Des Weiteren wurden CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut mit PKH26 gefärbt und nach 7 Tagen in SDF und FDF sortiert und ebenfalls auf ihre CD44-Expression untersucht. Darüber hinaus wurden Leukozyten mittels Erythrozytenlyse isoliert und auch auf ihre CD44-Expression hin untersucht. Zusätzlich wurden auch MSCs, die in verschiedenen Medien kultiviert wurden, dahingehend analysiert.

3.2.2.1 CD44v-Expression in CD34⁺, ALDH⁺ und ALDH⁺/CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark von gesunden Spendern und AML-Patienten

MNCs aus jeweils 3 Proben aus Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut von gesunden Spendern, wurden zunächst mittels Magnetseparation über eine Säule nach CD34 angereichert. Für Nabelschnurblut betrug diese Anreicherung im Mittel 47,09 % für mit G-CSF mobilisiertes Peripherblut 93,92 %. Diese Anreicherung der Zellen war nötig, um für die CD44v-Expression in den CD34⁺, ALDH⁺ und ALDH⁺/CD34⁺ Zellen aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können. Die MNCs aus 4 Proben von gesundem Knochenmark und aus 12 Proben von Knochenmark von Patienten mit AML konnten aufgrund der geringen Probenmenge und der daraus resultierenden niedrigen Zellzahl, nicht nach CD34 angereichert werden. Bei diesen Proben wurden die MNCs, ohne vorherige Anreicherung, direkt gefärbt. Abbildung 3-20 zeigt eine Übersicht über die gefärbten Parameter am Beispiel des Knochenmarks von AML-Patient Nummer 10 (AML 10).

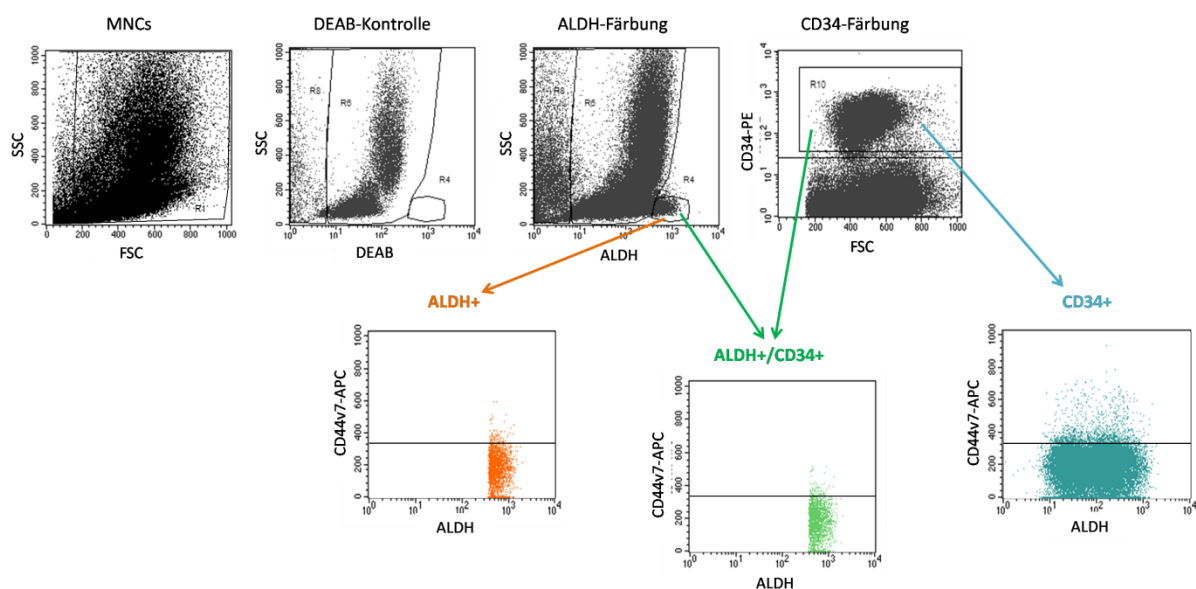


Abbildung 3-20 Übersicht über die Kombination der verschiedenen Färbungen von ALDH und deren Kontrolle DEAB, CD34 und CD44v7 in MNCs von AML 10. Die CD44pan- und CD44v-Expression wurden jeweils in ALDH⁺, CD34⁺ und ALDH⁺/CD34⁺ analysiert.

Abbildung 3-21 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse für die CD44v-Expression in ALDH⁺, CD34⁺ und ALDH⁺/CD34⁺ Zellen aus mit G-CSF mobilisiertem

Peripherblut von gesunden Spendern, Nabelschnurblut und Knochenmark von gesunden Spendern. Insgesamt war die CD44v-Expression niedrig. Dennoch waren sie in den Subpopulationen aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Nabelschnurblut niedriger exprimiert, als in denen aus gesundem Knochenmark. Demnach war also in den Subpopulationen aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Nabelschnurblut nahezu keine CD44v-Expression zu finden. Die Schwankungen in der CD44v-Expression in den Zellen aus Knochenmark waren besonders in den ALDH⁺ und ALDH⁺/CD34⁺ hoch, was auf eine hohe Heterogenität zwischen den 4 gesunden Spendern hindeutet. CD44v7 wurde von allen Varianten am stärksten exprimiert.

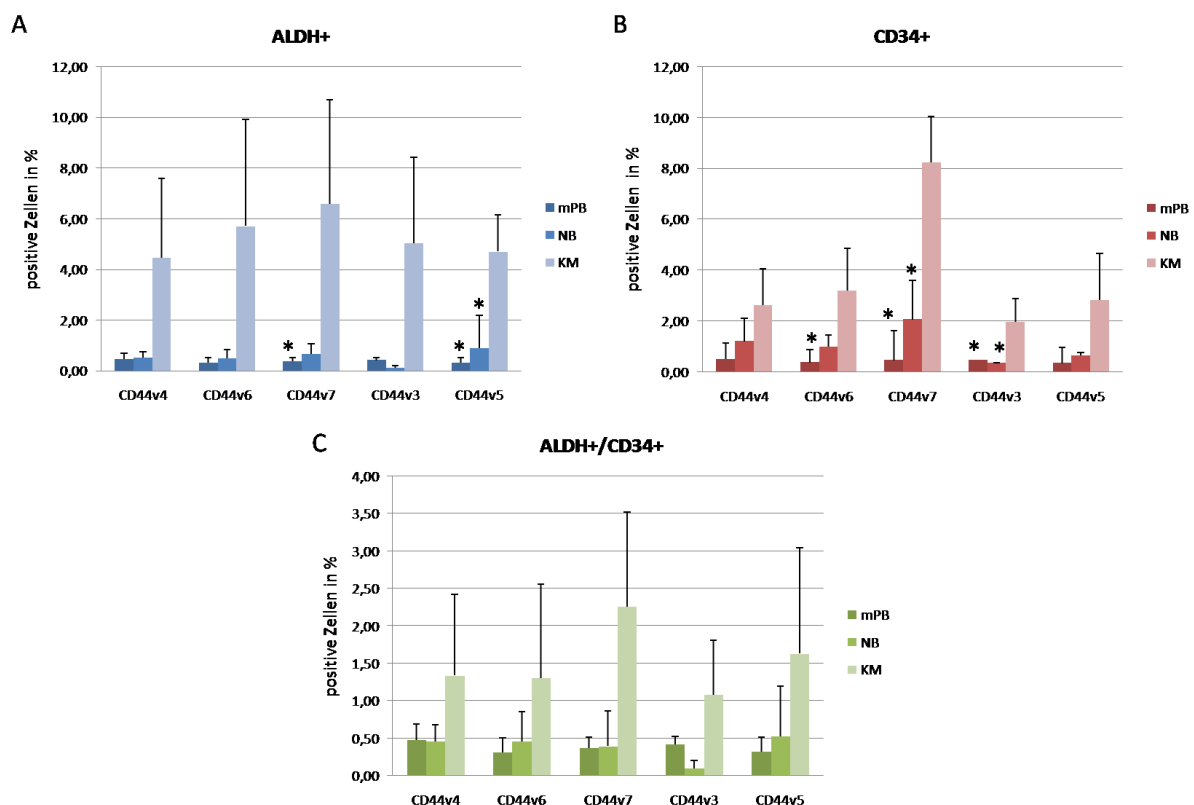


Abbildung 3-21 CD44v-Expression in ALDH⁺ (A), CD34⁺ (B) und ALDH⁺/CD34⁺ (C) Zellen aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut von gesunden Spendern (n=3), Nabelschnurblut (n=3) und Knochenmark von gesunden Spendern (n=4). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Die mit * versehenen Werte waren jeweils statistisch signifikant verschieden von denen in Knochenmark ($p \leq 0,05$).

Im Weiteren wurde nun die CD44v-Expression in ALDH⁺, CD34⁺ und ALDH⁺/CD34⁺ Zellen aus Knochenmark von gesunden Spendern (n=4) mit denen aus Patienten mit AML (n=12) verglichen. Die 12 Patienten mit neudiagnostizierter AML, wurden nach

dem Vorhandensein von ungünstigen und günstigen zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen, nach den aktuellen Richtlinien der German AML Intergroup, in verschiedene Risikogruppen eingeteilt. 5 Patienten gehörten demnach zur zytogenetischen Hochrisikogruppe (cHRG) und 6 zur zytogenetischen Intermediärrisikogruppe (cIRG). Zytogenetische Informationen von einem Patienten waren nicht verfügbar.

Abbildung 3-22 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse für die CD44v-Expression. In den ALDH⁺ Zellen aus gesundem Knochenmark und denen von AML-Patienten war nahezu kein Unterschied in der CD44v-Expression detektierbar. In CD34⁺ und ALDH⁺/CD34⁺ Zellen waren die CD44-Varianten im Knochenmark von AML-Patienten hingegen tendenziell erhöht. Statistisch signifikant war diese Erhöhung der CD44v-Expression nicht, da die Schwankungen in den Ergebnissen, vor allem zwischen den AML-Patienten sehr hoch waren.

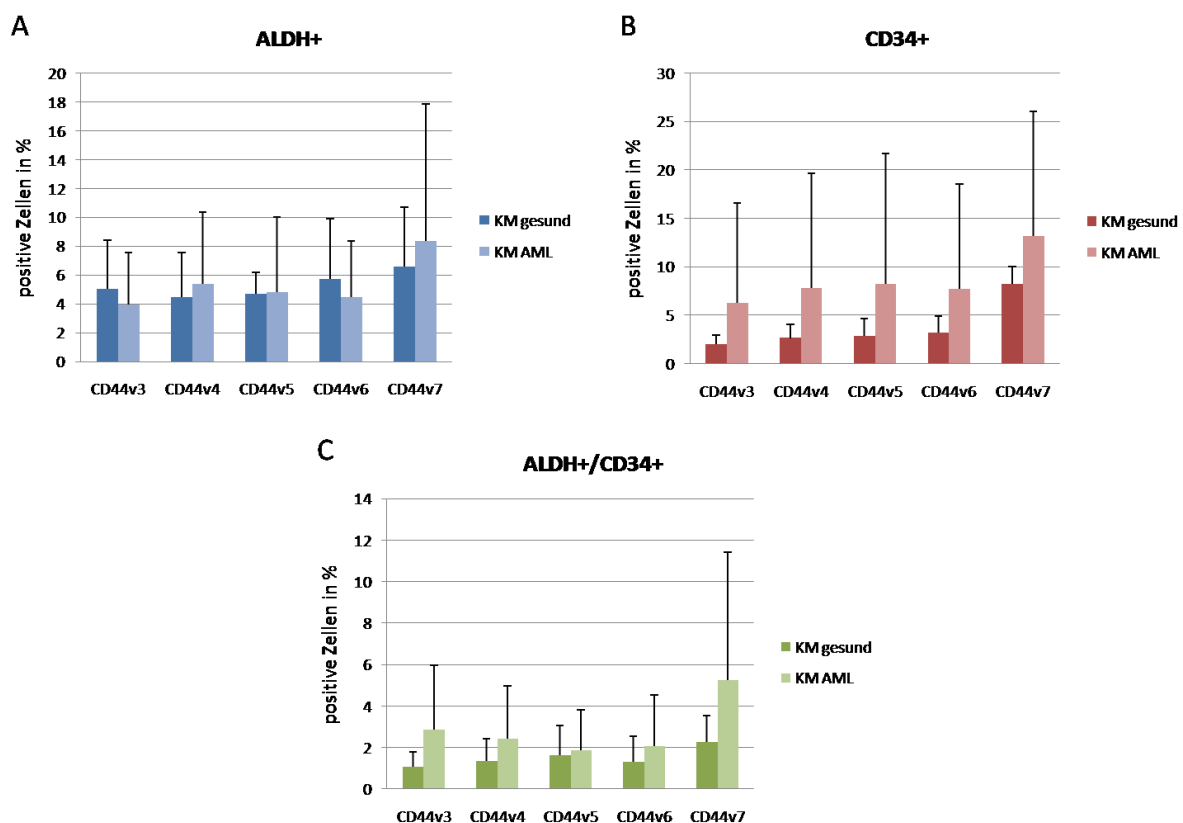


Abbildung 3-22 CD44v-Expression in ALDH⁺ (A), CD34⁺ (B) und ALDH⁺/CD34⁺ (C) Zellen aus Knochenmark von gesunden Spendern (n=4) und Knochenmark von AML-Patienten (n=12). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.

CD44v7 war auch in diesen Proben die höchstexprimierte Variante. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse für diese Variante für alle Patienten einzeln aufgeschlüsselt und mit dem Mittelwert für Knochenmark von gesunden Spendern verglichen (siehe Abbildung 3-23). Auffällig war die sehr hohe Schwankungsbreite für die CD44v7-Expression in den AML-Patienten. Es gab Patienten mit niedrigerer, gleich hoher und höherer Expression im Vergleich zum gesunden Knochenmark. Die höchste CD44v7-Expression in ALDH⁺ und ALDH⁺/CD34⁺ Zellen war in AML 2 mit 34,74 bzw. 22,7 % und in CD34⁺ Zellen in AML 5 mit 43,88 % messbar.

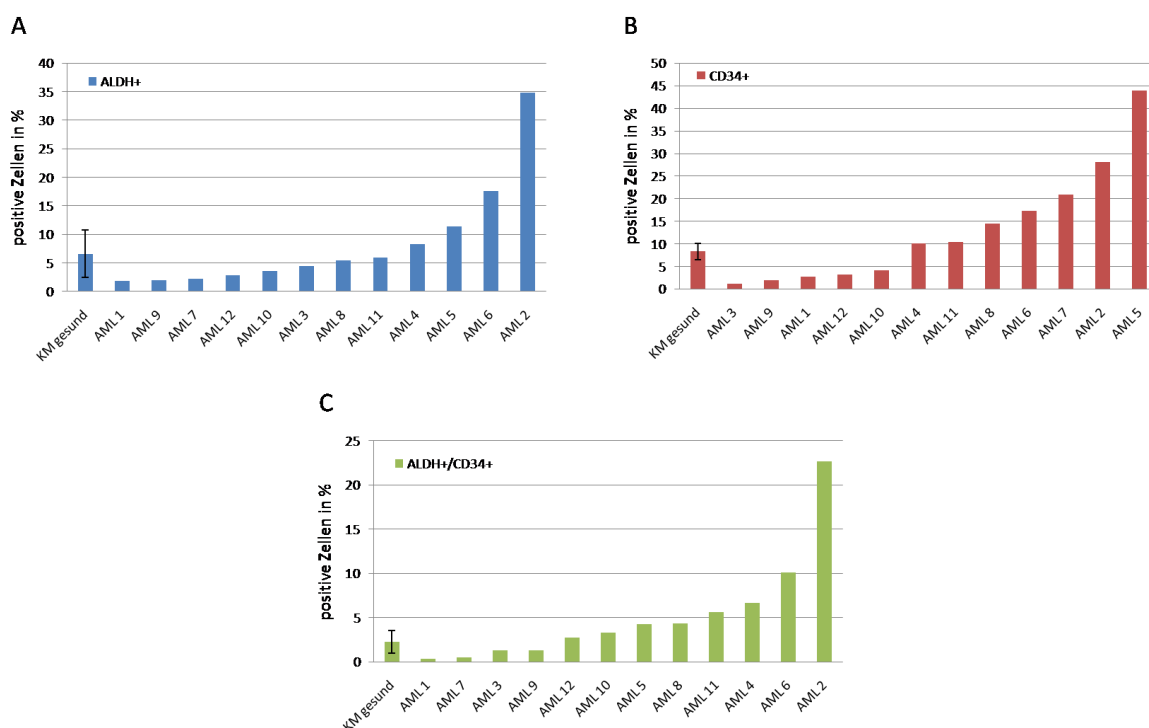


Abbildung 3-23 CD44v7-Expression in ALDH⁺ (A), CD34⁺ (B) und ALDH⁺/CD34⁺ (C) Zellen aus Knochenmark von gesunden Spendern (n=4) und Knochenmark von AML-Patienten (AML 1-12). Die Werte für das Knochenmark von gesunden Spendern sind jeweils als Mittelwert und deren Standardabweichung dargestellt. Die Werte für das Knochenmark von AML-Patienten sind jeweils einzeln dargestellt.

Als nächstes wurden verschiedene Parameter wie z.B. die Menge an ALDH⁺ bzw. CD34⁺ Zellen im Knochenmark oder Patienten der cIRG bzw. cHRG jeweils der CD44v7-Expression gegenübergestellt und durch die Berechnung des Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten analysiert. Mithilfe dieser Analyse konnte eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen der Menge an CD34⁺ Blasten im Knochenmark und der Expression von CD44v7 in den CD34⁺ Blasten gefunden

werden ($n=11$, Spearman $r=-0,7182$, $P=0,0128$, siehe Abbildung 3-24). Je mehr $CD34^+$ Blasten im Knochenmark vorkamen, desto niedriger war deren $CD44v7$ -Expression. Die klinischen Daten für die $CD34$ -Expression von einem Patienten waren nicht verfügbar, so erfolgte die Analyse in nur 11 Patienten.

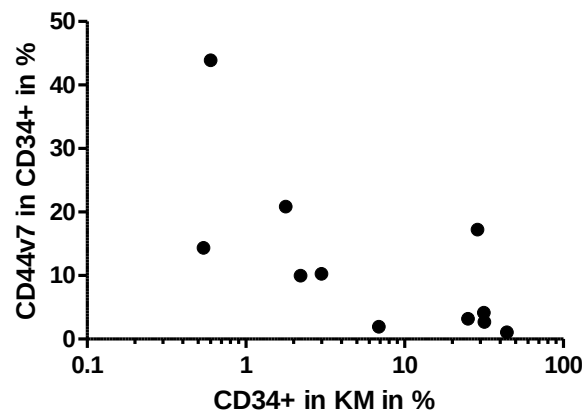


Abbildung 3-24 Übersicht über die negative Korrelation zwischen der Anzahl an $CD34^+$ Blasten im Knochenmark und der $CD44v7$ -Expression in den $CD34^+$ Blasten ($n=11$, Spearman $r=-0,7182$, $P=0,0128$).

3.2.2.2 $CD44pan$ -Expression in $CD34^+$, $ALDH^+$ und $ALDH^+/CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark von gesunden Spendern und AML-Patienten

Die Analyse der $CD44pan$ -Expression erfolgte in denselben 3 bzw. 4 Proben aus Nabelschnurblut, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und gesundem Knochenmark wie für die $CD44v$ -Analyse (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Darüber hinaus wurden insgesamt 29 Proben von Knochenmark von Patienten mit AML auf ihre $CD44pan$ -Expression hin untersucht. Zwölf dieser 29 AML-Proben waren dieselben wie für die $CD44v$ -Expression (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Auch diese AML-Patienten wurden wie unter 3.2.2.1 beschrieben in zytogenetische und molekulargenetische Risikogruppen eingeteilt. 12 Patienten gehörten zur cHRG und 16 zur cIRG. Zytogenetische Informationen von einem Patienten waren nicht verfügbar.

Die $CD44pan$ -Expression war in den $ALDH^+$ und $ALDH^+/CD34^+$ Zellen aus gesundem Material einheitlich hoch und lag zwischen 98 und 100 %. In den $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut und gesundem Knochenmark war mit 93,7 bzw. 94,46 %

eine niedrigere CD44pan-Expression zu finden, als in mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut mit 98,98 %.

Die CD44pan-Expression in ALDH⁺/CD34⁺ Zellen aus gesundem Knochenmark (99,97 %) und die von AML-Patienten (99,68 %, n=12) war gleich hoch und die in ALDH⁺ Zellen aus AML-Patienten (89,57 %, n=29) niedriger als in gesundem Knochenmark (99,65 %). Die Schwankungsbreite der CD44pan-Expression in ALDH⁺ Zellen aus AML-Patienten war sehr groß und lag zwischen 36,7 und 100 %. In CD34⁺ Zellen aus Knochenmark von AML-Patienten war die CD44pan-Expression mit 95,24 % (n=26) in etwa gleich im Vergleich zu gesundem Knochenmark (94,46 %), wobei sich die Schwankungsbreite zwischen Knochenmark von AML-Patienten und gesunden Spendern deutlich unterschied. In AML-Patienten lagen die CD44pan-Expressionen in den CD34⁺ Zellen zwischen 60 und 100 %, in den gesunden Spendern zwischen 90,62 und 97,33 %.

Als nächstes wurden, wie auch für die CD44v7-Expression unter 3.2.2.1, verschiedene Parameter wie z.B. die Menge an ALDH⁺ bzw. CD34⁺ Zellen im Knochenmark oder Patienten der cIRG bzw. cHRG jeweils der CD44pan-Expression gegenübergestellt und durch die Berechnung des Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten analysiert. Mithilfe dieser Analyse konnten 2 statistisch signifikante Korrelationen gefunden werden. Zum einen konnte eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen der Menge an ALDH⁺ Zellen im Knochenmark und der Expression von CD44pan in den ALDH⁺ Zellen in Patienten der cHRG gezeigt werden (n=12, Spearman $r=-0,8301$, $P=0,0008$, siehe Abbildung 3-25A). Je mehr ALDH⁺ Zellen im Knochenmark vorkamen, desto niedriger war deren CD44pan-Expression in Patienten der cHRG. Darüber hinaus zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Menge an CD34⁺ Blasten im Knochenmark und der Expression von CD44pan in den CD34⁺ Blasten in Patienten der cIRG (n=13, Spearman $r=0,5599$, $P=0,0466$, siehe Abbildung 3-25B). Je mehr CD34⁺ Blasten im Knochenmark vorkamen, desto höher war deren CD44pan-Expression in Patienten der cIRG. Die klinischen Daten für die CD34-Expression von 3 Patienten waren nicht verfügbar, so erfolgte die Analyse in nur 13 Patienten.

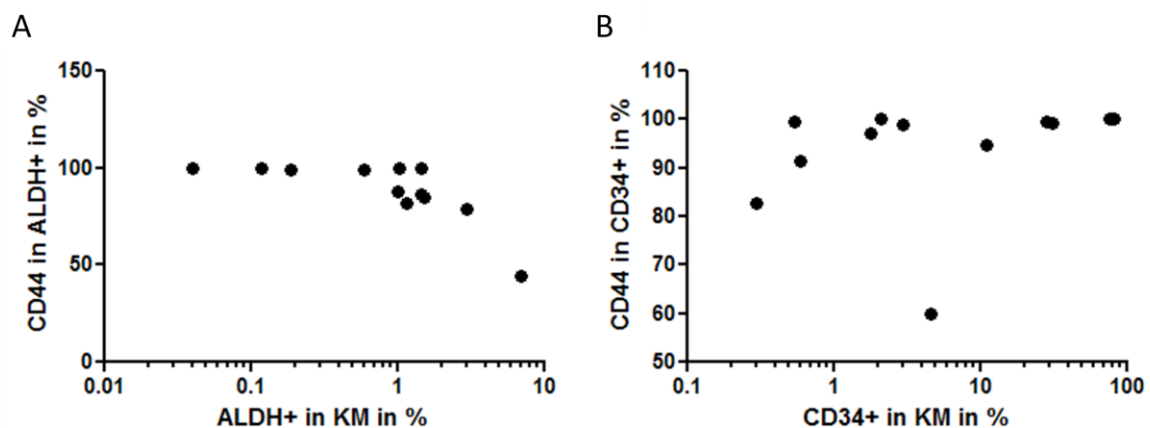


Abbildung 3-25 Übersicht über negative Korrelation zwischen der Anzahl an $ALDH^+$ Zellen im Knochenmark und der CD44pan-Expression in den $ALDH^+$ Zellen in Patienten der cHRG (A) ($n=12$, Spearman $r=-0,8301$, $P=0,0008$) und über die positive Korrelation zwischen der Anzahl an $CD34^+$ Blasten im Knochenmark und der CD44pan-Expression in den $CD34^+$ Blasten in Patienten der cIRG (B) ($n=13$, Spearman $r=0,5599$, $P=0,0466$).

3.2.2.3 CD44pan- und CD44v-Expression in SDF und FDF

Zusätzlich zu $ALDH^+$, $CD34^+$ und $ALDH^+/CD34^+$ Zellen wurden auch langsam- (SDF) und schnellteilende Zellen (FDF) auf ihre CD44pan- und CD44v-Oberflächen-Expression hin untersucht. Dazu wurden $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut mit PKH26 gefärbt und nach 7 Tagen in SDF und FDF sortiert und anschließend mit Antikörpern gegen CD44 gefärbt. Abbildung 3-26 zeigt eine Übersicht über diese Ergebnisse. Dabei wurden für CD44v4, v6 und v7 Ergebnisse aus 3 Versuchen mit Nabelschnurblutzellen verwendet und für CD44pan Ergebnisse aus 5 Versuchen. In SDF und FDF gab es mit 95,75 bzw. 96,36 % keine Unterschiede in der CD44pan-Expression. Dagegen war die Expression der CD44-Varianten in SDF höher als in FDF. Für CD44v6 war dieser Unterschied statistisch signifikant ($p<0,05$). CD44v3 und CD44v5 wurden ebenfalls gemessen und zeigten die gleiche Tendenz. Aber aufgrund der nur geringen Zellzahlen für SDF und FDF konnten diese Varianten nicht von 3 Proben gemessen werden und wurden deshalb nicht im Diagramm dargestellt.

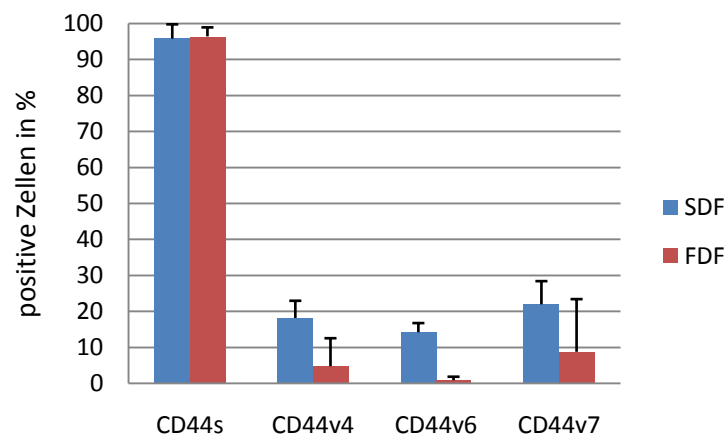


Abbildung 3-26 CD44pan- (CD44s-) und CD44v-Expression in SDF und FDF aus Nabelschnurblut (n=3 bzw. n=5). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Der Unterschied in der CD44v6-Expression zwischen SDF und FDF war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Die höhere CD44v-Oberflächenexpression in SDF im Vergleich zu FDF korrelierte mit den gefundenen mRNA-Ergebnissen. Da in anderen primitiven Zellpopulationen, beispielsweise in $ALDH^+$ Zellen, fast keine CD44v-Expression gefunden wurde, haben wir die Aussagekraft der Ergebnisse für SDF und FDF kritisch betrachtet und diese Zellen nach 7 Tagen zusätzlich mit Aldefluor gefärbt, um die Verteilung der ALDH-Expression in SDF und FDF zu untersuchen (siehe Abbildung 3-27). In SDF waren 97,36 % der $ALDH^+$ Zellen zu finden, was darauf hindeutet, dass nahezu alle $ALDH^+$ Zellen langsamteilend waren. Dennoch waren aber auch 57,56 % der $ALDH^-$ Zellen in SDF zu finden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die zusätzliche Untersuchung der CD34-Expression gefunden (Daten nicht dargestellt). Langsamteilende Zellen (SDF) waren demzufolge eine heterogene Population, die fast alle $ALDH^+$ und $CD34^+$ Zellen enthielt, aber auch einen hohen Prozentsatz an Zellen, die keine Stammzellmarker trugen. Die Aussagekraft der Ergebnisse für SDF und FDF ist somit sehr fragwürdig.

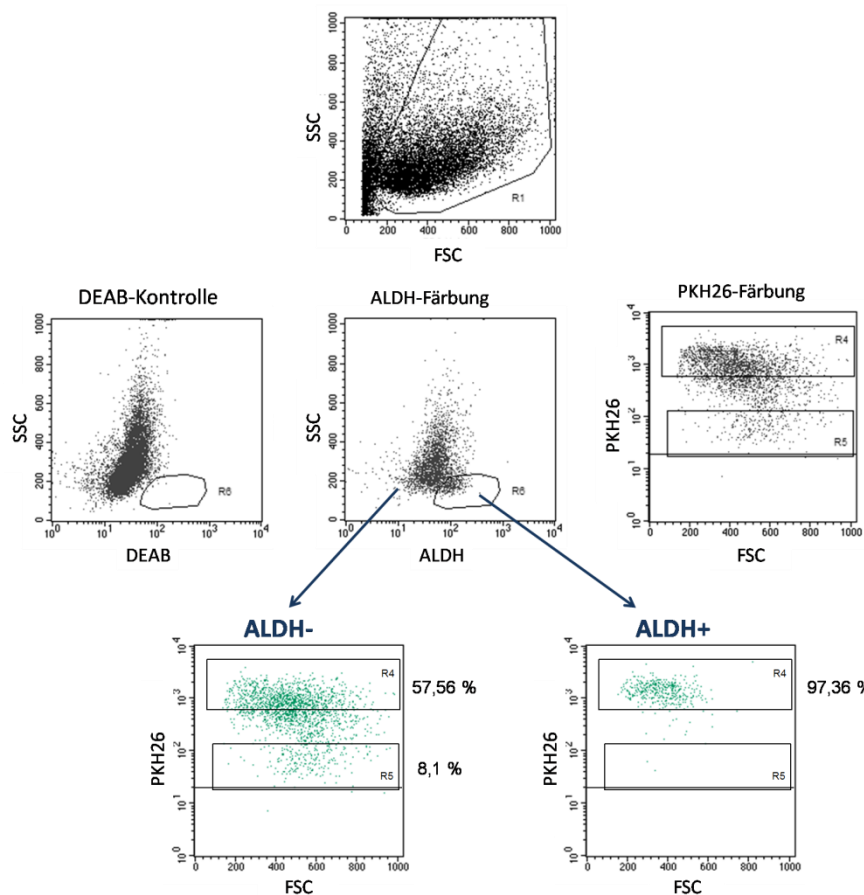


Abbildung 3-27 Übersicht über $CD34^+$ Zellen aus G-CSF-mobilisiertem Peripherblut (mPB 14), die nach 7 Tagen in SDF (R4) und FDF (R5) aufgeteilt und zusätzlich mit Aldefluor gefärbt wurden. Dargestellt sind $ALDH^+$ Zellen (R6) im Vergleich zur DEAB-Kontrolle. In SDF waren 97,36 % der $ALDH^+$ und 57,56 % der $ALDH^-$ Zellen zu finden.

3.2.2.4 CD44pan- und CD44v-Expression in Leukozyten

Leukozyten aus gesundem Material, d.h. aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut, Peripherblut und Knochenmark, wurden mittels Erythrozytenlyse isoliert und mit Antikörpern gegen CD45, CD3, CD44pan und CD44-Varianten gefärbt. Zunächst wurden MNCs aufgrund ihrer SSC- und FSC-Eigenschaften abgegrenzt und die nur lebenden Zellen gegen ihre CD45-Expression dargestellt (siehe Abbildung 3-28). Aus dieser Darstellung konnten bereits die Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten voneinander abgegrenzt werden. Die genaue Unterscheidung zwischen T- und B-Lymphozyten erfolgte mittels CD3. $CD3^+$ Zellen wurden als T- und $CD3^-$ Zellen als B-Lymphozyten eingeteilt. Somit konnten die verschiedenen Leukozyten parallel auf ihre CD44pan- und CD44v-Expression untersucht werden.

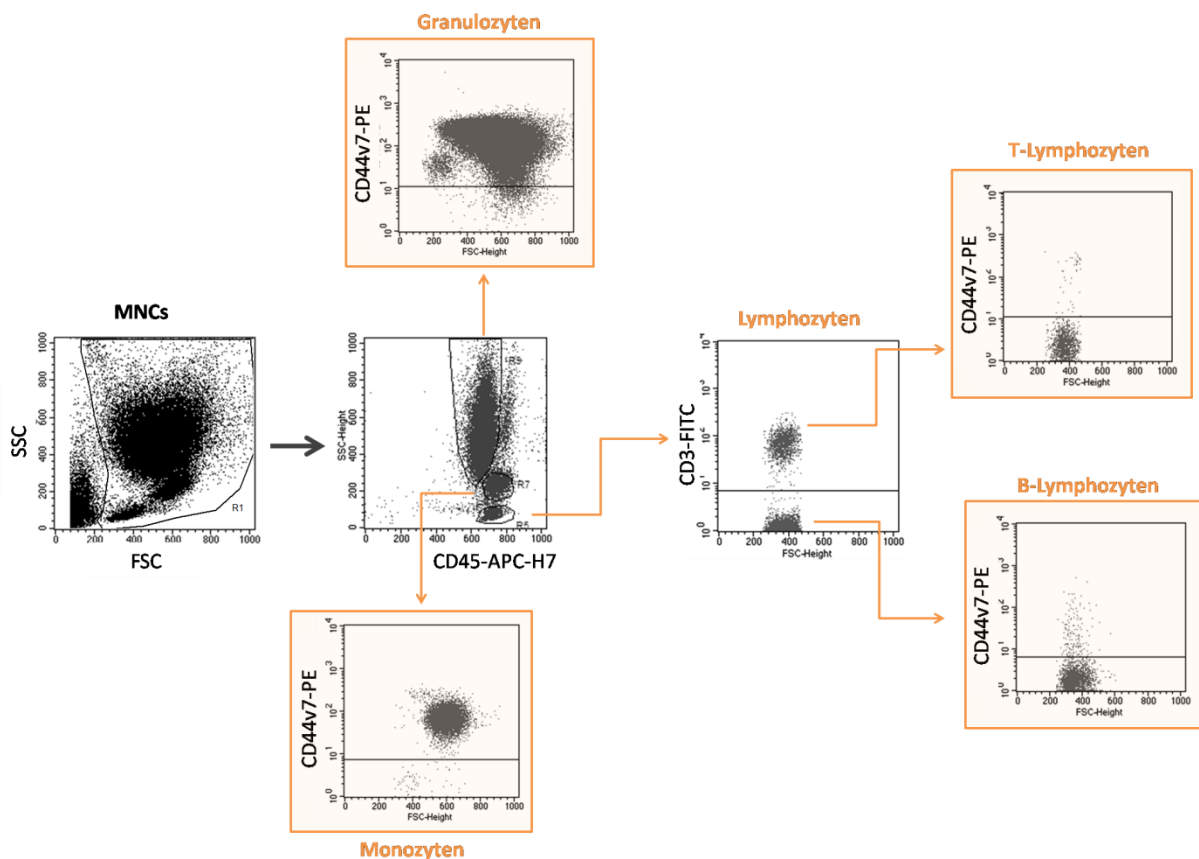


Abbildung 3-28 Übersicht über die durchflusszytometrische Darstellung von Granulozyten, Monozyten, T- und B-Lymphozyten und deren jeweilige CD44v7-Expression am Beispiel von mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut (mPB 62).

Abbildung 3-29 zeigt eine Zusammenfassung der CD44pan- und CD44v-Expression in Monozyten, Granulozyten, T- und B-Lymphozyten aus jeweils 3 Proben aus normalem und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark von gesunden Spendern. CD44pan war auf allen Leukozyten sehr stark exprimiert (97 bis 100 %). Die CD44-Varianten waren auf T- und B-Lymphozyten viel niedriger exprimiert als auf Monozyten und Granulozyten. CD44v7 war auf B-Lymphozyten aus Peripherblut deutlich höher exprimiert als auf denen aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark. CD44v3 war auf Monozyten und Granulozyten am niedrigsten und CD44v7 am höchsten exprimiert. Tendenziell waren die CD44-Varianten auf Monozyten und Granulozyten aus Peripherblut stärker exprimiert, gefolgt von mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark, wo die niedrigste Expression von CD44v zu finden war. Teilweise waren die Schwankungen zwischen den verschiedenen Proben sehr hoch, vor allem für

Monozyten und Granulozyten aus Peripherblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut, was auf hohe individuelle Unterschiede hindeuten könnte.

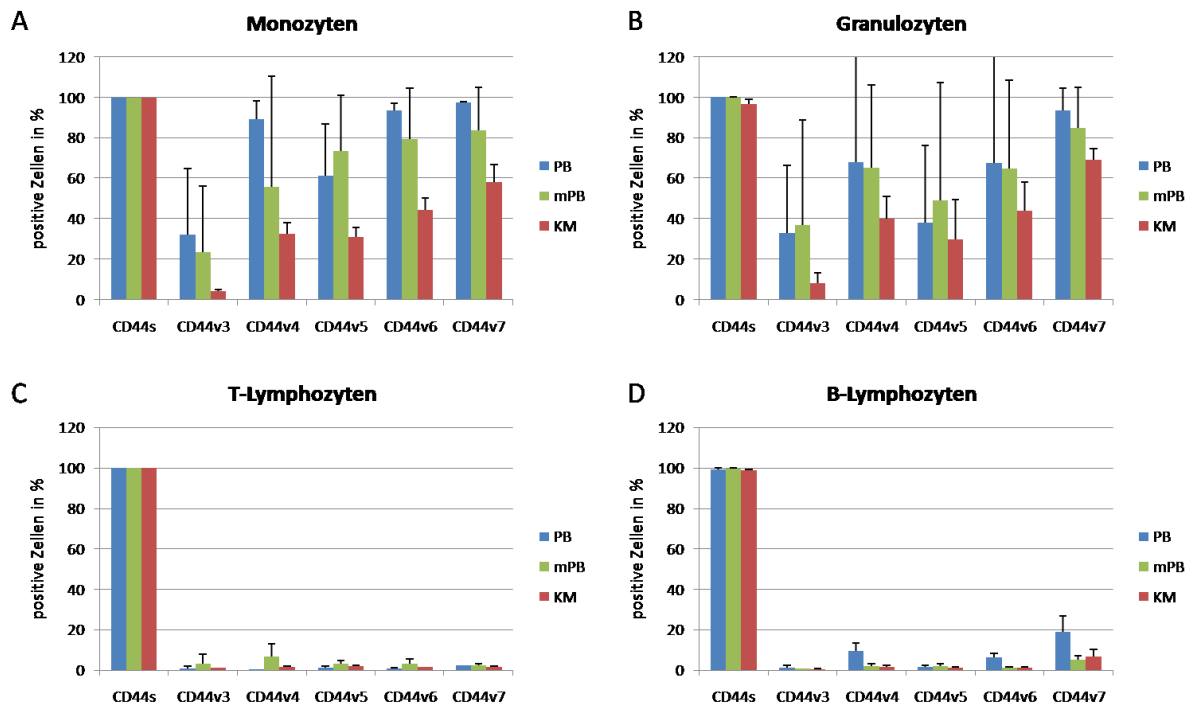


Abbildung 3-29 Übersicht über die CD44pan- (CD44s-) und CD44v-Expression in Monozyten (A), Granulozyten (B), T- (C) und B-Lymphozyten (D) aus normalem, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark von gesunden Spendern (jeweils n=3). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.

3.2.2.5 CD44pan- und CD44v-Expression in MSCs

MSCs, die in 3 verschiedenen Medien (PL, 7er und 6er) kultiviert wurden, wurden ebenfalls auf ihre CD44pan- und CD44v-Oberflächenexpression untersucht. Abbildung 3-30 zeigt eine Übersicht der erhaltenen Ergebnisse für die verschiedenen Medien aus jeweils 3 Versuchen. Die CD44pan-Expression in MSCs, die in 7er und 6er Medium kultiviert wurden, war mit 98,18 bzw. 99,66 % höher als in denen, die mit PL-Medium kultiviert wurden (90,37 %). Die CD44-Varianten wurden in den MSCs aller 3 Medien kaum exprimiert (meist unter 1 %).

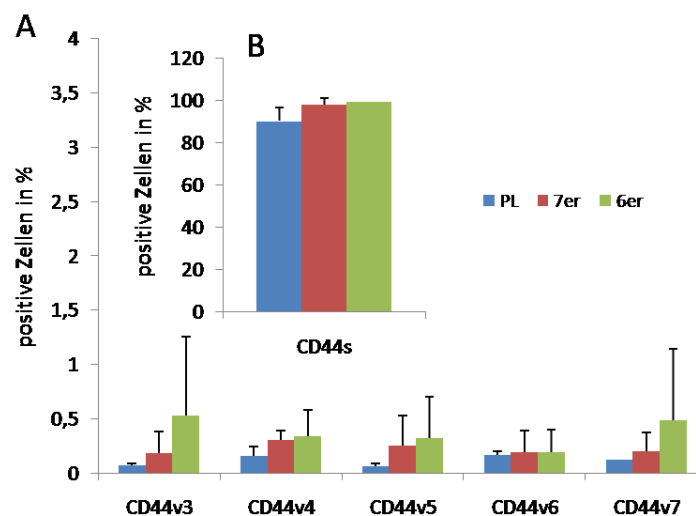


Abbildung 3-30 CD44v- (großes Diagramm A) und CD44pan- (CD44s-) (kleines Diagramm B) Expression in MSCs, die in 3 verschiedenen Medien (PL, 7er und 6er) kultiviert wurden. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus jeweils 3 Versuchen.

3.3 Zellzyklusabhängige Expression von CD44v in leukämischen Zelllinien

3.3.1 Zellzyklusabhängige CD44v-Expression in KG-1a

Aufgrund der sehr heterogenen Ergebnisse für die CD44v-Oberflächenexpressionen, die in den leukämischen Zelllinien gefunden wurden, wurden weitere Versuche durchgeführt, die den potentiellen Einfluss des Zellzyklus auf dieses Phänomen untersuchen sollten. Als ersten Ansatz wurden KG-1a und K-562 jeweils 44 h in serumfreiem Medium kultiviert, um die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus zu synchronisieren. Ein Teil dieser Zellen wurde auf ihre CD44v-Expression untersucht, der andere für 25 h in serumhaltigem Medium weiterkultiviert, um die Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zu synchronisieren. In beiden Zelllinien war die CD44v-Expression in den Zellen, die in der S-Phase synchronisiert waren, höher als den Zellen, die sich in der G₁-Phase befanden. Beispielsweise war die CD44v7-Expression in KG-1a nach serumfreier Inkubation 15,01 % im Vergleich zu 43,47 % nach Inkubation mit Serum und analog dazu die CD44v5-Expression in K-562 15,78 bzw. 31,4 %. In K-562 war, im Gegensatz zu KG-1a, zusätzlich eine Erhöhung der CD44pan-Expression von 75,63 auf 83,54 % nach Inkubation mit Serum erkennbar.

Um weitere Beweise für die Theorie der Zellzyklusabhängigen CD44v-Expression zu finden, wurden KG-1a in CD44v7⁺ und CD44v7⁻ Zellen sortiert. Diese Zellen wurden anschließend mit dem CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit auf ihre Zellzyklusverteilung hin untersucht. Abbildung 3-31 zeigt eine Übersicht dieser Ergebnisse aus insgesamt 3 Versuchen. 87,16 % der CD44v7⁻ Zellen waren in der G₁-Phase, 10,9 % in der S-Phase und 2,23 % in G₂/M-Phase des Zellzyklus zu finden. Statistisch signifikant weniger CD44v7⁺ Zellen (36,63 %) waren in der G₁-Phase zu finden, im Vergleich zu statistisch signifikant mehr Zellen in der S- (30,34 %) und G₂/M-Phase (31,52 %).

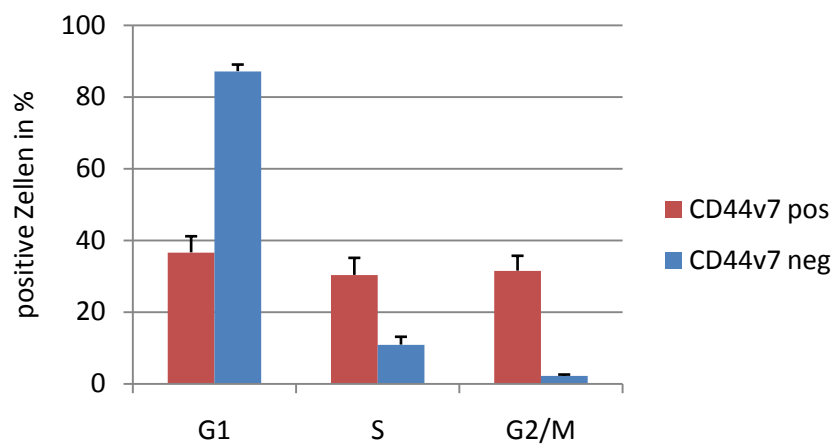


Abbildung 3-31 Zellzyklusverteilung von CD44v7⁺ und CD44v7⁻ KG-1a nach Zellsortierung. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die Anzahl der CD44v7⁺ Zellen in G₁-, S- und G₂/M-Phase war jeweils statistisch signifikant verschieden im Vergleich zu der Anzahl der CD44v7⁻ Zellen in den zugehörigen Zellzyklusphasen (p<0,05).

Mithilfe von Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain war es möglich, den Zellzyklus und die CD44v-Expression zusammen und in intakten Zellen mittels Durchflusszytometer, auch ohne UV-Laser, zu messen. Abbildung 3-32 zeigt eine Übersicht für eine beispielhafte Messung des Zellzyklus und CD44v7 in KG-1a. CD44v7 wurde in der G₁-Phase mit 57,09 % am niedrigsten und in der G₂-M-Phase mit 91,82 % am höchsten exprimiert.

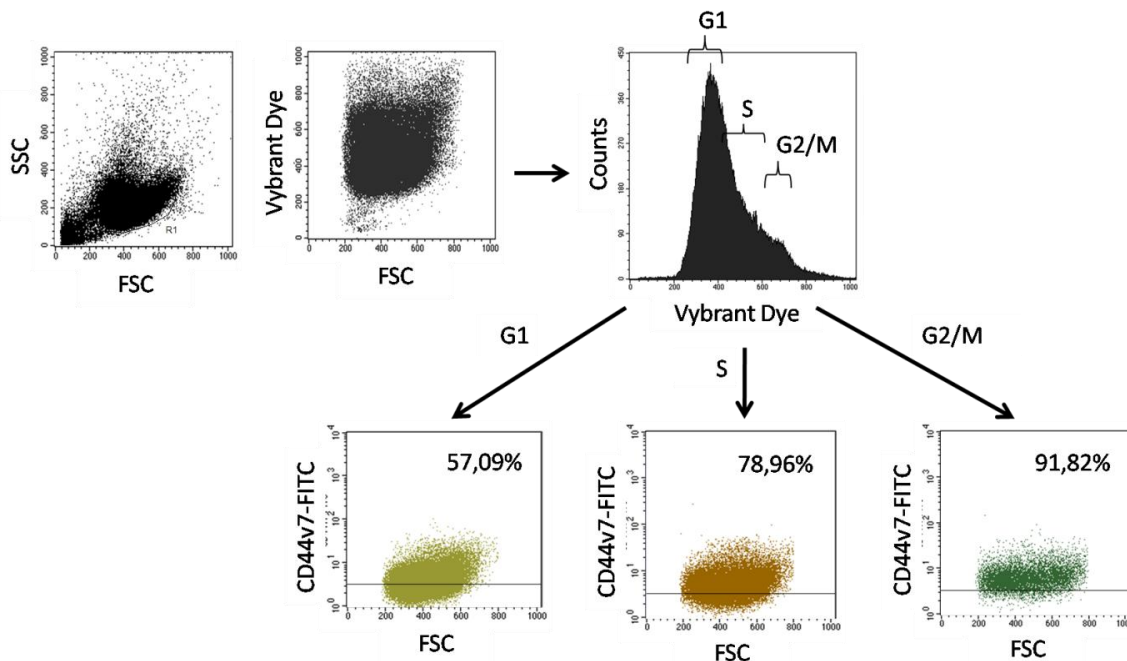


Abbildung 3-32 Übersicht über die durchflusszytometrische Messung des Zellzyklus mit Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain und CD44v7 in KG-1a. Dargestellt ist die Zellzyklusverteilung und die Expression von CD44v7 in G₁-, S- und G₂/M-Phase.

Abbildung 3-33 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse für die CD44v-Expression in den verschiedenen Zellzyklusphasen in KG-1a aus insgesamt 3 Versuchen. Alle CD44-Varianten waren in der G₁-Phase am niedrigsten exprimiert und in der G₂/M-Phase am höchsten. Zellen, die sich auf eine Teilung vorbereiteten, zeigten also eine höhere Expression der CD44-Varianten. Für die CD44pan-Expression, welche vor allem die Expression des ubiquitär vorkommenden CD44s repräsentiert, konnte in KG-1a keine Zellzyklusabhängigkeit beobachtet werden.

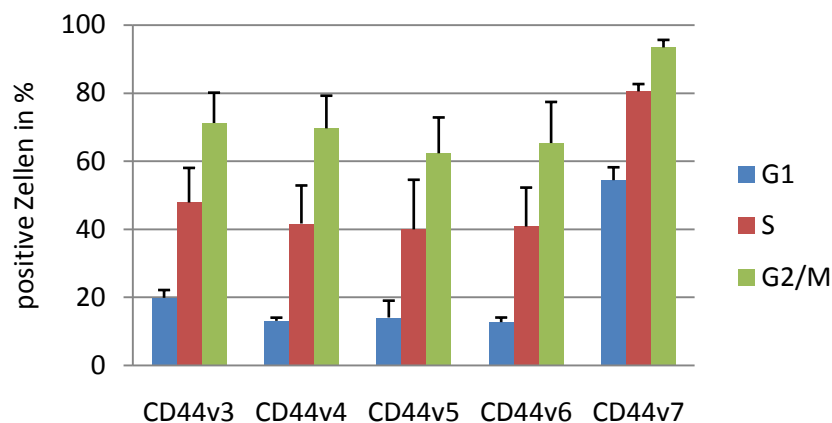


Abbildung 3-33 CD44v-Expression in G₁-, S- und G₂/M-Phase in KG-1a nach gemeinsamer Färbung der Zellen mit Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen.

3.3.2 Zellzyklusabhängige CD44v- und ALDH-Expression in K-562

Neben einer zellzyklusabhängigen Expression der CD44-Varianten in K-562, wurde auch eine mögliche zellzyklusabhängige Expression der ALDH untersucht. K-562 ist die einzige der getesteten leukämischen Zelllinien, in der eine ALDH-Expression detektiert werden konnte (Mittelwert 19,66 %). Der obere Teil der Abbildung 3-34 zeigt eine Übersicht über eine beispielhafte ALDH-Färbung mit der zugehörigen DEAB-Kontrolle. Die Darstellung der ALDH-Färbung in der obersten Reihe zeigt ein sehr eng gesetztes Gate für ALDH⁺ Zellen im Vergleich zur DEAB-Kontrolle. Die ALDH-Färbung in der zweiten Reihe zeigt eine Einteilung in 4 verschiedene ALDH-Gates: ALDH⁺⁺, ALDH⁺, ALDH⁻ und ALDH⁻⁻. Um einen Zusammenhang zwischen Zellzyklus und ALDH-Expression herstellen zu können, wurden K-562 entsprechend ihrer ALDH-Fluoreszenz in diese 4 Subpopulationen (ALDH⁺⁺, ALDH⁺, ALDH⁻ und ALDH⁻⁻) sortiert. Anschließend wurden die sortierten Subpopulationen mit dem CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit auf ihre Zellzyklusverteilung hin untersucht. Von den ALDH⁻⁻ Zellen waren 86,8 % in der G₁-Phase, von den ALDH⁻ 67,15 %, von den ALDH⁺ 50,29 % und von den ALDH⁺⁺ Zellen 54,19 %. Analog dazu waren mehr ALDH⁺⁺ und ALDH⁺ Zellen in der S- (20,94 bzw. 21,23 %) und G₂/M-Phase (15,97 bzw. 16,33 %) zu finden, als ALDH⁻ (18,56 % in S- und 13,67 % in G₂/M-Phase) und ALDH⁻⁻-Zellen (8,55 % in S- und 4,38 % in G₂/M-Phase). Nachdem eine zellzyklusabhängige ALDH-Expression gezeigt werden konnte, wurde anschließend

die Expression der CD44-Varianten in den verschiedenen ALDH-Subpopulationen untersucht (siehe Abbildung 3-34 unten).

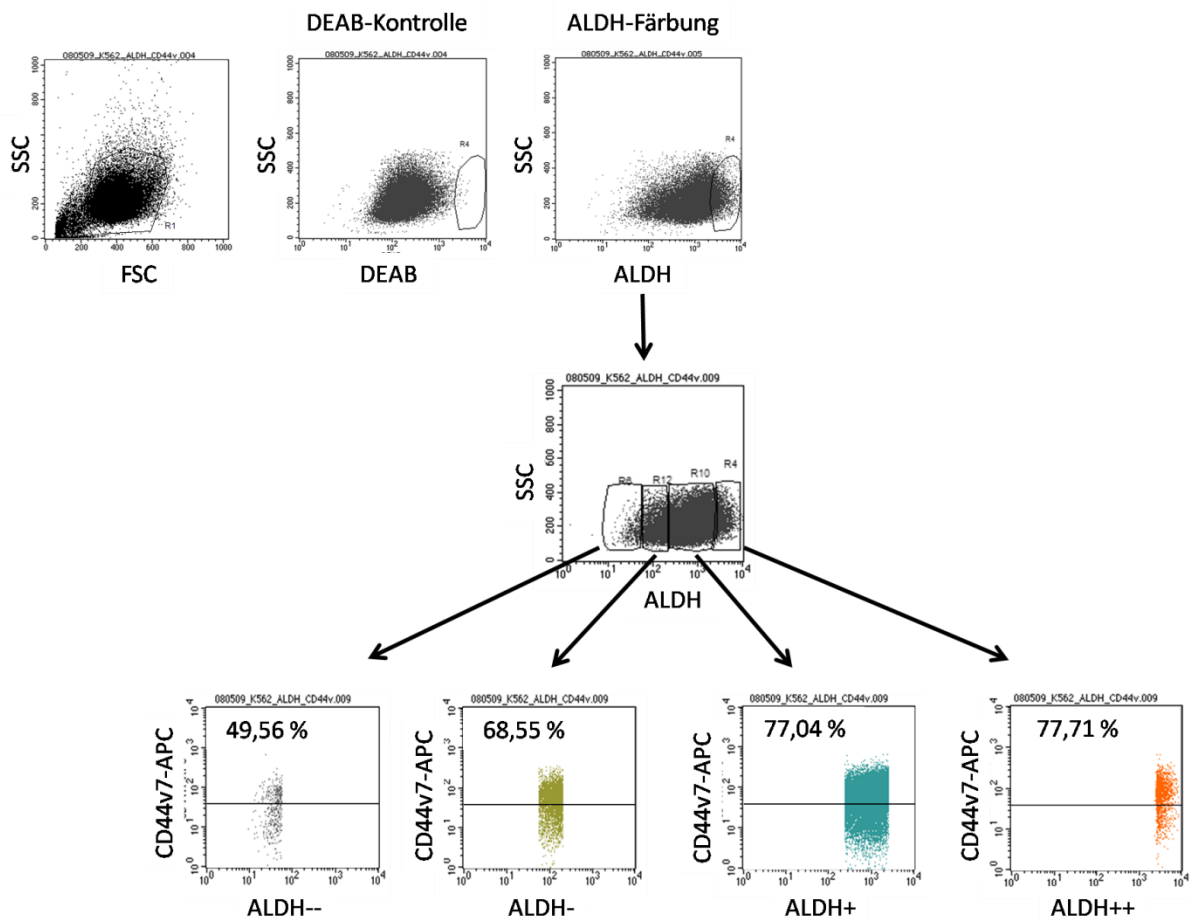


Abbildung 3-34 Übersicht über die durchflusszytometrische Messung der ALDH-Expression mit zugehöriger DEAB-Kontrolle und CD44v7-Expression in verschiedenen ALDH-Subpopulationen (ALDH⁻, ALDH⁻, ALDH⁺ und ALDH⁺⁺) in K-562.

Abbildung 3-35 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse für die CD44pan- und CD44v4-, v5- und v7-Expression in ALDH⁻, ALDH⁻, ALDH⁺ und ALDH⁺⁺ K-562 aus insgesamt 3 Versuchen. Sowohl die CD44pan-, als auch die CD44v4-, v5- und v7-Expression war in den ALDH⁻ Zellen am niedrigsten, gefolgt von den ALDH⁻ und den ALDH⁺ Zellen. In den ALDH⁺⁺ Zellen war jeweils die höchste CD44-Expression zu finden.

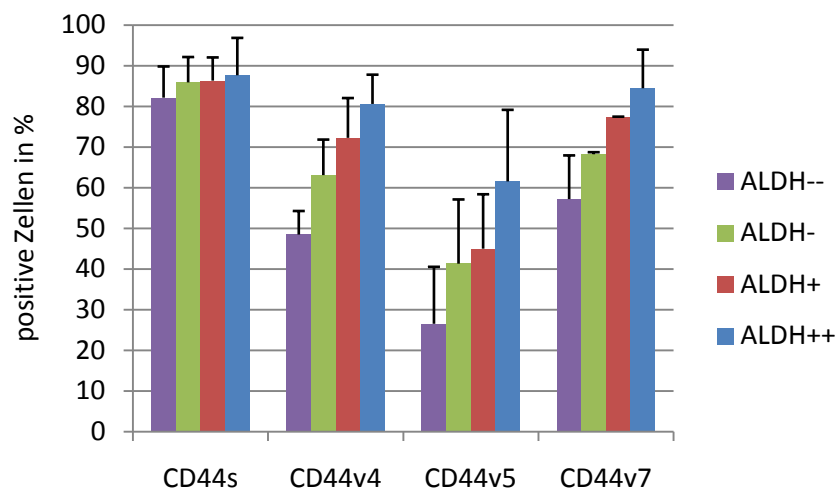


Abbildung 3-35 CD44pan- (CD44s-) und CD44v-Expression in ALDH⁻, ALDH⁻, ALDH⁺ und ALDH⁺⁺ K-562. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen.

3.4 Einfluss der Kokultur auf die CD44pan- und CD44v-Expression und den Selbsterhalt und die Differenzierung von HSCs

3.4.1 Kokultur mit MSCs führt zu einer Erhöhung der CD44v7-Expression

Um das Proliferationsverhalten von HSCs in Kokultur mit MSCs untersuchen zu können, wurden CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut von gesunden Spendern mit CFDA-SE gefärbt, welches in fluoreszierendes CFSE umgesetzt wird. Anschließend wurden die Zellen mit und ohne MSCs für 7 Tage kultiviert. Das gebildete CFSE hat sich irreversibel an intrazelluläre Moleküle gebunden und mit jeder Zellteilung gleichmäßig zwischen den beiden Tochterzellen aufgeteilt. Die gleichmäßige Abnahme der Fluoreszenzintensität von CFSE in jeder neuen Generation wurde nach der Kultivierung von 7 Tagen durchflusszytometrisch gemessen. Parallel zur CFSE-Fluoreszenz wurde auch die CD34-, CD11b-, CD44pan- und die CD44v-Expression analysiert und zwischen Kultur mit und ohne MSCs verglichen (Abbildung 3-36). Maximal 12 Zellteilungen konnten voneinander abgegrenzt und jeweils auf die Expression der Oberflächenmoleküle untersucht werden. Pro Zellteilung wurde die

Anzahl der Ereignisse bestimmt, die positiv für CD34, CD11b, CD44pan und die CD44-Varianten waren und auf die Gesamtzahl der Ereignisse in jeder Zellteilung bezogen. Mit den daraus erhaltenen Werten konnte eine Aussage über den prozentuellen Anteil der Zellen in jeder Zellteilung gemacht werden, der die verschiedenen Oberflächenmoleküle exprimierte. Wie man in Abbildung 3-36 und Abbildung 3-37 erkennen kann, hat sich die CD44pan-Expression in den verschiedenen Zellteilungen nicht zwischen Kultur mit oder ohne MSCs unterschieden und war in jeder Zellteilung um die 98 bis knapp 100 %. Die CD34-Expression hat mit zunehmender Zellteilung abgenommen. Diese Abnahme war aber in Zellen, die mit MSCs kultiviert wurden, langsamer. Zellen, die mit MSCs kultiviert wurden, blieben also länger CD34⁺ als Zellen, die ohne MSCs kultiviert wurden. CD11b und CD44v7 wurden in Zellen, die sich kaum geteilt haben auch kaum exprimiert, die Expression dieser beiden Moleküle hat aber mit zunehmender Zellteilung zugenommen und war höher in den Zellen, die mit MSCs kultiviert wurden. Zellen, die sich selten geteilt haben, haben ihre CD34-Expression behalten und nicht begonnen sich auszudifferenzieren, was durch die fehlende CD11b-Expression verdeutlicht werden konnte. Zellen, die sich häufiger geteilt haben, haben ihre CD34-Expression verloren und begonnen sich auszudifferenzieren, was durch die vermehrte Expression von CD11b sichtbar wurde.

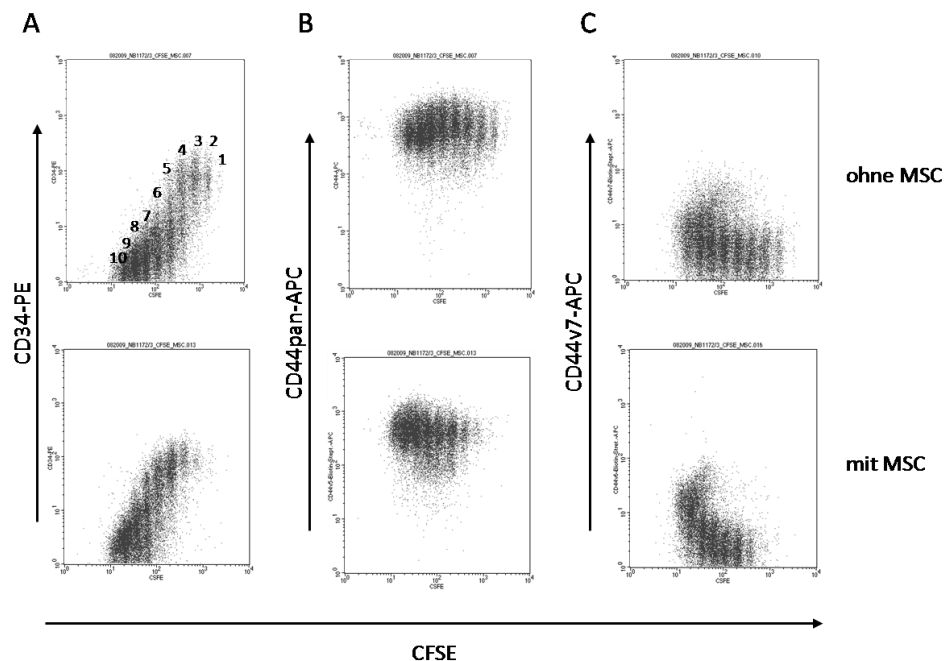


Abbildung 3-36 Übersicht über die durchflusszytometrische Messung von CFSE (A-C), CD34 (A), CD44pan (B) und CD44v7 (C) in $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut nach 7 Tagen in Kultur mit und ohne MSCs. Das obere linke Bild zeigt die Verteilung von insgesamt 10 Zellteilungen (1-10).

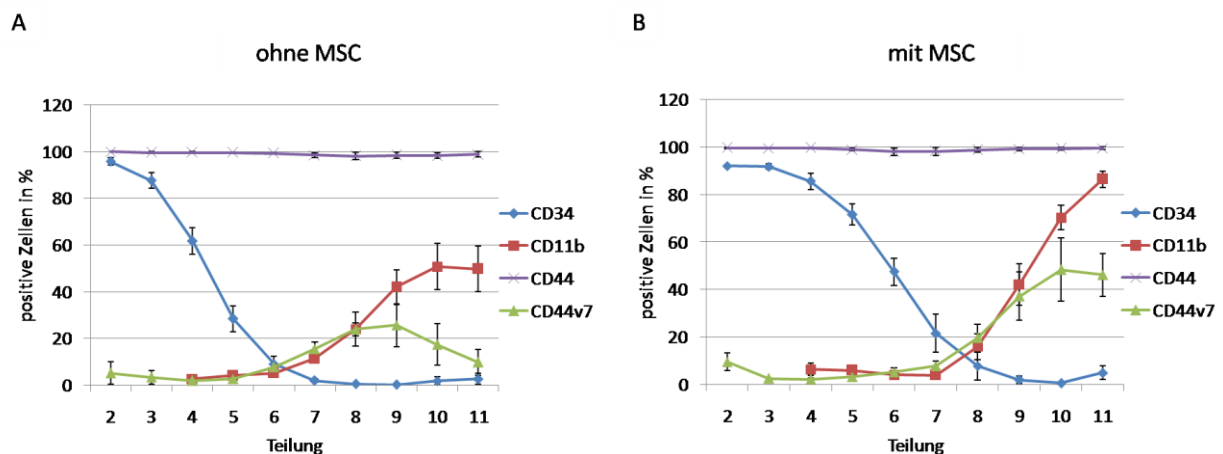


Abbildung 3-37 Übersicht der CD34-, CD11b-, CD44pan- und CD44v7-Expression in den Zellteilungen 2 bis 11 in $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut, die 7 Tage ohne MSC (A) bzw. mit MSC (B) kultiviert wurden. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3 bzw. 4 Versuchen.

Die Expression der anderen CD44-Varianten (CD44v3, v4, v5 und v6) war niedriger als die von CD44v7, wobei auch hier mit zunehmender Zellteilung eine Zunahme der Expression zu finden war, die aber, im Gegensatz zu CD44v7, nach Kultivierung mit

MSCs nicht höher war als ohne Kokultur. Im Falle von CD44v5 war die Expression in der Kokultur mit MSCs geringer als ohne MSCs.

Betrachtet man nun die Gesamtexpression von CD44pan, CD34, CD11b und CD44v7 und nicht die Expression in den einzelnen Zellteilungen, so war eine hohe Heterogenität vor allem in der CD34-, CD11b- und CD44v7-Expression zwischen den verschiedenen Experimenten zu finden. So schwankte die CD34-, CD11b- und CD44v7-Expression teilweise stark zwischen den Versuchen, sowohl in den Zellen, die mit als auch ohne MSCs kultiviert wurden. Darüber hinaus zeigten die CD34- und CD11b-Expressionen unterschiedliche Tendenzen im Hinblick auf den Einfluss der Kokultur mit MSCs. In der Mehrzahl der Versuche war eine höhere der CD34- und CD11b-Expression in Zellen detektierbar, die mit MSCs kultiviert wurden. Es gab aber auch Versuche, in denen es keine Unterschiede in deren Expressionen gab bzw. bei denen sie in Zellen, die mit MSCs kultiviert wurden, niedriger waren. Die CD44v7-Expression hingegen war durchgehend in Zellen erhöht, die mit MSCs kultiviert wurden, nur war der Unterschied zwischen den verschiedenen Experimenten unterschiedlich hoch. Abbildung 3-38 zeigt eine Zusammenstellung der prozentualen Änderung der CD44pan-, CD11b-, CD34- und CD44v7-Expression in Zellen, die mit MSCs kultiviert wurden im Vergleich zu Zellen, die ohne MSCs kultiviert wurden. Die CD44pan-Expression war nicht verändert, wenn die Zellen mit MSCs kultiviert wurden. Die CD11b-Expression war im Mittel zu 20,39 %, die CD34-Expression zu 23,0 % höher in Zellen, die mit MSCs kultiviert wurden. Die stärkste Expressionserhöhung in Zellen, die mit MSCs im Vergleich zu ohne kultiviert wurden, war für CD44v7 mit 135,54 % messbar.

Eine mögliche Ursache für die starken Schwankungen in den Expressionen nach Kultivierung der CD34⁺ Zellen war das doch sehr sensible Kultursystem: Zum einen könnten die verwendeten CD34⁺ Zellen und die MSCs, die immer von anderen Spendern kamen, zum anderen die Kultivierung unter *in vitro*-Bedingungen in Kulturmedium und im Brutschrank, für diese Schwankungen verantwortlich sein.

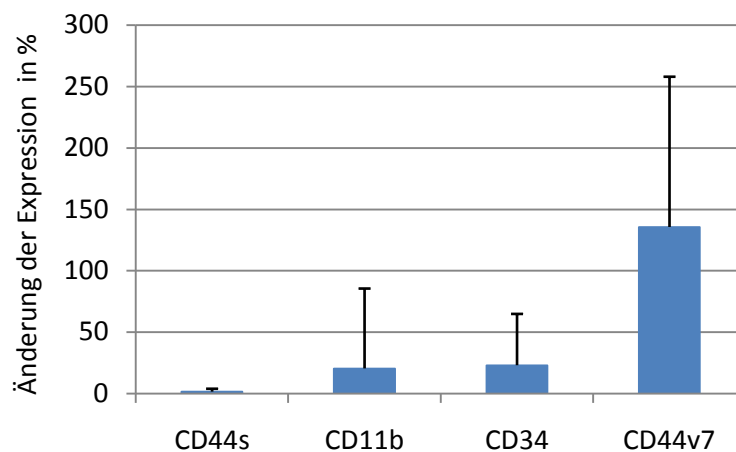


Abbildung 3-38 Übersicht über die prozentuale Änderung der CD44pan- (CD44s-), CD11b-, CD34- und CD44v7-Expression in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut, die 7 Tage mit MSCs kultiviert wurden im Vergleich zu Zellen, die ohne MSCs kultiviert wurden. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 9 (für CD11b), 12 (für CD44v7), 15 (für CD44pan) bzw. 16 (für CD34) Versuchen.

3.4.2 Kokultur mit MSCs verstärkt apoptotischen Effekt von A3D8 in CD34⁺ Zellen

Die Kultivierung von CD34⁺ Zellen mit und ohne MSCs zeigte eine durchgehend starke Expression von CD44pan und eine Erhöhung der CD44v7-Expression mit zunehmender Kultivierungsdauer verstärkt bei Zellen, die mit MSCs kultiviert wurden. Um nun die Bedeutung der CD44pan- und CD44v7-Expression im Kokultursystem mit MSCs genauer zu untersuchen, erfolgte die gleichzeitige Inkubation mit A3D8, einem Antikörper gegen CD44pan, und anti-CD44v7. A3D8, ein in der Literatur bereits beschriebener Antikörper, induzierte die terminale Differenzierung in den AML-Zelllinien THP-1, HL-60 und NB-4 und inhibierte deren Proliferation (Charrad, Gadhoum et al. 2002). Darüber hinaus induzierte A3D8 Apoptose in THP-1, HL-60 und besonders in NB-4 (Charrad, Gadhoum et al. 2002). Über die Wirkung von anti-CD44v7 ist bislang wenig bekannt, eine eventuell blockierende Wirkung wird aber vermutet.

Die ersten Versuche wurden in NB-4 durchgeführt, da für diese leukämische Zelllinie der apoptotische Effekt von A3D8 bereits beschrieben wurde. Dazu wurden die Zellen 3 Tage mit 2 µg/ml A3D8 bzw. anti-CD44v7 inkubiert und anschließend wurde

mittels Annexin V/Pi-Färbung die Anzahl noch lebender Zellen bestimmt. Parallel dazu wurden die NB-4 zusätzlich mit ZVAD-FMK inkubiert. ZVAD-FMK ist ein genereller Caspase-Inhibitor, für den in NB-4 beschrieben ist, dass er die Wirkung von A3D8 abschwächen kann, was zeigt, dass in den apoptotischen Signalwegen, die durch A3D8 in NB-4 ausgelöst werden, Caspasen beteiligt sind (Maquarre, Artus et al. 2005).

Abbildung 3-39 zeigt beispielhaft wie die Auswertung der Annexin V/Pi-Messung für die verschiedenen Ansätze (Kontrolle, A3D8, anti-CD44v7) in NB-4 erfolgte. Es wurden jeweils Ereignisse aus dem Gesamtgate (alle) bzw. aus dem Zellgate (R1) in lebende, früh-, spätapoptotische und nekrotische Zellen unterteilt.

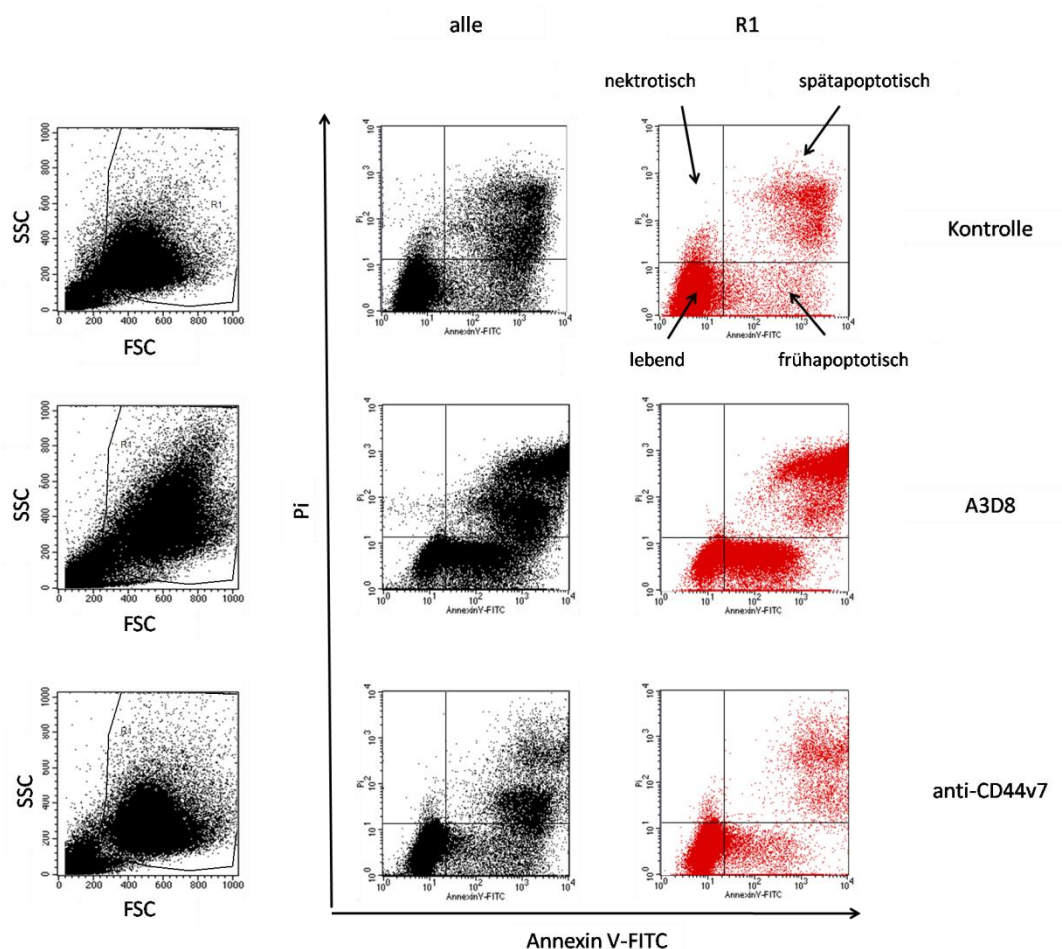


Abbildung 3-39 Übersicht über die durchflusszytometrische Messung von Annexin V/Pi in NB-4, die 3 Tage mit je 2 µg/ml A3D8, anti-CD44v7 bzw. ohne etwas (Kontrolle) inkubiert wurden. Die Unterteilung in lebend, früh-, spätapoptotisch und nekrotisch erfolgte im Gesamtgate (alle) bzw. im Zellgate (R1).

Abbildung 3-40 zeigt eine Zusammenfassung der für NB-4 erhaltenen Ergebnisse aus 3 Versuchen. Die Anzahl der nekrotischen Zellen konnte in allen Ansätzen vernachlässigt werden, was darauf hindeutet, dass die Zellen hauptsächlich durch Apoptose gestorben sind. Wie erwartet waren nach der Inkubation der Zellen mit A3D8 weniger lebende (43,97 %) und mehr früh- und spätapoptotische Zellen zu finden, als in der unbehandelten Kontrolle (69,35 % lebende Zellen). Die Inkubation mit anti-CD44v7 hatte keinen Einfluss auf die Anzahl lebender Zellen (69,92 %), die sich nicht von der der Kontrolle unterschied. Die Zugabe von 25 μ M ZVAD-FMK allein zeigte leichte toxische Effekte in NB-4 (64,31 % lebende Zellen). Wurde ZVAD-FMK allerdings zu den Ansätzen dazugegeben, die A3D8 enthielten, konnte dessen apoptotische Wirkung verringert werden. Es waren vor allem mehr lebende (54,32 % im Vergleich zu 43,97 %) und weniger frühapoptotische Zellen (23,3 % im Vergleich zu 31,06 %) in den NB-4 zu finden, die mit A3D8 und ZVAD-FMK inkubiert wurden, im Vergleich zu den NB-4, die mit A3D8 allein inkubiert wurden.

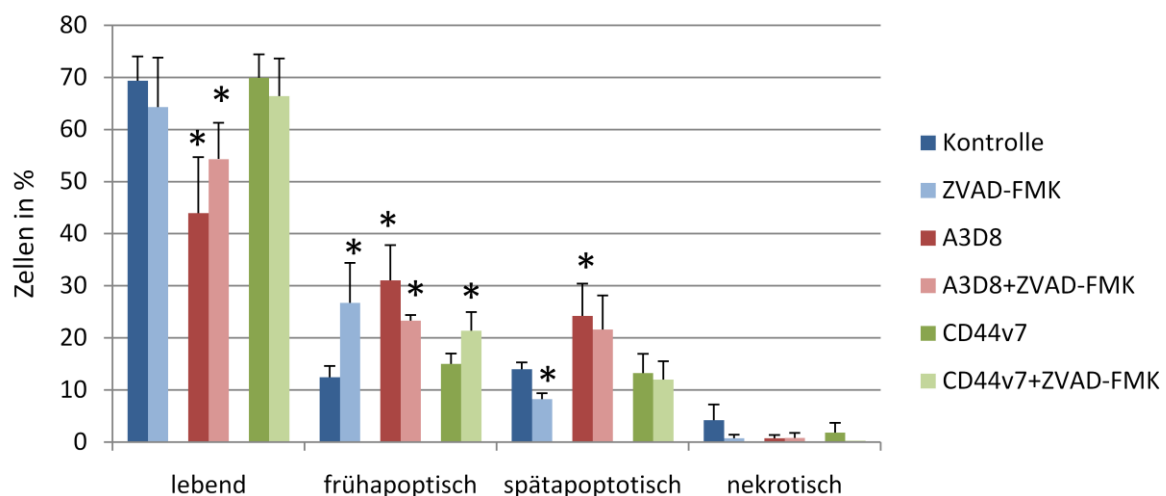


Abbildung 3-40 Übersicht über die Anzahl lebender, früh-, spätapoptotischer und nekrotischer NB-4 nach 3 Tagen Inkubation mit je 2 μ g/ml A3D8 oder anti-CD44v7 und/oder 25 μ M ZVAD-FMK. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die mit * versehenen Werte waren jeweils statistisch signifikant verschieden von der unbehandelten Kontrolle ($p \leq 0,05$).

Im Folgenden wurden nun CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut mit je 2 μ g/ml A3D8 oder anti-CD44v7 für 7 Tage kultiviert. Parallel dazu wurden die Zellen mit oder ohne MSCs kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Annexin V/Pi-Messung. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD34 gefärbt, um den Anteil CD34⁺ Zellen

nach 7 Tagen bestimmen zu können und um die Anzahl lebender Zellen zwischen CD34⁺ und CD34⁻ Zellen unterscheiden zu können. Abbildung 3-41 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse für CD34⁺ (A) und CD34⁻ (B) Zellen aus 3 Versuchen. Für die Kokultur mit den MSCs wurden die CD34⁺ Zellen im Insert kultiviert, um den Einfluss löslicher, von den MSCs ausgeschütteter Mediatoren zu untersuchen. Vorversuche haben gezeigt, dass die erhaltenen Effekte unabhängig davon waren, ob die Zellen im Insert oder mit direktem Kontakt zu den MSCs kultiviert wurden, was darauf hindeutete, dass die Effekte von A3D8 durch die ausgeschütteten Mediatoren verursacht wurden. Deshalb erfolgte die Kokultur im Insert. Einen weiteren Vorteil dieser Kokulturbedingungen war die leichte Trennung beider Zelltypen voneinander und die somit problemlose Analyse der Zellen im Insert.

Die Kultivierung mit anti-CD44v7 zeigte keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Auf eine Darstellung dieser Ergebnisse wurde daher verzichtet. Sowohl in den CD34⁺ als auch in CD34⁻ Zellen war die Anzahl lebender Zellen in den Ansätzen, die ohne MSCs und ohne A3D8 kultiviert wurden am größten (89,67 bzw. 93,14 %). Die Anzahl lebender Zellen in den Ansätzen, die entweder mit MSCs oder mit A3D8 kultiviert wurden, war etwa gleich, aber in CD34⁻ Zellen (78,05 bzw. 77,33 %) war sie geringer als in CD34⁺ (85,61 bzw. 84,26 %). Der größte Effekt war nach gemeinsamer Kultivierung von MSCs und A3D8 detektierbar. Sowohl in CD34⁺ als auch in CD34⁻ Zellen waren statistisch signifikant weniger lebende und statistisch signifikant mehr frühapoptotische Zellen zu finden, als in der unbehandelten Kontrolle. Der Effekt war aber in CD34⁻ Zellen wesentlich stärker als in CD34⁺ (45,66 bzw. 69,1 % lebende Zellen, 42,57 bzw. 20,62 % frühapoptotische Zellen). A3D8-Inkubation in CD34⁺ Zellen war aber insgesamt weniger toxisch als in NB-4. Dies wurde auch durch die längere Kultivierungsdauer von CD34⁺ Zellen mit A3D8 (7 Tage) im Vergleich zu NB-4 (3 Tage) sichtbar. Kokultur von MSCs und A3D8 führte aber dennoch zu einer starken Verringerung lebender Zellen vor allem von CD34⁻, also ausdifferenzierteren Zellen.

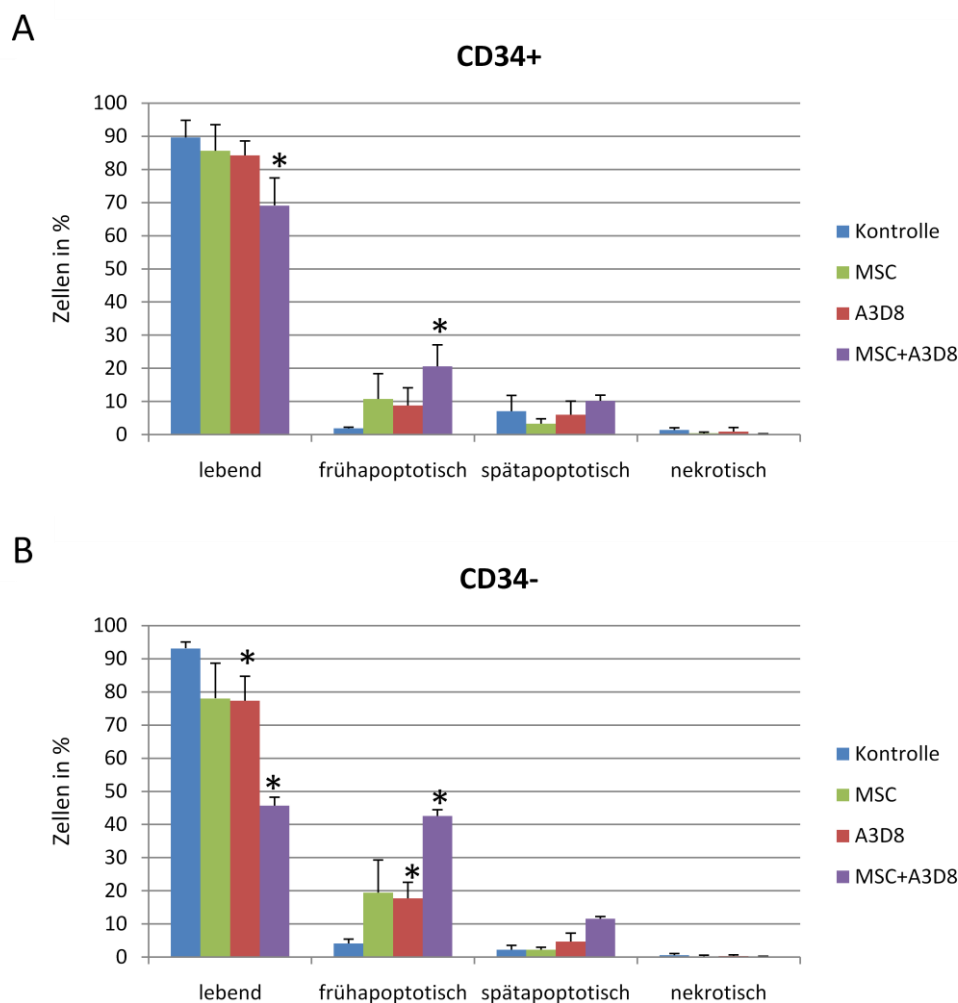


Abbildung 3-41 Übersicht über die Anzahl lebender, früh-, spätapoptotischer und nekrotischer CD34⁺ (A) und CD34⁻ (B) Zellen aus Nabelschnurblut, die 7 Tage mit je 2 µg/ml A3D8 und mit bzw. ohne MSCs kultiviert wurden. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die mit * versehenen Werte waren jeweils statistisch signifikant verschieden von der unbehandelten Kontrolle ($p \leq 0,05$).

Hat man nun den Anteil an CD34⁺ Zellen in den verschiedenen Ansätzen betrachtet, so fiel auf, dass er sich zwischen der Kontrolle (27,87 %) und den mit MSCs kultivierten Zellen (27,73 %) kaum unterschieden hat, dass er aber in den mit A3D8-inkubierten Ansätzen (37,28 % für A3D8 allein bzw. 36,68 % für A3D8 und MSC) erhöht war im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 3-42). Diese Ergebnisse deuten, wie die aus der Annexin V/Pi-Messung, daraufhin, dass die A3D8-Inkubation für CD34⁻ Zellen weitaus toxischer war, als für CD34⁺.

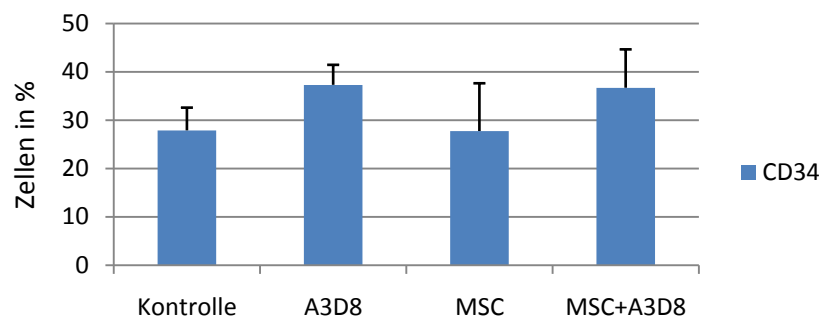


Abbildung 3-42 Übersicht über die Anzahl an CD34⁺ Zellen nach Kultivierung von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut mit A3D8 und/oder MSCs für 7 Tage. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen.

Als nächstes wurde, wie in NB-4, der Einfluss des generellen Caspase-Inhibitors ZVAD-FMK auf die Toxizität von A3D8 untersucht. Dazu wurden CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut mit je 2 µg/ml A3D8 und/oder 25 µM ZVAD-FMK und mit oder ohne MSCs im Insert kultiviert. Die Kultivierungsdauer wurde von 7 Tage auf 5 Tage reduziert, da sicher war wie lang der Caspase-Inhibitor stabil und somit wirksam blieb. Abbildung 3-43 zeigt eine Übersicht dieser Ergebnisse, die für Zellen, die nach 5 Tagen noch CD34⁺ waren, erhalten wurden aus insgesamt 3 Versuchen. Sowohl in Zellen, die mit oder ohne MSCs kultiviert wurden, war die Anzahl lebender Zellen nach A3D8-Inkubation geringer als in der Kontrolle, wobei angemerkt werden muss, dass der Effekt in Zellen, die mit MSCs kultiviert wurden, erneut stärker war. Die Schwankungen in den Ergebnissen waren jedoch sehr groß, was durch die hohe Standardabweichung verdeutlicht wird. Die Zugabe von ZVAD-FMK führte in den CD34⁺ ohne MSCs aber mit A3D8 kultivierten Zellen zu einer Erhöhung der lebenden Zellen (87,71 % im Vergleich zu 72,15 %) und zu einer Verringerung der frühapoptotischen Zellen (10,18 % im Vergleich zu 22,79 %) im Vergleich zu Zellen, die mit A3D8 und ohne ZVAD-FMK inkubiert wurden. In den CD34⁺ mit MSCs kultivierten Zellen zeigte die Zugabe von ZVAD-FMK kaum einen Effekt in dem mit A3D8-behandeltem Ansatz im Vergleich zu dem Ansatz, der mit A3D8 aber ohne ZVAD-FMK inkubiert wurde. In Zellen, die nach 5 Tagen CD34⁻ waren, wurden die gleichen Tendenzen beobachtet (Daten nicht dargestellt).

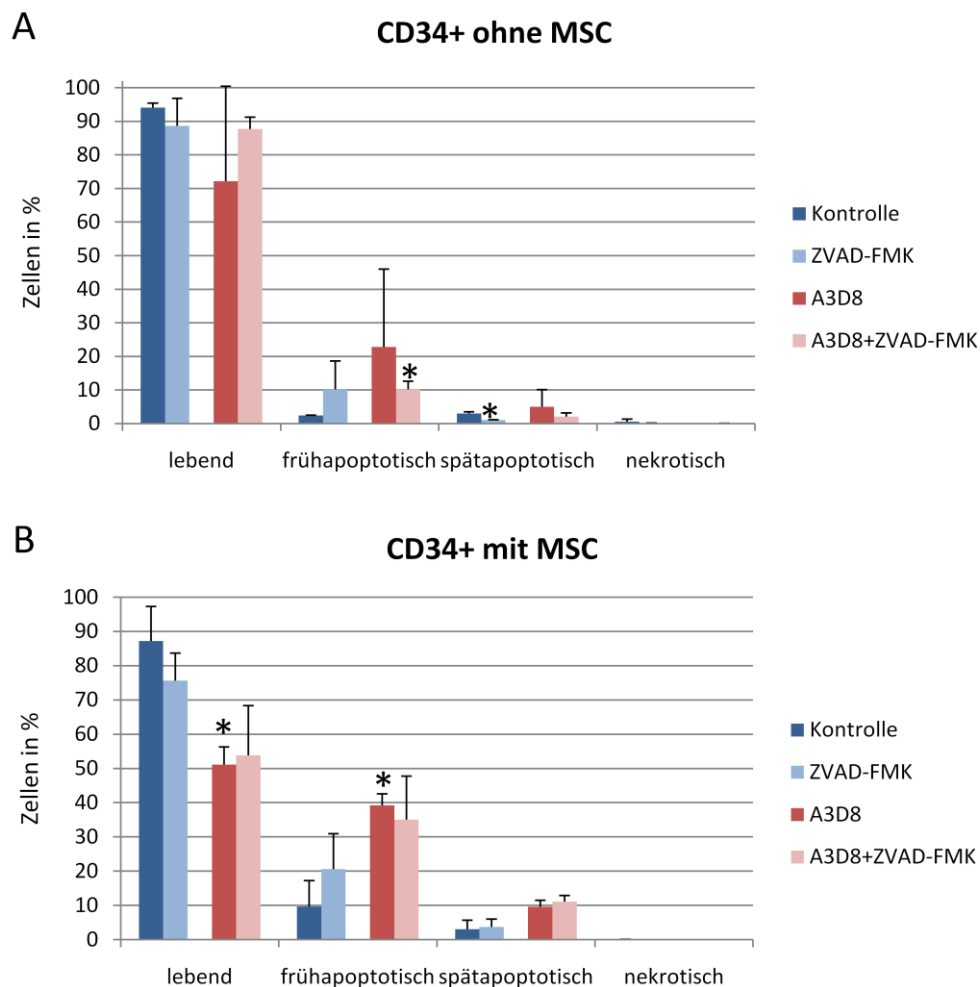


Abbildung 3-43 Übersicht über die Anzahl lebender, früh-, spätapoptotischer und nekrotischer CD34⁺ Zellen nach 5 Tagen Inkubation mit je 2 µg/ml A3D8 und/oder 25 µM ZVAD-FMK ohne (A) bzw. mit (B) Kokultur mit MSCs. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die mit * versehenen Werte waren jeweils statistisch signifikant verschieden von der unbehandelten Kontrolle ($p \leq 0,05$).

Der Einfluss von A3D8 wurde natürlich auch in CD34⁺ Zellen aus gesundem Knochenmark und von Patienten mit AML untersucht. Es konnten aber nur einzelne Proben untersucht werden, aufgrund der geringen Verfügbarkeit und der großen Nachfrage dieser Proben. Eine statistische Auswertung dieser Ergebnisse war daher nicht möglich. Dennoch konnte auch in diesen Einzelfällen die apoptotische Wirkung von A3D8 beobachtet werden, die in den CD34⁺ Zellen aus Knochenmark im Vergleich zu denen aus Nabelschnurblut in der gleichen Größenordnung lag. In den CD34⁺ Zellen aus einem AML-Patienten war eine stärkere apoptotische Wirkung von

A3D8 detektierbar im Vergleich zu denen aus Nabelschnurblut. Eine Interpretation dieses Einzelergebnisses wäre aber verfrüht.

3.4.3 Erhöhung der p27-Expression in mit anti-CD44v7-behandelten NB-4

Neben des apoptotischen Effekts von A3D8 in NB-4, der über die Wirkung von Caspasen vermittelt wird, wurde auch eine Stabilisierung von p27 (Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor p27^{Kip1}) nach A3D8-Behandlung beschrieben, die zum Zellwachstumsarrest führt (Gadhoum, Leibovitch et al. 2004). Dieser für A3D8 in NB-4 beschriebene Effekt, sollte im Folgenden auch für anti-CD44v7 in NB-4 und CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut untersucht werden. Dazu wurden zunächst NB-4 3 Tage mit je 2 µg/ml A3D8 oder anti-CD44v7 und/oder 25 µM ZVAD-FMK behandelt und anschließend wurde p27 mittels intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch gemessen. Die Detektion von anti-p27 erfolgte über einen sekundären Antikörper (goat anti-mouse IgG-FITC). Abbildung 3-44 zeigt beispielhaft wie die p27-Expression in NB-4 in den verschiedenen Ansätzen gemessen wurde. Für die Kontrolle und für den mit anti-CD44v7 inkubierten Ansatz konnte die p27-Expression bestimmt werden. In Zellen, die mit A3D8 inkubiert wurden, war keine Messung der p27-Expression möglich, da bereits ein sehr starkes Signal vom sekundären Antikörper allein detektiert wurde, und dieses sich nicht von der eigentlichen p27-Färbung unterschied. Eine mögliche Ursache für dieses starke unspezifische Signal war eventuell die unbeabsichtigte Detektion von A3D8-Molekülen, die vielleicht noch an den Zellen hafteten.

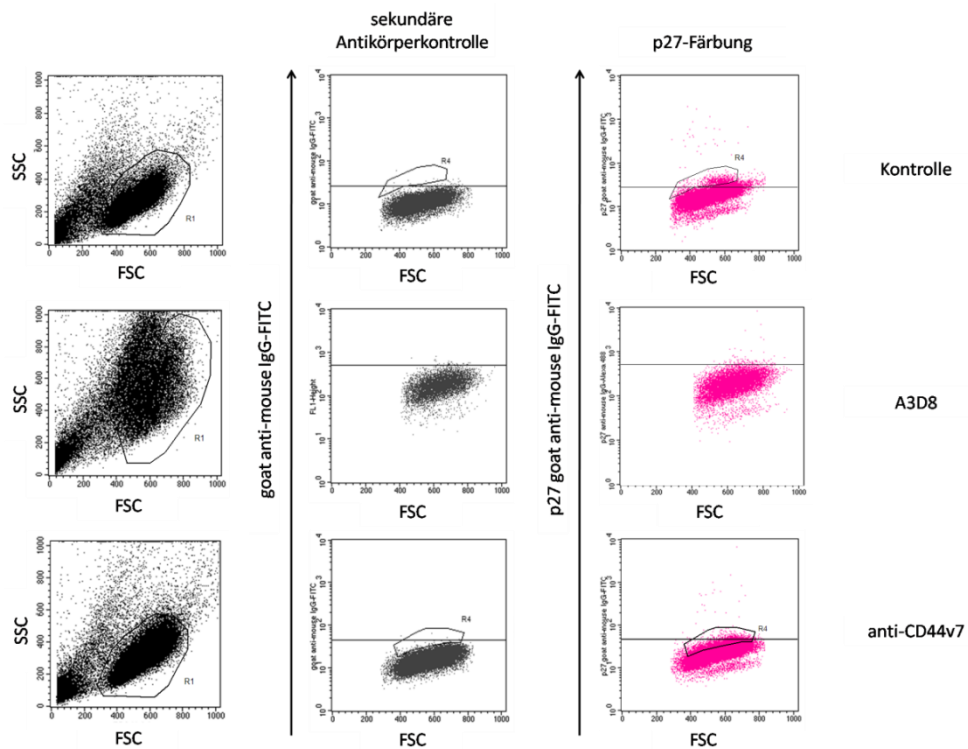


Abbildung 3-44 Übersicht über die durchflusszytometrische Messung von p27 in NB-4, die 3 Tage mit je 2 µg/ml A3D8, anti-CD44v7 bzw. ohne Zusatz (Kontrolle) inkubiert wurden. Dargestellt sind unter anderem jeweils die sekundäre Antikörperkontrolle (grau) und die eigentliche p27-Färbung (pink).

Abbildung 3-45 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse für die p27-Expression in NB-4 aus insgesamt 3 Versuchen. Die Inkubation mit anti-CD44v7 führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der p27-Expression auf 14,54 % im Vergleich zur Kontrolle (3,23 %). Die alleinige Zugabe von ZVAD-FMK hatte keinen Einfluss auf die p27-Expression (4,11 %). Im Ansatz, der mit anti-CD44v7 und ZVAD-FMK inkubiert wurde, war die Erhöhung der p27-Expression, die bei alleiniger Gabe von anti-CD44v7 gemessen wurde (14,54 %), nicht mehr detektierbar (4,18 %).

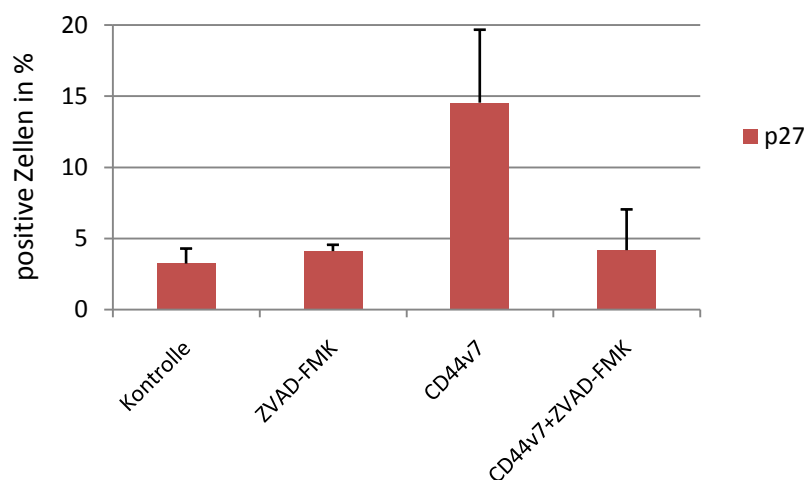


Abbildung 3-45 Übersicht über die p27-Expression in NB-4 nach Inkubation mit 2 µg/ml anti-CD44v7 und/oder 25 µM ZVAD-FMK für 3 Tage. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die Erhöhung der p27-Expression nach anti-CD44v7-Inkubation war statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$).

In CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut konnte die p27-Expression nicht gemessen werden, da deren Aufreinigung über Antikörper aus der Maus erfolgte und anti-p27 ebenfalls aus der Maus stammte. Diese Kombination führte zur Detektion unspezifischer Signale durch den sekundären Antikörper. Die Suche nach einem p27-Antikörper, der nicht aus der Maus stammte, blieb leider erfolglos. Die Detektion der p27-Expression mittels Westernblot konnte aufgrund der zu geringen Zellzahlen auch nicht durchgeführt werden.

3.4.4 Kokultur mit Hyaluronsäure führt zu einer Erhöhung der CD34-Expression

Da Hyaluronsäure ein wichtiger Ligand von CD44 und einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix ist, wurden zusätzlich zur Kokultur mit MSCs auch Kokulturversuche von CD34⁺ Zellen mit Hyaluronsäure durchgeführt, um den Einfluss der CD44-Hyaluronsäure-Interaktion auf den Selbsterhalt und die Proliferation von HSCs zu untersuchen. Dazu wurden CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut von gesunden Spendern 7 Tage lang, entweder mit Hyaluronsäure in Suspension kultiviert oder der Boden des Kulturgefäßes wurde zuvor mit Hyaluronsäure (200 µg/ml) beschichtet und im Anschluss erfolgte die Zugabe von den CD34⁺ Zellen. Nach 7 Tagen erfolgte die

Analyse der CD34-, CD11b-, CD44pan- und CD44v-Expression mittels Durchflusszytometer.

Ähnlich wie bei den Ergebnissen für die MSC-Kokultur, konnte man auch hier eine hohe Heterogenität, vor allem in der CD34-Expression zwischen den verschiedenen Experimenten, finden. Auch hier schwankte die CD34-Expression teilweise stark zwischen den Versuchen, sowohl in den Zellen, die mit als auch die ohne Hyaluronsäure kultiviert wurden. Die CD44pan-Expression unterschied sich nicht zwischen Kultur mit Hyaluronsäure und ohne, dies war analog zu den Ergebnissen nach MSC-Kokultur. Die CD34-Expression war in Zellen, die mit 40 bzw. 80 µg Hyaluronsäure in Suspension kultiviert wurden, höher als in Zellen, die ohne kultiviert wurden (siehe Abbildung 3-46). In Zellen, die in zuvor mit Hyaluronsäure (200 µg/ml) beschichteten Gefäßen kultiviert wurden, unterschied sich die CD34-Expression kaum von der in Zellen, die ohne kultiviert wurden. Die CD11b-Expression war in Zellen, die mit 40 µg Hyaluronsäure in Suspension kultiviert wurden um 19,12 % höher als in denen, die ohne inkubiert wurden. Die CD44-Varianten waren generell nur sehr schwach exprimiert und ihre Expression unterschied sich kaum zwischen Kokultur mit und ohne Hyaluronsäure.

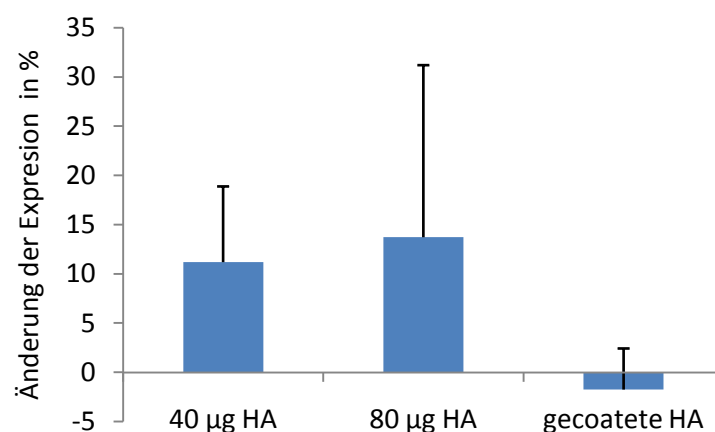


Abbildung 3-46 Übersicht über die prozentuale Änderung der CD34-Expression in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF-mobilisiertem Peripherblut, die 7 Tage mit 40 µg oder 80 µg HA bzw. in zuvor mit HA beschichteten Gefäßen kultiviert wurden im Vergleich zu Zellen, die ohne HA kultiviert wurden. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 4 (für 40 µg HA und gecoatete HA) bzw. 9 (für 80 µg HA) Versuchen.

3.4.5 CD34⁺ Zellen, die in Kontakt mit Hyaluronsäure sind, migrieren schlechter

Um den Einfluss von Hyaluronsäure auf das Migrationsverhalten von CD34⁺ Zellen zu untersuchen, wurden Transwell-Inserts verwendet, deren Membran entweder mit bzw. ohne 200 µg/ml Hyaluronsäure beschichtet wurde. Als Migrationsstimulanz dienten die von zuvor ausgesäten und kultivierten MSCs produzierten Zytokine. Nach 24 h Inkubationsdauer der CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut im Insert der Transwells, wurden die durch die Membran migrierten CD34⁺ Zellen gezählt. Abbildung 3-47 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse aus insgesamt 3 Versuchen. Weniger CD34⁺ Zellen (6,97 %) migrierten durch die Membran, wenn diese mit Hyaluronsäure beschichtet war, im Vergleich zur unbehandelten Membran (12,03 %).

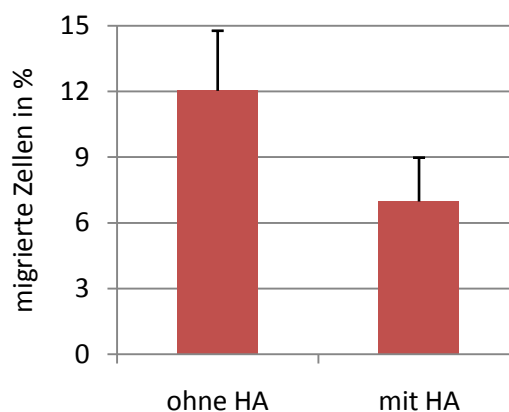


Abbildung 3-47 Übersicht über die Anzahl der migrierten CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut durch Membranen, die ohne bzw. mit 200 µg/ml HA beschichtet wurden, nach einer Inkubationszeit von 24 h. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen.

3.5 Einfluss von Antikörpern gegen CD44pan und CD44v auf die Adhäsion an MSCs und Hyaluronsäure

Um den Einfluss von Antikörpern gegen CD44pan- und die CD44-Varianten auf die Adhäsion von leukämischen Zelllinien und CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut an MSCs und Hyaluronsäure zu untersuchen, wurden 2 in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Adhäsionsassays verwendet (Wagner, Wein et al. 2007; Zepeda-Moreno, Taubert et al. 2011). Beide Assays beruhen auf der Trennung von adhärenenten und

nicht-adhärenenten Zellen mithilfe der Schwerkraft, wobei der eine auf Objektträgern durchgeführt wird und der andere in 96-Well-Platten.

Der Vorteil des Objektträgerassays für die durchgeführten Versuche bestand darin, dass man auch die Adhäsion an Hyaluronsäure untersuchen konnte, indem man speziell vom Institut für angewandte physikalische Chemie in Heidelberg angefertigte Objektträger, die mit Hyaluronsäure beschichtet wurden, verwenden konnte. Der Vorteil des 96-Well-Assays war die Trennung der adhärenenten und nicht-adhärenenten Zellen voneinander und die Detektion der nicht-adhärenenten Zellen mit einem colorimetrischen Assay, der die Quantifizierung von nur lebenden Zellen ermöglichte.

3.5.1 Objektträgerassay

Zunächst wurde die Grundadhäsion von KG-1a und Jurkat an Hyaluronsäure ohne den Einfluss von Antikörpern untersucht. Abbildung 3-48 zeigt eine Übersicht über die an Hyaluronsäure haftenden KG-1a und Jurkat aus 2 Versuchen. Die Anzahl der an Hyaluronsäure haftenden KG-1a und Jurkat war insgesamt sehr gering. Dennoch war der Prozentsatz von KG-1a mit 13,46 % wesentlich höher als der von Jurkat mit 1,6 %. Dies kann eventuell durch das Vorhandensein von CD44 auf der Oberfläche von KG-1a im Gegensatz zum Fehlen dieses Adhäsionsmoleküls bei Jurkat begründet werden. Da die Grundadhäsion von KG-1a an Hyaluronsäure insgesamt betrachtet aber gering war, wurde darauf verzichtet, Folgeversuche mit Antikörpern gegen CD44 anzuschließen.

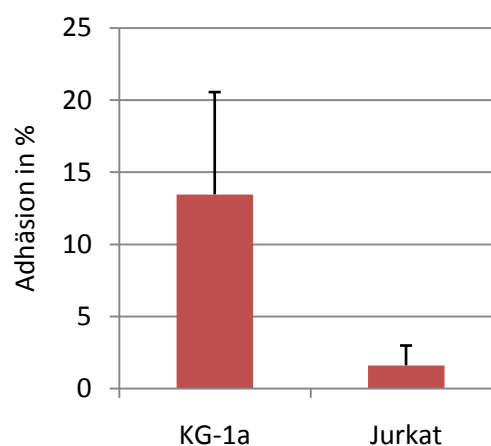


Abbildung 3-48 Übersicht über die an HA haftenden KG-1a und Jurkat nach 3 h Inkubationsdauer. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 2 Versuchen.

Im Weiteren wurde die Adhäsion von KG-1a an MSCs nach 1-stündiger Inkubation mit Antikörpern gegen CD44v3, v5, v4, v6, v7 und CD44pan (Clone A3D8) untersucht. Abbildung 3-49 zeigt eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse aus 3 Versuchen. Inkubation mit CD44v3, v4, v5, v6 und v7 hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion von KG-1a an MSCs. Die Inkubation mit A3D8 zeigte einen kleinen, aber nicht signifikanten Effekt auf die Adhäsion, welche im Vergleich zur Kontrolle verringert war (95,3 % im Gegensatz zu 100 %)). Aufgrund der bereits erwähnten Vorteile des 96-Well-Assays gegenüber dem Objektträgerassay, wurden die weiteren Experimente mit KG-1a und CD34⁺ Zellen mit dem 96-Well-Assay durchgeführt.

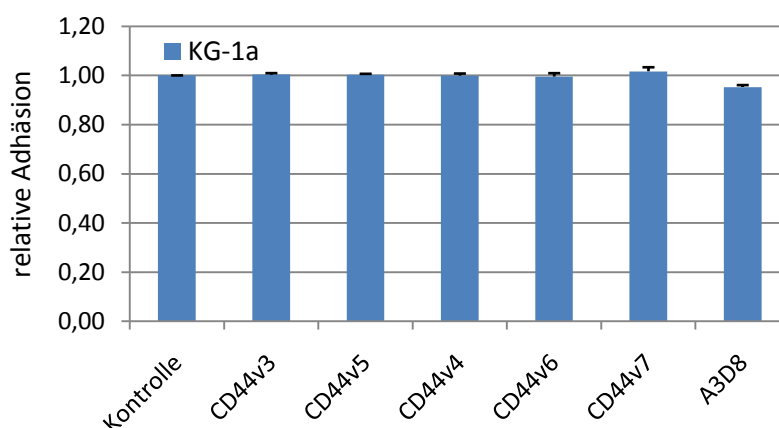


Abbildung 3-49 Übersicht über die relative Adhäsion von KG-1a an MSCs nach Inkubation mit anti-CD44v3, v4, v5, v6, v7 und A3D8 nach 1 h in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen.

3.5.2 96-Well-Assay

Mit diesem Assay wurde die Adhäsion von KG-1a und CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut an MSCs nach 2- und 23-stündiger Inkubation mit A3D8 und anti-CD44v7 untersucht. Auf die Untersuchung der anderen Antikörper gegen die CD44-Varianten wurde verzichtet, da sie keinerlei Effekt im Objektträgerassay zeigten und ihre Expression generell niedriger ist, als die von CD44v7. Abbildung 3-50 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse aus jeweils 3 Versuchen. Die Inkubation mit anti-CD44v7 für 2 bzw. 23 h hatte sowohl in KG-1a als auch in CD34⁺ Zellen keinen Einfluss auf die Adhäsion an MSCs. Somit konnten die Ergebnisse für anti-CD44v7 aus dem Objektträgerassay bestätigt werden. Die Inkubation mit A3D8 für 2 h hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Adhäsion von KG-1a und CD34⁺ Zellen an MSCs.

Demgegenüber hatte die 23-stündige Inkubation mit A3D8 in beiden Zelltypen einen, wenn auch gegensätzlichen und zumindest in KG-1a sehr geringen, Effekt. Statistisch signifikant mehr KG-1a (107 %) adhärten im Gegensatz zu statistisch signifikant weniger CD34⁺ Zellen (84,6 %) an MSCs im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0,01$).

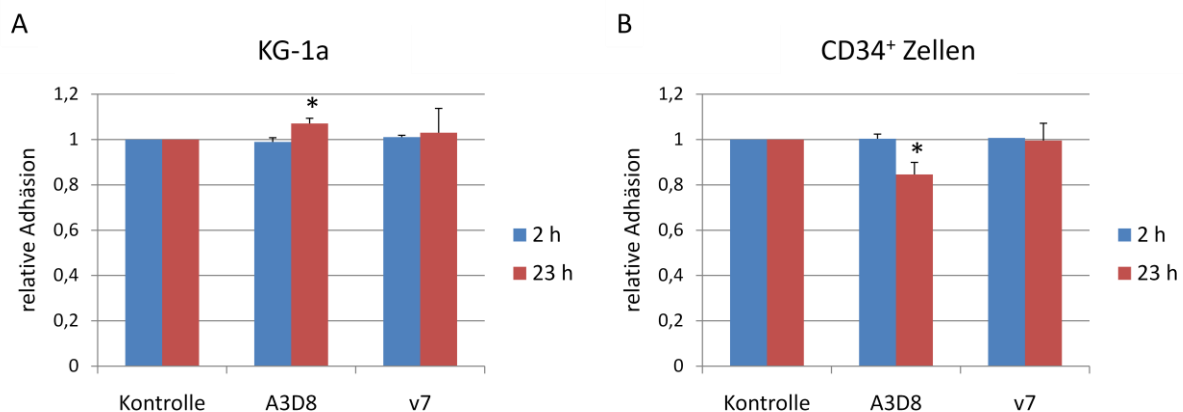


Abbildung 3-50 Übersicht über die relative Adhäsion von KG-1a (A) und CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut (B) an MSCs nach Inkubation mit A3D8 bzw. anti-CD44v7 für 2 bzw. 23 h in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. Die mit * versehenen Werte waren jeweils statistisch signifikant verschieden von der unbehandelten Kontrolle ($p \leq 0,01$).

3.6 Mikrofluidik: Scherströmung induziert Adhäsion und Rolling von leukämischen Zelllinien und CD34⁺ Zellen, die CD44 exprimieren, an Hyaluronsäure

3.6.1 KG-1a zeigen Scherstrom-induzierte Anhaftung an Hyaluronsäure im Gegensatz zu Jurkat

Wie bereits erwähnt spielt die Interaktion von CD44 und Hyaluronsäure eine wichtige Rolle in zahlreichen biologischen Prozessen. Um den Einfluss dieser Interaktion in leukämischen Zelllinien und CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut zu untersuchen, wurden zunächst statische Adhäsionsassays von KG-1a und Jurkat an Hyaluronsäure durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5.1). Die Anzahl der an Hyaluronsäure haftenden KG-1a und Jurkat war insgesamt sehr gering. Dennoch war der Prozentsatz von haftenden KG-1a (13,46 %) wesentlich höher als der von Jurkat (1,6 %). Ein Grund für diesen Unterschied könnte eventuell das

Vorhandensein von CD44 auf der Oberfläche von KG-1a im Gegensatz zum Fehlen von CD44 in Jurkat sein. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, war die Verwendung des statischen Adhäsionsassays, aufgrund der geringen Adhäsion jedoch ungeeignet. Auch die Bedeutung der Scherströmung auf die CD44-Hyaluronsäure-Interaktion, die bereits in der Literatur beschrieben ist (Clark, Alon et al. 1996; DeGrendele, Estess et al. 1996), konnte mit diesem Assay nicht untersucht werden. Aus diesen Gründen wurde ein von Christof Christophis (Institut für angewandte physikalische Chemie in Heidelberg) entwickeltes Mikrofluidiksystem (Christophis, Grunze et al. 2010) verwendet, unter dessen Leitung die Experimente auch durchgeführt wurden.

In einem ersten Versuch wurde die Adhäsionsstärke von KG-1a und Jurkat an Hyaluronsäure und Argininsäure durch ein Abreißexperiment untersucht. Dazu wurden KG-1a bzw. Jurkat jeweils auf Hyaluronsäure, Argininsäure und auf reinem Glas für 3 h in den Kanälen in Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Abreißexperiment gestartet, indem ein logarithmisch ansteigender Fluss angelegt wurde. Die Berechnung der adhärennten Zellen erfolgte durch manuelles Auszählen von Zeitraffermikroskopieaufnahmen. Durchlaufende und rollende Zellen konnten ebenfalls mithilfe der Videos gut voneinander abgetrennt werden. Abbildung 3-51 zeigt die Abreißkurven für Jurkat und KG-1a auf den 3 Substraten aus 3 bis 6 Versuchen. Für beide Zelltypen konnten die nichtadhärennten und adhärennten Zellen bei sehr kleinen Scherströmungen von ~0,05 dyn/cm² voneinander unterschieden werden. Ein deutlicher Abfall der Zellzahl nach statischer Inkubation konnte bei beiden Zelltypen und allen 3 Substraten beobachtet werden. Die zurückbleibenden adhärennten Zellen benötigten einen viel höheren Fluss, um abgelöst zu werden. 56 % der Jurkat adhärten an Glas im Vergleich zu nur 26 % an Argininsäure und 3 % an Hyaluronsäure. Zur Quantifizierung der Adhäsionsstärke wurde die kritische Scherströmung (τ_{50}) bestimmt, die benötigt wird, um 50 % der adhärennten Zellen zu entfernen. In Jurkat wurde die kritische Scherströmung von 1,48 dyn/cm² auf Glas, 0,49 dyn/cm² auf Argininsäure und 0,06 dyn/cm² auf Hyaluronsäure berechnet. KG-1a zeigten im Vergleich zu Jurkat eine reduzierte Tendenz an Glas (10 %) und an Argininsäure (6 %) zu adhärten. Im Gegensatz dazu adhärten mehr KG-1a an Hyaluronsäure (13 %). Mit steigender Scherströmung (>0,2 dyn/cm²) konnte ein Anstieg der adhärennten KG-1a an

Hyaluronsäure beobachtet werden. Der Fluss stimulierte also die KG-1a an Hyaluronsäure zu haften, was zu einem zwischenzeitlichen Anstieg der adhärenen Zellzahl führte (Maximum adhärenen Zellen bei $1,3 \text{ dyn/cm}^2$). Bei höheren Scherströmungen wurden die adhärenen KG-1a abgelöst. In KG-1a wurde die kritische Scherströmung von $1,4 \text{ dyn/cm}^2$ auf Glas, $0,56 \text{ dyn/cm}^2$ auf Argininsäure und $5,17 \text{ dyn/cm}^2$ auf Hyaluronsäure berechnet.

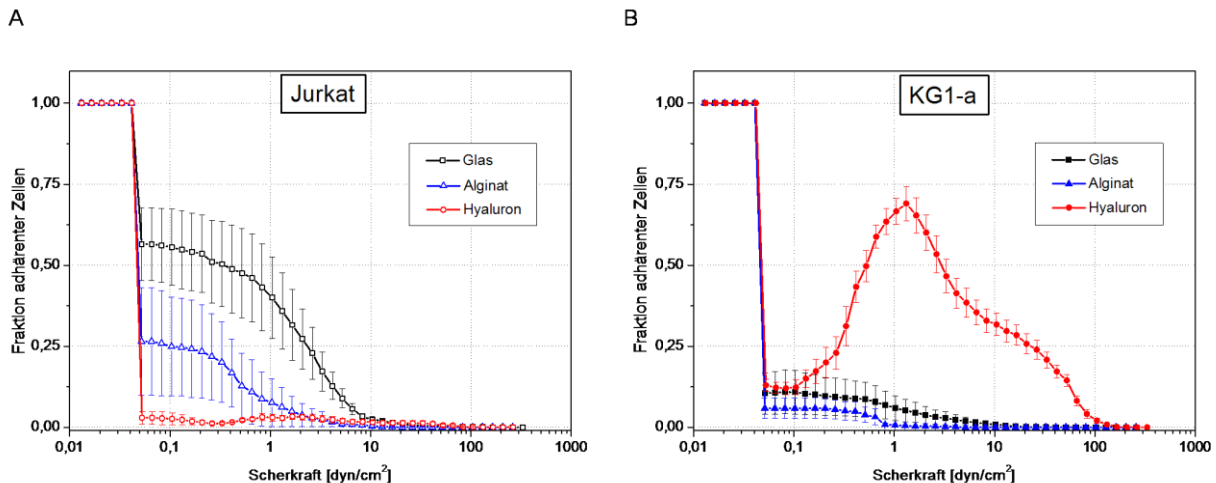


Abbildung 3-51 Übersicht über die Abreißkurven von Jurkat (A) und KG-1a (B) auf Glas, Alginat (Argininsäure) und Hyaluron (Hyaluronsäure). Die Abreißkurven wurden auf die initiale Zellzahl im Blickfeld (~ 600) normalisiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardfehler aus 3 bis 6 Versuchen.

3.6.2 Einfluss von A3D8 auf die Scherstrom-induzierte Adhäsion von KG-1a an Hyaluronsäure

In diesem Experiment sollte der mögliche Einfluss von dem CD44pan-Antikörper A3D8 und von anti-CD44v7 auf die Adhäsion von KG-1a an Hyaluronsäure aus dem Fluss untersucht werden. Für diese Fragestellung wurde ein konstantes Flussassay verwendet, auf eine statische Vorinkubation wurde verzichtet, um optimale Bedingungen für die Scherstrom-induzierte Adhäsion, die in den Vorversuchen beobachtet wurde, zu ermöglichen. Eine niedrige Scherströmung von $0,175$ bzw. $0,25 \text{ dyn/cm}^2$ wurde gewählt und die anhaftenden Zellen nach 0, 2,5 und 5 min gezählt. Zuvor wurden KG-1a 1 h bzw. 24 h mit je $2 \mu\text{g/ml}$ A3D8 bzw. anti-CD44v7 vorinkubiert, bevor sie ins Kanalsystem überführt wurden. Nach Vorinkubation der KG-1a mit anti-CD44v7, sowohl für 1 als auch für 24 h, konnten keinerlei

Unterschiede in der Anzahl haftender Zellen im Vergleich zur Kontrolle gefunden werden.

Abbildung 3-52 zeigt eine Übersicht über die erzielten Ergebnisse nach A3D8-Inkubation. Nach Vorinkubation für 1 h war sowohl bei 0,175 bzw. 0,25 dyn/cm² kein großer Unterschied in der Anzahl haftender Zellen an Hyaluronsäure detektierbar im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3-52 A und B). A3D8 scheint also keinen direkten blockierenden Effekt auf die Haftung an Hyaluronsäure zu haben. Nach der 24-stündigen Vorinkubation mit A3D8 sah man eine leichte Erhöhung der anhaftenden Zellen nach 2,5 und 5 min im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3-52 C und D). Diese Ergebnisse deuten auf einen indirekten Effekt von A3D8 auf die Adhäsion hin. Dieser Effekt könnte beispielsweise eine Hochregulation von CD44 auf der Zelloberfläche sein.

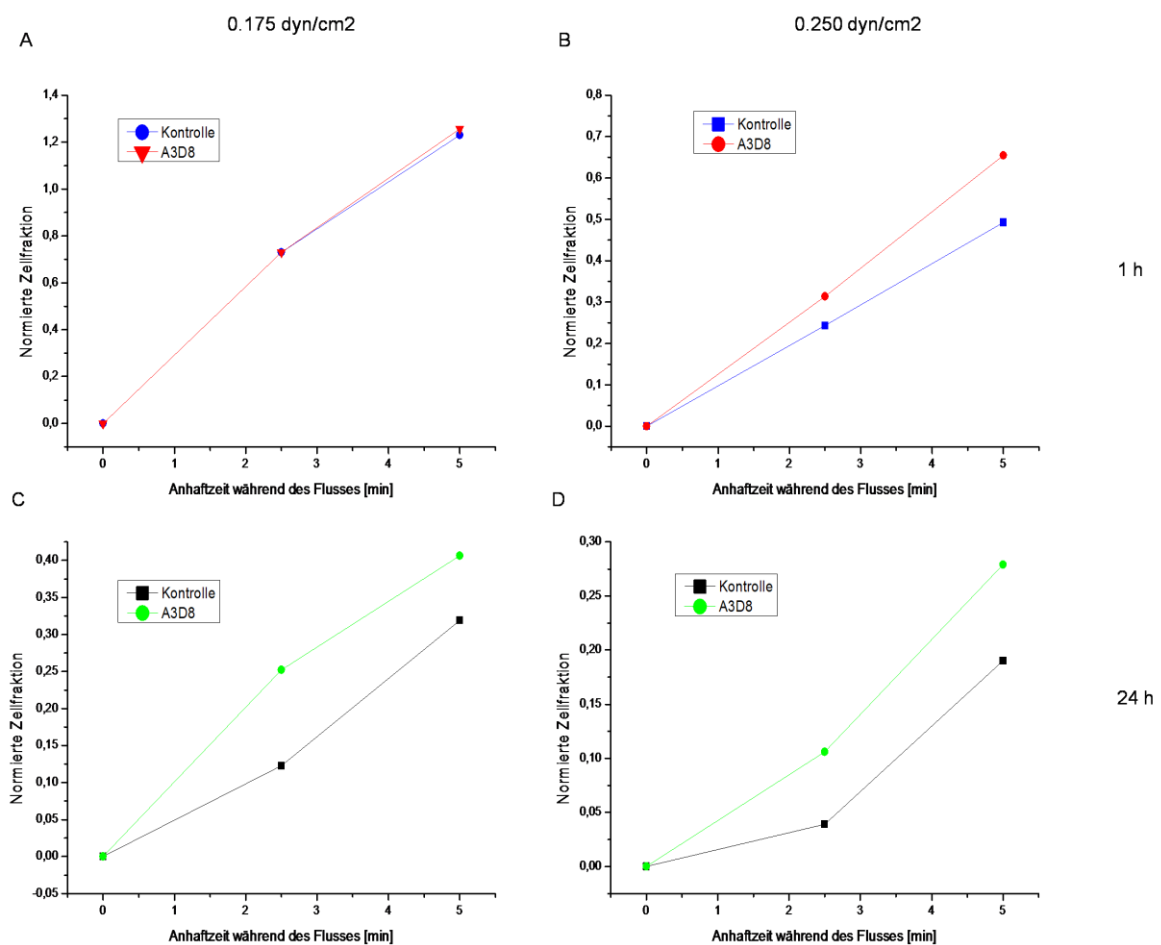


Abbildung 3-52 Übersicht über die Anzahl von KG-1a, die aus dem Fluss (0,175 bzw. 0,25 dyn/cm²) an HA anhaften nach A3D8-Vorinkubation für 1 h (A und B) bzw. für 24 h (C und D).

3.6.3 Scherstrom-induzierte Anhaftung von leukämischen Zelllinien an Hyaluronsäure in Abhängigkeit von ihrer CD44-Expression

Im nächsten Experiment sollte untersucht werden, ob sich leukämische Zelllinien, die anhand ihrer CD44-Expression unterschieden werden können, auch im Hinblick auf die Scherstrom-induzierte Adhäsion an Hyaluronsäure unterscheiden. Für diese Fragestellung wurde ebenfalls ein konstantes Flussassay verwendet, auf eine statische Vorinkubation wurde verzichtet, um optimale Bedingungen für die Anhaftung zu ermöglichen. Eine niedrige Scherströmung von $\sim 0,2 \text{ dyn/cm}^2$ wurde gewählt, um die Scherstrom-induzierte Adhäsion zu stimulieren und um nichtadhärente Zellen abzulösen. Es wurden KG-1a und HL-60 als leukämische Zelllinien mit einer sehr hohen CD44-Expression verwendet, darüber hinaus K-562, die eine sehr heterogene CD44-Expression zeigten und Jurkat und Kasumi-1, die keinerlei CD44-Expression vorwiesen (siehe Abschnitt 3.2.1). Leukämische Zelllinien, die CD44 exprimierten (HL-60, KG-1a und K-562), hafteten an Hyaluronsäure aus dem Fluss, im Gegensatz zu Kasumi-1 und Jurkat, die kein CD44 exprimierten und nicht an Hyaluronsäure hafteten (siehe Abbildung 3-53). Die Anhaftung an Hyaluronsäure nach 4 min war in HL-60 (~ 810 Zellen) am stärksten, gefolgt von KG-1a (~ 340 Zellen) und K-562 (~ 190 Zellen). Die Expression von CD44 auf der Oberfläche von Zellen war also notwendig, damit die Zellen an Hyaluronsäure haften konnten. Die stärkere Adhäsion von HL-60 im Vergleich zu KG-1a könnte trotz ähnlicher CD44-Expression auf die unterschiedliche Zellgröße zurückzuführen sein. In den größeren HL-60 kam es eventuell zu einer verstärkten Flussaktivierung und somit zu einer höheren Anhafrate. Natürlich müssen auch weitere Faktoren, wie beispielsweise der Aktivierungszustand von CD44 mit in Betracht gezogen werden.

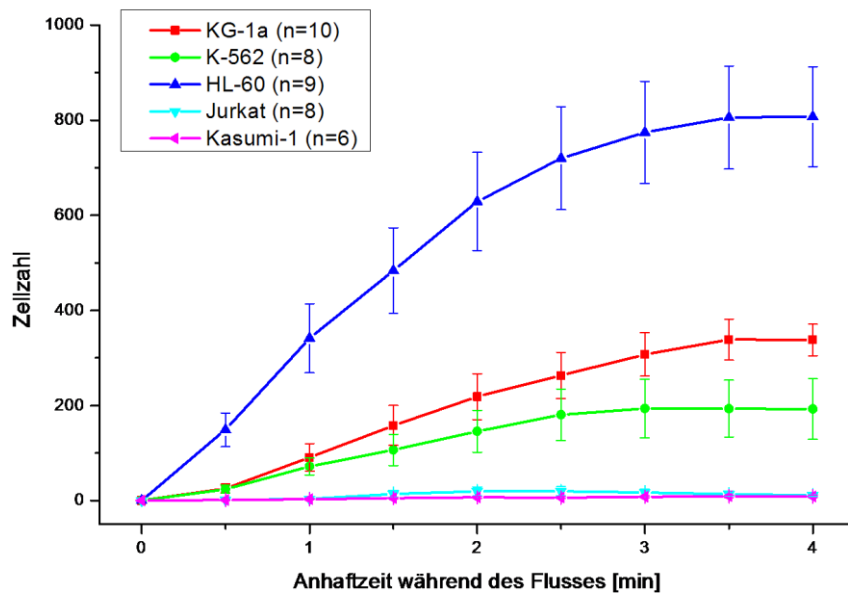


Abbildung 3-53 Übersicht über die Anhaftung von leukämischen Zelllinien (KG-1a, K-562, HL-60, Jurkat und Kasumi-1) aus dem Fluss ($\sim 0,2 \text{ dyn/cm}^2$) an Hyaluronsäure. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler aus 6 bis 10 Versuchen.

3.6.4 CD34^+ Zellen zeigen Scherstrom-induzierte Anhaftung an Hyaluronsäure

Um zu untersuchen, ob die in leukämischen Zelllinien gefundenen Ergebnisse auch in primärem humanem Material eine Rolle spielen, wurden CD34^+ Zellen aus Nabelschnurblut verwendet, die wie KG-1a und HL-60 eine starke CD44 -Expression zeigten. Diese Zellen wurden auf Hyaluronsäure und Argininsäure für kurze Zeit inkubiert (5 min), bevor ein logarithmisch ansteigender Fluss angelegt wurde. Aufgrund der viel geringeren Zellmengen an CD34^+ Zellen, die man im Vergleich zu den leukämischen Zelllinien zur Verfügung hatte, konnten nicht alle Experimente mit diesen Zellen wiederholt werden. Außerdem konnten nur Einzelzellen analysiert und beschrieben werden. Die Ergebnisse aus 2 Abreißexperimenten zeigten, dass CD34^+ Zellen nicht an Argininsäure (0 %) und nur gering an Hyaluronsäure (6 %) hafteten. Dennoch adhärten und rollten mehr CD34^+ Zellen an bzw. auf Hyaluronsäure mit zunehmender Scherströmung und lösten sich erst bei einer relativ hohen Scherströmung von $2,17 \text{ dyn/cm}^2$ ab. Wurde nun eine konstante Scherströmung von 2 dyn/cm^2 angelegt und die Richtung des Flüssigkeitsstromes in regelmäßigen Abständen verändert, so haben auch die CD34^+ Zellen ihre Flussrichtung verändert und eine konstante Rollinggeschwindigkeit von $17,8 \mu\text{m/s}$ gezeigt (siehe Abbildung

3-54). Wann immer der Fluss gestoppt wurde, stoppten auch die $CD34^+$ Zellen (bei $0,3 \text{ dyn/cm}^2$), um im Anschluss den Kontakt zur Hyaluronsäure zu lösen bei ungefähr $0,2 \text{ dyn/cm}^2$. Wurde ein neuer Fluss in die entgegengesetzte Richtung angelegt, so haben die $CD34^+$ Zellen den Kontakt zur Hyaluronsäure wiederhergestellt und sind in Flussrichtung auf der Oberfläche entlang gerollt. Somit zeigten auch $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut eine Scherstrom-induzierte Adhäsion an Hyaluronsäure.

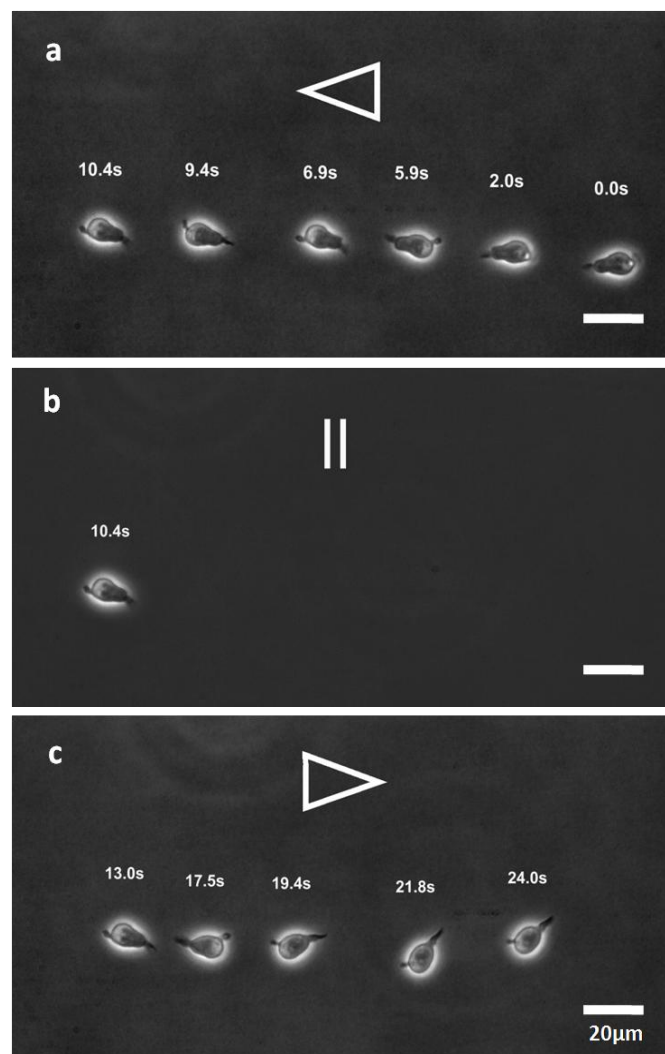


Abbildung 3-54 Bildersequenz einer rollenden $CD34^+$ Zelle auf Hyaluronsäure bei 2 dyn/cm^2 (a-c). Die Pfeile verdeutlichen die Flussrichtung.

4 Diskussion

4.1 Leukämische Zelllinien, HSCs und LSCs exprimieren dieselben alternativ gespleißten variablen CD44-Exon-Produkte

Zur Untersuchung der CD44s- und CD44v-Expression auf mRNA-Ebene wurden jeweils 2 unterschiedliche Primerpaare verwendet, um zum einen die Verteilung der eingebauten variablen Exons zu untersuchen und zum anderen diese zu quantifizieren. Es wurden sowohl leukämische Zelllinien (KG-1a, HL-60, K-562, NB-4, Jurkat und Kasumi-1), als auch verschiedene Subpopulationen ($CD34^+$ versus $CD34^-$, $CD34^+/CD38^-$ versus $CD34^+/CD38^+$, $ALDH^+$ versus $ALDH^-$, $CD34^+/ALDH^+$, SDF versus FDF, Leukozyten) von Zellen aus verschiedenen primären Materialien (Nabelschnurblut, mobilisiertes Peripherblut, Knochenmark, sowie Peripherblut von gesunden Spendern und von Patienten mit AML) untersucht. Die CD44-Standardisoform wurde durchgehend sehr stark exprimiert. Die Analyse der verschiedenen variablen Exons ergab, dass sowohl in den leukämischen Zelllinien, als auch in den verschiedenen hämatopoetischen Subpopulationen, primitiv oder weiter differenziert, aus primärem Material von gesunden Spendern und von Patienten mit AML, die gleichen Banden, also das gleiche Muster, für die einzelnen CD44-Varianten exprimiert wurden. Dies deutet daraufhin, dass sowohl in gesunden als auch in leukämischen Zellen dieselben variablen Exons zwischen die Standardexons eingebaut wurden. Diese Ergebnisse bestätigen nun auch für hämatopoetische Zellen die Vermutung, dass verschiedene Gewebe dominante variable Exonprodukte exprimieren. Dies konnte zuvor unter anderem für die epitheliale Form (Cooper, Dougherty et al. 1992) und den Keratinozytentyp (Brown, Bouchard et al. 1991; Haggerty, Bretton et al. 1992) gezeigt werden.

Die jeweils stärkste also dominante Bande, die man für die verschiedenen CD44-Varianten nach Standard-PCR in der Gelelektrophorese beobachten konnte, enthielt in den meisten Fällen nur das einzelne untersuchte variable Exon, das direkt nach dem Standardexon eingebaut wurde. Die nächsthöheren Banden enthielten das jeweils getestete variable Exon zusammen mit dem direkt davor liegenden variablen

Exon. Dies spricht dafür, dass die variablen Exons ihrer Reihenfolge nach eingebaut bzw. im Spleißprozess nicht eliminiert werden. Dafür sprechen auch die in epithelialen Zellen (CD44v8-v10) und Keratinozyten (CD44v3-v10) gefundenen CD44-Varianten, die ebenfalls jeweils variable Exons enthielten, die nebeneinander lagen (Brown, Bouchard et al. 1991; Cooper, Dougherty et al. 1992; Haggerty, Bretton et al. 1992).

4.2 Unterschiedliche und zellzyklusabhängige CD44s- und CD44v-Expression in leukämischen Zelllinien

KG-1a, HL-60, NB-4 und K-562 exprimierten sowohl CD44s bzw. CD44pan als auch die CD44-Varianten auf mRNA- und Proteinebene. KG-1a, HL-60 und NB-4 zeigten eine durchgehend starke CD44pan-Oberflächenexpression im Vergleich zu einer heterogenen Verteilung von CD44 auf der Oberfläche von K-562. Jurkat und Kasumi-1 zeigten auf mRNA-Ebene nur eine minimale CD44s- und keine CD44-Varianten-Expression. Auf Proteinebene konnten in Jurkat und Kasumi-1 keinerlei CD44-Moleküle auf der Oberfläche detektiert werden.

Die in KG-1a, HL-60, NB-4 und K-562 exprimierten CD44-Varianten schwankten in ihren Expressionsleveln zwischen verschiedenen Messungen teilweise stark und die Ursache für diese Schwankungen wurde in weiteren Versuchen genauer untersucht.

Erste Hinweise darauf, dass die CD44v-Expression vom Zellzyklus der Zellen abhängig sein könnte, erhielt man nach Inkubation von KG-1a und K-562 in serumfreiem Medium, gefolgt von einer Inkubation in serumhaltigem Medium. Durch diese Synchronisation der Zellen, zuerst in der G₁-Phase und im Anschluss daran in der S-Phase des Zellzyklus, konnten starke Unterschiede in der Stärke der CD44v-Expression gemessen werden. Sowohl in KG-1a als auch in K-562 war die CD44v-Expression in Zellen, die in der S-Phase synchronisiert waren, höher als Zellen, die sich in der G₁-Phase befanden. Darüber hinaus war in K-562, im Gegensatz zu KG-1a, zusätzlich eine Erhöhung der CD44pan-Expression nach Inkubation mit Serum detektierbar. Da diese Art der Synchronisation, also die Inkubation in serumfreiem gefolgt von serumhaltigem Medium, nicht den Zellzyklus in allen Zellen gleichermaßen beeinflussen kann, wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Theorie der zellzyklusabhängigen CD44v-Expression beweisen zu können. Zu

diesem Zweck wurden KG-1a in CD44v7⁺ und CD44v7⁻ Zellen sortiert und auf ihre Zellzyklusverteilung hin untersucht. Signifikant mehr CD44v7⁺ KG-1a waren in der S- und G₂/M-Phase und signifikant weniger in der G₁-Phase zu finden, im Vergleich zu CD44v7⁻ KG-1a. In einem weiteren Ansatz konnten KG-1a mithilfe des Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain parallel auf ihre Zellzyklusverteilung und CD44v-Expression getestet werden. Alle CD44-Varianten waren dabei in der G₁-Phase am niedrigsten exprimiert und in der G₂/M-Phase am höchsten.

In K-562 konnte neben einer zellzyklusabhängigen Expression von CD44 und den CD44-Varianten auch eine zellzyklusabhängige Expression der ALDH gefunden werden. K-562 ist die einzige der von uns untersuchten leukämischen Zelllinien, die eine ALDH-Aktivität zeigte (Mittelwert 19,66 %). Anhand ihrer ALDH-Expression konnten K-562 in ALDH⁺⁺, ALDH⁺, ALDH⁻ und ALDH⁻ Subpopulationen unterteilt werden. Von den ALDH⁺⁺ und ALDH⁺ K-562 waren im Vergleich zu ALDH⁻ und ALDH⁻ Zellen mehr Zellen in der S- und G₂/M-Phase und weniger in der G₁-Phase des Zellzyklus zu finden. Anschließend wurde die CD44pan- und CD44v-Expression in den verschiedenen ALDH-Subpopulationen gemessen und sowohl die CD44pan-, als auch die CD44v4-, v5- und v7-Expression war in ALDH⁻ Zellen am niedrigsten, gefolgt von ALDH⁻ und ALDH⁺ Zellen. In ALDH⁺⁺ Zellen war jeweils die höchste CD44pan- und CD44v-Expression zu finden.

Leukämische Zellen von Zelllinien, sind durch eine hohe Proliferationsrate charakterisiert und sie erhöhen in diesem Zusammenhang ihre CD44v-Expression.

4.3 Schwache CD44v-Expression in HSCs im Gegensatz zu einer starken Expression in myeloiden Leukozyten

CD34⁺ und CD34⁻ Zellen, ALDH⁺ und ALDH⁻ Zellen, ALDH⁺/CD34⁺, SDF und FDF, Leukozyten und MSCs aus den verschiedenen primären Materialien von gesunden Spendern wurden, analog zu den leukämischen Zelllinien, auf ihre CD44s- bzw. CD44pan- und CD44v-Expression auf mRNA- (mittels Standard- und Real-time PCR) und Proteinebene (mittels Oberflächenfärbung und durchflusszytometrischer Analyse) untersucht.

Auf mRNA-Ebene wurde CD44s in allen Subpopulationen primärer Zellen durchgehend stark exprimiert. Demgegenüber wurden die CD44-Varianten auf

mRNA-Ebene in den ALDH⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark von gesunden Spendern kaum bzw. nur sehr schwach exprimiert im Vergleich zu den ALDH⁻ Zellen. Dagegen war in SDF eine stärkere CD44-Varianten-Expression als in FDF auf RNA- und Proteinebene zu finden. Dieser scheinbare Widerspruch in der CD44v-Expression zwischen funktionell ähnlichen Subpopulationen hämatopoetischer Progenitoren konnte damit erklärt werden, dass die langsamteilenden Zellen (SDF), eine sehr heterogene Population aus ALDH⁺ und ALDH⁻, aber auch CD34⁺ und CD34⁻ Zellen dargestellt haben. Dagegen waren in den schnellteilenden Zellen (FDF) hauptsächlich ALDH⁻ und CD34⁻ Zellen zu finden. Die CD44-Varianten wurden in den langsamteilenden ALDH⁻ und CD34⁻ Zellen stärker exprimiert als in den schnellteilenden ALDH⁻ und CD34⁻ Zellen. Die langsamteilende Zellfraktion, da aus primitiven und differenzierten Zellen bestehend, stellt somit keine geeignete Subpopulation zur Analyse der Stammzellfunktion dar. Durch die zusätzliche Färbung von ALDH und/oder CD34 und CD38 können jedoch sehr primitive langsamteilende hämatopoetische Vorläuferzellen definiert und analysiert werden. Unsere Arbeitsgruppe hat zu diesem Zweck CD34⁺/CD38⁻ Zellen aus Nabelschnurblut mit PKH26 gefärbt und diese nach 7 Tagen in SDF und FDF sortiert (Wagner, Ansorge et al. 2004). Mithilfe von Transkriptomanalysen konnte gezeigt werden, dass in langsamteilenden Zellen (SDF) verschiedene Gene hochreguliert waren, die mit Stammzellfunktionen assoziiert waren (Wagner, Ansorge et al. 2004). Darüber hinaus konnten humane Zellen der langsamteilenden Zellfraktion (SDF) in den Thymus von NOD/SCID-Mäusen wandern und dort ausreifen im Gegensatz zu Zellen der schnellteilenden Zellfraktion (FDF) (Vitacolonna, Schubert et al. 2010). Die Sortierung in SDF und FDF, in Verbindung mit weiteren Stammzellmarkern, ist also notwendig zur Anreicherung von primitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Sowohl in den nach ALDH⁺ und ALDH⁻ sortierten Zellen, als auch in SDF und FDF war ein sehr heterogenes Verhältnis in der ALDH-Expression auf mRNA-Ebene zu finden. In den Proben mit einer starken Erhöhung der ALDH-Expression in ALDH⁺ versus ALDH⁻ Zellen bzw. in SDF versus FDF fand man darüber hinaus eine Erniedrigung der CD44s-Expression und umgekehrt. Über die Bedeutung dieser negativen Korrelation zwischen der ALDH- und CD44s-Expression auf mRNA-Ebene kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Womöglich kann durch das

heterogene Verhältnis zwischen der ALDH-Expression in $ALDH^+$ versus $ALDH^-$ Zellen bzw. SDF versus FDF eine Aussage über den Grad der Differenzierung der verschiedenen Populationen bzw. über die Reinheit der sortierten Populationen gemacht werden. Es wurde bereits beschrieben, dass sich die CD44-Expression während der Differenzierung ändert. So exprimierten beispielsweise myeloide und erythroide Vorläuferzellen CD34 und CD44, im Gegensatz zu einem Teil der B-Lymphozytenvorläufer, die $CD34^+$, aber $CD44^-$ waren (Deguchi und Komada 2000).

Auf Proteinebene wurden anschließend $CD34^+$, $ALDH^+$ und $ALDH^+/CD34^+$ Zellen, als primitive hämatopoetische Vorläuferpopulationen, aus Nabelschnurblut, mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und gesundem Knochenmark auf ihre CD44pan- und CD44v-Expression hin untersucht. Die CD44pan-Expression war in $ALDH^+$ und $ALDH^+/CD34^+$ Zellen aus gesundem Material einheitlich hoch und lag zwischen 98 und 100 %. In $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut und gesundem Knochenmark war mit 93,7 bzw. 94,46 % eine niedrigere CD44pan-Expression zu finden, als in mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut mit 98,98 %. Die CD44v-Expression hingegen war insgesamt in allen primitiven Subpopulationen niedrig. CD44v7 wurde von allen Varianten am stärksten exprimiert. In den Subpopulationen aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Nabelschnurblut waren die CD44-Varianten kaum exprimiert (CD44v7 meist unter 1 %), im Vergleich zu einer höheren Expression in denen aus gesundem Knochenmark (CD44v7 maximal 12 %). Die CD44-Varianten waren am höchsten in $ALDH^+$ Zellen, gefolgt von $CD34^+$ Zellen und am niedrigsten in den primitiveren $ALDH^+/CD34^+$ Zellen exprimiert. Die Werte aus gesundem Knochenmark schwankten teilweise stark zwischen den verschiedenen Proben im Gegensatz zu denen aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Nabelschnurblut, was auf höhere individuelle Unterschiede im Knochenmark hindeutet. Primitive hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, also Zellen, die noch Kontakt zu ihrer Nische haben, zeigen eine höhere CD44v-Expression, als mobilisierte Vorläuferzellen oder Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut. Ob die höhere, aber im Hinblick auf ausdifferenzierte Zellen dennoch niedrige CD44v-Expression einen Einfluss auf die Stammzeleigenschaften oder die Differenzierung der Zellen hat, wurde in Kokulturversuchen mit MSCs und Hyaluronsäure näher untersucht.

Im nächsten Schritt wurde die Oberflächenexpression von CD44pan und CD44v in ausdifferenzierten Leukozyten untersucht. CD44pan war auf allen Leukozyten sehr stark exprimiert (97 bis 100 %). Die CD44-Varianten wurden in T- und B-Lymphozyten viel niedriger exprimiert als in Monozyten und Granulozyten. CD44v7 war auch in den Leukozyten die am höchsten exprimierte CD44-Variante. So war die CD44v7-Expression beispielsweise in T-Lymphozyten aus gesundem Knochenmark im Mittel 1,67 %, in B-Lymphozyten 6,77 %, in Monozyten 57,95 % und in Granulozyten 68,95 %. Tendenziell waren die CD44-Varianten auf Monozyten und Granulozyten aus Peripherblut stärker exprimiert, gefolgt von mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Knochenmark, wo die niedrigste Expression der CD44-Varianten zu finden war. Teilweise waren die Schwankungen zwischen den verschiedenen Proben sehr hoch, was ein Hinweis auf hohe individuelle Unterschiede in der CD44v-Expression sein könnte. Generell betrachtet wurde aber die CD44v-Expression mit der Differenzierung hochreguliert und zwar in der myeloiden Linie stärker als in der lymphoiden. Die Bildung der Zellen der myeloiden Reihe erfolgt im Knochenmark während die Ausreifung der Zellen der lymphoiden Reihe in sekundären lymphatischen Organen stattfindet. Die unterschiedlich ausdifferenzierten Leukozyten im Knochenmark, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien befinden, exprimierten weniger CD44-Varianten, als die bereits ausdifferenzierten und ausgereiften Leukozyten im Peripherblut. Dass sich die Expression der CD44-Varianten während der Zelldifferenzierung ändert, konnten auch Ghaffari *et al.* für CD44v10 zeigen. Diese Variante wurde nur von einer kleinen Subpopulation von reifen CD34⁻ myeloiden Zellen exprimiert, wohingegen sie in CD34⁺ Zellen fast gar nicht exprimiert wurde (Ghaffari, Dougherty *et al.* 1995). Des Weiteren zeigten Legras *et al.*, dass CD44v6 in 12 % der CD34⁺ Zellen exprimiert wurde und dass während der Monopoese diese Variante stark hochreguliert wurde, im Vergleich zur Granulopoese, in der CD44v6 runterreguliert wurde (Legras, Gunthert *et al.* 1998).

Zum Abschluss wurden auch MSCs, nach Kultivierung in 3 verschiedenen Medien (PL, 7er und 6er), auf ihre CD44pan- und CD44v-Oberflächenexpression untersucht. Nahezu alle MSCs, die in 7er und 6er Medium kultiviert wurden, exprimierten CD44pan im Gegensatz zu nur 90 % der MSCs, die in PL-Medium kultiviert wurden. Dies zeigt, dass unterschiedliche Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf die

Eigenschaften der Zellen haben können. Die CD44-Varianten wurden in den MSCs aller 3 Medien kaum exprimiert (meist unter 1 %).

4.4 Heterogene CD44s- und CD44v -Expression in AML-Patienten auf mRNA- und Proteinebene

Analog zu den Untersuchungen in gesundem primärem Material wurden auch CD34⁺ und CD34⁻ Zellen, ALDH⁺ und ALDH⁻ Zellen, sowie ALDH⁺/CD34⁺ aus Knochenmark und Peripherblut von Patienten mit neudiagnostizierter AML auf ihre CD44s- bzw. CD44pan- und CD44v-Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Auf mRNA-Ebene fand man zunächst eine heterogene Expression der CD44-Varianten in CD34⁺ versus CD34⁻ und in ALDH⁺ versus ALDH⁻ Zellen zwischen verschiedenen AML-Proben. Teilweise war die Expression bis zu 8-fach (für CD44v7) erhöht zwischen den verschiedenen Proben. Wurde im Anschluss die Expression der CD44-Varianten in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut mit denen aus Knochenmark von AML-Patienten verglichen, fand man durchgehend eine Erhöhung der CD44-Varianten (CD44v7 36-fach) in den AML-Proben auf mRNA-Ebene. Hat man nun denselben Vergleich in ALDH⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und aus Knochenmark von AML-Patienten angestellt, zeigten sich im Mittel keine großen, sondern eher kleine und heterogene Unterschiede in der CD44v-Expression. Die starken Unterschiede in den CD34⁺ im Vergleich zu ALDH⁺ Zellen könnten dadurch erklärt werden, dass CD34⁺ Zellen in AML-Patienten myeloide Blasten sind, die die Fähigkeit zur vollständigen Ausdifferenzierung verloren haben. Sie sind aber differenzierter als CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und könnten daher eine höhere CD44v-Expression aufweisen.

Auf Proteinebene konnte man in ALDH⁺/CD34⁺ Zellen aus gesundem Knochenmark und von AML-Patienten eine etwa gleichhohe CD44pan-Expression finden. In ALDH⁺ Zellen aus AML-Patienten war sie jedoch 10 % niedriger als in gesundem Knochenmark. Jedoch war die Schwankungsbreite der CD44pan-Expression in ALDH⁺ Zellen aus verschiedenen AML-Patienten sehr groß und lag zwischen 36,7 und 100 %. In CD34⁺ Zellen aus Knochenmark von AML-Patienten war die mittlere CD44pan-Expression gleich im Vergleich zu gesundem Knochenmark, wobei aber auch hier die Schwankungsbreite zwischen verschiedenen AML-Patienten (zwischen 60 und 100 %) sehr groß war. Eine statistisch signifikante negative Korrelation

konnte zwischen der Menge an ALDH⁺ Zellen im Knochenmark und der Expression von CD44pan in ALDH⁺ Zellen in Patienten der zytogenetischen Hochrisikogruppe (n=12, Spearman $r=-0,8301$, $P=0,0008$) gefunden werden. Je mehr ALDH⁺ Zellen im Knochenmark vorkamen, desto niedriger war deren CD44pan-Expression. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass ein hoher Prozentsatz an ALDH⁺ Zellen in AML-Patienten mit einer signifikant schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit und mit ungünstigen zytogenetischen Faktoren korreliert (Ran, Schubert et al. 2009). Somit kann vermutet werden, dass eine niedrigere CD44pan-Expression in ALDH⁺ Zellen, die in Verbindung mit einer hohen Anzahl an ALDH⁺ Zellen in Patienten der cHRG gefunden wurde, ebenfalls auf einen schlechteren klinischen Verlauf hindeuten könnte. Demgegenüber zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Menge an CD34⁺ Blasten im Knochenmark und der Expression von CD44pan in CD34⁺ Blasten in Patienten der zytogenetischen Intermediärrisikogruppe (n=13, Spearman $r=0,5599$, $P=0,0466$). Je mehr CD34⁺ Blasten im Knochenmark vorkamen, desto höher war deren CD44pan-Expression. Dies verdeutlicht möglicherweise, dass die höhere CD44pan-Expression in CD34⁺ Blasten in Patienten der cIRG keinen Einfluss auf die klinische Prognose hat. Weiterhin könnte dies verdeutlichen, dass CD34 allein, im Gegensatz zu ALDH bzw. ALDH und CD34, nicht zur Charakterisierung von primitiven leukämischen Zellen geeignet ist, sondern eher eine Eigenschaft der leukämischen Blasten darstellt.

In der CD44v-Expression war in ALDH⁺ Zellen aus gesundem Knochenmark im Vergleich zu denen aus AML-Patienten, im Durchschnitt gesehen, kein Unterschied detektierbar. In CD34⁺ und ALDH⁺/CD34⁺ Zellen waren die CD44-Varianten im Knochenmark von AML-Patienten hingegen tendenziell erhöht. CD44v7 war auch hier die höchstexprimierte Variante, die wie die anderen Varianten, eine sehr hohe Schwankungsbreite zwischen den verschiedenen AML-Patienten zeigte, und niedriger, gleich hoch, höher oder viel höher exprimiert wurde, im Vergleich zum gesunden Knochenmark. Diese Ergebnisse haben dieselbe Tendenz wie die von Legras *et al.*, welche zeigen konnten, dass CD44v6 in AML-Patienten sehr heterogen exprimiert wurde und dass eine starke CD44v6-Expression (>20 %) mit einem kürzeren Überleben dieser Patienten korrelierte (Legras, Gunthert et al. 1998).

Eine statistisch signifikante negative Korrelation konnte zwischen der Menge an CD34⁺ Blasten im Knochenmark und der Expression von CD44v7 in den CD34⁺

Blasten gezeigt werden ($n=11$, Spearman $r=-0,7182$, $P=0,0128$). Je mehr $CD34^+$ Blasten im Knochenmark vorkamen, desto niedriger war deren $CD44v7$ -Expression. Eine Bedeutung von $CD44v7$ in AML konnten wir in langzeitüberlebenden, in NOD/SCID-Mäusen AML-induzierenden Zellen zeigen, die einen signifikanten Anstieg der $CD44v7$ -Expression aufwiesen (Schubert, Herbert et al. 2011). $ALDH^+$, $CD34^+$ und SDF aus AML-Patienten enthielten im Vergleich zu $ALDH^-$, $CD34^-$ und FDF mehr AML-induzierende Zellen und es konnten mehr humane Zellen nach 12 Wochen aus dem Knochenmark und der Milz der NOD/SCID-Mäuse gewonnen werden, die darüber hinaus eine höhere $CD44v7$ -Expression zeigten (Schubert, Herbert et al. 2011). Eine erhöhte $CD44v7$ -Expression nach Injektion von AML-induzierenden Zellen scheint einen Einfluss auf das Überleben dieser Zellen in NOD/SCID-Mäusen zu haben. Eine hohe $CD44v7$ -Expression in $ALDH^+$, $CD34^+$ und $ALDH^+/CD34^+$ Zellen könnte somit auch einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Prognose von AML-Patienten haben.

4.5 Mobilisierung mit G-CSF allein und in Kombination mit Plerixafor erhöht die $CD44v$ -Expression auf mRNA-Ebene

Zwei unterschiedliche Strategien zur Mobilisierung von HSCs aus dem Knochenmark ins periphere Blut wurden angewendet und es erfolgte die Quantifizierung von $CD44pan$ und den $CD44$ -Varianten in diesen mobilisierten Zellen mittels Real-time PCR. Zum einen wurden $CD34^+$ Zellen, die mittels G-CSF ins Peripherblut von gesunden Spendern mobilisiert wurden, mit denen aus Nabelschnurblut verglichen. Zum anderen wurden im Rahmen einer Phase IIIb Studie $ALDH^+$ und $CD34^+$ Zellen, die mit G-CSF und Plerixafor ins periphere Blut von Patienten mit Multiplem Myelom mobilisiert wurden, mit denen verglichen, die vor Plerixafor-, aber nach G-CSF-Gabe, ins periphere Blut der gleichen Patienten mobilisiert wurden.

In $CD34^+$ Zellen aus dem mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut war im Vergleich zu $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut sowohl die durchschnittliche $CD44pan$ - als auch die $CD44v$ -mRNA-Expression erhöht, wobei besonders die Erhöhung der $CD44v$ -Expression statistisch signifikant war. Auf Proteinebene war die $CD44v$ -Expression in $CD34^+$ Zellen aus mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut und Nabelschnurblut sehr niedrig (0,45 % bzw. 2,05 % für $CD44v7$). Demgegenüber war die $CD44v$ -Expression

in CD34⁺ Zellen aus Knochenmark wesentlich höher (8,24 % für CD44v7). Es ist also denkbar, dass die Mobilisierung mit G-CSF zu einer Verringerung der CD44v-Oberflächenexpression führt und dies zur Mobilisierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen beiträgt. Auf mRNA-Ebene wird anschließend die Expression der CD44-Varianten in einer Art negativen Rückkopplung hochreguliert, um die CD44-Varianten auf der Oberfläche der mobilisierten Vorläuferzellen wieder zu ersetzen.

Ein Teil der Ergebnisse aus der Phase IIIb Studie, bei der Zellen aus Patienten mit Multiplem Myelom mit G-CSF und Plerixafor mobilisiert wurden, wurde bereits veröffentlicht (Taubert, Saffrich et al. 2011). Da diese Ergebnisse nicht unmittelbar mit den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zusammenhängen, sollen sie an dieser Stelle nur kurz erwähnt werden. Nach Mobilisierung mit Plerixafor erhielt man höhere Prozentzahlen an ALDH⁺ und CD34⁺ Zellen sowie an den primitiveren ALDH⁺/CD34⁺/CD38⁻ und CD34⁺/CD38⁻ Subpopulationen, im Vergleich zur Mobilisierung mit G-CSF allein. Darüber hinaus exprimierten ALDH⁺ und CD34⁺ Zellen mehr CD133 nach Plerixaforgabe und es konnten mehr CXCR4⁺ Zellen detektiert werden nach Verabreichung von Plerixafor. In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die durch die Kombination aus G-CSF und Plerixafor mobilisierten Zellen auch funktionell einer primitiveren Subpopulation entsprechen (Fruehauf, Veldwijk et al. 2009). Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden, wie bereits erwähnt, ALDH⁺ und CD34⁺ Zellen nach G-CSF-, aber vor Plerixaforgabe, mit denen nach Plerixaforgabe im Hinblick auf ihre CD44pan- und CD44v-Expression auf mRNA-Ebene untersucht. In ALDH⁺ Zellen nach Plerixaforgabe fand man eine höhere CD44pan- und CD44v-Expression, im Vergleich zu vor Plerixafor- und nach G-CSF-Gabe, die im Falle der meisten CD44-Varianten statistisch signifikant war. CD34⁺ Zellen zeigten die gegenläufige Tendenz, also eine leichte Erniedrigung der CD44pan- und CD44v-Expression nach Plerixaforgabe, die aber aufgrund der teilweise sehr heterogenen Ergebnisse für die verschiedenen Patienten statistisch nicht signifikant war. Grund für diese zunächst gegensätzlich erscheinenden Ergebnisse, könnte die hohe Heterogenität innerhalb der CD34⁺ Zellpopulation sein. CD34⁺ Zellen bestehen aus einer Vielzahl verschieden primitiver Vorläuferzellen, die sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften und zwischen verschiedenen Patienten mit Multiplem Myelom stark voneinander unterscheiden können und so zu sehr heterogenen Ergebnissen führen können.

Demgegenüber steht die Anreicherung von hämatopoetischen Vorläuferzellen mithilfe ihrer ALDH-Aktivität, welche eine wichtige Rolle für ihre Stammzellfunktion spielt (Wang, Fang et al. 2001; Chute, Muramoto et al. 2006). ALDH⁺ Zellen scheinen somit, zumindest in Patienten mit Multiplem Myelom, eine homogenere Population von Zellen darzustellen und die erhaltenen Ergebnisse für diese Subpopulation zeigen nicht so starke Schwankungen im Vergleich zur CD34⁺ Subpopulation.

4.6 Kokultur mit MSCs führt zu einer Erhöhung der CD44v7-Expression und verstärkt Apoptose nach Ligation mit dem CD44-Antikörper A3D8

Unsere Arbeitsgruppe verwendet die Kokultur von MSCs und HSCs als Modell für die Stammzellnische. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kokulturversuche von MSCs und CD34⁺ Zellen durchgeführt, um den Einfluss von CD44 auf den Selbsterhalt und die Proliferation von CD34⁺ Zellen zu untersuchen. Dazu wurden CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut mit CFDA-SE gefärbt, was nach Bildung des fluoreszierenden CFSE die Analyse der einzelnen Zellteilungen ermöglichte. Im Anschluss wurden die Zellen mit oder ohne MSCs für 7 Tage kultiviert. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Detektion von CD34, CD11b, CD44pan und den CD44-Varianten in den einzelnen Zellteilungen. Zusätzlich zu diesen Versuchen wurden auch Kokulturversuche nach Zugabe von Antikörpern gegen CD44pan (A3D8) und CD44v7 durchgeführt, um eine mögliche Bedeutung von CD44 für die Prozesse in der Stammzellnische zu untersuchen.

Die CD44pan-Expression unterschied sich in den verschiedenen Zellteilungen zwischen Kultur mit oder ohne MSCs nicht voneinander und war in jeder Zellteilung durchgehend sehr hoch. Die CD34-Expression nahm mit zunehmender Zellteilung ab, doch war diese Abnahme in Zellen, die mit MSCs kultiviert wurden, langsamer und sie blieben länger CD34⁺. CD11b und CD44v7 wurden in Zellen, die sich kaum geteilt haben, wenig exprimiert, die Expression dieser beiden Moleküle nahm aber mit zunehmender Zellteilung zu und war in den mit MSCs kokultivierten Zellen höher. Zellen, die sich viel geteilt und differenziert haben, verloren ihre CD34-Expression, gleichzeitig begannen sie CD11b, CD44v7 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Demgegenüber standen Zellen, die sich selten geteilt haben, ihre CD34-Expression

behielten und keine CD11b- und CD44v7-Expression zeigten. Die Expression der anderen CD44-Varianten war niedriger als die von CD44v7, wobei auch hier mit zunehmender Zellteilung und Differenzierung eine Zunahme der Expression zu finden war. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für CD44v7 war die Expression der anderen CD44-Varianten in der Kokultur mit MSCs jedoch nicht erhöht. Im Falle von CD44v5 war sie sogar geringer, als ohne MSCs.

Betrachtete man nun die Gesamtexpression von CD44pan, CD34, CD11b und CD44v7 und nicht die Expression in den einzelnen Zellteilungen, so war eine hohe Heterogenität vor allem in der CD34-, CD11b- und CD44v7-Expression zwischen den verschiedenen Experimenten, sowohl in Zellen, die mit als auch die ohne MSCs kultiviert wurden, zu finden. In den meisten Versuchen war eine höhere Expression von CD34, CD11b und CD44v7 in Zellen detektierbar, die mit MSCs kultiviert wurden, im Unterschied zu einer unveränderten CD44pan-Expression. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Kokultur mit MSCs den Selbsterhalt, aber auch die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen fördert. Diese Ergebnisse konnten bereits teilweise durch Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (Walenda, Bork et al. 2010). Darüber hinaus deuten die erhaltenen Ergebnisse daraufhin, dass die Expression der CD44-Varianten, neben CD11b, ein Marker für die Differenzierung der Zellen ist.

Natürlich gab es in diesem *in vitro*-Kokultursystem Limitationen, die zu den teilweise hohen Schwankungen der Ergebnisse innerhalb der verschiedenen Versuche geführt haben. Zum einen könnten die verwendeten CD34⁺ Zellen und die MSCs, die immer von anderen Spendern kamen, eine Ursache dafür sein und zum anderen die Kultivierung dieser Zellen in Kulturmedium und im Brutschrank. Im Rahmen dieser Versuche konnten, aufgrund der geringen Verfügbarkeit von gesundem Knochenmark, nur CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut untersucht werden. Ob sich die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Quellen für hämatopoetische Vorläuferzellen voneinander unterscheiden hätten, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Zumindest zeigten die CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut dieselben Tendenzen.

Als nächstes erfolgte die Kokultur von MSCs und CD34⁺ Zellen zusammen mit Antikörpern gegen CD44pan (A3D8) und CD44v7. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass A3D8 die terminale Differenzierung in den AML-Zelllinien THP-1, HL-60 und NB-4 induzierte und deren Proliferation inhibierte (Charrad, Gadhoun et al. 2002). Darüber hinaus induzierte A3D8 Apoptose in THP-1, HL-60 und verstärkt in NB-4 (Charrad, Gadhoun et al. 2002). Über die Wirkung von anti-CD44v7 ist bislang wenig bekannt, eine eventuell blockierende Wirkung wird aber vermutet. Zunächst wurden die Antikörper in NB-4 getestet und es konnte bestätigt werden, dass A3D8 in NB-4 nach 3 Tagen verstärkt Apoptose induzierte, wohingegen anti-CD44v7 keinen Effekt zeigte, im Vergleich zur Kontrolle. Wurden die NB-4 zusätzlich mit ZVAD-FMK, einem generellen Caspase-Inhibitor, inkubiert, konnte die apoptotische Wirkung von A3D8 abgeschwächt und somit gezeigt werden, dass Caspasen an den apoptotischen Signalwegen in NB-4 beteiligt sind. Die gleichen Ergebnisse konnten auch von Maquarre *et al.* gezeigt werden (Maquarre, Artus et al. 2005).

Im Folgenden erfolgte nun die Inkubation von A3D8 und anti-CD44v7 in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, mit und ohne Kokultur. Für die Kokultur mit den MSCs wurden die CD34⁺ Zellen im Insert von Transwells mit sehr kleiner Porengröße kultiviert, um den Einfluss löslicher, von den MSCs ausgeschütteter Mediatoren auf die CD34⁺ Zellen zu untersuchen. Vorversuche haben gezeigt, dass die erhaltenen Effekte durch A3D8 unabhängig davon waren, ob die Zellen im Insert oder mit direktem Kontakt zu den MSCs kultiviert wurden, was darauf hindeutete, dass die Effekte durch die ausgeschütteten Mediatoren verursacht wurden. Wie auch in NB-4 hatte die Kultivierung mit anti-CD44v7 in CD34⁺ Zellen keinen Effekt auf das Überleben der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Nach Inkubation mit A3D8 waren weniger lebende Zellen detektierbar als in der Kontrolle, aber der Effekt war bei weitem nicht so stark wie nach der gemeinsamen Kultivierung von CD34⁺ Zellen, MSCs und A3D8: sowohl in CD34⁺ als auch CD34⁻ Zellen waren statistisch signifikant weniger lebende und signifikant mehr frühapoptotische Zellen zu finden, als in der unbehandelten Kontrolle. Der Effekt war aber in CD34⁻ Zellen wesentlich stärker als in CD34⁺. Dennoch war die A3D8-Inkubation weniger toxisch für die primären Zellen im Vergleich zu NB-4. Dies wurde auch dadurch deutlich, dass die CD34⁺ Zellen viel länger mit A3D8 kultiviert wurden (7 Tage im Vergleich zu 3 Tagen

in NB-4). In der Kokultur mit MSCs führte aber die A3D8-Behandlung zu einer starken Verringerung lebender Zellen vor allem der CD34⁻, also differenzierteren Zellen. Dieser Effekt war unabhängig vom Zellkontakt mit den MSCs und wurde durch lösliche von den MSCs ausgeschütteten Mediatoren vermittelt. Die Menge an CD34⁺ Zellen war nach Inkubation mit A3D8 um 10 % höher als in den Kontrollen. Auch dies ist ein Hinweis dafür, dass die A3D8-Inkubation für CD34⁻ Zellen weitaus toxischer war, als für CD34⁺.

In der Kultur ohne MSCs konnte die Zugabe von ZVAD-FMK, sowohl bei CD34⁺ als auch bei CD34⁻ Zellen, die apoptotische Wirkung von A3D8 abschwächen (in CD34⁺ Zellen 15 %, in den CD34⁻ Zellen 11 % mehr lebende Zellen). Dies spricht dafür, dass auch in primären Zellen Caspasen an den apoptotischen Signalwegen, die durch A3D8 induziert wurden, beteiligt waren. In der Kokultur mit MSCs zeigte die Zugabe von ZVAD-FMK nur einen geringen Effekt. Dies könnte ein Hinweis für die Beteiligung weiterer apoptotischer Signalwege sein, genauso wie die Tatsache, dass ZVAD-FMK auch in Zellen, die ohne MSCs kultiviert wurden, die apoptotische Wirkung von A3D8 zwar reduzieren, aber nicht vollständig beseitigen konnte. Denkbar wäre beispielsweise der Serin-Protease-Signalweg, deren Beteiligung an der A3D8 induzierten Apoptose in NB-4 bereits beschrieben wurde (Maquarre, Artus et al. 2005).

Die Wirkung von A3D8 wurde auch in CD34⁺ Zellen aus gesundem Knochenmark und von Patienten mit AML untersucht. Auch in diesen Zellen konnte der apoptotische Effekt von A3D8 beobachtet werden, der in den CD34⁺ Zellen aus Knochenmark und aus Nabelschnurblut in der gleichen Größenordnung lag. In den CD34⁺ Zellen aus einem AML-Patienten war, im Vergleich zu denen aus Nabelschnurblut, eine verstärkte apoptotische Wirkung von A3D8 detektierbar. Da aber aufgrund der geringen Verfügbarkeit nur einzelne Proben untersucht werden konnten, muss auf eine genaue Beurteilung dieser Ergebnisse jedoch verzichtet werden. Dennoch deuten die Ergebnisse daraufhin, dass der apoptotische Effekt von A3D8 in leukämischen Zellen aus primärem Material und Zelllinien stärker war, als in gesunden primären Zellen.

Neben A3D8 wurde auch der Einfluss von anti-CD44v7 auf das Überleben von NB-4 und hämatopoetischen Vorläuferzellen mit und ohne Kokultur untersucht. Dieser

Antikörper zeigte aber, im Gegensatz zu A3D8, keinen Einfluss auf die Anzahl lebender Zellen in beiden Zelltypen. Es konnte aber eine signifikante Erhöhung der p27-Expression (14,54 %), im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (3,23 %) in NB-4 nach Inkubation mit anti-CD44v7 detektiert werden. Eine Stabilisierung von p27, dem Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p27^{Kip1}, wurde bereits in NB-4, THP-1, KG-1a, HL-60 und primären leukämischen Zellen nach A3D8-Behandlung gefunden und verursachte einen Zellwachstumsarrest, also eine Inhibierung der Zellproliferation (Gadhoum, Leibovitch et al. 2004). Wurden nun die NB-4 gleichzeitig mit anti-CD44v7 und dem generellen Caspase-Inhibitor ZVAD-FMK inkubiert, konnte keine Erhöhung der p27-Expression im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Zwar wurde durch die anti-CD44v7-Behandlung in NB-4 keine Apoptose in den Zellen induziert, dennoch kam es aber zu einer Erhöhung der p27-Expression durch die Beteiligung von Caspasen.

In NB-4, die mit A3D8 inkubiert wurden, und in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut konnte die p27-Expression nicht gemessen werden. In NB-4 war die Ursache hierfür wahrscheinlich die noch an den Zellen haftenden A3D8-Moleküle und in CD34⁺ Zellen CD34-Antikörper, mit denen die Zellen angereichert wurden, und die vom sekundären Antikörper, der eigentlich nur den ungekoppelten p27-Antikörper binden sollte, detektiert wurden. Die Messung von p27 mittels Westernblot konnte aufgrund der zu geringen Zellzahlen nicht durchgeführt werden. In weiteren Versuchen muss nun der Einfluss von A3D8 und anti-CD44v7 auf p27 in primären Zellen untersucht werden.

4.7 Kokultur mit Hyaluronsäure führt zu einer Erhöhung der CD34-Expression und inhibiert die Migration von HSCs

Da Hyaluronsäure ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und der Stammzellnische ist und darüber hinaus ein wichtiger Ligand von CD44, wurde mittels Kokulturversuchen der Einfluss der CD44-Hyaluronsäure-Interaktion auf den Selbsterhalt, die Proliferation und die CD44-Expression von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und mit G-CSF mobilisiertem Peripherblut untersucht. Nach 7 Tagen Kokultur von CD34⁺ Zellen mit Hyaluronsäure, die entweder in Suspension oder an den Boden des Kulturgefäßes gebunden war, erfolgte die Analyse der

Oberflächenexpression von CD34, CD11b, CD44pan und CD44v. Die CD44pan-Expression unterschied sich nicht zwischen Kultur mit und ohne Hyaluronsäure. Diese Ergebnisse waren analog zu denen nach Kokultur mit MSCs. Die CD44-Varianten waren generell nur sehr schwach exprimiert und ihre Expression unterschied sich kaum zwischen Kokultur mit und ohne Hyaluronsäure. Die CD34- und CD11b-Expression war in den Zellen, die mit Hyaluronsäure in Suspension kultiviert wurden, höher im Vergleich zu den Zellen, die ohne bzw. mit zuvor beschichteter Hyaluronsäure inkubiert wurden. Direkter Kontakt zwischen CD34⁺ Zellen und Hyaluronsäure in Suspension hat, ähnlich wie bei der Kokultur mit MSCs, den Selbsterhalt und die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen gefördert. Dabei war das 3-dimensionale Geflecht, das die CD34⁺ Zellen und die Hyaluronsäure in Suspension gebildet haben, Voraussetzung für die gefundenen Effekte, da diese nicht beobachtet werden konnten, wenn nur der Boden mit Hyaluronsäure beschichtet wurde. Wie auch bei den Kokulturversuchen mit MSCs schwankte die CD34-Expression in allen Kulturbedingungen teilweise stark zwischen den Versuchen, was, wie bereits unter 4.6 erwähnt, auf die artifiziellen Bedingungen der *in vitro*-Kultur zurückgeführt werden kann.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die Interaktion von Hyaluronsäure mit den CD34⁺ Zellen einen Einfluss auf das Migrationsverhalten dieser Zellen hat. Zu diesem Zweck wurden Transwell-Inserts verwendet, deren Membran mit Hyaluronsäure beschichtet wurde. Deutlich weniger CD34⁺ Zellen, etwa die Hälfte, migrierten durch die mit Hyaluronsäure beschichteten Membranen in Richtung MSCs und deren ausgeschütteten Zytokinen, im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle.

Die aus den Kokultur- und Migrationsversuchen erhaltenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass auch die Interaktion zwischen hämatopoetischen Vorläuferzellen und Hyaluronsäure wichtig sein könnte, für die Regulation der Eigenschaften der HSCs in ihrer Nische, und dass nicht nur zelluläre Bestandteile dabei eine wichtige Rolle spielen. Nilsson *et al.* konnten zeigen, dass sowohl murine als auch humane hämatopoetische Vorläuferzellen Hyaluronsäure exprimieren und dass diese Expression wichtig war für die hämatologische Rekonstitution nach Transplantation von hämatopoetischen Vorläuferzellen in letal bestrahlte Mäuse. Darüber hinaus regulierte die Hyaluronsäure die Proliferation und die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen (Nilsson, Haylock et al. 2003). In weiteren

Versuchen muss nun geklärt werden, wie wichtig die Interaktion mit CD44 in diesem Zusammenhang ist.

4.8 Kein direkter Einfluss von Antikörpern gegen CD44pan und CD44v auf die Adhäsion von leukämischen Zelllinien und HSCs an MSCs

Um einen möglichen Einfluss von Antikörpern gegen CD44pan- (A3D8) und die CD44-Varianten (anti-v3, v4, v5, v6 und v7) auf die Adhäsion von leukämischen Zelllinien und CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut an MSCs und Hyaluronsäure zu untersuchen, wurden insgesamt 2 Adhäsionsassays verwendet, die beide in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurden (Wagner, Wein et al. 2007; Zepeda-Moreno, Taubert et al. 2011). Mithilfe des Objektträgerassays (Wagner, Wein et al. 2007) konnten auch Objektträger, die speziell mit Hyaluronsäure beschichtet wurden, für die Adhäsionsversuche verwendet werden. Im Gegensatz dazu hatte das 96-Well-Assay (Zepeda-Moreno, Taubert et al. 2011) den Vorteil, dass wirklich nur vitale Zellen mithilfe eines colorimetrischen Assays quantifiziert und analysiert wurden. Die leukämische Zelllinie KG-1a wurde für diese Versuche als Modell für sehr primitive leukämische Zellen verwendet, da diese Zellen CD34 auf ihrer Oberfläche exprimieren und so den leukämischen Gegenspieler zu den gesunden CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut darstellen.

Zunächst wurde die Grundadhäsion von KG-1a und Jurkat an Hyaluronsäure untersucht. Dabei war die Anzahl der haftenden KG-1a und Jurkat insgesamt sehr gering, aber dennoch in KG-1a deutlich höher als in Jurkat. Diese deutlichen Unterschiede in der Adhäsion an Hyaluronsäure zwischen beiden leukämischen Zelllinien können durch das Vorhandensein von CD44 auf der Oberfläche von KG-1a, im Gegensatz zum Fehlen von CD44 in Jurkat erklärt werden.

Kurzzeitinkubation mit Antikörpern gegen CD44pan (A3D8) und CD44v3, v4, v5, v6 und v7 hatte in KG-1a keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion an MSCs. Auch in CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut hatte die Kurzzeitinkubation mit A3D8 und anti-CD44v7 keinen Effekt auf die Adhäsion dieser Zellen an MSCs. Hingegen zeigte die Langzeitinkubation mit A3D8 für 23 h, sowohl in KG-1a als auch in CD34⁺ Zellen, deutliche Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle: signifikant mehr KG-1a

adhärierten an MSCs im Gegensatz zu signifikant weniger CD34⁺ Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Diese Ergebnisse deuten auf einen indirekten Effekt von A3D8 auf die Adhäsion hin, der anscheinend gegensätzlich ist zwischen leukämischen und gesunden Zellen. Es ist möglich, dass verschiedene Signalwege in leukämischen und gesunden Zellen durch A3D8 aktiviert werden und dadurch unterschiedliche Effekte ausgelöst werden können. H90 und A3D8, beides Antikörper gegen CD44, scheinen an dasselbe Epitop von CD44 zu binden, da ähnliche Effekte für beide Antikörper in der Literatur beschrieben wurden. Sie induzierten beispielsweise die terminale Differenzierung in den leukämischen Zelllinien THP-1, NB-4 und HL-60 (Charrad, Gadhoul et al. 2002). H90 konnte darüber hinaus auch die leukämische Repopulation von LSCs aus AML-Patienten in NOD/SCID-Mäusen reduzieren und deren Differenzierung induzieren, während der Antikörper auf gesunde hämatopoetische Vorläuferzellen keinen Effekt hatte (Jin, Hope et al. 2006). Es ist daher denkbar, dass A3D8, ähnlich wie H90, unterschiedliche Effekte auf gesunde und leukämische Zellen z.B. im Hinblick auf die Adhäsion haben könnte. Dafür sprechen auch die unterschiedlich starke apoptotische Wirkung von A3D8 auf leukämische und gesunde Zellen, die unter 4.6 bereits diskutiert wurde. Diese unterschiedlichen Effekte, die für die Adhäsion gefunden wurden, könnten in einer Hoch- bzw. Runterregulation von CD44 und/oder anderen Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche bestanden haben, die dann zu einer höheren bzw. niedrigeren Adhäsion an MSCs führte. Denkbar ist auch, dass die erhöhte Adhäsion in KG-1a durch eine Aktivierung von CD44 verursacht wurde, die in den CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut nicht zu finden war. Dass CD44 aber an der Adhäsion von HPCs und KG-1a an MSCs beteiligt ist, konnte unsere Arbeitsgruppe zum einen durch die Lokalisation von CD44 an der Kontaktstelle der HPC mit der MSC zeigen und zum anderen dadurch, dass durch Zugabe von einem CD44-Antikörper (clone DF1485) die Adhäsion von KG-1a und HPCs an MSCs direkt und signifikant reduziert werden konnte (Wagner, Wein et al. 2008). Die Verwendung eines anderen Antikörpers gegen CD44 (clone G44-26) hatte keinen Effekt auf die Adhäsion von KG-1a an MSCs und durch einen dritten Antikörper gegen CD44 (clone BU52) war die Adhäsion von KG-1a an MSCs sogar höher im Vergleich zur Kontrolle (Wagner, Wein et al. 2008). Ähnliche Ergebnisse von Oostendorp *et al.* zeigten, dass Antikörper, die in der globulären Region von CD44 binden, die Adhäsion von

erythroiden und granulozytären Progenitoren an Stroma verstärken konnten, wohingegen Antikörper, die an andere Regionen von CD44 binden, die Adhäsion dieser Zellen reduzierten (Oostendorp, Spitzer et al. 1998).

A3D8 zeigte im Gegensatz dazu keinen direkten Effekt auf die Adhäsion, da dieser Antikörper wahrscheinlich ein Epitop von CD44 bindet, das nicht für die Interaktion mit den MSCs, sondern eventuell für die Signaltransduktion in die Zelle von Bedeutung ist.

4.9 Scherströmung induziert Adhäsion und Rolling von CD44-exprimierenden leukämischen Zelllinien und HSCs an Hyaluronsäure

Um den Einfluss der CD44-Hyaluronsäure-Interaktion in leukämischen Zelllinien und CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut zu untersuchen, wurden zunächst statische Adhäsionsassays von KG-1a und Jurkat an Hyaluronsäure durchgeführt. In diesen Assays konnte, trotz insgesamt geringer Menge an adhären Zellen, eine deutlich höhere Adhäsion von KG-1a, welche CD44 exprimieren, im Gegensatz zu Jurkat, welche kein CD44 exprimieren, gefunden werden. Um nun näher beurteilen zu können, welche Rolle CD44 für die Adhäsion an Hyaluronsäure in leukämischen Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen spielt, war die Verwendung des statischen Adhäsionsassays, aufgrund der geringen Grundadhäsion ungeeignet. Weiterhin konnte auch die Bedeutung der Scherströmung auf die CD44-Hyaluronsäure-Interaktion, welche bereits in der Literatur beschrieben wurde (Clark, Alon et al. 1996; DeGrendele, Estess et al. 1996), mit diesem Assay nicht untersucht werden. Aus diesen Gründen wurde ein Mikrofluidiksystem verwendet, welches im Institut für angewandte physikalische Chemie in Heidelberg entwickelt wurde (Christophis, Grunze et al. 2010).

In den ersten Experimenten, die mit KG-1a und Jurkat durchgeführt wurden und in denen nach zunächst statischer Inkubation ein logarithmisch ansteigender Fluss angelegt wurde, konnte gezeigt werden, dass Jurkat nur eine sehr geringe Adhäsionsstärke an Hyaluronsäure zeigten ($\tau_{50}=0,06 \text{ dyn/cm}^2$), im Vergleich zu KG-1a ($\tau_{50}=5,17 \text{ dyn/cm}^2$). Die Scherströmung induzierte in KG-1a die Haftung und das Rolling an Hyaluronsäure, was durch einen Anstieg der adhären KG-1a mit

steigender Scherströmung ($>0,2 \text{ dyn/cm}^2$), bis zu einem Maximalwert adhärenter Zellen bei 1 dyn/cm^2 , gezeigt werden konnte. Bei höheren Scherströmungen wurden die adhärenenten KG-1a abgelöst.

Als nächstes wurde getestet, ob die Zugabe von A3D8 bzw. anti-CD44v7 einen Einfluss auf die durch Scherströmung induzierte Adhäsion von KG-1a an Hyaluronsäure hatte, indem ein konstantes Flussassay mit $0,175$ bzw. $0,25 \text{ dyn/cm}^2$ verwendet wurde. Nach Inkubation der KG-1a mit anti-CD44v7 konnten keinerlei Unterschiede in der Anzahl haftender Zellen im Vergleich zur Kontrolle gefunden werden. Anti-CD44v7 hatte somit weder einen direkten noch einen indirekten Effekt auf die Adhäsion an Hyaluronsäure. Diese Resultate bestätigten die Ergebnisse aus den statischen Adhäsionsassays. Die Kurzzeitinkubation von KG-1a mit A3D8 hatte ebenfalls keinen Effekt. Demgegenüber hatte eine 24-stündige A3D8-Inkubation eine leichte Erhöhung der anhaftenden Zellen an Hyaluronsäure zur Folge. Diese Ergebnisse zeigten die gleichen Tendenzen nach 24-stündiger Inkubation mit A3D8, die für die Adhäsion von KG-1a an MSCs gefunden wurden. A3D8 zeigte also auch hier keinen direkten Effekt auf die Adhäsion. Es ist also wahrscheinlich, dass A3D8 an ein Epitop von CD44 bindet, welches weder für die Adhäsion an MSCs noch für die an Hyaluronsäure von Bedeutung ist. Mögliche alternative Effekte, die durch die A3D8-Inkubation in KG-1a induziert wurden, wurden bereits unter 4.8 diskutiert.

Im nächsten Experiment wurde getestet, ob sich leukämische Zelllinien, die sich anhand ihrer CD44-Expression unterscheiden, auch im Hinblick auf die durch Scherströmung induzierte Adhäsion an Hyaluronsäure unterscheiden. Mithilfe eines konstanten Flussassays mit einer Scherströmung von $\sim 0,2 \text{ dyn/cm}^2$, wurden KG-1a und HL-60 als leukämische Zelllinien mit einer sehr hohen CD44-Expression verwendet. Darüber hinaus wurden K-562, die eine sehr heterogene CD44-Expression zeigten und Jurkat und Kasumi-1, die keinerlei CD44-Expression aufwiesen, untersucht. Leukämische Zelllinien, die CD44 exprimierten (HL-60, KG-1a und K-562), hafteten an Hyaluronsäure aus dem Fluss, im Gegensatz zu Kasumi-1 und Jurkat, die kein CD44 exprimierten und nicht an Hyaluronsäure hafteten. Dabei war die Anzahl haftender Zellen in HL-60 am höchsten, gefolgt von KG-1a und K-562. Ursachen dafür, dass mehr HL-60 im Vergleich zu KG-1a an Hyaluronsäure gehaftet haben, obwohl beide eine ähnlich starke CD44-Expression zeigten, gibt es viele. Eventuell kam es durch die größere Zellgröße von HL-60 zu einer verstärkten

Flussaktivierung und somit zu einer höheren Anhafrate. Des Weiteren könnten auch der Aktivierungszustand und posttranslationale Modifikationen von CD44 in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass nicht alle Zellen, die CD44 exprimierten, an Hyaluronsäure hafteten und dass durch Behandlung mit speziellen Antikörpern gegen CD44 die Bindung an Hyaluronsäure induziert werden konnte (Lesley, Kincade et al. 1993).

Zusätzlich zu den leukämischen Zelllinien wurden auch CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut, die durchgehend eine hohe CD44s-Expression zeigten, auf ihre Haftung an Hyaluronsäure untersucht. Sie zeigten eine niedrigere Anhaftung an Hyaluronsäure im Vergleich zu KG-1a, doch mit zunehmender Scherströmung adhärten und rollten mehr CD34⁺ Zellen auf Hyaluronsäure und lösten sich erst bei einer relativ hohen Scherströmung von 2,17 dyn/cm² ab. Somit zeigten auch CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut eine durch Scherströmung induzierte Adhäsion an Hyaluronsäure. Aufgrund der viel geringeren Zellzahl, die man im Vergleich zu leukämischen Zelllinien zur Verfügung hatte, konnten aber nicht alle Experimente mit CD34⁺ Zellen wiederholt werden. Ob die gefundenen Unterschiede in der Anzahl haftender Zellen an Hyaluronsäure zwischen leukämischen und gesunden Zellen einen Einfluss auf ihre Eigenschaften im Körper haben könnten, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden und bedarf weiterer Experimente.

Mit diesen Versuchen konnte aber gezeigt werden, dass sowohl leukämische Zelllinien, als auch hämatopoetische Vorläuferzellen, die CD44 auf ihren Zelloberflächen exprimierten, eine Scherstrom-vermittelte Adhäsion und Rolling ab 0,2 dyn/cm² an Hyaluronsäure zeigten, im Gegensatz zu Zellen, die kein CD44 exprimierten. Dies demonstriert, dass nicht nur Lymphozyten eine CD44-vermittelte Adhäsion und Rolling an Hyaluronsäure zeigen (Clark, Alon et al. 1996; DeGrendele, Estess et al. 1996). Darüber hinaus wurde ebenfalls beschrieben, dass die CD44-Hyaluronsäure-Interaktion wichtig ist für das Homing und Engraftment von hämatopoetischen Vorläuferzellen in das Knochenmark und die Milz von NOD/SCID-Mäusen (Avigdor, Goichberg et al. 2004) und es kann vermutet werden, dass dabei die beobachtete Scherstrom-induzierte Adhäsion eine Rolle spielen könnte.

Die gefundene Scherstrom-abhängige Interaktion von CD44 und Hyaluronsäure ist ähnlich der, die man beim Rolling und der Adhäsion von Leukozyten durch Selektine

gefunden hat (Finger, Puri et al. 1996; Lawrence, Kansas et al. 1997). Die maximale Adhäsion von KG-1a und die maximale Rollinggeschwindigkeit von 15 $\mu\text{m/s}$, die bei etwa 1 dyn/cm^2 gefunden werden konnte und die lineare Korrelation zwischen der Rollinggeschwindigkeit und der Scherströmung, die oberhalb von 1 dyn/cm^2 gesättigt war, sind in derselben Größenordnung wie die Werte, die für das Selektin-abhängige Leukozytenrolling gefunden werden konnten (Finger, Puri et al. 1996; Zhu, Yago et al. 2008). Dies spricht dafür, dass biologische Prozesse, beispielsweise Entzündungsantworten und das Homing und Engraftment von Zellen, durch ähnliche Mechanismen im Körper reguliert werden.

In weiteren Versuchen muss nun eindeutig bewiesen werden, dass tatsächlich CD44 für diese Scherstrom-induzierte Adhäsion und Rolling von leukämischen Zelllinien und hämatopoetischen Vorläuferzellen an Hyaluronsäure verantwortlich ist. Zu diesem Zweck sollen weitere Antikörper gegen CD44, für welche die blockierende Wirkung im Hinblick auf die Hyaluronsäurebindung bereits beschrieben wurde, verwendet werden. Darüber hinaus ist geplant, KG-1a mit shRNA gegen CD44 zu transfizieren, um die CD44-Moleküle auf der Oberfläche dieser Zellen zu beseitigen und so die Interaktion mit Hyaluronsäure zu unterbrechen. Zusätzlich soll in Jurkat die CD44-Expression mithilfe einer Transfektion mit CD44-cDNA induziert und damit auch die Adhäsion an Hyaluronsäure hervorgerufen werden.

5 Literaturverzeichnis

- Akisik, E., Bavbek, S. and Dalay, N. (2002). "CD44 variant exons in leukemia and lymphoma." Pathol Oncol Res **8**(1): 36-40.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. and Seed, B. (1990). "CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate." Cell **61**(7): 1303-1313.
- Avigdor, A., Goichberg, P., Shvitiel, S., Dar, A., Peled, A., Samira, S., Kollet, O., HersHKoviz, R., Alon, R., Hardan, I., Ben-Hur, H., Naor, D., Nagler, A. and Lapidot, T. (2004). "CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow." Blood **103**(8): 2981-2989.
- Bajorath, J., Greenfield, B., Munro, S. B., Day, A. J. and Aruffo, A. (1998). "Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site." Journal of Biological Chemistry **273**: 338-343.
- Banerji, S., Day, A. J., Kahmann, J. D. and Jackson, D. G. (1998). "Characterization of a functional hyaluronan-binding domain from the human CD44 molecule expressed in Escherichia coli." Protein Expr Purif **14**(3): 371-381.
- Bates, R. C., Edwards, N. S., Burns, G. F. and Fisher, D. E. (2001). "A CD44 survival pathway triggers chemoresistance via lyn kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt in colon carcinoma cells." Cancer Res **61**(13): 5275-5283.
- Bendall, L. J., Bradstock, K. F. and Gottlieb, D. J. (2000). "Expression of CD44 variant exons in acute myeloid leukemia is more common and more complex than that observed in normal blood, bone marrow or CD34+ cells." Leukemia **14**(7): 1239-1246.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. and Sultan, C. (1982). "Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes." Br J Haematol **51**(2): 189-199.
- Bennett, K. L., Modrell, B., Greenfield, B., Bartolazzi, A., Stamenkovic, I., Peach, R., Jackson, D. G., Spring, F. and Aruffo, A. (1995). "Regulation of CD44 binding to hyaluronan by glycosylation of variably spliced exons." J Cell Biol **131**(6 Pt 1): 1623-1633.
- Brown, T. A., Bouchard, T., St John, T., Wayner, E. and Carter, W. G. (1991). "Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons." J Cell Biol **113**(1): 207-221.
- Camp, R. L., Kraus, T. A. and Pure, E. (1991). "Variations in the cytoskeletal interaction and posttranslational modification of the CD44 homing receptor in macrophages." J Cell Biol **115**(5): 1283-1292.
- Charrad, R. S., Gadhoum, Z., Qi, J., Glachant, A., Allouche, M., Jasmin, C., Chomienne, C. and Smadja-Joffe, F. (2002). "Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines." Blood **99**(1): 290-299.
- Cheung, A. M., Wan, T. S., Leung, J. C., Chan, L. Y., Huang, H., Kwong, Y. L., Liang, R. and Leung, A. Y. (2007). "Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential." Leukemia **21**(7): 1423-1430.
- Christ, O., Lucke, K., Imren, S., Leung, K., Hamilton, M., Eaves, A., Smith, C. and Eaves, C. (2007). "Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity." Haematologica **92**(9): 1165-1172.

- Christophis, C., Grunze, M. and Rosenhahn, A. (2010). "Quantification of the adhesion strength of fibroblast cells on ethylene glycol terminated self-assembled monolayers by a microfluidic shear force assay." Phys Chem Chem Phys **12**(17): 4498-4504.
- Chute, J. P., Muramoto, G. G., Whitesides, J., Colvin, M., Safi, R., Chao, N. J. and McDonnell, D. P. (2006). "Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(31): 11707-11712.
- Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F. and Shaper, J. H. (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." J Immunol **133**(1): 157-165.
- Clark, R. A., Alon, R. and Springer, T. A. (1996). "CD44 and hyaluronan-dependent rolling interactions of lymphocytes on tonsillar stroma." J Cell Biol **134**(4): 1075-1087.
- Cooper, D. L., Dougherty, G., Harn, H. J., Jackson, S., Baptist, E. W., Byers, J., Datta, A., Phillips, G. and Isola, N. R. (1992). "The complex CD44 transcriptional unit; alternative splicing of three internal exons generates the epithelial form of CD44." Biochem Biophys Res Commun **182**(2): 569-578.
- Cozzio, A., Passegue, E., Ayton, P. M., Karsunky, H., Cleary, M. L. and Weissman, I. L. (2003). "Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors." Genes Dev **17**(24): 3029-3035.
- Culty, M., Nguyen, H. A. and Underhill, C. B. (1992). "The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan." J Cell Biol **116**(4): 1055-1062.
- Day, A. J. and Sheehan, J. K. (2001). "Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation." Curr Opin Struct Biol **11**(5): 617-622.
- DeGrendele, H. C., Estess, P., Picker, L. J. and Siegelman, M. H. (1996). "CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway." J Exp Med **183**(3): 1119-1130.
- Deguchi, T. and Komada, Y. (2000). "Homing-associated cell adhesion molecule (H-CAM/CD44) on human CD34+ hematopoietic progenitor cells." Leuk Lymphoma **40**(1-2): 25-37.
- Devine, S. M., Flomenberg, N., Vesole, D. H., Liesveld, J., Weisdorf, D., Badel, K., Calandra, G. and DiPersio, J. F. (2004). "Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma." J Clin Oncol **22**(6): 1095-1102.
- Dick, J. E. (2008). "Stem cell concepts renew cancer research." Blood **112**(13): 4793-4807.
- DiPersio, J. F., Stadtmauer, E. A., Nademanee, A., Micallef, I. N., Stiff, P. J., Kaufman, J. L., Maziarz, R. T., Hosing, C., Fruehauf, S., Horwitz, M., Cooper, D., Bridger, G. and Calandra, G. (2009). "Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma." Blood **113**(23): 5720-5726.
- Droll, A., Dougherty, S. T., Chiu, R. K., Dirks, J. F., McBride, W. H., Cooper, D. L. and Dougherty, G. J. (1995). "Adhesive interactions between alternatively spliced CD44 isoforms." J Biol Chem **270**(19): 11567-11573.
- Duester (2000). "Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid." Eur J Biochem **267**(14).

- Durie, B. G. and Salmon, S. E. (1975). "A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival." Cancer **36**(3): 842-854.
- Eisterer, W., Bechter, O., Soderberg, O., Nilsson, K., Terol, M., Greil, R., Thaler, J., Herold, M., Finke, L., Gunthert, U., Montserrat, E. and Stauder, R. (2004). "Elevated levels of soluble CD44 are associated with advanced disease and in vitro proliferation of neoplastic lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia." Leuk Res **28**(10): 1043-1051.
- Evanko, S. P., Angello, J. C. and Wight, T. N. (1999). "Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **19**(4): 1004-1013.
- Finger, E. B., Puri, K. D., Alon, R., Lawrence, M. B., von Andrian, U. H. and Springer, T. A. (1996). "Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear." Nature **379**(6562): 266-269.
- Flomenberg, N., Devine, S. M., Dpersio, J. F., Liesveld, J. L., McCarty, J. M., Rowley, S. D., Vesole, D. H., Badel, K. and Calandra, G. (2005). "The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone." Blood **106**(5): 1867-1874.
- Francke, U., Foellmer, B. E. and Haynes, B. F. (1983). "Chromosome mapping of human cell surface molecules: monoclonal anti-human lymphocyte antibodies 4F2, A3D8, and A1G3 define antigens controlled by different regions of chromosome 11." Somatic Cell Genet **9**(3): 333-344.
- Freund, D., Oswald, J., Feldmann, S., Ehninger, G., Corbeil, D. and Bornhauser, M. (2006). "Comparative analysis of proliferative potential and clonogenicity of MACS-immunomagnetic isolated CD34+ and CD133+ blood stem cells derived from a single donor." Cell Prolif **39**(4): 325-332.
- Fricker, S. P., Anastassov, V., Cox, J., Darkes, M. C., Grujic, O., Idzan, S. R., Labrecque, J., Lau, G., Mosi, R. M., Nelson, K. L., Qin, L., Santucci, Z. and Wong, R. S. (2006). "Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4." Biochem Pharmacol **72**(5): 588-596.
- Fruehauf, S., Veldwijk, M. R., Seeger, T., Schubert, M., Laufs, S., Topaly, J., Wuchter, P., Dillmann, F., Eckstein, V., Wenz, F., Goldschmidt, H., Ho, A. D. and Calandra, G. (2009). "A combination of granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) and plerixafor mobilizes more primitive peripheral blood progenitor cells than G-CSF alone: results of a European phase II study." Cytotherapy **11**(8): 992-1001.
- Gadhoum, Z., Leibovitch, M. P., Qi, J., Dumenil, D., Durand, L., Leibovitch, S. and Smadja-Joffe, F. (2004). "CD44: a new means to inhibit acute myeloid leukemia cell proliferation via p27Kip1." Blood **103**(3): 1059-1068.
- Gallatin, W. M., Weissman, I. L. and Butcher, E. C. (1983). "A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes." Nature **304**(5921): 30-34.
- Ghaffari, S., Dougherty, G. J., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C. and Eaves, C. J. (1995). "Differentiation-associated changes in CD44 isoform expression during normal hematopoiesis and their alteration in chronic myeloid leukemia." Blood **86**(8): 2976-2985.
- Ghaffari, S., Smadja-Joffe, F., Oostendorp, R., Levesque, J. P., Dougherty, G., Eaves, A. and Eaves, C. (1999). "CD44 isoforms in normal and leukemic hematopoiesis." Exp Hematol **27**(6): 978-993.

- Goldstein, L. A., Zhou, D. F., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F. and Butcher, E. C. (1989). "A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins." Cell **56**(6): 1063-1072.
- Goodfellow, P. N., Banting, G., Wiles, M. V., Tunnacliffe, A., Parkar, M., Solomon, E., Dalchau, R. and Fabre, J. W. (1982). "The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11." Eur J Immunol **12**(8): 659-663.
- Goodison, S., Urquidi, V. and Tarin, D. (1999). "CD44 cell adhesion molecules." Mol Pathol **52**(4): 189-196.
- Goshen, R., Ariel, I., Shuster, S., Hochberg, A., Vlodavsky, I., de Groot, N., Ben-Rafael, Z. and Stern, R. (1996). "Hyaluronan, CD44 and its variant exons in human trophoblast invasion and placental angiogenesis." Mol Hum Reprod **2**(9): 685-691.
- Gunthert, U. (1993). "CD44: a multitude of isoforms with diverse functions." Curr Top Microbiol Immunol **184**: 47-63.
- Gunthert, U., Schwarzler, C., Wittig, B., Laman, J., Ruiz, P., Stauder, R., Bloem, A., Smadja-Joffe, F., Zoller, M. and Rolink, A. (1998). "Functional involvement of CD44, a family of cell adhesion molecules, in immune responses, tumour progression and haematopoiesis." Adv Exp Med Biol **451**: 43-49.
- Haggerty, J. G., Bretton, R. H. and Milstone, L. M. (1992). "Identification and characterization of a cell surface proteoglycan on keratinocytes." J Invest Dermatol **99**(4): 374-380.
- Harada, H. and Takahashi, M. (2007). "CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2." J Biol Chem **282**(8): 5597-5607.
- Hardingham, T. E. and Fosang, A. J. (1992). "Proteoglycans: many forms and many functions." FASEB J **6**(3): 861-870.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A. and Bloomfield, C. D. (1999). "The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997." Ann Oncol **10**(12): 1419-1432.
- Haynes, B. F., Liao, H. X. and Patton, K. L. (1991). "The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms." Cancer Cells **3**(9): 347-350.
- Hess, D. A., Wirthlin, L., Craft, T. P., Herrbrich, P. E., Hohm, S. A., Lahey, R., Eades, W. C., Creer, M. H. and Nolte, J. A. (2006). "Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells." Blood **107**(5): 2162-2169.
- Ho, A. D. (2005). "Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells." Exp Hematol **33**(1): 1-8.
- Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tolg, C., Ponta, H., Herrlich, P. and Gunthert, U. (1991). "CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines." Cancer Res **51**(19): 5292-5297.
- Hope, K. J., Jin, L. and Dick, J. E. (2004). "Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity." Nat Immunol **5**(7): 738-743.
- Ilanguvaran, S., Briol, A. and Hoessli, D. C. (1998). "CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes." Blood **91**(10): 3901-3908.

- Isacke, C. M. and Yarwood, H. (2002). "The hyaluronan receptor, CD44." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **34**: 718-721.
- Ishii, S., Ford, R., Thomas, P., Nachman, A., Steele, G., Jr. and Jessup, J. M. (1993). "CD44 participates in the adhesion of human colorectal carcinoma cells to laminin and type IV collagen." Surg Oncol **2**(4): 255-264.
- Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T., Tomiyama, H., Saito, N., Fukata, M., Miyamoto, T., Lyons, B., Ohshima, K., Uchida, N., Taniguchi, S., Ohara, O., Akashi, K., Harada, M. and Shultz, L. D. (2007). "Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region." Nat Biotechnol **25**(11): 1315-1321.
- Ishikawa, H., Tamura, A., Matsui, T., Sasaki, H., Hakoshima, T. and Tsukita, S. (2001). "Structural conversion between open and closed forms of radixin: low-angle shadowing electron microscopy." J Mol Biol **310**(5): 973-978.
- Jackson, D. G., Buckley, J. and Bell, J. I. (1992). "Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain." J Biol Chem **267**(7): 4732-4739.
- Jalkanen, S. and Jalkanen, M. (1992). "Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin." J Cell Biol **116**(3): 817-825.
- Jalkanen, S. T., Bargatze, R. F., Herron, L. R. and Butcher, E. C. (1986). "A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man." Eur J Immunol **16**(10): 1195-1202.
- Jiang, D., Liang, J. and Noble, P. W. (2007). "Hyaluronan in tissue injury and repair." Annual Review of Cell and Developmental Biology **23**: 435-461.
- Jin, L., Hope, K. J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F. and Dick, J. E. (2006). "Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells." Nat Med **12**(10): 1167-1174.
- Kansas, G. S., Wood, G. S. and Dailey, M. O. (1989). "A family of cell-surface glycoproteins defined by a putative anti-endothelial cell receptor antibody in man." J Immunol **142**(9): 3050-3057.
- Katoh, S., McCarthy, J. B. and Kincade, P. W. (1994). "Characterization of soluble CD44 in the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth." J Immunol **153**(8): 3440-3449.
- Katoh, S., Zheng, Z., Oritani, K., Shimosato, T. and Kincade, P. W. (1995). "Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan." J Exp Med **182**(2): 419-429.
- Katz, F. E., Tindle, R., Sutherland, D. R. and Greaves, M. F. (1985). "Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells." Leuk Res **9**(2): 191-198.
- Khaldoyanidi, S., Karakhanova, S., Sleeman, J., Herrlich, P. and Ponta, H. (2002). "CD44 variant-specific antibodies trigger hemopoiesis by selective release of cytokines from bone marrow macrophages." Blood **99**(11): 3955-3961.
- Khaldoyanidi, S., Moll, J., Karakhanova, S., Herrlich, P. and Ponta, H. (1999). "Hyaluronate-enhanced hematopoiesis: two different receptors trigger the release of interleukin-1beta and interleukin-6 from bone marrow macrophages." Blood **94**(3): 940-949.
- Kim, H. R., Wheeler, M. A., Wilson, C. M., Iida, J., Eng, D., Simpson, M. A., McCarthy, J. B. and Bullard, K. M. (2004). "Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells in vitro via interaction with CD44." Cancer Res **64**(13): 4569-4576.

- Knudson, C. B. and Knudson, W. (1993). "Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease." FASEB J **7**(13): 1233-1241.
- Knudson, W., Chow, G. and Knudson, C. B. (2002). "CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan." Matrix Biol **21**(1): 15-23.
- Kocaoemer, A., Kern, S., Kluter, H. and Bieback, K. (2007). "Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue." Stem Cells **25**(5): 1270-1278.
- Kopp, H. G., Avecilla, S. T., Hooper, A. T. and Rafii, S. (2005). "The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization." Physiology (Bethesda) **20**: 349-356.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A. and Dick, J. E. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-648.
- Lawrence, M. B., Kansas, G. S., Kunkel, E. J. and Ley, K. (1997). "Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E)." J Cell Biol **136**(3): 717-727.
- Lee, J. Y. and Spicer, A. P. (2000). "Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule." Curr Opin Cell Biol **12**(5): 581-586.
- Legg, J. W., Lewis, C. A., Parsons, M., Ng, T. and Isacke, C. M. (2002). "A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility." Nat Cell Biol **4**(6): 399-407.
- Legras, S., Gunthert, U., Stauder, R., Curt, F., Oliferenko, S., Kluin-Nelemans, H. C., Marie, J. P., Proctor, S., Jasmin, C. and Smadja-Joffe, F. (1998). "A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia." Blood **91**(9): 3401-3413.
- Legras, S., Levesque, J. P., Charrad, R., Morimoto, K., Le Bousse, C., Clay, D., Jasmin, C. and Smadja-Joffe, F. (1997). "CD44-mediated adhesiveness of human hematopoietic progenitors to hyaluronan is modulated by cytokines." Blood **89**(6): 1905-1914.
- Lesley, J., English, N., Hascall, V. C., Tammi, M. and Hyman, R. (2002). Hyaluronan binding by cell surface CD44. Cambridge, U. K. , Woodhead Publishing Ltd. .
- Lesley, J., English, N., Perschl, A., Gregoroff, J. and Hyman, R. (1995). "Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation." J Exp Med **182**(2): 431-437.
- Lesley, J., Hyman, R. and Kincade, P. W. (1993). "CD44 and its interaction with extracellular matrix." Adv Immunol **54**: 271-335.
- Lesley, J., Kincade, P. W. and Hyman, R. (1993). "Antibody-induced activation of the hyaluronan receptor function of CD44 requires multivalent binding by antibody." Eur J Immunol **23**(8): 1902-1909.
- Lewinsohn, D. M., Nagler, A., Ginzton, N., Greenberg, P. and Butcher, E. C. (1990). "Hematopoietic progenitor cell expression of the H-CAM (CD44) homing-associated adhesion molecule." Blood **75**(3): 589-595.
- Lokeshwar, V. B. and Bourguignon, L. Y. (1991). "Post-translational protein modification and expression of ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and its biosynthetic precursors during T-lymphoma membrane biosynthesis." J Biol Chem **266**(27): 17983-17989.

- Maquarre, E., Artus, C., Gadhoum, Z., Jasmin, C., Smadja-Joffe, F. and Robert-Lezenes, J. (2005). "CD44 ligation induces apoptosis via caspase- and serine protease-dependent pathways in acute promyelocytic leukemia cells." Leukemia **19**(12): 2296-2303.
- Miyake, K. and Kincade, P. W. (1990). "A new cell adhesion mechanism involving hyaluronate and CD44." Curr Top Microbiol Immunol **166**: 87-90.
- Miyake, K., Medina, K. L., Hayashi, S., Ono, S., Hamaoka, T. and Kincade, P. W. (1990). "Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures." J Exp Med **171**(2): 477-488.
- Moll, J., Khaldoyanidi, S., Sleeman, J. P., Achtnich, M., Preuss, I., Ponta, H. and Herrlich, P. (1998). "Two different functions for CD44 proteins in human myelopoiesis." J Clin Invest **102**(5): 1024-1034.
- Moore, K. A. and Lemischka, I. R. (2006). "Stem cells and their niches." Science **311**(5769): 1880-1885.
- Morra, M. (2005). "Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan." Biomacromolecules **6**(3): 1205-1223.
- Naor, D., Sionov, R. V. and Ish-Shalom, D. (1997). "CD44: structure, function, and association with the malignant process." Adv Cancer Res **71**: 241-319.
- Nilsson, S. K., Haylock, D. N., Johnston, H. M., Occhiodoro, T., Brown, T. J. and Simmons, P. J. (2003). "Hyaluronan is synthesized by primitive hemopoietic cells, participates in their lodgment at the endosteum following transplantation, and is involved in the regulation of their proliferation and differentiation in vitro." Blood **101**(3): 856-862.
- Okamoto, I., Kawano, Y., Murakami, D., Sasayama, T., Araki, N., Miki, T., Wong, A. J. and Saya, H. (2001). "Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway." J Cell Biol **155**(5): 755-762.
- Omary, M. B., Trowbridge, I. S., Letarte, M., Kagnoff, M. F. and Isacke, C. M. (1988). "Structural heterogeneity of human Pgp-1 and its relationship with p85." Immunogenetics **27**(6): 460-464.
- Oostendorp, R. A., Spitzer, E., Brandl, M., Eaves, C. J. and Dormer, P. (1998). "Evidence for differences in the mechanisms by which antibodies against CD44 promote adhesion of erythroid and granulopoietic progenitors to marrow stromal cells." Br J Haematol **101**(3): 436-445.
- Pearce, D. J., Taussig, D., Simpson, C., Allen, K., Rohatiner, A. Z., Lister, T. A. and Bonnet, D. (2005). "Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples." Stem Cells **23**(6): 752-760.
- Picker, L. J. and Butcher, E. C. (1992). "Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing." Annu Rev Immunol **10**: 561-591.
- Picker, L. J., Nakache, M. and Butcher, E. C. (1989). "Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types." J Cell Biol **109**(2): 927-937.
- Protin, U., Schweighoffer, T., Jochum, W. and Hilberg, F. (1999). "CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets." J Immunol **163**(9): 4917-4923.
- Pure, E. and Cuff, C. A. (2001). "A crucial role for CD44 in inflammation." Trends Mol Med **7**(5): 213-221.

- Quackenbush, E. J., Vera, S., Greaves, A. and Letarte, M. (1990). "Confirmation by peptide sequence and co-expression on various cell types of the identity of CD44 and P85 glycoprotein." Mol Immunol **27**(10): 947-955.
- Ran, D., Schubert, M., Pietsch, L., Taubert, I., Wuchter, P., Eckstein, V., Bruckner, T., Zoeller, M. and Ho, A. D. (2009). "Aldehyde dehydrogenase activity among primary leukemia cells is associated with stem cell features and correlates with adverse clinical outcomes." Exp Hematol **37**(12): 1423-1434.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Ristamaki, R., Joensuu, H., Salmi, M. and Jalkanen, S. (1994). "Serum CD44 in malignant lymphoma: an association with treatment response." Blood **84**(1): 238-243.
- Ruiz, P., Schwarzler, C. and Gunthert, U. (1995). "CD44 isoforms during differentiation and development." Bioessays **17**(1): 17-24.
- Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells **4**(1-2): 7-25.
- Schubert, M., Herbert, N., Taubert, I., Ran, D., Singh, R., Eckstein, V., Vitacolonna, M., Ho, A. D. and Zoller, M. (2011). "Differential survival of AML subpopulations in NOD/SCID mice." Exp Hematol **39**(2): 250-263 e254.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I. and Jackson, D. G. (1993). "The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat." J Biol Chem **268**(17): 12235-12238.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U. and Bell, J. I. (1992). "Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12160-12164.
- Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S. and Zoller, M. (1993). "Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44." J Exp Med **177**(2): 443-455.
- Siminovitch, L., McCulloch, E. A. and Till, J. E. (1963). "The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies." J Cell Physiol **62**: 327-336.
- Skelton, T. P., Zeng, C., Nocks, A. and Stamenkovic, I. (1998). "Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan." J Cell Biol **140**(2): 431-446.
- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. M. and Seed, B. (1989). "A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family." Cell **56**(6): 1057-1062.
- Storms, R. W., Trujillo, A. P., Springer, J. B., Shah, L., Colvin, O. M., Ludeman, S. M. and Smith, C. (1999). "Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9118-9123.
- Sugahara, K. N., Hirata, T., Hayasaka, H., Stern, R., Murai, T. and Miyasaka, M. (2006). "Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments." J Biol Chem **281**(9): 5861-5868.
- Tacyildiz, N., Cavdar, A. O., Yavuz, G., Gozdasoglu, S., Unal, E., Ertem, U., Duru, F., Ikinciogullari, A., Babacan, E., Kuzu, I. and Cin, S. (2001). "Serum levels and differential expression of CD44 in

- childhood leukemia and malignant lymphoma: correlation with prognostic criteria and survival." Pediatr Int **43**(4): 354-360.
- Taher, T. E., Smit, L., Griffioen, A. W., Schilder-Tol, E. J., Borst, J. and Pals, S. T. (1996). "Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. Association with p56lck in T lymphocytes." J Biol Chem **271**(5): 2863-2867.
- Taubert, I., Saffrich, R., Zepeda-Moreno, A., Hellwig, I., Eckstein, V., Bruckner, T., Ho, A. D. and Wuchter, P. (2011). "Characterization of hematopoietic stem cell subsets from patients with multiple myeloma after mobilization with plerixafor." Cytotherapy **13**(4): 459-466.
- Terstappen, L. W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M. and Loken, M. R. (1991). "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells." Blood **77**(6): 1218-1227.
- Thomas, L., Byers, H. R., Vink, J. and Stamenkovic, I. (1992). "CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate." J Cell Biol **118**(4): 971-977.
- Till, J. E. and McCulloch, E. (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res **14**: 213-222.
- Tolg, C., Hofmann, M., Herrlich, P. and Ponta, H. (1993). "Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability." Nucleic Acids Res **21**(5): 1225-1229.
- Toyama-Sorimachi, N. and Miyasaka, M. (1994). "A novel ligand for CD44 is sulfated proteoglycan." Int Immunol **6**(4): 655-660.
- van Rhenen, A., Feller, N., Kelder, A., Westra, A. H., Rombouts, E., Zweegman, S., van der Pol, M. A., Waisfisz, Q., Ossenkoppele, G. J. and Schuurhuis, G. J. (2005). "High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival." Clin Cancer Res **11**(18): 6520-6527.
- Vardiman, J. W., Harris, N. L. and Brunning, R. D. (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." Blood **100**(7): 2292-2302.
- Vitacolonna, M., Schubert, M., Herbert, N., Taubert, I., Singh, R., Ho, A. and Zoller, M. (2010). "Improved T and B cell recovery by the transfer of slowly dividing human hematopoietic stem cells." Leuk Res **34**(5): 622-630.
- Wagner, W., Ansorge, A., Wirkner, U., Eckstein, V., Schwager, C., Blake, J., Miesala, K., Selig, J., Saffrich, R., Ansorge, W. and Ho, A. D. (2004). "Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis." Blood **104**(3): 675-686.
- Wagner, W., Wein, F., Roderburg, C., Saffrich, R., Diehlmann, A., Eckstein, V. and Ho, A. D. (2008). "Adhesion of human hematopoietic progenitor cells to mesenchymal stromal cells involves CD44." Cells Tissues Organs **188**(1-2): 160-169.
- Wagner, W., Wein, F., Roderburg, C., Saffrich, R., Faber, A., Krause, U., Schubert, M., Benes, V., Eckstein, V., Maul, H. and Ho, A. D. (2007). "Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction." Exp Hematol **35**(2): 314-325.
- Walenda, T., Bork, S., Horn, P., Wein, F., Saffrich, R., Diehlmann, A., Eckstein, V., Ho, A. D. and Wagner, W. (2010). "Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells." J Cell Mol Med **14**(1-2): 337-350.
- Wang, J. S., Fang, Q., Sun, D. J., Chen, J., Zhou, X. L., Lin, G. W., Lu, H. Z. and Fei, J. (2001). "Genetic modification of hematopoietic progenitor cells for combined resistance to 4-

- hydroperoxycyclophosphamide, vincristine, and daunorubicin." Acta Pharmacol Sin **22**(10): 949-955.
- Weber, G. F., Ashkar, S., Glimcher, M. J. and Cantor, H. (1996). "Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1)." Science **271**(5248): 509-512.
- Yang, H. and Binns, R. M. (1993). "Isolation and characterization of the soluble and membrane-bound porcine CD44 molecules." Immunology **78**(4): 547-554.
- Yin, T. and Li, L. (2006). "The stem cell niches in bone." J Clin Invest **116**(5): 1195-1201.
- Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L. C. and Chang, C. (1998). "Human aldehyde dehydrogenase gene family." Eur J Biochem **251**(3): 549-557.
- Zepeda-Moreno, A., Taubert, I., Hellwig, I., Hoang, V., Pietsch, L., Lakshmanan, V. K., Wagner, W. and Ho, A. D. (2011). "Innovative method for quantification of cell-cell adhesion in 96-well plates." Cell Adh Migr **5**(3).
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y. and Li, L. (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." Nature **425**(6960): 836-841.
- Zhao, L. R., Duan, W. M., Reyes, M., Keene, C. D., Verfaillie, C. M. and Low, W. C. (2002). "Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats." Exp Neurol **174**(1): 11-20.
- Zhou, D. F., Ding, J. F., Picker, L. J., Bargatze, R. F., Butcher, E. C. and Goeddel, D. V. (1989). "Molecular cloning and expression of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor." J Immunol **143**(10): 3390-3395.
- Zhu, C., Yago, T., Lou, J., Zarnitsyna, V. I. and McEver, R. P. (2008). "Mechanisms for flow-enhanced cell adhesion." Ann Biomed Eng **36**(4): 604-621.

6 Veröffentlichungen

6.1 Publikationen

Ran D, Schubert M, Pietsch L, Taubert I, Wuchter P, Eckstein V, Bruckner T, Zoeller M, Ho AD. Aldehyde dehydrogenase activity among primary leukemia cells is associated with stem cell features and correlates with adverse clinical outcomes. *Exp Hematol*. 2009 Dec; 37(12):1423-34.

Vitacolonna M, Schubert M, Herbert N, Taubert I, Singh R, Ho A, Zöller M. Improved T and B cell recovery by the transfer of slowly dividing human hematopoietic stem cells. *Leuk Res*. 2010 May; 34(5):622-30.

Taubert I, Saffrich R, Zepeda-Moreno A, Hellwig I, Eckstein V, Bruckner T, Ho AD, Wuchter P. Characterization of hematopoietic stem cell subsets from patients with multiple myeloma after mobilization with plerixafor. *Cytotherapy*. 2011 Apr; 13(4):459-66.

Schubert M, Herbert N, Taubert I, Ran D, Singh R, Eckstein V, Vitacolonna M, Ho AD, Zöller M. Differential survival of AML subpopulations in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2011 Feb; 39 (2):250-263.e4.

Zepeda-Moreno A, Taubert I, Hellwig I, Hoang V, Pietsch L, Lakshmanan VK, Wagner W, Ho AD. Innovative method for quantification of cell-cell-adhesion in 96-well plates. *Cell Adh Migr*. 2011 May 1;5(3). [Epub ahead of print]

Christophis C, Taubert I, Meseck G, Schubert M, Grunze M, Ho AD, Rosenhahn A. Shear stress regulates adhesion and rolling of CD44-expressing leukemic and hematopoietic cells on hyaluronan. [submitted]

Ran D, Schubert M, Taubert I, Eckstein V, Bellos F, Jauch A, Bruckner T, Chen H, Saffrich R, Wuchter P, Ho AD. Frequency of leukemia stem cell candidates at diagnosis of acute myeloid leukemia is a significant prognostic factor for response. [submitted]

6.2 Präsentationen

6.2.1 Vorträge

Isabel Taubert, Stammzellnische und Erhalt des hämatopoetischen und leukämischen Stammzellpotenzials. 17. Forschungskolloquium des Tumorzentrums Heidelberg/Mannheim, 2009, Heidelberg, Deutschland.

Dan Ran, Isabel Taubert, Mario Schubert, Volker Eckstein, Frauke Bellos, Anthony D. Ho. Leukemia stem cell candidates in acute myeloid leukemia predict refractoriness to conventional chemotherapy and adverse clinical outcome. 5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung, 2010, Lübeck, Deutschland.

Isabel Taubert, Mario Schubert, Isabelle Hellwig, Abraham Zepeda-Moreno, Dan Ran, Larissa Pietsch, Volker Eckstein, Margot Zoeller, Anthony Ho. Importance of CD44 and CD44v7 in the interaction of HPC and LSC with their niche. Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO, SGMO, 2010, Berlin, Deutschland.

6.2.2 Poster

Isabel Taubert, Mario Schubert, Dan Ran, Larissa Pietsch, Isabelle Hellwig, Angela Lenze, Kerstin Woerner, Patrick Wuchter, Volker Eckstein, Margot Zoeller, Anthony Ho. Low expression of variant CD44 isoforms in primitive hematopoietic progenitors and leukemic stem cells. 38. Jahrestagung der ISEH, 2009, Athen, Griechenland.

Isabel Taubert, Patrick Wuchter, Volker Eckstein, Dan Ran, Larissa Pietsch, Angela Lenze, Isabelle Hellwig, Mario Schubert, Anthony D. Ho. Flow cytometric analysis of AMD3100-mobilized peripheral hematopoietic stem cells

reveals two distinct ALDH+/CD34+/CD38- subpopulations, 38. Jahrestagung der ISEH, 2009, Athen, Griechenland.

Isabel Taubert, Mario Schubert, Dan Ran, Larissa Pietsch, Isabelle Hellwig, Angela Lenze, Kerstin Woerner, Volker Eckstein, Margot Zoeller, Anthony D. Ho. Hyaluronan and CD44 play a role in the maintenance of stemness in hematopoietic progenitor cells. Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO, SGMO, 2009, Heidelberg/Mannheim, Deutschland.

Isabel Taubert, Volker Eckstein, Dan Ran, Larissa Pietsch, Angela Lenze, Isabelle Hellwig, Mario Schubert, Anthony D. Ho, Patrick Wuchter. Characterization of AMD3100-mobilized peripheral hematopoietic stem cells from patients with multiple myeloma. Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO, SGMO, 2009, Heidelberg/Mannheim, Deutschland.

Isabel Taubert, Christof E. Christophis, Mario Schubert, Abraham Zepeda-Moreno, Isabelle Hellwig, Volker Eckstein, Margot Zoeller, Anthony Ho. Importance of CD44 in the interaction of HPC and LSC with their niche. PBSCT-Symposium, 2010, Heidelberg, Deutschland.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Anthony D. Ho für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Labor durchzuführen und für seine Betreuung der Arbeit.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Werner Buselmaier für seine wertvolle Unterstützung und Betreuung der Arbeit seitens der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Dr. Mario Schubert danke ich für die Vergabe des Themas und die Korrektur der Arbeit. Bei Prof. Dr. Margot Zöller bedanke ich mich dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand.

Weiterhin danke ich Dr. Volker Eckstein für die Bereitstellung der notwendigen technischen Ausrüstung und die Korrektur der Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich beim gesamten Team des Stammzellforschungslabors für die freundliche Aufnahme, sehr gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken, vor allem aber bei Angela Lenze, Kerstin Wörner, Dr. Simone Bork, Dr. Patrick Horn, Annette Ludwig, Katrin Miesala-Barth und Anke Diehlmann.

Meinen „Leidensgenossen“ Isabelle Hellwig, Larissa Pietsch, Dan Ran, Van Hoang und besonders Abraham Zepeda-Moreno danke ich für ihre Freundschaft, ihre Unterstützung im Labor und außerhalb. Gracias por mostrarme tu mundo.

Meinen Eltern Kurt und Marina Taubert, meiner Schwester Anja, meiner Oma Else Zimmermann und Max danke ich für die liebevolle Unterstützung, einschließlich den immer offenen Ohren und Schultern zum Anlehnen.

Schließlich will ich noch einem sehr wichtigen Menschen in meinem Leben, Martin Hoffmann, für seine unendliche Geduld im Ertragen meiner Launen und liebevolle Unterstützung während der gesamten Zeit danken. Ich freue mich auf unsere gemeinsame neue Aufgabe.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Doktorarbeit selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Doktorarbeit wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Heidelberg, im April 2011

Isabel Taubert