

Interaktion von Tumorzellen in der hämatopoetischen Stammzellnische

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Beerlage, Astrid

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Klein

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. V. Mirakaj

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Die hämatopoetische Stammzellnische	7
1.1.1	Die endosteale Stammzellnische	8
1.1.2	Die perivaskuläre Stammzellnische	9
1.1.3	Weitere zelluläre Komponenten	9
1.1.4	Azelluläre Komponenten	10
1.1.5	Hämatopoetische Stammzellen	13
1.1.6	Klinische Bedeutung	15
1.2	Mammakarzinom	16
1.2.1	Prävalenz	16
1.2.2	Ätiologie und Pathogenese	17
1.2.3	Therapie	18
1.3	Prostatakarzinom	19
1.3.1	Prävalenz	19
1.3.2	Ätiologie und Pathogenese	19
1.3.3	Therapie	19
1.4	Dissemination von Tumorzellen in die hämatopoetische Stammzell- nische	20
1.4.1	Mammakarzinom	22
1.4.2	Prostatakarzinom	22
1.5	„Single Cell Force Spectroscopy“ mit Hilfe der „Atomic Force Micros- copy“	23
1.6	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Kultivierung humaner Zelllinien	26
2.1.1	Verwendete Zelllinien	26
2.1.2	Mediumwechsel, Ablösen und Passagieren humaner Zelllinien .	27
2.1.3	Kryokonservierung humaner Zelllinien	29

2.2	Separierung humaner hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut	29
2.2.1	Gewinnung von PBMC	30
2.2.2	Isolierung von CD38- Zellen aus PBMC	31
2.2.3	CD34+ Selektion der CD38- Zellpopulation	31
2.2.4	Reinheitsüberprüfung der aufgereinigten CD34+CD38- Zellpopulation	32
2.3	Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmarkaspiraten .	33
2.4	„Single Cell Force Spectroscopy“ mit Hilfe der „Atomic Force Microscopy“	34
2.4.1	Eichung und Messparameter	35
2.4.2	Cantileverfunktionalisierung und Zellimmobilisierung	36
2.4.3	Zell-Zell-Adhäsionsmessungen	37
2.4.4	Zell-Matrix-Adhäsionsmessungen	38
2.4.5	Auswertung	39
2.5	Funktionelle Analysen	40
2.5.1	Markierung von Zellen mit QTrackern	40
2.5.2	Zell-Zell-Adhäsionsassay: Koinkubation von KG-1a mit PC3 oder MDA-MB-231	41
2.5.3	Zell-Zell-Adhäsionsassay: Verdrängung von KG-1a aus ihrer Bindung an CAL 72 durch PC3 oder MDA-MB-231	43
2.5.4	Zell-Matrix-Adhäsionsassays	44
2.6	Statistische Auswertungen	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Affinitätsanalyse von Prostata- und Mammakarzinomzelllinien und einer CD34+ hämatopoetischen Zelllinie an Matrixkomponenten der hämatopoetischen Stammzellnische	47
3.1.1	Adhäsion von CD34+ KG-1a an Matrixkomponenten	47
3.1.2	Adhäsion von PC3 an Matrixkomponenten	49
3.1.3	Adhäsion von MDA-MB-231 an Matrixkomponenten	50
3.2	Adhäsion einer CD34+ hämatopoetischen Zelllinie an Zellen der hämatopoetischen Stammzellnische in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Prostata- und Mammakarzinomzellen	51
3.2.1	Bindungsaffinität von KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 an CAL 72	51
3.2.2	Bindungsaffinität von KG-1a bei Koinkubation mit PC3 oder MDA-MB-231 auf CAL 72	52

3.2.3	Verdrängung von an CAL 72 gebundenen KG-1a Zellen durch PC3 und MDA-MB-231	53
3.3	Interaktionsanalyse von Prostata- und Mammakarzinomzelllinien und einer CD34+ hämatopoetischen Zelllinie mit Zellen der hämatopoe- tischen Stammzellnische mit Hilfe der SCFS	56
3.3.1	Analyse der Adhäsionseigenschaften von KG-1a, PC3 und MDA- MB-231 an die osteoblastische Zelllinie CAL 72 sowie mesen- chymale Stammzellen	56
3.3.2	Vergleich der Adhäsionseigenschaften von KG-1a und primären humanen hämatopoetischen Stammzellen an CAL 72	57
3.4	Interaktionsanalyse von Prostata- und Mammakarzinomzelllinien und einer CD34+ hämatopoetischen Zelllinie mit Matrixkomponenten der hämatopoetischen Stammzellnische	59
3.4.1	Analyse von Adhäsionseigenschaften von KG-1a mit Matrix- komponenten der hämatopoetischen Stammzellnische	60
3.4.2	Analyse von Adhäsionseigenschaften von PC3 mit Matrixkom- ponenten der hämatopoetischen Stammzellnische	61
3.4.3	Analyse von Adhäsionseigenschaften von MDA-MB-231 mit Matrixkomponenten der hämatopoetischen Stammzellnische	64
3.5	Abhängigkeit der Adhäsionsstärke von der Zeit bei Zell-Zell- und Zell- Matrix-Interaktionsmessungen	66
3.5.1	Zunahme der Bindungsstärke in Abhängigkeit der Kontaktzeit	66
3.5.2	Adhäsionsunterschiede in der initialen Adhäsion nach 1 sec	66
4	Diskussion	68
4.1	Adhäsion einer CD34+ hämatopoetischen Zelllinie an Komponenten der hämatopoetischen Stammzellnische im Vergleich zu Prostata- und Mammakarzinomzellen	69
4.2	Konkurrenz um Bindungsstellen der hämatopoetischen Stammzellni- sche zwischen KG-1a und Prostata- und Mammakarzinomzellen	74
4.3	Ausblick	76
5	Zusammenfassung	78
	Literaturverzeichnis	80
	Erklärung zum Eigenanteil	88

Wissenschaftliche Beiträge	89
Danksagung	90

Abkürzungsverzeichnis

A/A-Lösung	Antibiotische/Antimykotische-Lösung (10 mg/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B)
AFM	„Atomic Force Microscope“
ATCC	„American Type Culture Collection“, Manassas, USA
BMPR Ia	„Bone morphogenetic protein receptor Ia“
CAR-Zellen	„CXCL12-abundant cells“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
FFP	„Fresh Frozen Plasma“
GnRH	„Gonadotropin-Releasing-Hormon“
HER2/neu	„Human epidermal growth factor receptor 2“
HSC	hämatopoetische Stammzellen
ITS	Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit Supplement
LM	Laminin
min	Minuten
ml	Milliliter
MSC	mesenchymale Stammzellen
nm	Nanometer

nN	Nano-Newton
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS +/+	„Phosphate Buffered Saline“ mit Calcium und Magnesium
PBS -/-	„Phosphate Buffered Saline“ ohne Calcium und Magnesium
pN	Piko-Newton
P/S-Lösung	Penicillin- und Streptomycinlösung (10 mg/ml)
PTH	Parathormon
SCF	„Stem Cell Factor“
SCFS	„Single Cell Force Spectroscopy“
sec	Sekunden
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs („Union Internationale Contre le Cancer“)
μm	Mikrometer
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die hämatopoetische Stammzellnische

Stammzellen stellen eine sehr seltene Zellpopulation im menschlichen Körper dar. Trotzdem sind sie essentiell für das Überleben, da sie Wachstum und Reparatur von Geweben ermöglichen. Zur Aufrechterhaltung dieser Zellpopulationen werden spezialisierte Mikromilieus benötigt. Dieses als Nischen bezeichnete Umfeld ermöglicht es den Stammzellen, ihre Selbsterneuerungsfähigkeit beizubehalten, aber auch, dass bei Bedarf eine entsprechende Proliferation mit anschließender Differenzierung initiiert werden kann. Zurück geht das Konzept der Stammzellnischen auf Schofield, der postulierte, dass durch die Adhäsion der Stammzellen in der Nische diese ein fixiertes Zellgewebe bilden, welche die Ausreifung der Zellen verhindert und deren fortgehende Proliferation ermöglicht (Schofield, 1978 [1]).

Die Ausgangsbasis für die Bildung der peripheren Blutzellen, wie den Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten bilden hämatopoetische Stammzellen (HSC). Die Blutbildung beginnt bereits in der 2. Schwangerschaftswoche im Dottersack. Mit Beginn der 6. Schwangerschaftswoche findet die Hämatopoese in der Leber und kurz darauf auch in der Milz statt. Erst ab dem 5. Schwangerschaftsmonat beginnt die Blutbildung im Knochenmark, woraufhin die Blutbildung in Leber und Milz langsam zurück geht. Bei Krankheiten wie der Osteomyelofibrose kann jedoch erneut eine Blutbildung in Leber und Milz erfolgen (Lehrbuch Histologie, S.224 f. [2]).

Innerhalb des Knochenmarks können vor allem endosteal und perivaskulär gehäuft hämatopoetische Stammzellen gefunden werden. Man unterscheidet daher zwischen der endostealen und der perivaskulären Stammzellnische. In den letzten Jahren konnten immer mehr unterschiedliche Zelltypen identifiziert werden, die für die Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellnische eine Rolle spielen. Abbildung 1.1 zeigt wesentliche Bestandteile der hämatopoetischen Stammzellnische. Hierzu ge-

hören zelluläre Bestandteile wie Osteoblasten, mesenchymale Stammzellen (MSC) und Endothelzellen, aber auch die extrazelluläre Matrix (EZM).

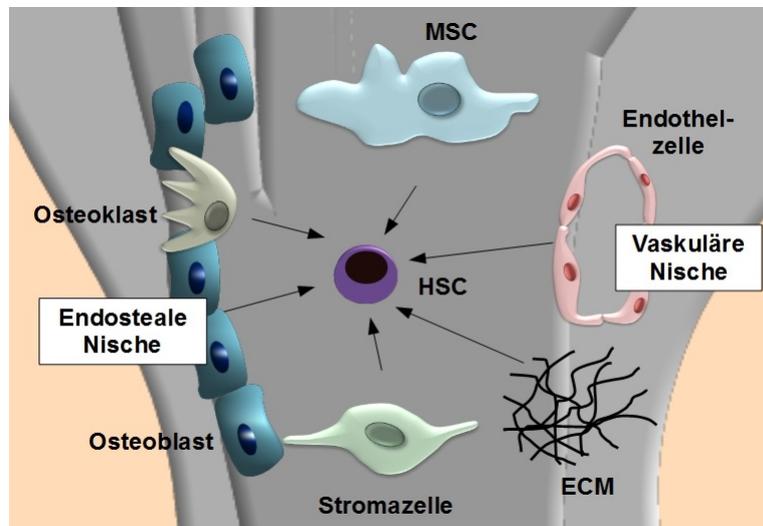


Abbildung 1.1: **Komponenten der hämatopoetischen Stammzellnische.** Für die Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellnische spielen sowohl zelluläre Bestandteile wie Osteoblasten, Osteoklasten, Endothelzellen, unterschiedliche Stromazellen und MSC, als auch die EZM eine Rolle.

1.1.1 Die endostale Stammzellnische

Schon 1975 zeigten Lord et al. [3], dass endosteal eine höhere Anzahl an HSC als im zentralen Knochenmark vorliegt. Die Wichtigkeit von Osteoblasten für die hämatopoetische Stammzellnische konnte seitdem in vielen Studien gezeigt werden. So führt die Erhöhung der Osteoblastenanzahl [durch Applikation von Parathormon und Überexpression von Parathormonrezeptoren beziehungsweise die Inaktivierung des „Bone morphogenetic protein receptor Ia“ (BMPRIa)] zu einer erhöhten Stammzellanzahl (Calvi et al., 2003 [4]). Zu diesem Ergebnis kam auch die zeitgleich erschienene Arbeit von Zhang et al. [5]. Bei Mausmutanten mit einer Deletion des BMPRIa erhöhte sich die Anzahl der Osteoblasten um das Dreifache, dabei kam es zu einer Verdopplung der HSC im Vergleich zu Mäusen des Wildtyps. Ein Verlust an Osteoblasten führt zudem zu einer verringerten Stammzellanzahl im Knochenmark (Visnjic et al., 2004 [6]). Neuere Studien stellen die direkte Interaktion zwischen Osteoblasten und HSC in Frage. Sie vermuten, dass die Korrelation vor allem auf die Schädigung der perivaskulären Nische durch die Bestrahlung in Transplantationsexperimente zurückzuführen ist. Den Osteoblasten wird eine eher indirekte Rolle für die Regulation der HSC zugesprochen (Morrison und Scadden, 2014 [7]).

1.1.2 Die perivaskuläre Stammzellnische

Während der Embryogenese spielt die extramedulläre Blutbildung eine wichtige Rolle, aber auch nach der Geburt führen bestimmte Erkrankungen, wie die Myelofibrose, zur extramedullären Blutbildung. Diese Tatsache unterstützt die These, dass neben Osteoblasten und Osteoklasten auch andere Zellen fähig sind, eine Umgebung zu bilden, in der adulte Stammzellen verweilen und ihre Stammzeleigenschaften aufrechterhalten können (Kiel und Morrison, 2008 [8]). In der Milz ist hierbei eine auffällig hohe Kolo-kalisation von HSC und Sinusoiden zu finden. Diese spezialisierten Blutgefäße scheinen neben der endostealen Nische eine weitere Nische für HSC bilden zu können. Auch im Knochenmark zeigte sich neben einer Häufung von HSC in der Nähe des Endosteums eine große Anzahl HSC mit Kontakt zu den Sinusoiden und damit den perivaskulären Stromazellen. Kiel et al. [9] fanden sogar eine höhere Anzahl HSC benachbart zu Sinusoiden (60%) als dem Endosteum anliegend (20%; die restlichen 20% konnten weder der einen noch der anderen Nische zugeordnet werden). Das Konzept der perivaskulären Nische wird dadurch gestützt, dass durch die Applikation von Interleukin-8 innerhalb von Minuten HSC in die Zirkulation mobilisiert werden können (Laterveer et al., 1995 [10]), sich diese also in räumlicher Nähe zu den Sinusoiden befinden müssen.

Unklar bleibt jedoch, ob die perivaskuläre Nische dauerhaft HSC beherbergt oder diese die Nische nur beim Migrieren in die endosteale Nische passieren. Wilson und Trumpp (2006 [11]) stellten die These auf, dass beide Nischen eine unterschiedliche Funktion erfüllen. Während ruhende HSC vor allem in der endostealen Nische lokalisiert zu sein scheinen, könnte die perivaskuläre Nische eher den Pool an Zellen beherbergen, der sich selbsterneuernd teilt. Durch den engen Kontakt zum Blut könnten Signale über die benötigte Anzahl neu zu bildender Zellen ausgetauscht werden und bei Bedarf zu einer raschen Proliferation führen. Die weiter entfernten Zellen in der endostealen Nische dienen in diesem Modell als Reservezellen bei einer hohen benötigten Proliferation. Kiel et al. (2005 [9]) zeigten hingegen, dass auch die ruhenden Stammzellen perivaskulär lokalisiert sind. Die Rolle der unterschiedlichen Zellen für die Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellnische bleibt weiterhin Gegenstand der Forschung.

1.1.3 Weitere zelluläre Komponenten

Neben den Osteoblasten und Osteoklasten sowie den perivaskulären Stromazellen konnten mittlerweile eine Reihe von Zellen identifiziert werden, die eine Rolle in den

hämatopoetischen Stammzellnischen spielen. Zu nennen sind hier Megakaryozyten, „CXCL12-abundant cells“ (CAR-Zellen) sowie MSC, aber auch das sympathische Nervensystem (Kiel und Morrison, 2008 [8]). Dabei spielen die MSC nicht nur eine Rolle als Vorläuferzellen von Osteoblasten, sondern sind auch in ihrer Eigenschaft als Stammzelle fester Bestandteil der hämatopoetischen Stammzellnische. Nestin+MSC exprimieren dabei höhere Mengen des für die Aufrechterhaltung der HSC wichtigen Zytokins CXCL12, aber auch VCAM1 und Osteopontin als alle anderen Stromazellen im Knochenmark, Osteoblasten eingeschlossen (Mendez-Ferrer et al., 2010 [12]). Die Depletion der Nestin+MSC führt dabei in der Maus zu einer Mobilisierung von 50% der HSC und einem um 90 % verschlechterten Homing von HSC (Ehninger und Trumpp, 2011 [13]).

1.1.4 Azelluläre Komponenten

Für die Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellnische im Knochenmark spielt neben den zellulären Komponenten auch die von ihnen sezernierte EZM eine wichtige Rolle. Die Gesamtheit der vom Gewebe synthetisierten und sezernierten Proteine wird als EZM bezeichnet. Die EZM ist organspezifisch und ihre Zusammensetzung hat direkte funktionelle Einflüsse auf die Hämatopoese. Sezernierte Proteine wechselwirken mit den HSC. So ist die Adhäsion an einzelne Komponenten der EZM beispielsweise vom Reifestadium der HSC abhängig (Coulombel et al., 1988 [14]). Einzelne Komponenten wie Osteopontin haben auch direkten Einfluss auf den Zellzyklus der HSC (siehe Osteopontin).

Die Komponenten der EZM lassen sich in drei große Gruppen unterteilen: Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine.

Kollagene

Von den bisher bekannten 26 Kollagenen konnten im Knochenmark bisher Kollagen Typ I, III, IV, V, VI, XII und XIV nachgewiesen werden (Bentley, 1982 [15]; Klein et al., 1995 [16]; Klein et al., 1998 [17]; Nilsson et al., 1998 [18]; Zuckerman und Wicha, 1983 [19]). Kollagen I und IV finden sich in der endostealen Stammzellnische. Kollagen IV wird als typisches Protein der Basalmembran von Gefäßen perivaskulär exprimiert (Nilsson et al., 1998 [18]).

Proteoglykane

Proteoglykane sind eine heterogene Gruppe von Makromolekülen, die an ihrem Proteinkern Glykosaminoglykanseitenketten gebunden haben. Anhand ihrer Seitenketten können die Proteoglykane in vier weitere Untergruppen unterteilt werden: He-

paransulfate, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat. Proteoglykane können Wachstumsfaktoren binden und vor Inaktivierung schützen (Gupta et al., 2000 [20]). Zudem bilden Proteoglykane Netzwerke, auch zusammen mit Kollagen, und stabilisieren dadurch die EZM.

Glykoproteine

Glykoproteine sind eine heterogene Gruppe, zu der wichtige Bestandteile der EZM wie Fibronectin, Tenascin und die Familie der Laminine gehören.

Laminine

Laminine sind eine Gruppe heterotrimerer Proteine. Jedes Laminin (LM) wird aus jeweils einer α -, β - und γ -Kette gebildet. Insgesamt existieren 11 unterschiedliche Lamininketten: 5 α -, 3 β - und 3 γ -Ketten. Von den so theoretisch möglichen 45 Lamininen wurden mittlerweile 18 Laminin-Isoformen beschrieben (Durbeej, 2010 [21]). Diese werden nach den bildenden Ketten benannt, Laminin LM 421 setzt sich also beispielsweise aus der α 4-Kette, der β 2-Kette und der γ 1-Kette zusammen. Laminine dienen der Adhäsion von Zellen an die EZM, aber auch der Vernetzung der EZM untereinander. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und Organogenese und sind auch im adulten Organismus für die Funktion verschiedenster Organe essentiell. Die Expression der Laminin-Isoformen variiert in verschiedenen Geweben. Im Knochenmark, und damit in der hämatopoetischen Stammzellnische, ist die Expression der Laminine LM 411, LM 421, LM 511 und LM 521 beschrieben. Die Adhäsion von HSC an diese Laminine wird durch β 1-Integrine vermittelt (Siler et al., 2000 [22]), dies bestätigten Gu et al. (2003 [23]). Zudem wiesen sie eine Rolle von α 6-Integrin für die Adhäsion an LM 411, 511 und 521 nach. Gu et al. (1999 [24]) wiesen die Expression von LM 411 und LM 511 im Knochenmark von Mäusen nach, ebenso die Expression von LM 211, wobei dies auf eine Expression in glatten Muskelzellen zurückgeführt wurde. Hingegen konnte keine Expression von LM 111 in der Maus nachgewiesen werden. Zusammenfassend zeigten die Arbeiten die Expression der Laminin-Isoformen 411, 421, 511 und 521 im Knochenmark. Hingegen konnte keine Expression von LM 111 und 211 nachgewiesen werden.

Tenascin

Die vier Tenascine (Tenascin-C, -R, -X und -W) verändern die Zell-Matrix-Adhäsion mit anderen Proteinen der EZM und modulieren Zellproliferation und Differenzierung. Im erwachsenen Gewebe ist die Expression von Tenascin-C stark eingeschränkt, eine starke *de novo* Expression von Tenascin-C kann Kennzeichen einer

Verletzung oder Krebserkrankung sein (Chiquet-Ehrismann et al., 2014 [25]). Im gesunden Knochenmark wird Tenascin-C in der periostealen Region und in der Gefäßwand von Arterien exprimiert. Bei verschiedenen Erkrankungen des Knochenmarks, beispielsweise bei der myeloischen Leukämie, wird Tenascin-C im Knochenmark überexprimiert (Soini et al., 1993 [26]). Im „Steady State“ kann der Verlust von Tenascin-C kompensiert werden, hingegen zeigt sich eine verringerte Regenerationsfähigkeit der HSC nach Knochenmarkablation (Nakamura-Ishizu et al., 2012 [27]). Die Tenascinproduktion erfolgt durch adhärente Stromazellen (Klein et al., 1993 [28]).

Fibronektin

Fibronektin, ein durch Disulfidbrücken verknüpftes Heterodimer, kommt ubiquitär in der EZM des menschlichen Körpers vor. Fibronektin kann verschiedene Komponenten der EZM miteinander verknüpfen und über Integrine Zellen an die EZM binden. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen in Femurschnitten von Mäusen zeigen eine starke periosteale Fibronektinsekretion, ebenso wie im Knochen selbst und der endostealen Region, jedoch nicht rund um Gefäße (Nilsson et al., 1998 [18]).

Osteopontin

Osteoblasten exprimieren im Knochenmark das Glykoprotein Osteopontin. Osteopontin scheint in erster Linie die Heilung von Knochen nach Verletzungen oder Infektionen zu unterstützen, zudem spielt es eine Rolle beim Knochenumbau (Denhardt und Noda, 1998 [29]; Liaw et al., 1998 [30]). Neben seinem Einfluss auf den Knochenstoffwechsel scheint Osteopontin jedoch auch eine regulatorische Rolle in der hämatopoetischen Stammzellnische zu spielen. Osteopontin dient im „Steady State“ als negativer Regulator der hämatopoetischen Stammzellproliferation. Es reguliert die Größe des Stammzellpools zum einem, indem diese aktiv im Ruhezustand gehalten werden, und zum anderen durch eine Beschränkung der Stammzellproliferation in Situationen, in denen die Nische zur Proliferation stimuliert wird (beispielsweise durch vermehrte Parathormonausschüttung). Die Expression von Osteopontin scheint zudem essentiell für das „Homing“ der HSC zu sein (Nilsson et al., 2005 [31]; Stier et al., 2005 [32]). Die Rolle von Osteopontin als Tumormarker wird diskutiert. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine erhöhte Osteopontinexpression beim Prostatakarzinom mit erhöhter Proliferation, Migration und Invasion im Mausmodell assoziiert ist (Tilli et al., 2012 [33]).

Netrin-1

Netrin-1 spielt physiologischer Weise eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems und dient hier als neuronales „Guidance“-Protein (Rajasekharan und Kennedy, 2009 [34]). In mehreren Tumoren ist eine Überexpression von Netrin-1 beschrieben, beispielsweise in metastasierenden Brusttumoren. Eine verminderte Netrin-1-Expression führt hierbei experimentell zu verminderter Apoptose (Fitamant, 2008 [35]). Im Prostatakarzinom scheint die Expression von Netrin-1 hingegen herabgesetzt zu sein (Latil et al. 2003 [36]).

Mediero et al. (2015 [37]) zeigten in ihrer Arbeit, dass Netrin-1 und sein Rezeptor Unc5b eine Rolle bei der Differenzierung von Osteoklasten, nicht aber von Osteoblasten spielen und konnten eine erhöhte Knochendichte in Netrin-1 Knockout-Mäusen zeigen. Netrin-1 zeigte jedoch keinen direkten Effekt auf die Knochenbildung. Darüber hinaus ist über die Rolle von Netrin-1 im Knochen beziehungsweise in der hämatopoetischen Stammzellnische bisher nur wenig bekannt.

1.1.5 Hämatopoetische Stammzellen

Die HSC ist die Ursprungszelle sämtlicher Blutzellen. Durch Differenzierung können aus ihr sowohl B- und T- Lymphozyten als auch myeloische Zellen wie Erythrozyten, Monozyten, Megakaryozyten und Granulozyten entstehen. Auf Grund der zum Teil sehr kurzen Lebenszeit der Blutzellen muss eine dauerhafte Produktion der Blutzellen gewährleistet sein. Dies ist nur durch die Fähigkeit der HSC sowohl zur Selbsterneuerung als auch zur Differenzierung in alle Zelltypen des Blutes möglich. Die Differenzierung ist ein schrittweiser Prozess: Aus den zur Selbsterneuerung fähigen HSC entstehen zunächst die Vorgängerzellen der myeloischen und lymphatischen Reihe. In weiteren Differenzierungsschritten entstehen am Ende die peripheren Blutzellen: T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten (siehe Abbildung 1.2).

Stromazellen sowie die EZM und sezernierte lösliche Zytokine regulieren sowohl die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus der HSC als auch die Differenzierung in die unterschiedlichen Blutzellen. Zudem dienen diese Komponenten dem „Homing“ und der Adhäsion der HSC in der Stammzellnische.

Die vielfältig untersuchte CXCR4/CXCL12 Achse spielt eine wichtige Rolle für das Homing der HSC. CXCL12 wird von zahlreichen Stromazellen in der hämatopoetischen Stammzellnische, beispielsweise den Osteoblasten, den MSC und den CAR-Zellen, sezerniert (Aiuti et al., 1997 [39]; Sugiyama et al., 2006, [40]; Jung et al., 2006, [41]; Greenbaum et al., 2013 [42]). Das sezernierte Chemokin bindet

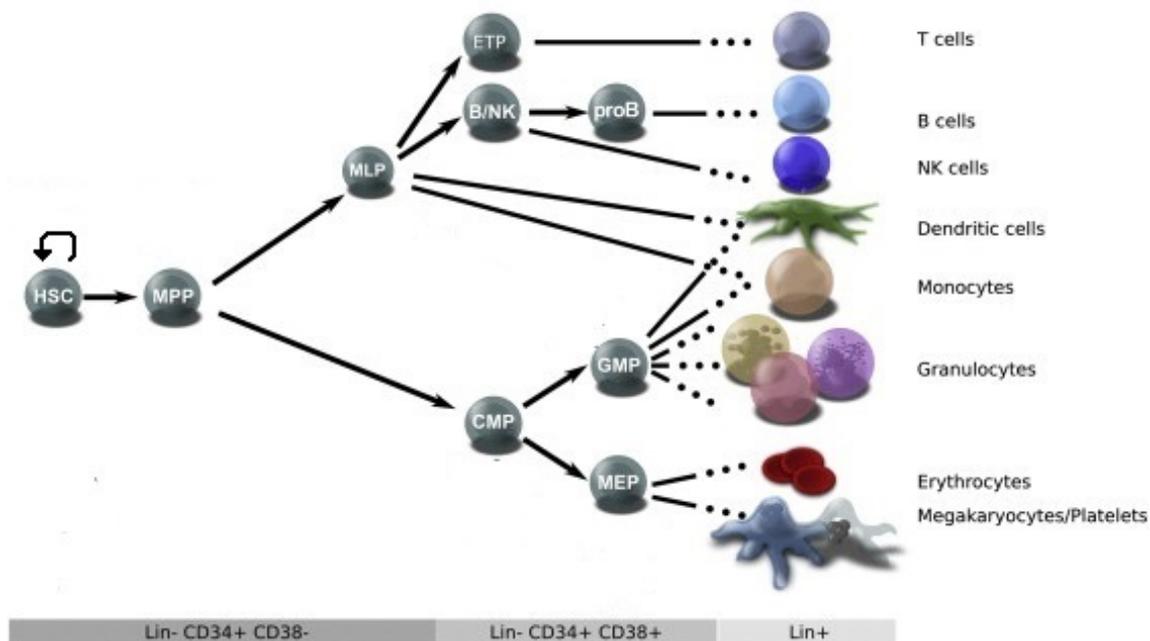


Abbildung 1.2: **Ablauf der Hämatopoese im Menschen.** Die HSC differenziert zunächst in eine lymphatische und myeloische Vorläuferzelle. In weiteren Differenzierungsschritten entstehen schlussendlich die peripheren Blutzellen: T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Die Expression von Oberflächenmarkern verändert sich im Verlauf der Differenzierung. Die am wenigsten differenzierten Zellen sind CD34+ und CD38-. Es werden keine für reife Zellen typischen Oberflächenmarker exprimiert (lin-). Legende: HSC= „hematopoietic stem cells“, MPP= „multipotent progenitors“, MLP= „multilymphoid progenitors“, ETP= „earliest thymic progenitors“, CMP= „common myeloid progenitor“, GMP= „granulocyte-macrophage progenitor“, MEP= „megakaryocytic-erythroid progenitor“, Lin-/+ = „lineage negative/positive“ (modifiziert nach Doulatov et al, 2012 [38])

an den CXCR4 Rezeptor auf HSC und führt hier nicht nur zur Retention im Knochenmark (Peled et al., 1999 ([43]), sondern spielt auch eine entscheidende Rolle bei der „Ruhigstellung“ (quiescence) und Selbsterneuerung der HSC (Tzeng et al., 2011 [44]). Hierbei scheinen vor allem CAR-Zellen als auch die MSC essentiell für die Ausschüttung von CXCL12 und damit der Retention im Knochenmark zu sein (Anthony und Link, 2014 [45]).

CD34+CD38- Zellen

Während des Differenzierungsprozesses von HSC hin zu differenzierten Blutzellen wird eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächenmarker exprimiert. Die Expression von CD34 gilt hierbei als guter Marker für humane HSC. Im weiteren Reifungspro-

zess kommt es zu einer Expression von CD38. Daher gilt die CD34+CD38- Subpopulation als besonders früher Vorläufer der HSC (Novelli et al. 1998 [46]; Ogawa, 2002 [47]).

1.1.6 Klinische Bedeutung

Nur bei einem optimalen Zusammenspiel zwischen den HSC und ihrer Nische ist eine funktionierende Hämatopoese möglich. Dies wird bei einer pathologischen Veränderung des Knochenmarks wie der primären Myelofibrose deutlich. Es handelt sich hierbei um eine myeloproliferative Erkrankung, bei der es zu einer schrittweisen Fibrosierung des Knochenmarks kommt. Diese Veränderungen führen zu einer Insuffizienz der Hämatopoese, welche klinisch durch Anämie, Thrombozytopenie und einer Linksverschiebung des Blutbilds apparent wird. Durch die Insuffizienz des Knochenmarks kommt es zur extramedullären Blutbildung in der Milz mit Splenomegalie (Herold, Innere Medizin [48]).

Durch die immer genaueren Kenntnisse über die Interaktion der HSC mit der hämatopoetischen Stammzellnische ist es heutzutage möglich, diese gezielt zu therapeutischen Zwecken zu manipulieren. Dies wird vor allem bei der allogenen und autologen Stammzelltransplantation genutzt, die bei vielen hämatologischen Erkrankungen (Leukämien, Lymphome und Multiples Myelom) sowohl Ultima ratio als auch die einzige kurative Therapieoption darstellt. Prinzipiell lassen sich zwei Verfahren zur Gewinnung des Stammzelltransplantates unterscheiden: Zum einen die direkte Aspiration von Knochenmark aus dem Beckenkamm und die heutzutage bevorzugte Aphaese, bei der HSC nach vorheriger Mobilisierung durch G-CSF aus dem peripheren Blut separiert werden.

G-CSF führt über verschiedene Mechanismen zu einer Mobilisierung von HSC ins periphere Blut: Es führt zu einer Herunter-Regulation von CXCL12, einer Aktivierung verschiedener Proteasen, welche N-terminal CXCL12 kürzen und hierdurch die Bindung an CXCR4 verschlechtern, sowie der Erhöhung weiterer Zytokine und Wachstumsfaktoren, die zu einer erhöhten Mobilisierung von HSC ins periphere Blut führen. Eine Mobilisierung ist auch mit dem direkten CXCR4 Antagonist Plerixafor möglich, der direkt in die wichtige CXCR4/CXCL12 Achse eingreift (Alvarez et al. 2013 [49]; To et al., 2011 [50]).

1.2 Mammakarzinom

1.2.1 Prävalenz

Jährlich erkranken in Deutschland mehr als 70.000 Frauen an Brustkrebs. Dies entspricht fast einem Drittel der Krebsneuerkrankungen bei Frauen. Damit ist Brustkrebs die mit Abstand häufigste Krebserkrankung bei Frauen (siehe Abbildung 1.3). Im Jahr 2010 starben in Deutschland über 17.000 Frauen an Brustkrebs, damit ist die Brustdrüse auch die häufigste Tumorlokalisation bei den Krebssterbefällen (siehe Abbildung 1.4). Die Prognose des Mammakarzinoms ist stark vom Stadium, indem die Krankheit diagnostiziert wird, abhängig. Insgesamt ist die Prognose für Brustkrebspatientinnen mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 87% aber sehr gut (Krebs in Deutschland, RKI [51], S.16;17;68). Liegt bereits eine Metastasierung des Tumors vor, sinkt die 5-Jahresüberlebensrate jedoch stark ab. In den USA beträgt diese dann lediglich 26% (National Cancer Institute, USA [52]). Die häufigste Lokalisation bei der Metastasierung des Mammakarzinoms ist der Knochen. In Autopsiestudien wurden bei 65-75% der Patientinnen Knochenmetastasen gefunden (Coleman, 2001 [53]). Vor allem unter dem Aspekt, dass der Großteil der Krebspatienten nicht am Primärtumor, sondern an den Folgen der Metastasierung verstirbt, erscheint es relevant, die hierfür verantwortlichen Mechanismen genauer zu verstehen.

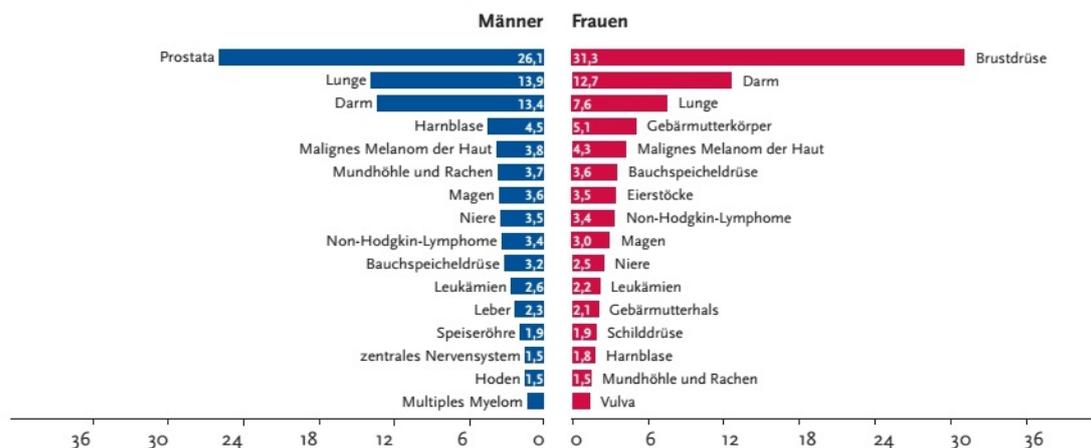


Abbildung 1.3: **Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs).** Prostatakrebs und Brustkrebs sind die jeweils mit Abstand häufigsten Tumorlokalisationen bei Mann und Frau (Quelle: Krebs in Deutschland, RKI [51], S.16)

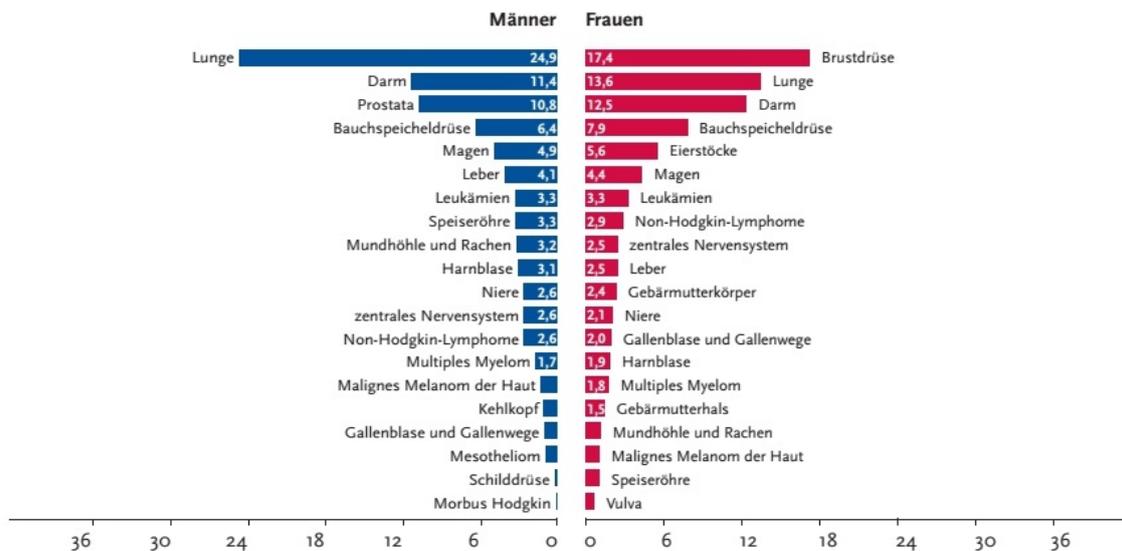


Abbildung 1.4: **Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2010.** Durch den häufig benignen Verlauf des Prostatakarzinoms steht das Prostatakarzinoms beim Mann, trotz seines sehr häufigen Auftretens, nur an dritter Stelle der Häufigkeit der Krebssterbefälle. Brustkrebs ist bei Frauen nicht nur die häufigste Tumorlokalisation, es ist zudem auch die häufigste Todesursache unter allen Krebserkrankungen bei Frauen (Quelle: Krebs in Deutschland, RKI [51], S.17)

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist bis heute nicht abschließend geklärt. Durch epidemiologische Studien konnten jedoch Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms identifiziert werden (Krebs in Deutschland, RKI [51], S.68): Eine frühe erste sowie eine späte letzte Regelblutung und Nulliparität erhöhen das Risiko für Brustkrebs. Der Einfluss einer postmenopausalen Hormontherapie ist umstritten, jedoch scheint insbesondere eine Kombinationstherapie aus Östrogenen und Gestagenen das Brustkrebsrisiko zu steigern. Bewegungsmangel, Übergewicht, Alkoholkonsum und Rauchen konnten als weitere Risikofaktoren identifiziert werden. Die meisten Brustkrebserkrankungen treten sporadisch auf. Mittlerweile sind zudem unterschiedliche Mutationen gefunden worden, die zum Tumorwachstum führen. Am bekanntesten sind hierbei Mutationen im Tumorsuppressorgen BRCA1 und BRCA2. In 5-10% aller Brustkrebserkrankungen liegt eine dieser Mutationen vor. Das Risiko einer Frau mit BRCA1-Mutation bis zum 70. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken liegt bei 65%, bei einer BRCA2-Mutation bei 45% (Antoniou et al., 2003 [54]).

Einzige Prophylaxe einer möglichen Tumorerkrankung stellt bisher die beidseitige Mastektomie dar.

1.2.3 Therapie

Für die Behandlung von Mammakarzinomen stehen die drei Säulen der Malignomtherapie zur Verfügung: Operation, Bestrahlung und Chemotherapie. Vor allem in frühen Stadien der Erkrankung ist eine R0-Resektion des Tumors, also eine Resektion ohne mikroskopischen Nachweis von Tumorgewebe am Rand des Resektats, das primäre Therapieziel. Zusätzlich dazu war das Mammakarzinom eine der ersten Tumorarten, bei der die sogenannte „targeted therapy“ Anwendung in der klinischen Praxis erfuhr. Hierbei wird gezielt der Metabolismus der Krebszellen durch Blockierung unterschiedlicher Zielstrukturen gehemmt. Beispielsweise werden Patientinnen, bei denen eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor „Human epidermal growth factor receptor 2“ (HER2/neu) immunhistochemisch nachgewiesen wird, mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab behandelt (Untch et al., 2006 [55]).

Trotz der großen Fortschritte in der Behandlung von Mammakarzinomen ist bis heute keine kurative Therapie beim Auftreten einer Fernmetastasierung möglich. Daher erfolgt hier in der Regel ein palliatives Therapiekonzept. Ziel ist es hierbei, das Leben des Patienten zu verlängern, wobei ein besonderes Augenmerk auf dem Erhalt oder der Besserung der Lebensqualität der Patientinnen liegt. Zur Therapie angewendet wird die palliative Chemotherapie oder eine „targeted therapy“ in Form einer endokrinen Therapie oder Anti-HER-2-Therapie. Beim Auftreten von osseären Metastasen werden Bisphosphonate und RANKL-Antikörper wie Denosumab eingesetzt (Mammakarzinom der Frau Leitlinie, S.22-23;32-33 [56]). Durch die Anwendung von Bisphosphonaten und RANKL-Antikörpern kann die Progression vorhandener Metastasen verringert werden, tumorbedingte Knochenschmerzen werden durch die Therapie gelindert (Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, S.215 [57]). Bisphosphonate hemmen die Aktivität von Osteoklasten und verhindern somit die Resorption von Knochensubstanz. Zudem zeigen Studien eine direkte antikanzerogene Wirkung (Cleardin, 2013 [58]). RANKL bindet normalerweise an RANK-Rezeptoren auf Osteoklasten. Durch die Aktivierung des RANK-Rezeptors wird vermehrt Knochen abgebaut (Differenzierung unreifer Osteoklasten, verlängertes Überleben und Funktionsverstärkung). Der Antikörper verhindert diese Mechanismen (Goessl et al., 2012 [59]).

1.3 Prostatakarzinom

1.3.1 Prävalenz

Das Prostatakarzinom ist mit über einem Viertel der Neuerkrankungen die häufigste Tumorlokalisation beim Mann (siehe Abbildung 1.3). Fast 66.000 Männer erkrankten im Jahr 2010 an Prostatakrebs. Auf Grund der exzellenten relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 93% sind Tumore der Prostata jedoch nur die dritthäufigste Lokalisation bei den Todesfällen durch Krebs (siehe Abbildung 1.4). Die Mehrzahl der Tumoren wird in den frühen Stadien T1 und T2 entdeckt (Krebs in Deutschland, RKI [51], S.16;17;88). Das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken steigt mit dem Alter. Franks (1954 [60]) stellte gar die These auf, dass mit zunehmendem Alter es unumgänglich zum Wachstum eines Prostatakarzinoms kommt. In der Mehrzahl der Fälle bleibt die Erkrankung jedoch latent und führt zu keinerlei Beschwerden beim Patienten und auch nicht zu dessen Tod. Nur jeder 10. Mann erkrankt an einem klinisch manifesten Prostatakarzinom und lediglich 3% der Patienten versterben an ihrem Prostatakarzinom (Scardinon et al., 1992 [61]). Vergleichbar zum Mammakarzinom kommt es auch beim Prostatakarzinom in fortgeschrittenen Krankheitsstadien häufig zu einer Metastasierung in den Knochen. Bei Prostatakarzinompatienten finden sich in Autopsiestudien bei 65-75% der Patienten Knochenmetastasen. Zusammengenommen sind das Mammakarzinom und das Prostatakarzinom für über 75% der Knochenmetastasen verantwortlich (Coleman, 2001 [53]).

1.3.2 Ätiologie und Pathogenese

Bisher sind die Ursachen für das Auftreten eines Prostatakarzinoms weitestgehend unbekannt. Zwar konnte mittlerweile eine familiäre Häufung als Risikofaktor ausgemacht werden, welche Genveränderungen zugrunde liegen ist jedoch unklar. Prostatakarzinome kommen häufiger bei Schwarzafrikanern (beziehungsweise Männer mit schwarzafrikanischem Ursprung) als bei Europäern vor. Bei Asiaten treten Prostatakarzinome relativ selten auf. Androgene sind essenziell für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms (Krebs in Deutschland, RKI [51] S.88).

1.3.3 Therapie

Wird bei einem Patienten die Diagnose eines Prostatakarzinoms gestellt, muss im Gegensatz zu den meisten Tumorentitäten zunächst überprüft werden, ob überhaupt eine Therapie eingeleitet werden soll. Unter bestimmten Voraussetzungen ist

aktives Abwarten („active surveillance“) auf Grund der häufig exzellenten Prognose und langsamen Progression des Prostatakarzinoms einer Therapie vorzuziehen. Voraussetzung für ein lediglich abwartendes Handeln sind unter anderem ein geringer PSA-Wert, ein niedriger Gleason-Score, ein niedriges Tumorstadium sowie eine geringe Lebenserwartung, unabhängig vom Karzinom, des Patienten. Kommt es im Verlauf zu einer Progression der Erkrankung kann sekundär eine Therapie, am häufigsten eine radikale Prostatektomie, erfolgen (Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms [62]).

Kurative Therapieoptionen sind die radikale Prostatektomie sowie Bestrahlung. In fortgeschrittenen Stadien erfolgt zusätzlich eine Hormontherapie. Die Hormontherapie spielt auch in der Palliativtherapie eine Rolle, sie wird hier durch Chemotherapien ergänzt [62]. Die Hormontherapie basiert auf der Testosteronabhängigkeit vieler Prostatakarzinome. Drei Prinzipien ermöglichen die Unterdrückung der Testosteronproduktion und damit eine Unterdrückung des Tumorwachstums: „Gonadotropin-Releasing-Hormon“ (GnRH)-Analoge, GnRH-Antagonisten (Hemmung der hypophysären Hormonproduktion) oder Antiandrogene (Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis [63]). Die Orchiektomie wird heute weniger häufig angewendet. Kommt es in fortgeschrittenen Stadien zu Knochenmetastasen, kann lokale Bestrahlung oder die Anwendung von Radionukliden hilfreich sein, um Schmerzen zu mindern und pathologische Frakturen zu vermeiden. Bisphosphonate können ergänzend zur Schmerztherapie eingesetzt werden. Alle genannten Therapien führen jedoch nicht zu einer Lebensverlängerung des Patienten (Leitlinie Prostatakarzinom, 2011 [62]).

1.4 Dissemination von Tumorzellen in die hämatopoetische Stammzellnische

Bereits 1889 formulierte Paget erstmals die Theorie, dass für die Metastasierung eines Tumors nicht nur die Tumorzellen bestimmte Eigenschaften aufweisen müssen, die sie zur Metastasierung befähigen, sondern auch im Zielgewebe bestimmte Strukturen die Metastasierung ermöglichen müssen. Hierfür verwendete er das Bild der Samen einer Pflanze, die zunächst willkürlich durch den Wind verteilt werden. Eine neue Pflanze kann aber nur wachsen, wenn der Samen auf fruchtbaren Boden trifft (Paget, 1889 [64]). Die These wurde später als „seed-and-soil“ Theorie bekannt und bildet bis heute eine Grundlage für das Verständnis der Tumormetastasierung. Therapieangriffspunkte können also nicht nur die Tumorzellen selbst

sein, sondern auch die sogenannten Nischen, in denen sich Tumorzellen ansiedeln können und die durch das von ihnen zur Verfügung gestellte Mikromilieu die Metastasierung erst ermöglichen. In Form von Antikörpern gegen „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF), die eine Bildung von neuen Gefäßen verhindern und damit das Tumorwachstum begrenzen, gibt es schon heute eine klinische Anwendung dieser Überlegung. Ein besseres Verständnis der Nischenbedingungen, die Tumorzellen benötigen, um metastasieren zu können, erscheint zwingend notwendig, um noch zielgerichteter therapieren zu können und auch Patienten, die unter einer metastasierten Tumorerkrankung leiden, neue Therapieoptionen und Heilungschancen zu eröffnen. Neben der Lunge, der Leber und dem Gehirn ist vor allem auch der Knochen ein häufiger Manifestationsort von Metastasen.

Das Mikromilieu des Knochens, das sich sowohl aus der EZM und spezifischen Zelltypen zusammensetzt, stellt einen besonders fruchtbaren Boden für das Wachstum unterschiedlicher Tumorzellen dar. Osteoblasten und andere Stromazellen sezernieren Zytokine, welche zur Migration von Tumorzellen in die Nische führen. Zusätzlich stellen sie Bindungsstellen für die Tumorzellen zur Verfügung. Die Mechanismen sind dabei vergleichbar mit dem „Homing“ der HSC (Weilbaeher et al., 2011 [65]). Dies spricht dafür, dass die hämatopoetische Stammzellnische neben den HSC auch von Tumorzellen besetzt und manipuliert wird.

Diese Dissemination von Tumorzellen in die hämatopoetische Stammzellnische wurde beispielsweise für das Multiple Myelom beschrieben. Beim Multiplen Myelom handelt es sich um ein aggressives B-Zell-Lymphom, dessen Ausgangszelle eine maligne transformierte Plasmazelle ist. Durch Infiltration ins Knochenmark kommt es zur Zerstörung des Knochens sowie der Verdrängung der normalen Blutbildung (Herold, Innere Medizin, S.74 f. [48]).

In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass eine gesunde B-Zellentwicklung abhängig ist von in der hämatopoetischen Stammzellnische sezernierten Zytokinen wie CXCL12 (Nagasawa, 2006 [66]). Aber auch die maligne transformierten Plasmazellen des Multiplen Myeloms benötigen zur Proliferation die Stromazellen des Knochenmarks. Hierbei nutzen die Zellen des Multiplen Myeloms jedoch nicht nur die bestehende Nischenstruktur im Knochenmark. Vielmehr kommt es durch die malignen Zellen zu einem Umbau der Nische, hin zu einem optimalen Umfeld für die Tumorprogression. Hierbei kommt es zum einen zu einer veränderten Zytokinausschüttung: Eine verstärkte Vaskularisierung der endostealen Nische, deren hypoxisches Umfeld normalerweise ideale Bedingungen für die ruhenden HSC darstellt, stimuliert das Tumorwachstum des Multiplen Myeloms. Gleichzeitig führt der Umbau der hämatopoetischen Stammzellnische durch eine erhöhte Osteoklasten- und

verringerte Osteoblastenaktivität zu einer Einschränkung der Hämatopoese (Noll et al., 2012 [67]).

1.4.1 Mammakarzinom

Die häufige Metastasierung von Brustkrebs in den Knochen legt nahe, dass hier bestimmte Faktoren exprimiert werden, welche eine Metastasierung begünstigen. Ein möglicher Kandidat ist hier die für das „Homing“ von HSC wichtige CXCR4/CXCL12 Achse. Mammakarzinomzellen zeigen eine hohe Expression von CXCR4. Dessen Ligand CXCL12 wird vor allem in den häufigsten Metastasierungszielen von Brustkrebs, Lymphknoten, Lunge, Leber und Knochen, stark exprimiert (Müller et al., 2001 [68]). Die bekannte Wichtigkeit der CXCR4/CXCL12 Achse für das „Homing“ der HSC legt daher einen Einfluss auf die Metastasierung von Mammakarzinomzellen in die hämatopoetische Stammzellnische nahe. Die Blockierung von CXCR4 führte zu verringerten Migrationseigenschaften von Brustzellen in knochen-konditioniertem Medium (Müller et al., 2001 [68]).

1.4.2 Prostatakarzinom

Prostatakarzinomzellen zeigen eine signifikant erhöhte CXCR4 und CXCL12 Expression (Sun et al., 2003 [69]), was auf eine mögliche Bedeutung dieser Achse für die Metastasierung von Prostatakarzinomzellen in den Knochen hindeutet. Beruhend auf diesen Erkenntnissen konnten Shiozawa et al. (2011 [70]) zeigen, dass disseminierte Prostatakarzinomzellen mit HSC um Plätze in der osteoblastischen Stammzellnische konkurrieren und dabei in Kolokalisation zu den HSC in der endostealen Nische zu finden sind. Die Größe der osteoblastischen Nischen korreliert dabei mit der Anzahl der disseminierten Tumorzellen. Zudem konnte durch die Applikation von G-CSF beziehungsweise AMD3100, einem CXCR4-Inhibitor, nicht nur die Mobilisierung von HSC, sondern auch von disseminierten Tumorzellen erreicht werden. Dies erscheint als ein vielversprechender Ansatz, um disseminierte Tumorzellen einer konventionellen Chemotherapie zugänglich zu machen.

Diese Daten zeigen eine hohe Evidenz für eine mögliche Okkupierung der hämatopoetischen Stammzellnische durch Prostatakarzinomzellen und werfen die Frage auf, ob die Nische außerdem fähig ist, Tumorzellen in einem Ruhezustand ähnlich dem der HSC zu halten (Shiozawa et al., 2011 [71]). Durch den Übergang in einen solchen Ruhezustand erklärt man sich unter anderem die Tatsache, dass Tumorzellen

len eine Chemotherapie überleben und noch Jahre nach der erhofften Heilung zu Spätrezidiven führen (Pedersen et al., 2012 [72]).

1.5 „Single Cell Force Spectroscopy“ mit Hilfe der „Atomic Force Microscopy“

Für den Verbleib in der hämatopoetischen Stammzellnische ist eine Adhäsion zwischen HSC und sowohl den zellulären als auch azellulären Komponenten der Nische essentiell. Dies gilt ebenso für die potentielle Adhäsion von Tumorzellen in der Nische. Im Gegensatz zu qualitativen Methoden wie beispielsweise dem „Plate-and-wash Assay“ bietet die „Single Cell Force Spectroscopy“ (SCFS) die Möglichkeit, die Adhäsion sowohl zwischen zwei Zellen als auch zwischen einer Zelle und Proteinen der EZM auf dem Niveau einer einzelnen Zelle zu quantifizieren. Somit können nicht nur wichtige Bindungspartner innerhalb der Stammzellnische identifiziert werden, sondern auch die Adhäsion an unterschiedliche Komponenten miteinander verglichen werden.

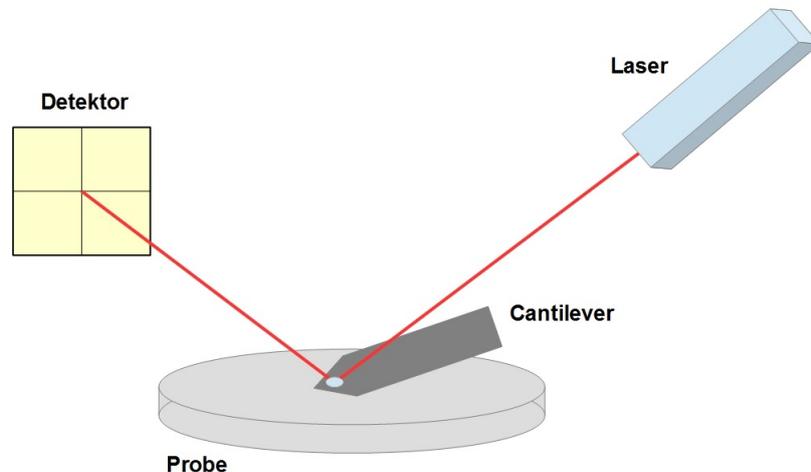


Abbildung 1.5: **Funktionsprinzip der SCFS.** Der vom Laser ausgestrahlte Laserstrahl wird vom Cantilever reflektiert und von einem Detektor registriert. Durch den Kontakt zur Probe und die Interaktion zwischen der zu untersuchenden Zelle und der Probe kommt es zur Krümmung des Cantilevers. Hierdurch wird der Strahlengang verändert, umso stärker, je stärker die Interaktionskräfte sind. Vom Detektor wird diese Ablenkung registriert und schließlich in Form einer Kraftkurve dargestellt.

Die SCFS beruht auf dem Prinzip des Rasterkraftmikroskopes [„Atomic Force Microscope“ (AFM)]: Kernstück ist eine Blattfeder, der sogenannte Cantilever. Am

Cantilever wird die zu untersuchende Zelle befestigt und der zu untersuchenden Probe angenähert. Berühren sich Zelle und Probe, kommt es zu einer Verbiegung des Cantilevers. Dies führt zu einer Ablenkung des Laserstrahles, welche durch einen Detektor aufgezeichnet wird (siehe Abbildung 1.5). Ebenso kommt es bei der entgegengesetzten Bewegung, also dem Entfernen des Cantilevers von der Probe, zu einer Auslenkung, die davon abhängig ist, wie stark die Adhäsion zwischen Zelle und Probe ist. Beide Bewegungen werden in Form einer Kraftkurve aufgezeichnet, bei der die vertikale Ablenkung des Cantilevers gegen die Höhe des Cantilevers aufgezeichnet wird. Durch eine vor Beginn durchgeführte Eichung des Cantilevers kann diese Ablenkung mit der dafür benötigten Kraft korreliert werden und die Adhäsion zwischen Zelle und Probe in Nano-Newton (nN) angegeben werden. Hierfür wird die maximale Ablenkung des Cantilevers beim Zurückziehen im Vergleich zum Nullwert bestimmt, die sogenannte „Detachment Force“. Sie repräsentiert die Stärke der Adhäsion zwischen Zelle und Probe. Die genaue Auswertung ist im Kapitel 2.4.5 beschrieben.

Die hohe Sensitivität der SCFS macht die Messungen anfällig für Störungen durch Vibrationen, Umgebungsgeräusche sowie schwankende Temperaturen (Friedrichs et al., 2013 [73]). Durch die Verwendung von Isoliertischen zur Vermeidung von Vibrationen und der Kontrolle der Temperatur sowie die Durchführung der Versuche in einer geräuscharmen Umgebung kann diesen Störfaktoren effektiv begegnet werden. Zudem muss die Morphologie der zu untersuchenden Zellen während des Experimentes ständig überwacht werden, um eventuelle Veränderung der Zelle, beispielsweise durch den Druck auf die Oberfläche zu erkennen und die Messungen mit der entsprechenden Zelle zu beenden und mit einer anderen, nicht beschädigten Zelle fortzuführen (Friedrichs et al., 2013 [73]).

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Shiozawa et al. (2011 [70]) konnten in den von ihnen durchgeführten Mausexperimenten zeigen, dass zirkulierende Prostatakarzinomzellen direkt mit HSC um Bindungsstellen in der hämatopoetischen Stammzellnische konkurrieren. Dabei konnten die in das Knochenmark metastasierten Tumorzellen durch Stammzellmobilisierungsprotokolle, welche normalerweise bei allogenen Stammzelltransplantationen verwendet werden, ins periphere Blut mobilisiert werden. Dies spricht für gleiche Bindungsmechanismen im Knochenmark. Neben der direkten Competition um Bindungsplätze ist jedoch noch ein weiterer Mechanismus vorstellbar: Rund 1-5 % der HSC scheinen

tächlich in die Blutzirkulation überzugehen. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass die HSC fest in der Nische verankert sind und nur nach Zellteilung in die Zirkulation gelangen können, scheint also ein deutlich größerer Umsatz in der hämatopoetischen Stammzellnische zu herrschen (Bhattacharya et al., 2009 [74]). Die ständige Zirkulation der HSC führt dazu, dass in der Nische potentiell freie Bindungsplätze sind. An diese freien Bindungsplätzen könnten neben HSC auch zirkulierende Tumorzellen binden. Vorstellbar ist also nicht nur, dass die Tumorzellen HSC von ihren Nischenplätzen verdrängen, sondern auch, dass sie stattdessen ohne aktive Verdrängung freie Plätze in der Nische einnehmen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Affinität an zelluläre und azelluläre Bindungspartner in der hämatopoetischen Stammzellnische von HSC sowie Prostata- und Mammakarzinomzellen zu vergleichen. Außerdem sollte untersucht werden, ob Prostata- und Mammakarzinomzellen HSC aktiv aus der hämatopoetischen Stammzellnische verdrängen können. Hierfür wurden *in vitro* Experimente mit humanen Zelllinien durchgeführt.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Kultivierung humaner Zelllinien

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und 5% Kohlenstoffdioxid kultiviert (HERACELL 240i, Thermo Scientific, Dreieich). Zur Kultivierung wurden 75 cm² Kulturflaschen verwendet (Biochrom AG, Berlin). Die Zellkulturmedien RPMI 1640 und DMEM (Gibco Life Technologies, Darmstadt) wurden mit fetalem Kälberserum (FCS) (PAA, Pasching, Österreich) versetzt. Vor Gebrauch wurde das FCS für 30 min bei 57°C hitzeinaktiviert und über einen 0,45 Mikrometer (μm) Filter sterilfiltriert.

Als Modell für osteoblastische Zellen wurde die Zelllinie CAL 72 gewählt. Sie wurde aus einem anaplastischen osteoblastischen Sarkom eines 10-jährigen Jungen isoliert. Diese Zelllinie exprimiert ein ähnliches Zytokinspektrum wie primäre Osteoblasten und ist daher als Modell zur Untersuchung der Rolle von Osteoblasten in der hämatopoetischen Stammzellnische geeignet (Rochet et al., 1999 [75]). CAL 72 verhindert nicht die hämatopoetische Kolonieformation und kann limitiert eine Expansion von hämatopoetischen Vorläuferzellen unterstützen, vergleichbar zu normalen Osteoblasten (Rochet et al., 2003 [76]). CAL 72 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen und in DMEM-Medium [Gibco Life Technologies, angereichert mit 10% FCS, 1% Penicillin- und Streptomycinlösung (10 mg/ml) (P/S-Lösung), Biochrom AG] sowie einfach konzentriertem Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit Supplement (ITS; Gibco Life Technologies) kultiviert.

Die Leukämiezelllinie KG-1a diente als Surrogatzelllinie für hämatopoetische Stammzellen. KG-1a Zellen sind humane hämatopoetische CD34+ Progenitorzellen. KG-1a Zellen sind morphologisch und funktionell undifferenziert. Es handelt sich hierbei um einen Subklon der KG1-Zelllinie, die aus dem Knochenmark eines 59-jährigen Mannes mit akuter myeloischer Leukämie gewonnen wurde (Koeffler et al., 1980 [77]). Die Zelllinie KG-1a wurde von der DSMZ bezogen und in RPMI 1640 Medium angezüchtet, welches mit 20 % FCS sowie 1 % P/S-Lösung versetzt wurde.

Zwei Tumorzelllinien dienten als Modellsystem für die ins Knochenmark metastasierenden Tumorzellen: Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 sowie die Prostatakarzinomzelllinie PC3. Bei der Zelllinie MDA-MB-231 [„American Type Culture Collection“, Manassas, USA (ATCC)] handelt es sich um eine hochinvasive Brustkrebszelllinie, die bei intrakardialer Injektion bei Mäusen bevorzugt in den Knochen metastasiert (Yoneda, 2000 [78]). Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium angezüchtet. Dieses wurde mit 10% FCS, 1% Antibiotische/ Antimykotische-Lösung (10 mg/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B; PAA), 20 mM HEPES-Puffer (PAA) und 2 mM L-Glutamin (Biochrom AG) versetzt. Bei der Prostatakarzinomzelllinie PC3 (ATCC) handelt es sich um ein schlecht differenziertes Adenokarzinom. Hierbei haben die Tumorzellen nur noch geringe Gemeinsamkeiten mit dem Ursprungsgewebe der Prostata. Die Zelllinie wurde post-mortem aus dem Knochenmark eines Grad IV Prostatakarzinompatienten gewonnen. Zur Kultivierung wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium angezüchtet, dieses wurde mit 10% FCS und 1 % P/S-Lösung versetzt.

Abbildung 2.1 zeigt die verwendeten Zelllinien in Kultur: Die Zelllinien CAL 72, PC3 und MDA-MB-231 adhäreren an der Oberfläche der Kulturflaschen. Dabei flachen die Zellen ab und werden spindelförmig. Die KG-1a Zellen hingegen adhäreren nicht, sondern verbleiben in Suspension.

2.1.2 Mediumwechsel, Ablösen und Passagieren humaner Zelllinien

Alle 2-3 Tage wurde bei den kultivierten Zelllinien ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Kulturmedien durchgeführt. Hierfür wurden die Suspensionszellen KG-1a für 10 Minuten (min) bei 150 x g pelletiert, anschließend der Überstand komplett verworfen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen. Die Passagierung der Zellen erfolgte circa 2-3 mal pro Woche, spätestens wenn die Zellen eine Dichte von $8 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ Zellen/Milliliter (ml) erreicht hatten. Hierfür wurden die Zel-

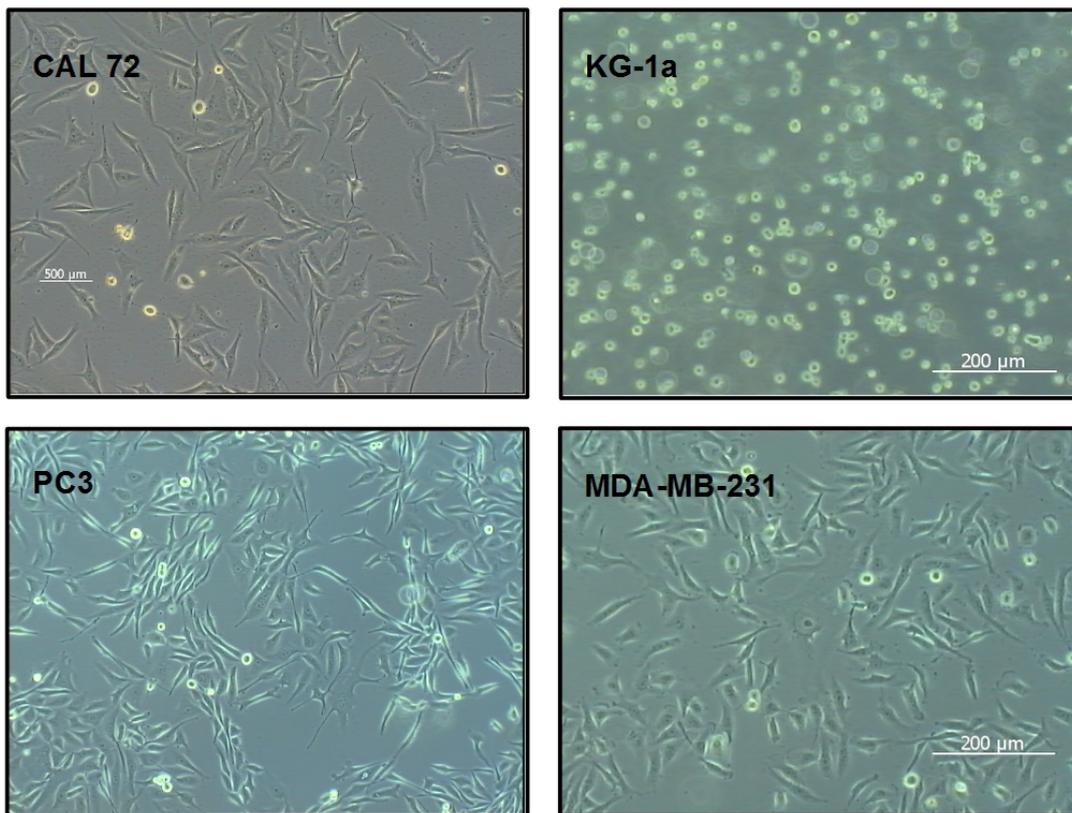


Abbildung 2.1: **Verwendete Zelllinien in der Zellkultur.** Lichtmikroskopische Aufnahmen der für die Experimente verwendeten Zelllinien: Oben links die adhäre osteoblastische Zelllinie CAL 72, oben rechts die Suspensionszelllinie KG-1a, unten links die adhäre Prostatakarzinomzelllinie PC3 sowie unten rechts die adhäre Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231

len nach Pelletierung in einer entsprechenden Menge Kulturmedium aufgenommen, sodass die Zellen im Anschluss eine Dichte von $2-4 \cdot 10^5$ Zellen/ml hatten. Die adhären Zelllinien MDA-MB-231, PC3 und CAL 72 wurden zum Mediumwechsel nach Abnahme des Kulturmediums zunächst mit „Phosphate Buffered Saline“ ohne Calcium und Magnesium (PBS -/-; Gibco Life Technologies) gewaschen und danach mit frischem Kulturmedium bedeckt. Bei einer Konfluenz von 90-100% wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS -/- mit Hilfe von Accutase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) vom Flaschenboden gelöst. Durch die Zugabe von Kulturmedium wurde der Ablösevorgang gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen bei $150 \times g$ für 10 min pelletiert und danach in frischem, serumhaltigem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis je nach gewünschter Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit (1:3 bis

1:20) in neuen Kulturflaschen ausgesät. Die Passagierung erfolgte 2-3 mal pro Woche.

2.1.3 Kryokonservierung humaner Zelllinien

Die Zellen einer konfluent bewachsenen Kulturflasche wurden zunächst mit PBS -/- gewaschen. Mit Hilfe von Accutase wurden die Zellen von der Kulturflasche gelöst und anschließend in serumhaltigem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Zellpellet im Anschluss in 5 ml Kulturmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (AppliChem, Darmstadt) aufgenommen. Sofort im Anschluss wurden die Zellen auf 5 Kryoröhrchen (Cryo.S, Greiner Bio-One, Frickenhausen) verteilt und diese zur schonenden Einfrierung im mit Isopropanol gefüllten Einfrierbecher (Kryo Freezing Container, Nalgene) auf -80°C abgekühlt. In jedem Röhrchen befanden sich damit ungefähr $5 \cdot 10^5$ Zellen. Am nächsten Tag erfolgte die Umbettung der Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff (-197°C). Nach Entnahme aus dem Stickstoffbad wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Sobald die Zellsuspension flüssig war, wurde sie in vorgewärmtem Medium aufgenommen und abzentrifugiert, um das verbleibende DMSO zu entfernen. Nach Aufnahme des Zellpellets in frisches Kulturmedium wurden die Zellen in einer 25 cm^2 Kulturflasche (Tissue Culture Flask, Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät. Die Zellen wurden zunächst für 7 Tage mit Plasmocin (2,5 mg/ml, InvivoGen, Toulouse, Frankreich) behandelt, um ein Wachstum von Mykoplasmen zu verhindern und erst im Anschluss für Versuche verwendet. Bei der Suspensionszelllinie KG-1a wurden 10 ml der Zellsuspension bei einer Dichte von $8\text{-}10 \cdot 10^5$ Zellen/ml abzentrifugiert und dann ebenfalls in 5 ml Kulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen. Das Vorgehen im Anschluss entsprach dem Vorgehen bei adhärenenten Zellen. In einem Kryoröhrchen befanden sich demnach $1,6\text{-}2 \cdot 10^6$ KG-1a Zellen.

2.2 Separierung humaner hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut

Nabelschnurblut für die Aufreinigung von CD34+CD38- Zellen wurde von der Universitätsfrauenklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Ein entsprechendes Votum der Ethikkommission zur Verwendung des humanen Materials lag vor. Die Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen wurde mithilfe von MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) durchgeführt. Diese magnetisch markierten Antikörper

erlauben eine Zellseparation beim Auftragen auf eine magnetische Säule. Die den gewünschten Oberflächenmarker tragenden Zellen verbleiben hierbei in der Säule und können nach dem Entfernen aus dem magnetischen Feld ausgespült werden. Negative Zellen durchfließen die Säule sofort und können auf diese Weise depletiert werden. Das Vorgehen bei der Aufreinigung entsprach dem in den Datenblättern der Isolationskits angegebenen Ablauf. Zunächst wurden die mononukleären Zellen isoliert, anschließend erfolgte die CD38- Selektion und abschließend die CD34+ Selektion.

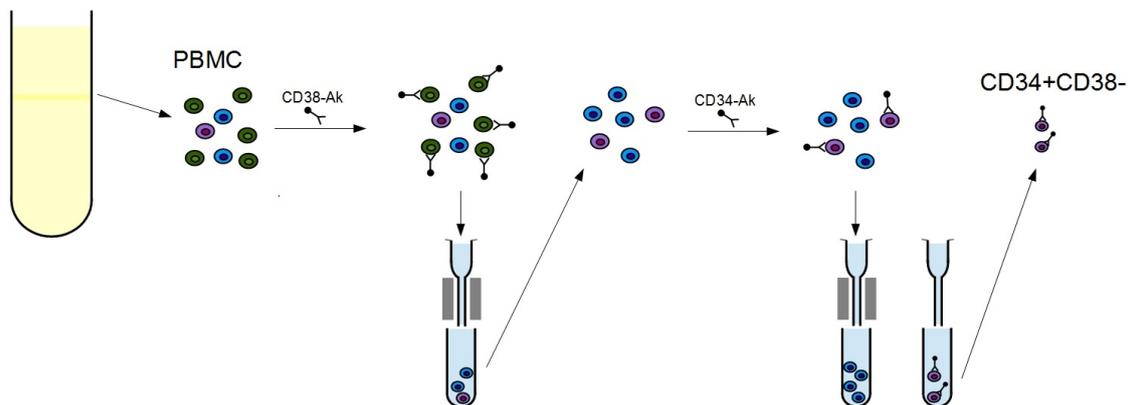


Abbildung 2.2: **Schema: CD34+CD38- Isolation.** Zur Isolierung der CD34+CD38- Zellen erfolgte nach Gewinnung der PBMC zunächst eine Negativselektion der CD38- Zellen. Hierfür wurden die PBMC mit einem magnetischen CD38 Antikörper inkubiert. Die CD38+ Zellen verblieben somit in der magnetischen Säule und im Durchfluss finden sich die CD38- Zellen. Für die CD34 Positivselektion erfolgte die Inkubation mit einem magnetischen CD34 Antikörper. Beim Durchfluss durch die magnetische Säule verbleiben diese zunächst in der Säule und können nach dem Entfernen des Magnetes aus der Säule gespült werden, sodass schlussendlich CD34+CD38- Zellen vorliegen.

2.2.1 Gewinnung von PBMC

Zur Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurde Nabelschnurblut zunächst im Verhältnis 1:2 mit Rinsing Solution [Zusammensetzung: 2 mM EDTA-Lösung (AppliChem) in PBS -/-] verdünnt. Nach Vorlage von 15 ml Percoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml, LSM 1077 Lymphocyte, PAA) in einem 50 ml Röhrchen (Becton Dickinson) wurden 35 ml des Nabelschnurblutes vorsichtig darüber geschichtet. Es erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation der Röhrchen bei 1500 x g. Mit Hilfe einer Stripette wurden die zwischen Serum und Dichtelösung befindliche Zellschicht vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden mit Rinsing Solution auf 50 ml aufgefüllt und die

Zellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 500 x g pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden alle Zellen in Rinsing Solution aufgenommen und gemeinsam in einem 50 ml Röhrchen pelletiert (10 min, 400 x g). Die Zellen wurden nun in Erythrozytenlysepuffer [Zusammensetzung: 150 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃ und 0,1 mM Di-Natrium-EDTA in bidestilliertem H₂O, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)] resuspendiert. Hierin wurden die Zellen für maximal fünf Minuten drehend inkubiert (MACSMix, Miltenyi Biotec). Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach erneuter Pelletierung der Zellen (10 min, 400 x g) wurden die Zellen in 10 ml Running Puffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt.

2.2.2 Isolierung von CD38- Zellen aus PBMC

Maximal $1 \cdot 10^8$ Zellen wurde für die weitere Aufreinigung verwendet, um die Kapazität der für die Depletion verwendeten LD-Säule (Miltenyi Biotec) nicht zu überschreiten. Im Anschluss an die vorherigen Waschschritte wurden die Zellen in $80 \mu\text{l}/1 \cdot 10^7$ Zellen Running Buffer (Zusammensetzung: 0,5% BSA, 2 mM Natrium-EDTA in PBS-Puffer, Universitätsapothek Tübingen) resuspendiert und $20 \mu\text{l}/1 \cdot 10^7$ Zellen CD-38 Biotin-Antikörper wurden der Suspension hinzugefügt. Nach zehnminütiger drehender Inkubation im MACSMix bei 4°C wurde die Suspension mit Running Buffer auf ein Volumen von 10 ml verdünnt und anschließend pelletiert (300 x g, 10 min). Erneut wurden die Zellen in $80 \mu\text{l}/1 \cdot 10^7$ Zellen resuspendiert und $20 \mu\text{l}/1 \cdot 10^7$ Zellen Anti-Biotin MicroBeads hinzugefügt. Die Suspension wurde 15 min im MACSMix bei 4°C inkubiert und anschließend mit Running Buffer auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und pelletiert (300 x g, 10 min). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in $500 \mu\text{l}$ Running Buffer suspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine zuvor mit 2 ml Running Buffer gespülte LD-Säule aufgetragen. Im Anschluss wurde zweimal 1 ml Running Buffer aufgetragen. Der gesamte Durchfluss wurde in einem 10 ml Röhrchen gesammelt, welches die gewünschte depletierte CD38- Zellpopulation enthielt. Die Zellen wurden erneut bei 300 x g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen.

2.2.3 CD34+ Selektion der CD38- Zellpopulation

Das zuvor bei der CD38- Selektion erhaltene Zellpellet wurde bis zu einer Zellzahl von $1 \cdot 10^8$ in $300 \mu\text{l}$ Running Buffer aufgenommen. Nach der Zugabe von $100 \mu\text{l}$ FcR Blocking Reagenz erfolgte die Zugabe von $100 \mu\text{l}$ CD34 Micro Beads. Nach einem guten Durchmischen der Suspension erfolgte eine 30 minütige Inkubation im MACSMix bei 4°C. Die Zellsuspension wurde dann mit Running Buffer auf 10 ml

aufgefüllt und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und das Zellpellet anschließend in 500 μ l Running Buffer suspendiert. Die magnetische Separation der CD34+ Zellen erfolgte durch Auftragen der Zellsuspension auf eine zuvor befeuchtete MS-Säule (Miltenyi Biotec). In dieser können maximal $1 \cdot 10^7$ magnetisch markierte Zellen zurückgehalten werden, wobei die Zahl der auf die Säule aufgetragenen Zellen $2 \cdot 10^8$ nicht überschreiten darf. Durch die vorherige CD38 Depletion ist in diesem zweiten Schritt eine Säule mit geringerer Kapazität als im ersten Isolierungsschritt ausreichend. Die Säule wurde dreimal mit 500 μ l Running Buffer gespült. Nach vollständigem Durchlaufen der Flüssigkeit wurde die Säule aus dem Magnet genommen und mit 1 ml Running Buffer eluiert. Die Aufreinigung wurde mit einer zweiten Säule wiederholt. Die erhaltenen CD34+CD38-Zellen wurden pelletiert (2000 rpm, 5 min) und schlussendlich in 100 μ l StemSpan SFEM-Medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) aufgenommen. Das Medium wurde zusätzlich mit StemSpanCC-100 cytokine cocktail (Stem Cell Technologies) und 1% P/S-Lösung versetzt. Bis zur Versuchsdurchführung wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Messungen am AFM fanden maximal 24 Stunden nach Isolation der Stammzellen statt.

2.2.4 Reinheitsüberprüfung der aufgereinigten CD34+CD38-Zellpopulation

Zur Überprüfung des Aufreinigungsvorganges wurde die gewonnene Zellpopulation mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Durchflusszytometer: BD LSR II, Becton Dickinson) analysiert. Alle Inkubationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Um unspezifische Bindungen zu verhindern wurden die Zellen für 10 min mit 1% Polyglobin (Talecris Biotherapeutics, Frankfurt am Main) inkubiert. Die Zellen wurden sowohl mit humanem CD34 FITC Antikörper (Miltenyi Biotec) als auch CD38 APC Antikörper (Miltenyi Biotec) für jeweils 10 min gefärbt. Dazwischen wurden die Zellen mehrmals mit einem Waschpuffer, bestehend aus PBS -/- mit 0,1% bovinem Serumalbumin (Sigma-Aldrich) und 0,05% Natirumazid, gewaschen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der FACScan Research Software (Becton Dickinson) sowie FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, USA).

2.3 Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmarkaspiraten

Die verwendeten MSC wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Professor Doktor Aicher (Orthopädische Universitätsklinik, Zentrum für medizinische Forschung Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der MSC erfolgte aus Knochenmarkaspiraten von Patienten, die sich einer totalen Hüftendoprothetik unterzogen. Diese stammten von der BG Unfallklinik Tübingen, ein entsprechendes Votum des Ethikkomitees der Universität Tübingen lag vor. Die Gewinnung humaner MSC wurde wie in Felka et al. (2009 [79]) beschrieben durchgeführt. Zunächst erfolgte die Isolation der MSC durch ein Ficoll-Verfahren. Die mononukleäre Zellfraktion wurde abgenommen, mit PBS -/- gewaschen und im Anschluss in 75 cm² große Kulturflaschen ausgesät. Die Zelldichte betrug hierbei $2 \cdot 10^5$ Zellen/cm². Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die nichtadhärenten Zellen abgewaschen. Die adhärierenden MSC wurden in Expansionmedium [„GMP+ Medium“, bestehend aus DMEM mit wenig Glucose (Lonza, Basel, Schweiz), 5% Thrombozytenlysat (Blutbank Tübingen), 5% „Fresh Frozen Plasma“ (FFP), (TCS Bioscience, Buckingham, Großbritannien), 2mM L-Glutamin (Lonza, Basel, Schweiz), 1000 IE Heparin (Roth, Karlsruhe) und 25 mM HEPES-Puffer (Sigma-Aldrich)], kultiviert. Die MSC wurden expandiert und nach Erreichen einer Konfluenz von 80% mit Accutase abgelöst und passagiert. Abbildung 2.3 zeigt die in Kultur wachsenden MSC-Zellen. Die Verwendung der MSC für die Messung der Zell-Zell-Adhäsionskräfte erfolgte in Passage vier.

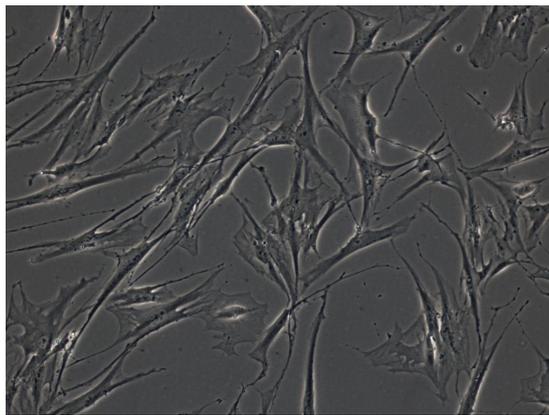


Abbildung 2.3: **Humane mesenchymale Stammzellen in der Zellkultur.** Bei Kultivierung adhäreren mesenchymale Stammzellen in den Kulturflaschen. Neben den zentral liegenden Zellkernen sind pro Zelle mehrere schmale Ausläufer der Zellen zu sehen.

2.4 „Single Cell Force Spectroscopy“ mit Hilfe der „Atomic Force Microscopy“

Die Kraftspektroskopieexperimente wurden mit dem NanoWizard II kombiniert mit dem CellHesion 200 Modul (JPK Instruments, Berlin) durchgeführt, welche auf einem Zeiss Axiovert 200 aufgebaut waren. Der JPK PetriDishHeater wurde zur Erwärmung der Proben auf 38°C verwendet. Um den Einfluss von Vibrationen auf die Messungen zu reduzieren stand der gesamte Aufbau auf einem aktiven Isolationstisch (Halcyonics i4, Accurion). Zudem befand sich der Aufbau in einem geräuscharmen Umfeld. Zur Messung der Kraftkurven wurden spitzenlose TL-2-Cantilever (NanoSensors ArrowTM, bezogen über JPK Instruments) mit einer angegebenen Federkonstante von 0,03 N/m verwendet. Die Messungen wurden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 mm durchgeführt (TPP, Sigma-Aldrich). Die SCFS erlaubt die Messung der Adhäsionskräfte zwischen einer einzelnen Zelle und einer Probe (eine weitere Zelle beziehungsweise azelluläre Matrixkomponenten) in Form der „Detachment Force“. Mithilfe der SCFS sind Messungen von Adhäsionskräften im Bereich 10 pN - 100 nN möglich (Friedrichs et al., 2013 [73]).

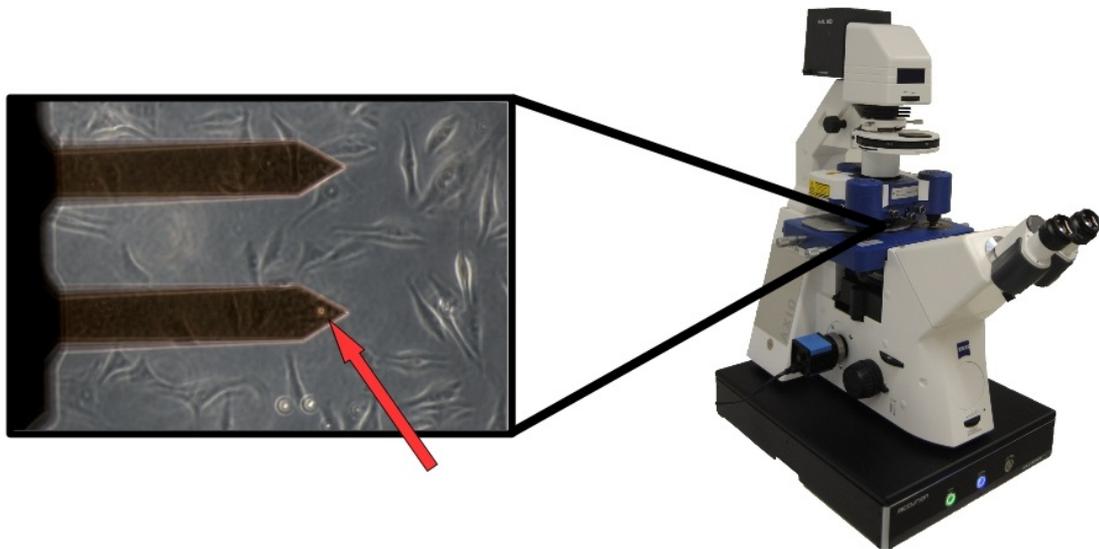


Abbildung 2.4: Zeiss Axiovert 200 mit CellHesion 200 (rechts) sowie CD34+CD38- Zelle an TL-2 Cantilever (links). Die AFM-Messungen wurden mit dem Cell Hesion 200 (rechts) durchgeführt. Der lichtmikroskopische Ausschnitt links zeigt den verwendeten Cantilever TL-2. Auf ihm erkennt man eine CD34+CD38- Zelle, markiert mit dem roten Pfeil. Diese wurde mit CellTak fixiert (siehe Kapitel 2.4.2). Im Hintergrund sind CAL 72 Zellen, welche auf einer Petrischale adhäreren, zu erkennen.

2.4.1 Eichung und Messparameter

Da im Herstellungsprozess der Cantilever keine genau identische Abmessung des Cantilevers gewährleistet werden kann, jedoch schon kleinste Veränderung der Dicke des Cantilevers zu einer signifikanten Veränderung der Federkonstante führen, können die vom Hersteller angegebenen Federkonstanten nur als Anhaltspunkt dienen. Zudem ist zu erwarten, dass die Federkonstante durch die Funktionalisierung des Cantilevers und durch mehrmalige Verwendung beeinflusst wird. Vor Versuchsbeginn ist es folglich notwendig, jedes Mal die Federkonstante für den individuell verwendeten Cantilever zu bestimmen. Dies erfolgte mit Hilfe der „Thermal Noise Methode“ (Hutter und Bechhöfer, 1993 [80]), welche durch die Einführung vieler Korrekturfaktoren seit dem weiter verfeinert wurde. Die Bestimmung der Federkonstante erfolgte mit Hilfe der von JPK Instruments gestellten SPM Software. Die Eichung des Cantilevers wurde bereits im später verwendeten Medium in einer 35 mm Petrischale durchgeführt. Die Bewegungen des Cantilevers erfolgen piezoelektrisch, was eine sehr präzise Steuerung der Bewegung erlaubt. Der verwendete „closed loop Modus“ garantiert eine genaue vertikale Positionierung des Cantilevers, da hierbei die Position des Piezo kontinuierlich korrigiert wird und dadurch ein Drift im System (beispielsweise durch Temperaturschwankungen) kompensiert werden kann (Friedrichs et al., 2013 [73]). Die Geschwindigkeit, mit der sich der Piezo der Oberfläche nähert und entfernt, wurde auf $5 \mu\text{m}/\text{sec}$ eingestellt. Diese mittlere Geschwindigkeit verhindert zum einen, dass es durch eine zu schnelle Bewegung zur Verformung des Cantilevers allein durch das verdrängte Wasser kommt. Zum anderen ist die Geschwindigkeit hoch genug, dass es nicht zu einer Veränderung kommt, die allein durch die Zeit, nicht jedoch durch die Entfernung des Cantilevers von der Oberfläche bedingt ist. Der Piezo stoppte bei einer Kontaktkraft von 500 Piko-Newton (pN), während der Kontaktzeit wurde diese Kraft konstant ausgeübt. Die Zelle passt sich dem auf sie ausgeübten Druck an und flacht während der Kontaktzeit ab. Der Constant Force Modus bietet daher gegenüber dem Constant Distance Modus, bei dem nach einmaligem Erreichen der eingestellten Kontaktkraft die Entfernung zur Oberfläche konstant gehalten wird, den Vorteil, dass es nicht schon während der Kontaktzeit zu einer partiellen Ablösung der Zelle von der zu messenden Oberfläche kommen kann. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass es durch die konstante Kraftausübung zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche kommen kann, welches zu einer erhöhten Adhäsionskraft führen kann. Die Rückzugslänge des Piezo wurde so hoch gewählt, dass eine vollständige Separierung der Zelle von der Oberfläche gewährleistet ist. Die eingestellte Zuglänge variierte zwischen 70 und 90 μm .

2.4.2 Cantileverfunktionalisierung und Zellimmobilisierung

Zur Durchführung der Adhäsionsmessungen zwischen den Tumorzellen beziehungsweise den hämatopoetischen Stammzellen und den Nischenzellen muss eine sichere Befestigung der Zelle am Cantilever gewährleistet sein. Zur Funktionalisierung der Cantilever wurde CellTak (Becton Dickinson) verwendet. CellTak ist eine Proteinmischung, die aus der Meeresmuschel *Mytilus Edulis* isoliert wird. Die Proteinmischung wird von den Muscheln zur Anheftung an Strukturen wie Steine sezerniert [81]. CellTak wurde im Verhältnis 1:30 mit 0,1 M Bicarbonatlösung verdünnt. 50-60 μl dieser Lösung wurden mit einer Pipette auf die einzelnen Cantilever getropft, sodass diese vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Nach 30 minütiger Inkubation wurden die Cantilever vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült, luftgetrocknet und anschließend bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Messungen am AFM wurden sowohl die bereits zuvor beschriebenen Zelllinien KG-1a, MDA-MB-231 und PC3 als auch primäre, aus Nabelschnurblut isolierte, hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen verwendet. Die Gewinnung der primären Zellen ist im Abschnitt 2.2 beschrieben. Die adhärenen Zelllinien PC3 und MDA-MB-231 wurden mit Hilfe von Accutase aus ihren Kulturflaschen gelöst und dann in serumfreiem RPMI mit Ionenmix aufgenommen. Hierbei handelt es sich um eine 100 mM/l CaCl_2 , 100 mM/l MgCl_2 und 2,5 mM/l MnCl_2 -Lösung in destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Zellen zweimal bei 2000 rpm für jeweils 5 min pelletiert, der Überstand abgenommen und die Zellen wiederum in 1 ml serumfreiem RPMI mit Ionenmix aufgenommen. Die Konzentration wurde hierbei auf ungefähr $2 \cdot 10^5$ Zellen pro ml eingestellt. Auch die Suspensionszellen KG-1a wurden auf dieselbe Konzentration eingestellt, zweimal in serumfreiem RPMI mit Ionenmix gewaschen und am Ende in 1 ml serumfreiem RPMI mit Ionenmix aufgenommen. Das mit Ionenmix versetzte RPMI-Medium wurde vor seiner Verwendung mit einem 0,22 μm Filter (Sterile Millex Filter Unit, Millipore) filtriert. Hierdurch wurde verhindert, dass sich schlierenartige Konglomerate in der Lösung bilden, die die sehr sensitiven Messungen mit dem AFM beeinflussen. Um eine Zelle auf dem Cantilever zu immobilisieren, wurden unter optischer Kontrolle ungefähr 50-100 Zellen (circa 2-5 μl) der vorbereiteten Zellsuspension mit einer Pipette auf die Petrischale gegeben, in der die folgenden Messungen durchgeführt wurden. Zur Immobilisierung einer Zelle auf dem Cantilever wurde dieser oberhalb einer Zelle platziert und der Cantilever dann bis auf die Zelle herunter gefahren. Nach einer zehnssekündigen Kontaktzeit mit einer Kraft von 1 nN klebte die Zelle auf Grund der mit CellTak beschichteten Oberfläche am Cantilever. Anschließend erfolgte eine mehrminütige Pause, in der sich die Bindung zwischen Cantilever und Zelle verfestigen konnte. Der gesamte Versuch wurde unter

optischer Kontrolle mit dem Lichtmikroskop durchgeführt, sodass die Zellmorphologie und Viabilität jederzeit beurteilt werden konnten. Durch Anheben des Kopfteils des AFM aus der Petrischale löste sich die Zelle vom Cantilever und das Einfangen einer neuen Zelle war möglich. Pro Zelle wurden 10-25 Messungen durchgeführt, bei morphologischen Veränderungen der auf dem Cantilever befestigten Zelle erfolgte eine frühere Ablösung der Zelle vom Cantilever und die Versuche wurden mit einer neuen Zelle fortgeführt.

Nach Abschluss der Experimente wurden die funktionalisierten Cantilever in einen Tropfen 1 M Schwefelsäure gelegt, um sie zu reinigen. Nach 30 min wurden die Cantilever mit destilliertem Wasser abgespült und luftgetrocknet. Nach erneuter Funktionalisierung konnten die Cantilever so wiederholt verwendet werden.

2.4.3 Zell-Zell-Adhäsionsmessungen

Mit Hilfe der SCFS wurden die Adhäsionskräfte von KG-1a, MDA-MB-231 und PC3 sowohl auf CAL 72 als auch auf humanen MSC gemessen. Zudem wurde die Adhäsion von primären hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen auf CAL 72 gemessen. Hierfür wurden am Vortag der Versuchsdurchführung $1,5 \cdot 10^5$ CAL 72 Zellen in 35 mm Petrischalen ausgesät. Für die Versuchsdurchführung mit humanen MSC wurden $3 \cdot 10^4$ Zellen ausgesät. Die Aussaat erfolgte sowohl bei CAL 72 also auch MSC in deren serumhaltigen Kulturmedien. Über Nacht wurden die Petrischalen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Vor Versuchsdurchführung wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal vorsichtig mit RPMI mit Ionenmix gespült. Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen mit 2 ml RPMI mit Ionenmix bedeckt. Die RPMI/Ionenmix-Lösung wurde wiederum mit einem $0,22 \mu\text{m}$ -Filter filtriert. Die Petrischale wurde in die vorgesehene Halterung des AFM eingebaut, welche auf 38°C erwärmt wurde. Durch das im AFM integrierte Durchlichtmikroskop wurden die Zellen durchgehend beobachtet.

Eine Zelle der gewünschten Zellart wurde wie im Kapitel 2.4.2 beschrieben am Cantilever befestigt. Für die Aufnahme der Kraftkurven wurde die am Cantilever befestigte Zelle oberhalb des Zellkerns einer Stromazelle positioniert. Die verwendeten Messparameter sind im Kapitel 2.4.1 beschrieben. Die Zell-Zell-Kontaktzeit wurde variiert: Pro Stromazelle erfolgten eine Messung je Kontaktzeit. Nach drei Messungen wurde eine kurze Pause eingehalten und die am Cantilever befestigte Zelle über einer neuen Stromazelle positioniert. Nach jeder Messung musste durch Kontrolle der aufgezeichneten Kraftkurven sichergestellt werden, dass beide Zellen nach dem Messvorgang vollständig voneinander separiert waren. Ist dies nicht der Fall, kann ein typischer Anstieg der Kurve schon zu Beginn der Annäherung der Zelle an

Matrixprotein	Hersteller	verwendete Konzentration
humanes r-LM 111	BioLamina, Stockholm, Schweden	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
humanes r-LM 211	BioLamina	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
humanes r-LM 411	BioLamina	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
humanes r-LM 421	BioLamina	0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
humanes r-LM 511	BioLamina	0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
humanes r-LM 521	BioLamina	0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Kollagen IV	Sigma-Aldrich	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Osteopontin	Dr. Carolin Steinl, Universität Tübingen	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
humanes Tenascin-C	Chemicon, Schwalbach	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
murines r-Netrin-1	R&D Systems, Minneapolis, USA	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
humanes Fibronectin	Tebu-Bio, Offenbach	0,22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tabelle 2.1: **Verwendete Proteine der extrazellulären Matrix.** Für die durchgeführten Zell-Matrix-Adhäsionsmessungen wurden 11 unterschiedliche Proteine verwendet. Bei den mit „r-“ gekennzeichneten Proteinen handelt es sich um rekombinant hergestellte Proteine.

die Oberfläche in den Kraftkurven beobachtet werden. In diesem Fall wurde diese Messung (in der die Zelle am Cantilever bei Messbeginn nicht vollständig von der Stromazelle separiert war) sowie die vorangegangene Messung (in der beide Zellen nicht vollständig separiert wurden) verworfen.

2.4.4 Zell-Matrix-Adhäsionsmessungen

Für die Zell-Matrix-Adhäsionsmessungen mit Hilfe der SCFS wurden elf Proteine der EZM verwendet: sechs humane Laminin-Isoformen, Fibronectin, Kollagen IV, Netrin-1, Osteopontin und Tenascin-C. In Tabelle 2.1 sind die Bezugsquellen sowie die verwendeten Konzentrationen dargestellt.

Die verwendeten Substrate wurden punktförmig auf eine Petrischale aufgetragen. Die aufgetragenen Substrate wurden bei 37°C für 5-15 min getrocknet. Auf der Rückseite der Petrischale wurden die Auftragungsorte der Proteine genau markiert. Dies ermöglichte, dass bei der Versuchsdurchführung am AFM auf den gespotteten Proteinen gemessen wurde, da die entsprechenden Stellen so lichtmikroskopisch aufgesucht werden konnten. Unspezifische Bindungsstellen der Plastikschale wurden durch Zugabe von 1% BSA/PBS (BSA: Sigma-Aldrich, PBS: Gibco Life Technologies) geblockt. Dies erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 4°C oder durch eine einstündige Inkubation bei 37°C. Bis zur Versuchsdurchführung wurden die Petrischalen bei 4°C gelagert. Vor Verwendung der Petrischalen für die Messungen

wurde die BSA/PBS-Lösung vorsichtig abgenommen und das Schälchen zweimal mit RPMI gespült. Die RPMI/Ionenmix-Lösung wurde vor Verwendung mit einem $0,22\ \mu\text{m}$ Filter filtriert. Die Messungen wurden ebenfalls in RPMI/Ionenmix-Lösung durchgeführt. Nach der im Kapitel 2.4.2 beschriebenen Fixierung einer Zelle auf dem Cantilever wurde die fixierte Zelle über dem gewünschten Spot platziert. Die Messungen wurden mit den im Kapitel 2.4.1 beschriebenen Messparametern durchgeführt. Zwischen jeder Messung erfolgte eine Variation der Kontaktstelle, sodass ausgeschlossen werden konnte, dass es durch die aufeinanderfolgenden Messungen zu einer verminderten Proteinkonzentration an der Messstelle kam. Nach vier Messungen erfolgte eine längere Pause.

2.4.5 Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Kraftkurven erfolgte mit der „JPK SPM Data Processing Software“ von JPK. Nach erfolgtem Nullen von „Baseline“ und „Contact Point“ wurde mit Hilfe der Software der Minimalwert der Kraftkurve bestimmt. Dieser entspricht der für die Auswertung verwendeten maximalen „Detachment Force“. Dieser Wert gibt die maximale Adhäsion zwischen der am Cantilever befestigten Zelle und der Probe (Zell-Zell- beziehungsweise Zell-Matrix-Adhäsion) an. In Abbildung 2.5 B ist eine beispielhafte Messkurve dargestellt. Während der Aufnahme der Kraftkurve können vier verschiedene Phasen unterschieden werden. Abbildung 2.5 A zeigt diese schematisch. In der ersten Phase nähert sich der Cantilever der Oberfläche. In der zweiten Phase hat die Zelle Kontakt zur Oberfläche. Dieser bleibt während der festgelegten Kontaktzeit bestehen. Schließlich wird der Cantilever und damit auch die Zelle wieder nach oben gezogen. Wird die „Detachment Force“ (grauer Kreis in B) überschritten löst sich die Adhäsion zwischen Zelle und Oberfläche schrittweise (3). Das Erreichen der Nullposition auf der x-Achse zeigt die vollständige Separierung von Zelle und Probe an. Da keine Kräfte mehr auf den Cantilever wirken, wird dieser nicht mehr verbogen und befindet sich somit in Neutralposition (4). Eine vollständige Separierung muss für die Auswertung der Kurve gewährleistet sein.

Relevant für die bestimmten „Detachment Forces“ ist zum einen die Kontaktzeit: je länger die Zelle Kontakt zur Oberfläche hat, desto stärkere Adhäsionskräfte bilden sich aus. Zum anderen hängen die gemessenen Adhäsionskräfte von der Kontaktfläche zwischen Zelle und Oberfläche ab: eine größere Zelloberfläche erlaubt die Ausbildung einer stärkeren Adhäsion als eine kleine Zelloberfläche.

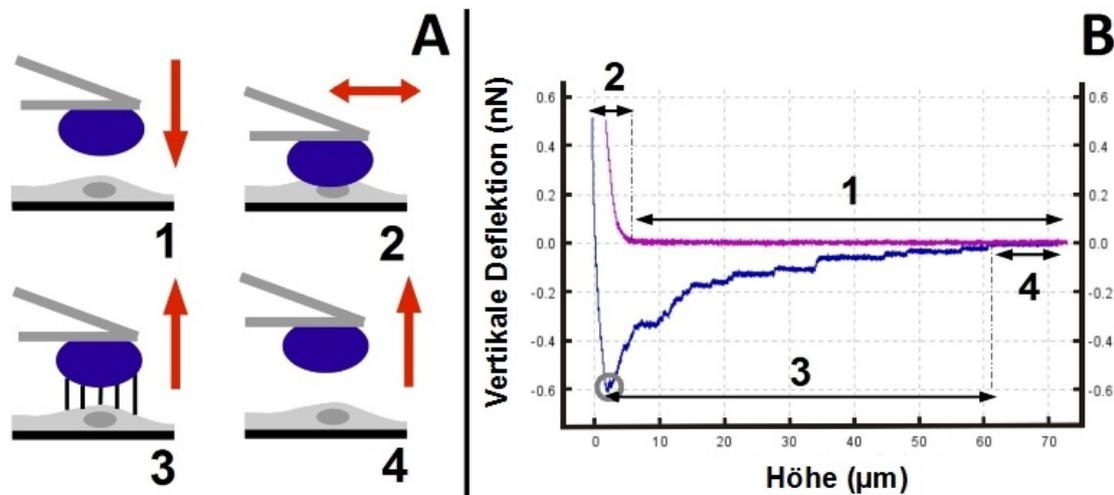


Abbildung 2.5: **A:** Schematische Darstellung zur Erläuterung der Kraftkurve; **B:** Kraftkurve: Messung einer PC3 Zelle auf CAL 72 mit einer **Kontaktzeit von 10 sec.** Bei der Aufnahme der Kraftkurve wird die Zelle zunächst der Oberfläche angenähert (1), bleibt über eine definierte Zeit in Kontakt mit der Oberfläche (2) und wird dann wieder nach oben gezogen (3), bis sich die Bindung zwischen Oberfläche und Zelle vollständig gelöst hat (4).

2.5 Funktionelle Analysen

2.5.1 Markierung von Zellen mit QTrackern

Die Färbung der Zellen für die Adhäsionsanalysen erfolgte mit den Farbstoffen QTracker 525 und 625 (Invitrogen Life Technologies, Darmstadt). Die Farbstoffe bestehen aus Nanokristallen, die an Proteine gebunden sind. Diese werden bei beiden Farbstoffen von Licht einer Wellenlänge zwischen 360 und 400 Nanometer (nm) angeregt und emittieren dann Licht der Wellenlänge 525 nm beziehungsweise 625 nm. Die Nanokristalle werden in Vesikeln ins Zytoplasma aufgenommen. Die Aufnahme ist also nicht an bestimmte Enzyme gebunden, wodurch die Färbung unterschiedlicher Zelltypen möglich ist. Die Zellfärbung erfolgte bei Vorliegen der Zellen in einer Suspension im Kulturmedium. Folglich wurden die adhärenen Zelllinien PC3 und MDA-MB-231 zunächst mit Accutase aus den Kulturflaschen abgelöst und in Kulturmedium aufgenommen. Bei allen Zelltypen erfolgte dann ein zweimaliges Waschen der Zellen, in dem diese zunächst für 10 min bei 150 x g pelletiert wurden und danach in serumhaltiges Kulturmedium aufgenommen wurden. Die Zellen wurden hierbei auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Für die Färbungen wurde eine 5 nM Verdünnung des Farbstoffes verwendet. Zunächst wurden die beiden Komponenten A (Nanokristalle) und B (Phosphat gepuffertes PBS, pH 7,2) im

Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Verdünnung mit dem Kulturmedium der zu färbenden Zelllinie bis zur gewünschten Konzentration von 5 nmol/l und eine gute Durchmischung aller Komponenten. Nach Mischung von Farbstoff und Zellsuspension erfolgte die einstündige drehende Inkubation (MACSMix) im Brutschrank bei 37°C. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal in serumfreiem RPMI, serumhaltigem Kulturmedium oder „Phosphate Buffered Saline“ mit Calcium und Magnesium (PBS +/-) (Gibco Life Technologies), je nach weiterer Verwendung, gewaschen und dann für die entsprechenden Versuche verwendet. Die Arbeiten mit den QTrackern wurden unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt.

2.5.2 Zell-Zell-Adhäsionsassay: Koinkubation von KG-1a mit PC3 oder MDA-MB-231

Um zu untersuchen, ob sich die Adhäsion von Prostata- oder Mammakarzinomzellen und KG-1a gegenseitig beeinflusst, wurden diese auf CAL 72 koinkubiert. Zur Kontrolle diente die alleinige Inkubation von KG-1a, PC3 sowie MDA-MB-231 Zellen auf CAL 72. Es erfolgte sowohl eine Koinkubation von KG-1a Zellen mit PC3 Zellen als auch eine Koinkubation von KG-1a Zellen mit MDA-MB-231 Zellen.

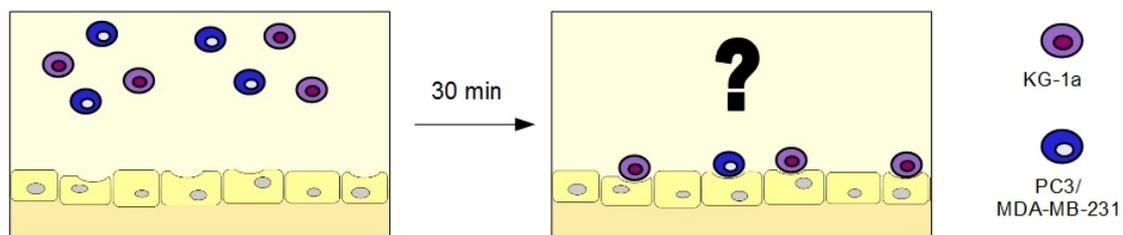


Abbildung 2.6: **Schema: Ablauf Koinkubationsassay.** KG-1a und PC3 beziehungsweise MDA-MB-231 wurden im Verhältnis 1:1 auf einem konfluenten Zellrasen CAL 72 für 30 min koinkubiert. Nach der Inkubation wurden die nicht gebundenen Zellen durch vorsichtiges Waschen entfernt und durch Fluoreszenzmessungen bestimmt wieviele KG-1a und PC3 beziehungsweise MDA-MB-231 gebunden haben.

Mithilfe von Fluoreszenzmessungen der mit QTrackern gefärbten Zellen konnte die gebundene Zellmenge berechnet werden. Die Positivkontrolle stellte die Gesamtfluoreszenz der pro Vertiefung eingesetzten Zellen dar. Diese entspricht der Fluoreszenz, die bei Bindung aller Zellen an die Nischenzellen zu erwarten wäre und wurde daher bei der Auswertung auf 100 % gesetzt. Die Messung der Positivkontrolle erfolgte in PBS +/-, da das Kulturmedium RPMI eine Eigenfluoreszenz bei den Messungen

aufwies. Die Messung einer Vertiefung, in der lediglich CAL 72 ausgesät wurden, aber keine Zugabe von gefärbten Zellen erfolgte, diente als Negativkontrolle und entsprach damit einer Adhärenz von 0% der eingesetzten Zellen. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung aller Versuchsansätze, die Fluoreszenzwerte wurden für die Auswertung gemittelt. Die Versuchsdurchführung erfolgte in einer weißen 96-well Platte (Nuncoln Delta Surface, Thermo Fisher Scientific, Dreieich). Die CAL 72 wurden am Vortag der Versuches in einer Konzentration von $1,3 \cdot 10^4$ Zellen pro Vertiefung ausgesät. Über Nacht konnten die Zellen adhären und einen konfluenten Zellrasen bilden. Die Bildung einer sezernierten extrazellulären Matrix wurde durch die kurze Adhäsionszeit (weniger als 24 h) jedoch weitestgehend unterbunden. Pro Vertiefung wurde eine Zellzahl von $6,7 \cdot 10^4$ Zellen KG-1a und die gleiche Menge an Tumorzellen verwendet. Die Zellmenge wurde so kalkuliert, dass nach Binden der Zellen möglichst alle Bindungsstellen besetzt sind. Die Zellen wurden in einem Volumen von $67 \mu\text{l}$ pro Vertiefung suspendiert. Die für den Versuch benötigte Zellzahl wurde mit QTracker 525 (MDA-MB-231 beziehungsweise PC3) und QTracker 625 (KG-1a) gefärbt. Die Färbung der Zellen wurde wie im Kapitel 2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die gefärbten Zellen wurden unter lichtgeschützten Bedingungen weiter verwendet. Die für die Zell-Zell-Assays zu verwendenden Zellen wurden zweimal in serumfreiem RPMI gewaschen. Dies erfolgte durch Pelletierung durch 5 minütige Zentrifugation bei 2000 rpm, vollständiges Abnehmen des Überstandes und Resuspension der Zellen in serumfreiem RPMI. Die für die spätere Auswertung benötigten Positivkontrollen wurden in PBS +/+ ebenfalls zweimal gewaschen. Anschließend erfolgte eine Resuspension der Zellen im gewünschten Volumen. Die adhärenen Knochenmarkzellen wurde nach Abnahme des Kulturmediums zweimal mit PBS +/+ gewaschen, bevor die gefärbten Zellen zugegeben wurden. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C und 5% im Brutschrank. Durch vorsichtiges Waschen mit PBS +/+ wurden die nicht gebundenen Zellen entfernt. Die Fluoreszenz der gebundenen Zellen wurde mit Hilfe eines Fluorometers (TECAN GENios, TECAN, Grödig, Österreich) bestimmt. Die Anregung beider Farbstoffe erfolgte mit einer Wellenlänge von 360 nm, die Emission des QTrackers 525 wurde mit einem 535 nm Filter gemessen, die des QTrackers 625 mit einem 620 nm Filter. Die Auswertung des Zell-Zell-Assays erfolgte auf Grundlage folgender Formel:

$$\frac{\text{Fluoreszenz der adhärenen Zellen} - \text{Negativkontrolle Stromazellen}}{\text{Fluoreszenz Positivkontrolle} - \text{Fluoreszenz Medium}}$$

Das berechnete Ergebnis ist die Anzahl der adhärierenden Zellen in %. Für die Auswertung der Vertiefungen, in denen sich sowohl der Farbstoff QTracker 525 als auch QTracker 625 befand, wurde als Negativkontrolle anstelle der Messwerte der Vertiefungen mit lediglich Knochenmarkszellen die Messwerte der Vertiefungen, in denen sich der nicht zu bestimmende Farbstoff auf Knochenmarkszellen (jedoch gemessen mit dem Filter des zu bestimmenden Farbstoffes) befand, verwendet. Dies verhinderte, dass eventuelle geringfügigen Überlagerungen der Emissionsspektren zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen. Jeder Ansatz wurde drei Mal durchgeführt und der Mittelwert für die Auswertung verwendet.

2.5.3 Zell-Zell-Adhäsionsassay: Verdrängung von KG-1a aus ihrer Bindung an CAL 72 durch PC3 oder MDA-MB-231

In einem zweiten Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob bereits an Zellen des Knochenmarks (in diesem Fall die osteoblastische Zelllinie CAL 72) gebundene hämatopoetische Stammzellen (dargestellt durch die CD34+ KG-1a Zellen) durch Mamma- beziehungsweise Prostatakarzinomzellen verdrängt werden können. Nach 30 minütiger Inkubation der KG-1a Zellen auf CAL 72 wurden die nicht gebundenen Zellen durch vorsichtiges Waschen entfernt und die gleiche Menge Tumorzellen hinzugegeben. Wiederum nach 30 min wurden auch hier die ungebundenen Zellen vorsichtig abgewaschen und durch Fluoreszenzmessungen die Bindung der KG-1a und der Tumorzellen bestimmt.

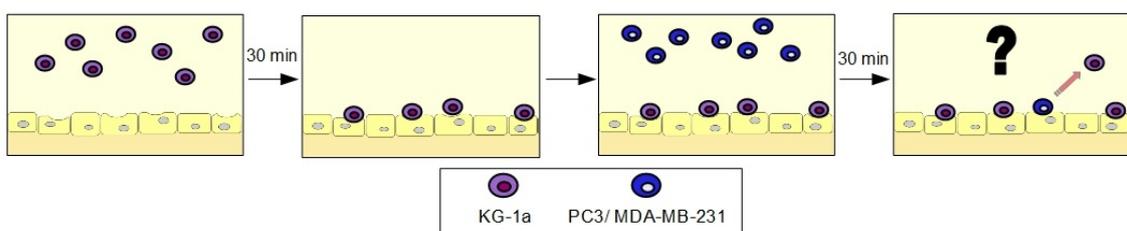


Abbildung 2.7: **Schema: Ablauf Verdrängungsassay.** Zunächst erfolgte eine 30 minütige Inkubation von KG-1a auf CAL 72. Die nicht adhärierenden Zellen wurden durch vorsichtiges Waschen entfernt und in einem zweiten Schritt PC3 oder MDA-MB-231 Zellen hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation für 30 min wurden wiederum die nicht gebundenen Zellen durch Waschen entfernt und durch Fluoreszenzmessung die Adhäsion von KG-1a sowie PC3 beziehungsweise MDA-MB-231 an CAL 72 bestimmt.

Um Veränderungen durch die Zugabe der Tumorzellen zu ermitteln, erfolgte als Kontrolle der gleiche Ansatz, jedoch wurde statt den Tumorzellen lediglich RPMI-Medium auf die schon gebundenen KG-1a Zellen gegeben, das weitere Vorgehen blieb identisch. Die Negativ- und Positivkontrollen wurden wie bei den Koinkubationsexperimenten durchgeführt. Jeder Ansatz wurde dreimal durchgeführt, für die Auswertung wurde der Mittelwert verwendet.

Vor Versuchsbeginn wurden wie bei den Koinkubationsversuchen $1,3 \cdot 10^4$ CAL 72 Zellen pro Vertiefung für weniger als 24 h kultiviert. Dies erfolgte wie bei den Koinkubationsexperimenten in einer weißen 96-well Platte. Entsprechend dem Koinkubationsversuch wurden die Zellen abgelöst, gezählt und mit QTracker Farbstoffen gefärbt. Vor der Verwendung der Zellen wurden diese in serumfreiem RPMI gewaschen und im Anschluss auf die zuvor mit PBS +/+ gewaschenen CAL 72 gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation im Brutschrank wurden die nicht adhärierenden Zellen durch vorsichtiges Waschen mit PBS +/+ entfernt. Die zuvor drehend inkubierten Zellen, welche nun zum Versuchsansatz hinzugegeben wurden, wurden erneut gewaschen und in serumfreies RPMI beziehungsweise PBS +/+ aufgenommen (Positivkontrollen) und dann in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 30 Minuten wurden die Vertiefungen erneut zweimal vorsichtig mit PBS +/+ gewaschen. Direkt im Anschluss wurde die Fluoreszenz mit dem Microplattenreader bestimmt. Auch die Berechnung der adhärierenden Zellen erfolgte wie bei den Koinkubationsexperimenten. Als Negativkontrolle für Vertiefungen, in denen zunächst KG-1a und dann PC3 oder MDA-MB-231 inkubiert wurde, diente der Wert, der nach 30 minütiger Inkubation mit PC3 oder MDA-MB-231 mit dem Filter für den KG-1a-Farbstoff gemessen wurde. Dies erfolgte, um eventuelle geringfügige Überschneidungen im Emissionsspektrum als Fehlerquelle auszuschließen.

2.5.4 Zell-Matrix-Adhäsionsassays

Um das Adhäsionsverhalten der verschiedenen Zelllinien an Bestandteile der EZM zu untersuchen, wurden Zell-Matrix-Adhäsionsassays durchgeführt. Die verwendeten Proteine sowie die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 2.1 dargestellt. Hierfür wurden zunächst die unterschiedlichen zu untersuchenden Substrate auf eine in Sektoren eingeteilte Petrischale mit 35 mm Durchmesser punktförmig aufgetragen. Die aufgetragenen Substrate wurden bei 37°C für 5-15 min getrocknet.

Unspezifische Bindungsstellen der Plastikschale wurden durch Zugabe von 1% BSA/PBS geblockt. Dies erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 4°C oder durch eine einstündige Inkubation bei 37°C.

Für die Versuchsdurchführung wurden die zu verwendenden Zellen mit Hilfe von Accutase aus der Kulturflasche gelöst. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von $1000/\mu\text{l}$ eingestellt. Die Suspensionszelllinie KG-1a wurde auf eine Konzentration von $1500/\mu\text{l}$ eingestellt. Es folgte ein zweimaliges Waschen der Zellen durch Abzentrifugieren der Zellen für 5 min bei 2000 rpm, Verwerfen des Überstandes und Resuspension der Zellen in serumfreiem RPMI mit Ionenmix.

Die vorbereiteten Petrischalen mit den aufgetragenen EZM-Proteinen wurden nach Abnahme des BSA/PBS-Lösung zweimal vorsichtig mit vorgewärmtem PBS -/- mit Ionenmix gewaschen. Die vorbereiteten Zellen wurden vorsichtig auf die vorbereiteten Petrischalen gegeben und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde daraufhin vorsichtig abgenommen und das Schälchen vorsichtig mit vorgewärmtem PBS -/- mit Ionenmix gewaschen. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis sich die gebundenen Zellen deutlich sichtbar vom Hintergrund abhoben (2-4 Waschvorgänge). Unter dem Durchlichtmikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Jena) wurde die Bindung der Zellen an die EZM-Proteine fotografisch festgehalten.

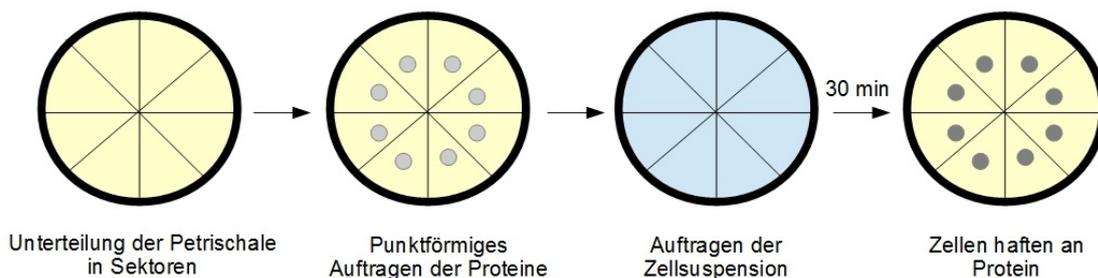


Abbildung 2.8: **Schema: Ablauf Zell-Matrix-Assay.** Für die Durchführung der Zell-Matrix-Assays wurde eine Petrischale zur späteren korrekten Zuordnung in Sektoren unterteilt und in jeden Sektor eines der verwendeten EZM-Proteine punktförmig aufgetragen. Die so präparierten Petrischalen wurden für 30 min mit einer Zellsuspension (KG-1a oder PC3 oder MDA-MB-231) inkubiert und danach vorsichtig gewaschen, sodass die adhätierenden Zellen unter dem Lichtmikroskop sichtbar wurden.

2.6 Statistische Auswertungen

Statistische Auswertungen und Grafiken wurden mithilfe von GraphPad erstellt (GraphPad Prism Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA).

Statistische Signifikanzen wurden mit Hilfe des two-paired t-Testes beurteilt. Un-

terschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) oder $p < 0,001$ (***) .

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Affinitätsanalyse von Prostata- und Mammakarzinomzelllinien und einer CD34+ hämatopoetischen Zelllinie an Matrixkomponenten der hämatopoetischen Stammzellnische

Für die Verankerung in der hämatopoetischen Stammzellnische bieten sowohl zelluläre Komponenten als auch Matrixproteine potentielle Bindungsstellen. Zur Einschätzung der Adhäsion der untersuchten Zelllinien KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 an Matrixkomponenten der hämatopoetischen Stammzellnische wurden Zell-Matrix-Adhäsionsassays durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.4 sowie Abbildung 2.8). Zudem wurden zum Vergleich auch Proteine verwendet, die nicht in der hämatopoetischen Stammzellnische exprimiert werden. Die gewählten Konzentrationen wurden mit der KG-1a Zelllinie austitriert und jeweils die Konzentration gewählt, bei der noch eine gute Adhäsion sichtbar war beziehungsweise die Konzentration der Ausgangslösung, wenn schon ohne Verdünnung keine gute Adhäsion erreicht wurde.

Abbildung 3.1, 3.2 und 3.3 zeigen die Ergebnisse der Zell-Matrix-Adhäsionsassays: Die adhärenen Zellen heben sich als helle Punkte vom dunklen Hintergrund ab. Der Vergleich zwischen unterschiedlichen Proteinen beziehungsweise die Adhäsion unterschiedlicher Zelllinien an ein Protein erlaubt einen qualitativen Vergleich.

3.1.1 Adhäsion von CD34+ KG-1a an Matrixkomponenten

Die als Surrogatzelllinie für hämatopoetische Stammzellen verwendeten KG-1a Zellen adhären besonders gut an die Laminin-Isoformen LM 511 und LM 521, obwohl diese in einer Konzentration von nur 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufgetragen worden waren. Auch an

Fibronektin zeigte sich eine gute Adhäsion, wobei hierfür eine deutlich höhere Konzentration von $0,22 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ benötigt wurde. Die Adhäsion an LM 411 ($0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) und LM 421 ($0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) sowie Kollagen IV ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) war in etwa vergleichbar, hierfür wurde jedoch bei Kollagen IV eine 10 mal höhere Konzentration benötigt als bei LM 421. Die Adhäsion an Osteopontin sowie Tenascin-C ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) war schwächer als die Adhäsion an die vorher genannten Matrixproteine. An die Laminin-Isoform LM 111 sowie Netrin-1 in der Konzentration $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ zeigte sich die schwächste Adhäsion. An die Laminin-Isoform LM 211 (ebenfalls $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) zeigte sich keine Adhäsion. Repräsentative Beispiele zeigt Abbildung 3.1, der Versuch wurde mit einer Anzahl von $n=3$ durchgeführt.

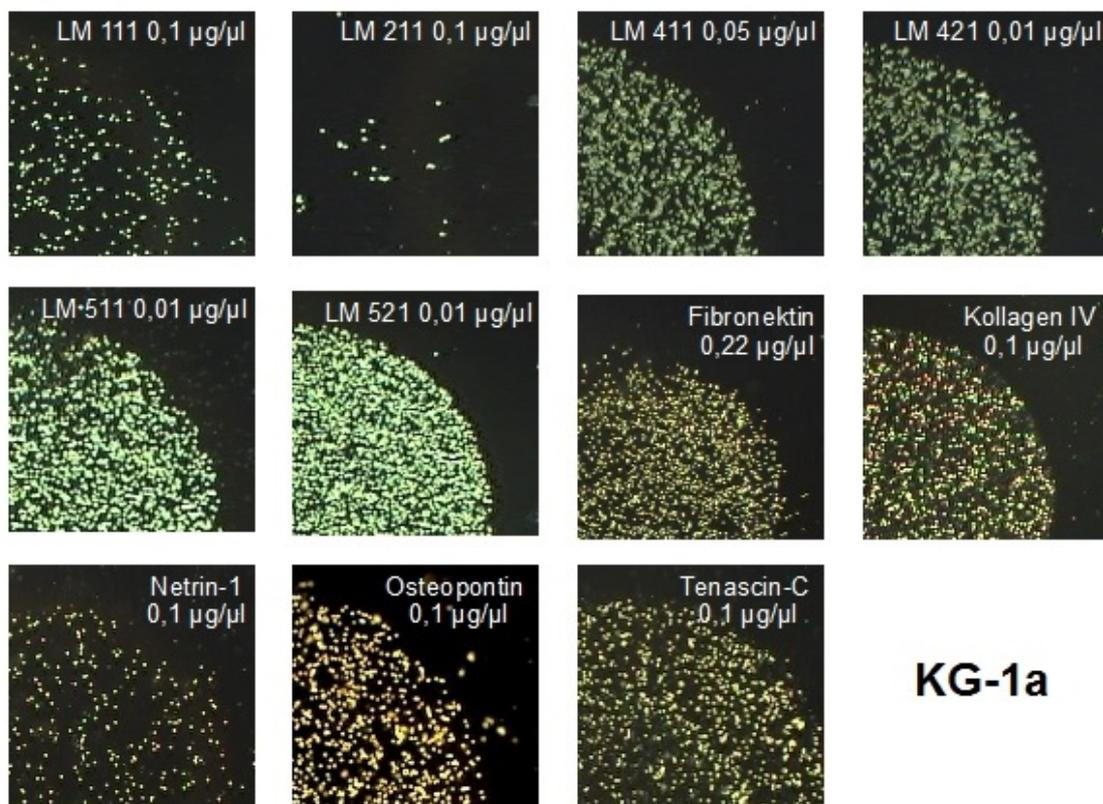


Abbildung 3.1: **Adhäsion von KG-1a Zellen an unterschiedliche EZM-Proteine.** Erkennbar ist eine hohe Zelldichte vor allem bei LM 511 und LM 521. KG-1a zeigte eine geringe Adhäsion an LM 111 und Netrin-1, und eine mittlere Adhäsion an LM 411 und 421, Fibronektin, Kollagen IV, Osteopontin und Tenascin-C. Es zeigte sich keine Adhäsion an LM 211.

3.1.2 Adhäsion von PC3 an Matrixkomponenten

Die Prostatakrebszelllinie PC3 hat eine hohe Affinität zu den Matrixproteinen LM 511, LM 521 (beide $0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), Tenascin-C und Kollagen IV (je $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die meisten Zellen adhärten an LM 511. Die Adhäsion an LM 421 ($0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), LM 411 ($0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), Netrin-1 ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) und Fibronectin ($0,22 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) zeigte sich im Vergleich hierzu geringer. PC3 Zellen zeigten lediglich eine geringe Affinität an die Proteine LM 111 und Osteopontin ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). An LM 211 ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) zeigten die PC3 Zellen keine Adhäsion. Abbildung 3.2 zeigt repräsentative Beispiele der Zell-Matrix-Adhäsionsassays, der Versuch wurde mit einer Anzahl von $n=3$ durchgeführt.

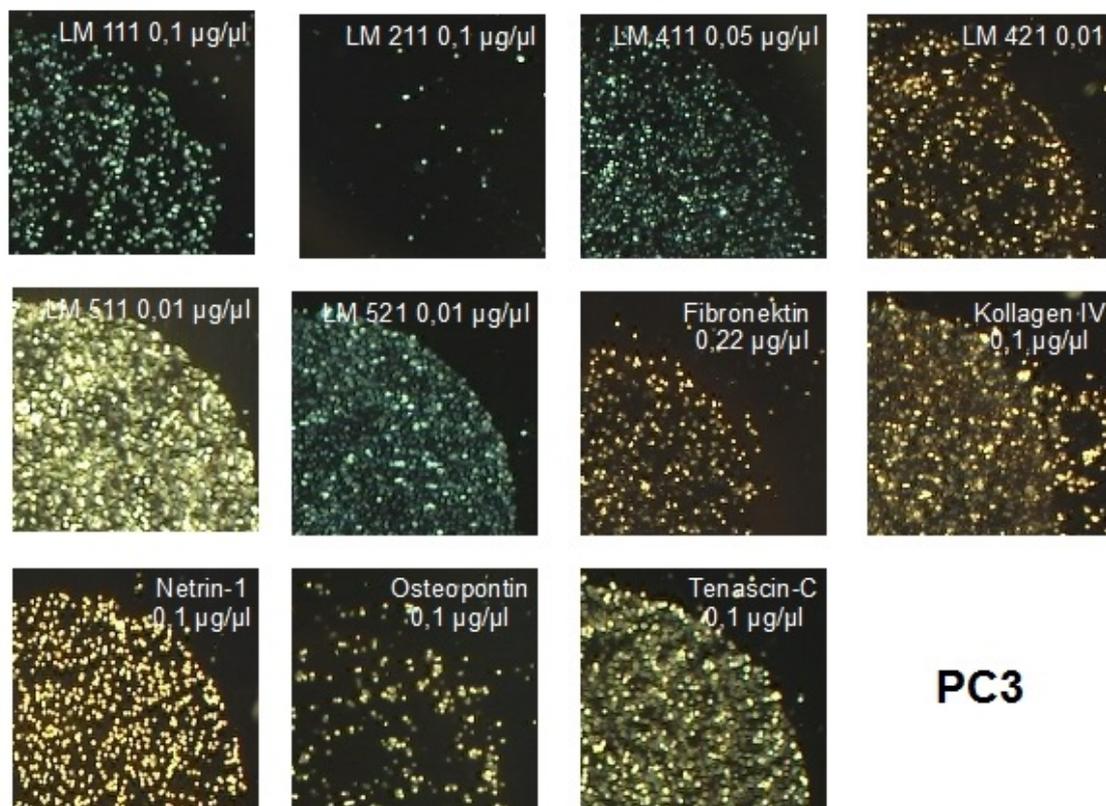


Abbildung 3.2: **Adhäsion von PC3 Zellen an unterschiedliche EZM-Proteine.** PC3 Zellen zeigen eine besonders gute Adhäsion an die Laminine 511 und 521 sowie Kollagen IV und Tenascin-C. Weniger Zellen adhärten an LM 111, 411, 421, Fibronectin sowie Netrin-1. An Osteopontin adhärten nur wenige, an LM 211 keine Zellen.

3.1.3 Adhäsion von MDA-MB-231 an Matrixkomponenten

Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 zeigte eine hohe Affinität an LM 421, 511 und 521 (je $0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) sowie Kollagen IV und Tenascin-C (beide $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Etwas geringer war die Adhäsion an LM 411 ($0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). MDA-MB-231 Zellen banden nicht an die Proteine LM 211 und Netrin-1 ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). An Fibronectin ($0,22 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), Osteopontin und LM 111 (beide $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) zeigten die MDA-MB-231 Zellen lediglich eine mäßige Adhäsion. Repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 3.3 dargestellt, der Versuch wurde mit einer Anzahl von $n=3$ durchgeführt.

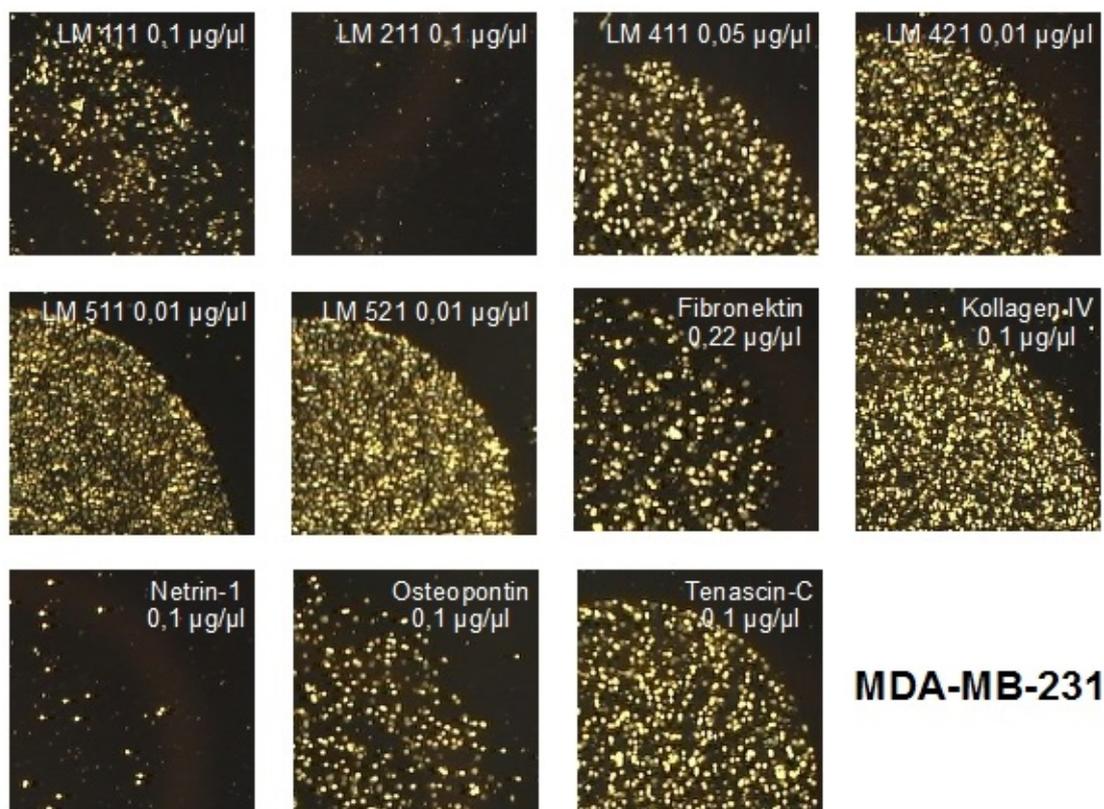


Abbildung 3.3: **Adhäsion von MDA-MB-231 Zellen an unterschiedliche EZM-Proteine.** MDA-MB-231 zeigen eine hohe Adhäsion an LM 411, 421, 511, 521 sowie an Kollagen IV. Eine geringere Adhäsion zeigte sich an LM 111, Fibronectin, Osteopontin und Tensascin-C. MDA-MB-231 Zellen adhärten nicht an die Proteine LM 211 sowie Netrin-1.

Die drei verglichenen Zelllinien zeigen alle eine besonders starke Adhäsion an LM 511 und LM 521, ebenso zeigt sich eine gute Adhäsion an Kollagen IV. Alle drei Zelllinien adhärten gering bis gar nicht an LM 111 und LM 211.

Unterschiede zeigen sich in der Adhäsion an Fibronectin. Hierbei scheint die Adhäsion

sion von KG-1a Zellen stärker zu sein, als die der PC3 und MDA-MB-231 Zellen. PC3 Zellen zeigten im Vergleich die höchste Adhäsion an Netrin-1.

3.2 Adhäsion einer CD34+ hämatopoetischen Zelllinie an Zellen der hämatopoetischen Stammzellnische in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Prostata- und Mammakarzinomzellen

Neben der im vorherigen Kapitel besprochenen Adhäsion an azelluläre Nischenkomponenten spielt auch die zelluläre Adhäsion eine wichtige Rolle in der hämatopoetischen Stammzellnische. Auch für metastasierende Tumorzellen stellen sie mögliche Adhäsionsstellen dar. Durch Zell-Zell-Assays wurde untersucht, inwiefern sich die Bindung von KG-1a Zellen durch die Anwesenheit von Prostata- und Mammakarzinomzellen verändert. Die Adhäsion wird hierbei in Relation zur Positivkontrolle in % angegeben (siehe Kapitel 2.5.2). Die Versuche wurden jeweils in einer Anzahl von $n=5$ durchgeführt.

Die Berechnung der Adhäsion der Zellen beruht auf der Annahme, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und Fluoreszenzintensität besteht. Um diesen zu überprüfen wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt (siehe Abbildung 3.4). Abbildung 3.4 A zeigt den Zusammenhang zwischen Zellzahl und Fluoreszenzintensität für mit QTracker 525 gefärbte MDA-MB-231 Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen. Da auch bei der geringsten getesteten Konzentration von 5 nM ein linearer Zusammenhang besteht und mögliche toxische Effekte des Farbstoffes auf die Zelle bei einer möglichst geringen Konzentration am geringsten sind, wurde diese Konzentration für die Adhäsionsexperimente gewählt. Abbildung 3.4 B zeigt den linearen Zusammenhang zwischen Zellzahl und Fluoreszenzintensität bei der gewählten Konzentration von 5 nM für die drei verwendeten Zelllinien KG-1a, PC3 und MDA-MB-231.

3.2.1 Bindungsaffinität von KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 an CAL 72

Analog zu den Zell-Matrix-Assays wurde zunächst die Affinität von KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 an einen konfluenten Zellrasen der osteoblastischen Zelllinie CAL 72 bestimmt. Hierfür fand eine halbstündige Inkubation der Zellen statt, im Anschluss wurde anhand von Fluoreszenzmessungen der Anteil der adhärenen Zellen

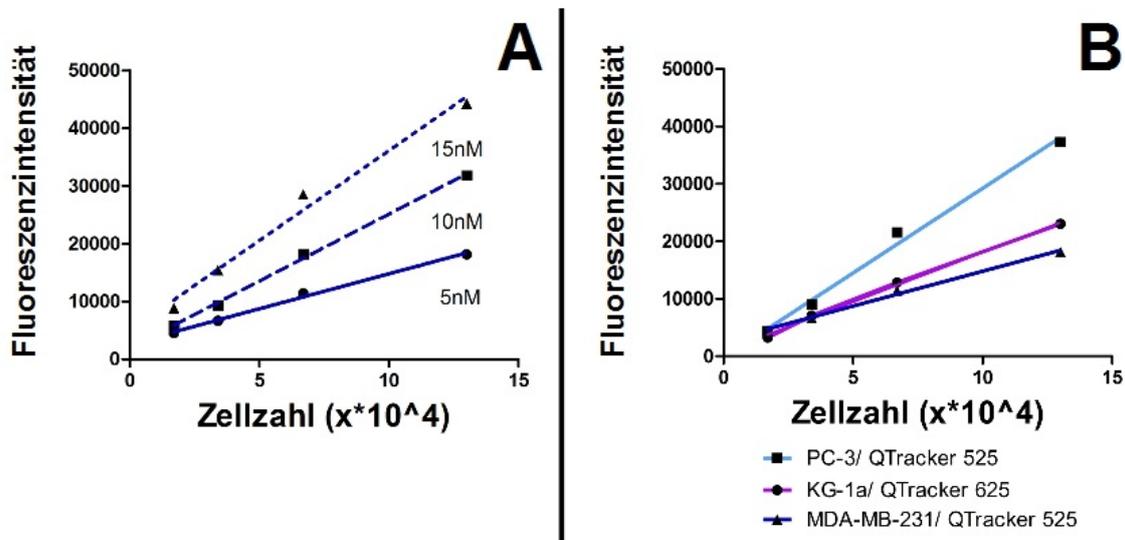


Abbildung 3.4: Überprüfung der Färbung von MDA-MB-231 mit QTracker 525 bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen (A), Färbung von KG-1a mit QTracker 625 sowie PC3 und MDA-MB-231 mit QTracker 525 bei einer Konzentration von 5 nM (B). Um zu überprüfen, ob die Fluoreszenz der Farbstoffe QTracker 525 und QTracker 625 mit der Zellzahl korrespondiert, wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt ($n=1$). A zeigt, dass für alle getesteten Konzentrationen ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und Fluoreszenzintensität besteht. B zeigt den linearen Zusammenhang bei der letztendlich verwendeten Konzentration von 5 nM für die verwendeten Zelllinien KG-1a, PC3 und MDA-MB-231.

bestimmt. Hierbei zeigte sich eine deutlich höhere Bindungsfähigkeit der PC3 und MDA-MB-231-Zelllinie als der KG-1a Zellen: Lediglich 36% ($\pm 7\%$) der KG-1a Zellen banden nach einer halben Stunde an CAL 72, wohingegen alle PC3 Zellen (103%, $\pm 6\%$) und MDA-MB-231 Zellen (100%, $\pm 4\%$) an CAL 72 binden konnten (siehe Abbildung 3.5). Hierbei ist zu beachten, dass PC3 und MDA-MB-231 Zellen adhären Zelllinien sind, wohingegen KG-1a Zellen in der Zellkultur in Suspension verbleiben und nicht adhären.

3.2.2 Bindungsaffinität von KG-1a bei Koinkubation mit PC3 oder MDA-MB-231 auf CAL 72

Um den Einfluss von zirkulierenden Tumorzellen auf das Adhäsionsverhalten von hämatopoetischen Stammzellen zu simulieren wurden fluoreszenzmarkierte KG-1a Zellen mit PC3 Zellen oder MDA-MB-231 Zellen koinkubiert und untersucht, ob sich hierdurch eine Veränderung der Adhäsion von KG-1a Zellen an CAL 72 ergibt. Durch die Koinkubation von KG-1a Zellen mit PC3 oder MDA-MB-231 Zellen kam

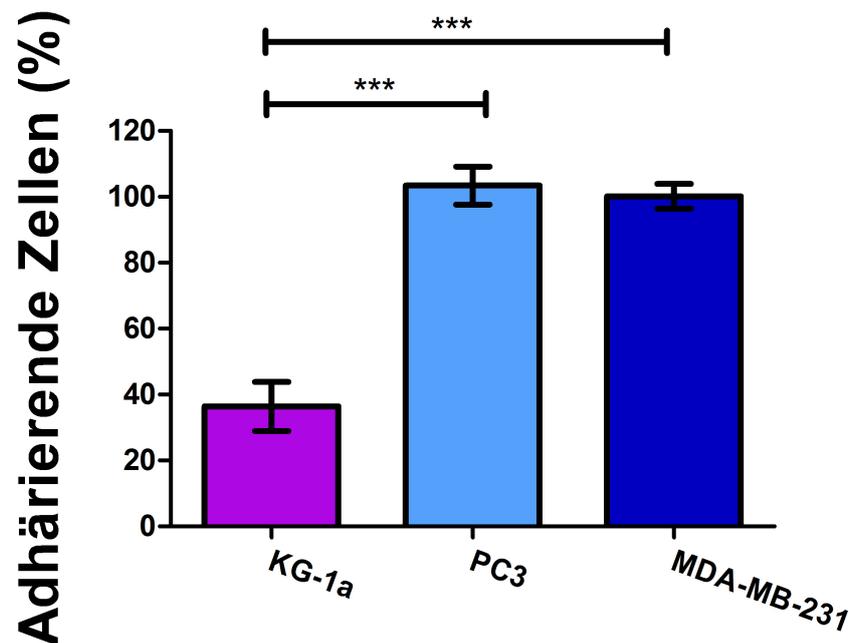


Abbildung 3.5: Adhäsion von KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 auf CAL 72. Alle PC3 und MDA-MB-231 Zellen konnten nach 30 minütiger Inkubation an CAL 72 binden, lediglich 36% der KG-1a Zellen adhärirten innerhalb dieser Zeit.

es lediglich zu einer geringfügigen Abnahme der Adhäsion der KG-1a Zellen von 36% auf 34% ($\pm 8\%$) bei der Koinkubation mit PC3 sowie von 36% auf 29% ($\pm 8\%$) bei der Koinkubation mit MDA-MB-231 (siehe Abbildung 3.6).

Ebenso verringerte sich die Adhäsion der PC3 und MDA-MB-231 Zellen im Vergleich zur alleinigen Inkubation. PC3 Zellen zeigten eine Verringerung der Adhäsion von 103% auf 95%. 94% der MDA-MB-231 Zellen adhärirten bei Koinkubation mit KG-1a im Vergleich zu 100% bei alleiniger Inkubation. Die Reduktion der Adhäsion bei Koinkubation im Vergleich zur alleinigen Inkubation war nicht signifikant.

3.2.3 Verdrängung von an CAL 72 gebundenen KG-1a Zellen durch PC3 und MDA-MB-231

In vivo ist ein Großteil der hämatopoetischen Stammzellen in der hämatopoetischen Stammzellnische gebunden. Tumorzellen gelangen sekundär in diese Nische und könnten diese Interaktion beeinflussen. Um dies zu simulieren, wurden KG-1a Zellen an CAL 72 gebunden und untersucht, ob sie sich durch die Inkubation mit PC3 oder MDA-MB-231 Zellen von ihren Bindungsplätzen verdrängen lassen. Als Kontrolle diente ein anstelle von mit den Tumorzellen lediglich mit RPMI behan-

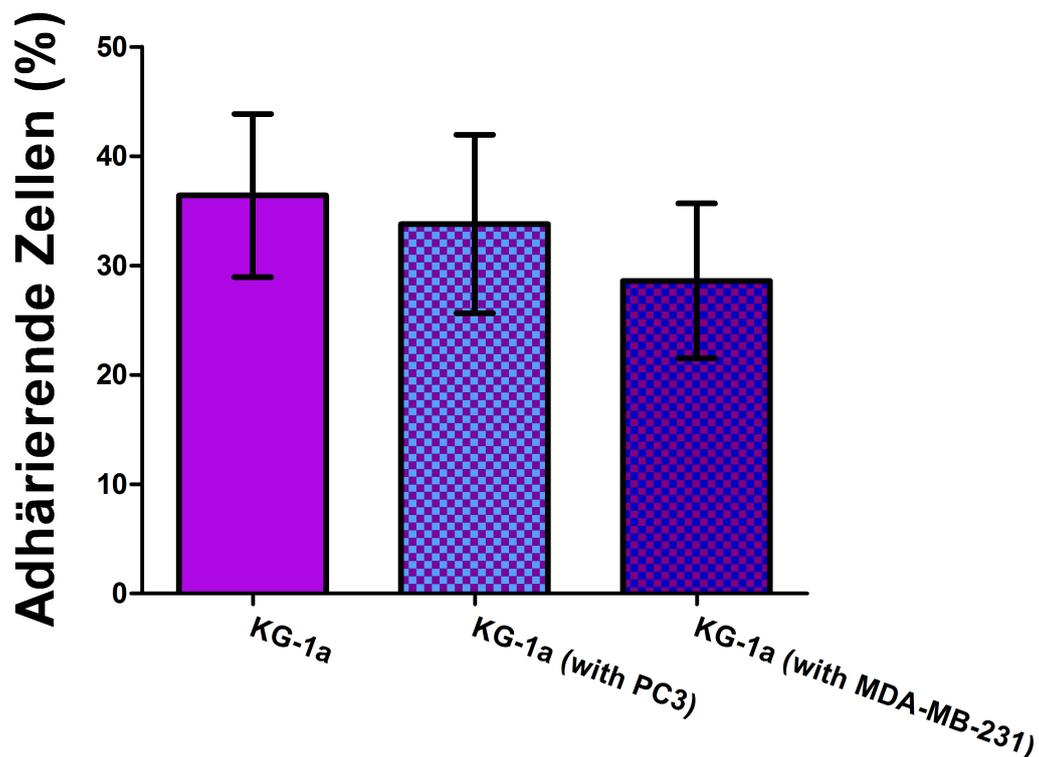


Abbildung 3.6: Adhäsion von KG-1a bei Koinkubation mit PC3 beziehungsweise MDA-MB-231 auf CAL 72. Bei Konkurrenz um die Bindungsplätze an CAL 72 verringert sich die Adhäsion von KG-1a an CAL 72 nur geringfügig (nicht signifikant).

delter Ansatz.

KG-1a Zellen können nicht durch PC3 Zellen aus ihrer Bindung an CAL 72 verdrängt werden. Bei der Inkubation von KG-1a Zellen mit RPMI zeigte sich eine Bindung von 88% ($\pm 10\%$) der KG-1a Zellen. Kein Unterschied zeigte sich bei der Inkubation mit PC3 Zellen: Die Adhäsion lag hier bei 89% ($\pm 11\%$). Auch die Zugabe von MDA-MB-231 Zellen bewirkte keine Veränderung der Adhäsion von KG-1a. In der Kontrolle mit RPMI adhärten 73% ($\pm 9\%$) der Zellen. Durch die Zugaben von MDA-MB-231 kam es zu keiner Veränderung der Adhäsion. Hierbei adhärten 74% ($\pm 10\%$) der KG-1a Zellen. Insgesamt zeigte sich keine Veränderung der Adhäsion von KG-1a Zellen durch die Zugabe von PC3 beziehungsweise MDA-MB-231 Zellen (siehe Abbildung 3.7).

Bei der Durchführung der Experimente zeigte sich ein hoher Standardfehler. Dies erklärt die abweichende Adhäsion von KG-1a bei Inkubation mit RPMI in den Verdrängungsexperimenten mit PC3 sowie MDA-MB-231 von 73% beziehungsweise 88%.

Die PC3 und MDA-MB-231 Zellen wurden durch die bereits gebundenen KG-1a Zellen nicht in ihrer Adhäsion beeinflusst: 94% ($\pm 2\%$) der MDA-MB-231 Zellen banden an CAL 72 in einem Kontrollversuch, bei Zugabe der MDA-MB-231 zu den bereits auf CAL 72 adhärierenden KG-1a konnten 92% ($\pm 6\%$) der Tumorzellen binden. 78% der zu den an CAL 72 gebundenen zugegebenen PC3 adhärerten, 76% ($\pm 16\%$) der PC3 Zellen banden in der Kontrolle.

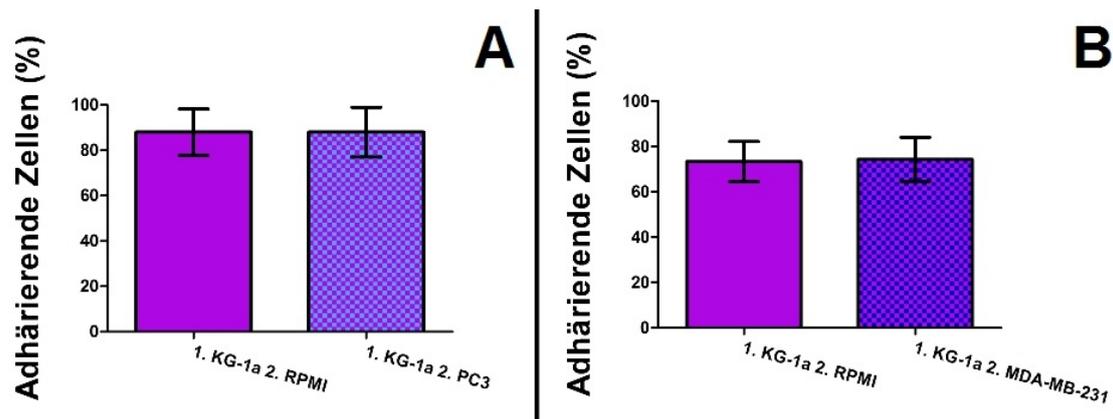


Abbildung 3.7: **Verdrängung von KG-1a auf CAL 72 durch MDA-MB-231 beziehungsweise PC3.** Weder PC3 noch MDA-MB-231 führen zu einer veränderten Adhäsion von an CAL 72 adhärerten KG-1a Zellen

Zusammenfassend zeigen KG-1a Zellen eine geringere Adhäsionsfähigkeit als PC3 und MDA-MB-231 an CAL 72 bei 30 minütiger Inkubation. Bei der Koinkubation von KG-1a und PC3 beziehungsweise MDA-MB-231 Zellen kommt es zu einer nicht signifikanten Abnahme der Bindung von KG-1a. Diese Abnahme erscheint größer bei der Koinkubation mit MDA-MB-231 als bei der Koinkubation mit PC3, die Verringerung ist jedoch in beiden Fällen nicht signifikant. KG-1a Zellen werden durch Zugabe von PC3 und MDA-MB-231 Zellen nicht aus ihrer Bindung an CAL 72 verdrängt.

3.3 Interaktionsanalyse von Prostata- und Mammakarzinomzelllinien und einer CD34+ hämatopoetischen Zelllinie mit Zellen der hämatopoetischen Stammzellnische mit Hilfe der SCFS

SCFS-Messungen ermöglichen es, die initiale Adhäsion an Strukturen der hämatopoetischen Stammzellnische zu quantifizieren. Eine hohe „Detachment Force“ zeigt eine gute Bindungsfähigkeit an die untersuchte Substanz und deutet damit auf eine gewichtige Rolle für die Adhäsion in der hämatopoetischen Stammzellnische hin.

Die gemessenen Adhäsionskräfte variieren dabei erheblich zwischen den unterschiedlichen zellulären und azellulären Proben. Abbildung 3.8 zeigt beispielhaft hierfür zum einen die Adhäsion einer CD34+CD38- Zelle an eine CAL 72 Zelle (A) sowie die Adhäsion einer PC3 Zelle an LM 511 (B). Die Adhäsion der CD34+CD38- Zelle ist deutlich unter 1 nN stark, wohingegen die Adhäsion der PC3 Zelle fast 9 nN beträgt. Zu erkennen ist, dass die „Retrakturcurve“ (dunkelblau) in B nicht die Nulllinie erreicht. Zelle und Probe konnten in diesem Fall auf Grund der hohen Interaktionskraft auch beim maximalen Rückzug von 100 μm nicht vollständig separiert werden.

3.3.1 Analyse der Adhäsionseigenschaften von KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 an die osteoblastische Zelllinie CAL 72 sowie mesenchymale Stammzellen

Die drei Zelllinien KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 wurden auf ihre Adhäsion an die osteoblastische Zelllinie CAL 72 sowie humane MSC untersucht. Abbildung 3.9 zeigt die Adhäsion der Zellen nach 30 sec Kontaktzeit.

KG-1a Zellen zeigen eine nicht signifikant höhere Adhäsion an MSC (1,26, \pm 0,13, n=20) als an CAL 72 (0,98 nN, \pm 0,08, n=46). PC3 Zellen adhäreren signifikant besser an MSC (0,89 nN, \pm 0,07, n=18) als an CAL 72 (0,59 nN \pm 0,04, n=30). MDA-MB-231 Zellen zeigen ein ähnliches Bindungsvermögen an CAL 72 (1,13 nN, \pm 0,13, n=25) wie an MSC (1,07, \pm 0,17, n=12). PC3 Zellen zeigen ein signifikant geringeres Bindungsvermögen an CAL 72 im Vergleich zu KG-1a und MDA-MB-231. Auch an MSC binden PC3 mit der geringsten Kraft. Tabelle 3.1 zeigt die Anzahl der jeweils durchgeführten Messungen.

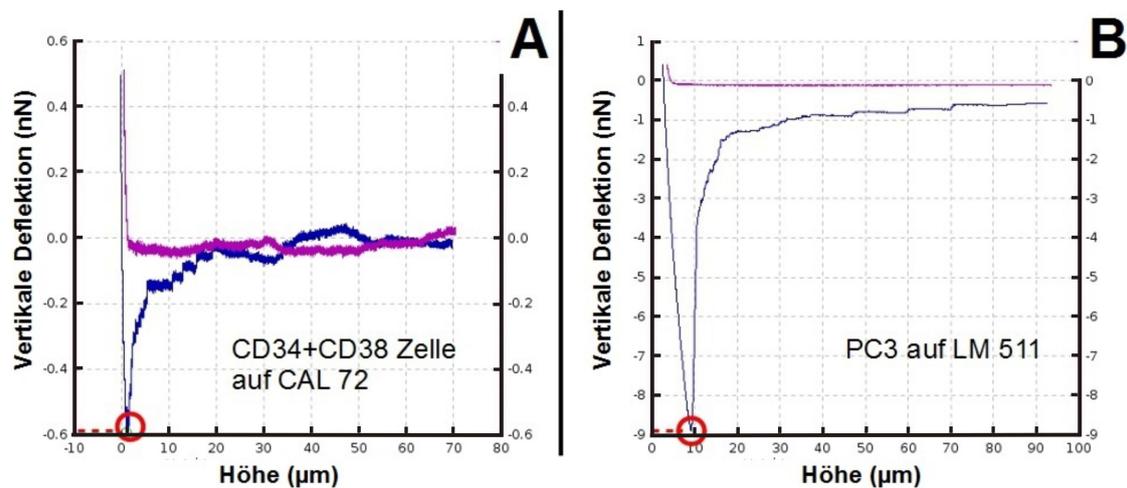


Abbildung 3.8: Adhäsion einer CD34+CD38- an CAL 72 (A) und Adhäsion einer PC3 Zelle an LM 521 (B). Die Kontaktzeit zwischen Zelle und Probe beträgt in beiden Fällen 30 sec. Die Adhäsionskräfte, die mithilfe der SCFS bestimmt werden können, variieren erheblich zwischen den unterschiedlichen Zellen und Proben: Die Adhäsion der CD34+CD38- Zelle an CAL 72 beträgt lediglich 0,59 nN. Eine starke Adhäsion zeigt die PC3 Zelle an LM 511: In der dargestellten Messung betrug die Adhäsion 8,9 nN. Die dunkelblaue „Retract-Kurve“ verläuft am Ende nicht auf der Nulllinie. Dies zeigt, dass Zelle und Probe auch bei maximalem Rückzug des Cantilevers von der Probe nicht vollständig separiert werden konnten.

3.3.2 Vergleich der Adhäsionseigenschaften von KG-1a und primären humanen hämatopoetischen Stammzellen an CAL 72

Die CD34+ Zelllinie KG-1a dient als Surrogatzelllinie für hämatopoetische Stammzellen. Um die Vergleichbarkeit zu primären hämatopoetischen Stammzellen zu überprüfen, wurden CD34+CD38- Zellen aus humanem Nabelschnurblut aufgereinigt und mit KG-1a in SCFS-Messungen auf CAL 72 verglichen. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurde eine FACS-Messung durchgeführt. Die Aufreinigung erzielte eine Reinheit von 94,9 % und die aufgereinigten Zellen waren damit für die folgenden

	Kontaktzeit in sec	KG-1a	PC3	MDA-MB-231
CAL 72	30	46	30	25
MSC	30	20	18	12

Tabelle 3.1: Anzahl der durchgeführten Zell-Zell-Adhäsionsmessungen: KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 auf CAL 72 beziehungsweise MSC nach 30 sec.

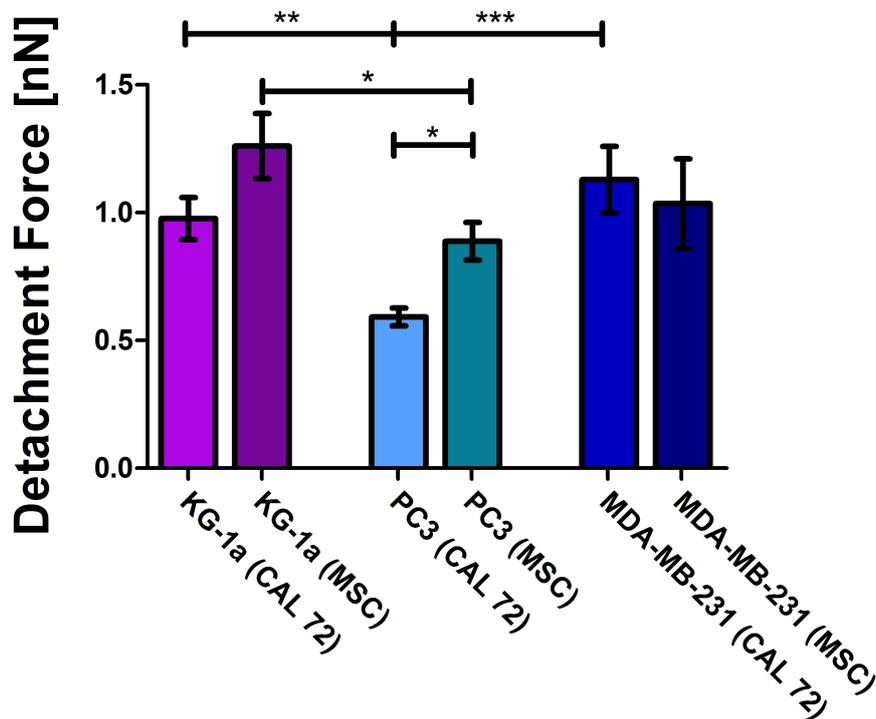


Abbildung 3.9: Adhäsionskräfte von KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 an CAL 72 und MSC nach 30 sec. PC3 Zellen zeigen eine geringere Adhäsion an zelluläre Komponenten der hämatopoetischen Stammzellnische als KG-1a und MDA-MB-231. Die Adhäsion an CAL 72 ist für KG-1a und PC3 geringer als an MSC. Die Anzahl der Messungen ist in Tabelle 3.1 aufgeführt.

SCFS-Messungen verwendbar (siehe Abbildung 3.10). Für die Einordnung des Vergleiches zwischen KG-1a und primären humanen HSC ist zu beachten, dass KG-1a Zellen deutlich größer als CD34+CD38- Zellen sind und damit eine größere Kontaktfläche besitzen, welche zu größeren Adhäsionskräften bei den SCFS-Messungen führen kann.

Um KG-1a Zellen nach 10 sec von CAL 72 zu separieren, wurde eine Kraft von 0,56 nN ($\pm 0,05$, n=64) benötigt. Diese Kraft stieg bei 30 sec auf 0,98 nN ($\pm 0,08$, n=46) und nach 60 sec auf 1,62 nN ($\pm 0,13$, n=55). Für die Separierung der CD34+CD38-Zellen wurden geringere Kräfte benötigt: Nach 10 sec betrug die Detachment Force 0,42 nN ($\pm 0,02$, n=46), nach 30 sec 0,62 ($\pm 0,04$, n=49) und nach 60 sec 0,82 nN ($\pm 0,05$, n=52). Für alle drei gewählten Kontaktzeiten zeigt sich eine signifikant geringere Adhäsion der CD34+CD38 Zellen als der KG-1a Zellen.

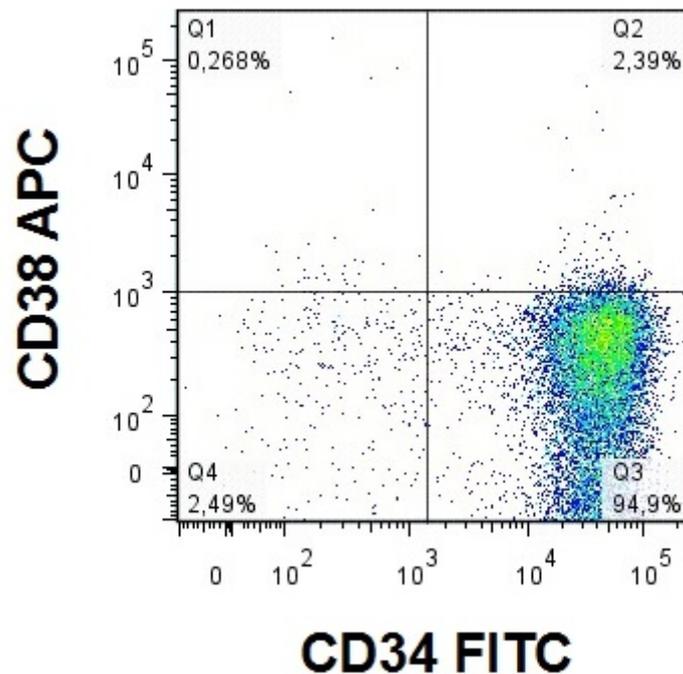


Abbildung 3.10: Überprüfung der Aufreinigung von CD34+CD38- Zellen aus PBMC mittels FACS. Die aufgereinigten Zellen wurden sowohl mit einem APC-gekoppelten CD38 Antikörper als auch einem FITC-gekoppelten CD34 Antikörper gefärbt. Im rechten unteren Quadranten findet sich die gesuchte CD34+CD38- Zellpopulation. Die Aufreinigung von CD34+CD38- Zellen aus PBMC erzielte eine Reinheit von 94,9%.

3.4 Interaktionsanalyse von Prostata- und Mammarkarzinomzelllinien und einer CD34+ hämatopoetischen Zelllinie mit Matrixkomponenten der hämatopoetischen Stammzellnische

Mit den in den Zell-Matrix-Assays austitrierten Konzentrationen der unterschiedlichen Laminin-Isoformen sowie weiteren Proteinen der EZM der hämatopoetischen Stammzellnischen wurden analog zu den Zell-Zell-SCFS-Messungen Zell-Matrix-SCFS-Messungen durchgeführt. Verwendet wurden hierfür die Zelllinien KG-1a, PC3 und MDA-MB-231. Verglichen werden die Messungen bei einer Kontaktzeit von 30 sec. Wie schon in den Zell-Matrix-Assays gezeigt, haben alle drei Zelllinien eine hohe Affinität an die Laminin-Isoformen LM 511 und LM 521. Hier kam es daher häufig zu nicht auswertbaren Messungen, da die Affinität der Zellen höher an LM 511 und

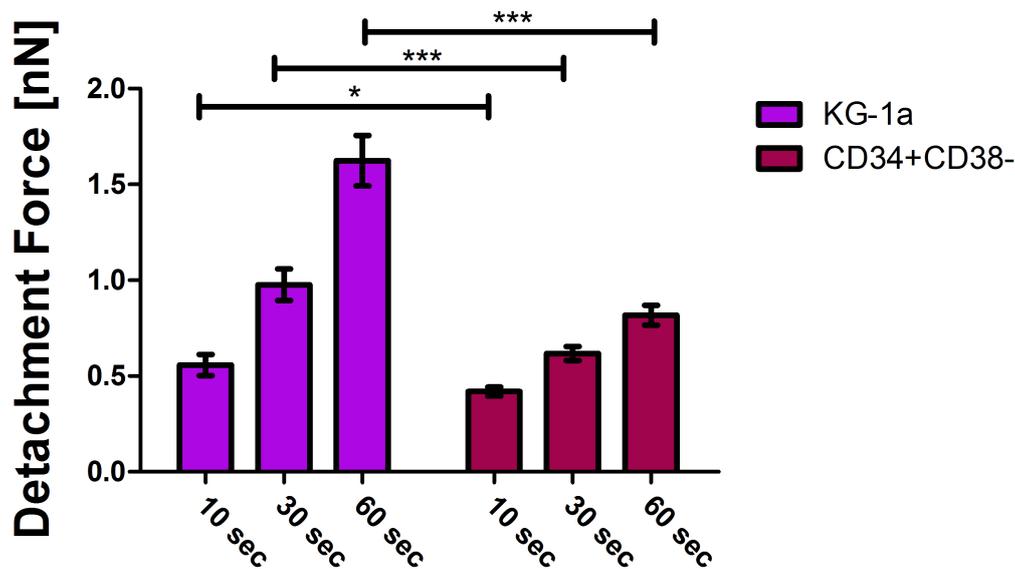


Abbildung 3.11: Vergleich der Adhäsionskräfte von KG-1a und CD34+CD38- hämatopoetischer Stammzellen auf CAL 72. KG-1a Zellen zeigen eine signifikant höhere Adhäsion an CAL 72 als CD34+CD38- Zellen, die Anzahl der durchgeführten Messungen ist im Kapitel 3.3.2 zu finden.

521 als deren Bindung an den Cantilever war. In der Auswertung konnten jedoch nur die erfolgreichen Messungen einfließen, sodass die Adhäsion an diese Proteine eher noch höher einzuschätzen ist.

3.4.1 Analyse von Adhäsionseigenschaften von KG-1a mit Matrixkomponenten der hämatopoetischen Stammzellnische

Zur Separierung von KG-1a Zellen von der Matrix wurden bei der Interaktion mit Fibronectin, Kollagen IV, LM 511, sowie LM 521 die stärksten Kräfte benötigt. Besonders sticht hierbei die Adhäsion an LM 521 hervor, die mit im 4,43 nN deutlich höher ist als die Adhäsion an die übrigen Matrixproteine. KG-1a Zellen zeigten eine geringe Adhäsion von weniger als 1 nN an LM 111, LM 211, sowie Netrin-1. Die Bindung von KG-1a an LM 411, 421 und Osteopontin war mit circa 1,3 nN vergleichbar, die Bindung an Tenascin-C mit 1,8 nN hingegen höher (siehe Abbildung 3.13 sowie Tabelle 3.2). Die hohen Standardfehler bei hoher Bindungskraft sind dadurch zu erklären, dass hierbei lediglich eine geringere Anzahl an Messungen erfolgreich durchgeführt werden konnte, da es auf Grund der starken Adhäsion häufig zu einem Haftenbleiben der Zelle an der Oberfläche kommt, da die Bindung an den Cantilever

Matrixprotein	Detachment Force	Standardfehler	Anzahl Messungen
Fibronektin	2,26 nN	$\pm 0,66$ nN	n=6
Kollagen IV	2,58 nN	$\pm 1,57$ nN	n=6
LM 111	0,59 nN	$\pm 0,12$ nN	n=13
LM 211	0,96 nN	$\pm 0,26$ nN	n=14
LM 411	1,34 nN	$\pm 0,21$ nN	n=14
LM 421	1,38 nN	$\pm 0,47$ nN	n=9
LM 511	2,81 nN	$\pm 0,12$ nN	n=8
LM 521	4,43 nN	$\pm 1,71$ nN	n=7
Netrin-1	0,93 nN	$\pm 0,22$ nN	n=11
Osteopontin	1,24 nN	$\pm 0,23$ nN	n=9
Tenascin-C	1,80 nN	$\pm 0,46$ nN	n=10

Tabelle 3.2: Bestimmung der Zellbindungskräfte von KG-1a Zellen an Fibronektin, Kollagen IV, LM 111, 211, 411, 421, 511 und 521, Netrin-1, Osteopontin und Tenascin-C.

schwächer als die Bindung an die Oberfläche ist. Zwei beispielhafte Adhäsionskurven zeigt Abbildung 3.12. Die in A abgebildete Adhäsion einer KG-1a Zelle an LM 411 mit einer Stärke von 1,44 nN ist im Vergleich zur in B dargestellten Adhäsion einer KG-1a Zelle an LM 521 mit 4,50 nN deutlich geringer. In beiden Kurven ist erkennbar, dass es nach dem Rückzug des Cantilevers um 2-5 μm von der Probe zur schrittweisen Separierung von Zelle und Probe kommt.

3.4.2 Analyse von Adhäsionseigenschaften von PC3 mit Matrixkomponenten der hämatopoetischen Stammzellnische

PC3 Zellen binden besonders stark an die Matrixkomponenten LM 511, LM 521 und Kollagen IV. Bei allen drei Proteinen liegt die maximale „Detachment Force“ über 3 nN. Deutlich geringer mit einer Bindungskraft um 2 nN ist die Adhäsion von PC3 an Netrin-1, Tenascin-C und Fibronektin. PC3 adhäreren mit einer Bindungskraft von 1,5 nN an Osteopontin. Die Bindung von PC3 an LM 111, 211 und 411 ist schwach, für LM 111 und 411 liegt sie unter 1 nN (siehe Abbildung 3.14 sowie Tabelle 3.3).

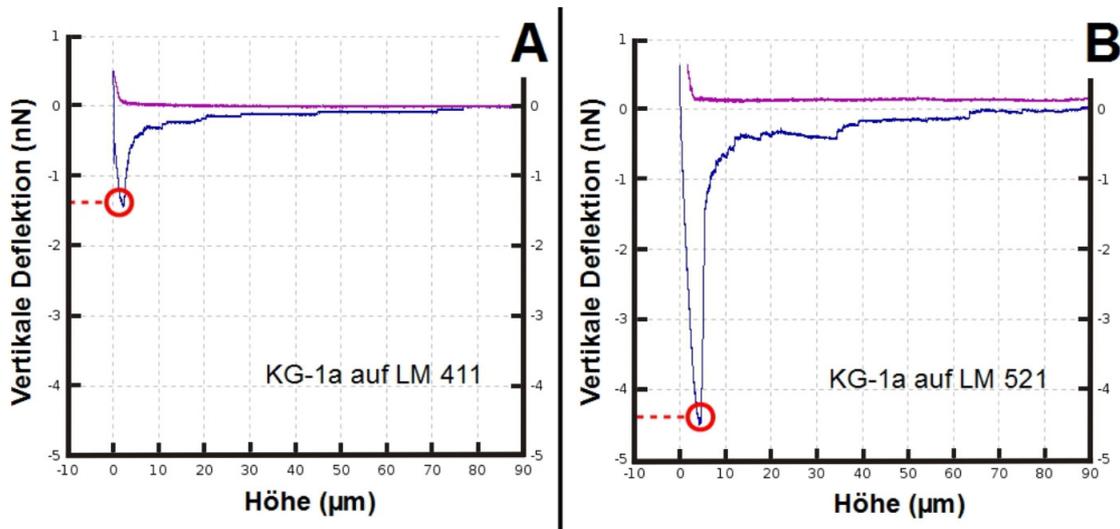


Abbildung 3.12: Kraftkurven der Adhäsion einer KG-1a Zelle an LM 411 (A) sowie an LM 521 (B), in beiden Fällen nach einer Kontaktzeit von 30 sec. KG-1a Zellen zeigen eine signifikant geringere Adhäsion an LM 411 im Vergleich zur Adhäsion an LM 521 (siehe Abbildung 3.13). Die hier dargestellten Kraftkurven verdeutlichen dies: Die Kraftkurven zeigen eine Adhäsion von 1,44 nN an LM 411 und 4,50 nN an LM 521.

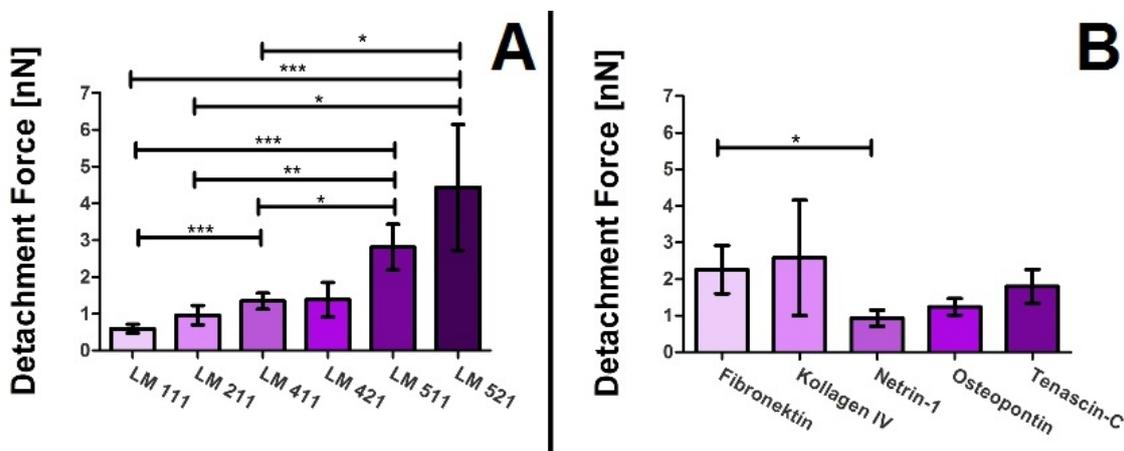


Abbildung 3.13: Adhäsionskräfte zwischen KG-1a Zellen und Laminin-Isoformen (A) sowie weiteren Matrixproteinen (B), Kontaktzeit 30 sec. KG-1a Zellen adhären stark an die Laminin-Isoformen LM 511 und LM 521 sowie an Fibronectin und Kollagen IV. Hingegen zeigte sich eine deutlich geringere Bindungsstärke an die Laminin-Isoformen LM 411 und 421 sowie an Osteopontin und Tenascin-C. KG-1a Zellen banden lediglich schwach an LM 211 und Netrin-1. Die geringste Bindung zeigten KG-1a Zellen an LM 111.

Matrixprotein	Detachment Force	Standardfehler	Anzahl Messungen
Fibronektin	1,75 nN	$\pm 0,54$ nN	n=7
Kollagen IV	3,20 nN	$\pm 0,71$ nN	n=10
LM 111	0,79 nN	$\pm 0,12$ nN	n=8
LM 211	1,18 nN	$\pm 0,11$ nN	n=10
LM 411	0,77 nN	$\pm 0,10$ nN	n=9
LM 421	1,90 nN	$\pm 0,60$ nN	n=9
LM 511	3,56 nN	$\pm 0,70$ nN	n=3
LM 521	3,35 nN	$\pm 0,75$ nN	n=8
Netrin-1	2,10 nN	$\pm 0,45$ nN	n=6
Osteopontin	1,51 nN	$\pm 0,36$ nN	n=8
Tenascin-C	2,03 nN	$\pm 0,36$ nN	n=11

Tabelle 3.3: Bestimmung der Zellbindungskräfte von PC3 Zellen an Fibronektin, Kollagen IV, LM 111, 211, 411, 421, 511 und 521, Netrin-1, Osteopontin und Tenascin-C.

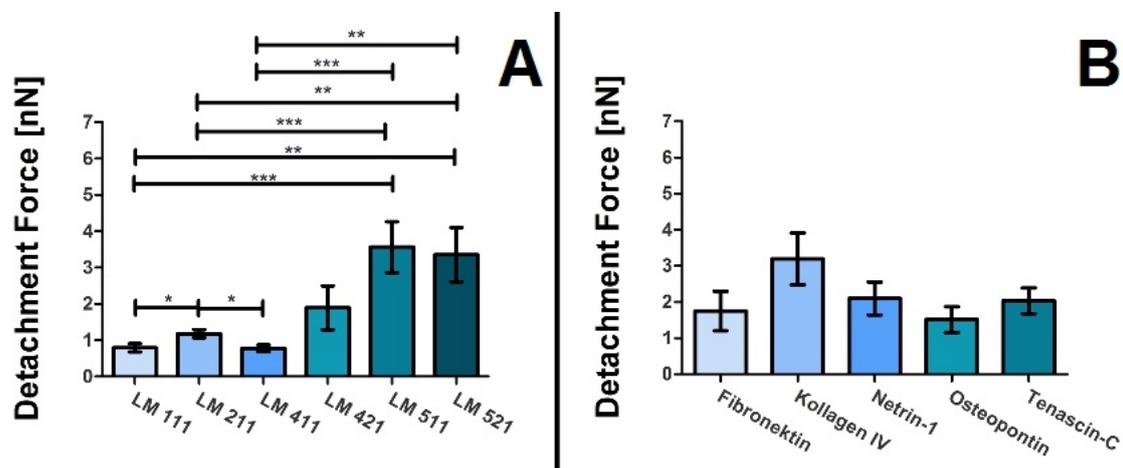


Abbildung 3.14: Adhäsionskräfte zwischen PC3 Zellen und Laminin-Isoformen (A) sowie weiteren Matrixproteinen (B), Kontaktzeit 30 sec. PC3 Zellen adhäreren besonders stark an die Laminin-Isoformen LM 511 und LM 521 sowie an Kollagen IV. Hingegen zeigen sie nur eine geringere Adhäsion an LM 421, Fibronektin, Netrin-1, Osteopontin und Tenascin-C. An den Laminin-Isoformen LM 111, 211 und 411 adhärerten die PC3 Zellen mit der geringsten Kraft.

Matrixprotein	Detachment Force	Standardfehler	Anzahl Messungen
Fibronektin	0,93 nN	$\pm 0,22$ nN	n=5
Kollagen IV	3,93 nN	$\pm 1,7$ nN	n=8
LM 111	0,81 nN	$\pm 0,16$ nN	n=7
LM 211	0,74 nN	$\pm 0,17$ nN	n=8
LM 411	0,67 nN	$\pm 0,12$ nN	n=8
LM 421	1,44 nN	$\pm 0,38$ nN	n=10
LM 511	2,45 nN	$\pm 0,68$ nN	n=11
LM 521	1,52 nN	$\pm 0,13$ nN	n=8
Netrin-1	1,86 nN	$\pm 0,49$ nN	n=7
Osteopontin	0,93 nN	$\pm 0,19$ nN	n=9
Tenascin-C	1,53 nN	$\pm 0,35$ nN	n=10

Tabelle 3.4: **Bestimmung der Zellbindungskräfte von MDA-MB-231 Zellen an Fibronektin, Kollagen IV, LM 111, 211, 411, 421, 511 und 521, Netrin-1, Osteopontin und Tenascin-C.**

3.4.3 Analyse von Adhäsionseigenschaften von MDA-MB-231 mit Matrixkomponenten der hämatopoetischen Stammzellnische

MDA-MB-231 Zellen zeigen die höchste Bindungsfähigkeit an Kollagen IV. Hier beträgt die Bindungskraft 3,93 nN. Auch die Adhäsion der MDA-MB-231 Zellen an LM 511 mit 2,45 nN ist hoch. Die Adhäsion der MDA-MB-231 Zellen an LM 421, Tenascin-C und Netrin-1 ist mit Werten um 1,5 nN deutlich geringer. Die Bindungskraft an LM 111, LM 211, LM 411, Fibronektin und Osteopontin nach 30 sec liegt unter 1 nN (siehe Abbildung 3.15 sowie Tabelle 3.4).

Die untersuchten Zelllinien KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 zeigen alle eine hohe Affinität zu LM 511, 521 und Kollagen IV. Die Adhäsion an LM 111, 211 sowie an LM 411 ist bei allen untersuchten Zelllinien lediglich schwach ausgeprägt. Unterschiede zeigen sich in der Adhäsion an Fibronektin und Netrin-1. KG-1a Zellen zeigen eine stärkere initiale Bindung zu Fibronektin als PC3 und MDA-MB-231. Die Bindung an Netrin-1 ist im Gegensatz dazu höher für PC3 und MDA-MB-231 Zellen als für KG-1a Zellen (siehe Abbildung 3.16).

Vergleicht man die Zell-Zell-Adhäsionskräfte mit den Zell-Matrix-Adhäsionskräften fällt auf, dass erstere insgesamt schwächer ausgeprägt sind. Die höchsten „Detachment Forces“ werden bei der Interaktion zwischen KG-1a und MSC mit einem Mit-

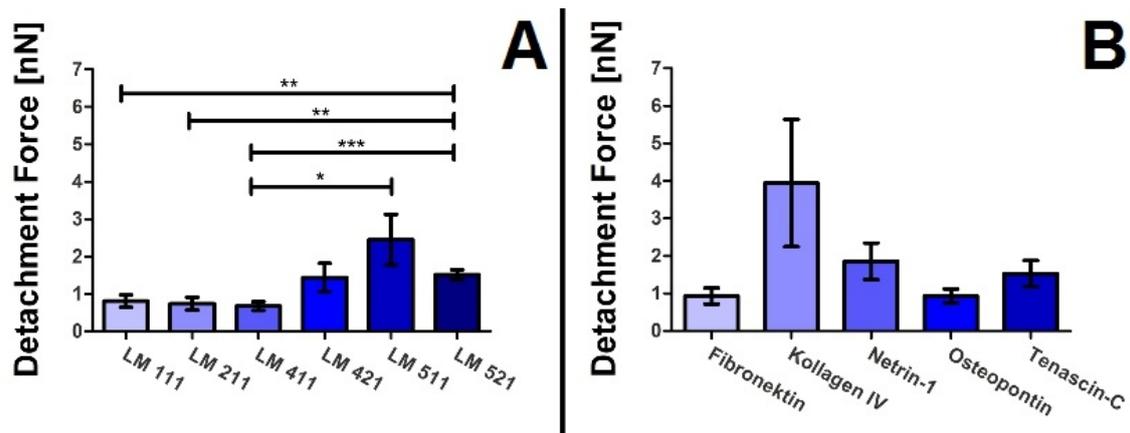


Abbildung 3.15: Adhäsionskräfte zwischen MDA-MB-231 Zellen und Laminin-Isoformen (A) sowie weiteren Matrixproteinen (B), Kontaktzeit 30 sec. MDA-MB-231 Zellen zeigten die stärkste Adhäsion an Kollagen IV. Unter den Laminin-Isoformen zeigte sich die stärkste Adhäsion an LM 511, wohingegen MDA-MB-231 Zellen lediglich gering an LM 111, 211 und 411 adhärten. Ebenso war die Adhäsion an Fibronectin und Osteopontin nur schwach. An LM 421, 521, Netrin-1 und Tenascin-C zeigte sich eine mittlere Adhäsionsstärke.

telwert von 1,13 nN gemessen. Bei der Zell-Matrix-Interaktion werden hingegen Mittelwerte von bis zu 4,43 nN erreicht (Adhäsion von KG-1a an LM 521). Die meisten Mittelwerte der Zell-Matrix-Messungen zeigen Mittelwerte > 1 nN.

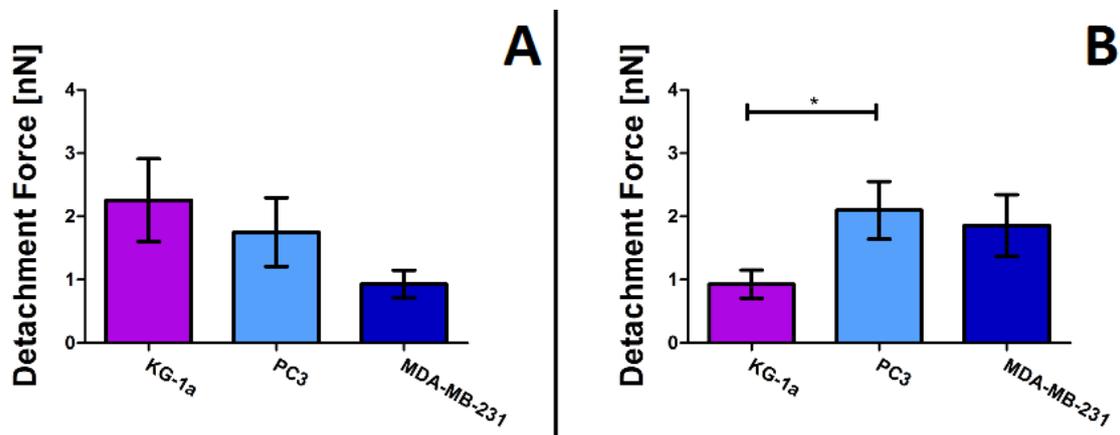


Abbildung 3.16: Adhäsion von KG-1a, PC3 und MDA-MB-231 an Fibronectin (A) und Netrin-1 (B) nach 30 sec Kontaktzeit. KG-1a zeigt im Vergleich zu PC3 und MDA-MB-231 eine höhere Affinität an Fibronectin, PC3 und MDA-MB-231 haben eine höhere Affinität an Netrin-1.

3.5 Abhängigkeit der Adhäsionsstärke von der Zeit bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionsmessungen

3.5.1 Zunahme der Bindungsstärke in Abhängigkeit der Kontaktzeit

Die SCFS erlaubt es, die Bindung zwischen einer am Cantilever befestigten, zu untersuchenden Zelle und einer definierten Oberfläche zu quantifizieren. Hierbei wurden Kontaktzeiten von 1, 10, 30 und 60 sec für die Messung von Zell-Matrix-Interaktionen gewählt und auf Grund der geringeren Adhäsionskräfte Kontaktzeiten von 10, 30 und 60 sec für die Messung der Zell-Zell-Interaktionen. Hierbei zeigte sich bei allen untersuchten Interaktionen eine Zunahme der Adhäsionskraft mit Zunahme der Kontaktzeit.

Exemplarisch hierfür ist in Abbildung 3.17 die Adhäsion von CD34+CD38- Zellen auf CAL 72 (A) und die Adhäsion von PC3 Zellen auf Tenascin-C (B) dargestellt. Bei einer Kontaktzeit von 10 sec adhären die CD34+CD38- Zellen mit einer Stärke von 0,42 nN ($\pm 0,023$, n=46), bei 30 sec mit 0,62 nN ($\pm 0,037$, n=49), nach 60 sec Kontaktzeit zeigt sich eine Adhäsionskraft von 0,82 nN ($\pm 0,052$, n=52). Im untersuchten Zeitraum ist die Adhäsion damit näherungsweise linear ansteigend.

Nach 1 sec adhären die PC3 Zellen mit 0,61 nN ($\pm 0,18$, n=10) an Tenascin-C, nach 10 sec mit 0,99 nN ($\pm 0,16$ nN, n=11), nach 30 sec mit 2,03 nN ($\pm 0,36$, n=11) und nach 60 sec mit 3,00 nN ($\pm 0,65$, n=11). Hiermit liegt auch hier im untersuchten Zeitraum eine nahezu lineare Steigerung der Adhäsion vor.

3.5.2 Adhäsionsunterschiede in der initialen Adhäsion nach 1 sec

Um zu beurteilen, welche Matrixkomponenten eine Rolle bei der initialen Adhäsion in der hämatopoetischen Stammzellnische spielen, wurde die Adhäsion nach einer Kontaktzeit von 1 sec gemessen. Wie in Abbildung 3.14 gezeigt, adhären PC3 Zellen besonders stark an Kollagen IV, LM 511 und 521. Abbildung 3.18 zeigt daher exemplarisch die Adhäsion von PC3 Zellen nach einer Sekunde an diese Proteine. Zum Vergleich ist die unspezifische Adhäsion an Plastik dargestellt. Die Adhäsion an die Proteine der EZM ist dabei signifikant höher. Tabelle 3.5 zeigt die ermittelten Mittelwerte und Standardfehler.

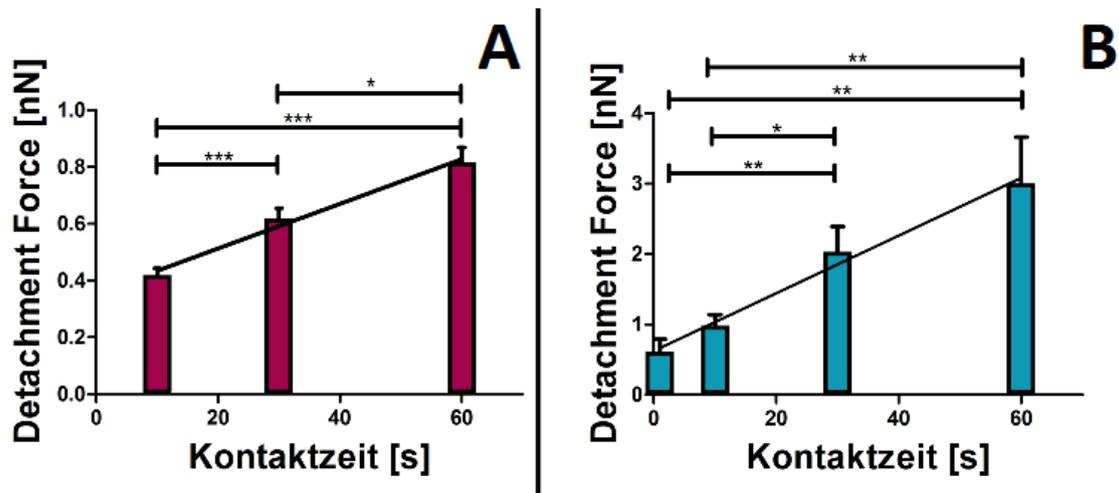


Abbildung 3.17: Zunehmende Adhäsion von CD34+CD38- Zellen an CAL 72 (A) und von PC3 an Tenascin-C (B). In Kontaktzeiten zwischen 1 und 60 sec nimmt die Adhäsionskraft stetig zu, sowohl bei der Zell-Zell- als auch bei Zell-Matrix-Interaktion und unabhängig von der untersuchten Zellart.

Matrixprotein	Detachment Force	Standardfehler	Anzahl Messungen
Kollagen IV	1,69 nN	$\pm 0,17$ nN	n=7
LM 511	1,14 nN	$\pm 0,23$ nN	n=11
LM 521	1,18 nN	$\pm 0,33$ nN	n=11
Plastik	0,13 nN	$\pm 0,03$ nN	n=3

Tabelle 3.5: Adhäsion von PC3 Zellen an Kollagen IV, LM 511, LM 521 und Plastik nach einer Kontaktzeit von 1 sec.

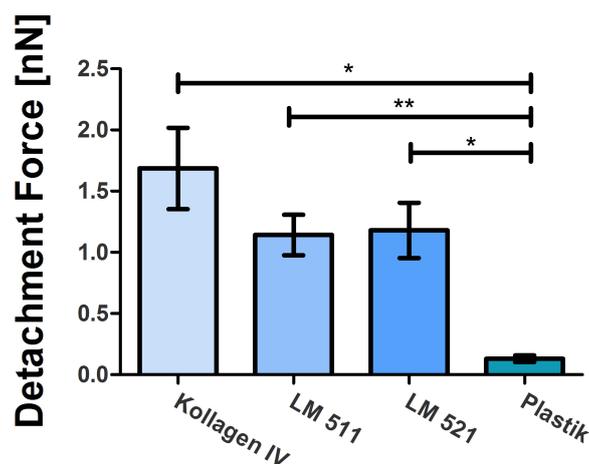


Abbildung 3.18: Initiale Adhäsion nach 1 sec von PC3 Zellen an Kollagen IV, LM 511 und LM 521. Bereits nach einer Kontaktzeit von 1 sec unterscheidet sich die Adhäsion von PC3 Zellen an die Laminine 511 und 521 sowie Kollagen IV signifikant von der unspezifischen Adhäsion an Plastik.

Kapitel 4

Diskussion

Die von Paget 1889 [64] aufgestellte Hypothese des „seed and soil“ Prinzips gilt bis heute: Im Metastasierungsprozess spielen sowohl zelluläre Eigenschaften als auch die Bedingungen am Ort der Metastasierung eine entscheidende Rolle. Knochen stellen dabei einen „fruchtbaren“ Boden dar, was zur präferentiellen Metastasierung unter anderem von Prostata- und Mammakarzinomen in den Knochen führt. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, sowohl zelluläre als auch azelluläre Bestandteile der hämatopoetischen Stammzellnische zu identifizieren, die für die Adhäsion von Prostata- und Mammakarzinomzellen im Knochen eine Rolle spielen und damit eine Metastasierung in den Knochen ermöglichen. Es erfolgte ein Vergleich der Adhäsion der Prostata- und Mammakarzinomzelllinien PC3 und MDA-MB-231 mit der CD34+ Zelllinie KG-1a, die als Surrogatzelllinie für hämatopoetische Stammzellen verwendet wurde. Zudem wurde mit Hilfe von Zell-Zell-Assays untersucht, ob die Adhäsion von KG-1a Zellen durch Prostata- und Mammakarzinomzellen beeinflusst wird.

Alle drei untersuchten Zelllinien zeigten sowohl in den durchgeführten SCFS-Messungen als auch im Zell-Matrix-Assay eine starke Adhäsion an LM 511, 521 und Kollagen IV. Hingegen war die Adhäsion an das nicht in der hämatopoetischen Stammzellnische exprimierte LM 111 und 211 sowohl für KG-1a Zellen als auch PC3 und MDA-MB-231 Zellen gering. Die gemessenen Zell-Zell-Interaktionskräfte waren geringer als die Zell-Matrix-Bindungskräfte, was die Rolle der EZM für die Adhäsion in der hämatopoetischen Stammzellnische hervorhebt.

Die durchgeführten Zell-Zell-Assays zeigten keinen Einfluss der Prostata- und Mammakarzinomzellen auf die Bindung der CD34+ Zelllinie KG-1a: Weder verringerte sich deren Adhäsion bei einer Koinkubation noch konnten die Prostata- und Mammakarzinomzellen KG-1a aus ihrer Bindung an CAL 72 verdrängen.

Die vorliegende Studie wurde mit Hilfe von *in vitro* Experimenten mit Zelllinien durchgeführt. Insbesondere die Verwendung von KG-1a Zellen an Stelle primärer hämatopoetischer Stammzellen muss kritisch hinterfragt werden. KG-1a Zellen können auf Grund morphologischer und funktioneller Undifferenziertheit (Koeffler et al., 1980 [77]) als Surrogatzelllinie für hämatopoetische Stammzellen verwendet werden. CD34, welches von KG-1a Zellen exprimiert wird, wurde schon früh als Marker für hämatopoetische Stammzellen beschrieben, wird aber auch von weiteren Vorläuferzellen exprimiert (Sidney et al., 2014 [82]). CD34 wird dabei eine Rolle in der Zelladhäsion und in der Inhibition der Ausdifferenzierung der Zellen zugeschrieben (Krause et al., 1996 [83]). KG-1a sind dennoch myeloblastische Zellen, welche aus den Zellen eines Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) gewonnen wurden. Sie eignen sich daher für die Durchführung orientierender Experimente. Um die Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation zu erhöhen ist jedoch die Verwendung primärer, nicht maligner Zellen anzustreben. Vergleichende Betrachtung der Adhäsion an Osteoblasten zwischen KG-1a Zellen und primären, aus Nabelschnurblut isolierten, hämatopoetischen Stammzellen zeigten signifikante Unterschiede. Daher erscheint vor allem für SCFS-Messungen die Verwendung primärer Zellen notwendig, da hier auch die Zellgröße eine entscheidende Rolle spielt und KG-1a Zellen wesentlich größer sind als CD34+/CD38- Zellen.

Jüngst konnte gezeigt werden, dass gesunde HSC leukämische Stammzellen einer AML aus der hämatopoetischen Stammzellnische verdrängen können (Boyd et al., 2014, [84]). Die Durchführung der Zell-Zell-Interaktionsexperimente mit primären Zellen anstelle der Zelllinie ist daher ebenso anzustreben. Auf Grund der begrenzten Anzahl an Zellen, die aus Nabelschnurblut isoliert werden können, ist die praktischen Umsetzung jedoch mit dem bisherigen Versuchsablauf nur schwierig vereinbar.

4.1 Adhäsion einer CD34+ hämatopoetischen Zelllinie an Komponenten der hämatopoetischen Stammzellnische im Vergleich zu Prostata- und Mammakarzinomzellen

Mit Hilfe der SCFS konnte die initiale Adhäsion der Zelllinien innerhalb der ersten Minute an Komponenten der EZM, sowie an MSC und CAL 72 beurteilt werden. CAL 72 dienen dabei als Modell für Osteoblasten. Im Vergleich mit anderen osteoblastischen Zelllinien wie MG-63 und HL-60 können CAL 72 die Expansion von

hämatopoetischen Vorläuferzellen fördern ähnlich wie humane Osteoblasten (Rochet et al., 2003 [76]) und sind daher als Modell für Osteoblasten etabliert (Schüler et al., 2012 [85]; Weber et al., 2014 [86]).

Zudem wurde die Bindungsfähigkeit in den ersten 30 min mit Hilfe von Zell-Zell-Adhäsionassays verglichen. Die initiale Adhäsion ermöglicht eine Verankerung der Zellen in der hämatopoetischen Stammzellnische und stellt damit den ersten Schritt einer Invasion des Knochenmarks im Metastasierungsprozess dar. Die untersuchten Adhäsionskräfte zwischen den CD34+ KG-1a Zellen sowie Prostata- und Mammakarzinomzellen mit CAL 72 und MSC waren dabei gering. In den hier durchgeführten Experimenten zeigten sich nur geringe Differenzen zwischen der initialen Adhäsion an Osteoblasten und MSC: lediglich für Prostatakarzinomzellen konnte eine signifikant höhere Adhäsion an MSC im Vergleich zur Adhäsion an CAL 72 gezeigt werden. Für hämatopoetische Stammzellen war die Adhärenz nicht signifikant höher. Mammakarzinomzellen zeigten eine nahezu identische Adhäsion an MSC und an CAL 72. Insgesamt zeigt sich demnach eine Tendenz zu einer stärkeren Adhäsion an die MSC, welche sich im Verlauf zu Osteoblasten differenzieren können. Faktoren wie CXCL12 und Osteopontin, welche für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften der HSC unabdingbar sind, werden von den MSC stärker als von allen anderen Knochenstromazellen sezerniert (Ehninger und Trumpp, 2011, [13]). Dieser Aspekt erklärt möglicherweise die höhere Affinität der Zellen an MSC im Vergleich zu CAL 72.

Bei der Koinkubation von KG-1a mit CAL 72 konnte eine signifikant geringere Fraktion der Zellen, verglichen mit Prostata- und Mammakarzinomzellen, binden. Dieser Effekt könnte zumindest teilweise durch die Eigenschaften der verwendeten Zelllinien zu erklären sein: Bei den Prostata- und Mammakarzinomzelllinien handelt es sich um adhärenz wachsende Zellen, hingegen sind KG-1a Zellen Suspensionszellen. Beim Vergleich der Adhäsion von KG-1a Zellen an CAL 72 nach 30 min fällt auf, dass diese in den durchgeführten Koinkubationsassays deutlich geringer als in den durchgeführten Verdrängungsassays ist. Während im Koinkubationsassay lediglich 36% der KG-1a Zellen adhärten, wurde im Verdrängungsassay eine Adhäsion von 88% beziehungsweise 73% gemessen. Dies zeigte sich auch bei Kontrollansätzen, in denen lediglich KG-1a mit CAL 72 für 30 beziehungsweise 60 min inkubiert wurden: Nach 30 min betrug die Adhäsion im Mittel 41%, nach 60 min im Mittel 125% (n=6). Diese Verdreifachung der KG-1a Adhäsion auf einen Wert, der über den theoretisch möglichen 100% liegt, spricht für eine Veränderung der Fluoreszenz der

KG-1a Zellen und nicht für eine entsprechende Zunahme der Adhäsion. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die gemessenen Zellen während dieser Zeit in RPMI-Medium suspendiert waren, wohingegen die Positivkontrolle in PBS suspendiert wurde. Die Aussage, dass KG-1a Zellen nicht durch PC3 oder MDA-MB-231 Zellen aus ihrer Bindung an CAL 72 verdrängt werden können, behält jedoch ihre Gültigkeit, da hierfür zwei Ansätze, die bis auf die Zugabe von PC3 oder MDA-MB-231 identisch waren, miteinander verglichen wurden. Zwischen diesen beiden Ansätzen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Adhäsion von KG-1a.

Physiologischerweise sind HSC nicht dauerhaft fest in der Nische gebunden, es herrscht vielmehr eine ständige Zirkulation (Bhattacharya et al., 2009 [74]). Im Gegensatz dazu ist es für die Ausbildung von Metastasen für die Prostata- und Mammakarzinomzellen essentiell, dauerhaften Halt in der Nische zu finden, um dort expandieren zu können. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass sich KG-1a-Zellen und PC3 sowie MDA-MB-231 Zellen zwar in der initialen Adhäsion ähneln, bei längerer Inkubation jedoch mehr Prostata- und Mammakarzinomzellen an CAL 72 adhären. Zudem ist es möglich, dass Osteoblasten bei der malignen Transformation der Nische eine größere Rolle für die Adhäsion der Tumorzellen spielen, als dies im physiologischen Zustand für die HSC der Fall ist.

Die hier gewählten kurzen Inkubationszeiten stellten sicher, dass bei den Experimenten lediglich die direkte Zell-Zell-Interaktion untersucht wurde und nicht die Interaktion zwischen von den Nischenzellen sezernierter Matrix und den untersuchten Zelllinien. Diese Interaktion spielt jedoch eine Rolle bei der längerfristigen Adhäsion in der Stammzellnische. Mendez-Ferrer et al. (2010 [12]) zeigten, dass MSC für die Aufrechterhaltung und Chemotaxis wichtige Gene 50-700 mal stärker exprimieren als andere Knochenmarkstromazellen. Die Funktion der MSC liegt daher möglicherweise stärker in der Sezernierung dieser Matrix, als in der direkten Zell-Zell-Adhäsion zur initialen Verankerung der HSC in der hämatopoetischen Stammzellnische.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Experimente eine mäßige Affinität der KG-1a Zellen an CAL 72. Dies unterstützt neuere Studien, die die Bedeutung der perivaskulären Nische gegenüber der osteoblastischen Nische hervorheben. Hierfür spricht die räumliche Nähe der HSC zu den Sinusoiden: fast alle Zellen sind in einem Abstand von 5 Zelldurchmessern zu den Sinusoiden lokalisiert (Kiel et al., 2005 [9]). Zudem sprechen auch funktionelle Daten für die Wichtigkeit der perivaskulären Zellen: „Stem Cell Factor“ (SCF) ist ein wichtiger Faktor in der hämatopoetischen Stammzellnische, der für die Aufrechterhaltung der HSC-Population von Bedeutung ist (Ding et al., 2012 [87]). SCF-Knock-out-Mäuse versterben bereits pränatal

und zeigen eine hochgradige Anämie. Wird SCF jedoch lediglich in Osteoblasten ausgeschaltet, führt dies zu keiner relevanten Änderung der HSC-Frequenz. Die Deletion von SCF auf perivaskulären und endothelialen Zellen führt hingegen zu einer verringerten Anzahl an HSC (Ding et al., 2012 [87]). Entgegen der ursprünglich angenommenen direkten Interaktion zwischen Osteoblasten und HSC im Sinne einer osteoblastischen Nische scheinen Osteoblasten eher indirekten Einfluss, zum einen auf die Entwicklung der Nische, aber auch auf deren Aufrechterhaltung zu haben, beispielsweise durch die Bereitstellung von Calcium (Morrison und Scadden, 2014 [7]).

Mesenchymale Zellen kommen sowohl perivaskulär als auch endosteal vor. Möglicherweise unterscheidet sich je nach Lokalisation ihre Funktion, jedoch führt ein SCF-Knock-out zur Verminderung von HSC in der Stammzellnische, sie scheinen also eine Rolle für die Aufrechterhaltung der Nische zu haben (Ding et al, 2012 [87]), Morrison und Scadden, 2014 [7]). Für die initiale Adhäsion beim Eintritt ins Knochenmark scheinen MSC auf Grund der geringen Adhäsion jedoch nicht verantwortlich zu sein. Die gemessenen Zell-Matrix-Interaktionen zeigten deutlich höhere „Detachment Forces“ als die oben diskutierten Zell-Zell-Interaktionen. Dies spricht für eine größere Rolle in der primären Adhäsion als die Zell-Zell-Interaktion. Bisherige Studien fokussieren sich stark auf zelluläre Komponenten der hämatopoetischen Stammzellnische, das vorliegende Ergebnis zeigt, dass auch die azellulären Matrixkomponenten verstärkt in Betracht gezogen werden sollten.

Auf Grund der hohen Varianz bei Messungen mit Hilfe der SCFS wird eine große Anzahl an Messungen benötigt, um statistisch valide Ergebnisse zu erhalten. Daher erscheinen weitere Messungen notwendig, um auch geringere Differenzen zwischen den einzelnen Matrixproteinen verifizieren zu können. Vor allem bei der Messung hoher Interaktionskräfte ergibt sich hierbei das Problem, dass die gemessene Zelle eine sehr starke Adhäsion an den Cantilever benötigt, um nicht von diesem bei der Messung separiert zu werden. So kam es bei den Proteinen LM 511, 521 sowie Kollagen IV, vor allem bei Messungen mit längerer Kontaktzeit, zur Separierung der Zelle vom Cantilever. Für weitere Messungen wäre es daher erstrebenswert, eine Befestigung mit Hilfe einer anderen Methode als der Fixierung mit Hilfe von Cell Tak zu erproben. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Fixierung nicht die Distribution von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche modifiziert. Die Verwendung von Proteinen, die selbst in der EZM vorkommen, wie beispielsweise Fibronectin, erscheint daher nicht geeignet, zumal die Adhäsionskräfte an Fibronectin in den durchgeführten Messungen niedriger war als die Adhäsion an beispielsweise LM 511. Die

Befestigung der Zelle mit Hilfe von Unterdruck könnte eine Möglichkeit zur Befestigung der Zelle darstellen, benötigt jedoch zusätzliches Equipment (Taubenberger et al., 2013 [88])

Eine besonders starke Adhäsion aller Zelllinien konnte sowohl an Kollagen IV als auch an Laminin 511 und 521 gezeigt werden. Auch die durchgeführten Zell-Matrix-Adhäsion-Assays bestätigen die Ergebnisse der SCFS-Messungen im Wesentlichen, sind jedoch auf Grund ihrer lediglich qualitativen Aussagekraft nur dazu geeignet, große Unterschiede in der Adhäsion zu beurteilen und erlauben keine Differenzierung zwischen den Komponenten, die eine gute Adhäsionsfähigkeit zeigen. Eine Quantifizierung der Zell-Matrix-Assays ist mit Hilfe der bei den Zell-Zell-Assays verwendeten Fluoreszenzmessungen möglich. Hierdurch könnte es möglich sein, die Beeinflussung der Adhäsion bei der Koinkubation von hämatopoetischen Stammzellen und Tumorzellen zu beurteilen.

Kollagen IV ist unter anderem ein Bestandteil der Lamina densa der Basallamina und wird daher ubiquitär im gesamten Körper exprimiert (Lehrbuch Histologie [2], S. 121). Auch im Knochenmark konnte die Expression nachgewiesen werden, sowohl perivaskulär, aber auch endosteal (Nilsson et al., 1998 [18]). Die hohe Adhäsion aller drei untersuchten Zelllinien erklärt daher nicht den Osteotropismus. Das Durchbrechen der Basallamina ist jedoch ein wichtiger Schritt der Karzinogenese, der dazu führt, dass das zunächst lokal begrenzte Geschehen zu einer systemischen Erkrankung wird. Die Adhärenz an Kollagen IV könnte hierbei eine Rolle spielen.

Gu et al. (1999 [24]) und Siler et al. (2000 [22]) konnten die Expression von LM 511 und LM 521 im humanen Knochenmark nachweisen. Die im Vergleich zu LM 111 und LM 411 höhere Adhäsion von HSC an LM 511 und LM 521 zeigten schon Gu et al. (2003 [23]), jedoch war hier die Adhäsion an Fibronectin noch höher. Die starken Adhäsionskräfte an LM 511 und LM 521 deuten auf eine gewichtige Rolle für die Adhäsion der HSC im Knochenmark hin. Bisherige Arbeiten beschäftigten sich vor allem mit der Rolle von LM 511 im Primärtumor: Die Expression von LM 511 korreliert mit höherem Metastasierungspotential und damit einem fortgeschrittenen Tumorgeschehen bei Brustkrebs in Mäusen. Dazu passend ist die Adhäsion der invasiven Zelllinie MDA-MB-231 an LM 511 höher als die der Zelllinie MCF-7, welche kein metastatisches Potential hat (Chia et al., 2007, [89]). Auch die Untersuchung humaner Brustkrebsproben zeigte eine 100 % Expression beim besonders aggressiven „triple negativen“ Brustkrebs. Hierbei handelt es sich um einen besonders aggressiven

siven Brustkrebssubtyp, dessen Zellen keine Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie HER2/neu (Human epidermal growth factor receptor 2) exprimieren. Die Autoren postulieren eine Verbindung mit besonders aggressiven Subtypen sowie der epithelialen zur mesenchymalen Transition (Carpenter et al., 2008 [90]).

Auch in Prostatakarzinomproben konnte die Expression von LM 511 sowie LM 521 nachgewiesen werden (Brar et al., 2003 [91]). Dabei zeigt sich sowohl beim Mamma- als auch beim Prostatakarzinom eine vermehrte LM 511 Expression in fortgeschrittenen Tumorstadien (Pouliot und Kusuma, 2013 [92]). Die Adhäsion an LM 511 im Knochenmark erscheint daher als logischer nächster Schritt, der schließlich zur Ausbildung von Knochenmetastasen führt.

Es zeigte sich keine signifikanten Differenzen in der Affinität an die einzelnen Matrixproteine im Vergleich zwischen den verwendeten Zelllinien. Die These, dass Tumorzellen und hämatopoetische Stammzellen sich eine Nische teilen, wird dadurch gestützt.

4.2 Konkurrenz um Bindungsstellen der hämatopoetischen Stammzellnische zwischen KG-1a und Prostata- und Mammakarzinomzellen

Die vorliegende Studie hatte als Zielsetzung, potentiell für die Adhäsion im Knochenmark wichtige Strukturen zu identifizieren und zu untersuchen ob eine Verdrängung hämatopoetischer Zellen aus ihrer Bindung an diese Strukturen durch maligne entartete Mamma- und Prostatakarzinomzellen möglich ist. Die durchgeführten SCFS-Messungen zeigten Differenzen zwischen der Adhäsion an unterschiedliche Matrixkomponenten, konnten jedoch keine großen Differenzen zwischen der Adhäsion von KG-1a und den untersuchten Prostata- und Mammakarzinomzellen feststellen. Eine vergleichbare starke Adhärenz unterstützt die These, dass Tumorzellen hämatopoetische Zellen verdrängen können, nicht. Shiozawa et al. (2011 [70]) zeigten im Mausmodell, dass im Blut zirkulierende Prostatakarzinomzellen direkt mit HSC um Bindungsplätze in der hämatopoetischen Stammzellnische konkurrieren. Zudem konnten die im Knochenmark lokalisierten Prostatakarzinomzellen durch die Anwendung von Stammzellmobilisierungsprotokolle mobilisiert werden und gelangten dadurch zurück in den systemischen Kreislauf. Diese Schlussfolgerung basieren hauptsächlich auf im Mausmodell durchgeführten *in vivo* Versuchen (Shiozawa et al., 2011, [70]). Zusätzlich wurden kompetitive *in vitro* Assays auf Osteoblasten durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Beeinflussung von HSC-Adhäsion und Pro-

statakarzinomzellen erst, wenn die die Tumorzahl um ein zehnfaches gegenüber den HSC erhöht wurde: Als Effekt sank die HSC-Adhäsion, was jedoch auch auf einer lediglich mengenmäßigen Überlegenheit der Zellen beruhen könnte (Shiozawa et al., 2011 [70]). Die hier durchgeführten Koinkubationsassays bestätigen dieses Bild: Die Adhäsion von KG-1a an CAL 72 wird durch die zusätzliche Zugabe von PC3 beziehungsweise MDA-MB-231 nur unwesentlich verringert. Jedoch zeigt sich, dass die Koinkubation mit MDA-MB-231 zu stärkeren Abnahme der Adhäsion von KG-1a führt als die Koinkubation mit PC3. Möglicherweise ist dies auf die geringere initiale Adhärenz der PC3 Zellen, die in der SCFS gezeigt werden konnte, zurück zu führen. *In vivo* treffen Tumorzellen in der hämatopoetischen Stammzellnische auf bereits gebundene HSC. Um diese Situation *in vitro* nach zu stellen, wurden Verdrängungsassays durchgeführt, bei denen nach einer Inkubationszeit von 30 min zu den bereits adhärenzierten KG-1a Zellen Mamma- oder Prostatakarzinomzellen zugegeben wurden. Es zeigte sich jedoch keine Verdrängung der KG-1a Zellen durch die Tumorzellen. Die hier durchgeführten *in-vitro* Assays stehen im Kontrast zu den von Shiozawa et al. durchgeführten Experimenten: KG-1a Zellen, als Surrogatzellen für HSC, die an Osteoblasten gebunden hatten, wurden durch 30 minütige Koinkubation mit Mamma- und Prostatakarzinomzellen nicht aus ihrer Bindung verdrängt, ihre Adhäsion blieb unverändert. In Vorversuchen wurde überprüft, ob eine ausreichende Anzahl an KG-1a Zellen zur Versuchsdurchführung verwendet wurde, um eine Sättigung der Bindungsstellen der CAL 72 Zellen zu erzielen. Obwohl dies erfüllt war, zeigten sich auch in der Adhäsion der PC3 Zellen keine Veränderung. Dies deutet auf möglicherweise unterschiedliche Bindungsstellen beider Zelllinien hin, sodass eine Adhäsion von PC3 Zellen trotz KG-1a Adhäsion möglich ist. Durch die Verwendung funktionsblockierender Antikörper gegen mögliche Adhäsionsstrukturen wie Integrine könnte geklärt werden, ob diese These zutrifft.

Bhattacharya et al. (2009 [74]) zeigten in ihrer Arbeit, dass täglich 1-5 % der HSC in die Zirkulation eintreten. Die Interaktion zwischen HSC und der Nische stellt demnach kein stabiles System dar, sondern befindet sich in einem ständigen Zirkulationsprozess. Hierdurch sind niemals alle Bindungsstellen durch HSC besetzt, sondern es finden sich immer freie Bindungsstellen. Es erscheint also möglich, dass beim Metastasierungsprozess, in dem zunächst lediglich eine geringe Anzahl an Tumorzellen in den Kreislauf und damit potentiell auch in die hämatopoetische Stammzellnische gelangen, diese freiwerdenden Bindungsstellen von den Tumorzellen besetzt werden. Hierbei würde also auch eine wie von Shiozawa et al. (2011 [70]) beschriebene Konkurrenz um die Bindungsstellen bestehen, in der jedoch nicht aktiv HSC

aus ihren Bindungsstellen verdrängt werden, sondern lediglich freie Bindungsstellen durch Tumorzellen besetzt werden. Dies ist sowohl bei dem durchgeführten „Engraftment“ von Stammzelltransplantaten nach Ablation der endogenen Stammzellen durch Radiatio als auch bei einer Vergrößerung der hämatopoetischen Stammzellnische durch die Applikation von PTH der Fall.

Die durchgeführten Experimente unterstützen die These, dass Prostatakarzinomzellen, wie bereits gezeigt werden konnte, in die hämatopoetische Stammzellnische metastasieren und es so zur Ausbildung von Knochenmetastasen kommen kann. Prostatakarzinomzellen zeigen eine vergleichbare Affinität sowohl an zelluläre als auch azelluläre Strukturen der hämatopoetischen Stammzellnische wie KG-1a Zellen, konnten aber diese nicht aktiv aus ihrer Bindung an CAL 72 verdrängen. Zur direkten Interaktion zwischen Mammakarzinomzellen und HSC liegen bisher keine Daten vor. Auf Grund der hier vorliegenden Ergebnisse erscheinen weitere Untersuchung sinnvoll zu sein, da auch Mammakarzinomzellen ein mit KG-1a Zellen vergleichbares Adhäsionsprofil zeigen, wenn gleich auch hier keine aktive Verdrängung von KG-1a aus ihrer Bindung an CAL 72 gezeigt werden konnte.

4.3 Ausblick

Die durchgeführten Experimente zeigen eine besondere Relevanz der Zell-Matrix-Adhäsion für die initiale Adhäsion in der hämatopoetischen Stammzellnische. Die genaue Differenzierung der Bindungsstrukturen ist essentiell, um dieses Wissen in Zukunft auch therapeutisch nutzen zu können. Manche dieser Bindungsstrukturen konnten bereits identifiziert werden: So führt eine Blockierung von $\alpha 3$ -Integrin zu einer verminderten Adhäsion von MDA-MB-231 an LM 511 (Chia et al., 2007 [89]). Auch die Bindungsmechanismen von HSC an Laminine konnten bereits identifiziert werden: $\beta 1$ -Integrine vermitteln die Adhäsion an Laminin LM 411, LM 421, LM 511 und LM 521. Die Verwendung funktionsblockierender Antikörper kann zeigen, ob diese Integrine die relevanten Bindungsstrukturen darstellen. Zudem könnten funktionsblockierende Antikörper zeigen, ob die Adhäsion an Osteoblasten durch die selben Bindungsstrukturen vermittelt wird, oder ob Tumorzellen und HSC durch unterschiedliche Strukturen an Osteoblasten binden.

Die Funktion der perivaskulären Nische ist nicht nur für die Mobilisation von HSC in die Peripherie von Relevanz. Auch ruhende HSC sind hier zu finden und eine

Elimination der vaskulären und perivaskulären SCF-Expression führte zu einer Elimination fast aller ruhenden HSC in Mäusen (Oguro, 2013 [93]). Diese neueren Erkenntnisse über die Funktion der perivaskulären Nische (Morrison und Scadden, 2014 [7]) lassen es daher sinnvoll erscheinen, die untersuchten zellulären Komponenten der vorliegenden Arbeit auf perivaskuläre Zellen auszuweiten.

Schon seit längerem ist bekannt, dass nicht nur hämatopoetische Vorläuferzellen in der hämatopoetischen Stammzellnische im Knochenmark optimale Bedingungen, sowohl für das Verbleiben in einem Ruhezustand (quiescent state), als auch für die Proliferation vorfinden. Auch maligne Erkrankungen dieser Zellen, wie beispielsweise das Multiple Myelom, benötigen das Umfeld der Nische für ihre Progression. Die Erkenntnis, dass sich auch solide Tumoren im Metastasierungsprozess in der hämatopoetischen Stammzellnische ansiedeln können, ist hingegen noch relativ jung. Dieses Wissen rückt jedoch die Nische als Angriffspunkt für therapeutische Interventionen noch mehr in den Fokus: Shiozawa et al. (2011 [70]) konnten bereits zeigen, dass sie mit Hilfe von Stammzellmobilisierungsprotokollen Prostatakarzinomzellen aus der Nische ins periphere Blut mobilisieren können. Hierdurch sind sie wieder einer Chemotherapie zugänglich. Die Blockierung von für die Tumoradhäsion wichtigen EZM-Proteinen könnte eine Möglichkeit darstellen, schon vor der Etablierung von Tumorzellen eine Adhäsion im Knochenmark und damit eine Metastasierung ins Knochenmark zu verhindern. Ein besseres Verständnis der Nischenfunktion könnte also letztendlich dazu führen, dass auch Patienten mit Knochenmetastasen, für die bisher nur palliative Therapiekonzepte bestehen, in Zukunft eine kurative Therapie erhalten könnten.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die bei Mann und Frau häufigsten Tumorentitäten, das Mamma- sowie Prostatakarzinom, metastasieren im fortgeschrittenen Stadium häufig in den Knochen, was zu erheblichen Komplikationen führt. Vorhergehende Studien stellten die These auf, dass die Tumorzellen ähnliche Bindungsstrukturen wie die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zur Adhäsion in der hämatopoetischen Stammzellnische nutzen. Hierfür spielen sowohl zelluläre Bestandteile der Nische, wie Osteoblasten und mesenchymale Stammzellen (MSC) eine Rolle, als auch Bestandteile der extrazellulären Matrix.

Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten wurde die Rolle dieser Faktoren für die Adhäsion der Prostatakarzinomzelllinie PC3, der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 sowie der CD34+ Zelllinie KG-1a in der hämatopoetischen Stammzellnische untersucht. Die stärkste Adhäsion bestand hierbei an LM 511, 521 und Kollagen IV, drei typische Bestandteile der extrazellulären Matrix in der Nische. Die Adhäsion an LM 111 und 211, welche nicht in der Nische exprimiert werden, war hingegen gering. Die beobachteten Zell-Matrix-Interaktionen waren signifikant stärker als die analysierten Zell-Zell-Interaktionen. Dies spricht für einen größeren Einfluss der über Integrine vermittelten Zell-Matrix-Adhäsion verglichen mit der Zell-Zell-Adhäsion. Der Vergleich der Adhäsion der CD34+ KG-1a Zelllinie mit aus Nabelschnurblut isolierten HSC zeigte signifikante Unterschiede, weshalb die Verwendung von KG-1a als Surrogatzelllinie für humane HSC zumindest bei der Durchführung von „Single Cell Force Spectroscopy“ (SCFS)-Experimenten kritisch hinterfragt werden muss, da hierbei die unterschiedliche Zellgröße von KG-1a und primären HSC eine entscheidende Rolle für die Adhäsionsstärke spielt.

Zudem wurde untersucht, ob PC3 und MDA-MB-231 Zellen KG-1a Zellen in ihrer Adhäsion an CAL 72, einer osteoblastischen Zelllinie, beeinflussen. Die Bindung von KG-1a an CAL 72 wurde durch die Koinkubation mit PC3 und MDA-MB-

231 nicht beeinflusst. Ebenso ließen sich an CAL 72 gebundene KG-1a Zellen nicht durch die Inkubation mit PC3 oder MDA-MB-231 aus ihrer Bindung verdrängen. Die durchgeführte Studie unterstützt die These, dass Tumorzellen vakante Stellen im Knochenmark besetzen können, hämatopoetische Stammzellen jedoch nicht aktiv aus ihrer Bindung verdrängen.

Literaturverzeichnis

- [1] R. Schofield. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1-2):7–25, 1978.
- [2] U. Welsch. *Lehrbuch Histologie*. Urban und Fischer, 2006.
- [3] B. I. Lord, N. G. Testa, and J. H. Hendry. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood*, 46(1):65–72, 1975.
- [4] L. M. Calvi, G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, and D. T. Scadden. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960):841–846, 2003.
- [5] J. Zhang, C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.-G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. Li. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960):836–841, 2003.
- [6] D. Visnjic, Z. Kalajzic, D. W. Rowe, V. Katavic, J. Lorenzo, and H. L. Aguila. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*, 103(9):3258–3264, 2004.
- [7] S. J. Morrison and D. T. Scadden. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505(7483):327–334, 2014.
- [8] M. J. Kiel and S. J. Morrison. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*, 8(4):290–301, 2008.
- [9] M. J. Kiel, O. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst, and S. J. Morrison. Slam family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121(7):1109–1121, 2005.
- [10] L. Laterveer, I. J. Lindley, M. S. Hamilton, R. Willemze, and W. E. Fibbe. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radio-protective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood*, 85(8):2269–2275, 1995.
- [11] A. Wilson and A. Trumpp. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, 6(2):93–106, 2006.

-
- [12] S. Méndez-Ferrer, T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov, and P. S. Frenette. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466(7308):829–834, 2010.
- [13] A. Ehninger and A. Trumpp. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med*, 208(3):421–428, 2011.
- [14] L. Coulombel, M. H. Vuillet, C. Leroy, and G. Tchernia. Lineage- and stage-specific adhesion of human hematopoietic progenitor cells to extracellular matrices from marrow fibroblasts. *Blood*, 71(2):329–334, 1988.
- [15] S. A. Bentley. Collagen synthesis by bone marrow stromal cells: a quantitative study. *Br J Haematol*, 50(3):491–497, 1982.
- [16] G. Klein, C. A. Müller, E. Tillet, M. L. Chu, and R. Timpl. Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood*, 86(5):1740–1748, 1995.
- [17] G. Klein, C. Kibler, F. Schermutzki, J. Brown, C. A. Müller, and R. Timpl. Cell binding properties of collagen type XIV for human hematopoietic cells. *Matrix Biol*, 16(6):307–317, 1998.
- [18] S. K. Nilsson, M. E. Debatis, M. S. Dooner, J. A. Madri, P. J. Quesenberry, and P. S. Becker. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J Histochem Cytochem*, 46(3):371–377, 1998.
- [19] K. S. Zuckerman and M. S. Wicha. Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. *Blood*, 61(3):540–547, 1983.
- [20] P. Gupta, T. R. Oegema, J. J. Brazil, A. Z. Dudek, A. Slungaard, and C. M. Verfaillie. Human LTC-IC can be maintained for at least 5 weeks in vitro when interleukin-3 and a single chemokine are combined with O-sulfated heparan sulfates: requirement for optimal binding interactions of heparan sulfate with early-acting cytokines and matrix proteins. *Blood*, 95(1):147–155, 2000.
- [21] M. Durbeej. Laminins. *Cell Tissue Res*, 339(1):259–268, 2010.
- [22] U. Siler, M. Seiffert, S. Puch, A. Richards, B. Torok-Storb, C. A. Müller, L. Sorokin, and G. Klein. Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood*, 96(13):4194–4203, 2000.
- [23] Y.-C. Gu, J. Kortessmaa, K. Tryggvason, J. Persson, P. Ekblom, S.-E. Jacobsen, and M. Ekblom. Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood*, 101(3):877–885, 2003.

- [24] Y.-C Gu, L. Sorokin, M. Durbeej, T. Hjalt, J. I. Jönsson, and M. Ekblom. Characterization of bone marrow laminins and identification of alpha5-containing laminins as adhesive proteins for multipotent hematopoietic FDCP-Mix cells. *Blood*, 93(8):2533–2542, 1999.
- [25] R. Chiquet-Ehrismann, G. Orend, M. Chiquet, R. P. Tucker, and K. S. Midwood. Tenascins in stem cell niches. *Matrix Biol*, 37:112–123, 2014.
- [26] Y. Soini, D. Kamel, M. Apaja-Sarkkinen, I. Virtanen, and V. P. Lehto. Tenascin immunoreactivity in normal and pathological bone marrow. *J Clin Pathol*, 46(3):218–221, 1993.
- [27] A. Nakamura-Ishizu, Y. Okuno, Y. Omatsu, K. Okabe, J. Morimoto, T. Uede, T. Nagasawa, T. Suda, and Y. Kubota. Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood*, 119(23):5429–5437, 2012.
- [28] G. Klein, S. Beck, and C. A. Müller. Tenascin is a cytoadhesive extracellular matrix component of the human hematopoietic microenvironment. *J Cell Biol*, 123(4):1027–1035, 1993.
- [29] D. T. Denhardt and M. Noda. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl*, 30-31:92–102, 1998.
- [30] L. Liaw, D. E. Birk, C. B. Ballas, J. S. Whitsitt, J. M. Davidson, and B. L. Hogan. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest*, 101(7):1468–1478, 1998.
- [31] S. K. Nilsson, H. M. Johnston, G. A. Whitty, B. Williams, R. J. Webb, D. T. Denhardt, I. Bertoncello, L. J. Bendall, P. J. Simmons, and D. N. Haylock. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 106(4):1232–1239, 2005.
- [32] S. Stier, Y. Ko, R. Forkert, C. Lutz, T. Neuhaus, E. Grünewald, T. Cheng, D. Dombkowski, L. M. Calvi, S. R. Rittling, and D. T. Scadden. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*, 201(11):1781–1791, 2005.
- [33] T. M. Tilli, K. D. Mello, L. B. Ferreira, A. R. Matos, M. T. S. Accioly, P. A. S. Faria, A. Bellahcène, V. Castronovo, and E. R. Gimba. Both osteopontin-c and osteopontin-b splicing isoforms exert pro-tumorigenic roles in prostate cancer cells. *Prostate*, 72(15):1688–1699, 2012.
- [34] S. Rajasekharan and T. E. Kennedy. The netrin protein family. *Genome Biol*, 10(9):239, 2009.
- [35] J. Fitamant, C. Guenebeaud, M.-M. Coissieux, C. Guix, I. Treilleux, J.-Y. Scoazec, T. Bachelot, A. Bernet, and P. Mehlen. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(12):4850–4855, 2008.

-
- [36] A. Latil, L. Chêne, B. Cochant-Priollet, P. Mangin, G. Fournier, P. Berthon, and O. Cussenot. Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *Int J Cancer*, 103(3):306–315, 2003.
- [37] A. Mediero, B. Ramkhelawon, M. Perez-Aso, K. J. Moore, and B. N. Cronstein. Netrin-1 is a critical autocrine/paracrine factor for osteoclast differentiation. *J Bone Miner Research*, 30(5):837–854, 2015.
- [38] S. Doulatov, F. Notta, E. Laurenti, and J. E. Dick. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, 10(2):120–136, 2012.
- [39] A. Aiuti, I. J. Webb, C. Bleul, T. Springer, and J. C. Gutierrez-Ramos. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*, 185(1):111–120, 1997.
- [40] T. Sugiyama, H. Kohara, M. Noda, and T. Nagasawa. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6):977–988, 2006.
- [41] Y. Jung, J. Wang, A. Schneider, Y.-X. Sun, A. J. Koh-Paige, N. I. Osman, L. K. McCauley, and R. S. Taichman. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone*, 38(4):497–508, 2006.
- [42] A. Greenbaum, Y.-M. S. Hsu, R. B. Day, L. G. Schuettpelez, M. J. Christopher, J. N. Borgerding, T. Nagasawa, and D. C. Link. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*, 495(7440):227–230, 2013.
- [43] A. Peled, I. Petit, O. Kollet, M. Magid, T. Ponomaryov, T. Byk, A. Nagler, H. Ben-Hur, A. Many, L. Shultz, O. Lider, R. Alon, D. Zipori, and T. Lapidot. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, 283(5403):845–848, 1999.
- [44] Y.-S. Tzeng, H. Li, Y.-L. Kang, W.-C. Chen, W.-C. Cheng, and D.-M. Lai. Loss of CXCL12/SDF-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood*, 117(2):429–439, 2011.
- [45] B. A. Anthony and D. C. Link. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol*, 35(1):32–37, 2014.
- [46] E. M. Novelli, M. Ramirez, and C. I. Civin. Biology of CD34+CD38- cells in lymphohematopoiesis. *Leuk Lymphoma*, 31(3-4):285–293, 1998.
- [47] M. Ogawa. Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, 30(1):3–6, 2002.
- [48] G. Herold. *Innere Medizin*. 2011.

- [49] P. Alvarez, E. Carrillo, C. Vélez, F. Hita-Contreras, A. Martínez-Amat, F. Rodríguez-Serrano, H. Boulaiz, R. Ortiz, C. Melguizo, J. Prados, and A. Aránega. Regulatory systems in bone marrow for hematopoietic stem/progenitor cells mobilization and homing. *Biomed Res Int*, 2013:312656, 2013.
- [50] L .B. To, J.-P. Levesque, and K. E. Herbert. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. *Blood*, 118(17):4530–4540, 2011.
- [51] *Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Auflage*. Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013.
- [52] N. Howlader, A. M. Noone, M. Krapcho, J. Garshell, D. Miller, S. F. Altekruse, C. L. Kosary, M. Yu, J. Ruhl, Z. Tatalovich, A. Mariotto, D. R. Lewis, H. S. Chen, E. J. Feuer, and K. A. Cronin. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, <http://seer.cancer.gov/csr/1975-2012> , zuletzt abgerufen 25.5.2015.
- [53] R. E. Coleman. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev*, 27(3):165–176, 2001.
- [54] A. Antoniou, P. D. P. Pharoah, S. Narod, H. A. Risch, J. E. Eyfjord, J. L. Hopper, N. Loman, H. Olsson, O. Johannsson, A. Borg, B. Pasini, P. Radice, S. Manoukian, D.M. Eccles, N. Tang, E. Olah, H. Anton-Culver, E. Warner, J. Lubinski, J. Gronwald, B. Gorski, H. Tulinius, S. Thorlacius, H. Eerola, H. Nevanlinna, K. Syrjski, O.-P. Kallioniemi, D. Thompson, C. Evans, J. Peto, F. Lalloo, D. G. Evans, and D. F. Easton. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, 72(5):1117–1130, 2003.
- [55] M. Untch, C. Jackisch, C. Thomssen, U. Nitz, G. von Minckwitz, and M. Kaufmann. Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. *Deutsches Aerzteblatt*, Jg 103 Heft 50:3406–3410, 2006.
- [56] Leitlinie Mammakarzinom der Frau, Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen, Stand 2013.
- [57] Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 3.0, Aktualisierung 2012.
- [58] P. Clézardin. Mechanisms of action of bisphosphonates in oncology: a scientific concept evolving from antiresorptive to anticancer activities. *BoneKey Reports*, 2:267, 2013.
- [59] C. Goessl, L. Katz, W. C. Dougall, P. J. Kostenuik, H. B. Zoog, A. Braun, R. Dansey, and R. B. Wagman. The development of denosumab for the treatment of diseases of bone loss and cancer-induced bone destruction. *Ann N Y Acad Sci*, 1263:29–40, 2012.

- [60] L. M. Franks. Latent carcinoma. *Ann R Coll Surg Engl*, 15(4):236–249, 1954.
- [61] P. T. Scardino, R. Weaver, and M. A. Hudson. Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol*, 23(3):211–222, 1992.
- [62] Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Version 1.03, Stand 2011.
- [63] P. Haag. *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis: inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen - 2010/11, 5. Auflage*. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach am Rhein, 2009.
- [64] S. Paget. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev*, 8:98–101, 1889.
- [65] K. N. Weilbaecher, T. A. Guise, and L. K. McCauley. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer*, 11(6):411–425, 2011.
- [66] T. Nagasawa. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*, 6(2):107–116, 2006.
- [67] J. E. Noll, S. A. Williams, L. E. Purton, and A. C. W. Zannettino. Tug of war in the haematopoietic stem cell niche: do myeloma plasma cells compete for the HSC niche? *Blood Cancer J*, 2:e91, 2012.
- [68] A. Müller, B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Veregui, and A. Zlotnik. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824):50–56, 2001.
- [69] Y.-X. Sun, J. Wang, C. E. Shelburne, D. E. Lopatin, A. M. Chinnaiyan, M. A. Rubin, K. J. Pienta, and R. S. Taichman. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem*, 89(3):462–473, 2003.
- [70] Y. Shiozawa, E. A. Pedersen, A. M. Havens, Y. Jung, A. Mishra, J. Joseph, J. K. Kim, L. R. Patel, . Ying, A. M. Ziegler, M. J. Pienta, J. Song, J. Wang, R. D. Loberg, P. H. Krebsbach, K. J. Pienta, and R. S. Taichman. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest*, 121(4):1298–1312, 2011.
- [71] Y. Shiozawa, K. J. Pienta, and R. S. Taichman. Hematopoietic stem cell niche is a potential therapeutic target for bone metastatic tumors. *Clin Cancer Res*, 17(17):5553–5558, 2011.
- [72] E. A. Pedersen, Y. Shiozawa, K. J. Pienta, and R. S. Taichman. The prostate cancer bone marrow niche: more than just 'fertile soil'. *Asian J Andrology*, 14(3):423–427, 2012.

- [73] J. Friedrichs, K. R. Legate, R. Schubert, M. Bharadwaj, C. Werner, D. J. Müller, and M. Benoit. A practical guide to quantify cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Methods*, 60(2):169–178, 2013.
- [74] D. Bhattacharya, A. Czechowicz, A. G. L. Ooi, D. J. Rossi, D. Bryder, and I. L. Weissman. Niche recycling through division-independent egress of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 206(12):2837–2850, 2009.
- [75] N. Rochet, J. Dubousset, C. Mazeau, E. Zanghellini, M. F. Farges, H. S. de Novion, A. Chompret, B. Delpech, N. Cattan, M. Frenay, and J. Gioanni. Establishment, characterisation and partial cytokine expression profile of a new human osteosarcoma cell line (CAL 72). *Int J Cancer*, 82(2):282–285, 1999.
- [76] N. Rochet, P. Leroy, D. Farahi Far, L. Ollier, A. Loubat, and B. Rossi. CAL72: a human osteosarcoma cell line with unique effects on hematopoietic cells. *Eur J Haematol*, 70(1):43–52, 2003.
- [77] H. P. Koefler, R. Billing, A. J. Lusic, R. Sparkes, and D. W. Golde. An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood*, 56(2):265–273, 1980.
- [78] T. Yoneda. Cellular and molecular basis of preferential metastasis of breast cancer to bone. *J Orthop Sci*, 5(1):75–81, 2000.
- [79] T. Felka, R. Schäfer, B. Schewe, K. Benz, and W. K. Aicher. Hypoxia reduces the inhibitory effect of IL-1beta on chondrogenic differentiation of FCS-free expanded MSC. *Osteoarthritis Cartilage*, 17(10):1368–1376, 2009.
- [80] J. L. Hutter and J. Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instruments*, 64:1868–1873, 1993.
- [81] *Gebrauchsanweisung (Instructions for Use) BD Cell-Tak Cell and Tissue Adhesive, Catalog No. 354240.*
- [82] L. E. Sidney, M. J. Branch, S. E. Dunphy, H. S. Dua, and A. Hopkinson. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*, 32(6):1380–1389, 2014.
- [83] D. S. Krause, M. J. Fackler, C. I. Civin, and W. S. May. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87(1):1–13, 1996.
- [84] A. L. Boyd, C. J. V. Campbell, C. I. Hopkins, A. Fiebig-Comyn, J. Russell, J. Ulemek, R. Foley, B. Leber, A. Xenocostas, T. J. Collins, and M. Bhatia. Niche displacement of human leukemic stem cells uniquely allows their competitive replacement with healthy HSPCs. *J Exp Med*, 211(10):1925–1935, 2014.
- [85] Y. Schüler, C. Lee-Thedieck, K. Geiger, T. Kaiser, Y. Ino, W. K. Aicher, and G. Klein. Osteoblast-secreted factors enhance the expression of dysadherin and CCL2-dependent migration of renal carcinoma cells. *Int J Cancer*, 130(2):288–299, 2012.

- [86] C. G. Weber, M. Mueller, N. Vandecandelaere, I. Trick, A. Burger-Kentischer, T. Maucher, and C. Drouet. Enzyme-functionalized biomimetic apatites: concept and perspectives in view of innovative medical approaches. *J Mater Sci Mater Med*, 25(3):595–606, 2014.
- [87] L. Ding, T. L. Saunders, G. Enikolopov, and S. J. Morrison. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481(7382):457–462, 2012.
- [88] A. V. Taubenberger, D. W. Hutmacher, and D. J. Müller. Single-cell force spectroscopy, an emerging tool to quantify cell adhesion to biomaterials. *Tissue Eng Part B Rev*, 2013.
- [89] J. Chia, N. Kusuma, R. Anderson, B. Parker, B. Bidwell, L. Zamurs, E. Nice, and N. Pouliot. Evidence for a role of tumor-derived laminin-511 in the metastatic progression of breast cancer. *Am J Pathol*, 170(6):2135–2148, 2007.
- [90] P. M. Carpenter, J. Wang-Rodriguez, O. T. M. Chan, and S. P. Wilczynski. Laminin 5 expression in metaplastic breast carcinomas. *Am J Surg Pathol*, 32(3):345–353, 2008.
- [91] P. K. Brar, B. L. Dalkin, C. Weyer, K. Sallam, I. Virtanen, and R. B. Nagle. Laminin alpha-1, alpha-3, and alpha-5 chain expression in human prepubertal benign prostate glands and adult benign and malignant prostate glands. *Prostate*, 55(1):65–70, 2003.
- [92] N. Pouliot and N. Kusuma. Laminin-511: a multi-functional adhesion protein regulating cell migration, tumor invasion and metastasis. *Cell Adh Migr*, 7(1):142–149, 2013.
- [93] H. Oguro, L. Ding, and S. J. Morrison. SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell*, 13(1):102–116, 2013.

Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde von mir, Astrid Beerlage, in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gerd Klein, durch welchen auch die Betreuung der Arbeit sowie die Korrektur erfolgte, konzipiert.

Alle dargestellten Experimente wurden von mir selbst durchgeführt. Die statistischen Auswertungen und Grafiken wurden von mir erstellt. Modifiziert übernommene Grafiken wurden von mir als solche in der Bildunterschrift gekennzeichnet.

Wissenschaftliche Beiträge

Poster „Skirmish in the Stem Cell Niche: Competitive Interactions of Hematopoietic Stem Cells and Tumor Cells for Limited Space“

Astrid Beerlage, Konstanze Geiger, Gerd Klein

Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, 08.10.2013
in Tübingen

Vortrag und Poster „Skirmish in the Stem Cell Niche: Competitive Interactions of Hematopoietic Stem Cells and Tumor Cells for Limited Space“

Astrid Beerlage, Konstanze Geiger, Jan Zieger, Gerd Klein

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Matrixbiologie, 20.-22.03.2014 in
Regensburg

Poster „Skirmish in the Stem Cell Niche: Competitive Interactions of Hematopoietic Stem Cells and Tumor Cells for Limited Space“

Astrid Beerlage, Konstanze Geiger, Jan Zieger, Gerd Klein

XX. Wilsede Meeting, 21.-24.06.2014 in Wilsede

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Professor Gerd Klein, für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie für die zu jedem Zeitpunkt aufgebrachte große Geduld.

Danke an die Arbeitsgruppe Klein:

Konstanze Geiger, für die gute Einarbeitung und für die Geduld bei meinen vielen Fragen „ready for take off, bereit zur Landung“

Tatjana Kaiser, Tanja Seeger, Olga Schmal, Subasty Baskaran und Jan Zieger, dafür dass sie immer ein offenes Ohr bei Problemen hatten und im Labor immer gute Stimmung herrschte.

In besonderem Maße möchte ich mich bei der Deutschen Krebshilfe sowie dem IZKF-Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät Tübingen für die finanzielle Unterstützung der Arbeit bedanken.

Danke an meine Eltern, dafür dass sie immer für mich da sind und mich dabei unterstützen, wo auch immer mein Weg hinführt.

Danke an Ferdinand, Rebekka und Simone. Ich bin dankbar Freunde wie euch zu haben.

Danke Julian, für die Unterstützung dabei, dass ich diese Arbeit auf Papier gebracht habe. „Lookin’ in your eyes i see a paradise this world that i’ve found is too good to be true... nothings gonna stop us now.“