Multifunktionale nanostrukturierte Hydrogele zur Kultur hämatopoetischer Stammzellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Anita Ludwig-Husemann, Diplom-Humanbiologin

[2023]

Referentin:	Prof. Dr. rer. nat. Cornelia Lee-Thedieck
Korreferent:	Prof. Dr. rer. nat. Anaclet Ngezahayo
Tag der Promotion:	21.02.2023

Kurzzusammenfassung

Um die funktionellen Interaktionen hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) mit ihrer physiologischen Nische im Knochenmark zu verstehen, sind artifizielle Nischenmodelle zur Untersuchung einzelner biochemischer und biophysikalischer Eigenschaften der Nische hervorragend geeignet. In dieser Arbeit wurde ein zweidimensionales, nanostrukturiertes, heparinbasiertes Biohybridhydrogel entwickelt, um multiple Funktionen für die *in vitro* HSPZ-Kultur nachzustellen. Dabei standen drei elementare Funktionalitäten der Nische im Vordergrund: (i) die Matrixelastizität, (ii) die Bindung und Freisetzung von Zytokinen und (iii) die nanostrukturelle Präsentation von extrazellulären bzw. zellulären $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Peptidliganden. Bei unveränderter Matrixelastizität innerhalb der physiologischen Knochenmarkssteifigkeit wurden durch Variation der Nanostrukturierung unterschiedliche Dichten von zellulärem *IDSP* oder extrazellulärem *LDV* als Integrin $\alpha_4\beta_1$-spezifische Bindemotive realisiert. Zusätzlich war die Gelmatrix in der Lage, das Chemokin SDF-1α spezifisch zu binden und wieder freizusetzen.

Der Einfluss der multifunktionalen Geleigenschaften wurde an humanen CD34$^+$ HSPZ in Form von Zellpolarisierung, Zellmotilität, Proliferation und Ausprägung der Differenzierung untersucht. Dabei konnte in dieser Arbeit Folgendes beobachtet werden. Der Polarisierungsgrad und die Motilität der HSPZ-Kulturen zeigten eine deutliche Abhängigkeit vom Ligandentyp, waren jedoch unabhängig von der Ligandendichte. SDF-1α beeinflusste fördernd die Zellpolarisation, aber nicht die Motilität der Zellen. Die Proliferation von HSPZ insgesamt und die Expansion von CD34$^+$ Zellen zeigten keine Abhängigkeit von der Nanostrukturierung. Auf die Differenzierung hatte SDF-1α einen geringen reduzierenden Effekt. Für die nanostrukturierte Präsentation von *IDSP* ergab sich eine ausgeprägte negative Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad und dem Nanopartikelabstand, der die *IDSP*-Ligandendichte bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Wechselwirkung zwischen HSPZ und dem hier untersuchten Biohybridhydrogelsystem. Dabei können die unterschiedlichen Effekte von zellulärem und extrazellulärem Integrinbindemotiv vorrangig mit der unterschiedlichen Bindungsaffinität des aktivierten $\alpha_4\beta_1$ Integrins für die verschiedenen Liganden erklärt werden. Bei der durch die *IDSP*-Ligandendichte beeinflussten Differenzierung bleibt es unklar, ob bei gegebener Matrixelastizität eine effizientere $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Aktivierung bei hohen oder niedrigen Ligandendichten stattfindet. Schließlich konnte ein kooperativer Effekt zwischen gleichzeitig aktiviertem $\alpha_4\beta_1$ Integrin- und SDF-1α-Rezeptor auf HSPZ im Sinne einer Synergie für die Zellpolarisation bei beiden Integrinliganden festgestellt werden. Dagegen scheint der resultierende Effekt von SDF-1α in Kombination mit dem *IDSP*-Liganden auf die Differenzierung antagonistischer Natur zu sein. Damit tragen die Ergebnisse auf Basis nanostrukturierter Integrinliganden zu einem besseren Verständnis über das komplexe Zusammenspiel der HSPZ mit ihrer Knochenmarksnische bei. Durch die ermöglichte simultane Anpassung mehrerer Nischefaktoren in solchen Biohybridhydrogelsystemen könnte zukünftig das Verhalten von HSPZ *ex vivo* gezielter untersucht und beeinflusst werden.

Schlagworte: Hämatopoetische Stammzellen, zweidimensionale Zellkultur, Hydrogel, Nanostruktur

Abstract

To understand the functional interactions of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) with their physiological niche in bone marrow, artificial niche models are excellent for studying individual biochemical and biophysical niche properties. In this work, a two-dimensional, nanostructured, heparin-based biohybrid hydrogel was developed to mimic multiple functions for *in vitro* HSPC culture. Three essential functionalities of the niche were in the focus of this study: (i) matrix elasticity, (ii) cytokine binding and release, and (iii) nanostructured presentation of extracellular or cellular $\alpha_4\beta_1$ integrin peptide ligands. With unchanged matrix elasticity within physiological bone marrow stiffness, different densities of cellular *IDSP* or extracellular *LDV* as integrin $\alpha_4\beta_1$-specific binding motifs were realized by varying the nanostructure. In addition, the gel matrix was able to specifically bind and release the chemokine SDF-1α.

The influence of the multifunctional gel properties on human $CD34^+$ HSPCs was investigated in terms of cell polarization, cell motility, proliferation and degree of differentiation. The following cell behavior was observed in this work. The degree of polarization and motility of HSPC cultures showed a clear dependence on ligand type, but were independent of ligand density. SDF-1α promotively affected cell polarization but not cell motility. Proliferation of total HSPCs and expansion of $CD34^+$ cells both showed no dependence on nanostructuring. SDF-1α had only a small reducing effect on differentiation. The nanostructured presentation of *IDSP* revealed a pronounced negative correlation between the degree of differentiation and nanoparticle spacing, which determines *IDSP* ligand density.

The results show a clear interplay between HSPCs and the biohybrid hydrogel system studied here. The different effects of the cellular and extracellular integrin binding motif can be primarily explained by the different binding affinity of the activated $\alpha_4\beta_1$ integrin for the different ligands. For differentiation affected by *IDSP* ligand density, it remains unclear whether, for a given matrix elasticity, more efficient $\alpha_4\beta_1$ integrin activation occurs at high or low ligand densities. Finally, a synergetic cooperative effect between simultaneously activated $\alpha_4\beta_1$ integrin and SDF-1α receptor on HSPCs on cell polarization was detected for both integrin ligands. In contrast, the resulting effect of SDF-1α in combination with the *IDSP* ligand on differentiation appears to be antagonistic in nature. Thus, the results based on nanostructured integrin ligands contribute to a better understanding of the complex interplay of HSPCs with their bone marrow niche. By enabling simultaneous tailoring of multiple niche factors in such biohybrid hydrogel systems, the behavior of HSPCs *ex vivo* could be more specifically studied and influenced in the future.

Keywords: hematopoietic stem cells, two-dimensional cell culture, hydrogel, nanostructure

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung i

Abstract ii

Abkürzungsverzeichnis vii

Abbildungsverzeichnis xi

Tabellenverzeichnis xv

1 Einleitung 1

1.1 Hämatopoetische Stammzellen und Orte der Blutzellbildung 1

1.1.1 Definition des Stammzellbegriffs im Kontext der Hämatopoese 1

1.1.2 Hämatopoetische Nischen *in vivo* 6

1.2 Biomaterialien für die Kultur von HSPZ 27

1.2.1 Zweidimensionale Kultursubstrate zur Nachbildung der HSPZ-Mikroumgebung 28

1.2.2 Nanostrukturierung als Rezeptor-Cluster induzierendes Element von HSPZ-Zellkultursubstraten 31

1.2.3 Das entwickelte zweidimensionale Hydrogelsystem für diese Arbeit . . 32

1.3 Zielsetzung der Arbeit 37

2 Material und Methoden 39

2.1 Chemikalien 39

2.2 Puffer und Lösungen 40

2.3 Zellnährmedien 41

2.4 Biologische Moleküle, Peptide, Proteine und Antikörper 41

2.5 Kits 43

2.6 Geräte 44

2.7 Verbrauchsmaterialien 46

2.8 Software 47

2.9 Mizellare Diblock-Copolymer Nanolithographie 48

2.9.1 Herstellung goldsalzbeladener mizellarer Lösungen 48

2.9.2 Herstellung von Nanostruktur-Arrays auf Glasträgern 52

2.9.3 Charakterisierung der Nanostruktur-Arrays auf Glasträgern 54

2.10 Herstellung und Charakterisierung der Hydrogelmatrix 57

2.10.1 Synthese von Heparin-Maleimid-Konjugat 57
2.10.2 Bestimmung des Maleimid-Funktionalisierungsgrades 58
2.10.3 Herstellung der Biohybridhydrogelmatrix 60
2.10.4 Mechanische Eigenschaften der Hydrogelmatrix 65
2.11 Funktionalisierung nanostrukturierter Hydrogele 69
2.11.1 Peptidfunktionalisierung gebundener Nanostruktur 69
2.11.2 Immobilisierung löslichen SDF-1α 70
2.12 Nachweis der Nanostrukturanbindung auf Hydrogelen 71
2.12.1 Stromlose Abscheidung von Gold an der Nanostruktur 71
2.12.2 REM-Aufnahmen nanostrukturierter Hydrogele 72
2.12.3 ToF-SIMS nanostrukturierter Hydrogele 73
2.13 Relativer Nachweis der Peptidfunktionalisierung 74
2.14 Nachweis der reversiblen Bindung von SDF-1α 74
2.14.1 Quantifizierung hydrogelgebundenen SDF-1α mittels ELISA 74
2.15 Zellkultivierung 75
2.15.1 Steriles Arbeiten in der Zellkultur 75
2.15.2 Eukaryotische Zelllinien und deren Kulturbedingungen 75
2.15.3 Zellzahlbestimmung 77
2.16 Isolierung von $CD34^+$ mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut 78
2.16.1 Zellaussaat von HSPZ auf Gele 80
2.17 Untersuchung der Zelladhäsion 81
2.17.1 Immunfluoreszenzfärbungen von adhärierten HSPZ auf Hydrogelen . . 81
2.17.2 REM-Aufnahmen von adhärierten HSPZ auf Hydrogelen 82
2.18 Untersuchung der Zellmotilität auf Hydrogelen 82
2.19 Zellverträglichkeit der Biohybridhydrogelmatrix 83
2.20 Proliferationsanalyse der HSPZ auf nanostrukturierten Hydrogelen 87
2.20.1 Wachstumskurve und Berechnung der Generationszeit der HSPZ-Expansion 87
2.20.2 Zellzyklusaktivitätsmessung mittels EdU *Assay* für die Durchflusszytometrie 87
2.21 Differenzierungsanalyse der HSPZ auf nanostrukturierten Hydrogelen 89
2.21.1 Phänotypische Charakterisierung der HSPZ nach Kultur auf nanostrukturierten Hydrogelen mittels Durchflusszytometrie 89
2.21.2 Koloniebildung der HSPZ nach Kultur auf nanostrukturierten Hydrogelen 92

3 Ergebnisse **95**

3.1 Charakterisierung der Goldnanopartikel-Arrays 95
3.1.1 Plasmabehandlung für die Goldnanopartikelbildung 95

3.1.2 Bestimmung der Partikelabstände und korrespondierender Partikeldichten mithilfe der REM-Bildgebung 95
3.2 Charakterisierung des Biohybridhydrogels 98
3.2.1 Mittlerer Maleimid-Funktionalisierungsgrad des Heparin-Maleimid-Konjugats 99
3.2.2 Mechanische Eigenschaften der Gelmatrix 99
3.2.3 Nachweis der Nanostrukturanbindung auf der Hydrogeloberfläche . . . 106
3.2.4 Bindungsvermögen löslicher Biomoleküle 110
3.2.5 Einbettung der Gele in *Wells* 116
3.3 Zellverhalten auf nanostrukturierten Biohybridhydrogelen 118
3.3.1 Zellverträglichkeit der Biohybridhydrogelmatrix 118
3.3.2 Zelladhäsion von HSPZ und deren Nachkommen 120
3.3.3 Motilitätsuntersuchungen kultivierter HSPZ 128
3.3.4 Proliferationsanalyse der HSPZ-Kultur auf nanostrukturierten Hydrogelen 138
3.3.5 Differenzierungsanalyse kultivierter HSPZ auf nanostrukturierten Hydrogelen 145
4 Diskussion **159**
4.1 Die multiplen Funktionalitäten des Biohybridhydrogels 159
4.1.1 Elastizität der Hydrogelmatrix 160
4.1.2 Bindung und Freisetzung von Zytokinen 163
4.1.3 Nanostrukturierung zur präzisen Anbindung von Integrin $\alpha_4\beta_1$ Liganden 165
4.2 Integrin $\alpha_4\beta_1$ Liganden haben Einfluss auf Zellpolarisation und -motilität . . 167
4.2.1 Die Zellpolarisation als Indikator der Zell-Material-Interaktion 168
4.2.2 Die Zellmotilität ist ligandentypabhängig 169
4.2.3 Die Verstärkung der Polarisierung durch SDF-1α 173
4.3 Die Proliferation von HSPZ ist nanostrukturunabhängig 175
4.4 Die komplexe Wirkung des Biohybridhydrogels auf die HSPZ-Differenzierung 178
4.4.1 Die Dynamik der $CD34^+$ Zellpopulation 178
4.4.2 Die Abhängigkeit des Differenzierungsgrades von Ligandentyp und -dichte 180
4.4.3 Der marginale Einfluss von SDF-1α auf die HSPZ-Differenzierung . . . 184
5 Zusammenfassung und Perspektive **187**
A Anhang **193**
Referenzen **207**
Danksagung **243**
Lebenslauf **245**
Publikationsliste **246**

Abkürzungsverzeichnis

Spacer Abstandshalter

Well Vertiefung

2VP 2-Vinylpyridin

a.u. willkürliche Einheiten, *arbitrary units*

ACKR3 *atypical chemokine receptor 3*

AFM Rasterkraftmikroskopie, *atomic force microscopy*

AGM Aorta-Gonaden-Mesonephros

AuNP Goldnanopartikel

BCML *block copolymer micelle (nano)lithography*

BSA bovines Serumalbumin

CAMs Zelladhäsionsmoleküle, *cell adhesion molecules*

CD Differenzierungsmarker, *cluster of differentiation*

CFU koloniebildende Einheit, *colony-forming unit*

CLPs gemeinsame lymphoide Progenitorzellen, *common lymphoid progenitors*

cmc *critical micelle concentration*

CMPs gemeinsame myeloide Progenitorzellen, *common myeloid progenitors*

cRGD zyklisches RGD-Peptid, *cyclic*RGD

CS1 *connecting segment* 1

CXCR4 *CXC-chemokine receptor* 4

D0 Zellkulturtag 0, *Day* 0

D12 Zellkulturtag 12, *Day* 12

D6 Zellkulturtag 6, *Day* 6

DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindol

ddH_2O Wasser, doppelt deionisiert und hochrein

Dll1 *Delta-like* 1

Donor Spender:in

E-Modul Elastizitätsmodul

EDC *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid

EdU 5-Ethinyl-2'-desoxyuridin

ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*

EtOH Ethanol

EZM extrazelluläre Matrix

Fab *fragment of antigen binding*

FBS *fetal bovine serum*

Fc *constant fragment*

Flt3L *Fms-like tyrosine kinase 3* Ligand

FSC Vorwärtsstreulicht, *forward scatter*

GMPs Granulozyt-Makrophage-Progenitorzellen, *granulocyte-macrophage progenitors*

GTPase Guanosintriphosphatase

h.i. hitzeinaktiviert

HM Heparin-Maleimid-Konjugat

HSPZ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen

HSZ hämatopoetische Stammzellen

hämatopoetische blutbildende

Ig Immunglobulin

IL-3 Interleukin-3

IMDM Iscove's Modified Dulbecco's Medium

LT Langzeit, *long-term*

MACS® magnetische Zell-Separation, *magnetic activated cell sorting*

MEPs Megakaryozyt-Erythrozyt-Progenitorzellen, *megakaryocyte-erythrocyte progenitors*

MFI mittlere Fluoreszenzintensität

MPPs multipotente Progenitorzellen, *multipotent progenitors*

MPT *multiple particle tracking*

MSD mittleres Verschiebungsquadrat, *mean square displacement*

NMR *nuclear magnetic resonance*

P2VP Poly(2-vinylpyridin)

PBS phosphatgepufferte Salzlösung, *phosphate buffered saline*

PEG Polyethylenglykol

Progenitor Vorläufer

PS Polystyrol

r.F. relative Luftfeuchtigkeit

REM Rasterelektronenmikroskopie

RPMI Roswell Park Memorial Institute

RT Raumtemperatur

S-Phase Synthese-Phase

SCF *stem cell factor*

scr willkürlich durchmischte Peptidsequenz, *scrambled*

SD Standardabweichung, *standard deviation*

SDF-1 *stromal cell-derived factor*-1

SDF-1α *stromal cell-derived factor*-1 alpha

sPEGthiol sternförmiges Polyethylenglykol-thiol

SSC Seitwärtsstreulicht, *side scatter*

ST Kurzzeit, *short-term*

Sulfo-NHS *N*-Hydroxysulfosuccinimid

TCP Zellkulturplastik, *tissue culture plastic*

ToF-SIMS Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie, *Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*

TPO Thrombopoetin

VCAM-1 *vascular cell adhesion molecule*-1

VLA-4 *very late antigen*-4

WST-1 4-[3-(4-Indophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat, *water soluble tetrazolium*-1

Abbildungsverzeichnis

1.1 Das klassisch hierarchische Differenzierungsmodell von HSZ. 3

1.2 Diskretes und kontinuierliches Differenzierungsmodell hämatopoetischer Stammzellen. 4

1.3 Subtypen von MPPs in der Maus 5

1.4 Trajektorien der Differenzierung in der hämatopoetischen Hierarchie 6

1.5 Zeitliche und örtliche Veränderungen der Zusammensetzung des HSPZ-Kompartments im Menschen 7

1.6 Idealisiertes Schema der molekularen Kommunikation zwischen HSZ und ihren Nischenzellen. 10

1.7 Die Einteilung von CAMs. 17

1.8 Konformationsänderung des Integrinrezeptors. 18

1.9 Clustern von Integrinrezeptoren. 21

1.10 Durch SDF-1 aktivierte Signalwege. 23

1.11 Postuliertes Modell der $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Phosphorylierung in Tumor- und Immunzellmigration. 25

1.12 Chemische Struktur von Heparin. 31

1.13 Die SDF-1α-Dimerstruktur in Interaktion mit Heparin. 34

1.15 Schema des multifunktionalen nanostrukturierten Hydrogelsystems in Interaktion mit HSPZ. 36

2.1 Schematische Darstellung der Prozesse bei der mizellaren Diblock-Copolymer Nanolithographie 49

2.2 Beladung der Mizellen mit Goldsalz bei der Herstellung goldsalzbeladener mizellarer Lösungen für die BCML. 51

2.3 Schema der hexagonalen Anordnung goldsalzbeladener Mizellen in der Ebene 53

2.4 Chemische Struktur von sPEGthiol. 57
2.5 Chemische Struktur von Heparin-Maleimid-Konjugat. 57
2.6 Repräsentative ^{1}H-NMR-Spektren von porcinem Heparin und dessen Produkten nach Funktionlisierung mit Maleimid. 59
2.7 Schema der Gussformzusammensetzung. 62
2.8 Hydrogel nach Präparation. 63
2.9 Absorptionsspektren als Funktion der Wellenlänge in Abhängigkeit vom AuNP-Durchmesser einer monodispersen kolloidalen Lösung. 72
2.10 Zellzählung mittels eines Hämacytometers. 77
2.11 Separation von mononukleären Zellen aus humanem Vollblut. 79
2.12 Farbumschlagsreaktion des WST-1 zu Formazan. 84
2.13 Einbau von EdU zur Markierung von replizierter DNA in Zellen. 88
2.14 Messsignale eines Durchflusszytometers für die zelluläre Analyse. 90
2.15 Manuelles Auszählen der Kolonien des CFU-*Assay* am Lichtmikroskop 93

3.1 REM-Aufnahmen zum Effekt der Plasmabehandlung 96
3.2 REM-Aufnahmen von AuNP-Arrays distinkter Interpartikelabstände 96
3.3 REM-Bild eines AuNP-Arrays und dessen Auswertung hinsichtlich seiner Hexagonalität. 97
3.4 Fotografie der Hydrogelscheiben vor und nach Trocknung an Luft 100
3.5 Einfluss von deionisiertem Wasser auf die Hydrogelmatrix 100
3.6 Rotationsrheometrie von Hydrogelscheiben 102
3.7 Bestimmung des E-Moduls E_{komp} über uniaxiale Kompression. 103
3.8 MPT Messungen von Gelen 105
3.9 MPT Messungen von Gelen zur Bewertung der Gelreproduzierbarkeit und zur Ermittlung der lokalen Elastizität. 106
3.10 Qualitativer Nachweis des Transfers des AuNP-Arrays auf die Hydrogeloberfläche 107
3.11 REM-Bilder von AuNP-Arrays 108
3.12 Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrum zum Nachweis der AuNP-Anbindung 109
3.13 Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrum einzelner Aminosäurefragmente . . . 111

3.14 Kumulative Abgabe von SDF-1α in Zellkulturmedium nach 24 h 113

3.15 Abnahme der hydrogelgebundenen Menge SDF-1α als Funktion der Zeit. . . . 114

3.16 Aufsummierte Abgabe von SDF-1α aus Hydrogelen in überstehendes SDF-1α-freies Zellkulturmedium 115

3.17 Relative Abgabe von SDF-1α aus mit SDF-1α-beladenen Hydrogelen 116

3.18 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Hydrogelscheiben und deren Einbettung in *Wells* von Zellkulturplatten 117

3.19 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von KG-1a Zellen zur Unterscheidung lebender und toter Zellen. 118

3.20 Durchflusszytometrische Analyse von KG-1a Zellen nach 24 h Kultur auf unstrukturierten, zweidimensionalen Oberflächen. 119

3.21 Relative Stoffwechselaktivität von KG-1a Zellen nach 24 h Kultur im Mediumüberstand 120

3.22 Verschiedene Morphologien einer HSPZ-Kultur als REM-Aufnahmen 122

3.23 Verschiedene Morphologien einer HSPZ-Kultur nach 8 Tagen 123

3.28 Anteil polarisierter HSPZ auf unterschiedlichen Oberflächen 129

3.29 Anteil polarisierter HSPZ auf Hydrogelen 130

3.30 Animierte Bilderfolge der Zeitraffer-Mikroskopie zur Nachverfolgung der Zellbewegung auf Hydrogeloberflächen. 131

3.31 Akkumulierte Wegstrecke durch Klickverfolgung von migrierenden polarisierten Zellen 133

3.32 Einfluss von SDF-1α auf die mittlere korrigierte Geschwindigkeit von HSPZ . 134

3.33 Einfluss der Nanostrukturierung auf die mittlere korrigierte Geschwindigkeit von HSPZ 135

3.34 Bildsequenz der Durchlichtmikroskopie zur Migration von polarisierten HSPZ nach 48 h 136

3.35 Durchlichtmikroskopie von HSPZ nach 48 h auf funktionalisierten nanostrukturierten Hydrogelen 137

3.36 Gesamtzellzahl von HSPZ nach 6 und 12 Tagen auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen 139

3.37 Expansion von HSPZ nach 6 bzw. 12 Tagen auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. 141

3.38 Zytotoxische Wirkung von EdU auf proliferierende HSPZ 143

3.39 Proliferationsanalyse über EdU^+ und EdU^- Zellen auf Hydrogelen 144

3.41 Durchflusszytometrische Analyse von hämatopoetischen Progenitoren als $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Subpopulation 147

3.42 Durchflusszytometrische Analyse des Anteils $CD34^+$ Zellen an der Gesamtpopulation 149

3.43 Berechnete absolute $CD34^+$ Zellzahl von HSPZ nach 6 Tagen 150

3.44 Differenzierung von HSPZ nach 6 bzw. 12 Tagen auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. 152

3.47 Auswertung des CFU-*Assay* zur Ermittlung des myeloiden Koloniebildungspotentials kultivierter HSPZ 156

5.1 Schema der beobachteten Effekte des multifunktionalen nanostrukturierten Hydrogelsystems auf HSPZ 189

A.1 Binarische Kategorisierung der HSPZ-Morpholgie nach 48 h Kultur 194

A.2 Zusammenhang mittlerer unkorrigierter Geschwindigkeit und Direktionalität . 195

A.3 Repräsentative durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HSPZ-Kulturen auf verschiedenen Oberflächen - *IDSP*-Peptid. 196

A.4 Repräsentative durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HSPZ-Kulturen auf verschiedenen Oberflächen - *LDV*-Peptid. 199

A.5 Durchflusszytometrische Analyse der CD49d-Expression kultivierter HSPZ im Zeitverlauf. 202

A.6 Durchflusszytometrische Analyse der CD29-Expression kultivierter HSPZ im Zeitverlauf. 202

A.7 Durchflusszytometrische Analyse der CD184-Expression kultivierter HSPZ. . 203

A.8 Hierarchisches Vorgehen zur Grenzsetzung durchflusszytometrischer Messsignale von gefärbten HSPZ und deren Abkömmlinge. 204

Tabellenverzeichnis

2.1 Verwendete Chemikalien 39
2.2 Gebrauchsfertige Puffer 40
2.3 Angesetzte Puffer 41
2.4 Medien und Zusätze 41
2.5 Biologische Moleküle, Peptide und Proteine 41
2.6 Aminosäuresequenzen und physikochemische Eigenschaften der Peptidkonstrukte 42
2.7 Antikörper und Farbstoffe für die Immunfluoreszenzfärbung 42
2.8 Fluorochrom-konjugierte Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie 43
2.9 Verwendete Kits 43
2.10 Verwendete Geräte 44
2.11 Verwendete Verbrauchsmaterialien 46
2.12 Genutzte Programme für Datenauswertung 47
2.13 Verwendete Diblock-Copolymere und deren chemische Zusammensetzung . . . 50
2.14 Parameter zur Herstellung von BCML-Lösungen und Trägerbeschichtung . . . 50
2.15 Einflussfaktoren bei Herstellung der BCML-Lösungen und Substratbeschichtung 54
2.16 Abkürzung verwendeter Diblock-Copolymere 54
2.17 Ausbeute und Funktionalisierungsgrad verschiedener HM Synthese-Chargen . 60
2.18 Farbstoffe der Lebend-tot-Färbung für die Fluoreszenzmikroskopie 86
2.19 Fluorochrom-konjugierte Antikörper mit eingesetzten Endverdünnungen für die Durchflusszytometrie 91

3.1 Partikeldichten von AuNP-Arrays auf Glasträgern 98
3.2 Mechanische Eigenschaften der Hydrogele 102

3.3 Mittlere Generationszeiten von HSPZ auf *IDSP*-Peptid-funktionalisierten Oberflächen 140

3.4 Mittlere Generationszeiten von HSPZ auf *LDV*-Peptid-funktionalisierten Oberflächen 142

1. Einleitung

1.1. Hämatopoetische Stammzellen und Orte der Blutzellbildung

Die funktionelle Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus wie des menschlichen erfordert den permanenten Ersatz der alterungs-, trauma- oder krankheitsbedingt abgestorbenen Zellen. Die Quelle des Zellerhalts bilden Stammzellen, die durch Zellteilung eine Vermehrung ihrer selbst und Nachkommen für die gewebespezifischen Funktionen stellen. Blut ist ein flüssiges Gewebe und besitzt neben Epithelgewebe ein ausgeprägtes Regenerationspotential. So werden im adulten menschlichen Organismus, der aus geschätzten $3,72 \times 10^{13}$ Zellen besteht (Bianconi et al., 2013), im Normalzustand täglich rund 10^{12} Blutzellen neu gebildet (Doulatov et al., 2012). Blutbildende (hämatopoetische) Stammzellen stellen dabei den Ursprung einer jeden Blutzelle dar.

1.1.1. Definition des Stammzellbegriffs im Kontext der Hämatopoese

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) besitzen zwei essentielle Eigenschaften: die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Fähigkeit zur Differenzierung. HSZ sind multipotent, wobei sich deren Differenzierung auf die Bildung aller Blutzelltypen beschränkt (Morrison et al., 1995; Orkin, 2000; Reya et al., 2001; Dick, 2003; Reya, 2003). Klar abgrenzbar sind dagegen Vorläufer (Progenitor)-Zellen, die das Selbsterneuerungspotential bereits verloren haben, teilungsfähig sind und dabei nur noch auf bestimmte Blutzelltypen begrenzt differenzieren können. Die Bildung und Entwicklung von einer HSZ bis hin zur reifen Blutzelle wird als Hämatopoese ((alt)griechisch: *haĩma* = Blut, *poiēsis* = das Machen) bezeichnet. Die Hämatopoese ist ein permanent ablaufender Prozess, der während des gesamten menschlichen Lebens anhält. Daher müssen HSZ über Dekaden von Jahren ihre Stammzelleigenschaften beibehalten.

Selbsterneuerung und Differenzierung verwirklichen HSZ über symmetrische und asymmetrische Teilungen (Huang et al., 1999; Punzel et al., 2003; Giebel et al., 2006; Ho und Wagner, 2007). Während bei einer symmetrischen Zellteilung der HSZ entweder zwei Stammzellen oder zwei differenzierende Zellen entstehen, entsteht im Prozess der asymmetrischen Zellteilung eine Tochterzelle, die sich selbst erneuern kann (Stammzelle) und eine zweite Tochterzelle, die

zur Differenzierung bestimmt ist. Die symmetrische selbsterneuernde Teilung der Stammzelle trägt numerisch zur Stammzellexpansion bei, dagegen ist die asymmetrische Teilung ein balancierender Mechanismus zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung (Morrison und Kimble, 2006), der durch zellintrinsische und/oder zellextrinsische Signale gesteuert wird (Venkei und Yamashita, 2018; Sunchu und Cabernard, 2020; Loeffler et al., 2021).

Die Blutzellbildung ist eine hierarchische Abfolge von Differenzierungsereignissen auf Zellebene. Dies lässt sich in Form eines klassischen Stammbaums mit stufenweise fortschreitender Differenzierung darstellen, wobei jede Entwicklungsstufe durch bestimmte Progenitorpopulationen definiert ist (Abb. 1.1). Die Zelldifferenzierungshierarchie basiert auf Immunphänotypisierung anhand der Expression von Differenzierungsmarker, *cluster of differentiation* (CD)-Molekülen an der Zelloberfläche. Das baumartige Hierarchiemodell wurde allen voran durch die Weissmann-Forschungsgruppe etabliert (Morrison et al., 1995; Kondo et al., 1997; Morrison et al., 1997; Akashi et al., 2000; Manz et al., 2002) und wird auch als klassisches Modell der Hämatopoese bezeichnet. An dessen Spitze stehen HSZ, welche in zwei Untergruppen eingeteilt werden: Langzeit, *long-term* (LT)-HSZ und Kurzzeit, *short-term* (ST)-HSZ. LT-HSZ sind eine seltene, primär zellzyklusruhende Population und besitzen Langzeit-Rekonstitutionskapazität (>3–4 Monate), wogegen ST-HSZ nur Kurzzeit-Rekonstitutionskapazität (<8–12 Wochen) aufweisen (Osawa et al., 1996; Goodell et al., 1997; Zanjani et al., 1998; Majeti et al., 2007; Wilson et al., 2008; Zhang et al., 2018; Cheng et al., 2020). LT-HSZ entwickeln sich zu ST-HSZ, die widerum in multipotente Progenitorzellen, *multipotent progenitors* (MPPs) differenzieren (Yang et al., 2005). MPPs besitzen im Vergleich zu HSZ eine hohe Teilungsaktivität, doch zeigen sie bereits eine sehr eingeschränkte bis nicht nachweisbare Selbsterneuerungsfähigkeit (Morrison et al., 1997; Lai et al., 2005).

Die erste Gabelung folgt der MPP-Differenzierung entweder in gemeinsame myeloide Progenitorzellen, *common myeloid progenitors* (CMPs) mit myeloidem, erythoidem und megakaryozytischem Differenzierungspotential oder in gemeinsame lymphoide Progenitorzellen, *common lymphoid progenitors* (CLPs) mit ausschließlich lymphoidem Differenzierungspotential (Kondo et al., 1997). CLPs können sich zu T-, B- und natürliche Killer-Zellen oder auch dendritische Zellen ausbilden. Die zweite Gabelung folgt der CMP-Differenzierung und teilt in bipotente Granulozyt-Makrophage-Progenitorzellen, *granulocyte-macrophage progenitors* (GMPs) und Megakaryozyt-Erythrozyt-Progenitorzellen, *megakaryocyte-erythrocyte progenitors* (MEPs). GMPs bilden Granulozyten, Monozyten (Makrophagenvorstufen) sowie ebenfalls dendritische Zellen, während MEPs zu Megakaryozyten (Thrombozytenvorläufer) oder Erythrozyten differenzieren (Akashi et al., 2000; Na Nakorn et al., 2002).

Da sich das klassische Differenzierungsmodell humaner HSZ auf dem Expressionsprofil von CD-Molekülen an der Zelloberfläche gründet, soll hier kurz die Rolle von CD34 hervorgehoben werden. Die Gewinnung von HSZ erfolgt fast ausschließlich über phänotypische Isolierung

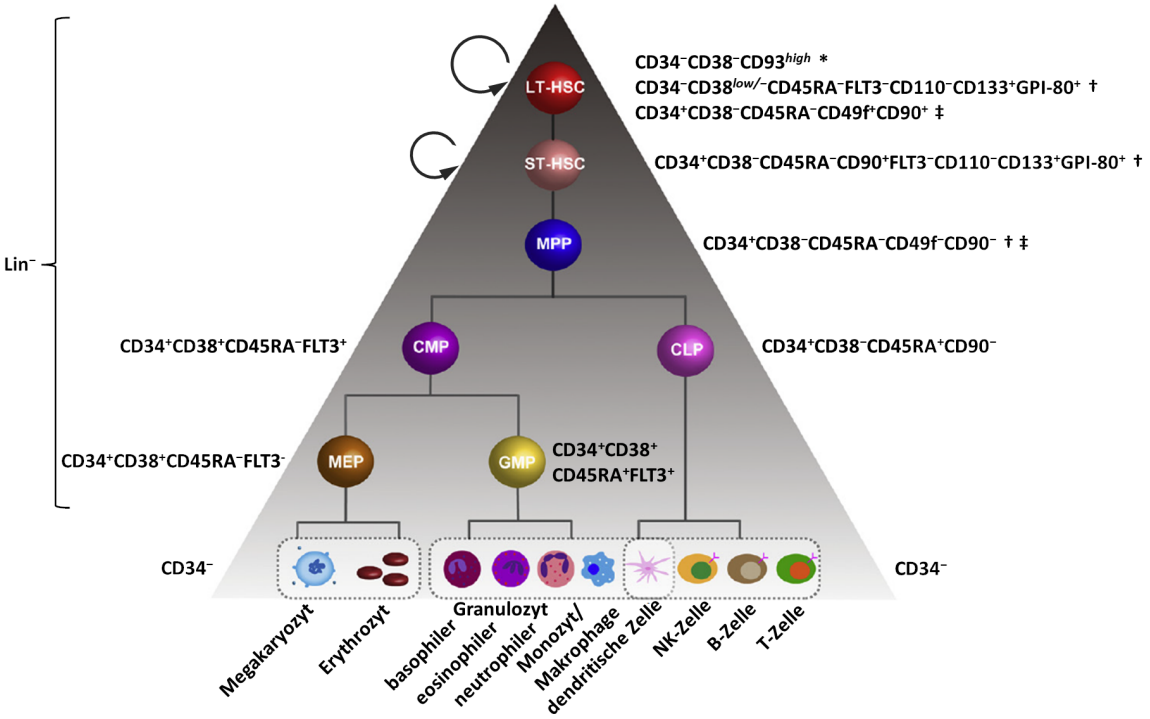


Abbildung 1.1.: Das klassisch hierarchische Differenzierungsmodell von HSZ. In der sich verzweigenden Entwicklungspyramide sitzen zuoberst multipotente LT- und ST-HSZ, wobei ST-HSZ durch ihre limitierte Selbsterneuerungsfähigkeit (schwarzer Kreisbogen mit Pfeil) eine Hierarchieebene unterhalb der LT-HSZ stehen. HSZ bringen MPPs hervor, die eine massiv reduzierte Selbsterneuerung aufweisen. Unterhalb der MPPs teilt sich die Entwicklungslinie in myeloid und lymphoid auf. CLPs produzieren Lymphozyten, darunter B- und T-Zellen sowie natürliche Killer (NK)-Zellen und dendritische Zellen. CMPs divergieren in MEPs und GMPs. Letztere bilden neben Granulozyten und Monozyten (Makrophagen) ebenfalls dendritische Zellen. Die Phänotypcharakteristik exprimierter (+) bzw. nicht exprimierter (-) CD-Moleküle der Zelloberfläche bezieht sich auf humane Zellen, nach Anjos-Afonso et al. (2013) (*); Sumide et al. (2018) (†); Notta et al. (2011) (‡); CLP nach Rieger und Schroeder (2012), alles weitere nach Sumide et al. (2018). Abbildung basierend auf Zhang et al. (2018) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

aus Primärquellen. CD34 wird vorwiegend als Marker für humane HSZ betrachtet und aus diesem Grund in der klinischen Praxis für Blutstammzelltransplantationen genutzt (Krause et al., 1996; Huber et al., 1999). Dabei ist die Quantifizierung der $CD34^+$ Zellen u. a. ein Prüfparameter bei der Stammzellapherese des peripheren Blutes und dient der Festlegung der Transplantationsdosis (Bundesärztekammer, 2019).

Allerdings wird CD34 auch von nichthämatopoetischen Zellen wie endothelialen Progenitoren (Fina et al., 1990) und embryonalen Fibroblasten (Brown et al., 1991) exprimiert und ist eher als ein allgemeiner Marker für Progenitoraktivität anzusehen (Sidney et al., 2014). Dabei nimmt die Expression von CD34 im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich ab. Allerdings ist die Funktion von CD34 noch immer nicht umfassend geklärt. Nach seiner Struktur ist CD34 ein transmembranes Sialomucin, dessen extrazelluläre Domäne stark sialyliert, *O*- und auch *N*-glykosyliert ist (Nielsen und McNagny, 2008). Neben L-Selektin (CD62L) (Baumheter

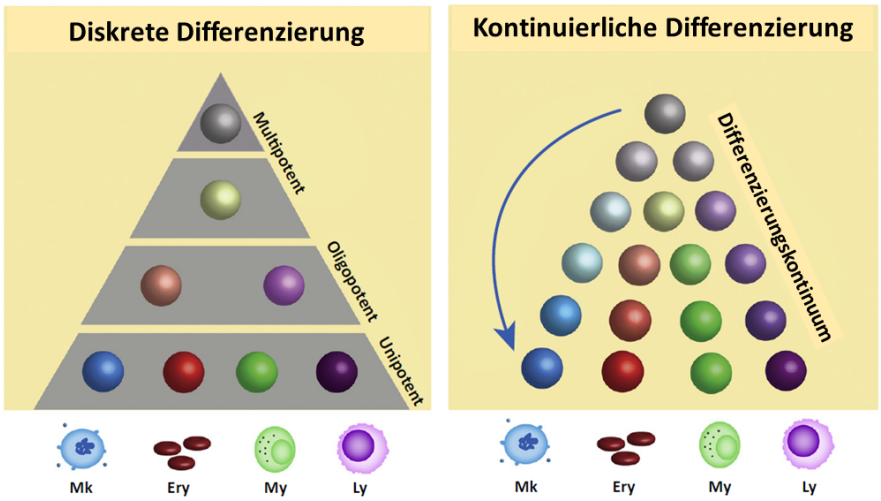


Abbildung 1.2.: Diskretes und kontinuierliches Differenzierungsmodell hämatopoetischer Stammzellen. *Links:* Im diskreten (klassischen) Differenzierungsmodell durchlaufen LT-HSZ an der Spitze der Differenzierungshierarchie (graue Kugel) mehrere separierte Intermediärstufen (farbige Kugeln), um reife Blutzellen zu bilden. Mit jeder Stufe reduziert sich die Differenzierungspotenz (multipotent>oligopotent>unipotent). *Rechts:* Im kontinuierlichen Differenzierungsmodell beschreiten LT-HSZ (graue Kugeln) von der Spitze aus Pfade, die als Differenzierungskontinuum begriffen werden (Kugeln mit graduell intensivierender Farbgebung). Es gibt keine offensichtlichen Entwicklungsabstufungen entlang des Differenzierungspfades. Besonders ist dabei die Differenzierung zu Megakaryozyten, die sich bereits zu einem frühen Zeitpunkt ausprägen können (blauer Pfeil). Reife Blutzellen: Megakaryozyten (Mk); Erythrozyten (Ery); Myelozyten (My); Lymphozyten (Ly). Abbildung basierend auf Zhang et al. (2018) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

et al., 1993) bindet CD34 auch zu vaskulären Selektinen (E- und P-Selektin) (AbuSamra et al., 2017), was für HSZ auf eine Funktion zum Besiedeln hämatopoetischer Gewebe hinweist. Da in verschiedenen *in vitro* Studien kein einheitlicher HSZ-Phänotyp, weder für Maus noch für Mensch, genutzt wurde und oftmals nur CD34 als einziger Stammzellmarker herangeführt wurde, wird für die Beschreibung von *in vitro* Studien im Folgenden nicht mehr von HSZ, sondern erweiternd von hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) gesprochen.

Wegen der diskreten Entwicklungsstufen von multipotenten HSZ über oligopotente und unipotente Prognitoren bis hin zu reifen Blutzellen (Abb. 1.2 links) wird noch immer das klassische Modell in der Forschung herangezogen. Dies geschieht nicht zuletzt weil die Phänotypisierung als Mittel der Wahl für eine ganze Zellpopulationsanalyse durchgeführt wird. In derartigen Zellpopulationsanalysen wird angenommen, dass Zellen gleichen Phänotyps funktionell homogen hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials sind. Damit unterschätzt das klassische Differerenzierungsmodell allerdings die Heterogenität der HSZ und Progenitoren (Copley et al., 2012; Crisan und Dzierzak, 2016; Jurecic, 2019). Die zelluläre Identität kann allein über den Phänotyp nicht hinlänglich beschrieben werden.

Mithilfe von Einzelzellanalysen - vorrangig über *Epigenomics* und *Transcriptomics* (Paul et al., 2015a; Olsson et al., 2016; Buenrostro et al., 2018; Han et al., 2018; Bergiers et al., 2018; Watcham et al., 2019; Zhang et al., 2022) - und Entwicklungsliniennachverfolgung in trans-

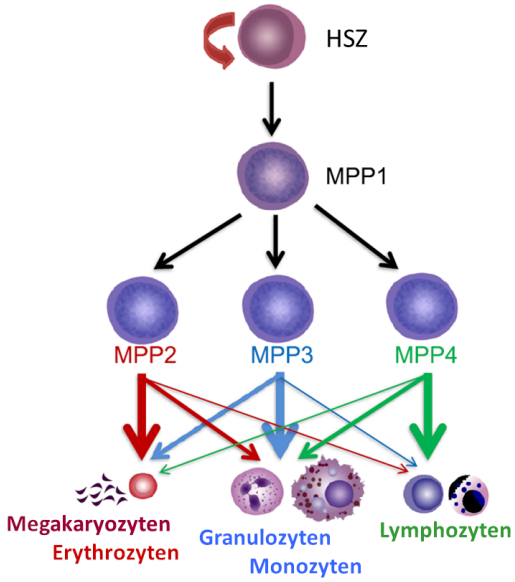


Abbildung 1.3.: Subtypen von MPPs in der Maus. MPPs sind eine heterogene Population mit unterschiedlicher Differenzierungslinienneigung *in vivo*. MPP-Subtypen werden in MPP1–4 eingeteilt. MPP1 ist multipotent und speist alle Differenzierungslinien. MPP2 ist eine primär Megakaryozyten-tendierende, MPP3 eine myeloid-tendierende MPP-Subpopulation. MPP2/3 sind funktionell verschieden zu den lymphoid-tendierenden MPP4. Abbildung basierend auf Cheng et al. (2020), frei verfügbar unter einer *Creative Commons CC BY*-Lizenz.

genen Organismen *via* Transposon-Markierung (Sun et al., 2014; Rodriguez-Fraticelli et al., 2018), Cre/loxP-System (Ganuza et al., 2017; Henninger et al., 2017) sowie CRISPR/Cas9-Gentechnik (Alemany et al., 2018), und in HSZ *via* virales *Barcoding* (Lu et al., 2011), wurde in den letzten 10 Jahren ein komplexeres Verständnis von der hämatopoetischen Differenzierungshierarchie gewonnen. Dies gipfelt im Konzept eines kontinuierlichen Differenzierungsmodells, in dem Hierarchiegrenzen wegfallen und die Unterschiedlichkeit der Einzelzellen im Differenzierungsprozess hervorgehoben wird, wie in Abb. 1.2 rechts dargestellt. Im Mausorganismus wurde bspw. gezeigt, dass MPPs eine heterogene Population darstellen, die bezüglich ihres Phänotyps, des Zellzyklusstatus, der Differenzierungslinienneigung, der Resistenz gegenüber Arzneimitteln und der Knochenmarkshäufigkeit in MPP1, MPP2, MPP3 und MPP4 unterteilt werden können (Wilson et al., 2008; Pietras et al., 2015). Alle MPP-Subtypen speisen sich aus HSZ, wobei MPP1 ähnlich den ST-HSZ sind, da sie Selbsterneuerungsfähigkeit, Multipotenz und Kurzzeit-Rekonstitutionskapazität (bis zu 4 Monate) besitzen (Cheng et al., 2020). Dagegen haben MPP2/3/4 *in vivo* keine Selbsterneuerungsfähigkeit mehr und weisen nur noch myeloide Kurzzeit-Rekonstitutionskapazität (<1 Monat) auf und zeigen Differenzierungslinienneigung. Nach Transplantationen produzieren HSZ zunächst myeloid-tendierende MPP2/3 und anschließend lymphoid-tendierende MPP4 (Abb. 1.3).

Die gegenwärtige Auffassung von der Hämatopoese ist angelehnt an Waddingtons epigenetische Landschaft (Waddington, 1957). Hämatopoetische Zellen entwickeln sich aus HSZ koninuierlich entlang Trajektorien (Giladi et al., 2018; Velten et al., 2017). Wie Abb. 1.4 illustriert, erlangen individuelle HSZ graduell eine Differenzierungslinienneigung entlang mehrerer parallel sowie gekreuzt verlaufender Richtungen ohne diskret-organisierte Progenitorpopulationen. Worin sich die Transition von einer zur anderen Zellidentität äußert, bleibt Gegenstand aktueller Forschung.

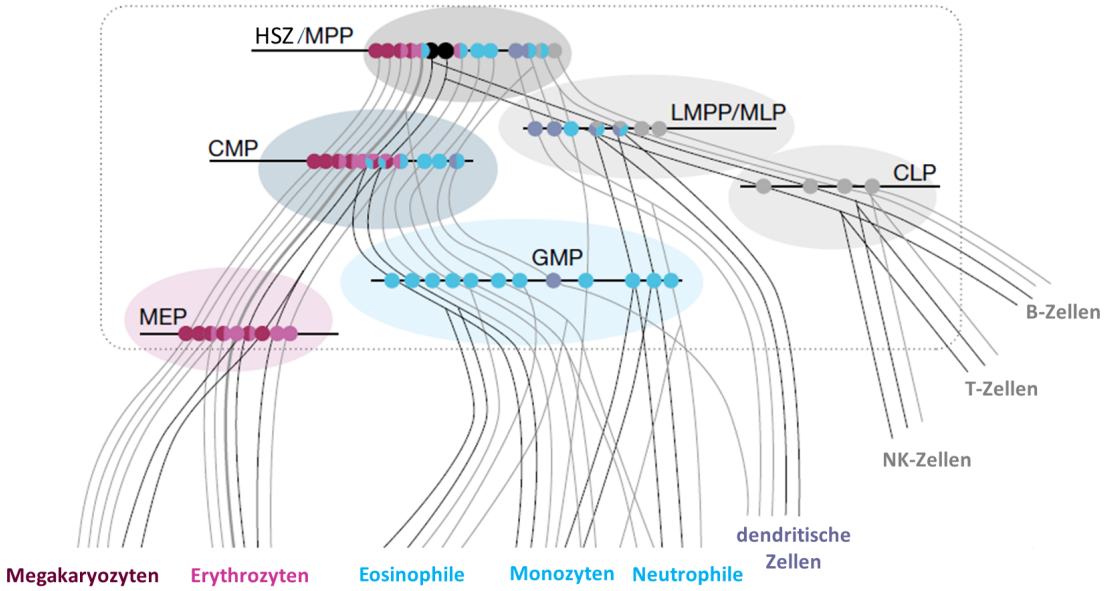


Abbildung 1.4.: Trajektorien der Differenzierung in der hämatopoetischen Hierarchie. Zweidimensionale Darstellung der frühen Hämatopoese (gerahmt von gepunkteter Linie). Kontinuierliche Linien kennzeichnen Differenzierungstrajektorien zu verschiedenen Einzelzellen (Kreise), die definierte, phänotypisch identische Progenitorkompartimente bilden (schattierte Ovale). Horizontale Linien repräsentieren die Momentaufnahme des Entwicklungspotentials der Zellen (unifarben = unipotent; zweifarben = bipotent; dreifarben = tripotent; schwarze Kreise kennzeichnen Multipotenz), wobei unipotente Zellen den bi- oder tripotenten meist zahlenmäßig überlegen sind. Abbildung basierend auf Laurenti und Göttgens (2018) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

1.1.2. Hämatopoetische Nischen *in vivo*

Die Flexibilität hämatopoetischer Zelldifferenzierung sich an körperliche Veränderungen anzupassen, spiegelt sich bereits in der Lokalisation der Blutzellbildung während der Ontogenese wider. Die embryonale Hämatopoese in Wirbeltieren findet in verschiedenen Zell- und Organstrukturen statt und erscheint in drei aufeinanderfolgenden „Wellen" (Belyavsky et al., 2021). Die ersten beiden Wellen laufen im Dottersack ab und produzieren in dieser sogenannten megaloblastischen Hämatopoese in Blutinseln der Dottesackwand neben Makrophagen- und Megakaryozyten-Vorläufern vorrangig primitive, kernhaltige Erythrozyten-Vorläufer (Megaloblasten) (McGrath und Palis, 2005; Welsch, 2009). Danach erscheinen im Embryo die ersten definitiven HSZ in Form der normoblastischen Hämatopoese in der Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM)-Region (Medvinsky und Dzierzak, 1996; Ivanovs et al., 2011). Dabei bilden sich die definitiven HSZ aus hämogenen Endothelzellen in der dorsalen Aorta durch den Prozess der endothelial-hämatopoetischen Transition (Bertrand et al., 2010; Boisset et al., 2010; Kissa und Herbomel, 2010; Ottersbach, 2019). In der AGM-Region von Mausembryonen wurde bereits in diesem Stadium (Embryonaltag 11) durch Transplantationsstudien eine funktionelle Heterogenität der Vorstufen-HSZ (*precursor hematopoietic stem cells*) und HSZ demonstriert (Ye et al., 2017). Über Einzellzell-RNA-Sequenzierung fand man heraus, dass

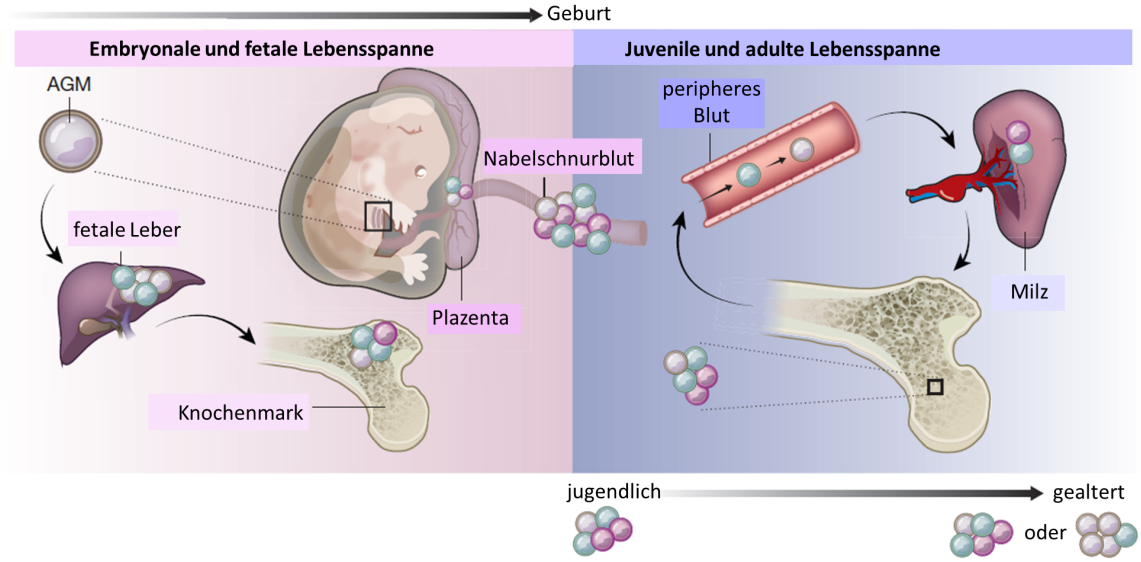


Abbildung 1.5.: Zeitliche und örtliche Veränderungen der Zusammensetzung des HSPZ-Kompartments im Menschen. HSPZ besiedeln unterschiedliche Organe im Verlauf der Lebenszeit. Die ersten definitiven HSZ erscheinen in der AGM-Region. Verschiedenfarbige Zellen repräsentieren verschiedene HSPZ-Untergruppen. Ungewiss ist, ob alle HSPZ-Untergruppen und Differenzierungpotenzen im gleichen Verhältnis in jedem Organ anzutreffen sind. Altersbedingte Veränderungen sind das Resultat von veränderter HSPZ-Zusammensetzung sowie phänotypischer Veränderungen in jedem einzelnen Zelltyp durch intrinsische genetische oder epigenetische Änderungen und systematische Modifizierungen der Mikroumgebung. Abbildung basierend auf Laurenti und Göttgens (2018) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

sich das Genexpressionsmuster zwischen zwei Vorstufen-HSZ nicht gleicht, wenngleich beide Zellen über dieselbe Oberflächenmarkerkombination (Phänotyp) isoliert wurden (Zhou et al., 2016).

Nach ihrer Bildung in der AGM-Region migrieren HSZ in die Leber und Plazenta (Abb. 1.5), sodass die Blutzellbildung im humanen Embryo ab der 6. Woche dort zu verorten ist (Welsch, 2009; Robin et al., 2009; Rieger und Schroeder, 2012). Dort akkumulieren HSZ für eine Expansion und Differenzierung (Ema und Nakauchi, 2000; Gekas et al., 2005; Kieusseian et al., 2012), sodass neben Erythropoese, die nun kernlose Erythrozyten hervorbringt, auch Granulozyto- und Megakaryozytopoese stattfindet (Fanni et al., 2018). Kurz darauf ist die Blutzellbildung auch in der Milz lokalisierbar, weshalb dieser Entwicklungsabschnitt als hepatolienale Phase der Hämatopoese bezeichnet wird (Welsch, 2009). Ungefähr ab dem 5. Monat dominiert im humanen Fetus die Blutzellbildung im gesamten Knochenmark (Welsch, 2009). Diese medulläre Phase der Hämatopoese geht mit einem Rückgang der Blutzellbildung in Leber und Milz einher und bleibt ein Leben lang erhalten (Abb. 1.5). Das Körperwachstum und damit verbundene Körpermassenvergrößerung erfordert auch die allometrische Zunahme der Blutzellmasse, sodass erst mit Erreichen des Erwachsenseins der Zuwachs des HSZ-Reservoirs einen stationären Zustand erreicht hat (Udroiu und Sgura, 2021).

Bei der Geburt ist noch das gesamte Knochenmark blutzellbildend. Das Knochenmark füllt den Raum zwischen den Knochenbälkchen (*Substantia spongiosa*) und den tubusförmigen Raum (*Cavitas medullaris*) der großen Extremitätenknochen aus. Das Grundgewebe besteht aus vaskularisiertem retikulärem Bindegewebe, welches sich aus Fibroblasten (Retikulumzellen), retikulären Fasern und Fettzellen (lipidbeladene Retikulumzellen) zusammensetzt (Lüllmann-Rauch, 2003). In diesem sind u. a. auch mesenchymale Stammzellen, HSPZ und deren Nachkommen angesiedelt.

Beim Erwachsenen wird das Knochenmark zunehmend durch Fettgewebe ersetzt, sodass sich die Hämatopoese nur noch auf die Epiphysen der großen Röhrenknochen wie *Humerus, Femur*, Wirbelkörper und einige platte Kochen wie z. B. *Sternum*, Rippen und Beckenkamm beschränkt (Welsch, 2009). Postnatal kann jedoch bei Stromaanomalien des Knochenmarks oder malignen hämatologischen Erkrankungen die Blutzellbildung in extramedulläre Körperregionen wie Milz, Leber, Lymphknoten und paravertebralen Regionen ausweichen (Yamamoto et al., 2016). Dies ist u. a. möglich, da einer zirkadianen Rhythmik folgend ein Teil der HSZ aus dem Knochenmark mobilisiert wird, in die periphere Blutbahn übertritt und mit der Blutzirkulation diese Regionen erreicht und infiltriert (Méndez-Ferrer et al., 2008; Golan et al., 2018; García-García und Méndez-Ferrer, 2020, siehe Abb. 1.5). Im Zuge eines Alterungsprozesses, der physiologisch mit fortgeschrittener Lebenszeit einhergeht, verlieren „alternde" HSZ zunehmend ihr Potential zur Selbsterneuerung und Homöostase des hämatopoetischen Systems (Dykstra et al., 2011; de Haan und Lazare, 2018). Ob HSZ-Alterung durch zellintrinsische oder zellextrinsische Faktoren verursacht wird, ist strittig. Zellintrinsische Veränderungen sind genetischer oder epigenetischer Natur, zellextrinsische Einflüsse dagegen wirken durch Veränderungen der unmittelbaren Umgebung auf die Zelle. Die unmittelbare Umgebung, die Mikroumgebung der HSZ beeinflusst und reguliert durch ihre zellextrinsischen Signale die Hämatopoese.

1.1.2.1. Molekulare Interaktionen der HSZ in der Knochenmarksnische

Der Terminus Nische als spezifische Mikroumgebung der Stammzelle wurde erstmals 1978 von Raymond Schofield geprägt, wobei er postulierte, dass „die Stammzelle in einem Verband mit anderen Zellen zu sehen ist, die ihr Verhalten bestimmen" (Schofield, 1978). Die klassische hämatopoetische Nische stellt daher die Mikroumgebung im Knochenmark dar, dem primären Ort der adulten Hämatopoese, worauf sich auch die in Abschnitt 1.1.1 eingeführten Differenzierungsmodelle beziehen. Die spezielle Mikroumgebung im Knochenmark ist der Ort, an dem sich adulte HSZ bevorzugt aufhalten. Dabei ist die Knochenmarksnische in der Lage, die HSZ in einem undifferenzierten und selbsterneuernden Zustand zu halten.

Das Knochenmark ist *per se* ein makroskopischer Raum. Bezogen auf die Dimension einer HSZ, die ein Volumen von annähernd 400 μm^3 und einen Durchmesser von weniger als 10 µm besitzt (Shariatmadar et al., 2008), können mikroskopisch Sublokalisationen der HSZ mit unmittelbarer

Nähe zu den histologischen Knochenmarkstrukturen vorgenommen werden. So ergeben sich Zonierungen der Knochenmarksnische in endostal, perivaskulär und zentral (Tamma und Ribatti, 2017). Bei dieser Einteilung von Zonen, die anatomisch überlappen, zugleich von unabhängigen Nischen zu sprechen, ist wissenschaftlich umstritten (Kiel und Morrison, 2008; Lévesque und Winkler, 2011; Ding und Morrison, 2013; Ugarte und Forsberg, 2013; Szade et al., 2018). Lebendtier-Bildgebung in Mäusen hat LT-HSZ in der Nähe von sinusoidalen Blutgefäßen sowie der inneren Knochenoberfläche (endostal) lokalisieren können. Dabei befinden sich klonal expandierende LT-HSZ fast ausschließlich in Bereichen mit Knochenumbauaktivität (Christodoulou et al., 2020). MPPs sind dagegen häufiger im Bereich von Blutgefäßen der Übergangszone von Arteriolen zu Sinusoiden im Knochenmark nahe der inneren Knochenhaut (Endost) anzutreffen (Christodoulou et al., 2020). In dieser Arbeit wird einfachheitshalber das Knochenmark als Ganzes im Sinne einer funktionellen Nische verstanden, auch wenn sich die Begrifflichkeit stets nur auf die Mikroumgebung der Zelle bezieht. Die Knochenmarksnische übermittelt der HSZ Signale über zelluläre, extrazelluläre sowie lösliche Faktoren, durch die die Funktion der Stammzelle reguliert wird.

Der zelluläre Bestandteil der Knochenmarksnische umfasst verschiedenste nichthämatopoetische und hämatopoetische Zelltypen: Endothelzellen, (multipotente) mesenchymale Stromazellen, Osteoblasten, Adipozyten, marklose Nervenfasern postganglionärer Neurone des sympathischen Nervensystems (in Begleitung von Schwann-Zellen) und Nachkommen der HSZ wie Megakaryozyten und Makrophagen (Abb. 1.6). Zahlreiche *in vivo* Studien haben die ausschlaggebende Bedeutung von Nischenzellen in der Regulierung der HSZ-Funktion dargelegt (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003; Méndez-Ferrer et al., 2010; Ding et al., 2012; Kunisaki et al., 2013). Nischenzellen garantieren in ihrer Diversität den HSZ das Überleben und damit den Erhalt des HSZ-Reservoirs (Baryawno et al., 2017). Durch Einzelzellanalysen aus murinem Knochenmark wurden über 20 verschiedene Subpopulationen von Zellen identifiziert (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019; Baccin et al., 2020; Zhong et al., 2020), deren Transkriptom ebenfalls auf eine trajektorielle Differenzierungshierarchie schließen lässt (Wolock et al., 2019). Eine Integration dieser Studiendatensätze führte zur Definition von 14 Meta-Clustern der Subpopulationen, die durch die Expression von pro-hämatopoetischen Faktoren charakterisiert sind (Dolgalev und Tikhonova, 2021). Auf diese Einteilung der Nischenzellen wird sich im Folgenden nicht bezogen, da die Datenlage auf Grund der Komplexität und Aktualität nicht hinreichend ist. Stattdessen werden die eingangs erwähnten Zelltypen in Interaktion mit HSZ betrachtet. Die molekulare Kommunikation zwischen Nischenzellen und HSZ erfolgt dabei über membranständige Rezeptormoleküle (Abb. 1.6) - entweder in direktem Kontakt zueinander (direkte Zell-Zell-Interaktion) oder durch die Bindung der von ihnen sezernierten löslichen Liganden (indirekte Zell-Zell-Kommunikation). Diese Interaktionen werden im Folgenden etwas näher beleuchtet.

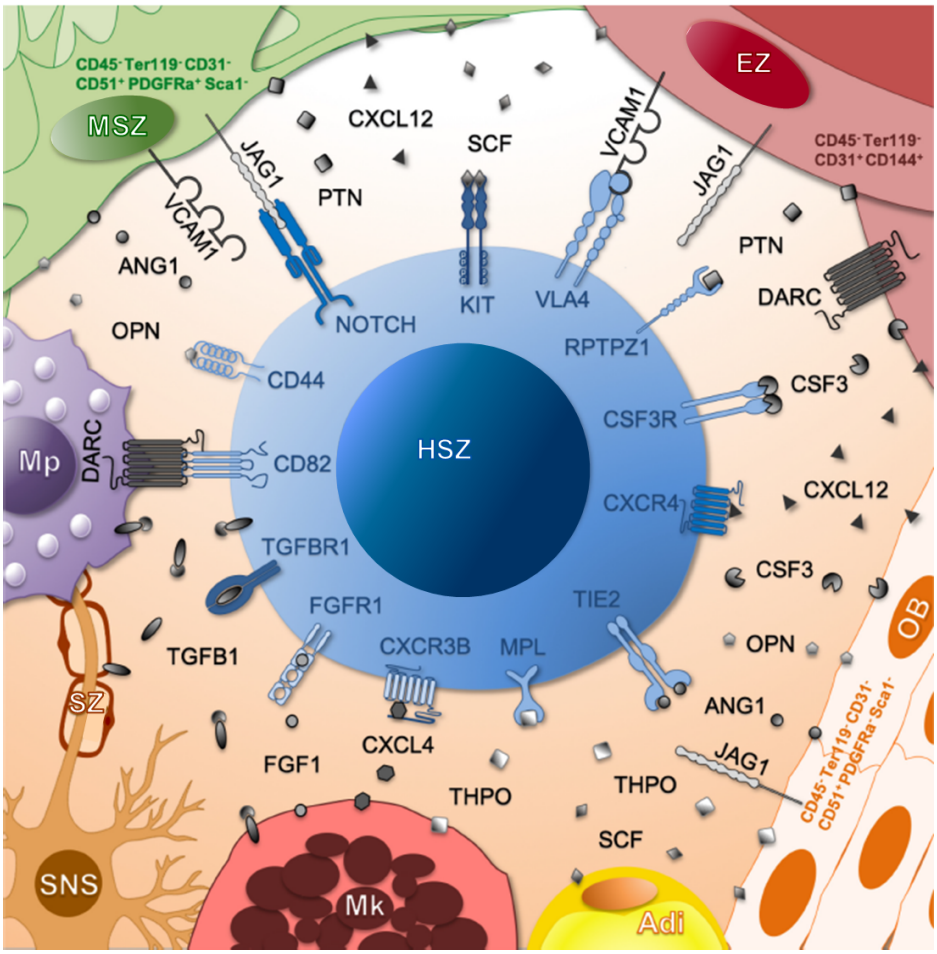


Abbildung 1.6.: Idealisiertes Schema der molekularen Kommunikation zwischen HSZ und ihren Nischenzellen. Liganden und ihre Rezeptoren sind angegeben. Die Farbe der Rezeptoren korreliert mit der Anzahl ligandenexprimierender Zelltypen (dunkel - viele Produzenten, hell - wenige Produzenten). Adipozyt (Adi); Endothelzelle (EZ); hämatopoetische Stammzelle (HSZ); Megakaryozyt (Mk); Makrophage (Mp); mesenchymale Stromazelle (MSZ); Osteoblast (Ob); Schwann-Zelle (SZ); sympathisches Nervensystem (SNS). Abbildung basierend auf Fröbel et al. (2021), frei verfügbar unter einer *Creative Commons CC BY*-Lizenz.

Direkte Zell-Zell-Interaktion HSZ können innnerhalb der Nische in solch räumlicher Nähe zu den nichthämatopoetischen und hämatopoetischen Zellen stehen, dass sie physikalisch in Kontakt treten. Der direkte Kontakt zwischen benachbarten Zellen wird vor allem über spezielle Membranproteine vermittelt, die als Teil eines Rezeptor-Ligand-Paares die Zell-Zell-Kommunikation und/oder das Aneinanderhaften der Zellen ermöglichen. Nachfolgend werden zwei Rezeptor-Liganden-Paare näher beschrieben, deren Aktivierung bereits durch *in vitro* Studien deutliche Effekte auf das HSPZ-Verhalten zeigten.

Notch-Liganden: Eine direkte Zell-Zell-Interaktion erfolgt bspw. zwischen dem Notch-Rezeptor der HSZ und dem Notch-Liganden „Delta" oder „Jagged" einer benachbarten Zelle. Murine wie humane HSZ exprimieren den Rezeptor Notch1 (Varnum-Finney et al., 1998), der u. a. den Liganden Jagged-1 (Jag1) bindet, welcher von mesenchymalen Stromazellen (Varnum-Finney

et al., 1998), Osteoblasten (Calvi et al., 2003) sowie Endothelzellen (Butler et al., 2010; Poulos et al., 2013) exprimiert wird. Auch die Notch-Liganden *Delta-like* 1 (Dll1) und Dll4 werden vorrangig von Endothelzellen präsentiert, worunter Dll4 (nicht aber Dll1) das frühe Differenzierungspotenzial der HSZ beeinflusst, sodass die Verlustmutation von endothelialem Dll4 die Knochenmarkshämatopoese zur myeloiden Nachkommenschaft verschiebt (Tikhonova et al., 2019). Darüber hinaus unterstützt eine posttranslationale Modifizierung, die *O*-Fucosylierung, der Notch-Rezeptoren die Interaktion mit Jag1- oder DLL4-exprimierenden Nischenzellen hinsichtlich vermehrter Quieszenz und Retention der HSZ im Knochenmark (Wang et al., 2015). Der Notch-Signalweg ist vorwiegend als balancierendes Element in der adulten Hämatopoese zu sehen, um die Entwicklung von hämatologischen malignen Erkrankungen zu unterbinden (Lampreia et al., 2017).

Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1): Als weiteres Beispiel direkter Zellinteraktion sei das VCAM-1 (CD106) genannt. VCAM-1 gehört strukturell zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie (Osborn et al., 1989). Es ist ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, welches stark von Endothel- und Stromazellen (Jacobsen et al., 1996; Mende et al., 2019) und moderat von Osteoblasten (Lisignoli et al., 2004; Mende et al., 2019) im Knochenmark exprimiert wird. HSZ exprimieren als Rezeptor das Integrin $\alpha_4\beta_1$ (CD49d/CD29), auch *very late antigen*-4 (VLA-4) genannt, über dessen Bindung an VCAM-1 (Elices et al., 1990; Oostendorp und Dörmer, 1997) u. a. die Progenitorfunktion erhalten (Jung et al., 2005) sowie die Rezirkulation von HSZ in das Knochenmark (*Homing*) und die Retention im Knochenmark reguliert wird (Teixidó et al., 1992; Simmons et al., 1992; Papayannopoulou et al., 1995; Vermeulen et al., 1998; Papayannopoulou et al., 2001; Scott et al., 2003). Im Modellorganismus Zebrafisch wurde eine Subpopulation von Makrophagen, die sich durch die Expression von VCAM-1 auszeichnet, identifiziert. Diese patrouillieren während der Embryonalentwicklung luminal venöser Plexus und dirigieren als Wegweiser HSZ in die Nische, dem kaudalen hämatopoetischen Gewebe (äquivalent der fötalen Leber in Säugern), weshalb sie als „*Usher*-Zellen" bezeichnet werden (Li et al., 2018a; Chiu und Aljitawi, 2019). Ein ähnlicher Mechanismus wurde bei Mäusen im Zusammenhang extramedullärer Hämatopoesse in der Milz beobachtet, wo Makrophagen HSZ über VCAM-1 in der Milz zurückhalten (Dutta et al., 2015).

Indirekte Zell-Zell-Kommunikation Neben direkter Zell-Zell-Interaktion erfolgt die Kommunikation zwischen Nischenzellen und HSZ auch indirekt über sezernierte kleine Proteine (ca. 15–25 kDa Löffler und Petrides, 2003), die Zytokine. Zytokine wirken in der Regel nur auf kurze Distanz auto- oder parakrin; können mitunter durch den Blutstromtransport auch endokrin auf entferntere Zielzellen wirken (Welsch, 2009). Im Folgenden werden einige hämatopoetische Zytokine skizziert, die wichtig für den HSZ-Erhalt sind und daher häufig dem Kulturmedium für *in vitro* Versuche - so wie auch in der vorliegenden Arbeit - zugesetzt werden.

Stem cell factor (SCF), auch Kit-Ligand (KitL) genannt, ist ein Wachstumsfaktor und bindet an die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit (CD117), die von HSZ exprimiert wird (Zsebo et al., 1990; Ogawa et al., 1991; Ikuta et al., 1991; Broudy, 1997). SCF ist für die Hämatopoese in der fetalen Leber ein unentbehrliches Zytokin (Fantin et al., 2021). Für den Fortbestand adulter HSZ ist es ebenso unverzichtbar und wird hauptsächlich von perivaskulären Stromazellen sowie Endothelzellen gebildet (Ding et al., 2012). Eine weitere wichtige SCF-Quelle stellen Adipozyten dar, die insbesondere nach Stresszuständen wie nach Bestrahlungs- oder Chemotherapie für die hämatopoetische Regeneration (Zhou et al., 2017) oder im adipösen bzw. gealterten Knochenmark für hämatopoetische Homöostase sorgen (Zhang et al., 2019a). SCF kommt in membrangebundener und löslicher Isoform vor, die die myeloide Differenzierung unterschiedlich beeinflussen (Kapur et al., 1998). Darüber hinaus reguliert ein unterschiedliches Rezeptorexpressionslevel von c-Kit das HSZ-Verhalten (Grinenko et al., 2014; Shin et al., 2014b). Zusätzlich können HSZ über c-Kit membrangebundenes SCF *clustern*, was zur Bildung eines Zellausläufers führt, der in Synergie mit der VCAM-1/VLA-4-Achse (wie oben erwähnt) große Membranprotrusionen bildet, die in einer polarisierten Zellmorphologie und vermehrter Adhäsion mündet. Lösliches SCF dagegen zerstört diese Protrusionen (Hao et al., 2021; Lee und Ding, 2021). Zudem wurde gezeigt, dass durch die proteolytische Freisetzung von löslichem SCF durch Matrix-Metalloproteinase-9 aus membrangebundenem SCF die HSZ rekrutiert und zur Proliferation angeregt werden (Huang et al., 1992; Heissig et al., 2002).

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), auch *CXC-chemokine ligand 12* (CXCL12) genannt, kommt im Menschen in sechs alternativen Splicevarianten (SDF-1α–ϵ und ϕ) vor (Yu et al., 2006), wobei nur die α und β-Form im Knochenmark detektiert wurden (Janssens et al., 2018). SDF-1 ist ein Migration auslösendes, chemotaktisch wirkendes Zytokin, dem eine entscheidende Bedeutung für die im Blutkreislauf zirkulierenden HSZ zum Auffinden „ihrer" Nische - dem sog. *Homing* - zukommt (Kollet et al., 2001; Ara et al., 2003; Lapidot et al., 2005; Sugiyama et al., 2006; Shang et al., 2011; Sharma et al., 2011; Greenbaum et al., 2013). SDF-1 wird daher auch als ein Retentionsfaktor für HSZ in der Knochenmarksnische angesehen. Dies ist auch an der im Tagesverlauf fluktuierenden Anzahl an aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf mobilisierten HSZ zu sehen, da diese Anzahl SDF-1-abhängig durch das sympathische Nervensystem in einer zirkadianen Rhythmik reguliert wird (Katayama et al., 2006; Méndez-Ferrer et al., 2008; Golan et al., 2018). Perivaskuläre Stromazellen, vor allem die um Sinusoide gelegenen, produzieren große Mengen SDF-1, weshalb sie auch als *CXCL12-abundant reticular* (CAR)-Zellen bezeichnet werden (Sugiyama et al., 2006). Auch perivaskuläre Stromazellen um Arteriolen stellen eine wesentliche Menge SDF-1 her (Ding und Morrison, 2013; Asada et al., 2017). Endothelzellen und Osteoblasten exprimieren ebenfalls SDF-1, jedoch ungefähr 100- und 1.000-fach weniger in Relation zu perivaskulären Stromazellen (Ding und Morrison, 2013; Crane et al., 2017).

Die biologische Aktivität von SDF-1 wird durch Bindung an den G-Protein gekoppelten

Rezeptor *CXC-chemokine receptor* 4 (CXCR4), auch als CD184 bezeichnet, vermittelt (Zou et al., 1998; Nagasawa, 2000; Foudi et al., 2006; Nagasawa, 2014). HSZ exprimieren CXCR4 und die aktivierte CXCR4/SDF-1-Achse fördert das Überleben und Besiedeln der Nische von transplantierten HSZ (Peled et al., 1999b; Broxmeyer et al., 2003; Wu et al., 2012; Lai et al., 2014) und unterstützt deren Quieszenz (Nie et al., 2008; Tzeng et al., 2011; Zhang et al., 2016). CXCR4 wird neben HSZ auch von rund 23% der perivaskulären mesenchymalen Stromazellen und 21% der Endothelzellen gebildet (Singh et al., 2020). Da diese Zellen selbst SDF-1 produzieren, kann gebildetes SDF-1 auf die $CXCR4^+$ Zellen zurückwirken. Dabei begünstigt diese intrinsische CXCR4/SDF-1-Achse das Überleben von Stromazellen durch Hochregulieren der Expression von Survivin (Singh et al., 2020), einem anti-apoptotischen Protein, das das Überleben mesenchymaler Stromazellen nach Strahlungsexposition im Knochenmark wesentlich verstärkt (Singh et al., 2018). CXCR4-exprimierende Endothelzellen sind in der Lage, eine Transzytose von SDF-1/CXCR4-Komplexen durchzuführen, sodass funktionales SDF-1 aus dem Blut in die Knochenmarksnische transferiert und dort konzentriert wird (Dar et al., 2005).

Thrombopoetin: Die Bildung des Wachstumsfaktors Thrombopoetin (TPO) wurde ursprünglich Osteoblasten zugeschrieben (Yoshihara et al., 2007). Tatsächlich entstammt das im Knochenmark zirkulierende TPO vorrangig aus dem Leberparenchym (Decker et al., 2018; Gao et al., 2021). Darüber hinaus wird TPO auch von verschiedenen hämatopoetischen Progenitoren gebildet (Majka et al., 2001). TPO wird über seinen Rezeptor, das Myeloproliferative-Leukämie-Protein (MPL; CD110), gebunden und ist neben HSZ-Erhalt (Qian et al., 2007; Yoshihara et al., 2007) für die Megakaryozyten-Differenzierung essenziell (de Sauvage et al., 1994; Kaushansky et al., 1994). In einer Xenograft-Studie mit Mäusen und transplantierten humanen HSZ unter Gabe von rekombinantem humanem TPO stellte sich heraus, dass TPO das *Homing* der HSZ ins Knochenmark verstärken konnte, indem die Expression und Sekretion von Matrix-Metalloproteinase-9 im Knochenmark gedrosselt wird, was den reduzierten proteolytischen Abbau von *stromal cell-derived factor*-1 alpha (SDF-1α) zur Folge hatte (Liu et al., 2020). Der begünstigende Besiedlungseffekt konnte auch in klinischen Studien bei Patient:innen, die am Tag der HSZ-Transplantation eine Einzeldosis TPO appliziert bekamen, beobachtet werden (Liu et al., 2020).

Zell-Matrix-Interaktion Die Zellen der Knochenmarksnische sezernieren extrazelluläre Matrix (EZM). Die EZM umfasst alle Makromoleküle, die im Extrazellularraum zwischen den Zellen immobilisiert werden (Lüllmann-Rauch, 2003). Sie besteht neben freien Glykosaminoglykanen überwiegend aus großen unlöslichen Proteinen, die in Säugern ungefähr 300 Proteine umfassen, die als „Kern-Matrisom" zusammengefasst werden (Hynes und Naba, 2012). Diese lassen sich in Glykoproteine, Kollagene und Proteoglykane einteilen (Naba et al., 2016; Lee-Thedieck et al., 2021). Daneben gibt es zahlreiche Matrisom-assoziierte Proteine,

z. B. EZM-modifizierende Enzyme oder EZM-bindende Wachstumsfaktoren, die vorwiegend löslicher Natur sind und substantiell zur EZM-Funktion beisteuern (Hynes und Naba, 2012). Matrisomproteine und Matrisom-assoziierte Proteine wirken zusammen am Umbau der EZM mit und binden Zellen über deren Rezeptoren. Die EZM ist daher nicht nur ein strukturgebendes Element, sondern beeinflusst auch Überleben, Proliferation, Differenzierung, Form, Polarität und Motilität der Zellen (Hynes und Naba, 2012).

In einer Studie aus 2017 wurden für das gesunde humane Knochenmark 30 Kern-Matrisom-Proteine und 32 Matrisom-assoziierte Proteine identifiziert (Glavey et al., 2017). Unter den Kern-Matrisom-Proteinen waren vorallem verschiedenste Kollagene (Typ I-VII, X, XI, XVI, XVII, XXVII), desweiteren Glykoproteine wie bspw. Fibrinogen (α, β, γ), Fibronektin, Hemicentin-1, Thrombospondin-1, und Proteoglykane wie *Bone marrow proteoglycan* (Proteoglykan 2) und Proteoglykan 3 zu finden. Im Vergleich zur EZM von Patient:innen mit Multiplem Myelom, einer bösartigen Entartung der Plasmazellen, fiel insbesondere der Verlust von 14 der 20 verschiedenen Kollagene sowie der Verlust von Fibronektin auf (Glavey et al., 2017). Diese und zahlreiche weitere Studien implizieren, dass die EZM-Remodellierung zu einer tumorbegünstigenden Mikroumgebung mitwirken kann (siehe dazu Sidhu et al., 2021).

Die lokale Zelldichte und -komposition prägt die Zusammensetzung der von den Zellen gebildeten Knochenmark-EZM. Daher ist die lokale Verteilung der EZM-Proteine mit der Bildung histologischer Strukturen durch Nischenzellen verknüpft. So sind z. B. Endothelzellen Teil arterieller und venöser Blutgefäße, bilden Kollagen IV und Laminin als Strukturelemente der Basalmembran (Nilsson et al., 1998; Coutu et al., 2017). Osteoblasten sind Teil der inneren Knochenhaut, des Endosts. Diese Zellen bilden bereits Kollagen Typ I (Coutu et al., 2017), den Hauptbestandteil organischer Knochenmatrix. Fibronektin wird von verschiedensten Nischenzellen wie Endothelzellen, Stromazellen und Osteoblasten gebildet (Wirth et al., 2020) und findet sich folglich im gesamten Knochenmark (Coutu et al., 2017).

Neben den Glykoproteinen und Kollagenen sind Proteoglykane eine wichtige struktur- und funktionsgebende Komponente der Knochenmarks-EZM. Alle Proteoglykane sind gekennzeichnet durch kovalent mit einem Kernprotein verküpfte Glykosaminoglykan-Seitenketten. Glykosaminoglykane sind lange, unverzweigte Polysaccharidketten, aufgebaut aus repetitiven Disaccharideinheiten (Aminozucker und Uronsäure). Durch die Uronsäuren und oft sulfatierten Aminozucker sind sie stark negativ geladen, binden daher Kationen und ziehen so osmotisch Wasser an. Der polyanionische Charakter ist auch Grund für die Bindung von zahlreichen löslichen Proteinen, um diese zu immobilisieren, oligomerisieren, deren Bindung zu einem Rezeptor oder deren Enzymaktivität zu regulieren und vor Proteolyse zu schützen (Esko et al., 2015).

Heparansulfat ist ein bedeutendes Glykosaminoglykan der Knochemark-EZM. Im Knochen ist bspw. das Heparansulfat-Proteoglykan Perlecan in der Knochenmatrix und in der arterio-

laren Basalmembran zu finden (Coutu et al., 2017). Heparansulfate kommen auch zelloberflächengebunden an Transmembranproteinen wie Syndekanen und Glykosylphosphatidylinositol-verankerten Glypikanen vor (Elgundi et al., 2019). Heparansulfate als Element der Knochenmarksnische wirkt regulatorisch in der Retention von HSZ und so auf deren Homöostase (Roberts et al., 1988; Gupta et al., 1996; Di Giacomo et al., 2012; Saez et al., 2014; Papy-Garcia und Albanese, 2017). Von Heparansulfat gebundenes SDF-1 und die Bildung eines stabilen haptotaktischen SDF-1-Gradienten stimuliert die SDF-1-induzierte Migration von hämatopoetischen Zellen beim *Homing*, was die Zellen zum lokalen Verweilen und Besiedeln der Knochenmarksnische veranlasst (Netelenbos et al., 2003; Dar et al., 2006).

Da **Fibronektin** ein ubiquitäres EZM-Protein im Knochenmark ist und in der vorliegenden Arbeit eine aus Fibronektin abgeleitete HSZ-bindende Aminosäuresequenz verwendet wurde, werden im Folgenden die diversen Interaktionen zwischen HSZ und Fibronektin genauer vorgestellt. Fibronektin ist ein Dimer und fungiert für Zellen als Adhäsionsmolekül. Bis dato ist die Expression von folgenden Fibronektin-Rezeptoren auf HSZ bekannt: die Integrinrezeptoren $\alpha_5\beta_1$ (Wierenga et al., 2006), $\alpha_4\beta_1$ (Williams et al., 1991; Yokota et al., 1998; Arroyo et al., 1999), $\alpha_4\beta_7$ (Bungartz et al., 2006), $\alpha_9\beta_1$ (Grassinger et al., 2009; Schreiber et al., 2009), $\alpha_v\beta_3$ (Umemoto et al., 2012), außerdem CD44 (Cao et al., 2016) und Toll-*like* Rezeptor-4 (Nagai et al., 2006; Esplin et al., 2011).

Der klassische Fibronektin-Rezeptor ist das Integrin $\alpha_5\beta_1$, dessen Bindungsmotiv die Aminosäuresequenz RGD (Arginin-Glycin-Aspartat) ist (Leiss et al., 2008). Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet ebenfalls die RGD-Sequenz (Pfaff et al., 1994). Das Bindungsvermögen beider RGD-Rezeptoren kann über das Fibronektinmolekül selbst moduliert werden. Die alternativen Spleißdomänen Extra-Domäne A und Extra-Domäne B sind charakteristisch für Gewebefibronektin, und fehlen meist in Blut zirkulierendem Plasma-Fibronektin, das von Hepatozyten der Leber gebildet wird (Pankov und Yamada, 2002). Die Präsenz der Extra-Domäne A vergrößert die Bindungspotenz des $\alpha_5\beta_1$ (Manabe et al., 1997; Rossnagl et al., 2016), während die Extra-Domäne B die Bindung über $\alpha_v\beta_3$ verstärkt (Adair et al., 2005; Kraft et al., 2016). Auch N-terminal weist Fibronektin eine für $\alpha_v\beta_3$ modifizierbare hochaffine Bindungsstelle auf (Curnis et al., 2006). Die Extra-Domäne A vermittelt außerdem die Bindung für einen weiteren Integrinrezeptor, $\alpha_9\beta_1$ (Liao et al., 2002; Shinde et al., 2008).

Eine dritte alternative Spleißdomäne in Fibronektin ist die sogenannte variable (V)-Region oder auch Typ III *connecting segment* (IIICS)-Region. Diese assoziiert mit den Integrinen $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$, die beide die minimale Bindungssequenz LDV (Leucin-Aspartat-Valin) und REDV (Arginin-Glutamat-Aspartat-Valin) erkennen; LDV ist Teil des *connecting segment* 1 (CS1), REDV ist Teil des *connecting segment* 5 (CS5) innerhalb der V-Region (Guan und Hynes, 1990; Komoriya et al., 1991; Wayner und Kovach, 1992; Mould et al., 1991). In allen Fibronektin-Isoformen kommen für beide α_4-Integrine weitere Bindungsequenzen

vor: IDA (Isoleucin-Aspartat-Alanin) im Segment H1 (Humphries et al., 1995) und die KLDAPT-Sequenz im Segment H2 (Moyano et al., 1997). CS1 besitzt ca. 20-fach höhere Bindungsaffinität für die α_4-Integrine als CS5 und H1 (Mould et al., 1994). Für $\alpha_4\beta_7$ ist neben den Bindungsmotiven in Fibronektin das *mucosal addressin cell adhesion molecule* (MAdCAM)-1 der bevorzugte Ligand, der besonders auf Leukozyten exprimiert wird (Berlin et al., 1993; Hamann et al., 1994; Erle et al., 1994; Li et al., 2018b).

Obwohl CD44 der primäre Rezeptor für Hyaluronan, ein nicht kovalent an Protein gebundenes Glykosaminoglykan, ist, können auch hämatopoetische Isoformen des CD44 die Bindung zu Fibronektin vermitteln. Dabei verändern Glykosylierungen die Ligandenspezifität (Sackstein, 2011), sodass bspw. die Chondroitinsulfat-Modifizierung u. a. die Bindung zu Fibronektin vermittelt (Jalkanen und Jalkanen, 1992). Schließlich kann an die Extra-Domäne A oder die Typ III-1 Domäne des Fibronektins auch den Toll-*like* Rezeptor-4 binden und dadurch aktivieren (Okamura et al., 2001; You et al., 2010; Malara et al., 2019).

Über das oben beschriebene Rezeptor-Repertoire können HSZ mit Fibronektin interagieren. Dabei erhält Fibronektin für HSZ *in vitro* die Fähigkeit zur Migration, zum *Homing* und zur Besiedlung des Knochenmarks (Sagar et al., 2006). Außerdem dient Fibronektin für HSZ *in vitro* der Anheftung an Substratoberflächen (Cancelas, 2011), was auf eine Rolle bei der Retention im Knochenmark schließen lässt. Des Weiteren stimuliert Fibronektin in der Regel die Proliferation (von Au et al., 2013). Eine Aktivierung des Integrin $\alpha_v\beta_3$ unterdrückt jedoch die Proliferation (Umemoto et al., 2012; Khurana et al., 2016). Schließlich fördert Fibronektin bei der Differenzierung die Myelopoese und trägt zur pathologischen Thrombopoese bei Myelofibrose bei (Wirth et al., 2020).

1.1.2.2. Die Rolle von Integrinen als Adhäsionsmoleküle und Mechanorezeptoren

Wie zuvor am EZM-Protein Fibronektin dargestellt, sind Integrine bedeutende bindungsvermittelnde Rezeptormoleküle für HSZ. In der Nische gehen HSZ zu anderen Zellen oder zur EZM eine anhaftende Bindung, die sog. Zelladhäsion ein. Adhäsion vermittelnde Moleküle der Zellen sind Zelladhäsionsmoleküle, *cell adhesion molecules* (CAMs). Es gibt vier unterscheidbare Klassen von CAMs: Cadherine, Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie, Integrine und Selektine (Abb. 1.7). Während Cadherine und CAMs der Ig-Superfamilie bevorzugt homophile Interaktionen mit Bindungspartnern eingehen, interagieren Integrine und Selektine heterophil mit ihren Liganden. Ein physiologischer Prozess, bei dem das ganze Repertoire von Adhäsionsmolekülen ausgeschöpft wird, ist z. B. die Extravasation von hämatopoetischen Zellen, vor allem der Leukozyten, die durch Adhäsion an der aktivierten Endothelschicht aus der Blutzirkulation über transendotheliale Migration zu Entzündungsherden gelangen. In der Sequenz von Intialkontakt und Selektin-vermitteltem Rollen entlang des Endothels, folgt ein Leukozyten-Arrest. Dieser wird durch Chemokine induziert und ist gekennzeichnet durch eine

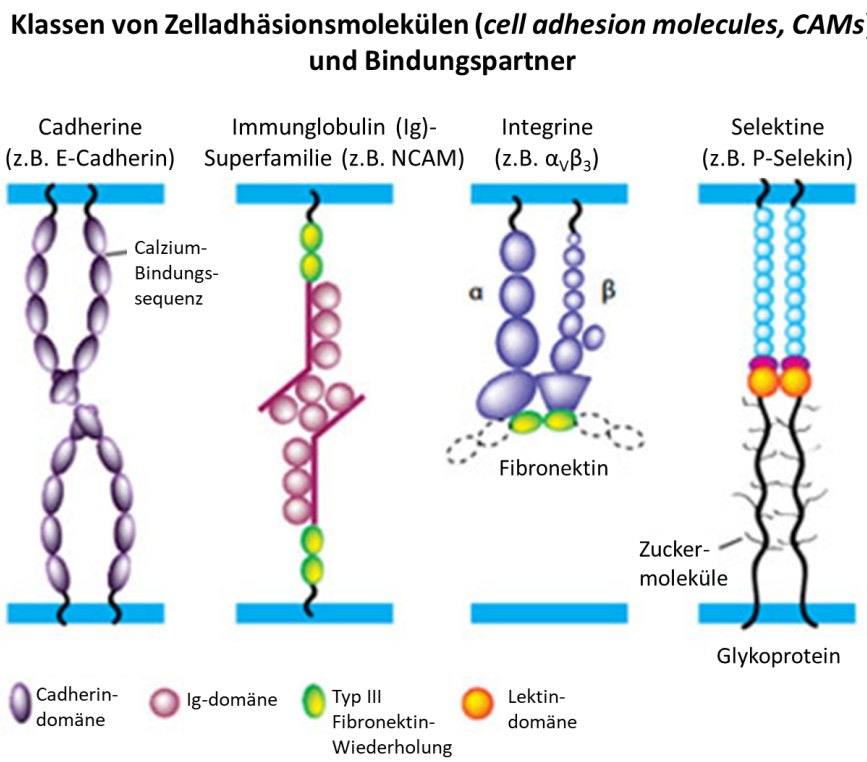


Abbildung 1.7.: Die Einteilung von CAMs. Cadherine, Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie, Integrine und Selektine. Cadherine und CAMs der Ig-Superfamilie gehen bevorzugt homophile Interaktionen mit Bindungspartnern ein, Integrine und Selektine interagieren mit heterophilen Liganden. Abbildung basierend auf Lodish (2008).

stabile adhäsive Bindung von Intergrinen zu CAMs der Ig-Superfamilie auf Endothelzellen (Rose et al., 2007; Alon und Feigelson, 2012). Schließlich erfolgt ein Kriechen mit anschließender trans- oder parazellulärer Diapedese, wobei letztere die Öffnung der Adhärenskontakte durch Reduzieren der homophilen Trans-Interaktionen des vaskulär-endothelialen Cadherins zwischen benachbarten Endothelzellen erfordert (Vestweber, 2015).

Multidomänen-Proteine der EZM besitzen mehrere adhäsive Regionen, die vor allem Liganden für zahlreiche Integrine darstellen wie am Beispiel von Fibronektin in 1.1.2.1 „Zell-Matrix-Interaktion" beschrieben wurde. Integrine sind obligate Heterodimere, nichtkovalent zusammengesetzt aus einer α- und einer β-Untereinheit. Kombinationen aus 18 verschiedenen α- und 8 verschiedenen β-Ketten ergeben bislang 24 bekannte Integrine in Säugern (Humphries et al., 2006; Takada et al., 2007), wovon 14 auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden (Hoffman et al., 2018, Tabelle 12.1). Die α- und β-Untereinheiten sind *single-pass* Transmembranproteine vom Typ I. Wie in Abb. 1.8 zu sehen besitzt jede Untereinheit eine lange extrazelluläre Domäne (N-terminale Ektodomäne), eine einzelne Transmembran-Helix und eine meistens kurze zytoplasmatische Domäne (C-terminale Schwanzdomäne) (Springer und Wang, 2004; Arnaout et al., 2005; Anthis und Campbell, 2011). Die Bindung divalenter

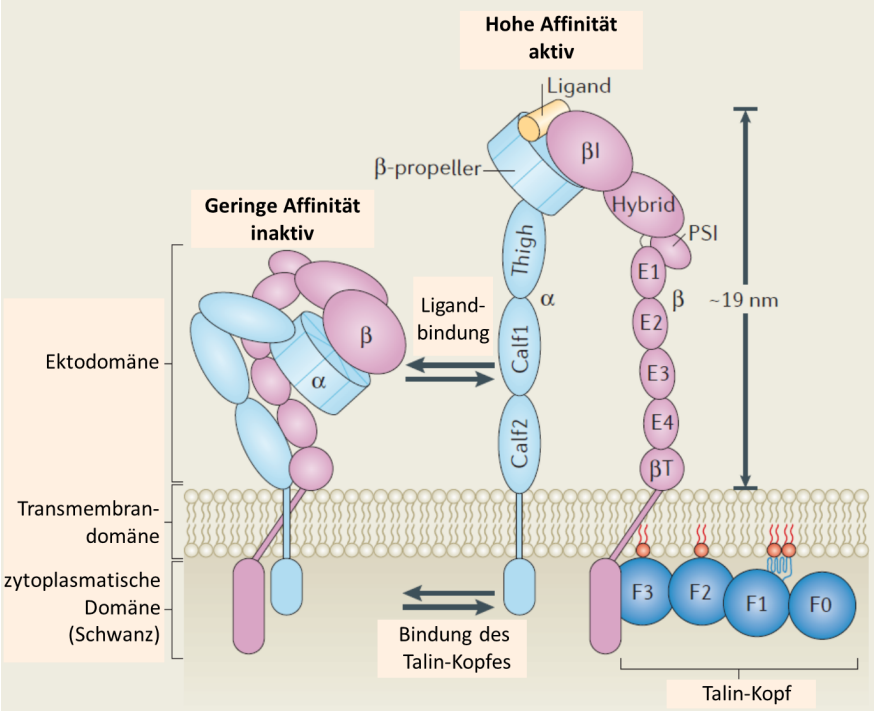


Abbildung 1.8.: Konformationsänderung des Integrinrezeptors. Vereinfachtes Modell der Interkonversion zwischen inaktivem und aktivem Zustand. Die Regulation ist grundsätzlich allosterisch, wobei der finale Schritt das Binden von Talin (und/oder Kindlin) an der zytoplasmatischen Domäne der β-Untereinheit des Integrins beinhaltet, was eine Separation der zytoplasmatischen Domänen von α und β-Untereinheit bewirkt, die sich auf die extrazelluläre Domäne überträgt. Daraus resultiert eine Konversion vom niedrig- zum hochaffinen Zustand, der „offen" für die Bindung von Liganden ist. Das Integrin in angewinkelter Form repräsentiert den inaktiven Zustand, in gestreckter Form den aktiven Zustand. Daher stellt die Integrinaktivierung zugleich eine Verlagerung der Ligandenbindungsdomäne um 15–20 nm von der Zellmembran dar. Abbildung basierend auf Calderwood et al. (2013) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Kationen wie Ca^{2+}, Mg^{2+} oder Mn^{2+} sind wichtig für die Heterodimerstabilität, modulieren aber auch die Ligandenbindung (Luo et al., 2007; Eng et al., 2011; Zhang und Chen, 2012). Im Allgemeinen bestimmt die α-Untereinheit die Ligandenspezifität, während die β-Untereinheit über Adapterproteine das Aktinzytoskelett bindet (Vicente-Manzanares et al., 2009).

Die Besonderheit von Integrinen ist ihr Vermögen rasch und reversibel ihre adhäsive Funktion über die Modulation der Ligandenbindungsaffinität zu ändern. Ihre Konformation befindet sich in einem Äquilibrium zwischen einem inaktiven geschlossenen, d. h. angewinkelten niedrigaffinen Zustand und einem aktiven offenen, d. h. gestreckten hochaffinen Zustand (Abb. 1.8). Letzterer ist neben der Streckung der Ektodomänen auch durch ein Auseinanderschwingen der transmembranären und zytoplasmatischen Domänen von α und β-Untereinheit bedingt. Die Ligandenbindungsdomäne der Integrine ist in angewinkelter Konformation <5 nm von der Membran (Nishida et al., 2006) entfernt, in gestreckter Konformation ist sie etwa 15–20 nm von der Zellmembran ausgelenkt (Takagi et al., 2002; Nishida et al., 2006; Ye et al., 2010). Integrine sind einmal durch extrazelluläre Liganden, die an der Ektodomäne binden, aktivierbar - die sog.

„*outside-in*"-Aktivierung (Anthis und Campbell, 2011). Desweiteren sind sie auch intrazellulär durch Talin, ein mechanosensitives Adapterprotein, aktivierbar, das u. a. die Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellt (Goult et al., 2018) und dessen Kopfdomäne am zytoplasmatischen β-Integrinschwanz und an saure Membranphospholipide bindet (Abb. 1.8 rechts unten) - die sog. „*inside-out*"-Aktivierung (Tadokoro et al., 2003; Ye et al., 2011; Anthis und Campbell, 2011; Calderwood et al., 2013; Chinthalapudi et al., 2018).

Somit erlauben Integrine eine bidirektionale Transmission von Kräften über die Plasmamembran. Die kraftinduzierte Deformation und damit einhergehende Konformationsänderung (Chen et al., 2017; Driscoll et al., 2021) weist Integrine als Rezeptoren für Mechanotransduktion aus. Die Integrin-Ligand-Bindung folgt einem *catch bond*-Verhalten (Kong et al., 2009), präziser gesagt einem *catch-slip bond*-Verhalten (Rakshit und Sivasankar, 2014): Liegt die Kraft, die auf das ligandenbindende Integrin ausgeübt wird, unterhalb der optimalen Bindungskraft so erhöht sich mit zunehmend wirkender Kraft die Bindungsstärke und -beständigkeit („*catch*"), während Kräfte oberhalb der optimalen Bindungskraft die Bindung zunehmend schwächen („*slip*") (Kechagia et al., 2019). Ein Schwellenwert an benötigter Kraft ist außerdem nötig, um intrazellulär das an der β-Untereinheit des Integrins gebundene Talin zu entfalten (Elosegui-Artola et al., 2016). Dadurch werden entlang der Talin-Stabdomäne Bindungsstellen für die Interaktion mit Vinculin und Aktin freigelegt (Calderwood et al., 2013). Aktinfilamente, die aus polymerisierten Aktinmonomeren entstanden, bilden das Rückgrat des Aktinzytoskeletts. Aktinpolymerisation findet vorrangig im Bereich der Plasmamembran statt (Lin und Forscher, 1995; Carlsson, 2018; Schaks et al., 2019). Aktinfilamente im Zusammenspiel mit nichtmuskulären Myosinen der Klasse II vermitteln Kontraktilität, die die Ursache des kontinuierlichen Aktinflusses von der Zellperipherie zum Zellinneren, dem retrograden Aktinfluss, ist. Diese Kontraktilität kann durch Kopplung mit der Zellmembran auch auf das Zelläußere übertragen werden. Die dabei vermittelnde Verbindungskette besteht aus EZM–Integrin–Adapterprotein–Aktin(zytoskelett) bzw. zellulärer Ligand–Integrin–Adapterprotein–Aktin(zytoskelett) und wird als „molekulare Kupplung" (*molecular clutch*) bezeichnet. Wenn diese Kupplung greift, dann wird die durch Aktinpolymerisation nahe der Zellmembran und Aktomyosin-Kontraktilität generierte Kraft über die Integrine physikalisch zur EZM übertragen, was zu reduziertem retrogradem Aktinfluss sowie Traktionskraft auf die EZM führt (Case und Waterman, 2015; Elosegui-Artola et al., 2018). Auf diese Weise kann netto eine Membranprotrusion und bei motilen Zellen eine polarisierte Migrationsfront ausgebildet werden.

Die molekulare Kupplung ist funktionaler Teil von Adhäsionskomplexen. Diese Komplexe sind dynamische Multiproteinstrukturen, die in Größe variieren: von früh naszierenden Adhäsionen ($<$250 nm) über Fokalkomplexe ($\approx$500 nm) zu reifen Fokaladhäsionen (1–5 µm) bis hin zu fibrillären Adhäsionen ($>$5 µm, Gardel et al., 2010). Dabei spielt die *inside-out*-Aktivierung von Integrinen eine große Rolle. Ein *inside-out*-Effektormolekül ist Kindlin, speziell Kindlin-3

in hämatopoetischen Zellen (Ruppert et al., 2015; Klapproth et al., 2019; Wen et al., 2021), das ebenfalls an die zytoplasmatische Domäne der β-Untereinheit bindet, das Integrin aktiviert und als Adapterprotein weitere Proteine wie Integrin-*linked* Kinase, den Aktinpolymerisationkeim Arp2/3-Komplex oder Paxillin rekrutiert (Fukuda et al., 2014; Theodosiou et al., 2016; Böttcher et al., 2017). Dieser Multiproteinkomplex rekrutiert und aktiviert weitere Schlüsselproteine für eine fokale Adhäsion wie *focal adhesion kinase* oder die Rho Guanosintriphosphatase (GTPase) Rac1, die die Zelladhäsion durch die Regulation der Aktindynamik stabilisieren (Sun et al., 2019). Daneben ermöglicht ein konstantes Recycling von Integrinen der Zellmembran über Endo- und Exozytose eine intrazellulär-gesteuerte Relokalisation von Integrinen in der Zellmembran, was zur Formierung neuer Adhäsionskomplexe im Rahmen der Zellmigration unerlässlich ist (Paul et al., 2015b; Moreno-Layseca et al., 2019).

Bei der zeitlich- wie größenabhängigen Ausbildung von Adhäsionskomplexen ist es erforderlich, dass Integrine lokal in der Plasmamembran konzentriert sind. Durch die fluide Natur der Zellmembran können sich Integrine relativ zueinander bewegen und diese laterale Diffusion, die auch innerhalb von Fokaladhäsionen auftritt (Rossier et al., 2012), ist essentiell für die Ausbildung von Integrin-angereicherten „Nanoinseln", sog. Clustern, in der Plasmamembran. Der Durchmesser eines Integrinmoleküls in der Zellmembran liegt zwischen 8–12 nm (Erb et al., 1997; Xiong et al., 2001, 2002). Fibroblasten-Zelllinien konnten auf Zellkulturoberflächen, die zyklisches RGD-Peptid, *cyclic*RGD (cRGD) auf Goldnanopartikeln (Durchmesser <8 nm) in definierten Abständen zueinander präsentierten, unter Fokaladhäsionsbildung nur bis zu einem Partikelabstand von ≤58 nm anheften und spreiten. Abstände ≥73 nm reduzierten drastisch diese Zellantwort (Arnold et al., 2004; Cavalcanti-Adam et al., 2006). Ein limitierender Abstand von 58–73 nm (<70 nm in Abb. 1.9) wurde daher für das Integrinclustern postuliert.

Mithilfe von Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie und aktivierten β_3-Integrinen in Fibroblasten-Zelllinien auf RGD-Oberflächen wurde beobachtet, dass Integrincluster auf ca. 100 nm Größe limitiert sind und jedes Cluster durchschnittlich 50 Integrine beinhaltet (Changede et al., 2015, siehe Abb. 1.9). Eine Verringerung der RGD-Ligandendichte verursachte zwar zugleich eine Dichteerniedrigung früher Adhäsionskomplexe, die Größe und Anzahl von Molekülen pro Cluster blieb dagegen konstant (Changede et al., 2015). Diese Größenangaben der Integrincluster beziehen sich wohlgemerkt auf Studien mit obligat adhärenten Zelllinien. Welche Grenzen für semi-adhärente Zellen wie HSPZ gelten, ist bisher noch nicht umfassend beschrieben worden. Angenommen wurde zusätzlich, dass das Integrinclustern mit der Aktivierung von Integrinen korreliert (Kim et al., 2004; Cluzel et al., 2005). Doch auch Cluster von inaktiven β_1-Integrinen, isoliert von Clustern aktiver β_1-Integrine innerhalb von Fokaladhäsionen konnten inzwischen beobachtet werden (Spiess et al., 2018). Dies lässt eine kollektive Regulation der Aktivität von Integrinen innerhalb eines Clusters vermuten. Die Konzentrierung individueller Integrine zu Clustern stellt eine Modulation der Integrin-Avidität zur Steigerung der Gesamtbindungsstärke dar (Stewart und Hogg, 1996; Arnaout et al., 2005).

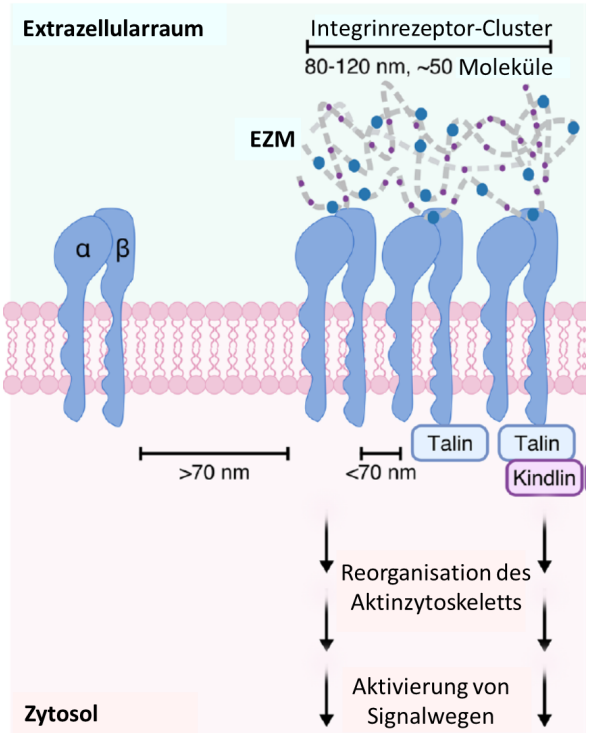


Abbildung 1.9.: Clustern von Integrinrezeptoren. Ein Integrin setzt sich aus α- und β-Untereinheit zusammen. Ein Cluster von Integrinen tritt auf, wenn Integrine näher als 70 nm zueinander angeordnet sind. Die Clustergröße ist stark kontrolliert, konserviert mit 80–120 nm Durchmesser und enthält ca. 50 Integrinmoleküle. Durch Bindung der Integrine an intrazelluläre Adapterproteine wie Talin und Kindlin werden die Cluster stabilisiert. Diese Adapterproteine verbinden zum Aktinzytoskelett, sodass eine Kraftübertragung zwischen EZM und Zellinnerem über die Integrine stattfinden und zu einem migratorischen Zellverhalten führen kann. Abbildung basierend auf Maynard et al. (2021), frei verfügbar unter einer *Creative Commons CC BY*-Lizenz.

Die Bildung von Integrinclustern kann auch durch eine mächtige Glykokalix erleichtert werden (Paszek et al., 2009, 2014). Da sich die Glykokalix mehrere 10 bis mehrere 100 Nanometer (Möckl, 2020) in den Extrazellularraum hineinstreckt, überragt sie die gestreckte Länge von 20 nm eines typischen Integrins (Eng et al., 2011, sowie Abb. 1.8). Um die sterische Barriere der Glykokalix bei der Integrin-Ligand-Bindung zu überwinden, muss sich die Membran lokal nach außen krümmen, was in einer höheren kinetischen Integrin-Ligand-Bindungsrate („kinetische Falle") mündet. Die Membrandeformation übt eine Zugspannung auf die ligandenbindenden Integrine (unabhängig von Aktomyosin-Kontraktilität) aus und induziert deren Konformationsänderung (Paszek et al., 2014). So werden aktive Integrine zu bereits bestehenden Adhäsionskomplexen geleitet und tragen zur Adhäsionsreifung bei.

Das Clustern hat hinsichtlich der Kräfteverteilung entlang der Plasmamembran den energetisch vorteilhaften Effekt, dass im Gegensatz zu „weit" voneinander isoliert liegenden Integrinen die Kraftbelastung (*force load*) pro einzelnes Integrin im Cluster reduziert wird. Die Spannung wird auf mehrere Integrine aufgeteilt, was letztlich das *„slip bond"*-Verhalten der Integrine unter großer Spannung verhindern kann (Oria et al., 2017). Dabei ist nicht die absolute Kraftbelastung der Integrine maßgeblich, sondern die (veränderliche) Kraftbelastung über die Zeit (Kraftladungsrate, *force loading rate*) (Elosegui-Artola et al., 2018). Ob es zur Ausbildung von Adhäsionskomplexen durch Integrincluster kommt, ist somit von der Ligandendichte, der Integrin-Ligand-Bindungsrate und - da Integrine ein Element der molekularen Kupplung sind - der Kraftladungsrate an der molekularen Kupplung abhängig.

1.1.2.3. Die Verknüpfung von Zytokin- und Integrinsignalgebung am Beispiel von SDF-1 und Integrin $\alpha_4\beta_1$

Wie in Abschnitt 1.1.2.1 erwähnt, bietet die Knochenmark-EZM den HSPZ ein Netzwerk von Proteinen u. a. für die Integrin-vermittelte Adhäsion. Überdies immobilisiert die EZM Zytokine, die wieder freigesetzt werden können, um als lösliche Liganden zu wirken oder an die EZM gebunden verbleiben, um als „Festphasen"-Liganden zu wirken. Daher liegt es nahe, dass es einen *Crosstalk*, d. h. eine sich kreuzende Interaktion von Integrin- und Zytokinsignalweg gibt und die Aktivierung beider Signalwege einen kooperierenden biologischen Effekt hat. Tatsächlich sind für adhärente Zellen etliche Beispiele synergetischer Effekte zwischen Wachstumsfaktoren und den Integrinen $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ bisher beschrieben worden (Salmerón-Sánchez und Dalby, 2016). Für hämatopoetische Zellen und insbesondere Leukozyten ist bekannt, dass Zytokine einen adhäsionsverstärkenden Effekt über die *inside-out* Aktivierung von Integrinen ausüben (Arai et al., 2001; Shimonaka et al., 2003; Katagiri und Kinashi, 2012; Su et al., 2015; Lagarrigue et al., 2016; Patsoukis et al., 2017; Bromberger et al., 2021). Nachfolgend wird nur der *Crosstalk* von aktiviertem SDF-1-Rezeptor und Integrin $\alpha_4\beta_1$ im Detail beschrieben, da deren Liganden eine essentielle Rolle in dieser Arbeit spielen.

SDF-1 ist der einzige Chemokinligand für CXCR4, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor. Sowohl die monomere als auch die dimere Form von SDF-1 kann CXCR4 aktivieren, wobei CXCR4 ebenfalls Homodimerisierung unterlaufen kann (Toth et al., 2004). Bisher ist noch nicht hinreichend geklärt, ob und in welchem Maße die monomere und die dimere Form bestimmte intrazelluläre Signalwege (Abb. 1.10) wie die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion oder den β-Arrestin-Signalweg bevorzugt stimulieren (Drury et al., 2011; Ray et al., 2012). Dabei kann der β-Arrestin-Signalweg zusätzlich über einen alternativen SDF-1-Rezeptor, *atypical chemokine receptor 3* (ACKR3), auch CXCR7 genannt, durch SDF-1-Monomer-Bindung aktiviert werden (Ray et al., 2012, und Abb. 1.10). Die aktivierte SDF-1/CXCR4-Achse konvergiert auf intrazellulärer Ebene mit der Integrinsignalgebung (Abb. 1.10). Effektormoleküle, die beide Signalwege integrieren, stellen z. B. die Rac GTPasen dar. Williams et al. (2008) konnten zeigen, dass Rac Proteine durch SDF-1 in HSPZ aktiviert wurden und Rac-defiziente HSPZ nicht auf SDF-1 ansprechen.

In der physiologischen Nische vermittelt das Integrin $\alpha_4\beta_1$ in HSPZ die Adhäsion über die Interaktion mit dem zellulären Liganden VCAM-1 (Elices et al., 1990; Simmons et al., 1992; Zhang et al., 2004; Klemke et al., 2007), den extrazellulären Liganden Fibronektin (Guan und Hynes, 1990; Wayner und Kovach, 1992; Chan und Aruffo, 1993) und Osteopontin (Barry et al., 2000; Grassinger et al., 2009; Lund et al., 2013; Hui et al., 2015). Das Integrin $\alpha_4\beta_1$ ist für hämatopoetische Zellen in der Interaktion mit VCAM-1 ein wichtiges Molekül für die koordinierte Regulation von Eintritt und Rückhalt in sowie Austritt aus dem Knochenmark (Alon et al., 1995; Craddock et al., 1997) und dient damit der Homöostase des hämatopoetischen

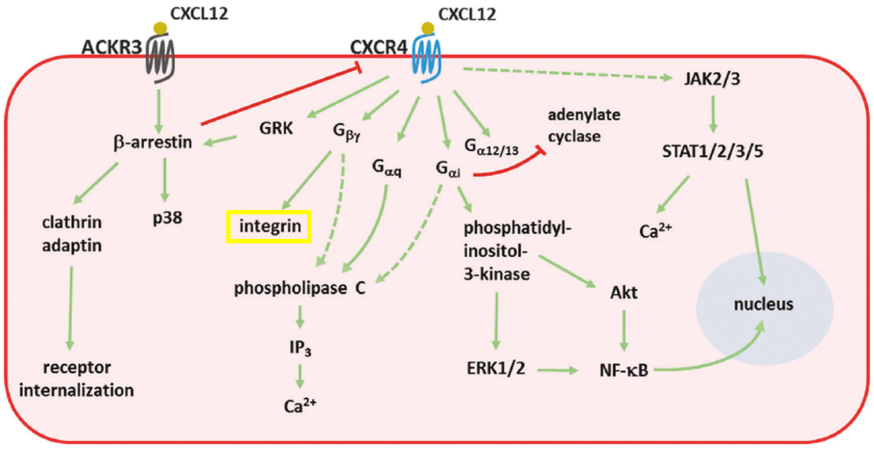


Abbildung 1.10.: Durch SDF-1 aktivierte Signalwege. Stimulierung der Rezeptoren CXCR4 und ACKR3 löst Signalkasaden aus, an denen sekundäre Botenstoffe beteiligt sind. Aktivierende intrazelluläre Signalwege sind durch grüne und inhibierende Interaktionen durch rote Verbindungslinien dargestellt. Gestrichelte Verbindungslinien repräsentieren Signalwege, die in diesem Zusammenhang hypothetisch sind. Der *Crosstalk* mit dem Integrinsignalweg ist durch das gelbe Viereck hervorgehoben. *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2); G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase (GRK); Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3); *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB); Januskinase 2/3 (JAK2/3); *signal transducer and activator of transcription* (STAT). Abbildung basierend auf Janssens et al. (2018) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Systems (Oostendorp und Dörmer, 1997; Arroyo et al., 1999; Scott et al., 2003; Imai et al., 2010). Die Integrin $\alpha_4\beta_1$-vermittelte Adhäsion nutzen auch maligne Formen hämatopoetischer Zellen, was insbesondere für Neoplasien von Myelomzellen im Knochenmark gut untersucht ist (Parmo-Cabañas et al., 2004; Martínez-Moreno et al., 2016; Redondo-Muñoz et al., 2019).

Das Chemokin SDF-1 moduliert in hämatopoetischen Zellen die $\alpha_4\beta_1$ Integrin-vermittelte Adhäsion sowohl zu Fibronektin als auch zu VCAM-1 (Hidalgo et al., 2001; Sanz-Rodríguez et al., 2001). Im Knochenmark ist SDF-1 mit VCAM-1 colokalisiert, was in *in vivo* Experimenten in Mäusen bewirkte, dass nur bei kombinierter Gabe neutralisierender Antikörper gegen CXCR4 und VCAM-1 Neutrophile ins Knochenmark freigesetzt wurden (Petty et al., 2009). Dies unterstreicht die Synergie zwischen den beiden Achsen, SDF-1/CXCR4 und VCAM-1/$\alpha_4\beta_1$. Aus dem peripheren Blut isolierte humane Mono- und Lymphozyten banden *in vitro* durch SDF-1α-Stimulation vermehrt lösliches VCAM-1 (sVCAM-1/Fc in einem Durchflusszytometer-*Assay*) (Chan et al., 2001). Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass das Chemokin SDF-1 eine verstärkende Wirkung auf die Adhäsion von $CD34^+$ HSPZ an VCAM-1 unter Scherströmungsbedingungen hat (Peled et al., 1999a). Ohne SDF-1 war überhaupt nur bei höherer VCAM-1-Substratbeschichtungsdichte eine Zellbindung möglich.

Bei VCAM-1-Substratbeschichtungsdichten, die nicht imstande waren selbst bei geringen Scherströmungsbedingungen $CD34^+$ Zellen zurückzuhalten, konnte die gleichzeitige Präsentation von immobilisiertem, nicht jedoch in Lösung befindlichem SDF-1, das sofortige Anhaften der Zellen vermitteln (Peled et al., 1999a). Bei Copräsentation von immobilisiertem SDF-1

mit VCAM-1 auf derselben Oberfläche zeigten Leukozyten ($CD3^+$ T-Lymphozyten) unter Scherströmung eine rapide Anhaftung (<0,1 s), die begleitet war vom Clustern des $\alpha_4\beta_1$ Integrins im Bereich der Leukozyten-Substrat-Kontaktzone (Grabovsky et al., 2000). Der aktivierte Chemokinsignalweg stellt so eine *inside-out* Aktivierung des Integrins über $G\alpha_i$-Protein Signalgebung dar, welcher nicht die $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Affinität, sondern -Avidität zu VCAM-1 erhöht (Grabovsky et al., 2000). Die $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Aviditätserhöhung ist verbunden mit einer schnellen Chemokin-induzierten Konzentrierung (Clustern) von G-Protein gekoppelten Chemokinrezeptoren, wie CXCR4, auf Ebene von Cholesterol-*Rafts* in der Membran von Lymphozyten (Shamri et al., 2002). Oberflächenimmobilisiertes VCAM-1 schränkt im Gegensatz zu löslichem VCAM-1 die laterale Mobilität des $\alpha_4\beta_1$ Integrins massiv ein. Ein Effekt, der durch SDF-1-Stimulation potenzierbar ist wie bei der T-Zelllinie Molt-4 gezeigt wurde (Sosa-Costa et al., 2016).

Die SDF-1/CXCR4-Signaltransduktion kann u. a. zytoplasmatische Tyrosin-Kinasen wie *zeta-associated protein 70* (ZAP-70) aktivieren, die über Tyrosin-Phosphorylierung widerum Vav1 aktivieren kann (Ticchioni et al., 2002). Vav1 ist ein GTP-Austauschfaktor (*GTP exchange factor, GEF*), vorrangig für die GTPase Rac. Es wird vermutet, dass Vav1 ein repressiver Adapter für Talin ist. Phosphorylierung aktiviert Vav1 und bewirkt Dissoziation von Talin. Freies Talin kann über die zytoplasmatische β_1-Untereinheit gebunden werden und $\alpha_4\beta_1$ Integrin effizient aktivieren (García-Bernal et al., 2009). Es wurde festgestellt, dass nach SDF-1-Stimulation nur Talin, nicht jedoch Paxillin, die rapide verstärkte Bindung von VCAM-1 unter Scherströmungsbedingungen in T-Zellen vermittelt (Manevich et al., 2007). Schließlich ist bekannt, dass das $\alpha_4\beta_1$ Integrin an Serin-988 seiner zytoplasmatischen Domäne der α_4-Kette durch Proteinkinase A phosphoryliert werden kann. Dadurch wird die Bindung des Adapterproteins Paxillin am Integrin inhibiert, wodurch in Folge die Zellpolarisation, Lamellipodienbildung und Migration ermöglicht wird (Goldfinger et al., 2003). Durch α_4 Phosphorylierung dissoziiert ein ternärer Komplex aus α_4, Paxillin und einem ADP-Ribosylierungsfaktor GTPase aktivierenden Protein (Arf-GAP), welches ungebunden inaktiv ist, sodass die GTPase Arf 6 in ihrer GTP-gebundenen aktiven Form als aktivierender Regulator der GTPase Rac wirken kann (Nishiya et al., 2005). In humanen Myelomazellen konnte gezeigt werden, dass die SDF-1-induzierte Adhäsion über $\alpha_4\beta_1$ sowohl RhoA- als auch Rac1-abhängig war (Azab et al., 2009). Schließlich wurde kürzlich ein Mechanismus postuliert, der Zellmigration in Myelom-, Melanom- und Endothel-Zellen mit Proteinkinase A-vermittelter S988-Phosphorylierung der α_4 Zytoplasmadomäne in Clustern von $\alpha_4\beta_1$ Integrinen in einem räumlich direkt miteinander agierenden Membranproteinkomplex aus CXCR4, Proteinkinase A, Adenylatzyklase 7 und *Vascular endothelial growth factor receptor-2* unter Beteiligung von Syndecan-1 erklärt (Jung et al., 2019). Darin wird beschrieben, dass nach Aktivierung von CXCR4 bspw. über SDF-1 die $G\beta\gamma$-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins freigesetzt wird, welches eine $G\beta\gamma$-abhängige Adenylatzyklase (AC7) zur Generierung von

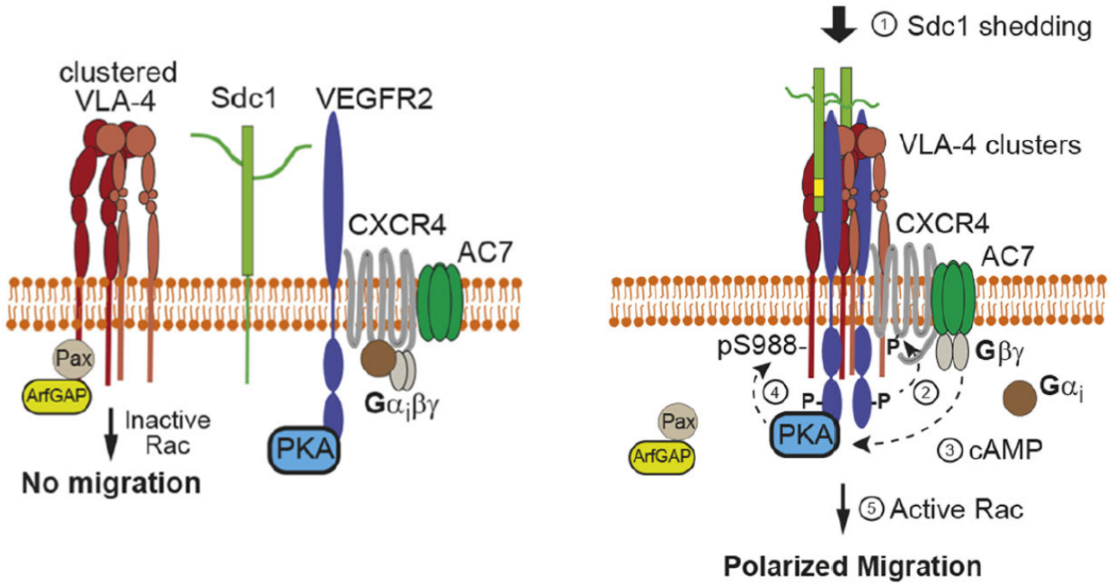


Abbildung 1.11.: Postuliertes Modell der $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Phosphorylierung in Tumor- und Immunzellmigration. *Links:* Der Komplex aus VEGFR2, CXCR4, AC7 und PKA ist inaktiv. Die α_4-Integrinuntereinheit liegt dephosphoryliert vor und rekutiert ArfGAP durch Paxillin-Bindung. Arf-GAP Aktivität reduziert die Aktivität der GTPase Rac. *Rechts:* Trimmen der Heparansulfatketten durch Heparanase des Sdc1 erleichtert das Freisetzen der Sdc1-Ektodomäne durch Matrix-Metalloproteinase-9 (1). Eine nun freigelegte Aminosäuresequenz (gelb) der abgestoßenen Sdc1-Ektodomäne assoziiert den VEGFR2-Komplex mit VLA-4 Clustern. CXCR4-Aktivierung erfolgt entweder durch Phosphorylierung über aktivierte VEGFR2-Tyrosinkinase (2) oder alternativ über Bindung des Liganden SDF-1, sodass Gα_i und G$\beta\gamma$ freigesetzt werden. G$\beta\gamma$ aktiviert AC7, die cAMP generiert (3), welches PKA aktiviert. Aktive PKA phosphoryliert die α_4-Integrinuntereinheit am Serin-988 (pS988) (4), was zur Dissoziation des Pax-ArfGAP führt. Dadurch kann lokale Rac-Aktivierung erfolgen, was zu Lamellipodienbildung und gerichteter Zellmigration führt. $\alpha_4\beta_1$ Integrin = *very late antigen-4* (VLA-4); Paxillin (Pax); ADP-Ribosylierungsfaktor GTPase aktivierenden Protein (ArfGAP); Syndecan-1 (Sdc1); *Vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR2); CXC-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4); Adenylatzyklase 7 (AC7); zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP); Proteinkinase A (PKA). Abbildung basierend auf Jung et al. (2019).

zyklischem Adenosinmonophosphat befähigt, was zur Aktivierung der Proteinkinase A und der α_4-Phosphorylierung führt (siehe Abb. 1.11).

1.1.2.4. Biophysikalische Signale in der Nische

Die molekulare Kommunikation der HSZ mit ihrer Nische ist mannigfaltig. Die bereits beschriebenen zellulären, extrazellulären sowie lösliche Faktoren in der Knochenmarksnische sind für die HSZ Stimuli, die durch ihre molekulare Struktur biochemisch definiert sind. Zusätzlich zu diesen biochemischen Signalen erfährt die HSZ in der Nische auch wichtige biophysikalische Signale, die wesentlichen Einfluss auf das HSZ-Verhalten haben. Wobei im Folgenden nur auf die Hypoxie, Elastizität und Nanostrukturierung näher eingegangen wird.

Hypoxie: In der Knochenmarksnische wirkt der Sauerstoffpartialdruck als ein biophysikalischer Faktor auf die HSZ. Trotz zahlreicher Blutgefäße ist das Knochenmark ein hypoxisches Gewebe (Spencer et al., 2014). Die Zellen sind metabolisch adaptiert, sodass quieszente HSZ der Maus eine anaerobe Glykolyse durchführen (Simsek et al., 2010; Suda et al., 2011; Takubo et al., 2013), um sich vor reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), die durch die Aktivität der Elektronentransportkette entstünden, zu schützen (Ito und Suda, 2014; Karigane und Takubo, 2017; Shyh-Chang und Ng, 2017). Die Gegenwart von übermäßigen ROS induzieren in murinen HSZ die Proliferation und Differenzierung oder Apoptose (Suda et al., 2011; Shyh-Chang und Ng, 2017). HSZ reagieren entsprechend protektiv gegen oxidativen Stress (Tothova et al., 2007; Wielockx et al., 2019; Sillar et al., 2019).

Matrixelastizität: Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung der EZM im Knochenmark sind die biomechanischen Eigenschaften lokal sehr unterschiedlich - so wurden z. B. im porcinem *Femur*-Knochenmark Elastizitätsmoduln (E-Moduln) von 0,25 bis 24,7 kPa gemessen (Jansen et al., 2015). In der *Tibia* der Maus wurde ein E-Modul von ≈0,1 kPa für das Knochenmark über Rasterkraftmikroskopie, *atomic force microscopy* (AFM) bestimmt. Demgegenüber weist die innere Knochenoberfläche eine zunehmende Steifigkeit von 2–100 kPa auf (Ivanovska et al., 2017), was auch den E-Modul von ≈27±10 kPa von Osteocalcin-reicher Osteoidmatrix, die von *in vitro* kultivierten Osteoblasten sezerniert wurde, mit einschließt (Engler et al., 2006). Die verschiedenen Festigkeiten sind biomechanische Stimuli, die HSZ über EZM-Rezeptoren als deren Ankerpunkte wahrnehmen und im Zellinneren in kontraktile Kräfte übertragen, die widerum auf die EZM und andere verbundene benachbarte Zellen rückwirken. Dabei haben die physikalischen Kräfte Einfluss auf Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzelle (Vining und Mooney, 2017). Die Effekte der Substratsteifigkeit auf die Differenzierung von HSPZ *in vitro* kann sehr generalisierend wie folgt zusammengefasst werden: „Festere" Substrate, die die endostale Region widerspiegeln sollen, begünstigen die HSZ-Selbsterneuerung und frühe Progenitoren, während „weichere" Substrate, die der perivaskulären Region gleichen sollen, fördern Proliferation und Differenzierung (Holst et al., 2010; Kumar et al., 2013; Shin et al., 2014a; Chitteti et al., 2015; Choi und Harley, 2017; Li et al., 2021a).

Nanostrukturen: Die EZM bestimmt mit ihren diversen Makromolekülen maßgeblich die strukturellen Eigenschaften der Nische. Neben der räumlichen, supramolekularen Organisation der EZM ist auch deren Struktur vom Mikrometer- bis hin zum Nanometerbereich wahrnehmbar und prägend für interagierende HSZ (Lee-Thedieck und Spatz, 2014). Dies konnte allerdings bisher nur durch *in vitro* Studien belegt werden. So haben z. B. Chua et al. (2006) gezeigt, wie aminierte Polyethersulfon-Nanofasern (mittlerer Durchmesser 529±114 nm) die Adhäsion, die Expansion und das Koloniebildungspotential von humanen $CD34^+$ HSPZ im Vergleich zu TCP und unmodifizierten, hydroxylierten oder carboxylierten Nanofasern wesentlich verstärkten. Über welche Mechanismen die HSZ solche Nanostrukturen wahrnehmen kann, ist bisher unklar geblieben. Diese biophysikalischen Signale können entweder über eine direkte Interaktion

oder aber indirekt durch an die Struktur adsorbierte Proteine und der daraus resultierenden strukturierten Präsentation an die HSZ übertragen werden. Den Einfluss nanostrukturiert präsentierter Biomoleküle auf HSPZ haben bisher nur wenige Studien im Detail untersucht. Es ist daher dringend erforderlich, das Verständnis von diesen möglichen biophysikalischen Signalen auf HSPZ über weitere Studien zu vertiefen.

1.2. Biomaterialien für die Kultur von HSPZ

Räumlich wie zeitlich konzertierte HSZ-Nischen-Interaktionen erzeugen solch eine Dynamik, die es extrem schwierig macht diese künstlich zu reproduzieren. Dennoch wurde wissenschaftlich versucht, Schlüsselfaktoren und Mechanismen zu determinieren, um das Verständnis über das Entwicklungsschicksal von HSZ zu erweitern und dieses Wissen praktisch umzusetzen. Exemplarisch dafür steht die *ex vivo* Expansion von HSPZ aus natürlichen Primärquellen - Knochenmarkaspirat, peripherem Blut und Nabelschnurblut - für den Einsatz in der Stammzelltherapie, was sich nach der ersten erfolgreich lebensrettenden Knochenmarktransplantation im Jahr 1969 im Rahmen einer klinischen Studie unter Edward Donnall Thomas (Thomas et al., 1977; Storb, 2012) zu einem sehr belebten Forschungsfeld entwickelt hat (Zonari et al., 2017; Yucel und Kocabas, 2018; Dircio-Maldonado et al., 2018; Tajer et al., 2019; Li et al., 2019; Bai et al., 2019; Wilkinson et al., 2019; Hua et al., 2019; Derakhshani et al., 2019; Ingavle et al., 2019; Papa et al., 2020; Yadav et al., 2020). Dabei rückte die Rolle von Biomaterialien für eine differenzierungsfreie Expansion von HSPZ vermehrt in den wissenschatlichen Fokus.

Biomaterialien sind nicht lebensfähige Materialien, die primär Anwendung als Implantate zur Reparatur funktionsunfähiger Gewebe und Organe in der regenerativen Medizin finden. Sie können darüber hinaus auch *in vitro* als Gerüststrukturen und Kultursubstrate für z. B. Stammzellen (Xu et al., 2019) dienen. Biomaterialien sind entweder natürliche oder synthetische Materialien oder Verbindungen aus beidem. Für die HSPZ-Kultur wurden bisher diverse Biomaterialien eingesetzt, wobei die Entwicklung und Anwendung als dreidimensionale Zellkultur mittlerweile bevorzugt wird, da diese eine realistischere Nachbildung der *in vivo* Nische ermöglicht (Bello et al., 2018; Raic et al., 2019; Ribeiro-Filho et al., 2019; Ingavle et al., 2019) und Forschungsergebnisse direkter auf *in vivo* Anwendungen übertragbar sind. Dabei werden natürliche Materialien wie bspw. Kollagen (Leisten et al., 2012), Fibrin (Ferreira et al., 2012), Gelatine (Mahadik et al., 2015; Gilchrist et al., 2019) oder dezellularisierte EZM (Lai et al., 2013) sowie synthetische Polymere wie bspw. Polycaprolacton (Ferreira et al., 2012), Poly(lactid-co-glycolid) (Ferreira et al., 2012) oder Polyethylenglykol (PEG) (Raic et al., 2014) eingesetzt.

Zellen in dreidimensionaler Zellkultur erfahren eine räumliche Begrenzung durch das umgebende Biomaterial. Dabei wird auch die Diffusion von Sauerstoff und löslichen Molekülen

begrenzt, was zur Ausbildung von Gradienten führen kann (Bao et al., 2018). Dagegen erlauben zweidimensionale biomaterialbasierte Kultursubstrate löslichen Faktoren freie Diffusion und den Zellen eine unbehinderte Ausbreitung und Migration. Dies macht zweidimensionale Kultursubstrate für Adhäsions- und Migrationsstudien interessant. Die plane Geometrie einer zweidimensionalen Kulturoberfläche ermöglicht zudem definierte Strukturen präzise zu platzieren und zu variieren, so dass die molekulare Interaktion mit Zellen systematisch studiert werden kann. Eine zweidimensionale Zellkulturplattform eignet sich daher besonders gut, um einzelne biochemische und biophysikalische Parameter isoliert und justierbar betrachten zu können. Daher liegt der Fokus in dieser Arbeit auf zweidimensionalen Kultursubstraten für HSPZ, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

1.2.1. Zweidimensionale Kultursubstrate zur Nachbildung der HSPZ-Mikroumgebung

Die Kultur von HSPZ außerhalb ihrer Nische erfolgte wie für andere Gewebe- und Zellkulturen traditionell in Gefäßen mit planer, homogener Oberfläche aus Glas oder Plastik (Carrel, 1923; Zhang et al., 2019b). Die Zweidimensionalität von *in vitro* Kulturgefäßen bildet die Basis für Oberflächenmodifizierungen mit Bestandteilen der physiologischen HSZ Nische. Dabei kann das Biomolekül als Ganzes oder als Fragment, welches mindestens ein rezeptorspezifisches Erkennungsmotiv enthält, an der Oberfläche immobilisiert werden. Die Biofunktionalisierung der Substratoberfläche erfolgt entweder über nichtkovalente Anbindung (physikalische Adsorption), kovalente Anbindung (chemische Bindungen) oder eine Kombination aus beidem und generiert eine temporär oder permanent stabile biofunktionalisierte Oberfläche (Casanova et al., 2020).

1.2.1.1. Beschichtungen von Zellkulturoberflächen mit Biomolekülen

Einfache Beschichtungen von Zellkulturplastik, *tissue culture plastic* (TCP) mit adhäsionsvermittelnden EZM-Molekülen wie Kollagen Typ I und Typ IV, Fibronektin und Laminin konnten als Kombination bereits eine gesteigerte Expansion von kultivierten humanen $CD34^+$ Zellen erzielen (Celebi et al., 2011). Auch Glykosaminoglykan-Beschichtungen wie bspw. Chondroitinsulfat B/Chitosan- und Heparin/Chitosan-Komplexe konnten die Zahl an kultivierten humanen $CD34^+$ Zellen signifikant erhöhen (Madihally et al., 1999). Beschichtungen mit zellulären Liganden wie z. B. das oberflächengebunde Notch-Ligandenkonstrukt $Delta1^{ext-IgG}$ zusammen mit dem Fibronektinfragment CH-296 erhöhte bei niedriger Ligandendichte ebenfalls die absolute Zahl von humanen $CD34^+$ Zellen (Delaney et al., 2005). Auf diese Weise expandierte HSPZ wurden sogar als funktionales Transplantat in klinischen Studien beim Menschen erfolgreich eingesetzt (Delaney et al., 2010, 2016).

Um die zufällige Orientierung des Biomoleküls und dessen Desorption, die z. B. bei physikalisch adsorbierten Biomolekül-Beschichtungen auf TCP entstehen, zu verhindern, werden definierte biofunktionalisierte Oberflächen mit ausgerichteter Orientierung und stabiler Bindung an eine Polymerschicht angewandt. Dadurch können die Zell-Biomolekül-Interaktionen detailliert charakterisiert werden. So haben z. B. Franke et al. (2007) verschiedene EZM-Moleküle (Fibronektin, Hyaluronan, Tropokollagen Typ I, Heparin) auf dünnen (≈4,5 nm; Pompe et al., 2003) Poly-(ethylen-*alt*-maleinsäureanhydrid)-Filmen kovalent angebunden. Mithilfe der Reflexion-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie wurde die Adhäsion von humanen $CD133^+$ HSPZ zu diesen EZM-Molekülen charakterisiert: keine signifikante Adhäsion zu Tropokollagen und Hyaluronan, die Selektin-vermittelte Adhäsion zu Heparin sowie die Integrin-vermittelte Adhäsion zu Fibronektin (Franke et al., 2007).

Die Vorzüge einer dünn beschichteten Zellkulturoberfläche ist die einfache Produktion und Handhabung, der leichte Zugang, um die Zellen zu beobachten, analysieren und zu ernten und letztlich die Skalierbarkeit für eine Hochdurchsatzanwendung. Allerdings sind dünne Beschichtungen auf einer festen Oberfläche wie TCP oder Glas so starr ($\text{E-Modul}_{\text{Glas}} \approx 70$ GPa; (Schneider et al., 2006), dass sie in keinster Weise die biomechanischen Eigenschaften des Knochenmarks widergespiegeln. Bei „weicheren" Materialien muss die Materialdicke größer als der Zelldurchmesser sein, damit die Zelle die starre Oberfläche unter dem weichen Substrat nicht spürt (Janmey et al., 2020). So wurde bspw. für mesenchymale Stammzellen gezeigt, dass diese auf Polyacrylamidgelen (E-Modul ≈1 kPa) ab einer Geldicke von ca. 10 µm durch Abflachung und Spreiten mechanoresponsiv auf den unterliegenden starren Glasuntergrund reagieren (Buxboim et al., 2010). Darüber hinaus konnte allein der Parameter Substratelastizität bei mesenchymalen Stammzellen, kultiviert auf Kollagen Typ I-beschichteten Polyacrylamidgelen verschiedener physiologisch relevanter Steifigkeiten (0,1–1 kPa ≈$\text{E-Modul}_{\text{Gehirn}}$; 8-17 kPa ≈$\text{E-Modul}_{\text{Muskel}}$; 25–40 kPa ≈$\text{E-Modul}_{\text{Osteoid}}$), selektiv die neurogene, myogene und osteogene Differenzierung auslösen (Engler et al., 2006). Da HSPZ ebenfalls mechanorezeptives Verhalten aufweisen (z. B. Lee-Thedieck und Spatz, 2014; Zhang et al., 2019b, und Referenzen darin), sind polymere Gele besonders geeignete Zellkultursubstrate. Zum einen können durch Anpassen der Formulierung ihre viskoelastischen Eigenschaften hinsichtlich physiologisch relevanter Substratelastizitäten erfolgen, zum anderen kann durch chemisch reaktive Gruppen eine gezielte Biofunktionalisierung der Zellkultursubstrate erreicht werden.

1.2.1.2. Hydrogele

Hydrogele sind hydrophile, dreidimensionale polymere Netzwerke, die eine erhebliche Menge Wasser binden (Ahmed, 2015) - so wie in biologischem Gewebe das Interstitium ein hochgradig hydratisiertes Gel darstellt, dessen interstitielle Flüssigkeit beim Erwachsenen rund 15% des Körpergewichtes ausmacht (Klinke und Pape, 2010). Hydrogele eignen sich daher als „weiche"

Zellkultursubstrate für die Verwendung als biomimetische Knochenmarksanaloga.

Choi und Harley (2012) kultivierten murine HSPZ auf zweidimensionalen Kollagen Typ I-beschichteten Polyacrylamidgelen. Die Analyse von Zellfläche und Zellform-Index aus Konfokal-Mikroskopiebildern ergab, dass je steifer (196 kPa *vs.* < 10 kPa) das Substrat und je höher die Kollagen-Dichte (bei 196 kPa), desto größer war die HSPZ-Fläche (Choi und Harley, 2012). Die veränderte Zellmorphologie von murinen HSPZ auf „steiferen" Substraten (Polyacrylamidgelen) konnte mit verschiedenen EZM-Liganden, namentlich Kollagen Typ I, Fibronektin und Laminin, bestätigt werden. So war die Polarisierung und Zellfläche erhöht, wenn sie auf „steifen" (E-Modul 44 kPa) Gelen kultiviert wurden, dagegen verbleiben sie auf „weichen" (E-Modul 3,7 kPa) Gelen rundlich (Choi und Harley, 2017). Darüber hinaus erhielten die „steifen" (E-Modul 44 kPa) Fibronektin-beschichteten Gele signifikant mehr multipotente myeloide Progenitoren nach Kurzzeitkultur von 24 h im Vergleich zu den „weichen" (E-Modul 3,7 kPa) Fibronektin-Gelen wie über klonogenem *Assay* gezeigt wurde (Choi und Harley, 2017). Erklärt wurde dieser Effekt durch das selektive Ansprechen von Integrinrezeptoren die sich darüber aufbauende intrazelluläre Spannung (Choi und Harley, 2017).

1.2.1.3. Heparin als Hydrogelbestandteil

Während Heparansulfat ein natürlicher Bestandteil der Knochenmarksnische ist (siehe Abschnitt 1.1.2.1) und von nahezu allen Zelltypen gebildet wird, wird das strukturverwandte Heparin nur von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebildet. Wie alle Glykosaminoglykane ist auch Heparin ein lineares Heteropolysaccharid, das eine helicale Konformation besitzt und dessen chemische Struktur aus repetitiven Disacchariden, und zwar 1→4-vernetzte Pyranosyluronsäure und 2-Amino-2-desoxyglucopyranose (Glucosamin) besteht (Abb. 1.12). Die Uronsäurereste sind typischerweise zu 90% L-Idopyranosyluronsäure und zu 10% D-Glucopyranosyluronsäure. Heparin besitzt die höchste negative Ladungsdichte von allen bekannten biologischen Makromolekülen (Capila und Linhardt, 2002). Dies resultiert aus den zahlreichen Carboxylgruppen und dem besonders hohen Sulfatierungsgrad. Die häufigste Struktur in Heparin ist das trisulfatierte Disaccharid (Abb. 1.12), sodass im Mittel eine Disaccharideinheit 2,7 Sulfogruppen enthält. Der Molekulargewichtsbereich beträgt 5–40 kDa mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 15 kDa (Capila und Linhardt, 2002).

Wegen der Wirkung Heparins durch Bindung mit Antithrombin als Antikoagulans wird Heparin, vor allem die Fraktion der niedermolekularen Heparine, in der Klinik zur antithrombotischen Therapie eingesetzt und daher in großen Mengen in pharmazeutischer Qualität aus Schweinedarmmukosa isoliert (Alban, 2007). Die etablierte Gewinnung und Aufreinigung zum xenogenen Arzneistoff macht Heparin zu einem geeigneten Zellkultursubstratbestandteil.

Heparin interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen, die eine Heparin-Bindedomäne besitzen,

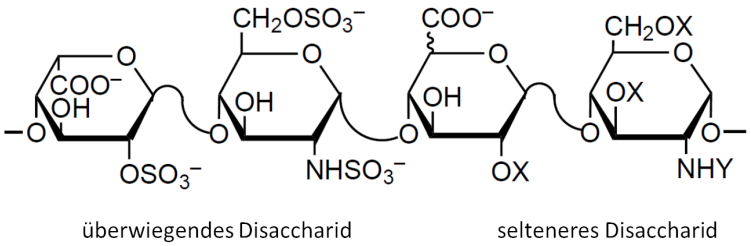


Abbildung 1.12.: Chemische Struktur von Heparin. Disaccharide als sich wiederholende Einheiten im Heparinmolekül; die Häufigkeit des trisulfatierten Disaccharids überwiegt. X=H oder SO_3^-; Y=$COCH_3$, SO_3^- oder H

die sich vor allem durch positive Ladungen von basischen Aminosäureresten auszeichnet (Capila und Linhardt, 2002). Dazu zählen auch etliche Zytokine. Die Bindung von Zytokinen durch Glykane der EZM ist ein Interaktionsmechanismus, der ihre Verfügbarkeit sowie Halbwertszeit durch Speicherung bei Bindung oder Freisetzung bei Abbau des Glykans reguliert. Darüber hinaus tragen vor allem die membranassoziierten Heparansulfate zur Gradientenbildung durch die lokal konzentrierte Präsentation von Zytokinen bei und induzieren deren Dimer- und Oligomerisierung (Hoogewerf et al., 1997; Proudfoot et al., 2003; Johnson et al., 2005; Salanga und Handel, 2011; Ziarek et al., 2013). Verschiedene Kombinationen von „kooperierenden" Chemokinen können einander durch kompetetive Bindung mit Glykosaminoglykanen verdrängen - wie *in vitro*-Studien zeigten - und sich in ihrer Wirkung verstärken (Verkaar et al., 2014; Proudfoot und Uguccioni, 2016). Die hohe Spezifität von Heparin zur Bindung verschiedenster Zytokine macht Heparin zum beliebten Element von Wachstumsfaktor freisetzenden Zellkulturgelen mit erweiterter Anwendung als zytokinfreisetzende oder -bindende Geltransplantate (Cai et al., 2005; Tae et al., 2006; Choi et al., 2008; Zieris et al., 2011; Prokoph et al., 2012; Freudenberg et al., 2015; van Janse Rensburg et al., 2017; Lohmann et al., 2017; He et al., 2019).

1.2.2. Nanostrukturierung als Rezeptor-Cluster induzierendes Element von HSPZ-Zellkultursubstraten

Die Zell-Kultursubstrat-Interaktion findet im Nanometerbereich, zumeist zwischen 5–30 nm statt (Curtis, 2001). In dieser Dimension erfolgen auch, wie in Abschnitt 1.1.2.2 beschrieben, die Integrin-Ligand-Bindung und das Integrinrezeptor-Clustern. Um beides zu ermöglichen, ist es nötig, Zellkulturmaterialien mit nanometerskalierten Clustern von Integrinliganden zu biofunktionalisieren. Für die Herstellung von Substraten, die als Eigenschaft die Nanometerkontrollierte Präsentation von Integrinliganden aufweisen, wurden zahlreiche Methoden entwickelt: i) Mischungstechniken, bei welchen funktionalisierte Polymermoleküle oder Nanopartikel mit einem nichtfunktionalisierten Polymer gemischt werden, ii) Protein-Technik, bei der rekombinant exprimierte Proteinimitate vielwertige Liganden präsentieren und iii)

Nanolithographie-Techniken, die räumlich präzise Anordnungen von Integrinliganden ermöglichen (detailliert in Karimi et al., 2018). Für die Zellkultur von HSPZ wurde bis dato nur die Nanolithographie-Technik zur oberflächlichen Nanostrukturierung von Substraten angewandt.

Humane $CD34^+$ HSPZ zeigten eine Integrin-vermittelte Adhäsion zu nanostrukturierten Substraten, die abhängig ist von der lateralen Distanz zwischen den EZM-Liganden (Altrock et al., 2012; Muth et al., 2013). HSPZ adhärierten auf cRGD-nanostrukturierten Glasoberflächen am besten bei 20±6 nm sowie merklich bei 32±6 nm Ligandendistanz (präziser Integrindistanz), begleitet von induziertem *Lipid raft*-Clustern (Altrock et al., 2012). Auf Oberflächen mit 58±10 nm und 90±20 nm Ligandendistanz zeigten sie kein adhäsives Verhalten. Die kritische maximale Ligandendistanz, die noch eine Integrin-vermittelte Adhäsion erzeugt, hängt auch von der Ligandenkomplexität ab. Diese wurde auf nanostrukturierten PEG-Gelen (E-Modul 6 MPa) festgelegt für cRGD <45 nm, Osteopontin-Fragment ≈75 nm, Fibronektin-Fragment ≈110 nm (Muth et al., 2013). Diese monofunktionalisierten Gele zeigten untereinander und zu nichtfunktionalisierten Oberflächen für HSPZ weder Proliferations- noch Differenzierungsunterschiede (Muth et al., 2013).

Immobilisierte Dll1-Konstrukte in Kombination mit dem Fibronektin-Fragment CH-296 (RGD- und LDV-Motiv enthaltend) und gelösten hämatopoetischen Zytokinen induzierten bei humanen $CD34^+CD38^-$ HSPZ eine vielfache Steigerung der $CD34^+$ Zellzahl (Ohishi et al., 2002; Delaney et al., 2005, 2010). Diese HSPZ-Ligandenkombination wurde aufgegriffen und als nanostrukturierte Präsentation von Dll1 mit Ligandendistanzen von rund 20 nm, 40 nm und 90 nm in Kombination mit RGD-Peptid in zufälliger Anordnung als zweidimensionale PEG-Hydrogele (E-Modul 4,6 MPa) mit Zytokinmedium getestet (Winkler et al., 2017b). Nach 14-tägiger Kultur von $CD34^+$ HSPZ auf den bifunktionalen Gelen war ersichtlich, dass eine hohe Dll1-Dichte von ≤40 nm Ligandendistanz die Expansion der $CD34^+$ Zellzahl signifikant gegenüber Oberflächen ohne Dll1-Funktionalisierung erhöhte. Dabei war es irrelevant, ob der zelluläre Ligand Dll1 in über die Nanostruktur definierter oder aber in zufälliger Anordnung vorlag. Die getesteten Dll1-Dichten besaßen darüber hinaus keinen unterscheidbaren Effekt auf das myeloide Differenzierungspotenzial (Winkler et al., 2017b).

Wohldefinierte Zellkultursubstrate durch Nanostrukturierung herzustellen, ermöglicht es daher globale wie lokale Dichten bzw. Konzentrationen von Molekülen der *in vivo* Knochenmarksnische zu imitieren, und potentielle Effekte der Rezeptor-Ligand-Interaktionen auf HSPZ auf molekularer Ebene zu untersuchen.

1.2.3. Das entwickelte zweidimensionale Hydrogelsystem für diese Arbeit

Für diese Arbeit wurde ein zweidimensionales Gelsystem entwickelt, um als Kultursubstrat für HSPZ zu dienen und damit das Zellverhalten gezielt untersuchen zu können. Als Grundlage

dient ein Hydrogel, welches aus einer biohybriden Polymermatrix besteht. Das Netzwerk wird aus zwei kovalent miteinander verknüpfte Komponenten gebildet: die synthetische Komponente ist 4-armiges,sternförmiges Polyethylenglykol-thiol (sPEGthiol) und die biologische Komponente Heparin-Maleimid-Konjugat (HM). Da die Netzwerkdichte maßgeblich die viskoelastischen Eigenschaften einer Hydrogelmatrix bestimmt, kann die Matrixelastizität darüber variiert werden. Eine Netzwerkdichteerhöhung kann über die Erhöhung des molaren Verhältnisses von sPEGthiol zu HM unter Beibehaltung unveränderlicher HM-Konzentration erfolgen, sofern der Funktionalisierungsgrad von HM mehr als 4 Maleimide pro Heparinmolekül aufweist. Solch eine Steifigkeitsvariation der Matrix wurde bereits für ähnliche PEG-Heparin-Gelsysteme, die Anwendung als biohybride Zellultursubstrate fanden, erfolgreich demonstriert (Freudenberg et al., 2009; Tsurkan et al., 2013).

Neben dem vielfach als Kulturmatrix genutzten, biokompatiblen und proteinabweisenden PEG wurde zusätzlich das Biomolekül Heparin als Matrixkomponente verwendet. Über die Strukturverwandtschaft des Heparins mit dem Heparansulfat, einem natürlichen Bestandteil der Knochenmarksnische (siehe Abschnitt 1.1.2.1), hinaus ist die Fähigkeit des Heparins zur Proteinbindung (siehe Abschnitt 1.2.1.3) der Grund zur Wahl dieses Glykosaminoglykans als Matrixkomponente. In dieser Arbeit wird Heparin speziell zur Bindung und anhaltenden Bereitstellung des Chemokins SDF-1α genutzt. SDF-1α besitzt verschiedene basische Aminosäurereste, wobei das Cluster Lys-24, His-25, and Lys-27 im ersten β-Strang der Aminosäuresequenz ein typisches Heparin-bindendes Motiv (BBXB; B=basische Aminosäure) darstellt (Amara et al., 1999; Sadir et al., 2001). Die Bindung zu sulfatierten Oligosacchariden - bei Heparin mindestens ein Tetrasaccharid lang - fördert die Dimerisierung von SDF-1α (Sadir et al., 2001; Fermas et al., 2008). Wie in Abb. 1.13 dargestellt, bilden zwei einander zugewandte SDF-1α-Monomere eine basische Spalte zur spezifischen Heparinbindung aus. In SDF-1α liegt die CXCR4-Rezeptorbindestelle getrennt von der Glykanbindestelle (Amara et al., 1999; Laguri et al., 2008; Connell et al., 2016; Sadri et al., 2022) und eine Heparansulfat- bzw. Heparinbindung hat keinen Effekt auf die Affinität zu CXCR4 (Connell et al., 2016). Gelmatrixgebundes SDF-1α kann wieder freigesetzt werden oder oberflächlich immobilisiert verbleiben und so als löslicher oder gebundener Ligand die SDF-1α/CXCR4-Achse in HSPZ aktivieren (siehe Abb. 1.10).

Wie in Abschnitt 1.1.2.3 dargelegt, konvergieren Zytokin- und Integrinsignalwege intrazellulär. Um mögliche synergetische Effekte beider Signalwege untersuchen zu können, bedarf es neben der Zytokinverfügbarkeit auch einer gezielten Präsentation von Integrinliganden auf der Substratoberfläche. Orientiert an der nanostrukurellen Organisation molekularer Bindungspartner für HSPZ in der Nische (Abschnitt 1.1.2.4), trägt die Geloberfläche eine Nanostrukturierung zur nanometerkontrollierten Präsentation von Integrinliganden. Die Nanostruktur wurde dazu mithilfe einer Nanolithographie-Technik realisiert. Die *block copolymer micelle (nano)lithography* (BCML) Technik beruht auf der regelmäßigen Anordnung goldsalzbeladener

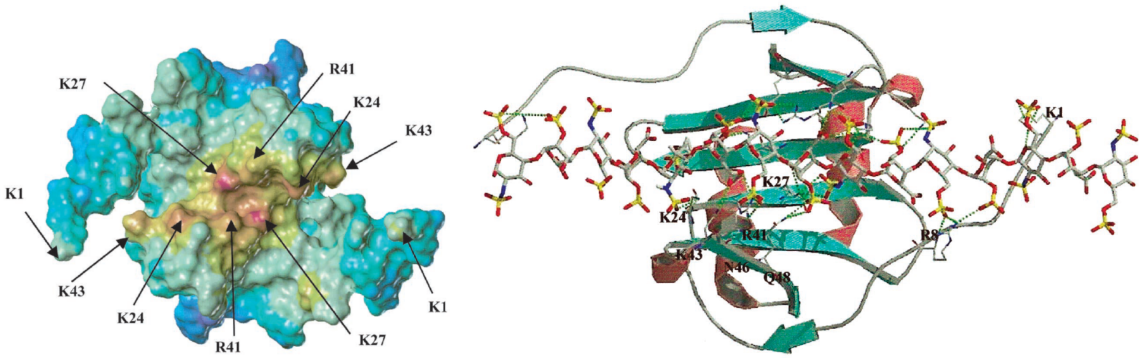


Abbildung 1.13.: Die SDF-1α-Dimerstruktur in Interaktion mit Heparin. *Links:* Connolly-Oberfläche des SDF-1α-Dimers, farblich kodiert entsprechend des elektrostatischen Potentials (blau = negativ; rot = positiv), Pfeile weisen auf basische Aminosäuren (Einbuchstabencode mit Sequenzposition). *Rechts:* Interaktionsmodell von Heparin mit einem SDF-1α-Dimer. Die Dimerstruktur ist als Bändermodell dargestellt. Das lineare Polysaccharid Heparin ist zusammen mit den basischen Aminosäureresten des SDF-1α, die mit Heparin interagieren, als Stäbchenmodell repräsentiert. Abbildung basierend auf Sadir et al. (2001), frei verfügbar unter einer *Creative Commons CC BY*-Lizenz.

Diblock-Copolymer-Mizellen (Details zur Methode siehe 2.9). Die BCML ermöglicht hier insbesondere die kontrollierbare Einstellung des Abstandes regelmäßig angeordneter Goldnanopartikel (AuNP) zueinander. Die Anbindung dieser AuNP-Struktur an die Geloberfläche erzeugt präzise positionierte Ankerpunkte für die gezielte Biofunktionalisierung mit Liganden für das von HSPZ exprimierte Integrin $\alpha_4\beta_1$. Die Einstellbarkeit des lateralen AuNP-Abstands im Nanometerbereich erlaubt somit die gezielte Änderung der präsentierten Ligandendichte an der Geloberfläche. Aufgrund des gleichartigen Durchmessers eines AuNP und Integrinmoleküls bindet ein Integrinrezeptor an maximal einem ligandenfunktionalisierten AuNP, sodass eine Variation der AuNP-Dichte gleichzeitig eine Variation der Rezeptordichte in der Zellmembran widerspiegelt. Über diese definierten Partikelabstände kann ein Clustern von $\alpha_4\beta_1$ Integrinrezeptoren in HSPZ induziert werden. Abgeleitet von den in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen kritischen Interpartikeldistanzen für eine Signalgebung wurde hier ein Partikelabstandsbereich von ≈26–124 nm untersucht.

Die außerordentliche Bedeutung der Integrine als zelluläres Rezeptormolekül wurde in Abschnitt 1.1.2.2 ausführlich dargelegt. Im vorliegenden Projekt wurden zur adhäsiven Interaktion der HSPZ mit dem Biomaterial die $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Liganden VCAM-1 und Fibronektin gewählt. Dabei wurde nicht mit den Vollprotein-Liganden gearbeitet, sondern mit synthetischen Peptidkonstrukten. Es ist bekannt, dass bereits lineare und zyklische Peptide, die die für das $\alpha_4\beta_1$ Integrin relevante Bindesequenz enthalten, selektiv gebunden werden und die Zugabe dieser Peptide in löslicher Form als potente Inhibitoren der Zelladhäsion eingesetzt werden können (Dutta et al., 2000; Yusuf-Makagiansar et al., 2002). Für die Biofunktionalisierung der auf der Hydrogeloberfläche gebundenen Goldnanostruktur wurden die Peptidkonstrukte C-PEG6-EI**LDV**PST und C-PEG6-TQ**IDSP**LN als $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Liganden eingesetzt (siehe Material

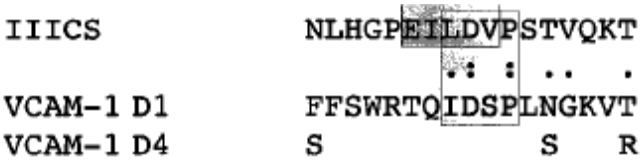


Abbildung 1.14.: Sequenzhomologie des $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Bindemotivs in Fibronektin und VCAM-1. Die partielle Aminosäuresequenz des CS1 der Typ III *connecting segment*-Region (IIICS) von humanem Fibronektin, die das Bindemotiv LDV beinhaltet (eingerahmt), ist mit dem Bindemotiv der partiellen Aminosäuresequenz der humanen VCAM-1 Domäne 1 (D1) bzw. Domäne 4 (D4) ausgerichtet. Identische (:) und ähnliche (.) Aminosäuren sind angezeigt. Abbildung basierend auf Clements et al. (1994).

Tabelle 2.6 zu physikochemischen Eigenschaften). Sie enthalten jeweils die spezifische adhäsive Minimalsequenz (fett gedruckt), die dem physiologischen Liganden entlehnt ist: Für Fibronektin befindet sich die Adhäsion-vermittelnde Minimalsequenz **LDV** innerhalb des CS1 der IIICS- bzw. variablen Region, einer der alternativen Spleißdomänen (Guan und Hynes, 1990; Komoriya et al., 1991; Wayner und Kovach, 1992; Taite et al., 2006). Für VCAM-1 exisitieren in der Ig-Domäne 1 und Ig-Domäne 4 $\alpha_4\beta_1$ Integrin-spezifische Bindemotive (Vonderheide et al., 1994). Im Menschen wurden zwei Spleißvarianten von VCAM-1 identifiziert, wovon die eine beide Domänen enthält, bei der anderen die Ig-Domäne 4 fehlt (Cybulsky et al., 1991; Osborn et al., 1992). Die für das Peptidkonstrukt genutzte Minimalsequenz **IDSP** ist in beiden Domänen vorhanden (Clements et al., 1994; Jones et al., 1995; Wang et al., 1995; Newham et al., 1997) und stellt ein Sequenzhomolog zu **LDV**(P) der Fibronektin-Minimalsequenz dar, wie in Abb. 1.14 verdeutlicht ist.

Sowohl die Anbindung der Goldnanopartikelstruktur an das Hydrogelsystem als auch die Biofunktionalisierung der AuNP mit Peptidkonstrukten wird über Gold-Schwefel-Bindungen vermittelt. Dazu reagieren im ersten Schritt bei Matrixbildung die Thiolgruppen des sPEGthiol mit den Goldnanopartikeln und in einem zweiten Schritt bei der Biofunktionalisierung die Thiolgruppen des endständigen Cysteinrestes der Peptidkonstrukte mit den Goldnanopartikeln. Weiterhin wird angenommen, dass aufgrund der Umgebungsbedingungen (nichtreduzierend und physiologischer pH-Wert) neben der schwächeren koordinativen Bindung die Konversion zur stärkeren kovalenten Gold-Thiolat-Bindung dominiert (siehe Abschnitt 2.11.1). Diese überwiegend kovalente Bindung des Peptidliganden zum Hydrogelkörper ebnet den Weg zu einer über $\alpha_4\beta_1$ Integrin-vermittelten Krafttransduktion im Nanometerbereich und erlaubt so den HSPZ die biomechanischen Eigenschaften der Hydrogelmtrix wahrzunehmen.

Wegen all dieser beschriebenen Eigenschaften des entwickelten Biohybridhydrogelsystems ergeben sich relevante funktionale Ähnlichkeiten zur Knochenmarksnische. Es dient daher in dieser Arbeit zur Anwendung als multifunktionales Zellkultursubstrat für HSPZ, um spezifische Effekte auf die Zellen zu studieren.

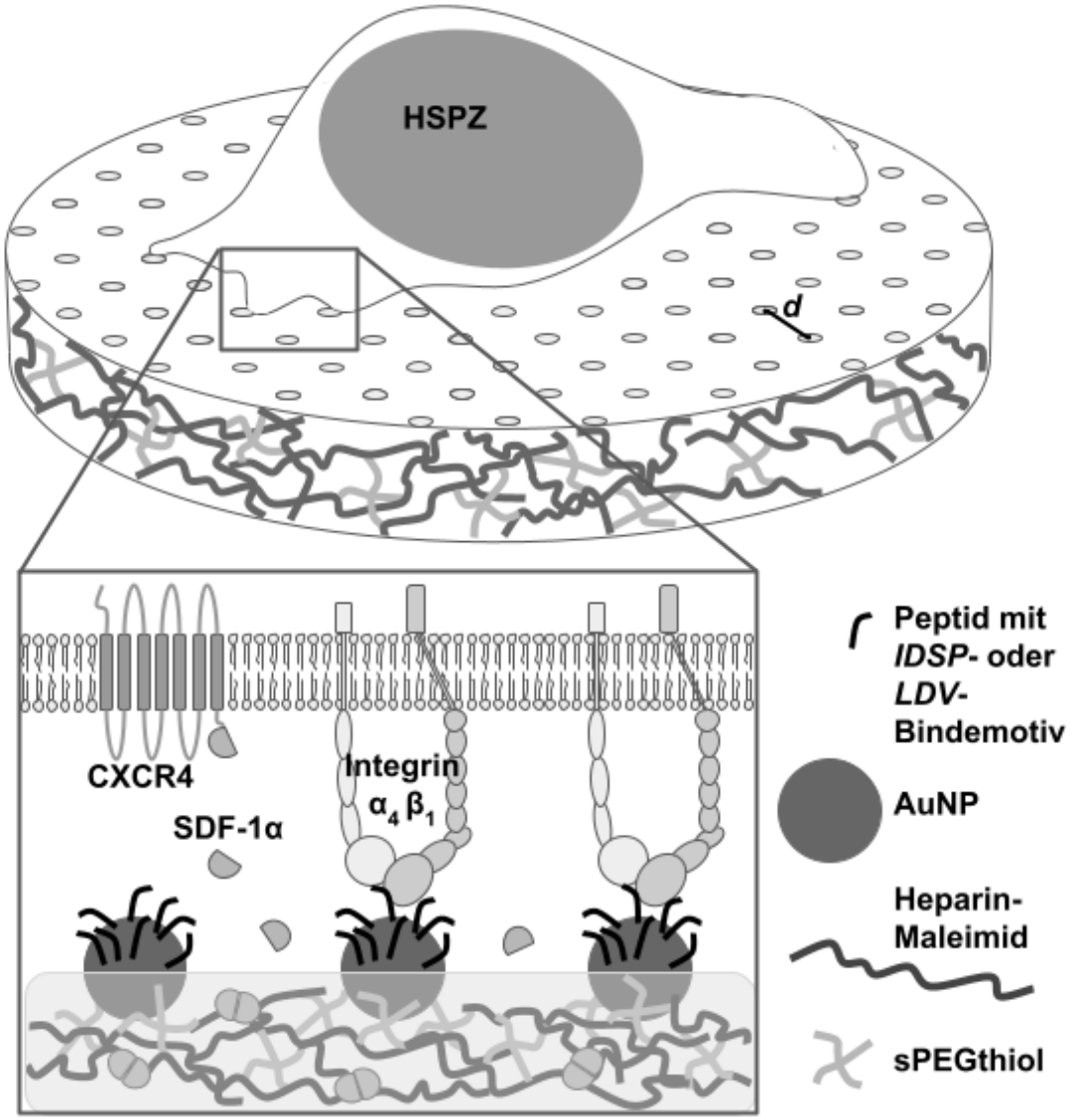


Abbildung 1.15.: Schema des multifunktionalen nanostrukturierten Hydrogelsystems in Interaktion mit HSPZ. Das Hydrogelsystem vereinigt drei funktionelle Aspekte: I. Nanostrukturierung zur präzisen Anbindung von Liganden: Die regelmäßige, quasi-hexagonale Anordnung von oberflächengebundenen AuNP im Partikelabstand d zueinander ermöglicht die präzise Immobilisation von zelladhäsiven Peptidkonstrukten, die Liganden für den $\alpha_4\beta_1$ Integrinrezeptor darstellen. Aufgrund der gleichartigen Integrin- und AuNP-Durchmesser bindet ein Integrinrezeptor an nur einem ligandenfunktionalisierten AuNP, sodass über die Variation der AuNP-Dichte auch die Ligandendichte variiert wird und damit die Rezeptordichte beeinflusst werden kann. II. Elastizität der Matrix: Das biohybride Polymernetzwerk aus kovalent verknüpftem Heparin-Maleimid und sPEGthiol stellt ein elastisches Gel dar. Die biomechanischen Eigenschaften der Matrix können über die Integrine als bidirektionale Mechanotransduktoren von der Zelle wahrgenommen werden. III. Bindung und Freisetzung von Zytokinen: Heparin mit seiner hohen negativen Ladungsdichte besitzt eine hohe Spezifität zur reversiblen Bindung verschiedenster Zytokine. Das Chemokin SDF-1α wird von Heparin als Dimer gebunden. Diese Bindungseigenschaft dient einmal als Zytokin-Reservoir während der Langzeitkultur und zugleich neben den Integrinliganden als juxtapositionelle Präsentation von SDF-1α an der Oberfläche.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Die Fähigkeit von HSZ zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in die verschiedenen Blutzelltypen hängt von einem komplexen System einwirkender zellextrinsischer Faktoren ab, die HSZ in der Knochenmarksnische wie in 1.1.2.1 dargestellt vorfinden. Um zu evaluieren, wie stark einzelne biochemische und biophysikalische Eigenschaften der Nische das Entwicklungsschicksal von HSZ bzw. HSPZ beeinflussen können, ist eine systematische Reduktion der Nischenkomplexität mittels artifizieller Nischenmodelle erforderlich. Unter Verwendung der zweidimensionalen Zellkulturplattform - wie sie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben wurde - sollen daher elementare Funktionalitäten der physiologischen Nische minimal komplex nachgebildet werden. Das hier entwickelte Hydrogelsystem vereint dabei mehrere Funktionalitäten, sodass den HSPZ Stimuli verschiedener Qualitäten parallel angeboten und ggf. angepasst werden können. Folgende drei Funktionalitäten sind für das hier vorgestellte Gelsystem besonders charakteristisch:

Funktion I: Elastizität der Hydrogelmatrix
Die erste Funktionalität des Hydrogelsystems umfasst den elastischen Charakter des Hydrogelkörpers, der einen biophysikalischen Effekt auf HSPZ über Rezeptoren der Mechanosensitivität und -transduktion ausüben kann. Im vorliegenden zweidimensionalen Gelsystem wird versucht, die Steifigkeit der Matrix der im Knochenmark entsprechend anzupassen.

Funktion II: Bindung und Freisetzung von Zytokinen
Die zweite Funktionalität besteht in der Bindung und Freisetzung von Zytokinen, die durch Heparin als Polymer-Baustein der Hydrogelmatrix hervorgerufen wird und eine kontinuierliche Bereitstellung löslicher hämatopoetischer Faktoren ermöglicht, was hier explizit anhand des Chemokins SDF-1α untersucht wird.

Funktion III: Nanostrukturierung zur präzisen Anbindung von Liganden
Die dritte Funktionalität des Hydrogelsystems besteht in der präzisen Immobilisierung von $\alpha_4\beta_1$ Integrinliganden über eine Nanostruktur, die die Einstellbarkeit des lateralen Abstands der $\alpha_4\beta_1$ Integrinliganden im Nanometermaßstab erlaubt. Durch Kontrollieren der Ligandendichte an der Hydrogeloberfläche kann dadurch ein Integrinrezeptorclustern induziert werden.

Durch die Kombination dieser verschiedenen Funktionalitäten des Hydrogelsystems wie Abb. 1.15 dargestellt, kann untersucht werden, inwieweit eine Aktivierung des $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Signalweges von der Ligandendichte bzw. vom Integrin-Clustern, der Matrixsteifigkeit und Aktivierung des SDF-1α-Signalweges abhängig sind. Dabei standen speziell folgende wissenschaftliche Fragen im Vordergrund: Hat hat die $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Peptidligandendichte einen Einfluss auf das HSPZ-Verhalten? Sind die zelluläre und die extrazelluläre $\alpha_4\beta_1$ Integrinbindesequenz gleichwertig oder induzieren sie unterschiedliches HSPZ-Verhalten? Existiert ein kooperativer Effekt zwischen gleichzeitig aktiviertem $\alpha_4\beta_1$ Integrin- und SDF-1α-Rezeptor,

der sich im HSPZ-Verhalten widerspiegelt?

Für die Beantwortung dieser Fragen wird dazu die Wechselwirkung von aus Nabelschnurblut isolierten $CD34^+$ HSPZ mit der Hydrogeloberfläche anhand von Adhäsion und Motilität sowie dem Proliferations- und Differenzierungsverhalten experimentell bestimmt. Die Resultate dieser Zellversuche liefern einen Beitrag zum qualitativen und quantitativen Verständnis des Einflusses von Liganden und Nanostrukturen auf HSZ und deren Nachkommen und geben mögliche Hinweise auf den *Crosstalk* zwischen SDF-1α- und $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Signalwegen. Darüber hinaus könnten die Erkenntnisse zur Findung optimaler Bedingungen für die Proliferation der HSPZ unter Erhalt des hämatopoetischen Stammzellpotentials *ex vivo* genutzt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Tabelle 2.1.: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	**Hersteller**
Aceton, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH_4Cl), zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Argon (Ar), ALPHAGAZ™ 2, 99,9999%	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf
Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$), für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Deuteriumoxid (D_2O), 99.9 atom % D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1,2-Dimethylbenzen (*o*-Xylol), zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO), für die Zellkultur	AppliChem GmbH, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$), zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolut	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz, für die Molekularbiologie, 99,0–101,0%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formaldehyd - Lösung, 37%, BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glutaraldehyd, 25% in H_2O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gold(III)chlorid-Trihydrat ($HAuCl_4 \cdot 3\,H_2O$), $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA, Darmstadt
Hydroxylaminhydrochlorid ($H_3NO \cdot HCl$), 99,9%	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe
Immersionsöl Immersol™ 518 F	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kohlendioxid (CO_2) N45, 99,995%	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf
Lymphocyte Separation Medium 1077	PromoCell GmbH, Heidelberg
Methylbenzen (Toluol), zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl), zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$), zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge Lösung 1,0 N	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-(2-Aminoethyl)maleimid-trifluoracetat, $\geq$ 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 2.1.: fortlaufend

Bezeichnung	Hersteller
N-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDC) Hydrochlorid, purum, $\geq 98,0\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz (Sulfo-NHS), $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd, reagent grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polyethylenglykol (PEG)-Thiol, 4-armig (Pentaerythritolkern), MW 10.000	JenKem Technology, Peking, China
Polystyrol-Mikrokugeln, Dragon Green-fluoreszent, Nenndurchmesser 0,20 µm	Bangs Laboratories Inc., Fishers, IN, USA
Polystyrol-Mikrokugeln, Suncoast Yellow-fluoreszent, Nenndurchmesser 0,20 µm	Bangs Laboratories Inc., Fishers, IN, USA
Polystyrol(x)-*block*-Poly(2-vinylpyridin)(y)	Polymer Source Inc., Dorval, Kanada
Salzsäure 2 N Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schwefelsäure 95-97%, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Stickstoff (N_2)	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf
Triton® X-100, für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypanblau Lösung, 0,4%, für die Mikroskopie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasser, doppelt deionisiert und hochrein (ddH_2O)	lokale Aufbereitung über Reinstwasseranlage (siehe Methoden)
Wasserstoff (H_2), ALPHAGAZ™ 2, 99,9999%	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf
Wasserstoffperoxid 30%, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt

2.2. Puffer und Lösungen

Tabelle 2.2.: Gebrauchsfertige Puffer

Bezeichnung	Hersteller
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) - Puffertabletten, pH 7,4	Applichem GmbH, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), ohne Calcium- und Magnesiumchlorid, sterilfiltriert, für Zellkultur geeignet	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA (Versen), 1% (w/v) in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	Biochrom GmbH, Berlin

Tabelle 2.3.: Angesetzte Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Phosphatpuffer (pH ≈6,4 bei RT), 0,1 M, 100 ml	13,25 ml	0,2 M $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ in ddH_2O
	36,75 ml	0,2 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ in ddH_2O
		verdünnen mit ddH_2O zu 100 ml
Annexin Puffer (pH ≈7,4)	10 mM	HEPES
	140 mM	NaCl
	2,5 mM	$CaCl_2$ in ddH_2O
Erylyse Puffer (pH ≈7,4), 1×	150 mM	NH_4Cl
	10 mM	$NaHCO_3$
	0,1 mM	EDTA-Dinatriumsalz in ddH_2O
Rinsing Puffer	2 mM	EDTA (Versen) in PBS
Running Puffer = FACS Puffer	0,5% (w/v)	BSA in *Rinsing* Puffer

2.3. Zellnährmedien

Tabelle 2.4.: Medien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
fetales Rinderserum, *fetal bovine serum* (FBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HPC Expansion Medium DXF	PromoCell GmbH, Heidelberg
Zytokin Mix E	PromoCell GmbH, Heidelberg
MethoCult™ H4434 Classic	STEMCELL Technologies Germany GmbH, Köln
IMDM + 2% FBS	STEMCELL Technologies Germany GmbH, Köln

2.4. Biologische Moleküle, Peptide, Proteine und Antikörper

Tabelle 2.5.: Biologische Moleküle, Peptide und Proteine

Bezeichnung	Hersteller
Heparin, Natriumsalz, Calbiochem®, porcine Darmmukosa, MW 15.000 ± 2.000	Merck KGaA, Darmstadt
Albumin aus Rinderserum (bovines Serumalbumin (BSA)), geeignet für Zellkultur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDF-1α (CXCL12), rekombinant human, Carrier-frei	BioLegend Inc., San Diego, CA, USA
Peptide (siehe Tabelle 2.6)	EMC Microcollections GmbH, Tübingen

Peptidkonstrukte Die Peptidkonstrukte wurden in sterilem ddH_2O gelöst und als 3 mM Stocklösung bei -80°C gelagert. Die Arbeitslösung wurde durch Verdünnen mit PBS hergestellt.

Tabelle 2.6.: Aminosäuresequenzen und physikochemische Eigenschaften der Peptidkonstrukte für die Biofunktionalisierung der Goldnanopartikel

Peptidkonstrukte[a]	**MW**	**Hydrophobizität**	**Nettoladung**	**pI**[b]	**Abkürzung**
Adhäsive Peptidsequenzen[c]					
C-PEG6-EILDVPST	1312	44%	-2	3,55	*LDV*-Peptid
C-PEG6-TQIDSPLN	1326	33%	-1	3,75	*IDSP*-Peptid
Kontrollsequenzen					
C-PEG6-EILEVPST	1326	44%	-2	3,61	*LEV*-Peptid
C-PEG6-QNLSPITD	1326	33%	-1	3,75	*scr*[d]-Peptid

[a] PEG6=Abstandshalter aus 6 Polyethylenglykol-Einheiten
[b] isoelektrischer Punkt
[c] spezifische adhäsive Minimalsequenz ist unterstrichen
[d] willkürlich durchmischte Peptidsequenz, *scrambled* (scr)

Tabelle 2.7.: Antikörper und Farbstoffe für die Immunfluoreszenzfärbung

Primärantikörperantigen	**Wirtsspezies**	**Klon**		**Verdünnung**	**Hersteller ID**[a]
human CXCR4	Kaninchen	polyklonal		1:100	Invitrogen, PA3-305
human CD133/1 (Prominin-1)	Maus	AC133		1:50	Miltenyi Biotec, 130-090-422
Sekundärantikörper-Fluorochrom	**Wirtsspezies**	λ_{ex}[b] [nm]	λ_{em}[c] [nm]		
anti-Kaninchen(IgG)-Alexa Fluor™ 488	Ziege	496	519	1:200 (10 µg/ml)	Invitrogen, A-11008
anti-Maus(IgG)-Alexa Fluor™ 546	Ziege	556	573	1:200 (10 µg/ml)	Invitrogen, A-11003
Fluorochrom	**Zielstruktur**				
DAPI[d]	DNA[e]	358[f]	461[f]	1:500 (2 µg/ml)	Thermo scientific, 62248
Phalloidin-Alexa Fluor™ 647	F-Aktin	650	668	1:40	Invitrogen, A22287

[a] Produkt-Identifikator des Herstellers
[b] Wellenlänge maximaler Anregung
[c] Wellenlänge maximaler Emission
[d] 4',6-Diamidino-2-phenylindol
[e] auch RNA; bevorzugte Bindung an AT-reiche Regionen der kleinen Furche des DNA-Doppelstrangs verstärkt Fluoreszenz
[f] nach DNA-Bindung

Tabelle 2.8.: Fluorochrom-konjugierte Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie

Antigen	**Fluorochrom**[a]	λ_{ex}[b] [nm]	λ_{em}[c] [nm]	**Klon**	c_A[d] $\left[\frac{\mu g}{ml}\right]$	**Hersteller**[e]
CD34, human	VioBright™ 515	488	514	*REA1164*	100	A
CD45RA, human	PE	(496) 565	578	*REA1047*	25	A
CD49d, human	PE	(496) 565	578	*REA545*	250	A
CD38, human	APC	652	660	*REA671*	150	A
CD184, human	APC	652	660	*REA649*	100	A
CD29, human	APC	652	660	*REA1060*	250	A
Isotypkontrollen						
REA Control	VioBright™ B515	488	514	*REA293*	37,5	A
Antibody (S), human IgG1	PE	(496) 565	578	*REA293*	150	A
	APC	652	660	*REA293*	100	A
Zielstruktur						
Nukleinsäuren[f]	SYTOX® AADvanced™	546	647		1 mM	B
Phosphatidylserin	FITC-Annexin V	494	518		100 µg/ml	C
primäre Amine	Viobility™ 405/452	405	452		1 µl[g]	A
EdU[h]	Alexa Fluor™ 488 Azid	495	519		10 mM Stock	B

[a] Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), 7-Aminoactinomycin D (AAD), Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)
[b] Wellenlänge maximaler Anregung
[c] Wellenlänge maximaler Emission
[d] Abfüllkonzentration
[e] A: Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach; B: Invitrogen, Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA; C: BioLegend Inc., San Diego, CA, USA
[f] RNA und DNA; präferiert bindend an GC-reichen Regionen des DNA-Doppelstrangs
[g] entspricht einem Testäquivalent
[h] 5-Ethinyl-2'-desoxyuridin

2.5. Kits

Tabelle 2.9.: Verwendete Kits

Bezeichnung	**Hersteller**
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Human SDF-1α (CXCL12) ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
CD34 MicroBead Kit, human	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach
Cell Viability Imaging Kit	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Viobility™ 405/452 Fixable Dye	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach
Molecular Probes™ SYTOX® AADvanced™ Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA
Molecular Probes™ Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488 Durchflusszytometrie-Assay-Kit	Invitrogen, Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA
MACS®Comp Bead Kit, anti-REA	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach

2.6. Geräte

Tabelle 2.10.: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav, Laboklav 135-MS	SHP Steriltechnik AG, Haldensleben
Blockheizer, HX Mini	Peqlab, VWR International GmbH, Darmstadt
Brutschrank, Heraeus B6 Function Line	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
CO_2-Inkubator, C 150	Binder GmbH, Tuttlingen
CO_2-Inkubator, Heracell™ 150i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
CoolCell® LX Cell Freezing Container	BioCision LLC, San Rafael, CA, USA
Dewargefäß, 23 AL	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Diamant-Schreiber, Holzgriff	Carl Friedrich Usbeck KG, Radevormwald
Drehschieberpumpe RZ 6	Vacuubrand GmbH + Co KG, Wertheim/Main
Durchflusszytometer, BD FACSVerse™	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
Durchflusszytometer, MACSQuant® Analyzer 10	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach
Feinwaage SI-234	Denver Instrument, Bohemia, NY, USA
Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop, Zeiss Merlin	Carl Zeiss SMT GmbH, Oberkochen
Flockeneisautomat AF80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
Fluoreszenzmikroskop, Axio Observer D1 + Fluar 100x Objektiv	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 im Cell Observer Komplettsystem	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Gefrierschränke (-20 °C), Comfort; Premium; Profiline	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Gefriertrocknungsanlage, Alpha 1-4 LDplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode/Harz
Henkellocheisen, Durchmesser 15,5 mm, nach DIN 7200	M. Paffrath OHG, Remscheid
Hochvakuum-Coater, Leica EM ACE600	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Incubator XL-5 2000, Heating Unit 2000, Temp-Controller 2000-2, CO_2-Controller, Feuchtemodul (2), CO_2-Deckel M, Heizeinsatz M24 2000	PeCon GmbH, Erbach
Kalibrier-Objektträger mit sub-mm-Skalierung	Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA
Kolbenhubpipetten, Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Kritisch-Punkt-Trockner, Leica EM CPD300	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kühlschränke, Profiline; Medline	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Laborwaage PG5002-S DeltaRange	Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA
Lichtmikroskop, Axio Vert.A1 mit AxioCam ICc1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Lichtmikroskop, Primovert	Carl Zeiss AG, Oberkochen
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach

Tabelle 2.10.: fortlaufend

Bezeichnung	Hersteller
Mehrfachdispenser, Multipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanalpipette, elektronisch, 8 Kanal	VWR International GmbH, Darmstadt
Mehrstellen-Magnetrührer, Variomag Poly 15	VWR International GmbH, Darmstadt
Membran-Vakuumpumpe, LABOPORT® N810	KNF Neuberger GmbH, Freiburg im Breisgau
Mikrozentrifugen, Eppendorf Centrifuge 5424; 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach
Niederdruckplasmaanlage, Pico PCCE	Diener electronic GmbH + Co. KG, Ebhausen
NMR Spektrometer, 400 MHz Bruker Avance	Bruker Corporation, Billerica, MA, USA
Orbitalschüttler, VWR Standard Analog Shaker 3500	VWR International GmbH, Darmstadt
pH-Meter, VWR pHenomenal® pH1100L	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipettierhelfer macro, für Pipetten 0,1-200 ml,	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Pipettierhelfer, PIPETBOY acu 2	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Plattenlesegerät, EnSpire® Multimode Plate Reader	Perkin Elmer Instruments Inc., Waltham, MA, USA
Reagenzglasschüttler, Vortex-Genie®2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Reinstwasseranlage, arium®pro VF	Sartorius AG, Göttingen
Rheometer MCR 501	Anton Paar, Graz, Österreich
Rotationsbeschichter, WS-650MZ-23NPP	Laurell Technologies Corporation, North Wales, PA, USA
Schüttelwasserbad SW23	Julabo GmbH, Seelbach
Sicherheitswerkbänke der Klasse II, Thermo Scientific™ Herasafe™ KS; Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Stickstoffbehälter, Arpege 110	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf
Teflon Racks, für 18x18 mm Deckgläser	eigene werkstättische Herstellung
Tiefgefrierschrank (-80 °C), HERAfreeze™ HFU240BV	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TOF.SIMS 5	IONTOF GmbH, Münster
Universalpinzette, K35A, Polybutylenterephthalat mit Fiberglas	Outils Rubis SA , Stabio, Schweiz
Universalzentrifuge, Heraeus™ Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Ultraschallbad, Ultrasonic Cleaner	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortex-Schüttler, lab dancer	VWR International GmbH, Darmstadt
Wippschüttler, Mini Blot Mixer	VWR International GmbH, Darmstadt
Zählkammer, Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Zellkultureinsatz, flexiPERM® disc	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Zugprüfmaschine Texture Analyzer TA.XTplus	Stable Micro System, Godalming, UK

2.7. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.11.: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Chemikalien-Schutzhandschuhe, Butyl II	Showa Best Glove Inc., Menlo, GA, USA
Combitips advanced®, Biopur®, 0,5 ml; 1,0 ml; 2,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser für Hämacytometer, optisch plan, 20×26 mm, Stärke 0,4 mm	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Deckgläser, rund, 15 mm, Stärke 1; 18×18 mm, Stärke 5	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
Deckgläser, rund, 50 mm, Stärke 1	VWR International LLC, Radnor, PA, USA
Deckgläser, 24×60 mm, 18×18 mm, , Stärke 1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dialyseschlauch, Spectra/Por®7, pre-treated RC, MWCO 8 kD, Durchmesser 15 mm	Repligen Corporation, Rancho Dominguez, CA, USA
Einfrierröhrchen, Cryo.s™ 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalkanülen, Sterican®, 0,80×120 mm; 0,90×40 mm;	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Einweg-Laborspatel, Mikro, antistatisch	VWR International LLC, Radnor, PA, USA
Einwegspritzen, NORM-JECT®, 2 ml; 10 ml; 20 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Kimtech Labortücher (20,5×20 cm)	Kimberly-Clark Professional, Dallas, Tx, USA
Kimtech Präzisionswischtücher (11×21 cm)	Kimberly-Clark Professional, Dallas, Tx, USA
Laborglasgefäße, *diverse*	Duran Group GmbH, Schott AG, Mainz
Messpipetten, BLAUBRAND®, 20 ml; 10 ml; 5 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Messkolben, BLAUBRAND®, 1000 ml; 100 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Messzylinder, BLAUBRAND® ETERNA, 100 ml; 50 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
MS Säulen	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach
Objektträger, ohne Mattrand	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pasteurpipetten, 230 mm	VWR International LLC, Radnor, PA, USA
Petrischalen, PS, mit Nocken, unsteril, 145/20 mm; 94/16 mm; 60/15 mm; 35/10 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 5 ml; 1000 μl; 100 μl; 10 μl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipetten, serologisch, 50 ml; 25 ml; 10 ml; 5 ml; 1 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Probenflaschen, mit Schraubkappe (PTFE faced), 30 ml, Borosilikatglas	DWK Life Sciences GmbH, Mainz
Reaktionsgefäße, 2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Röhrchen, Polypropylen, runder Boden, 5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Schnappdeckel-Reaktionsgefäß Rollrandglas, 25 ml	VWR International LLC, Radnor, PA, USA
Spritzenfilter, PTFE, unsteril, Porengröße 0,2 µm, Durchmesser 25 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Spritzenvorsatzfilter, Millex®GV_4, PVDF, steril, Porengröße 0,22 µm, Durchmesser 4 mm	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, County Cork, Irland

Tabelle 2.11.: fortlaufend

Bezeichnung	Hersteller
Spritzenvorsatzfilter, Sterilfilter Filtropur S 0,2	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Suspensionskulturflaschen, CELLSTAR®, 250 ml; 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Vakuumfiltrationseinheiten, PES, Porengröße 0,2 µm, Kapazität 1 l	VWR International LLC, Radnor, PA, USA
Verschlussfolie, Parafilm®	Bemis Company, Neenah, WI, USA
Wägepapier, 531	VWR International bvba, Leuven, Belgien
Zählgitterkulturschale, 60 mm *Gridded Scoring Dish*	STEMCELL Technologies Germany GmbH, Köln
Zellkulturplatten, CELLSTAR®, 6-, 12-, 24-, 48-, 96-*Well*	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten, Falcon®, 24-*Well*	Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturschalen, CELLSTAR®, PS, Nocken, steril, 100/20 mm; 35/10 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellstofftupfer, Rolle, Pur-Zellin®, 4×5 cm, steril	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Zentrifugenröhrchen CELLSTAR®, PP, 50 ,ml; 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.8. Software

Tabelle 2.12.: Genutzte Programme für Datenauswertung

Bezeichnung	Hersteller
ChemDraw Professional 16.0	PerkinElmer Corporation
FlowJo 10.6.1	Becton, Dickinson and Company
GIMP 2.10.6	The GIMP Development Team, https://www.gimp.org
ImageJ 1.34s und (Fiji Is Just) ImageJ Version 1.51u	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Maryland, USA
MestReNova 12	Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien
Microsoft Excel 2013 und 2019 MSO	Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA
OriginPro 2021 9.8.0.200	OriginLab Corporation, MA, USA
ZEN 2012 und 3.4 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH

Das in den folgenden Experimenten eingesetzte ultrafiltrierte, UV-bestrahlte und doppelt deionisierte Wasser (ddH_2O) wurde in einer Reinstwasseranlage (arium®pro VF, Sartorius AG) als hochreines Wasser mit einer Leitfähigkeit von 0,055 μS/cm bzw. einem Widerstand von 18,2 M$\Omega\times$cm bei 25°C erzeugt. Volumina bis 1000 µl wurden mithilfe von Kolbenhubpipetten (Eppendorf Research® plus, Eppendorf AG) und entsprechenden Pipettenspitzen (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht) pipettiert, größere Volumina von bis zu 50 ml wurden mit Messpipetten (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim) oder serologischen Pipetten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) und einem Pipettierhelfer und ab 50 ml mit einem Messzylinder oder -kolben (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim) abgemessen.

2.9. Mizellare Diblock-Copolymer Nanolithographie

Die Herstellung einer gleichmäßigen Nanostruktur wurde durch Ablagerung von AuNP auf Glasoberflächen als temporäre Trägeroberfläche erzielt. Technisch wurde dabei die mizellare Diblock-Copolymer Nanolithographie (BCML) angewandt, die sich wie folgt darstellen lässt:

2.9.1. Herstellung goldsalzbeladener mizellarer Lösungen

BCML basiert auf der spontanen Bildung von mikrophasengetrennten Morphologien aus amphiphilen Block-Copolymeren (Lohmüller et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Block-Copolymere bestehen aus zwei kovalent miteinander verbundenen Blöcken: unpolarem Polystyrol (PS) und polarem Poly(2-vinylpyridin) (P2VP), welche als Diblock-Copolymer mit Polystyrol(x)-*block*-Poly(2-vinylpyridin)(y) bezeichnet und im Folgenden mit PS(x)-*b*-P2VP(y) abgekürzt werden. PS(x)-*b*-P2VP(y)-Moleküle lagern sich in Lösungsmitteln oberhalb ihrer jeweiligen kritischen Mizellenbildungskonzentration (*critical micelle concentration* (cmc)) spontan zu Assoziationskolloiden zusammen. Wenn sie über der cmc im organischen Lösungsmittel wie in Toluol oder *ortho*-Xylol (*o*-Xylol) gelöst werden, adsorbiert ein Teil der freien Block-Copolymerketten über den polaren Block P2VP an polaren Grenzflächen wie z.B. an der Wandung von Glasgefäßen, während sich ein anderer Teil zur energetisch begünstigten Mizellenform zusammenlagert, indem die P2VP-Blöcke den polaren, inneren Kern der Mizelle und die unpolaren PS-Blöcke eine hydrophobe äußere Hülle bilden (Abb. 2.1, Spatz et al., 1995). Aus einer hydrophilen Perspektive sind diese Mizellen invers orientiert.

Je nach Zusammensetzung verschiedener absoluter und relativer Blocklängen resultieren verschieden lange und im Molekulargewicht variable PS(x)-*b*-P2VP(y)-Molekülketten. PS(x)-*b*-P2VP(y) mit definiertem Molekulargewicht können in Kombination mit einer bestimmten Massenkonzentration im organischen Lösungsmittel Mizellen generieren, die sich hinsichtlich ihres Radius und ihrer Verteilungsdichte in Lösung unterscheiden. Im Hinblick auf eine kinetisch stabile Formation von sphärischen Mizellen, die für eine Dünnfilmbeschichtung

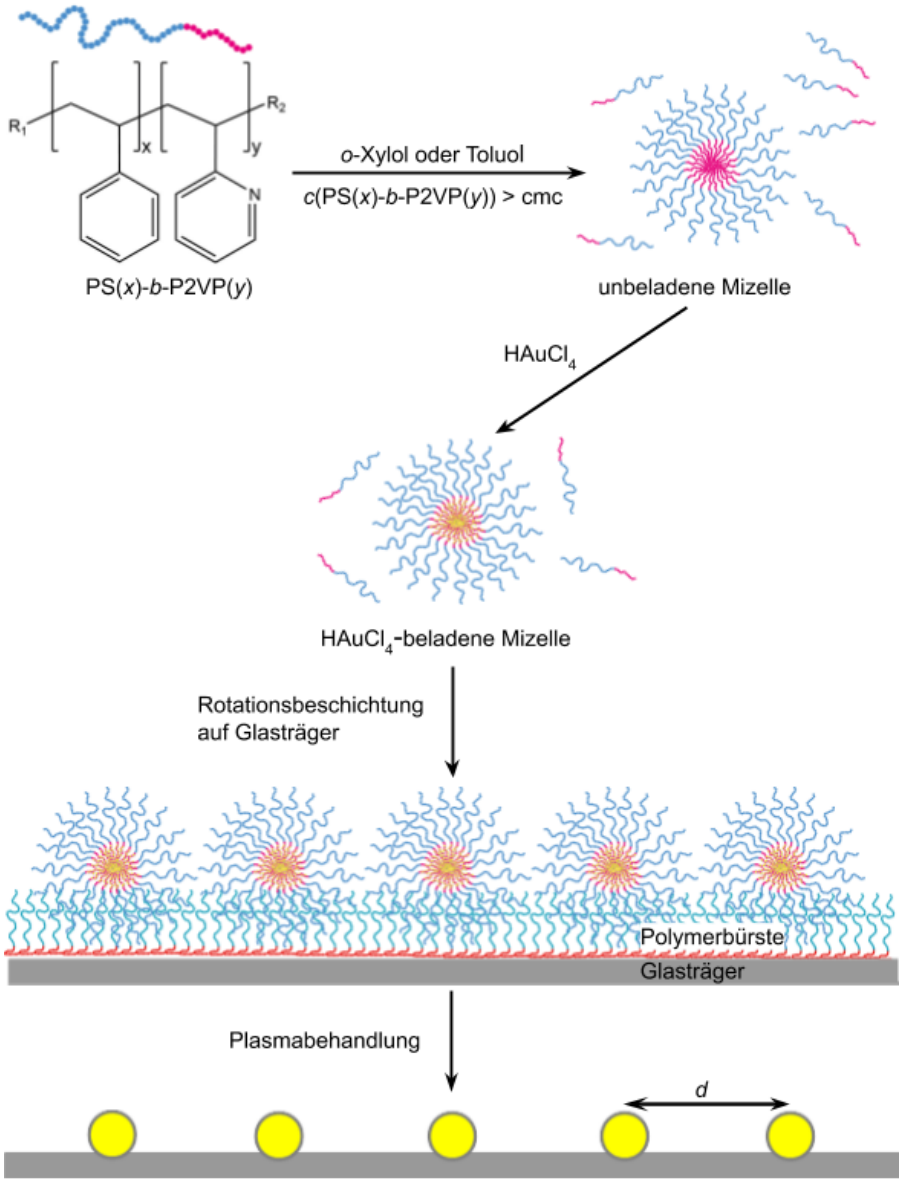


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung der Prozesse bei der mizellaren Diblock-Copolymer Nanolithographie. Das Diblock-Copolymer PS(x)-*b*-P2VP(y) besteht aus zwei kovalent miteinander verbundenen Blöcken aus unpolarem Polystyrol (PS, *(x) = Monomeranzahl*; blau) und polarem Poly(2-vinylpyridin) (P2VP, *(y) = Monomeranzahl*; pink). In organischen Lösungsmitteln (Toluol, *o*-Xylol) lagern sich die amphiphilen Diblock-Copolymerketten oberhalb der kritischen Mizellenbildungskonzentration (*critical micelle concentration*, cmc) zur energetisch begünstigten Mizellenform zusammen: die P2VP-Blöcke bilden den polaren, inneren Kern, die unpolaren PS-Blöcke eine hydrophobe äußere Hülle. Diese inversen Mizellen können mit Metallsalzen - hier Goldsalz in Form von Goldsäure ($HAuCl_4 \cdot 3\,H_2O$) - in das hydrophile Mizelleninnere angereichert werden (gelb). Die Lösung mit goldsalzbeladenen Mizellen wird im Prozess der Rotationsbeschichtung auf ein gereinigtes rotierendes Deckglas (Glasträger; grauer Streifen) gegeben. Dabei adsorbieren freie Diblock-Copolymerketten über den P2VP-Block an die polare Glasoberfläche und bilden eine schirmende hydrophobe „Polymerbürste", auf der die kugelförmigen Mizellen zum Erliegen kommen. Der mizellare Monofilm ordnet sich durch Abdampfen des organischen Lösungsmittels als annähernd hexagonale Kugelpackung in der Ebene an (hier nur Seitansicht). Der regelmäßige, mittlere Abstand d (im Nanometerbereich) der Mizellen zueinander bleibt auch nach Plasmabehandlung erhalten, wobei die organische Materie der Mizellen mithilfe ionisierten Gases (Plasma), z.B. Wasserstoff als Prozessgas, abgebrannt wird und Au^{3+}-Ionen im Mizellenkern zu einem elementaren Goldnanopartikel (gelber Kreis; Seitansicht) reduziert werden.

auf Oberflächen eine Gleichverteilung aufweisen sollen, gilt verallgemeinernd, dass sich ein Blockmonomerverhältnis PS:P2VP zwischen 2:1 und 3:1 besonders für die hier angestrebte Anwendung eignet, wogegen Blockmonomerverhältnisse ≤ 1 die Transformation zu zylindrischen Mizellen bei der Trägerbeschichtung begünstigen (Spatz et al., 1996b,a). Um den mittleren Abstand der Mizellen bzw. Mizellenzentren zueinander zu dirigieren, ist neben der Wahl des geeigneten Molekulargewichts, das maßgeblich den Mizellendurchmesser bestimmt, ferner eine geeignete Massenkonzentration des Diblock-Copolymers entscheidend.

In der vorliegenden Durchführung zum Gebrauch unterschiedlicher Mizellenkern-Abstände wurden die in Tabelle 2.13 gelisteten PS(x)-*b*-P2VP(y) verwendet. Gelöst wurden die Polymere in der in Tabelle 2.14 zu entnehmenden Massenkonzentration durch Einwaage in Caroscher Säure-gereinigten (siehe dazu Abschnitt 2.9.2.1), verschließbaren Glasprobenflaschen durch Zugabe von organischem Lösungsmittel, *o*-Xylol bzw. Toluol (Tabelle 2.14), sowie einem ebenfalls mit Caroscher Säure gereinigten Magnetrührstäbchen unter Rühren (300 rpm) für 24–48 h bei Raumtemperatur (RT).

Tabelle 2.13.: Verwendete Diblock-Copolymere und deren chemische Zusammensetzung

Diblock-Copolymer PS(x)-*b*-P2VP(y)[a]	M_n**(PS)** [g mol^{-1}]	M_n**(P2VP)** [g mol^{-1}]	M_n**(Diblock)** [g mol^{-1}]	$\frac{\text{PS}}{\text{P2VP}}$	**PDI**[b]	**ID**[c]
PS(154)-*b*-P2VP(33)	16000	3500	19500	4,67	1,05	P4708-S2VP
PS(288)-*b*-P2VP(81)	30000	8500	38500	3,56	1,06	P18226-S2VP
PS(1058)-*b*-P2VP(495)	110000	52000	162000	2,14	1,10	P5922-S2VP
PS(3365)-*b*-P2VP(1114)	350000	117000	467000	3,02	1,10	P40121-S2VP

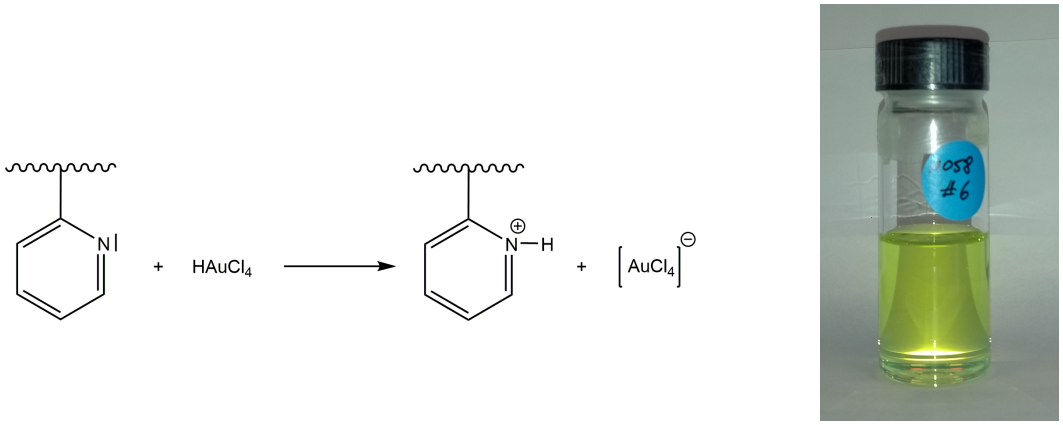
[a] x=Anzahl Styrolmonomere, Polystyrol (PS); y=Anzahl 2-Vinylpyridinmonomere, Poly(2-vinylpyridin) (P2VP)
[b] Polydispersität (PDI)
[c] Identifikator des Herstellers

Tabelle 2.14.: Eingestellte Parameter zur Herstellung von BCML-Lösungen und zur Trägerbeschichtung mit resultierenden Goldnanopartikelabständen

Diblock-Copolymer PS*(x)*-*b*-P2VP*(y)*	**c(PS*(x)*-*b*-P2VP*(y)*) [mg/ml]**	**Lösungsmittel**	**Loading**	**Drehzahl**[a] **[rpm]**	**Partikelabstand [nm]**
PS(154)-*b*-P2VP(33)	5	*o*-Xylol	0,25	10.000	≈26
PS(288)-*b*-P2VP(81)	4	*o*-Xylol	0,25	10.000	≈37
PS(1058)-*b*-P2VP(495)	5	*o*-Xylol	0,20	3.000	≈78
PS(3365)-*b*-P2VP(1114)	4	Toluol	0,25	8.500	≈124

[a] Rotationsbeschichtung von Glasträgeroberflächen

Die gebildeten inversen Mizellen ermöglichen eine gezielte Anreicherung von Metallsalzen in das hydrophile Mizelleninnere. Die Aufnahme von Metallsalz, hier in Form von Goldsalz (Abb. 2.1), erfolgte über das Lösen von Goldsäure ($HAuCl_4 \cdot 3\,H_2O$) unter Rühren (300 rpm) in der zuvor hergestellten mizellaren Lösung, abgedunkelt für 24 h bis zu 48 h bei RT. Bei diesem Vorgang wird 2-Vinylpyridin (2VP) protoniert und zugleich das Anion $AuCl_4^-$ als neutralisierendes Gegenion im Mizellenkern gebunden (Abb. 2.2a). Der nun polyionische Mizellenkern erhöht die Strukturintegrität der Mizelle, sodass eine thermodynamisch stabile



(a) Ionisierungsreaktion des Mizellenkerns **(b)** Goldsalzbeladene mizellare Lösung

Abbildung 2.2.: Beladung der Mizellen mit Goldsalz bei der Herstellung goldsalzbeladener mizellarer Lösungen für die mizellare Diblock-Copolymer Nanolithographie. Protonierung von 2-Vinylpyridin durch Goldsäure ($HAuCl_4 \cdot 3\,H_2O$) und Bindung des Anions $AuCl_4^-$ als Gegenion im Mizellenkern (a). Fotografie einer goldsalzbeladenen mizellaren Lösung aus Polystyrol(1058)-*block*-Poly(2-vinylpyridin)(495) in *ortho*-Xylol (b).

Mikroemulsion aus mit goldsalzbeladenen Mizellen in Lösung entsteht (Spatz et al., 1996a). Die Beladung der Mizellen mit Goldsalz - auch *Loading* genannt - ist definiert durch das stöchiometrische Verhältnis von Goldsalz zu 2VP-Einheiten (Formel 2.1).

$$Loading = L = \frac{n(\mathrm{HAuCl_4})}{n(\mathrm{2VP})} \tag{2.1}$$

Die verwendeten *Loadings* für die Herstellung goldsalzbeladener mizellarer Lösungen sind Tabelle 2.14 zu entnehmen. Die Mizellenbeladung mit Goldsalz korreliert mit dem Durchmesser des sich bildenden Goldionen-Clusters. Dieser Durchmesser ist vor allem durch auftretende repulsive Effekte bei hohem *Loading* begrenzt (Spatz et al., 1996a). Das auf diese Weise inkorporierte Goldsalz stellt die Vorläufersubstanz für die Bildung kugelförmiger AuNP dar (siehe Abschnitt 2.9.2.3) mit finalen Partikel-Durchmessern von 1 bis 15 nm (Spatz et al., 2000; Kästle et al., 2003). Für die Berechnung der eingesetzten Goldsalzmasse wurde die Formel 2.2 benutzt. Vor der Nutzung der goldsalzbeladenen mizellaren Lösung wurden größere Schwebstoffe durch einen Polytetrafluorethylen-Filter (Porengröße 0,2 µm) entfernt, sodass eine klare hellgelbe Flüssigkeit vorlag (Abb. 2.2b).

$$m(\mathrm{HAuCl_4 \cdot 3\,H_2O}) = \frac{m(\mathrm{PS}(x)\text{-}b\text{-}\mathrm{P2VP}(y)) \cdot M(\mathrm{HAuCl_4 \cdot 3\,H_2O}) \cdot \mathrm{Monomeranzahl(P2VP)} \cdot L}{M(\mathrm{PS}(x)\text{-}b\text{-}\mathrm{P2VP}(y))} \tag{2.2}$$

2.9.2. Herstellung von Nanostruktur-Arrays auf Glasträgern

2.9.2.1. Reinigung von Glasträgeroberflächen

Um die Beschichtung einer Oberfläche mit der zuvor hergestellten goldsalzbeladenen mizellaren Lösung zu realisieren, muss diese Oberfläche sowohl stabil gegenüber dem organischen Lösungsmittel als auch stabil gegenüber der nachfolgenden Plasmabehandlung sein. Als Trägermaterial wurde daher auf Glas zurückgegriffen. Die verwendeten quadratischen (18×18 mm) Deckgläschen aus Borosilikatglas der Stärke 1 (0,13 mm - 0,16 mm Dicke) wurden in Vorbereitung auf die Dünnfilmbeschichtung von Oberflächenverunreinigungen befreit. Dazu wurden die Gläschen in Teflonständern in ein Becherglas platziert und einem Caroschen Säurebad - einer Mischung aus Wasserstoffperoxid (30% (w/v)) und konzentrierter Schwefelsäure im Mischungsverhältnis 1:3 - für ca. 1 h unter dem Abzug unterzogen. Organische Ablagerungen wurden so zersetzt und dadurch die Oberfläche geglättet. Des Weiteren wurden bei dieser Reinigung Metallionen durch Protonen ausgetauscht (Scholze, 1988), was die Oberflächenanzahl von Silanolgruppen und damit die Hydrophilie der Oberfläche erhöht. Nach Überführen der Gläschen samt Teflon-Rack in ddH_2O und ausgiebigem Spülen in ddH_2O wurden sie final für 10 min dem Ultraschallbad ausgesetzt. Nach einem letzten Wasserwechsel wurden die hochrein gesäuberten Gläschen mit einer ebenfalls in Carosche Säure gesäuberten, spitz gekrümmten Edelstahlpinzette an einer Ecke aus dem Wasser genommen und sofort im Stickstoffstrom zur Pinzettenseite hin blasend getrocknet. Die getrockneten Gläschen wurden auf einer mit fusselfreiem Zellstoff ausgelegten Petrischale bis zur Rotationsbeschichtung (innerhalb der nächsten 2 h) zwischengelagert.

2.9.2.2. Rotationsbeschichtung gereinigter Glasträgeroberflächen mit goldsalzbeladener mizellarer Lösung

Zur Benetzung der gesäuberten Glasträger (Abschnitt 2.9.2.1) mit einem ultradünnen Film der goldsalzbeladenen mizellaren Lösung (Abschnitt 2.9.1), wurde die dynamische Verteiltechnik der Rotationsbeschichtung angewandt. Das gereinigte Deckgläschen wurde auf dem Drehteller des Rotationsbeschichters mittig platziert und vakuumfixiert. Im Lauf von 1 min wurden bei Erreichen der gewünschten Drehzahl (Tabelle 2.14) 50 µl der goldsalzbeladenen mizellaren Lösung mit Abstand und möglichst mittig auf das rotierende Deckglas in einem schnellen, kontinuierlichen Pipettenknopfdruck getropft. Die Lösung verteilte sich durch die wirkende Fliehkraft radial über die gesamte Oberfläche und überschüssige Lösung wurde über den Glasträgerrand hinaus geschleudert, sodass auf dem Glasträger im Optimum ein mizellarer Monofilm vorlag. Während dieses Benetzungsprozesses adsorbierten freie Diblock-Copolymerketten über den polaren P2VP-Block an die polare Glasoberfläche und bildeten eine schirmende hydrophobe „Polymerbürste", auf welcher die beladenen Mizellen zum Erliegen

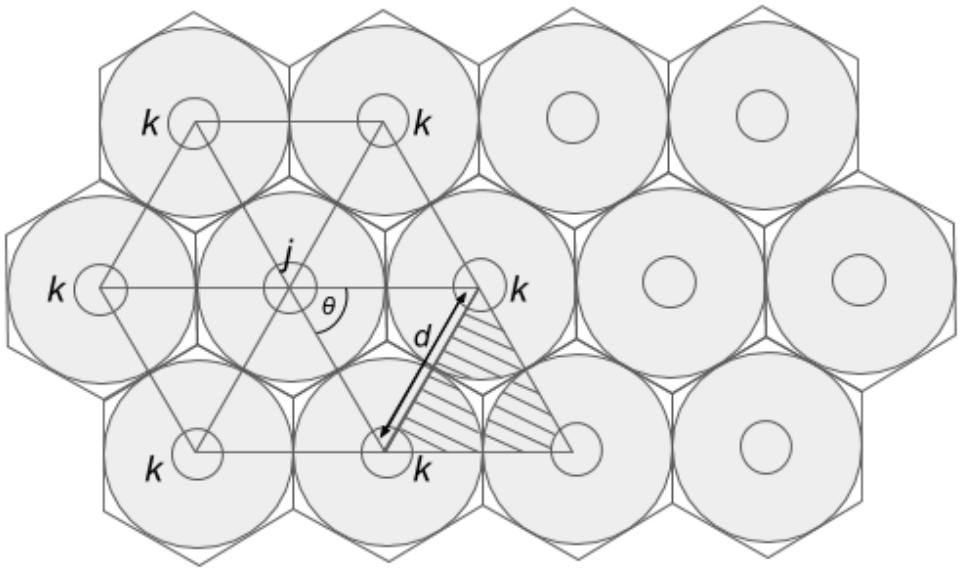


Abbildung 2.3.: Schema der idealen hexagonalen Anordnung goldsalzbeladener Mizellen in der Ebene. Goldsalzbeladene Mizellen (graue Großkreisscheiben) liegen nach Glasträgerbeschichtung in einer hexagonalen Gitterpackung vor. Die Gitterpunkte bilden Mizellenzentren, aus denen nach Plasmabehandlung Goldpartikel (graue Kleinkreisscheiben) im Abstand d zueinander verbleiben. Ein zentraler Partikel j ist jeweils von sechs umliegenden Nachbarpartikeln k umgeben. Die Packungsdichte der Mizellen ist über den Anteil an mizellenbedeckter Fläche definiert, visualisiert durch die Summe der schraffierten Kreissektoren innerhalb eines gleichseitiges Dreieck ($\theta_{jk} = 60°$). Zwei über eine Seite angrenzende Dreiecke bilden ein Fundamentalparallelogramm, das exakt eine Voronoi-Zelle (regelmäßiges Sechseck um eine Mizelle) umfasst.

kommen (Spatz et al., 1996a; Williges et al., 2013)(Abb. 2.1). Unterstützt durch das parallel ablaufende Abdampfen der leicht- bzw. mittelflüchtigen organischen Lösungsmittel (Toluol bzw. *o*-Xylol) ordnen sich die kugelförmigen goldsalzbeladenen Mizellen in einer annähernd hexagonalen Struktur, der dichtesten Kugelpackung in der Ebene an (Abb. 2.3). Die starke Ionenpaar-Wechselwirkung im Mizellenkern erhält die Mizellen-Integrität und somit auch die quasi-hexagonale Anordnung der Mizellen zueinander (und verhindert eine Transformation zur lamellaren Struktur) (Spatz et al., 1995).
Durch Anhauchen des Glases konnten Fehlstellen (nichtbenetzte Bereiche) identifiziert und entsprechende Gläschen aussortiert werden. Vollständig benetzte Gläschen wurden zur Orientierung der Oberfläche und Zuordnung der verwendeten goldsalzbeladenen mizellaren Lösung in der oberen rechten Ecke mithilfe eines Diamantstifts mit einer Nummerierung versehen und schnellstmöglich dem Plasmaprozess (Abschnitt 2.9.2.3) unterzogen.
Die applizierte Drehzahl bei Rotationsbeschichtung wirkt sich auf die mizelläre Filmdicke aus, wodurch neben der Wahl des Molekulargewichts und der Konzentration des Diblock-Copolymers, ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß, auf die resultierende Partikeldichte - definiert über den mittleren Partikelabstand d - Einfluss genommen werden kann (Tabellen 2.14 und 2.15).

Tabelle 2.15.: Einflussfaktoren bei Herstellung der BCML-Lösungen und Substratbeschichtung auf resultierende Goldnanopartikelabstände

Diblock-Copolymerkettenlänge	je länger, desto größer die Abstände
Diblock-Copolymerkonzentration	je größer, desto geringer die Abstände
Lösungsmittel	Toluol kleinere, *o*-Xylol größere Abstände
Rotationsbeschichtung	je höher die Drehzahl, desto größer die Abstände

2.9.2.3. Plasmabehandlung beschichteter Glasträgeroberflächen

Um einen nanoskopischen Goldpartikel aus dem im Mizellenkern inkludierten Goldsalz-Cluster zu erhalten, wurde die organische Materie der Mizellen mithilfe ionisierten Gases - hier reines Wasserstoffplasma - abgebrannt. Die Plasmabehandlung der beschichteten Glasträger (Abschnitt 2.9.2.2) lief unter Niederdruck bei etwa 0,4 mbar für ca. 45 min bei maximaler Generatorleistung (≈100%, korrespondierte zu 200 W, 40 kHz-Plasmaanlage) ab. Dabei wurden die Au^{3+}-Ionen zu einem elementaren Goldpartikel unter Erhalt der quasi-hexagonalen Anordnung, welche die inversen Mizellen vorgegeben hatten, reduziert. Somit entsteht ein geordneter Array aus AuNP mit einem mittleren Abstand d zueinander (Abb. 2.1), welcher unter Abschnitt 2.9.3 bestimmt wird. Aufgrund der hydrophilen Interaktion zwischen Gold und der Glasoberfläche (Gardner und Woods, 1977) sind die AuNP-Arrays auf den Glasträgern immobilisiert und wurden bis zur weiteren Verwendung einzeln in abgedichteten Petrischalen (Durchmesser 35 mm) staubfrei und dunkel gelagert.

2.9.3. Charakterisierung der Nanostruktur-Arrays auf Glasträgern

Da die vier verschiedenen genutzten Diblock-Copolymere jeweils für die Generierung eines distinkten Partikelabstandes genutzt wurden, wurden sie anhand ihrer Polystyrolblocklänge wie in Tabelle 2.16 abgekürzt.

Tabelle 2.16.: Abkürzung verwendeter Diblock-Copolymere für die Generierung von Nanostruktur-Arrays auf Glasträgern

Diblock-Copolymer	Abkürzung
PS(154)-*b*-P2VP(33)	PS154
PS(288)-*b*-P2VP(81)	PS288
PS(1058)-*b*-P2VP(495)	PS1058
PS(3365)-*b*-P2VP(1114)	PS3365

2.9.3.1. Rasterelektronenmikroskopie

Die BCML ermöglicht Partikelabstände zwischen 25 und 200 nm (Spatz et al., 2000; Kästle et al., 2003; Oria et al., 2017; Amschler et al., 2018) zu erzielen. Um diese Abstände

bestimmen zu können, muss die Elektronenmikroskopie bemüht werden, da bei optischen Mikroskopen die Auflösung physikalisch auf eine Lichtwellenlänge von ca. 200 nm begrenzt ist (Romeis et al., 2010). Bei der hierbei eingesetzten Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird im Hochvakuum ein Primärelektronenstrahl durch Anlegen einer Beschleunigungsspannung in Richtung Probenoberfläche beschleunigt, auf der Probenoberfläche fokussiert und zeilenweise über diese gerastert. Die aus der Probe austretenden Sekundär- und Rückstreuelektronen werden detektiert und zur Bildgebung genutzt. Bei der REM limitiert vor allem der Primärelektronenstrahldurchmesser das Auflösungsvermögen.

In Vorbereitung auf die REM-Analytik wurden Proben aus den Chargen produzierter AuNP-Arrays auf Glasträger im Hochvakuum-Coater (Leica EM ACE600) mit einer 6–10 nm dicken Kohlenstoffschicht bedampft, um den Elektronenabfluss über die Glasträgeroberfläche zu ermöglichen. Eine elektronenstabilere Beschichtung mit bspw. Gold ist bei AuNP kontraproduktiv, da die Beschichtung selbst eine Nanostruktur erzeugt. Die Aufnahmen erfolgten bei einer Beschleunigungsspannung (EHT) von 3 bis 5 kV, einem Arbeitsabstand (WD) zwischen 4 und 10 mm, einem Sondenstrom (IProbe) zwischen 40 und 320 pA; bei Vergrößerungen (Mag) bis zu 100.000× mit dem Detektortyp (Signal A) InLens oder SE2. Die Aufnahmen wurden zusammen mit Udo Geckle (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Angewandte Materialien) an einem Rasterelektronenmikroskop mit Schottky-Feldemitterkathode (Zeiss Merlin; potentielle Leistungsdaten: Beschleunigungsspannung 0,02-30 kV, Auflösung 0,8 nm bei 15 kV, Vergrößerung 12–2.000.000-fach) generiert.

2.9.3.2. Analyse der REM-Bilder von Nanostruktur-Arrays auf Glasträgern

In Realität weisen AuNP-Arrays stets eine von der Hexagonalität abweichende Struktur auf (unregelmäßige Sechsecke), was gemeinhin als quasi-hexagonal umschrieben werden kann. Zur Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder der AuNP-Arrays wurden das vom Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme (Stuttgart) zur Verfügung gestellte Plugin *dot analyse2* mit `ImageJ (Fiji)` genutzt. Mit diesem Programm konnten der mittlere Partikelabstand d sowie der Ordnungsparameter Ψ_6 bestimmt werden. Zugrunde liegt dieser Datenprozessierung die Annahme, dass die Punktverbindungen von einem (zentralen) Partikel j zu seinen ihn umgebenden sechs nächsten Nachbarpartikeln k in einem regelmäßigen Sechseck (Hexagon) exakt denselben Abstand d haben und zwei direkt benachbarte Abstandsstrecken ausgehend von demselben zentralen Partikel den Winkel θ_{jk} gleich 60° einschließen (Abb. 2.3). Diese hexagonale Ordnung (Ψ_6) ist in Formel 2.3 beschrieben. Sie kann Werte zwischen 0 und 1 (Hexagonalität) annehmen und ist indirekt proportional zur Standardabweichung, *standard*

deviation (SD) des mittleren Partikelabstandes d (Williges et al., 2013).

$$\Psi_6 = \left| \frac{1}{N_V} \sum_j \sum_k e^{i6\theta_{jk}} \right| \quad \text{sodass} \quad 0 \leq \Psi_6 \leq 1 \tag{2.3}$$

Die innere Summe berechnet die Abweichung von einem idealen Hexagon mit sechs 60° Winkeln zu den Winkeln der realen Nanostruktur (deformierte Hexagons), während die äußere Summe die Berechnung für alle im Bild identifizierten deformierten Hexagons wiederholt. N_V ist die Anzahl von Verbindungen zwischen dem zentralen Partikel und den ihn umgebenden sechs nächsten Nachbarpartikeln, wobei $1/N_V$ den berechneten Wert normalisiert.

Mit dieser internen Berechnung des Plugins konnten Array-Bilder in 50.000-facher Vergrößerung des PS1058- und PS3365-Polymers zur Ermittlung des mittleren Partikelabstandes und Ordnungsparameters ausgewertet werden. Die kleinere Abstände bildenden PS154- und PS288-Polymer-Arrays konnten aufgrund der schlechten Rohbildqualität (vor allem wegen zu schwachen Kontrasts) keiner solchen automatisierten Bildanalytik unterzogen werden und wurden über manuelles Ausmessen der Abstände mit `ImageJ (Fiji)` von Bildern in 100.000-facher Vergrößerung lediglich hinsichtlich ihres mittleren Partikelabstandes charakterisiert und die Nanostruktur in ihrer hexagonalen Anordnung lediglich optisch bewertet.

2.9.3.3. Berechnung der Partikeldichte von Nanostruktur-Arrays auf Glasträgern

Nach erfolgter BCML liegen die AuNP in annähernd geordneter Periodizität in einer 2-dimensionalen hexagonalen Anordnung im Partikelabstand d zueinander vor (Abb. 2.3). Diese Anordnung entstand im Prozess der Glasträgerbeschichtung (siehe Abschnitt 2.9.2.2) durch Selbstanordnung der $HAuCl_4$-beladenen Mizellen. Unter der Annahme, eine Mizelle hat lückenlosen Kontakt zu sechs umliegenden Mizellen, entspricht der Partikelabstand dem Durchmesser der $HAuCl_4$-beladenen Mizellen. Dieses hexagonale Gitter, dessen Gitterpunkte die Mizellenzentren und später die AuNP-Mittelpunkte darstellen (Abb. 2.3), weist die höchstmögliche Packungsdichte uniformer Kugeln in der Ebene auf (Lagrange, 1775). Die Packungsdichte η - der Anteil der Ebene, der von den Mizellen bedeckt wird - kann, wie in Abb. 2.3 gezeigt, anhand eines in zwei gleichseitige Dreiecke der Seitenlänge d zerlegten Fundamentalparallelogramms (Leppmeier, 1997) nach Formel 2.4 errechnet werden und erreicht eine Flächenbedeckung von näherungsweise 90,7%.

$$\eta = \frac{3A_{\text{Sektor}}}{A_{\text{Dreieck}}} = \frac{3\left(\frac{\pi}{24}d^2\right)}{\left(\frac{\sqrt{3}}{4}d^2\right)} = \frac{\pi\sqrt{3}}{6} \approx 0,9068996821 \tag{2.4}$$

Über die Packungsdichte η und die allgemeine Kugeldichte K (Formel 2.5) wird die AuNP-

Dichte n (Formel 2.6) bestimmt.

$$K = \frac{1}{\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2} \tag{2.5}$$

$$n = K\eta = \frac{2}{d^2\sqrt{3}} \tag{2.6}$$

2.10. Herstellung und Charakterisierung der Hydrogelmatrix

Die Hydrogelmatrix ist eine biohybride Polymermatrix. Das Netzwerk bilden zwei kovalent miteinander verknüpfte Komponenten, sPEGthiol ($MW_{sPEGthiol}$ 10.000; Abb. 2.4) und Maleimid-funktionalisiertes Heparin ($MW_{Heparin}$ 15.000±2.000; Abb. 2.5).

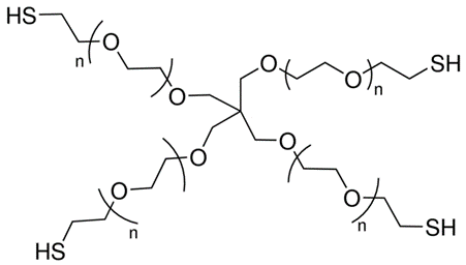


Abbildung 2.4.: Chemische Struktur von sPEGthiol.

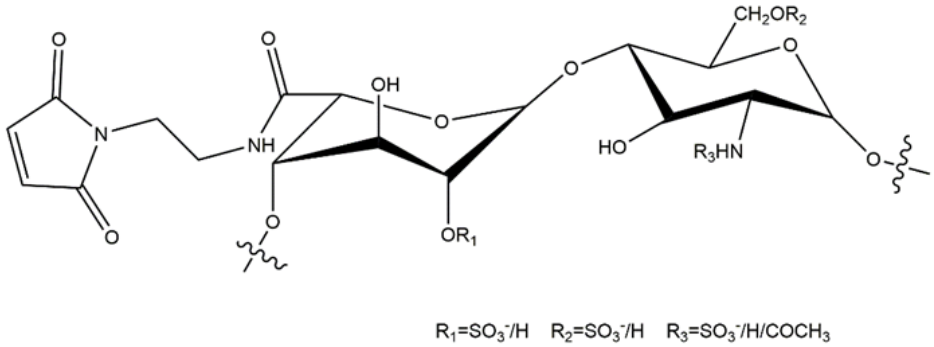


Abbildung 2.5.: Chemische Struktur von Heparin-Maleimid-Konjugat. Maleimid-Funktionalisierung einer repräsentativen Disaccharideinheit im Heparinmolekül.

2.10.1. Synthese von Heparin-Maleimid-Konjugat

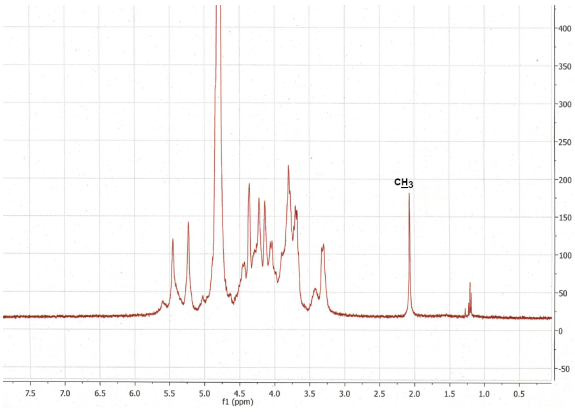
Das Syntheseprotokoll für das HM wurde dem Protokoll von Tsurkan et al. (2013) entlehnt und modifiziert. Eine Lösung von 1 g (6.6×10^{-2} mmol) Heparin (porcin, MW 15.000 ± 2.000) wurde in 3,5 ml ddH_2O mithilfe eines Rührfisches in einem Schnappdeckel-Glasgefäß auf dem Magnetrührer gelöst. Nach vollständigem Lösen des Heparins in Wasser wurde das Gefäß auf Eis gestellt. Das hier genutzte Heparin mit einem mittleren Molekulargewicht von 15 kDa besitzt pro Molekül in Näherung 25 Carboxylgruppen (Nie et al., 2007). Die

folgende Maleimid-Funktionalisierung wurde durch Aktivierung der Carboxylgruppen mit *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) als Abgangsgruppe für die Substitution mit *N*-(2-Aminoethyl)maleimid ermöglicht. Dafür wurden 147 mg (0,678 mmol; 1,5-facher molarer Überschuss zum Maleimid-Amin) Sulfo-NHS Natriumsalz sowie 270 mg (1,408 mmol; 3-facher molarer Überschuss zum Maleimid-Amin) EDC Hydrochlorid in jeweils 500 µl ddH_2O gelöst und zur Heparinlösung gegeben. Nach 20 min unter Rühren auf Eis kamen 115 mg (0,452 mmol) *N*-(2-Aminoethyl)maleimid-trifluoracetat, gelöst in 500 µl ddH_2O, hinzu. Die Substitutionsreaktion am Sulfo-NHS-Heparinester lief alsdann unter Rühren über Nacht bei RT ab.

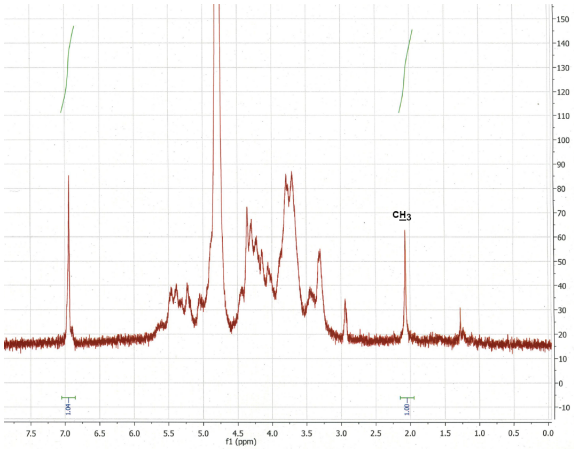
Das so synthetisierte HM wurde im Anschluss über Dialyse aufgereinigt, um freies Maleimid und die Reaktionsnebenprodukte, Sulfo-NHS sowie hydrolysiertes EDC, zu entfernen. Dazu wurden zwei Dialyseschläuche (hochrein, regenerierte Cellulose, MWCO 8.000, Flachbreite 24 mm, Durchmesser 15 mm) von ca. 24 cm Länge für mindestens 30 min in ddH_2O getränkt und mit ddH_2O gespült. Gewichtete Dialyseklammern wurden ca. 2 cm vom Schlauchende angebracht und die Hälfte der Reaktionslösung pro Schlauch gefüllt, und ungewichtete Dialyseklammern unter Einschluss einer Luftblase ca. 2 cm vom oberen Schlauchende geschlossen. Dialysiert wurde zunächst gegen 1800 ml 1 M Natriumchloridlösung, 3× für jeweils 1 h. Es erfolgten weitere vier Dialyseschritte mit 1800 ml ddH_2O, wobei die erste Wasserdialyse über Nacht, die zweite bis vierte für etwa 1 h erfolgten. Schließlich wurde die Lösung aus beiden Schläuchen in einen Rundkolben (500 ml) überführt und dieser unter Rotation zur Verteilung der Lösung auf eine größtmögliche Oberfläche in flüssigem Stickstoff getaucht. Die so schockgefrorene HM-Lösung wurde mindestens über Nacht gefriergetrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde das nun watteartige HM gewogen und bei -20°C gelagert.

2.10.2. Bestimmung des Maleimid-Funktionalisierungsgrades

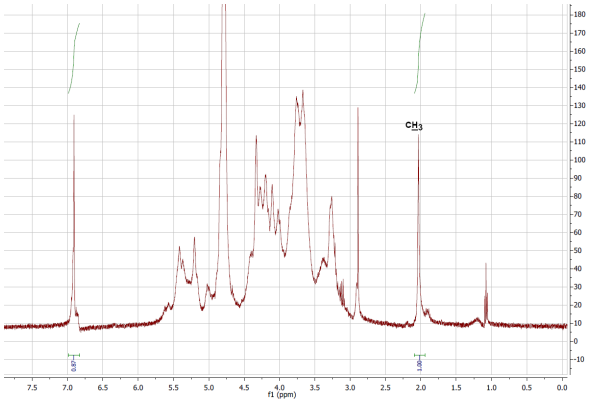
Der Grad der Maleimid-Funktionalisierung des HM wurde durch Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance* (NMR))-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente als Referenzsubstanz ein über *high performance size exclusion chromatography* charakterisiertes HM mit 6 Maleimiden pro Heparinmolekül (Tsurkan et al., 2013), zur Verfügung gestellt von Uwe Freudenberg (Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Institut für Biofunktionelle Polymermaterialien). Für die Analytik wurden 10–15 mg der Probe in 200 µl deuteriertem Wasser (D_2O) gelöst und einer NMR-Messung (Avance 400 MHz Spektrometer, Bruker) von Domenic Kratzer (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Funktionelle Grenzflächen) bzw. Toufik Naolou (Leibniz Universität Hannover, Institut für Zellbiologie und Biophysik) unterzogen. Die ^{1}H-Spektraldaten sind mit der Software `MestReNova` ausgewertet worden. Die Abszissenskalierung wurde auf die chemische Verschiebung des Deuteriumoxid-Signals (δ = 4,79) intern referenziert. Mithilfe eines für (porcinem) Heparin charakteristischen CH_3-Peaks



(a) ^{1}H-NMR-Spektrum von Heparin



(b) ^{1}H-NMR-Spektrum von HM 6



(c) ^{1}H-NMR-Spektrum von HM 5,02

Abbildung 2.6.: Repräsentative ^{1}H-NMR-Spektren von porcinem Heparin und dessen Produkten nach Funktionlisierung mit Maleimid. Während das ^{1}H-NMR-Spektrum von porcinem Heparin (Molekülmasse = 15.000 ± 2.000) kein ^{1}H-Signal einer chemischen Verschiebung im Bereich von δ = 6,0 bis 7,5 ppm aufweist (a), ist eine deutliche chemische Verschiebung bei $\delta \approx$ 6,9 ppm (Maleimid-Peak) in den ^{1}H-NMR-Spektren des Maleimid-funktionlisierten porcinen Heparins erkennbar (b, c). Die Quantifizierung des Maleimid-Funktionalisierungsgrades (Integral des Maleimid-Peaks) erfolgte über die Relation zum Integral des für Heparin charakteristischen CH_3-Peaks bei $\delta \approx$ 2,1 ppm. Gezeigt sind hier Heparin-Maleimid-Konjugate (HM) mit berechneten 6,0 (b) bzw. 5,02 (c) Maleimidgruppen pro Heparinmolekül.

(Pomin, 2014) bei $\delta \approx$2,1 ppm (Abb. 2.6a), dessen Integral auf 1 gesetzt wurde, konnte das Integral des Maleimid-Peaks ($\delta \approx$6,9 ppm) (Abb. 2.6c) bestimmt werden. In Relation zum Integral des Maleimid-Peaks der Referenzprobe (Funktionalisierungsgrad 6 Maleimide pro Heparinmolekül, Abb. 2.6b) sind so Funktionalisierungsgrade der Proben zwischen 4,44 und 5,19 (Tabelle 2.17) bestimmt worden. Der Funktionalisierungsgrad (Anzahl von Maleimiden pro Heparinmolekül) bildete die Grundlage zur Berechnung der einzusetzenden sPEGthiol-Menge für die Bildung der Hydrogelmatrix.

Tabelle 2.17.: Ausbeute und Funktionalisierungsgrad verschiedener Heparin-Maleimid-Konjugat (HM) Synthese-Chargen

HM Charge	Ausbeute [%]	Funktionalisierungsgrad(*)
A	88	5,02
B	76	4,44
C	91	5,19
D	91	5,13

(*) berechnete Anzahl von Maleimiden pro Hemparinmolekül

2.10.3. Herstellung der Biohybridhydrogelmatrix

Maleimide weisen wegen ihrer starken Elektrophilie durch ihre C=C-Doppelbindung eine hohe Regioselektivität gegenüber Thiole (nicht aber Disulfide) bei pH-Werten zwischen 6,5 und 7,5 auf. Unter alkalischen Bedingungen (pH>8,5) reagieren Maleimide bevorzugt mit primären Aminen und die Hydrolyserate des Maleimidrings zu nichtreaktiver Maleamidsäure ist erhöht (siehe Webseite von ThermoFischer[1]).

In der Reaktion mit einem Thiol - einer thio-MICHAEL-Addition - gehen Maleimide als MICHAEL-Akzeptoren eine stabile Succinimid-Thioether-Bindung ein, deren Rückreaktion (retro-MICHAEL-Reaktion) durch die irreversible hydrolytische Ringöffnung zur Succinamidsäure-Thioether-Bindung unterbunden werden kann (Fontaine et al., 2015). Die Ringöffnungsreaktion nach Thioetherbildung von sPEGthiol und HM wird durch den elektronenziehenden Stickstoff der Aminoethylgruppe, der Verbindungsgruppe zwischen Maleimid und Heparin im HM (Abb. 2.5), beschleunigt, wodurch unerwünschte Austauschreaktionen mit weiteren Thiolverbindungen verhindert werden, was die Langzeit-Stabilität des Maleimid-Thiol-Konjugats wesentlich erhöht (Fontaine et al., 2015).

Die thio-MICHAEL-Addition ist sehr spezifisch und läuft ohne Nebenprodukte ab. Sie verläuft selbst ohne Katalysator schnell und das unter physiologischen (wässrigen) Bedingungen. Die Reaktion wird daher auch als *Click*-Reaktion bezeichnet (Nair et al., 2014). Um die Reaktionskinetik zugunsten gleichmäßiger Netzwerkbildung beim Mischen beider Hydrogelkomponenten zu verlangsamen, wird die Reaktion bei auf ≈6,4 reduziertem pH-Wert des Puffers durchgeführt (Darling et al., 2016).

[1] `https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/sulfhydryl-reactive-crosslinker-chemistry.html`

2.10.3.1. Präparation nanostrukturierter und unstrukturierter Hydrogele

Hydrogelscheiben zur Anwendung in Zellkulturplatten Für Hydrogele zur Anwendung in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen (24-*Well* Platte), wurde ein Gesamtvolumen der Präpolymerlösung von 160 µl pro Gel kalkuliert. Gele für initiale Experimente zur Charakterisierung des Schwellverhaltens der Matrix (Abschnitt 2.10.4.1) und ein Teil der Gele, die der Rotationsrheometrie unterzogen wurden (Abschnitt 2.10.4.2), wurden mit einer HM-Konzentration von 1,5 nmol/µl der HM Funktionalisierungsgrade 4,5 und 4,6 angesetzt, woraus ein kalkulierter Feststoffgehalt (HM+sPEGthiol bezogen auf die Präpolymerlösung) von ≈3,8% resultierte. Ebenso wurden die Gele für Zellverträglichkeitsexperimente (Abschnitt 2.19) mit einer HM-Konzentration von 1,5 nmol/µl und HM Funktionalisierungsgrad 4,96 präpariert, woraus ein kalkulierter Feststoffgehalt (HM+sPEGthiol bezogen auf die Präpolymerlösung) von 3,93% resultierte. Für alle weiteren Anwendungen erwies sich eine Erhöhung der HM-Konzentration vor allem für den Übertrag des AuNP-Arrays als vorteilhaft, weswegen die eingesetzte HM-Konzentration über verschiedene Chargen hinweg konstant bei 2 nmol/µl gehalten wurde. Je nach Funktionalisierungsgrad der HM-Charge wurde die Menge an sPEGthiol so kalkuliert, dass Maleimid- und Thiol-Gruppen stöchiometrisch ausgeglichen wurden, in der theoretischen Annahme eines maximalen Vernetzungsgrades der Matrix. Die berechneten Massen an sPEGthiol und HM wurden in jeweils gleichen Volumina kalten Phosphatpuffers (0,1 M, pH ≈6,4 bei RT) vollständig gelöst und auf schmelzendes Eis gestellt. Pro Gel wurden 80 µl des gelösten sPEGthiol in ein 500 µl-Reaktionsgefäß aliquotiert und auf Eis bereitgestellt.

Die Gele wurden in Form runder Scheiben gefertigt, die durch Gießen der Präpolymerlösung in eine manuell zusammengesetzte Gussform (Abb. 2.7) entstand. Dazu dienten als Abstandshalter (*Spacer*) zur Gelscheiben-Dickendefinition zwei übereinander liegende und über einen Wasserfilm (ddH_2O) aneinander haftende Deckgläschen (18×18 mm, Stärke 5 mit 0,5–0,6 mm Dicke). Zwei dieser *Spacer* wurden wasserbenetzt beidseitig auf einen Objektträger (76 × 26 mm) gelegt. Im Bereich zwischen den *Spacer*n wurde ein Wassertropfen (V ≈0,8 µl ddH_2O) platziert, um ein nanostrukturiertes Deckgläschen (mit Nanostruktur nach oben zeigend) bzw. blankes Deckglas (18×18 mm, Stärke 1 mit 0,13–0,16 mm Dicke) auf dem Objektträger adhäsiv zu befestigen. Auf einem langen Deckgläschen (26×40 mm, Stärke 1) wurde mittig überlappend ein rundes Deckgläschen (Durchmesser 15 mm, Stärke 1) über einen Wassertropfen (V ≈0,8 µl ddH_2O) befestigt. Nach Benetzen der *Spacer* mit je einem Wassertröpfchen konnte das präparierte lange Deckgläschen so auf die *Spacer* gesetzt werden, dass visuell das runde Deckglas nach unten zeigend auf dem nanostrukturierten Deckglas zentriert war (Abb. 2.7B). In den mit dieser Konstruktion gebildeten Zwischenraum zwischen beiden kleinen Deckgläschen (Abb. 2.7C) wurde die Präpolymerlösung einpipettiert.

Die Präpolymerlösung wurde durch Mischen beider Lösungskomponenten - das in Phosphatpuffer gelöste sPEGthiol und HM - hergestellt. Wegen der rapiden Reaktionsgeschwindigkeit

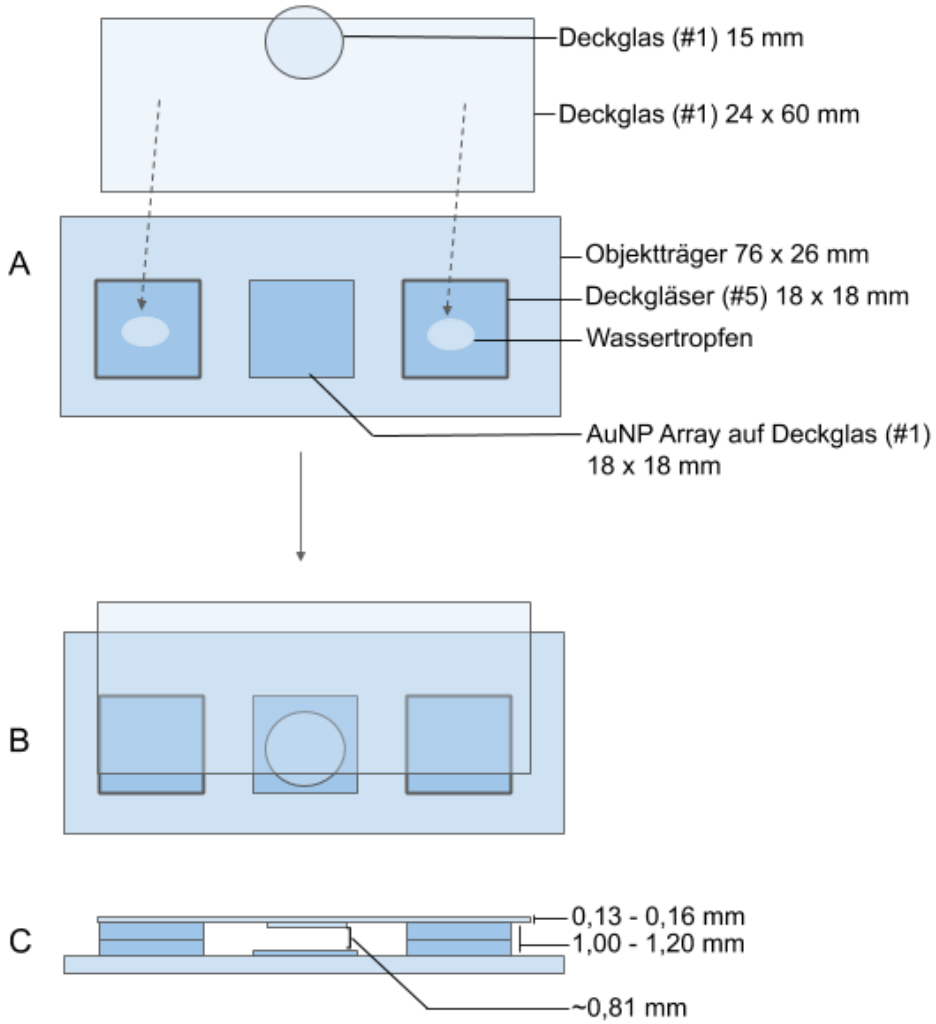
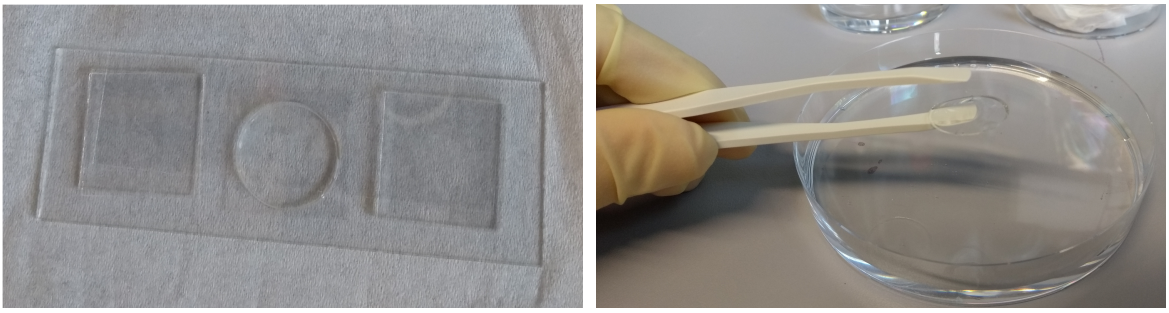


Abbildung 2.7.: Schema der Gussformzusammensetzung. Teile vor Zusammensetzen der Oberauf die Unterseite (A); fertige Gussform in Aufsicht (B), Seitsicht (C). # Stärke: #1 = 0,13–0,16 mm Dicke; #5 = 0,5–0,6 mm Dicke

der Thiol-Michael Addition wurde die Präpolymerlösung für jedes Gel einzeln unmittelbar vor dem Gießen angesetzt. So wurden zuerst 80 µl der HM-Lösung mit einer 200 µl-Pipette aufgezogen, der Einstellring auf 160 µl weitergedreht, um dann die aufgezogene HM-Lösung in der Pipettenspitze mit den zuvor aliquotierten 80 µl der sPEGthiol-Lösung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zu durchmischen und sogleich in den Spalt der Gussform zu pipettieren bis das runde Deckglas vollständig mit Gel benetzt war. Ein geringes Restvolumen verblieb in der Pipettenspitze, wurde in das Reaktionsgefäß zurückgegeben und diente als Gelierungskontrolle. Die Gele polymerisierten in der kovalenten Vernetzungsreaktion für ca. 10 min bei RT, ehe sie samt Gussform (Abb. 2.8a) in eine mit phosphatgepufferte Salzlösung, *phosphate buffered saline* (PBS) gefüllte Petrischale (Durchmesser 94 mm) getaucht wurden. Durch das Tauchen in Flüssigkeit kann die Gusskonstruktion einfach auseinander genommen werden, wobei das Gel mit beiden begrenzenden Deckgläsern verbunden bleibt und mit diesen in eine



(a) Gussform mit Gel **(b)** Handhabung der Gele mit Pinzette

Abbildung 2.8.: Hydrogel nach Präparation. Fotografie eines Gels (zentrale Kreisscheibe) in Gussform nach Gelieren (a) und geschwollenes Gel nach Ablösen aus der Gussform (b). Gele wurden nur noch auf der Pinzette aufliegend transferiert.

neue PBS gefüllte Petrischale gelegt werden kann. Die Gele schwollen so über Nacht bei 37°C im Zellinkubator (37°C, 5% CO_2, bis 95% relative Luftfeuchtigkeit (r.F.)) aus.

Am Folgetag ließ man die Gele auf RT abkühlen, nahm sie mit dem quadratischen Trägerglas zwischen handschuhbekleidetem Daumen und Zeigefinger, tauchte sie mit dem runden Deckglas nach unten orientiert in PBS und löste sie in PBS durch Unterschieben am Rand mit einer flachen Plastikpinzette vorsichtig vom nanostrukturierten bzw. blanken Deckglas ab. Blanke Deckgläser lösen sich mit leichtem Unterschub der Pinzette am Rand vom Gel, bei nanostrukturierten Deckgläsern muss die Pinzette bis zu etwa einem Drittel des Geldurchmessers zwischen Glas und Gel untergeschoben werden, um das Gel anzulösen und dann durch Schwerkraft und Kohäsion mit PBS zu lösen. Bei diesem Prozess löst sich das runde Deckglas (meist) von selbst vom Gel. Ab sofort wurden die Gele nur noch manövriert, indem man mit einer flacher Plastikpinzette unterhob (Abb. 2.8b). Für die Anpassung des Geldurchmessers an den Durchmesser der Vertiefung (*Well*) der 24-*Well* Zellkulturplatte wurden die Gele auf eine (trockene) Plastikpetrischale gesetzt und mit dem Henkellocheisen (Durchmesser 15,5 mm) nachgestanzt.

Gelherstellung für die Rheologie Für die Rotationsrheometrie (Abschnitt 2.10.4.2) wurden Gelscheiben mithilfe einer wie oben beschriebenen und in Abb. 2.7 ähnlich aufgebauten Gussform hergestellt. Als *Spacer* fungierten zur Dickenerhöhung jedoch 3 über einen Wasserfilm aneinander haftende Deckgläschen (18×18 mm, Stärke 5 mit 0,5–0,6 mm Dicke) und im Bereich zwischen den *Spacer*n wurden auf den Objektträger 2 blanke Deckgläschen (18×18 mm, Stärke 1 mit 0,13–0,16 mm Dicke) übereinander positioniert und als Gegendeckglas diente ein rundes (Durchmesser 15 mm, Stärke 1), woraus eine Geldicke von etwa 1,2 mm resultierte. Es wurden so 6 Gelscheiben gefertigt, wovon drei nach Ausschwellen wie in Abschnitt 2.10.3.2 beschrieben sterilisiert wurden, die anderen drei als unbehandelte Kontrollen verblieben.

Für Kompressionsmessungen (Abschnitt 2.10.4.2) wurden Gelscheiben von etwa 10 mm Durchmesser und 4 mm Dicke gefertigt. Dazu wurden 2 ml-Einwegspritzen (Polypropylen-Zylinder, Polyethylen-Kolben) als Gussformen genutzt, die im oberen Drittel vom Düsenende aus durchtrennt wurden und nur der verbleibende Zylinder mitsamt Kolben als Gefäß diente. Rund 315 µl Präpolymerlösung wurden zur Fertigung eines Gels einpipettiert. Gefertigt wurden 6 Gele, die nach Gelieren jeweils kopfüber in ein mit PBS gefülltes 50 ml-Zentrifugenröhrchen getaucht und verschlossen mehrere Tage im Kühlschrank inkubiert wurden. Die Gele konnten durch leichten Schub des Kolbens aus der Gussform gelöst werden. Drei Gele verblieben als unbehandelte Kontrollen, die restlichen drei Gele wurden wie in Abschnitt 2.10.3.2 beschrieben sterilisiert.

2.10.3.2. Sterilisierung der Gele

Zunächst wurde die Bodenschale autoklavierter Glaspetrischalen von außen mit Beschriftungsband beklebt, welches auf der Klebeseite mit Kugelschreiber den jeweiligen Nanostrukturarraytyp trug. Für eine Anwendung der Gele als Zellkulturmatrix wurden sie unter der Sterilbank in die zuvor markierten trockenen Glaspetrischalen überführt und 2× in 80% (v/v) Ethanol (EtOH) für je 20 min sterilisiert. Nach vollständiger Abnahme des Ethanolgemisches gab man langsam steriles PBS hinzu, um sie für ca. 20 min anschwellen zu lassen, dann folgte weiteres Schwellen 2× für mindestens 20 min in PBS. Für den Transfer der Gele in 24-*Well* Zellkulturplatten wurden 1 ml steriles PBS pro *Well* vorgelegt. Mit einer in 80% (v/v) EtOH sterilisierten flachen Plastikpinzette wurden die Gele mit Bedacht in die *Wells* überführt und 500 µl steriles PBS aufpipettiert. Danach wurde die *Well*platte geneigt und sich am Rand sammelndes PBS abgenommen bis das Gel auf dem Boden auflag. Zur Zwischenlagerung im Kühlschrank wurde 1 ml steriles PBS auf jedes Gel pipettiert und die Platte nach Auflegen des Deckels mit Verschlussfolie (Parafilm) umschlossen.

2.10.3.3. Einbettung der Gele in Zellkulturplatten

Die Fixierung der Gelscheiben im *Well*, um ein Ansammeln von Zellen im Spalt zwischen Gelrand und *Well*rand zu vermeiden, konnte durch Füllen dieses Ringspalts mit Präpolymerlösung realisert werden. Dazu wurden wie oben beschrieben sPEGthiol und HM separat in kaltem Phosphatpuffer (0,1 M, pH ≈6,4 (RT)) gleichen Volumens vollständig gelöst, mit einer 10 ml Spritze aufgezogen und über einen Spritzenfilter (Filtrationsdurchmesser 4 mm, Porengröße 0,22 µm) sterilfiltriert. Die sterile sPEGthiol-Lösung wurde zu je 25 µl aliquotiert und kühl gestellt. Über Neigung der die Gelscheiben enthaltenden *Well*platte wurde PBS möglichst restlos am *Well*rand mithilfe einer 1000 µl- und 100 µl-Pipette abgenommen. Dann wurden 25 µl sterile HM-Lösung mit einer Pipette aufgezogen, der Einstellring auf 50 µl weitergedreht und mit den aliquotierten 25 µl sPEGthiol-Lösung gemischt. Die Präpolymerlö-

sung wurde sofort am *Well*rand entlang ins gelscheibenbeladene *Well* entlassen. Nach mind. 10 min Reaktionszeit wurde pro *Well* 1 ml steriles PBS aufpipettiert, die Platte mit Deckel und Verschlussfolie (Parafilm) umschlossen und bis zur weiteren Nutzung im Kühlschrank aufbewahrt.

2.10.4. Mechanische Eigenschaften der Hydrogelmatrix

2.10.4.1. Bestimmung des Schwellverhaltens

Die Gele wurden i.d.Regel als flachzylindrische Scheiben wie in Abschnitt 2.10.3.1 beschrieben manuell gefertigt. Die Strukturstabilität der Gelscheiben hängt entscheidend von der sie umgebenden Lösung und dem resultierenden osmotischen Schwelldruck ab, sodass die Gelscheiben nach der Herstellung mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH ≈6,4 bei RT) einen Schwellprozess in PBS durchlaufen. Grund hierfür ist das biologische Matrixmolekül Heparin bzw. HM, wodurch die Gele einen polyanionischen Charakter erhalten. Das Heparinmolekül verhält sich wie ein Polyelektrolyt, das seine hohe repulsive Energie zwischen den vielen negativ geladenen Gruppen durch die Bindung von Kationen wie Na^+ und K^+ aus der physiologischen Pufferlösung (PBS) minimiert (Capila und Linhardt, 2002). Bei physiologischer Salzkonzentration (PBS) besteht so ein hoher Abschirmungseffekt der polyanionischen Heparinketten zueinander. Hinzu kommt, dass der Effekt des ausgeschlossenen Volumens (*excluded volume effect*) durch die sPEG-Ketten an Einfluss gewinnt und die Expansion des Gels zusätzlich limitiert (Freudenberg et al., 2012). Bei zu geringer Ionenstärke der Lösung übersteigt die Schwellkraft die elastische Retraktionskraft des Gelnetzwerks, was auf die dominierende elektrostatische Repulsion der Heparinketten und einhergehender Expansion unter Wasseraufnahme zurückführbar ist.

gravimetrisch Die Netzwerkdichte kann u. a. (siehe Abschnitt 2.10.4.3) über das Schwellverhalten des Gels charakterisiert werden (Subramani et al., 2020). Beim Schwellen bzw. bei Quellung des Gels dringt Lösungsmittel in das Netzwerk bis zu einem Gleichgewichtszustand ein, in dem vorrangig elastische Rückstellkräfte, die durch die kovalenten Bindungen im Netzwerk verursacht werden, einem weiteren Anschwellen entgegenwirken (Borck, 2005). Ein hohes Quellungsvermögen weist auf ein weitmaschiges, ein niedriges auf ein engmaschiges Netzwerk hin und findet im Quellungsfaktor q Ausdruck. Der Quellungsfaktor q wurde als Quotient aus dem Probengewicht des gequollenen Gels W_q (Feuchtmasse) zum Probengewicht des getrockneten Gels W_t (Trockenmasse) berechnet (Formel 2.7).

$$q = \frac{W_q}{W_t} \tag{2.7}$$

Die Gelproben wurden wie in Abschnitt 2.10.3.1 beschrieben gefertigt. Die Gelscheiben wurden für 4 Tage in Phosphatpuffer (0,1 M, pH ≈6,4 bei RT) im Kühlschrank geschwollen. Nach Schwellung wurden die Gele für 2 h bei RT in PBS äquilibriert. Oberflächlich ungebundene Pufferlösung wurde mit einem fusselfreien, PBS-genässten Tuch abgetupft und die Gele wurden gewogen (W_q). Im Anschluss wurden die Gele bei -80°C gefroren, dann gefriergetrocknet und erneut gewogen (W_t). Es wurden 6 technische Replikate einer HM-Charge untersucht.

Ähnlich zum Quellungsfaktor konnte der gravimetrische Wassergehalt geschwollener Gele als Masseanteil in Prozent nach Formel 2.8 bestimmt werden.

$$w(\mathrm{H_2O}) = \frac{W_q - W_t}{W_q} * 100 \tag{2.8}$$

volumetrisch Die schwellungsbedingte Volumenänderung der Gele wurde anhand der eindimensionalen Längenänderung des Durchmessers bzw. Radius ausgeschwollener Gelscheiben bestimmt und dient der Einschätzung, inwieweit die Gelmatrixoberfläche die Abstände gebundener AuNP verändert. Dafür wurden Gelscheiben zweier HM-Chargen (Funktionalisierungsgrad 4,5 und 4,6), jeweils technische Triplikate, wie in Abschnitt 2.10.3.1 beschrieben, hergestellt. Der initiale Radius R_i nach Gelpräparation (relaxiertes Gel, ungeschwollen, nicht dehydriert) sowie der finale Radius R_s nach Schwellung (für 3 Tage in PBS im Kühlschrank) wurde mithilfe von Fotografien der Gele, die auf einem Kalibrier-Objektträger mit 100 µm-Skalierung (Media Cybernetics) platziert wurden, und der Software `ImageJ (Fiji)` aus angepassten Kreisflächen als Deckungsobjekte ermittelt. Aus den über die Kreisfächen ermittelten Radien wurde die radiale Schwellung S_{radial} nach Formel 2.9 ermittelt. Aus den Radien wurde außerdem die prozentuale Längenänderung $\Delta L_{\mathrm{radial}}$ berechnet (Formel 2.10).

$$S_{\mathrm{radial}} = \frac{R_s}{R_i} \tag{2.9}$$

$$\Delta L_{radial} = \frac{R_s - R_i}{Ri} * 100 \tag{2.10}$$

2.10.4.2. Bestimmung des Elastizitätsmoduls

Da Hydrogele durch ihren hohen Wasseranteil und ihre Formstabilität die mechanischen Eigenschaften von Flüssigkeiten (viskos) und Feststoffen (elastisch) in sich vereinen, werden sie als viskoelastische Materialien bezeichnet. Über eine oszillierende Scherbelastung einer Probe kann die einwirkende Schubspannung τ und die daraus resultierende Scherdeformation γ gemessen werden. Als weitere wichtige Messgrößen seien der Speichermodul G' als Maß für die bei einer Scherung vom Material gespeicherte mechanische Energie sowie der Verlustmodul G'' als Maß für die bei der Scherung vom Material umgewandelte Energie genannt. Diese Größen bilden den Realteil (G') bzw. Imaginärteil (G'') (Bolduan, 2018) in der formelmäßigen

Beschreibung des komplexen Schermoduls (Schubmodul) G^* (Formel 2.11 und 2.12).

$$G^* = G' + \mathrm{i}G'' \tag{2.11}$$

$$G^{*2} = G'^2 + G''^2 \tag{2.12}$$

Bei gelähnlichen Materialien überwiegen elastische Eigenschaften die viskosen ($G' > G''$). Bei einer ideal elastischen Verformung gilt $G' >> G''$ bzw. $G'' = 0$, sodass $G^* \approx G'$.

Als Materialkennwert wird üblicherweise der Elastizitätsmodul E (E-Modul, auch Youngscher Modul, *Young's modulus*) angegeben und kann für ein linear elastisches, isotropes Material aus der Poissonzahl ν (elastische Materialkonstante) und dem komplexen Schermodul G^* nach Formel 2.13 berechnet werden.

$$E = 2G^*(\nu + 1) \tag{2.13}$$

Rotationsrheometrie Bei Rotationsmessungen dreht sich der obere Messkörper in eine Richtung, während die untere Messplatte stillsteht. In der dazwischenliegenden zu untersuchenden Probe bildet sich so eine laminare Strömung im Scherspalt aus. Die rheologischen Eigenschaften des Hydrogelkörpers wurden durch oszillierende Scherexperimente mithilfe eines Rotationsrheometers (Platte-Platte-Messgeometrie, Plattendurchmesser 10 mm) bestimmt. Zwei Geltypen, d. h. ausgeschwollene Gelscheiben mit und ohne durchlaufenen Sterilisationsprozess derselben HM-Charge (Funktionalisierungsgrad 4,6) wurden den Oszillationsmessungen bei 37°C unterzogen. Es wurden Gele mit einem Feststoffgehalt (HM+sPEGthiol bezogen auf die Präpolymerlösung) von 3,8% und 5,03% bei einer Scherspannungsamplitude τ von 1 Pa bei einer Kreisfrequenz ω von 0,1 bis 100 rad/s gemessen. Im linearen Bereich der Kreisfrequenz ω wurden die Speicher- und Verlustmoduln als arithmetisches Mittel der Messwerte pro Probe bestimmt. Pro Geltyp wurde das arithmetische Mittel aus drei technischen Replikaten gebildet. Aus dem gemittelten G' bzw. G'' wurde nach Formel 2.11 bzw. 2.12 der komplexe Schermodul G^* berechnet und in Fortfolge der Elastizitätsmodul E nach Formel 2.13 ermittelt (siehe dazu Kompressionsmessung).

Kompressionsmessung Der Elastizitätsmodul kann nach Formel 2.13 aus der Poissonzahl ν und dem komplexen Schermodul G^* ermittelt werden. Die Poissonzahl ν ist eine dimensionslose Größe, die sich aus dem Verhältnis von Querdeformation zu Längsdeformation ergibt. Da für Hydrogele, die relativ inkompressibel sind, allgemein eine elastische Materialkonstante $\nu = 0{,}45$ angenommen wird (Li et al., 1993; Flores-Merino et al., 2010), aber die elastische Materialkonstante ν des vorliegenden Hydrogelsystems nicht bekannt ist, wurde für eine genauere Bestimmung des Elastizitätsmoduls der uniaxiale Druckversuch durchgeführt. Mithilfe der Kompression von zylindrischen Gelscheiben (Feststoffgehalt 5,03%, Präparation beschrieben

in Abschnitt 2.10.3.1) wurden die Proben in einer Zugprüfmaschine (Geldurchmesser << Plattengröße) bei einer Kompressionsgeschwindigkeit von 0,5 mm/s einer Dehnung, genauer Stauchung bis zu 30% ausgesetzt. Die Längsdeformation ε wurde aus dem Verhältnis der Längenänderung ΔL während Kompression zur initialen Höhe L_0 ermittelt. Daraus konnte der Elastizitätsmodul E als Steigung aus der initialen linearen Spannungs(σ)-Dehnungs(ε)-Kurve im Dehnungsbereich 0 bis 10% bestimmt werden (Formel 2.14).

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \tag{2.14}$$

Messungen zur Makrorheologie (Rotationsrheometrie und Kompressionsmessung) wurden mithilfe von Johanna Hafner, geb. Roether (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik - Angewandte Mechanik) durchgeführt und ausgewertet.

2.10.4.3. Berechnung der Maschenweite des Netzwerkes

Zur Abschätzung einer ungehinderten Diffusion von löslichen Molekülen innerhalb des Hydrogels wurde die Netzwerkdichte hinsichtlich Berechnung der Maschenweite des Gelmatrix-Netzwerkes beschrieben. Basierend auf der Gummielastizitätstheorie und der Annahme eines affinen Netzwerks, d. h. „bei einer Deformation des Netzwerks ändern sich die Kettenlängen im gleichen Verhältnis wie die makroskopischen Dimensionen" (Wrana, 2014), sodass alle Ketten in gleichem Maße zur Rückstellkraft nach Deformation beitragen, kann folgende Formel 2.15 (Freudenberg et al., 2009; Roether et al., 2018) für die Berechnung der Maschenweite ξ aus dem Speichermodul G' herangezogen werden, um eine mittlere Porengröße des Netzwerkes abzuschätzen. Dabei ist T die Temperatur (= 37°C bei Versuchsbedingung) und k_b die Boltzmann-Konstante.

$$\xi = \left(\frac{G'}{k_b T}\right)^{-1/3} \tag{2.15}$$

2.10.4.4. Mikrorheologie

Zur Untersuchung von lokalen mechanischen und strukturellen Eigenschaften der Hydrogelmatrix wurde die sogenannte *multiple particle tracking* (MPT)-Methode angewandt. Dies ist eine passive, nichtinvasive Mikrorheologie-Methode basierend auf dem Video-Tracking der Brown'schen Molekularbewegung von in der Probe eingebetteten Tracerpartikeln. Durch die Abhängigkeit der Partikelbewegung von den viskoelastischen Eigenschaften des umgebenden Materials, können diese mechanischen Eigenschaften auf einer µm-Längenskala beschrieben und Heterogenitäten der Matrix identifiziert werden (Roether et al., 2018). Dazu wurden beide Komponenten der Präpolymerlösung wie in Abschnitt 2.10.3.1 beschrieben gelöst. Die gelösten Komponenten HM bzw. sPEGthiol wurden jeweils mit unterschiedlich - rot oder

grün fluoreszierenden Tracerpartikeln (Polystyrol-Mikrokugeln, Durchmesser ≈200 nm) in einer Konzentration von ca. 4% (v/v) pro Komponente gedopt. So wurden zwei verschiedene Kombinationen (HM-rot und sPEGthiol-grün; HM-grün und sPEGthiol-rot) von Gelen gefertigt, die nach Mischen beider gedopten Präpolymerlösungskomponenten als kuppelförmiges Gel direkt auf ein Deckgläschen (24×60 mm) aufpippetiert wurden. Es wurden technische Duplikate gefertigt und pro Probe vier verschiedene Positionen der Gelschicht nahe der Glasoberfläche im Mikroskop (Zeiss Observer D1, 100×-Objektiv, Öl-Immersion), 1000 Bilder pro Fluoreszenzkanal in einer Bilddimension von 127×127 µm mit einer Bildrate von 0,2 s aufgenommen. Auf diese Weise wurde die Brown'sche Molekularbewegung der eingebetteten Tracerpartikel bei 20°C aufgezeichnet.

Die Versuche zur Mikrorheologie wurden mithilfe von Johanna Hafner, geb. Roether (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik - Angewandte Mechanik) durchgeführt und ausgewertet. Dabei fand die Software `Image Processing System` (iPS, Visiometrics, Deutschland) sowie ein selbstgeschriebener `Matlab` *Code*, basierend auf dem weit verbreiteten Crocker und Grier - Trackingalgorithmus (Crocker und Grier, 1996), Anwendung. Ermittelt wurde damit ein sogenanntes mittleres Verschiebungsquadrat, *mean square displacement* (MSD) eines jeden Tracerpartikels sowie die quantitative Beziehung zwischen MSD ($\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$) als Funktion der Latenzzeit τ und dem komplexen Schermodul $G^*(\omega)$ als Funktion der Frequenz. So konnte für ideal elastische Materialien ein frequenzunabhängiger Schermodul als lokale Elastizität $G_{0,\mathrm{MPT}}$ bestimmt werden (Roether et al., 2018).

2.11. Funktionalisierung nanostrukturierter Hydrogele

2.11.1. Peptidfunktionalisierung gebundener Nanostruktur

Für eine Funktionalisierung der auf der Geloberfläche gebundenen AuNP wurden die in Tabelle 2.6 aufgelisteten Peptidkonstrukte verwendet. Charakteristisch für diese ist die Aminosäure Cystein am N-Terminus, welche die reaktive Thiolgruppe zur Gold-Schwefel-Bindung am AuNP bereitstellt. Die Hydrogele wurden am Tag vor Zellbesiedlung nach einmaligem Waschen mit PBS für etwa 1 h mit 400 µl 10 μM Peptidlösung pro Gel (*Well*) für 3 h bei RT in der Sterilbank inkubiert. Es wird angenommen, dass die Reaktionszeit ausreicht, um die Bildung des Thiolats (S−Au) sowohl aus der Reaktion der Thiolgruppe als auch möglicher gebildeter Disulfide der Peptidkonstrukte mit den AuNP zu gewährleisten (Bard et al., 2018).

Da unter nichtreduzierenden Bedingungen bei physiologischem pH-Wert ($\approx 7,4$) gearbeitet wurde, kann angenommen werden, dass die Dissoziation der S−H-Bindung begünstigt wird, sodass neben der koordinativen Bindung die Konversion zur stärkeren kovalenten Gold-

Thiolat-Bindung (Cysteinthiolat) überwiegt. Oxidierte Goldoberflächen stabilisieren die Gold-Thiol-Verbindung, sodass über AFM-basierte Einzelmolekülkraftspektroskopie gemessene Bruchkräfte mit steigendem Umgebungs-pH zunehmen (Xue et al., 2014).

Schließlich folgten drei Waschschritte mit je 1 ml PBS pro *Well* für jeweils 20 min. Das Ausschwemmen unspezifisch gebundener Peptidkonstrukte aus der Matrix wird während der Waschschritte theoretisch dadurch erleichtert, weil sich die Peptidkonstrukte mit einer Nettoladung von -2 bzw. -1 und dem Fehlen basischer Aminosäuren von der polyanionischen Hydrogelmatrix elektrostatisch abstoßen. Der nächste Inkubationsschritt mit SDF-1α wird in Abschnitt 2.11.2 beschrieben.

2.11.2. Immobilisierung löslichen SDF-1α

Für eine Beladung der Gele mit löslichen Molekülen in Form nichtkovalenter Bindungen wurde im Versuchsaufbau das Protein SDF-1α verwendet. Humanes, rekombinantes SDF-1α wurde als Stocklösung von 90 µg/ml in 0,2% (w/v) BSA in PBS in Aliquots bei -80°C gelagert.

In Vorversuchen zur Anwendung in Zellexperimenten wurde das Binde- und Freigabeverhalten der Gelmatrix untersucht. Um die Physisorption von SDF-1α an Polystyrol der 24-*Well* Platte, im Folgenden TCP genannt, zu reduzieren, wurde die Platte mit sterilfiltrierter 1% (w/v) BSA in PBS-Lösung über Nacht im Kühlschrank inkubiert und am Folgetag 2× mit PBS gewaschen. Dann wurden die wie in Abschnitt 2.10.3.2 beschrieben sterilisierten Gelscheiben in die BSA-beschichteten *Wells* überführt. Anders als bei Zellexperimenten, wurden die Gele nicht durch Zugabe von Präpolymerlösung in den *Wells* fixiert. Nicht für den Versuch benötigte *Wells* wurden mit sterilem PBS gefüllt.

Für die SDF-1α-Beladung der Gele wurde eine Konzentrationsreihe von SDF-1α in sterilem PBS (90, 60, 30, 0 µg/ml) hergestellt und pro *Well* 350 µl der jeweiligen SDF-1α-Lösung auf die Gele bzw. in die BSA-beschichteten Kontroll*wells* (TCP) gegeben und für Zeitintervalle von 22 h sowie 44 h und 66 h im Zellinkubator (37°C, 5% CO_2, bis 95% r.F.) immobilisiert. Ein Teil der Inkubationslösung wurde für die spätere Analytik bei -80°C gelagert; ebenso wurde der Überstand nach Inkubation abgenommen und eingefroren. Die *Wells* mit den Gelen sowie die BSA-beschichteten Kontroll*wells* (TCP) wurden 2× kurz mit PBS gewaschen, um ungebundenes SDF-1α zu entfernen.

Zur Freisetzungsanalyse wurden 400 µl Basalmedium, hier Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium ohne weitere Zusätze, zugegeben (Zeitpunkt 0 h). Zu definierten Zeitpunkten nach 6 h, 24 h, 7 oder 9 Tagen sowie 14 Tagen wurde der Überstand vollständig abgenommen und bis zur Analytik eingefroren gelagert, und frisches Basalmedium (400 µl pro *Well*) zugegeben. Die Freisetzung von SDF-1α erfolgte unter Zellkulturbedingungen im Inkubator, wobei zum Zweck der Verdunstungsreduktion die *Well*platte mit Verschlussfolie

(Parafilm) umschlossen wurde.

Für eine SDF-1α-Beladung der Gele für die Zellkultur wurden die in den *Wells* eingebetteten und peptidfunktionalisierten Gele (Abschnitt 2.10.3.3 und 2.11.1) mit 350 µl 30 µg/ml SDF-1α in PBS über Nacht im Zellkulturinkubator inkubiert und am Folgetag für die Zellaussaat wie in Abschnitt 2.16.1 beschrieben vorbereitet.

2.12. Nachweis der Nanostrukturanbindung auf Hydrogelen

2.12.1. Stromlose Abscheidung von Gold an der Nanostruktur

Für den schnellen qualitativen Nachweis der AuNP auf der Hydrogeloberfläche wurde die stromlose Abscheidung von elementarem Gold an den Partikeln angewandt. Dies ist ein visuell wahrnehmbarer Nachweis, basierend auf dem kollektiven Oszillieren der Elektronen an der AuNP-Oberfläche nach Einfall von Licht mit der Resonanzfrequenz, ein Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz genannt wird (Hutter und Fendler, 2004). Das Oberflächenplasmon-Band ist dabei ein starkes und breites Absorptionsband im visuellen Spektrum, charakteristisch für metallische Nanopartikel größer als 2 nm (Moores und Goettmann, 2006). Für AuNP liegt dieses Band bei ≈520 nm. Unter anderem definiert der Nanopartikeldurchmesser die Wellenlänge des absorbierten und reflektierten Lichts. So besitzen bspw. AuNP mit einem Durchmesser von 16 nm in monodisperser kolloidaler Lösung eine maximale Absorption bei ≈520 nm, sodass komplementär rot/purpur-farbenes Licht reflektiert wird, während 83 nm-Partikel ≈550 nm maximal absorbieren und komplementär purpur/violett erscheinen (Abb. 2.9, López-Muñoz et al., 2012). Mit Vergrößerung des Partikeldurchmessers und folglich veränderter Oberflächenplasmonenresonanz kommt es zur Rotverschiebung der Absorptionswellenlänge und Licht wird vermehrt gestreut.

Für die Visualisierung des Anwachsens des Nanopartikeldurchmessers von hydrogeloberflächengebundenen AuNP wurde mit der von Brown und Natan (1998) beschriebenen NH_2OH/Au^{3+} *Seeding*-Technik, die auch für oberflächengebundene AuNP anwendbar ist (Lohmueller et al., 2008), gearbeitet. Die AuNP dienen als katalytische Keime für die kinetisch bevorzugte Reduktion von Au^{3+} aus der Lösung mithilfe von Hydroxylamin (NH_2OH) zu elementarem Au an der Partikeloberfläche. So wurde Hydroxylaminhydrochlorid ($[NH_3OH]Cl$) als 2 M Stocklösung in ddH_2O angesetzt. Goldsäure ($HAuCl_4 \cdot 3\,H_2O$) wurde zu 1%-iger (w/v) goldgelber Stocklösung in ddH_2O gelöst und bis zur Verwendung luftdicht und dunkel gelagert. Die Arbeitslösung bestand aus 0,1% (w/v) $HAuCl_4$ und 0,2 mM $[NH_3OH]Cl$ in ddH_2O. Für die Nachweisreaktion wurde das überschichtete PBS von den nanostrukturierten sowie zur Kontrolle unstrukturierten Hydrogelen komplett abgesaugt. Dann wurde die Arbeitslösung aufgetragen, sodass die Hydrogeloberfläche vollständig bedeckt war. Die Reaktionszeit betrug

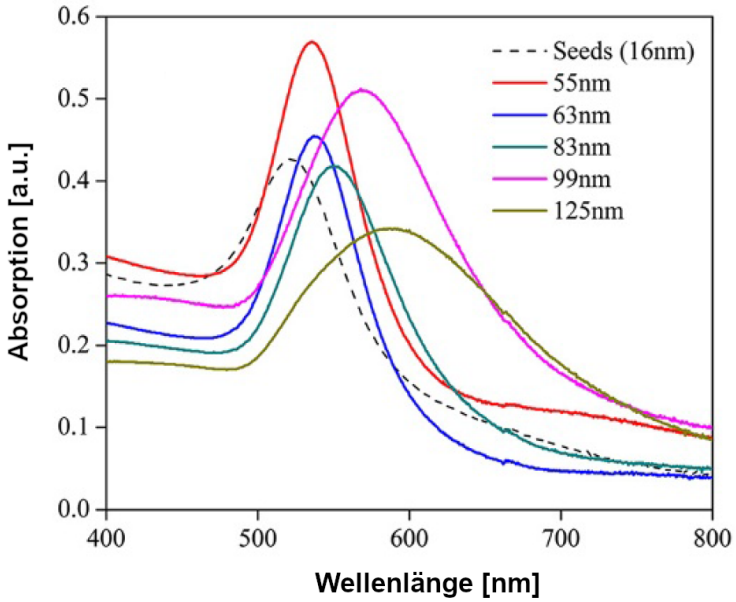


Abbildung 2.9.: Absorptionsspektren als Funktion der Wellenlänge in Abhängigkeit vom AuNP-Durchmesser einer monodispersen kolloidalen Lösung. Mit Vergrößerung des AuNP-Durchmessers verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu längeren Wellenlängen durch veränderte Oberflächenplasmonenresonanz. Bei einem Durchmesser >100 nm dominiert Lichtstreuung die Absorption. Abbildung entnommen aus López-Muñoz et al. (2012), frei verfügbar unter einer *Creative Commons CC BY*-Lizenz.

etwa 10 min. Eine Abscheidung von Gold an den Nanopartikeln war durch eine Violettfärbung der Oberfläche erkennbar. Von den Nachweisproben wurden Fotoaufnahmen gemacht.

2.12.2. REM-Aufnahmen nanostrukturierter Hydrogele

Für eine elektronenmikroskopische Darstellung (Methode siehe Abschnitt 2.9.3.1) der gebundenen AuNP-Struktur auf der Geloberfläche, wurden nanostrukturierte Gele in 80% (v/v) EtOH in H_2O und abschließend in absolut EtOH dehydriert und abgedeckt an der Luft getrocknet. Für die Bildaufnahmen zusammen mit Udo Geckle (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Angewandte Materialien - Energiespeichersysteme) am Feldemissionsrasterelektronenmikroskop (Zeiss Merlin) wurde das Gel zuvor im Hochvakuum-Coater (Leica EM ACE600) mit einer etwa 7 nm dicken Kohlenstoffschicht bedampft. Die Aufnahmen erfolgten bei einer Beschleunigungsspannung (EHT) von 2 bis 3 kV, einem Arbeitsabstand (WD) zwischen 2,6 und 6,5 mm, einem Sondenstrom (IProbe) zwischen 14 und 30 pA mit dem Detektortyp (Signal A) InLens.

2.12.3. ToF-SIMS nanostrukturierter Hydrogele

Die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie, *Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry* (ToF-SIMS) ist eine destruktive Oberflächenanalytik. Durch den Beschuss einer Probenoberfläche mit einem hochenergetischen Primärionenstrahl (z.B. Bi^+) im Hochvakuum wird innerhalb der obersten Nanometerschicht eine Stoßkaskade unter den Probenatomen ausgelöst, die neben überwiegend Neutralteilchen auch Elektronen und Sekundärionen emittiert (Benninghoven, 1994). Alle aus der Oberflächenschicht emittierten Sekundärionen werden auf einheitliche kinetische Energie beschleunigt, sodass sie anhand ihrer Flugzeit, die sie für eine nachfolgende Driftstrecke benötigen, allein durch ihre Masse vom Flugzeitmassenspektrometer separiert analysiert werden können (Tascon GmbH, 2021). Das Spektrum des Masse-Ladung-Verhältnisses detektierter Sekundärionen ist von der Art der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche abhängig. Die Signalintensität ist dabei ein Maß für die Teilchenmenge. Die räumliche bzw. laterale Auflösung ist auf ca. 100 nm begrenzt (Benninghoven, 1994). Bei Beschuss der Probenoberfläche mit Argon-Cluster aus einer Sputter-Ionenquelle kann die Oberflächenschicht erodiert und so ein chemisch-physikalisches Tiefenprofil erstellt werden (Ninomiya et al., 2009).

Die Messungen wurden im Rahmen der *Karlsruhe Nano Micro Facility* ermöglicht und von Alexander Welle (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Funktionelle Grenzflächen) an einem TOF.SIMS 5 (ION-TOF GmbH), ausgestattet mit einer mit Bismut gefüllten Flüssigmetall-Ionenkanone als Primärionenquelle und einem Reflectron-ToF-Analysator, durchgeführt. Die ToF-SIMS-Messung diente hier dem Nachweis der Bindung der AuNP der Nanostruktur auf der Hydrogelberfläche. Dafür wurden PS154-strukturierte sowie unstrukturierte Gele wie in Abschnitt 2.10.3.1 beschrieben mit einem HM Funktionalisierungsgrad von 4,67 und einem kalkulierten Feststoffgehalt (HM+sPEGthiol bezogen auf die Präpolymerlösung) von 5,06% gefertigt. Nach Sterilisierung der Gele (Abschnitt 2.10.3.2) wurden sie nach dem Rückschwellen in sterile Zellkultursilikoneinsätze (*flexiPERM® disc*), die auf einer Zellkulturschale (Durchmesser 10 cm) haftete, überführt.

Die Gele wurden für die halbquantitative Analyse von an Gold gebundenem Peptid (Abschnitt 2.13) mit dem Peptidkonstrukt C-PEG6-TQIDSPLN, kurz *IDSP*-Peptid, funktionalisiert (siehe Abschnitt 2.11.1) bzw. nur mit PBS inkubiert. Dann erfolgte die Dehydrierung in aufsteigender Aceton-Reihe. Um ein Anschwellen der Gele bei Mischungsverhältnissen von $\leq$50% (v/v) Aceton in Wasser zu verhindern, wurde bis zu diesem Mischungsverhältnis PBS als Lösungsmittel verwendet. Für Mischungsverhältnisse von $\geq$50% (v/v) Aceton wurde Wasser gewählt, um das Auskristallisieren der Puffersalze an der Oberfläche zu verhindern. Die Abfolge der Dehydrierung war: 10 min 30% (v/v) Aceton in PBS, 10 min 50% (v/v) Aceton in PBS, dann 2× 5 min 70% (v/v) Aceton in ddH_2O, 2× 5 min 80% (v/v) Aceton in ddH_2O, 2× 5 min 90% (v/v) Aceton in ddH_2O und final 10 min Aceton pur. Schließlich wurden die

Gele einer Kritisch-Punkt-Trocknung (Leica EM CPD300, mit CO_2) unterzogen und bis zur Messung staubfrei gelagert.

2.13. Relativer Nachweis der Peptidfunktionalisierung

Die in Abschnitt 2.12.3 beschriebene ToF-SIMS-Messung diente weiterhin der halbquantitativen Analyse von AuNP gebundenen Peptidkonstrukten - hier das *IDSP*-Peptid (Tabelle 2.6).

2.14. Nachweis der reversiblen Bindung von SDF-1α

2.14.1. Quantifizierung hydrogelgebundenen SDF-1α mittels ELISA

Der qualitative wie quantitative Nachweis des von der Matrix aufgenommenen und abgegebenen SDF-1α wurde antikörperbasiert mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) erbracht. Hier wurde ein *Sandwich* ELISA verwendet, der das Antigen zwischen zwei Lagen von Antikörpern, die jeweils unterschiedliche Epitope binden, detektiert. Es wurde ein ELISA *Kit* genutzt (Tabelle 2.9), bei welchem eine 96-*Well* Platte bereits mit dem SDF-1α spezifischen „Fänger"-Antikörper beschichtet ist. Darüber wurde das Antigen SDF-1α aus der Probenlösung immobilisiert und dann ein biotinylierter SDF-1α spezifischer Detektions-Antikörper zugegeben. Mithilfe von Streptavidin-*horseradish peroxidase (HRP)* und dem Chromogen-Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) konnte die Detektion mit einem UV/Vis-Spektrometer ermöglicht werden.

Die analytische Sensitivität des *Assay* beträgt 80 pg/ml und erschöpft sich bei 6000 pg/ml. Die Proben wurden unverdünnt oder verdünnt dem Herstellermanual entsprechend als technische Duplikate eingesetzt. Gearbeitet wurde mithilfe einer Mehrkanalpipette. Die Extinktion bei der spezifischen und unspezifischen Wellenlänge von 450 nm bzw. 550 nm wurde mit einem Plattenlesegerät (EnSpire®, Perkin Elmer Instruments) gemessen. Die aufgezeichneten Daten wurden in `Excel` berechnet und mit `Origin` graphisch dargestellt. Anhand einer mitgeführten SDF-1α Standardkonzentrationsreihe und der aus der resultierenden Standardkurve (Auftragung im dekadischen Logarithmus, polynomieller Fit) ermittelten Polynom der 4.Ordnung, konnte aus den Extinktionswerten die SDF-1α-Konzentration der Proben interpoliert werden. Werte der Duplikate wurden gemittelt und nur Werte mit Abweichung $\leq 10\%$ vom Mittelwert berücksichtigt.

2.15. Zellkultivierung

2.15.1. Steriles Arbeiten in der Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in Sicherheitswerkbänken der Klasse II (nach DIN EN 12469) unter Verwendung von sterilen Verbrauchsmaterialien, die entweder bereits vom Hersteller steril bezogen oder über Autoklavieren sterilisiert wurden. Kulturmedien waren als Fertigmedien (siehe Tabelle 2.4) vom Hersteller unter sterilen Bedingungen filtriert und abgefüllt, ebenso das für die Zellkultur genutzte PBS. Für steriles Wasser wurde ddH_2O autoklaviert, wogegen selbst angesetzte Puffer (siehe Tabelle 2.3) über sterile Filtermembranen mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert wurden. Fetales Rinderserum (FBS) wurde durch Behandlung bei 56°C für 30 min im Wasserbad unter gelegentlichem Schwenken hitzeinaktiviert (h.i.) und in Aliquots eingefroren gelagert (-20°C). Es wurde aseptisch und permanent antibiotikafrei gearbeitet. Die Kontrolle über mikrobiologische Kontaminationen der Zellkulturen erfolgte visuell über Lichtmikroskopie und ggf. über Mykoplasmen-PCR (Venor®GeM Classic, Minerva Biolabs). Die Zentrifugation von Zellen erfolgte, wenn nicht angegeben, bei $300\times g$ für 5 min bei RT mit maximaler Beschleunigungs- und Abbremsrate.

2.15.2. Eukaryotische Zelllinien und deren Kulturbedingungen

Alle kultivierten eukaryotischen Zelllinien sind in Suspension wachsende Zellen, die sich in ihrer Morphologie als einzelne runde Zellen darstellen. Die kryokonservierten Zellen wurden initial im 37°C-temperierten Wasserbad aufgetaut, dann mit 1 ml warmem (37°C) Kulturmedium im Einfrierröhrchen gemischt und zu 9 ml warmem Kulturmedium gegeben. Die resuspendierten Zellen wurden in eine Suspensionskulturflasche (250 ml, 75 cm^2, T-75) überführt und durch Schwenken verteilt. Die Zellkulturen wurden in CO_2-Inkubatoren (37°C, 5% CO_2, bis 95% r.F.) gehalten. Die Erhaltkultur wurde alle 2-3 Tage subkultiviert, sodass eine maximale Zelldichte von 1-1,5$\times 10^6$ Zellen/ml nicht überschritten wurde. Dazu wurden die Zellen mit frischem Medium auf eine Dichte von 3-5$\times 10^5$ Zellen/ml verdünnt und 10 ml davon in die T-75-Kulturflasche gegeben. Für die Kryokonservierung der Zelllinien wurden ca. 5×10^6 Zellen zentrifugiert und in 1 ml kaltem Einfriermedium, das aus frischem Kulturmedium mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxid bestand, resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen gegeben. Die Zellen wurden in einer CoolCell® bei -80°C tiefgefroren und langfristig bei einer Temperatur unter -130°C im Stickstoffbehälter gelagert.

KG-1a Die Zelllinie Koeffler und Golde (KG)-1 wurde aus dem Knochenmark eines 59-jährigen Mannes mit Diagnose Erythroleukämie als seltene Form der akuten myeloischen Leukämie (AML) etabliert (Koeffler und Golde, 1978). Der Subklon KG-1a ist eine undifferen-

zierte Variante der KG-1 (Koeffler et al., 1980). Die Zellen sind schwach adhärent. Die Kultur zeigt einen Anteil von 1–2% Riesenzellen. KG-1a werden u. a. wegen ihres hohen Expressionslevels des Stammzellmarkers $CD34^{+}$ als Modellzelllinie für hämatopoetische Stammzellen genutzt. Die KG-1a wurden vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) erworben. KG-1a wurden u. a. für die Etablierung der Durchflusszytometrie-Panel als Positivkontrolle für CD34, CD45RA sowie CD49d, außerdem als $CD38^{low}$ genutzt. Kulturmedium: 80% RPMI 1640 + 20% h.i. FBS

K-562 Die Zelllinie Knoxville (K)-562 wurde vom Pleuraerguss einer 53-jährigen Frau mit Diagnose chronisch myeloischer Leukämie (CML) in Blastenkrise etabliert (Lozzio und Lozzio, 1975). Morphologisch stellen sie sich als große runde Einzelzellen dar. Die K-562 wurden von der DSMZ erworben. K-562 wurden u. a. für die Etablierung der Durchflusszytometrie-Panel als Negativkontrolle für CD34, CD45RA, CD38, CD184 sowie CD49d genutzt. Kulturmedium: 90% RPMI 1640 + 10% h.i. FBS

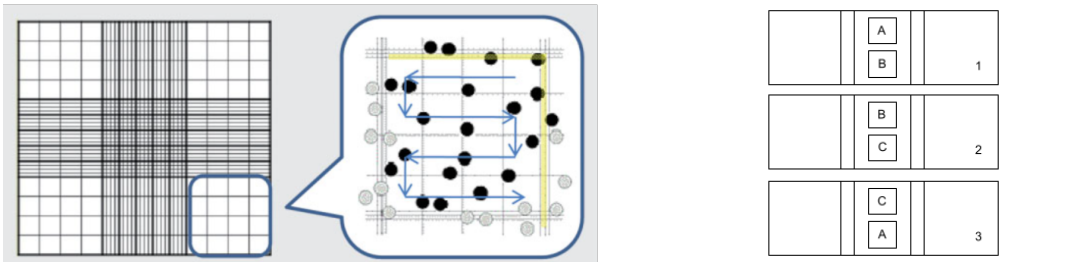
HL-60 Die humane Leukämie (HL)-60 Zelllinie wurde etabliert aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Frau mit Diagnose einer akuten Promyelozyten-Leukämie (APL) (Collins et al., 1977), die später als AML mit Ausreifung klassifiziert wurde (Dalton et al., 1988). Die HL-60 wurden von Prof. Dr. Veronique Orian-Rousseau (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Biologische und Chemische Systeme - Funktionelle molekulare Systeme) zur Verfügung gestellt. HL-60 wurden u. a. für die Etablierung der Durchflusszytometrie-Panel als Positivkontrolle für CD184, CD49d und CD29 genutzt. Kulturmedium: 80% RPMI 1640 + 20% h.i. FBS

MOLM-13 Die Zelllinie Matsuo, Okayama, Leukämie, Myeloisch (MOLM)-13 wurde aus dem peripheren Blut eines 20-jährigen Mannes mit Diagnose AML, genauer einer akuten Monozyten-Leukämie ohne Ausreifung nach initialem myelodysplastischen Syndrom etabliert (Matsuo et al., 1997). Die MOLM-13 wurden von der DSMZ erworben. MOLM-13 wurden u. a. für die Etablierung der Durchflusszytometrie-Panel als Positivkontrolle für CD38 genutzt. Kulturmedium: 90% RPMI 1640 + 10% h.i. FBS

OCI-AML3 Die Zelllinie Ontario Cancer Institute (OCI)-AML3 wurde aus dem peripheren Blut eines 57-jährigen Mannes mit der Diagnose AML, genauer akuter myelomonozytäre Leukämie etabliert (Wang et al., 1989). Die OCI-AML3 wurden von Prof. Dr. Veronique Orian-Rousseau (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Biologische und Chemische Systeme - Funktionelle molekulare Systeme) zur Verfügung gestellt. OCI-AML3 wurden u. a. für die Etablierung der Durchflusszytometrie-Panel als Positivkontrolle für CD184 und CD38 genutzt. Kulturmedium: 80% RPMI 1640 + 20% h.i. FBS

2.15.3. Zellzahlbestimmung

Für die Einsaat einer definierten Anzahl von Zellen in Kulturgefäße sowie zur Messung der proliferativen Kapazität der Zellkultur wurde die Zellzahl bestimmt. Die Bestimmung von Zellzahlen wurde über manuelle Zählung von Zellen in definiertem Volumen mithilfe des Hämacytometers (Zählkammer, Neubauer improved) im Durchlichtmikroskop mit einem 10er Objektiv (100-fache Gesamtvergrößerung) durchgeführt. Simultan wurde die Vitalität der Zellen indirekt über die Zellmembranintegrität beurteilt, indem die Zellsuspension (ggf. vorverdünnt) vor Zählung mit Trypanblau (0,4%) im Verhältnis 1:2 gemischt wurde. Defekte Zellmembranen toter Zellen lassen den bei physiologischem pH-Wert (7,4) sauren, anionischen Farbstoff Trypanblau in das Zellinnere passieren und färben Proteine des Cytoplasmas blau (Strober, 2015). Farblose Zellen besitzen eine intakte Membran und gelten mit dieser Farbstoff-Exklusionsmethode als vital.



(a) Zählgitter eines Hämacytometers und Zellzählung **(b)** Probenauftrag für die Zellzählung

Abbildung 2.10.: Zellzählung mittels eines Hämacytometers (Neubauer improved). Alle Zellen eines Großquadrates des Zählgitters, die die rechte und obere Mittellinie (gelb) berührten, wurden mitgezählt (schwarze Punkte) (a); Bild basierend auf Schrödel (2010) mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons. Für eine erhöhte Genauigkeit der Zellzählung wurde jede Probe (Zellsuspensionen A, B, C) als Doppelbestimmung auf zwei unterschiedlichen Hämacytometern (1, 2, 3) aufgetragen und ausgezählt (b).

In der Durchführung wurde die Zählkammer durch Anhauchen leicht befeuchtet und das Deckglas mit leichtem Druck aufgeschoben, sodass sich regenbogenfarbene Interferenzlinien (Newton'sche Ringe) zwischen Deckglas und den beiden Außenstegen zeigten. Mit einer Pipette wurden 20 µl des Zellsuspension-Trypanblau-Gemisches aufgezogen, die Pipettenspitze oberhalb der Kante des Deckglases angelegt und der Spalt zwischen Deckglas und Mittelsteg (Kammerboden) mithilfe der Kapillarwirkung befüllt. Ausgezählt wurden mäanderförmig alle 4 Großquadrate (Eckquadrate) eines Zählgitters, und zwar alle Zellen innerhalb sowie jene, die die obere und die rechte Mittellinie eines Großquadrates berührten (siehe Abb. 2.10a). Aus den gezählten vitalen Zellen wurde die Zellzahl pro µl bzw. ml nach Formel 2.16 berechnet. Zum Zweck der Genauigkeit wurde die Zellzählung als Doppelbestimmung durchgeführt, indem die Probenlösung einseitig auf zwei verschiedenen Hämacytometern (Nielson et al., 1991) unmittelbar vor Auszählung aufgebracht wurde, wobei jedes Hämacytometer bei Zählung

beidseitig mit 2 unabhängigen Proben beschickt war (siehe Abb. 2.10b).

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{ausgezählte Zellzahl}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}} \tag{2.16}$$

Neubauer Zählkammer: Kammertiefe = 0,1 mm; Großquadrat = 1 mm^2

2.16. Isolierung von CD34$^+$ mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut

HSPZ wurden manuell durch magnetische Zell-Separation, *magnetic activated cell sorting* (MACS®), d. h. durch Positiv-Selektion von magnetisch gelabelten CD34$^+$ Zellen aus Nabelschnurblut isoliert. Humane Nabelschnurblutspenden von termingerechten Geburten wurden von der Deutschen Knochenmarkspenderdatei (DKMS) Stem Cell Bank gGmbH (Dresden) bezogen. Die Entnahme des Nabelschnurblutes erfolgte an mit der DKMS kooperierenden Kliniken unter mütterlicher Einverständniserklärung und die Verwendung zu Forschungszwecken mit zustimmendem Votum der lokalen Ethikkommission (Ethik-Kommission bei der Landesärztekammer Baden-Württemberg, B-F-2013-111). Eine Nabelschnurblutprobe stammt von nur einem/einer Spender:in (Donor). Bei Beginn der Zellisolierung lag die Probenentnahme zwischen 24 h und 48 h zurück.

Gearbeitet wurde fortan unter sterilen Bedingungen. Der mit CPD (Citrat-Phosphat-Dextrose)-antikoaguliertem Nabelschnurblut befüllte Sammelbeutel wurde mit 80% (v/v) EtOH abgesprüht und der verbliebene Zuführschlauch mit einer sterilen Schere durchtrennt, um darüber das Blut zu entnehmen. Zur Zellisolierung wurde das Vollblut in Portionen zu 15 ml mit 30 ml *Rinsing* Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.3) verdünnt. Weiterhin wurden 15 ml *Lymphocyte Separation Medium 1077* (Ficoll® 400 und Natriumdiatrizoat, Dichte 1,077 g/ml bei 20°C) in 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt und unter Schräglage dieser befüllten Röhrchen langsam 35 ml des zuvor verdünnten Blutes aufpipettiert (Abb. 2.11 links). Es folgte die physikalische Trennung der mononukleären Zellen von polymorphnukleären Zellen und Erythrozyten über Erreichen ihrer Schwebedichte mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 1500×g (20 min bei 20°C, Ausschwingrotor mit Beschleunigungsstufe 5, Bremsstufe 0).

Nach Separation wurde der weiße Ring aus mononukleären Zellen (Abb. 2.11 rechts) mit einer 10 ml-Pipette abgenommen, in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit *Rinsing* Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 300×g (max. Beschleunigungs- und Bremsstufe 9). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, dann die Zellpellets in ca. 12 ml *Rinsing* Puffer resuspendierend vereinigt, überführt in ein 15 ml

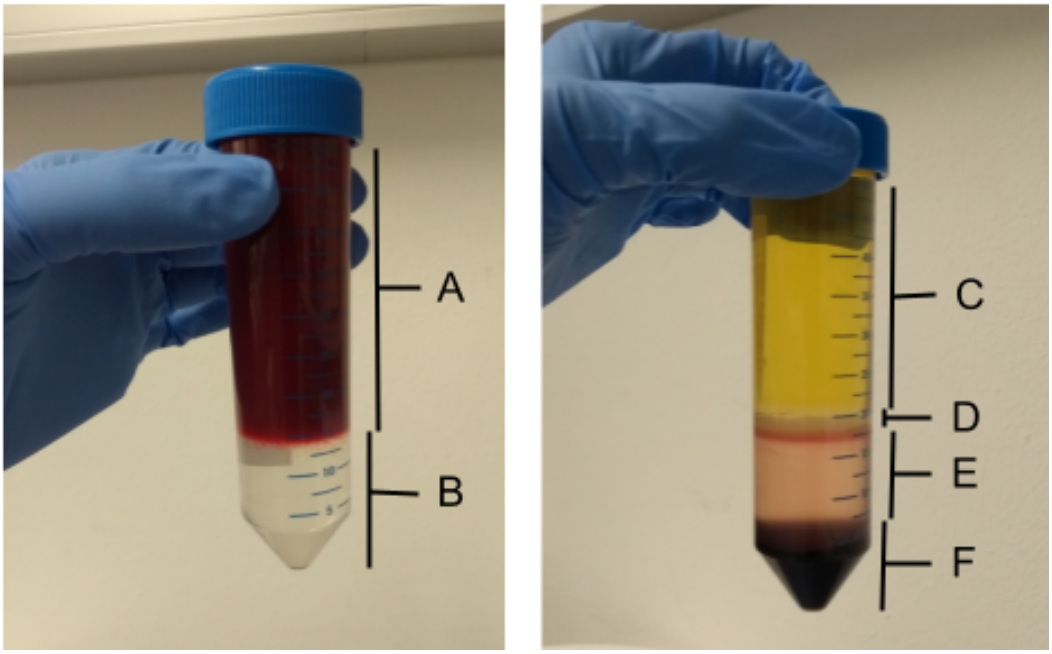


Abbildung 2.11.: Separation von mononukleären Zellen aus humanem Vollblut. *Links:* Humanes Nabelschnurblut (A) überschichtet auf *Lymphocyte Separation Medium 1077* (Ficoll® 400 und Natriumdiatrizoat, Dichte 1.077 g/ml bei 20°C) (B) vor Dichtegradientenzentrifugation. *Rechts:* Schichtung nach Dichtegradientenzentrifugation von oben nach unten: Plasma (C), Interphase aus angereicherten mononukleären Zellen (D), Separationsmedium (E), polymorphnukleäre Zellen (Granulozyten) und Erythrozyten (F).

Zentrifugenröhrchen und für 10 min bei 300×g (max. Beschleunigungs- und Bremsstufe 9) zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes einer zweimaligen Lyse der (kernlosen) Erythrozyten in 10 ml Ammoniumchlorid-basiertem Erylyse Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.3) für 5 min unter Invertieren bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das erhaltene Zellpellet in 10 ml *Rinsing* Puffer resuspendiert. Davon wurde eine Probe in *Rinsing* Puffer vorverdünnt, diese mit Trypanblau gefärbt und in einer 1:20 Endverdünnung mit der Zählkammer (Neubauer improved) ausgezählt (Abschnitt 2.15.3). Erneute Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes ergab ein Zellpellet.

Das Zellpellet wurde in 300 µl *Running* Puffer resuspendiert, maximal aber nur 1×10^8 Zellen (ggf. wurde das *Running* Puffervolumen entsprechend der Gesamtzellzahl erhöht). Zu den in 300 µl *Running* Puffer resuspendierten Zellen wurden 100 µl *FcR Blocking Reagent* sowie 100 µl *CD34 MicroBeads* gegeben (beides Bestandteile des CD34 MicroBead Kits, Tabelle 2.9; bei höherem Zellsuspensionsvolumen wurden die Reagenzvolumina entsprechend erhöht). *CD34 MicroBeads* sind anti-CD34-Antikörper-konjugierte, superparamagnetische Nanopartikel. Nach kurzem Schütteln der Suspension wurde das zugeschraubte Röhrchen in den *MACSmix™* gespannt, sodass die spezifische Antikörperbindung unter kontinuierlicher Rotation für 60 min im Kühlschrank möglich war. Gewaschen wurden die Zellen in zwei Schritten, zunächst mit 10 ml, dann in 1 ml *Running* Puffer pro 1×10^8 Zellen. Eine Magnetseparationssäule (*MS*

Säule, mit ferromagnetischer Kugelmatrix) wurde in den Permanentmagneten *MiniMACS™* Separator platziert und mit 750 µl *Running* Puffer äquilibriert. Schließlich wurde das Zellpellet pro 1×10^8 Zellen in 500 µl *Running* Puffer resuspendiert und restlos auf die Säule gegeben. Die Säulenmatrix verstärkt das Magnetfeld 10.000-fach (Miltenyi Biotec GmbH, 2017) und *MicroBeads*-markierte Zellen werden durch die Magnetkraft in der Säule in Suspension zurückgehalten, während nicht-*MicroBeads*-markierte Zellen die Säule durchwandern und in Suspension austreten.

Nach dreimaligem Auswaschen von unmarkierten Zellen durch Auftragen von jeweils 500 µl *Running* Puffer auf die Säule, wurde die mit den markierten Zellen beladene Säule in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gesetzt, mit 1 ml *Running* Puffer versetzt und die Zellen mithilfe des Kolbens eluiert. Dieses Eluat wurde erneut wie oben beschrieben einer weiteren Magnetseparation über eine Säule unterzogen, um die Reinheit der Zellfraktion zu erhöhen. Die finale Elution erfolgte dabei durch Zugabe von nur 500 µl *Running* Puffer auf die Säule. Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Probe mit Trypanblau gefärbt (1:2 Verdünnung) und mit der Zählkammer (Neubauer improved) wie in Abschnitt 2.15.3 beschrieben manuell ausgezählt.

Der Anteil an $CD34^+$ Zellen wurde im Rahmen der Phänotypisierung (Abschnitt 2.21.1) durchflusszytometrisch bestimmt. Der dafür verwendete CD34-Antikörper-Klon *REA1164* erkennt ein Klasse III Epitop des CD34-Antigens, wogegen der *MicroBead*-konjugierte monoklonale CD34-Antikörper (QBEND/10) ein Klasse II Epitop des CD34-Antigens bindet. Es wurden isolierte Zellen mit einem Gehalt von $\geq$95% $CD34^+$ Zellen für die Zellversuche verwendet. Der $CD34^+$ Zell-Isolationstag gilt für die folgenden Versuche als Zellkulturtag 0, *Day* 0 (D0), da die Zellen unmittelbar zur Zellbesiedlung der Gele für Kulturversuche eingesetzt wurden.

2.16.1. Zellaussaat von HSPZ auf Gele

Die in Abschnitt 2.16 isolierten $CD34^+$ HSPZ wurden in allen Experimenten in serum- und xenofreiem *Hematopoietic Progenitor Cell Expansion Medium DXF* mit 1% (v/v) Zytokin Mix E (Tabelle 2.4) kultiviert, das im Folgenden nur noch als Vollmedium bezeichnet wird. Zytokin Mix E enthält die rekombinanten humanen Proteine TPO, SCF, *Fms-like tyrosine kinase 3* Ligand (Flt3L) und Interleukin-3 (IL-3).

Die in Abschnitt 2.11 vorbereiteten Gele wurden nach Übernachtinkubation in PBS bzw. SDF-1α-PBS-Lösung am Tag der Zellbesiedlung (= $CD34^+$ Zell-Isolationstag) einmal mit 1 ml PBS für 20 min gewaschen. Dann wurden sie mit 500 µl Vollmedium im CO_2-Inkubator für ca. 1 h äquilibriert, bis kurz vor Zellaussaat dieses gegen 800 µl frisches Vollmedium ausgetauscht wurde und die Platten zur pH-Wert- und Temperaturstabilisierung im CO_2-Inkubator (37°C, 5% CO_2, bis 95% r.F.) belassen wurden.

Aufgrund der limitierten Zellzahl isolierter HSPZ aus einer Nabelschnurblutprobe (Donor) wurden die unterschiedlichen Geltypen pro Experiment nur als Unikate geführt. Die für die Zelleinsaat benötigte Menge an gewonnener $CD34^+$ Zellsuspension wurde mit PBS gewaschen und zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in Vollmedium aufgenommen, sodass eine Zellkonzentration von 100 Zellen pro 1 µl erzielt wurde. Zu den in den *Wells* vorgelegten 800 µl Vollmedium wurden 200 µl dieser Zellsuspension mit einer 200 µl-Pipette kreisförmig pipettiert und die Zellen durch kreisförmiges Neigen der Platte verteilt. So wurde jedes *Well* mit 2×10^4 HSPZ beimpft. Die Kulturplatten wurden dann in den Inkubator (37°C, 5% CO_2, bis 95% r.F.) gestellt. Am Tag 6 nach Aussaat erfolgte nach der Zellernte und Zellzahlbestimmung die Rückbesiedlung der Gele mit 2×10^4 HSPZ analog wie oben ab dem Vorlegen von 800 µl Vollmedium beschrieben. Außerdem wurden für beide Kulturintervalle 3 Tage nach Aussaat jeweils 500 µl Vollmedium pro *Well* hinzugegeben.

2.17. Untersuchung der Zelladhäsion

2.17.1. Immunfluoreszenzfärbungen von adhärierten HSPZ auf Hydrogelen

Für Immunfluoreszenzfärbungen von HSPZ wurden PS154- und PS1058-strukturierte Gele wie in Abschnitt 2.10.3.1 und 2.10.3.2 präpariert und in einen sterilen Zellkultursilikoneinsatz (*flexiPERM® disc*), welcher auf einer Zellkulturschale (Durchmesser 10 cm) haftete, überführt. Die Gele wurden wie in Abschnitt 2.11 mit *LDV*-Peptid funktionalisiert. Die Gele wurden in Vollmedium äquilibriert; um den Einsatz wurde steriles PBS gegeben. Pro *Well* wurden $1{,}5\times10^4$ $CD34^+$ mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut (Abschnitt 2.16) in 1 ml Vollmedium für 8 Tage unter Mediumzugabe von 500 µl an Tag 3 und Mediumaustausch von 500 µl an Tag 6 kultiviert. In Vorbereitung für die Zellfärbungen wurde das Medium abgenommen und die Gele samt Zellen in 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS etwa 40 min fixiert, dann einmal in PBS für etwa 10 min gewaschen, und danach die Zellmembran in 0,1% (v/v) Triton® X-100 in PBS für ca. 15 min zu permeabilisieren. Nach Abnahme der Permeabilisierungslösung wurden zugängliche unspezifische Bindungsstellen mit einer Lösung aus 1% (w/v) BSA in PBS bei Kühlschranktemperatur (ca. 24 h) blockiert. Die Verdünnungs- und Waschlösung aller nachfolgenden Schritte bestand aus 0,1% (w/v) BSA in PBS. Nach Abnahme der Blockierungslösung wurde 1 ml der Primärantikörperlösung mit Primärantikörpern gegen die Zielantigene CXCR4 und Prominin-1 (CD133) (Verdünnungen siehe Tabelle 2.7) bzw. zur Kontrolle unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper nur 1 ml 0,1% (w/v) BSA in PBS auf die jeweiligen Proben gebracht und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss wurde 4× für ca. 20 min (RT) gewaschen. Die Sekundärantikörperlösung enthielt neben den Sekundärantikörpern auch den Kernfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) sowie Fluorophor-konjugiertes Phalloidin, das an Aktinfilamente (F-Aktin) bindet (Verdünnungen

siehe Tabelle 2.7). Die Färbelösung wurde zu 530 µl pro Gel aufgegeben und abgedunkelt für etwa 1 h (RT) inkubiert. Es folgte 2-maliges Waschen für je etwa 30 min. Final wurde die die Gele umgebende Silikonform von der Kulturschale gelöst und dann die freiliegenden Gele mit der Zell-behafteteten Oberfläche voran möglichst luftblasenfrei auf ein rundes Deckglas (Durchmesser 50 mm, Stärke 1) gelegt. Ein weiteres rundes Deckglas (Durchmesser 15 mm, Stärke 1) wurde ebenfalls luftblasenfrei oben aufgelegt. Diese Proben wurden im inversen Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer.Z1) mit 40×-Objektiv in Luft sowie 63×-Objektiv in Immersionsöl mikroskopiert.

2.17.2. REM-Aufnahmen von adhärierten HSPZ auf Hydrogelen

Rasterelektronenmikroskopische Bildgebung (wie in Abschnitt 2.9.3.1 beschrieben) wurde auch für die ergänzende Darstellung von adhärierten Zellen auf der Hydrogeloberfläche genutzt. Dazu wurden wie in Abschnitt 2.17.1 beschrieben $CD34^+$ Zellen nach 8 Tagen Kultur auf Gelen mit PS154-*LDV*-Peptid in 0,625% (v/v) Glutaraldehyd in PBS (aus einer 25%igen Lösung in H_2O verdünnt) unter maximaler Füllhöhe von etwa 1,5 ml für ca. 40 min fixiert. Anschließend wurde zuerst mit 50% (v/v) EtOH in PBS für jeweils 10 min, nachfolgend mehrfach in 80%(v/v) EtOH in H_2O und abschließend in absolut EtOH dehydriert und abgedeckt an der Luft gerocknet. Für die Bildaufnahmen am Feldemissionsrasterelektronenmikroskop (Zeiss Merlin) wurde das Gel zuvor im Hochvakuum-Coater (Leica EM ACE600) mit einer etwa 7 nm dicken Kohlenstoffschicht bedampft. Die Aufnahmen wurden zusammen mit Udo Geckle (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Angewandte Materialien) erstellt. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Detektortyp SE2 bei einer Beschleunigungsspannung von 1-2 kV, einem Arbeitsabstand von 4-5,8 mm und einem Sondenstrom von 31 pA.

2.18. Untersuchung der Zellmotilität auf Hydrogelen

Für die Versuche zur Zellmotilität wurden wegen der Limitation des Mikroskopiebereiches auf die zentralen acht *Wells* einer 24-*Well* Platte die Versuchsbedingungen auf zwei *Well*platten mit je sechs belegten *Wells* aufgeteilt. Um die Charakterisierung der temporären Interaktion der Zellen mit der Geloberfläche zu untersuchen, und ob diese durch die Zugabe von SDF-1α beeinflusst wird, wurde die Zellmotilität mittels Zeitraffer-Mikroskopie 48 h nach Zellaussaat erfasst. Vor Beginn der Mikroskopie wurden unter der Sterilbank die Inter-*Well*bereiche mit sterilem PBS befüllt, um den thermischen Gradienten zwischen *Well*zentrum und -rand zu minimieren (Brown et al., 2017). Außerdem wurde zu den Zellen des TCP-*Well* (*Well* ohne Gel) der Platte, die die mit SDF-1α-beladenen Gele enthielt, 1 µl SDF-1α-Stocklösung (90 µg/ml) pipettiert, sodass eine Endkonzentration von etwa 90 ng/ml im Medium vorlag. Dann wurde die *Well*platte, in welcher die Gele nicht mit SDF-1α beladen waren, zuerst mikroskopiert. Dazu

wurden durchlichtmikroskopische Bildsequenzen im Abstand von 30 s über einen Zeitraum von 20 min pro Bildauschnitt pro *Well* aufgenommen. Vor Einbringen der *Well*platte wurde die Inkubationskammer (Incubator XL-5 2000) des Mikroskops (Axio Observer.Z1) für etwa 1 h stabil auf 37°C gehalten. Nach dem Einsatz der *Well*platte in den Heizeinsatz (M24 2000) wurde dieser mithilfe der Justierschrauben plan gebracht, indem die Luftblase einer auf dem *Well*plattendeckel platzierten Dosenlibelle zentriert wurde. Nach Auflegen des CO_2-Deckels und Aufdrehen der CO_2-Zufuhr (5% CO_2) mit kontinuierlicher Wasserdampfabgabe über das Feuchtemodul (schafft ca. 90% r.F.) wurde das System mind. 30 min äquilibriert. Vor Aufnahmestart konnte mit dem 10×-Objektiv keine Beleuchtung nach *Köhler* eingestellt werden, da durch die apparative Anordnung mit CO_2-Deckel der Kondensor nicht nah genug ans Objekt herangeführt werden konnte. Durch die daraus resultierende suboptimale Beleuchtung wurden die Aufnahmen mittels Durchlichtlampe, Kondensorblende im Hellfeld-Modus und Reflektor mit dem Emissionsfilter BP 690/50 (Teil des Zeiss Filter Sets 50) durchgeführt.

Die Bildanalyse erfolgte mit `ImageJ (Fiji)`. Bei Aufnahmen zum Zeitpunkt 0 min, 10 min und 20 min wurden über das Plugin *Cell Counter* alle vollständig erkennbaren Zellen im Bild anhand ihrer Morphologie per Auge entweder als polarisiert oder sphärisch gewertet. Mithilfe des Plugins *Manual Tracking* wurde die zeitliche Bildabfolge als Stapel ausgewertet. Darin wurden, wenn möglich 12 polarisierte Zellen, die möglichst über die gesamte Bilderfolge polarisiert erschienen und eine in der gegebenen Zeitauflösung kontinuierliche Bewegung präsentierten, für die manuelle Klickverfolgung einbezogen. Die über das *Manual Tracking* ausgegebene Textdatei wurde für die weitere Auswertung und graphische Darstellung in das Plugin *Chemotaxis and Migration Tool 1.01.* (Gerhard Trapp, 2006) eingespeist.

2.19. Zellverträglichkeit der Biohybridhydrogelmatrix

Für die Beurteilung der Zytokompatibilität der Hydrogele, wurden folgende *Assays* zur Viabilitätsbestimmung von KG-1a Zellen durchgeführt:

Stoffwechselaktivitätsmessung von KG-1a mittels WST-1 *Assay* Mit dem WST-1 *Assay* wird die Stoffwechselaktivität über die Verfügbarkeit von durch den katabolen Stoffwechsel generiertem NADH (reduziertem Nicotinsäureamidadenindinukleotid) als Co-Substrat von zellulären Dehydrogenasen von Zellen gemessen. Das 4-[3-(4-Indophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat, *water soluble tetrazolium*-1 (WST-1) ist ein Tetrazoliumsalz hellroter Farbe, welches vorwiegend von Oxidoreduktasen, genauer NADH-abhängigen Dehydrogenasen, an der Zelloberfläche unter Reduktion und Öffnung des Tetrazolrings zu

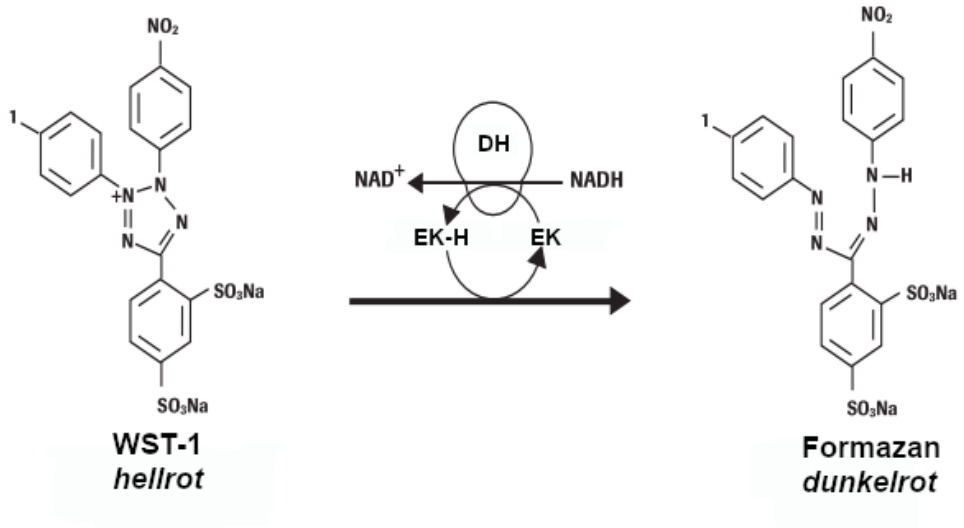


Abbildung 2.12.: Farbumschlagsreaktion des WST-1 zu Formazan. Reduktion des hellroten *water soluble tetrazolium*-1 (WST-1) durch NADH-abhängige Dehydrogenasen (DH) über einen intermediären Elektronenakzeptor (Elektronenkopplungsreagenz, EK) zu dunkelrotem Formazan.

wasserlöslichem, dunkelrotem Formazan mithilfe eines Elektronenkopplungsreagenz umgesetzt wird (Abb. 2.12).

Die Quantifizierung des gebildeten Formazans erfolgt colorimetrisch durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 440 nm (Absorptionsmaximum) und korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Experimentell wurden Triplikate unstrukturierter Gele wie in Abschnitt 2.10.3.1 präpariert. Die Gele wurden ferner sterilisiert (Abschnitt 2.10.3.2) und in ein mit 1 ml Kulturmedium (RPMI 1640 + 20% h.i. FBS) vorgelegtes *Well* einer 24-*Well* Platte eingebracht und für 30 min im Zellinkubator (37°C, 5% CO_2, bis 95% r.F.) äquilibriert. Nach Austausch des Mediums und Inkubation für weitere 30 min, wurden 700 µl Medium pro *Well* sowohl zu den Gelen als auch zu den TCP-Kontroll*wells* bzw. *Wells* mit sterilen Deckgläschen (rund, Durchmesser 15 mm, Stärke 1) pipettiert. Nach Übernachtinkubation im Zellinkubator wurden die Überstände abgenommen und als Kulturmedium für 2×10^4 KG-1a Zellen in 100 µl bzw. 100 µl Leerprobe (Kulturmedium ohne Zellen) pro *Well* in einer 96-*Well* Platte für 24 h im Zellinkubator eingesetzt.

Nach Zugabe von 10 µl WST-1 pro *Well* am Folgetag wurden die Zellen bzw. Leerproben für 3 h im Zellinkubator belassen, die Platte anschließend kurz vibrierend geschüttelt und jedes *Well* in einem Spektrophotometer (Plattenlesegerät, EnSpire®, Perkin Elmer Instruments) bei 440 nm spezifischer Wellenlänge und 670 nm Referenzwellenlänge ausgelesen. Die Triplikatwerte wurden gemittelt. Vom mittleren spezifischen Extinktionswert bei 440 nm jeder Bedingung wurde der jeweilige Leerwert abgezogen und relativ zur TCP-Bedingung angegeben.

Durchflusszytometrie FITC-Annexin V / SYTOX® AADvanced™ -gefärbter KG-1a Die Zellviabilität wurde weiterhin über die Zellmembranintegrität beurteilt. So wurde der Anteil nekrotischer sowie apoptotischer KG-1a-Zellen nach 24 h Kultur auf unstrukturierten Gelen sowie TCP und Glas durchflusszytometrisch bestimmt. Für die fluoreszente Markierung toter Zellen, die sowohl nekrotische als auch spät-apoptotische einschließt, wurde der Nukleinsäure-Farbstoff SYTOX® AADvanced™ verwendet, der nur die zerstörte Plasmamembran passieren kann und bevorzugt an GC-reichen Regionen des DNA-Doppelstranges bindet, was eine vielfach verstärkte Fluoreszenzemission (Roth et al., 1997) verursacht. Für die fluoreszente Markierung früh-apoptotischer Zellen wurde FITC-konjugiertes Annexin V verwendet, welches Calziumionen-abhängig das Phospholipid Phosphatidylserin bindet. Phosphatidylserin ist in der Plasmamembran lebender Säugerzellen asymmetrisch verteilt, und zwar ausschließlich in der inneren, dem Zytoplasma zugewandten Lipidschicht der Lipiddoppelschicht zu finden (Bevers und Williamson, 2016).

Bei der Membranreorganisation während des programmierten Zelltods (Apoptose) wird Phosphatidylserin auf die äußere, dem Extrazellularraum zugewandten Lipidschicht transloziert. Diese Exposition von Phosphatidylserin ermöglicht die Bindung von Annexin V bei Verfügbarkeit von Calciumionen. Die für den WST-1 *Assay* (siehe oben) in Medium äquilibrierten Gele sowie TCP und Deckgläschen der 24-*Well* Platte dienten zugleich für die Aussaat von $1{,}2\times10^5$ KG-1a Zellen in 600 µl Kulturmedium pro *Well*. Nach 24 h Kultur (37°C, 5% CO_2, bis 95% r.F.) wurden die Zellen in den *Wells* resuspendiert und in Reaktionsgefäße überführt, abzentrifugiert und in 500 µl Annexin Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.3) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 100 µl Färbeansatz, der aus einer 1:1000-Verdünnung von SYTOX® AADvanced™ (Tabelle 2.8) in Annexin Puffer bestand, resuspendiert. Zu dieser wurden 10 µl FITC-Annexin V (Tabelle 2.8) zugegeben, gemischt und für 15 min abgedunkelt bei RT gefärbt. Final wurden die Proben mit 200 µl Annexin Puffer verdünnt und am Durchflusszytometer (BD FACSVerse™ , Becton Dickinson Inc.) gemessen. Für positive Einzelfärbungen wurde parallel zur Probenfärbung ein Teil der KG-1a Zellen aus der Erhaltkultur für 10 min bei 70°C hitzeabgetötet und nach Abkühlen mit unbehandelten KG-1a Zellen der Erhaltkultur zusammengeführt. Die Zellsuspension wurde gedrittelt und nach Zentrifugation entweder in 100 µl SYTOX® AADvanced™ (Endverdünnung 1:1000), FITC-Annexin V (Endverdünnung 1:10) oder reinem Annexin Puffer analog wie zuvor beschrieben inkubiert und mitgemessen.

Lebend-tot-Färbung von KG-1a für die Fluoreszenzmikroskopie Zur fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung der Cytotoxizität der Hydrogele wurde eine Lebend-tot-Färbung von KG-1a Zellen durchgeführt. Die Diskriminierung toter von lebenden Zellen wird zum einen über die DNA-Farbstoffe (Tabelle 2.18) Propidiumiodid, welches nur durch beschädigte Zellmembranen in Zellen eindringen kann, sowie membrangängigem Hoechst 33342 ermög-

licht. Die Bindung doppelsträngiger DNA erhöht in beiden Fällen die Fluoreszenz um ein Vielfaches (Földesi, 2018). Zum anderen wird als Lebend-Färbung das membranpermeable Reagenz Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM)[2] und dessen Hydrolyse durch intrazelluläre Esterasen in grün fluoreszierendes Calcein (Tabelle 2.18) genutzt.

Tabelle 2.18.: Farbstoffe der Lebend-tot-Färbung für die Fluoreszenzmikroskopie

Zielstruktur	**Fluorochrom**	$\lambda_{\mathbf{ex}}$[(a)] [nm]	$\lambda_{\mathbf{em}}$[(b)] [nm]
DNA	Hoechst 33342[(c)]	361[(f)]	486[(f)]
DNA	Propidiumiodid[(d)]	535[(f)]	617[(f)]
Esterasen	Calcein[(e)]	490	515

(a) Wellenlänge maximaler Anregung
(b) Wellenlänge maximaler Emission
(c) selektive Bindung in der kleinen Furche AT-reicher Regionen des DNA-Doppelstrangs verstärkt Fluoreszenz
(d) bindet auch gefaltete RNA; keine DNA-Sequenzpräferenz, interkaliert zwischen den Basen alle 4-5 Basenpaare des DNA-Doppelstrangs (Kotzerke et al., 2019), was Fluoreszenz verstärkt
(e) Produkt aus dem Umsatz von Calcein-AM durch zelluläre Esterasen
(f) nach DNA-Bindung

Unstrukturierte Gele wurden als technische Duplikate wie in Abschnitt 2.10.3.1 präpariert. Die Gele wurden sterilisiert (Abschnitt 2.10.3.2), in eine 24-*Well* Platte überführt und in Kulturmedium (RPMI 1640 + 20% h.i. FBS) über Nacht im Zellinkubator (37°C, 5% CO_2, bis 95% r.F.) äquilibriert. Nach Aussaat von $2{,}5 \times 10^4$ KG-1a Zellen pro *Well* in 750 µl Medium wurden diese für 24 h im Zellinkubator kultiviert. Zur Färbung der Zellen wurde die Färbelösung des *Cell Viability Imaging Kit* (Tabelle 2.9) gemäß Herstellerangaben angesetzt. 250 µl Färbelösung wurden pro *Well* zur Kultur gegeben und 30 min im Zellinkubator inkubiert. Dann wurden die Proben mikroskopiert (Axio Observer.Z1, Zeiss). Bilder der 100-fachen Vergrößerung wurden für jeden Kanal in `ImageJ` (Reduktion des inhomogenen Hintergrunds über *Auto Local Threshold*; *Watershed*; *Analyze Particles* mit minimal 20 Pixel (*size*) und 0,1-1,0 *circularity*) analysiert.

[2] Glycine,N,N'-[[3',6'-bis(acetyloxy)-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthene]-2',7'-diyl]bis(methylene)]bis[N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]-,bis[(acetyloxy)methyl]ester

2.20. Proliferationsanalyse der HSPZ auf nanostrukturierten Hydrogelen

2.20.1. Wachstumskurve und Berechnung der Generationszeit der HSPZ-Expansion

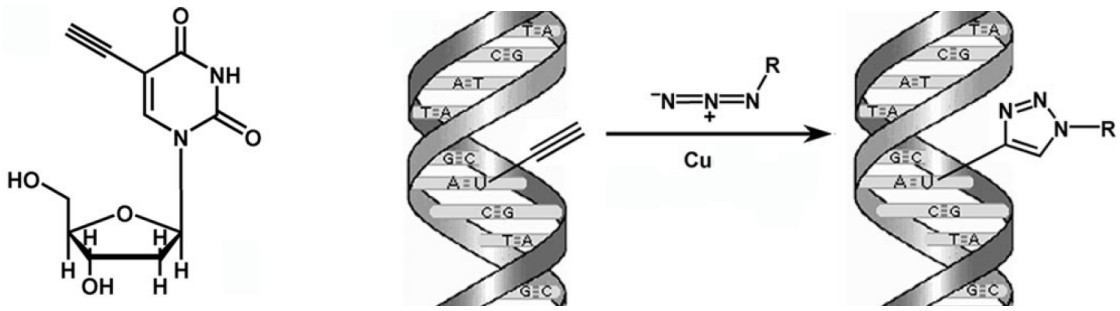
Für die Experimente zur Untersuchung der Zellexpansion wurden die neun Versuchsbedingungen gedrittelt und zu 3 Clustern auf 3 unterschiedlichen *Well*platten präpariert. Nach 6 bzw. 12 Tagen der Expansion der isolierten $CD34^+$ Zellen auf den funktionalisierten nanostrukturierten Hydrogelen (Abschnitt 2.16.1) bzw. TCP, wurden diese im *Well* mit der Pipette resuspendiert und die Zellsuspension restlos in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte als Doppelbestimmung wie in Abschnitt 2.15.3 beschrieben. Die mittlere Zellzahl pro Bedingung wurde als Mittel aus drei unabhängigen Experimenten erfasst und grafisch als Wachstumskurve dargestellt. Ebenfalls wurde die Generationszeit t_g, die für eine Verdopplung benötigte Zeit, nach Formel 2.17 berechnet.

$$t_g = \frac{t}{n} = \frac{(\log(2) \cdot t)}{(\log(N) - \log(N_0))} \tag{2.17}$$

Dabei ist t die Kulturdauer und $n = (\log(N) - \log(N_0))/0,3$ Generationszahl (Anzahl der Generationen) mit N_0 Zellzahl zum Kulturstart und N Zellzahl zum Ablesezeitpunkt.

2.20.2. Zellzyklusaktivitätsmessung mittels EdU *Assay* für die Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung der Zellproliferation von HSPZ auf den Hydrogelen wurde neben der Zellzahlbestimmung (Abschnitt 2.15.3) auch die Zellzyklusaktivität durch die direkte Messung der *de novo* DNA-Synthese durch Inkorporation von 5-Ethinyl-2'-desoxyuridin (EdU) erfasst. EdU ist ein nichtradioaktives Thymidinanalogon (Abb. 2.13a), welches in replizierende genomische DNA während der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus eingebaut werden kann (Salic und Mitchison, 2008). Die Alkingruppe des EdU ermöglicht eine Kupferkatalysierte *Click*-Reaktion mit einem Azid-modifizierten Fluoreszenzfarbstoff unter Bildung eines stabilen Triazolrings (Abb. 2.13b). Der Azid-Fluoreszenzfarbstoff - hier Alexa Fluor™ 488 Azid (Tabelle 2.8) - kann wegen seiner geringen Größe sehr gut (permeabilisierte) Membranen passieren und EdU im DNA-Doppelstrang erreichen, was eine präzise Quantifizierung mithilfe des Durchflusszytometers ermöglicht. Abhängig von der Länge des EdU-Pulses kann die Länge der verschiedenen Zellzyklusphasen (G1, G2, S) bestimmt werden (Pereira et al., 2017). Dabei ist die maximale Fluoreszenzintensität erreicht, wenn die Pulslänge die Dauer der S-Phase abdeckt. Für die Dauer der S-Phase wurden 8 h als grobe Näherung angenommen



(a) Struktur von EdU **(b)** Markierungsreaktion von in DNA eingebautem EdU

Abbildung 2.13.: Einbau von 5-Ethinyl-2'-desoxyuridin (EdU) zur Markierung von replizierter DNA in Zellen. (a) EdU ist ein Thymidinanalogon, das statt einer Methylgruppe eine Ethinylgruppe an Position 5 des Pyrimidinrings trägt. (b) Schema der Kupfer(Cu)-katalysierten *Click*-Reaktion der terminalen Ethinylgruppe des EdU mit einem organischen Azid (R ist bspw. ein Fluorochrom). Abbildung basierend auf Salic und Mitchison (2008) mit freundlicher Genehmigung von National Academy of Sciences (Copyright (2008) National Academy of Sciences, U.S.A).

(Becker et al., 2006; Hahn et al., 2009). Unter Annahme einer Zellzyklusdauer von ca. 24 h bei $CD34^+$ Zellen (Ko et al., 2007) wurde die EdU-Inkubationsdauer von 24 h gewählt, da sich teilungsaktive Zellen der $CD34^+$ HSPZ-Population in asynchronem Zellzyklus befinden, sodass zyklusaktive Zellen theoretisch während der gesamten S-Phase EdU zur Verfügung haben.

Die Kulturen, welche den Motilitätsuntersuchungen (siehe Abschnitt 2.18) unterzogen wurden, wurden weiterhin für eine Proliferationsanalyse mithilfe des EdU Alexa Fluor™ 488 Durchflusszytometrie-Assay-Kits (Tabelle 2.9) untersucht. Dazu wurde den Kulturen an Tag 3 nach Zellaussaat ein Drittel des Mediums vorsichtig abgenommen, indem die Platte geneigt und 333 µl des am Rand angesammelten Mediums abgenommen wurden. Pro *Well* wurden 333 µl frisches, mit EdU versetztes Vollmedium zugegeben, sodass die EdU-Endkonzentration 1 μM betrug. Das „TCP+SDF-1α "- *Well* diente als Kontrolle. Zu dieser wurden 333 µl frisches Vollmedium ohne EdU gegeben. Zur Verteilung wurden die Platten in kreisenden Bewegungen leicht geschwenkt und dann für 24 h im Zellkulturinkubator (37°C, 5% CO_2, bis 95% r.F.) belassen. Die Zellernte erfolgte entsprechend an Tag 4 nach Kulturansatz. Die Zellen wurden dazu im *Well* gründlich resuspendiert und die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Da der Einbau von EdU zu einem erheblichen Zelluntergang führte (Ligasová et al., 2015), wurden die Zellen vor der Fixierung zum Zweck späteren Totzellausschlusses zusätzlich mit dem Vitalitätsfarbstoff Viobility™ 405/452 (Tabelle 2.8) gefärbt. Zur Kompensation des Viobility™ 405/452-Spektrum-Spillovers in den Kanal B1 (Detektionskanal für AF 488), wurden von den gesammelten Zellen des Kontroll*well* („TCP+SDF-1α") 200 µl für eine Einzelfärbung mit Viobility™ 405/452 verwendet, wobei 100 µl für 5-10 min bei 95°C hitzeabgetötet und nach deren Abkühlung mit den unbehandelten 100 µl vereinigt wurden. Nach Zentrifugation

der Zellsuspensionen wurden das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert, dann in 100 µl Viobility™ 405/452 (Verdünnung 1:200 in PBS) resuspendiert und 10 min im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml 1% (w/v) BSA in PBS wurden die Zellen gewaschen und weiterhin wie im Herstellerprotokoll angegeben fixiert, permeabilisiert und die *Click*-Reaktion durchgeführt, mit Ausnahme der applizierten Waschlösungsvolumina, die auf 1 ml reduziert wurden. Final wurden die Zellen in nur 200 µl resuspendiert und im Durchflusszytometer (MACSQuant® 10, Methode siehe Abschnitt 2.21.1) mit der mithilfe der Einzelfärbung manuell eingestellten Kompensationsmatrix für B1 gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit `FlowJo`, wobei die Negativkontrolle (Kultur ohne EdU) zur Grenzsetzung der EdU-negativen Population diente.

2.21. Differenzierungsanalyse der HSPZ auf nanostrukturierten Hydrogelen

2.21.1. Phänotypische Charakterisierung der HSPZ nach Kultur auf nanostrukturierten Hydrogelen mittels Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie Die Durchflusszytometrie dient der Analytik von Partikeln in einer Probenflüssigkeit. In einem Durchflusszytometer wird Druck auf die Probenflüssigkeit ausgeübt, sodass ein Stromfluss entsteht. Dieser Probenstrom ist zugleich umgeben von einem Hüllstrom einer Trägerflüssigkeit niedrigeren Druckes, um die in der Probenflüssigkeit enthaltenden Partikel in einer laminaren Flussbahn vereinzelt im Fokus, d. h. Querschnittszentrum der Leitungsbahn auszurichten (Sack, 2007). Die einzelnen Partikel passieren nacheinander einen vom Laser emittierten Lichtstrahl definierter Wellenlänge (Abb. 2.14). Die Interaktion des auftreffenden Lichts mit dem Partikel resultiert in physikalisch-optische Effekte wie dem Tyndall-Effekt durch Lichtstreuung, außerdem Lichtbeugung, Lichtbrechung, Reflexion, Absorption, Anregung und Emission und gibt so Rückschlüsse auf Größe, Struktur (Granularität) des Partikels sowie der Anzahl von fluoreszierenden Molekülen, sofern diese im oder am Partikel, z.B. einer Zelle, vorhanden sind (Becton Dickinson GmbH, 2005).

Das vom Partikel abgegebene Licht wird über Sammellinsen zu optischen Filtern und Spiegeln geleitet, welche die Signale aufteilen, um wiederum auf spannungsregulierte Signalverstärker und schließlich den Detektoren zu treffen. Die Messdaten werden digitalisiert und als *Flow Cytometry Standard (FCS)*-Dateiformat gespeichert sowie simultan graphisch am Bildschirm dargestellt. Durch den Einsatz verschiedener Fluorochrom-konjugierter Antikörper und deren spezifische Bindung von Proteinen (Markern) der Zelloberfläche, kann über die detektierte Fluoreszenzsignalintensität eines spezifischen Emissionsspektrums (Abb. 2.14) auf die Markerproteinexpression geschlossen werden und so eine mehrdimensionale, phänotypische

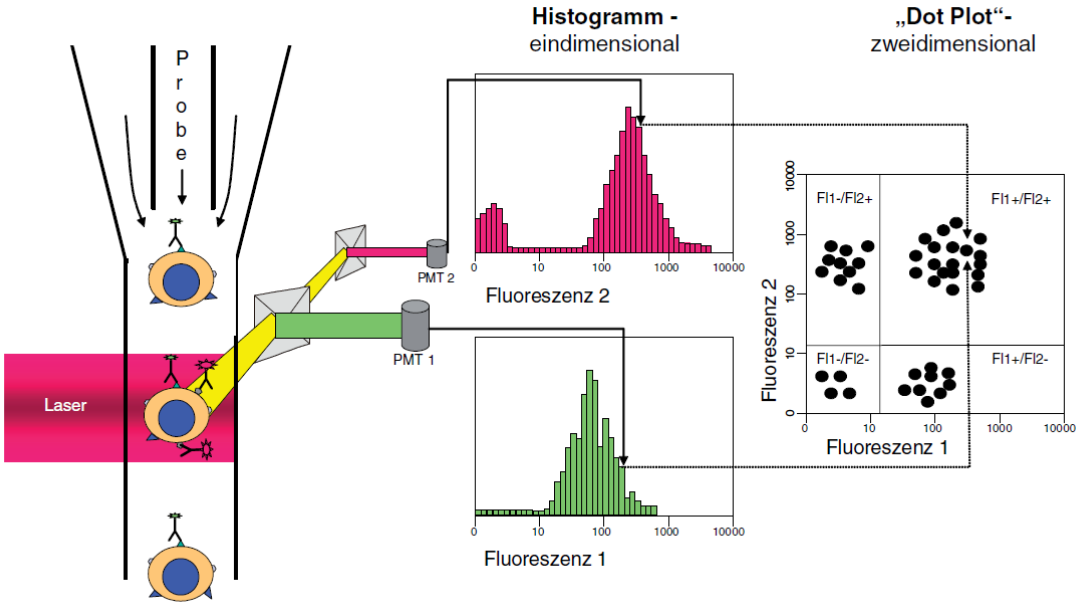


Abbildung 2.14.: Messsignale eines Durchflusszytometers für die zelluläre Analyse. In der Durchflusszelle passieren Fluorochrom-Antikörper-markierte Zellen einzeln den Kreuzungspunkt eines Laserstrahls. Auftreffendes Licht wird u. a. gestreut und Fluoreszenzen werden angeregt. Farbteilerspiegel sowie Filter trennen Fluoreszenzen und das von Photoelektronenvervielfachern (*Photomultiplier*, PMT) detektierte Licht wird für jede einzelne Zelle digital gespeichert. Für jede den Laserstrahl passierende Zelle werden simultan mehrere Fluoreszenzsignale aufgezeichnet. Während ein Histogramm graphisch die Anzahl der Fluoreszenzintensitäten für nur einen Fluoreszenzkanal (eindimensional) darstellt, integriert die Punktwolken-Darstellung („Dot-Plot") Signalintensitäten zweier Fluoreszenzkanäle (zweidimensional) und erreicht so mehr Informationstiefe, sodass Zellen ähnlicher Fluoreszenzintensitäten als Population z.B. in Form von Quadranten voneinander abgegrenzt werden können ($Fl1^+/Fl2^+$, $Fl1^-/Fl2^+$, $Fl1^-/Fl2^-$, $Fl1^+/Fl2^-$). Abbildung aus Sack (2007) mit freundlicher Genehmigung von Karger Publishers.

Charakterisierung der Zelle ermöglicht werden (Cossarizza et al., 2017).

Die durchflusszytometrische Analyse von HSPZ der Zellexpansionskulturen wurde mit dem Durchflusszytometer MACSQuant® 10 (Miltenyi Biotec), das mit den Lasern Violett (405 nm), Blau (488 nm) und Rot (638 nm) sowie mit Bandpass-Filtern 488/10 nm (für Vorwärtsstreulicht, *forward scatter* (FSC) und Seitwärtsstreulicht, *side scatter* (SSC)), 450/50 nm, 525/50 nm, 585/40 nm, 655-730 nm, und einem Langpass (LP)-Filter 750 nm LP ausgestattet war, durchgeführt. Die für die Phänotypisierung genutzten spezifischen Antikörper waren *REAfinity*™ -Antikörper. Diese sind rekombiniert generierte Antikörper, konstruiert aus der DNA-Fusion von mutiertem *constant fragment* (Fc) humanem Immunglobulin(Ig)G1 und dem *fragment of antigen binding* (Fab) monoklonaler Antikörper mit Ursprung Maus. Obwohl die Fc-Mutation dieser Konstrukte keine Bindung zu FcγRezeptoren vermittelt, wurden zur Abgrenzung der spezifischen Antikörperbindung von weiteren möglichen unspezifischen Antikörperbindungen Isotyp-Kontrollantikörper genutzt. Bei Isotypkontrollen sind das konjugierte Fluorochrom sowie das Fc-Fragment des Antikörpers mit dem spezifischen Antikörper identisch.

Alle genutzten Isotypkontrollen (siehe Tabelle 2.8) besaßen die Antigen-Spezifität gegen Schlitzschnecken-Hämocyanin. Obwohl sich die Abfüllkonzentrationen von Isotypkontroll- und korrespondierendem spezifischem Antikörper bis zu einem Faktor 6 unterschieden (siehe Tabelle 2.8), besaßen in Vorversuchen mit Zelllinien (siehe Abschnitt 2.15.2) auch höhere Färbekonzentrationen keinen relevanten Einfluss auf die Färbeindizes (*Stain Indices*). Daher wurde aus ökonomischen Gründen darauf verzichtet, Isotypkontrollantikörper- und spezifische Antikörper-Konzentration einander anzugleichen. So wurde für Isotypkontrollantikörper und korrespondierendem spezifischem Antikörper schließlich mit derselben Verdünnung der Abfüllkonzentration gearbeitet (siehe Tabelle 2.19).

Tabelle 2.19.: Fluorochrom-konjugierte Antikörper mit eingesetzten Endverdünnungen aus der Abfüllkonzentration für die Durchflusszytometrie

Antigen	**Fluorochrom**[(a)]	**Endverdünnung Analyse D0**	**Endverdünnung**[(c)] **Analysen D6 und D12**
CD34, human	VioBright™ 515	1:100	1:100
CD45RA, human	PE	1:50	1:75
CD49d, human	PE	1:50	1:75
CD38, human	APC	1:50	1:75
CD184, human	APC	1:50	1:75

Zellkulturtag 0 ($CD34^+$ Zellisolationstag, *Day* 0, D0); Zellkulturtag 6 (*Day* 6, D6); Zellkulturtag 12 (*Day* 12, D12)
[(a)] Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC)
[(b)] von D0 abweichende Endverdünnungen resultieren aus geringerer Zellzahl pro Probe an D6 bzw. D12

Für die Phänotypisierungsfärbungen der Expansionsversuche am Isolationstag (D0), am Zellkulturtag 6, *Day* 6 (D6) und am Zellkulturtag 12, *Day* 12 (D12) wurde die Zellsuspension jeder Probe zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 400×g). Nachdem der Überstand möglichst vollständig abgenommen wurde, wurde das Zellpellet in 80 µl Viobility™ 405/452 - Lösung (Verdünnung 1:200 in PBS) resuspendiert und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Färbung dient der Markierung toter Zellen. Darauffolgend wurde die Probe zu je 20 µl aufgeteilt, um dann 40 µl FACS Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.3) für die „ungefärbte" Probe bzw. 40 µl der vorher in FACS Puffer angesetzten 1,5×endkonzentrierten Isotypkontrollen-Färbelösung bzw. 40 µl einer der beiden vorher in FACS Puffer angesetzten 1,5×endkonzentrierten spezifischen Vielfachfärbungen (Panel M1: CD34-VioBright™ 515, CD38-APC, CD45RA-PE; Panel M2: CD34-VioBright™ 515, CD184-APC, CD49d-PE) zuzugeben. Nach kurzem Mischen wurden die Proben mit geschlossenem Deckel abgedunkelt im Inkubator (37°C) für 30 min inkubiert.

Die Färbung der lebenden Zellen bei physiologischer Körpertemperatur (37°C) gründet sich hauptsächlich auf die in Vorversuchen beobachtete temperaturabhängige Färbesensitivität des Markers CXCR4 (CD184). Ein Großteil der Chemokinrezeptoren, darunter auch CX-

CR4, weisen bei 37°C eine erhöhte Färbesensitivität auf (Della Berhanu et al., 2003). Bei physiologischer Temperatur bleiben die 7 Transmembrandomänen des Rezeptors fluide in der Zellmembran, was zum einen die Wahrscheinlichkeit der Bindung der korrekten Epitop-Konformation der drei extrazellulären *Loops* mit dem spezifischen Antikörper, zum anderen das Recyclen internalisierter Rezeptormoleküle in die Zellmembran ermöglicht (Goetz et al., 2018). Nach erfolgter Färbung wurden die Proben mit 1 ml warmem (37°C) FACS Puffer gewaschen, zentrifugiert (5 min, 400×g) und nach Überstandsabnahme (bis auf ≈20 µl) in 200 µl FACS Puffer aufgenommen und gemischt. Die Suspensionen wurden in 5 ml Röhrchen (*FACS Tubes*) überführt und von ca. 150 µl wurde bei mittlerer Flussrate die von den Zellen und Zelldebris emittierten Fluoreszenzsignale am Durchflusszytometer (MACSQuant® Analyzer 10) aufgezeichnet.

Für die Kompensation des gegenseitigen *Spillovers* im Detektionskanal der Fluorochrome VioBright™ 515 und PE wurde eine manuelle Kompensation mithilfe von Kompensationspartikeln (*Comp Beads*, Tabelle 2.9) direkt am Gerät durchgeführt. Dazu wurden an D0 zwei *FACS Tubes* mit je 1 Tropfen anti-REA-*Comp Beads* sowie 1 Tropfen blank-*Comp Beads* versehen und entweder 2 µl CD34-VioBright™ 515 oder 2 µl CD45RA-PE zugegeben, kurz gemischt und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert, ehe sie mit jeweils 500 µl FACS Puffer verdünnt wurden. Diese Einzelfärbungen wurden dann mit den probenspezifischen Messspannungen der Detektionskanäle zur stufenweisen Einstellung der Kompensationsmatrix genutzt, sodass die Mediane der negativen und positiven Populationen im jeweiligen *Spillover*-Kanal gleichwertig waren. Die so an D0 eingestellte Matrix samt Spannungen wurde als *Bank-Setting* gespeichert und für die durchflusszytometrische Messung an D0, D6 und D12 eines fortlaufenden Experimentes verwendet.

Für die Datenanalyse der *FCS*-Dateien wurde die Auswertesoftware `FlowJo` verwendet. Zur Abtrennung der positiven von den negativen Signalen eines Kanals, wurden alle Intensitätswerte, die >99% der Isotypkontrollintensitätswerte waren, als positive Signale definiert, sodass falsch positive Signale auf 1% limitiert waren. Das genaue Vorgehen der hierarchischen Grenzsetzung ist im Anhang in Abb. A.8, A.9 und A.10 dargestellt.

2.21.2. Koloniebildung der HSPZ nach Kultur auf nanostrukturierten Hydrogelen

Für frisch isolierte $CD34^+$ Zellen (D0) sowie nach 6 (D6) bzw. 12 (D12) Tagen Kultur wurde der funktionale Nachweis des Proliferations- und Differenzierungspotentials anhand eines *in vitro Assay* hinsichtlich des Koloniebildungspotentials erbracht. Bei diesem *Assay* wird eine einzelne hämatopoetische Progenitorzelle als koloniebildende Einheit, *colony-forming unit* (CFU), angesehen, die aufgrund der im Medium enthaltenden rekombinanten humanen

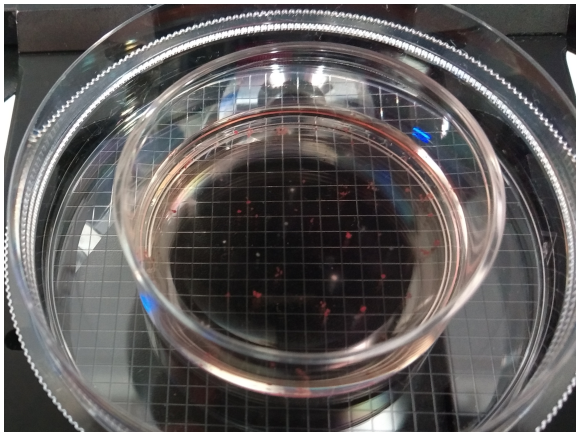


Abbildung 2.15.: Manuelles Auszählen der gebildeten Kolonien in Rahmen des CFU-*Assay* über visuelle Charakterisierung der Koloniety-pen am Lichtmikroskop. Ermittlung des myeloiden Koloniebildungspotentials für 14 Tage von HSPZ nach 6 Tagen *in vitro* Kultur. Ausplattierte Zellzahl ca. 500 in 1 ml Medium. Durchmesser der Zellkulturschale 35 mm.

Zytokine SCF, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)*, IL-3 und Erythropoietin (EPO) je nach Progenitorpotential in eine myeloide Kolonie differenziert, die sich anhand von Größe, Morphologie und zellulärer Zusammensetzung nach dem *Atlas of hematopoietic colonies from cord blood* (STEMCELL Technologies, 2010) wie folgt klassifizieren lässt: Erythroide Progenitorzellen bilden aufgrund der Hämoglobinisierung ihrer Nachkommen rote bis rotbraune Kolonien, *colony-forming unit-erythroid* (CFU-E) und *burst-forming unit-erythroid* (BFU-E). Granulozyten- und/oder Macrophagen-Progenitorzellen produzieren „weiße“ (nichthämoglobinisierte) Kolonien, *colony-forming unit-granulocyte, macrophage* (CFU-GM), *colony-forming unit-granulocyte* (CFU-G) sowie *colony-forming unit-macrophage* (CFU-M). Multipotente Progenitorzellen generieren eine gemischte Kolonie, *colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte* (CFU-GEMM).

Das für den CFU-*Assay* verwendete Medium (*MethoCult™ H4434 Classic*, STEMCELL Technologies) weist durch die beinhaltete Methylcellulose eine hohe Viskosität auf, was Zellbewegungen so minimiert, dass sich die gebildeten Tochterzellen in direkter Nähe zueinander befinden, was die Abgrenzung einzelner Kolonien gegeneinander bei einer geringen Plattierungsdichte ermöglicht. So wurde an D0, D6 und D12 von den erhaltenen HSPZ eine 10-fach konzentrierte Zellsuspension von 1500 Zellen in 330 µl Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit 2% FBS (Tabelle 2.4) hergestellt und diese bei RT in 3,3 ml *MethoCult™ H4434 Classic* appliziert. Nach gründlichem Durchmischen wurde dieser Ansatz für wenigstens 15 min zum Entweichen der Luftblasen stehen gelassen. Schließlich erfolgte das luftblasenfreie Auspipettieren in Triplikaten zu je 1 ml in Zellkulturschalen (Durchmesser 35 mm). Bis zu sechs dieser Kulturschalen wurden in einer Petrischale (Durchmesser 145) um eine zentrale, mit sterilem ddH_2O gefüllte Zellkulturschale (ohne Deckel) platziert. Die Petrischale war am Rand mit vier in sterilem ddH_2O-getränkten Zellstofftupfern bestückt, um die Feuchtigkeit zu erhalten.

Nach 10 bis 11 Tagen (Ansatz D0) bzw. 14 Tagen (Ansätze D6 und D12) im Zellinkubator (37°C, 5% CO_2, bis 95% r.F.) erfolgte die manuelle Auszählung der gebildeten Kolonien.

Dazu wurde die Kulturschale ohne Deckel auf eine auf dem Objekthalter eines inversen Lichtmikroskops (Axio Vert.A1) fixierte Zellkulturschale mit Gitter (Durchmesser 60 mm) platziert (Abb. 2.15). Dann wurden die Kolonien mithilfe des 5×-, ggf. 10×-Objektivs, wie oben definiert in rote, weiße und gemischte Kolonien morphologisch anhand des *Atlas of hematopoietic colonies from cord blood* (STEMCELL Technologies, 2010) kategorisiert und gezählt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Goldnanopartikel-Arrays

Für die oberflächliche Nanostrukturierung der Hydrogele wurde die in Abschnitt 2.9 beschriebene BCML-Technik angewandt. Die Beurteilung der Qualität der mit dieser Technik hergestellten AuNP-Arrays umfasst zum einen die Bildung von AuNP aus präformierten Goldsalz-Clustern der Mizellenkerne. Zum anderen ist es für die spätere Funktionalisierung der AuNP mit Liganden wichtig, die Hexagonalität der AuNP-Arrays zu charakterisieren.

3.1.1. Plasmabehandlung für die Goldnanopartikelbildung

Die Plasmabehandlung der beschichteten Glasträger ist ein notwendiger letzter Schritt, um im Prozess der BCML aus dem Array goldsalzbeladener Mizellen einen Array sphärischer AuNP zu generieren. Die durch Rotation mit goldsalzbeladener mizellarer Lösung beschichteten Glasträger konnten mithilfe der Wasserstoffplasmabehandlung erfolgreich in AuNP-Arrays unter Erhalt der quasi-hexagonalen Anordnung umgewandelt werden (Abb. 3.1). Die organische Polymerhülle der Mizellen konnte abgebrannt sowie die Goldionen(Au^{3+})-Cluster des Mizellenkerns zu elementaren AuNP reduziert werden. Das zeigt sich in der REM-Bildgebung (50.000× vergrößert) in einer deutlichen Reduktion der Partikeldurchmesser und höheren Bildkontrastes der Partikel nach der Plasmabehandlung (Abb. 3.1b) im Vergleich zum Bild vor der Plasmabehandlung (Abb. 3.1a).

3.1.2. Bestimmung der Partikelabstände und korrespondierender Partikeldichten mithilfe der REM-Bildgebung

Mithilfe der Elektrononmikroskopie - in diesem Fall der REM - kann die zweidimensionale Anordnung der nm-dimensionierten Goldpartikel sichtbar gemacht und ausgemessen werden. Die Abb. 3.2 zeigt exemplarisch eine REM-Aufnahme der AuNP-Arrays auf Glasträgern für jedes der vier genutzten Diblock-Copolymere. Im Vergleich ist deutlich zu sehen, wie die Polymerkettenlänge maßgeblich zu einer Vergrößerung des Abstandes der AuNP zueinander beiträgt. Mithilfe der in Abschnitt 2.14 gelisteten Parameter zur Generierung der Arrays auf Glasträgeroberflächen konnten somit vier distinkte Abstände erzielt werden. In allen

(a) Mizellärer Partikel-Array vor Plasmabehandlung **(b)** AuNP-Array nach Plasmabehandlung

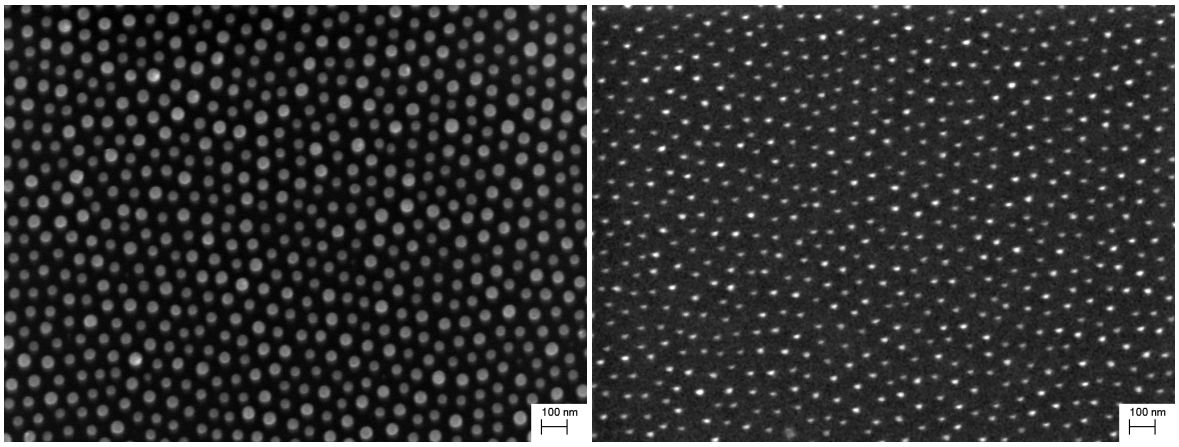


Abbildung 3.1.: REM-Aufnahmen zum Effekt der Plasmabehandlung auf mit goldsalzbeladener mizellarer Lösung beschichteter Glasträgeroberflächen (c(PS(1058)-*b*-P2VP(495))=5 mg/ml in *o*-Xylol, *Loading*=0,20, Rotationsbeschichtung bei 5000 rpm). Quasi-hexagonale Anordnung der Mizellen (helle runde Partikel) auf der Oberfläche vor Plasmabehandlung (a). Verlust der organischen Mizellenhülle durch Einfluss des Wasserstoffplasmas verringert den Partikeldurchmesser und reduziert die Au^{3+}-Ionen des Mizellenkerns zu elementaren AuNP unter Erhalt der quasi-hexagonalen Anordnung (b). Maßstab = 100 nm.

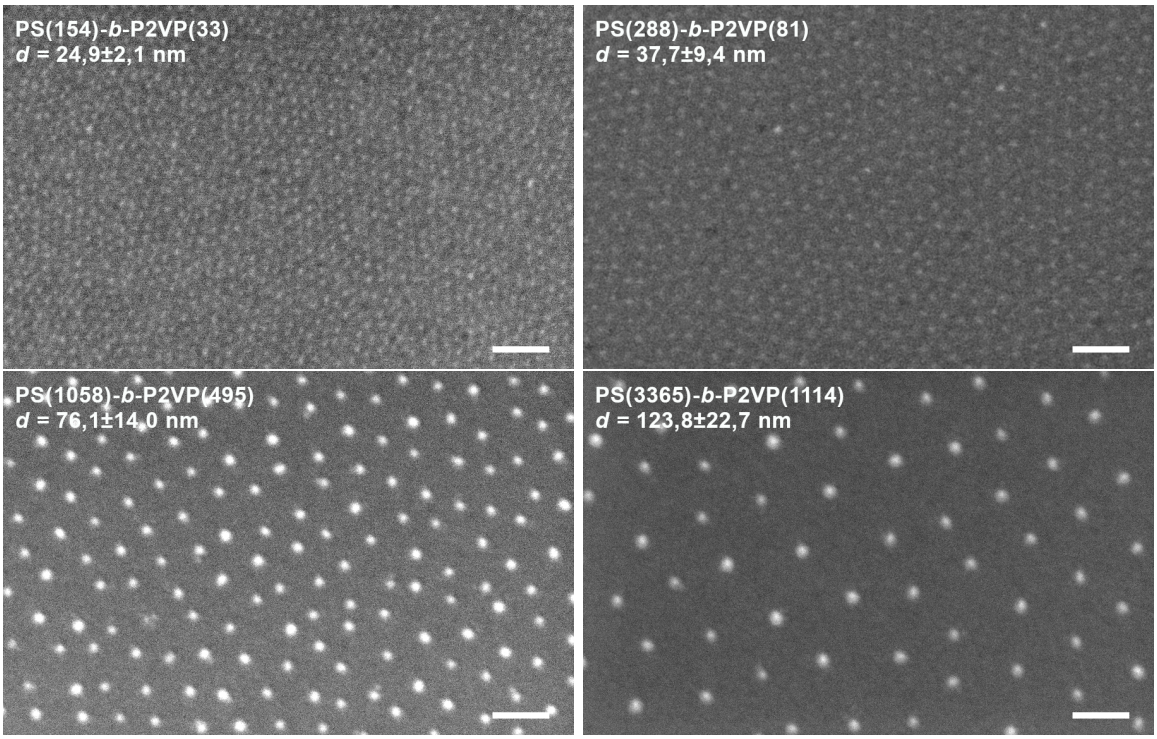


Abbildung 3.2.: REM-Aufnahmen von AuNP-Arrays distinkter Interpartikelabstände d. Durch die Wahl unterschiedlicher Diblock-Copolymer-Zusammensetzungen aus Polystyrol (PS) und Poly(2-vinylpyridin) (P2VP) können unterschiedlich weite Interpartikel-Abstände in einem quasi-hexagonalen Goldnanopartikelmuster erzielt werden. Maßstab = 100 nm.

(a) AuNP-Array auf einer Glasträgeroberfläche **(b)** Netzdiagramm der 6 nächsten Nachbarpartikel

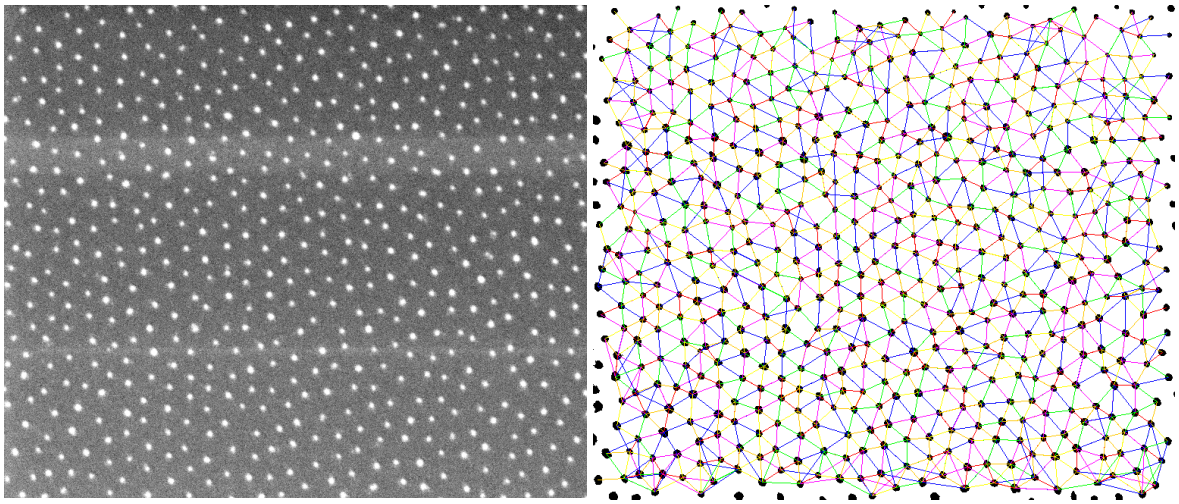


Abbildung 3.3.: REM-Bild eines AuNP-Arrays und dessen Auswertung hinsichtlich seiner Hexagonalität. REM-Bild (a) des AuNP-Arrays generiert aus der goldsalzbeladenen mizellaren Lösung des Diblock-Copolymers PS(1058)-*b*-P2VP(495). Analyse der Hexagonalität durch Verbindung der sechs nächsten Nachbarpartikel zum zentralen Partikel (b), basierend auf der Aufnahme (a).

Abbildungen ist die quasi-hexagonale Struktur der Partikel erkennbar. Darüber hinaus weisen die AuNP pro Oberfläche relativ uniforme Durchmesser auf.

Für die Berechnung der Partikeldichte von AuNP-Arrays auf Glasträgern (siehe dazu Abschnitt 2.9.3.3) wurde der mittlere Partikelabstand d ermittelt. PS154 und PS288 bilden Arrays mit sehr kleinen AuNP-Abständen (<50 nm), was in der Bildgebung zu einem für die Analysesoftware (`ImageJ (Fiji)` Plugin *dot analyse2*) zu geringen Bildkontrast führte und der mittlere Partikelabstand d daher über manuelles Ausmessen bestimmt wurde. Für die mit PS1058 und PS3365 hergestellten AuNP-Arrays konnte mithilfe des `ImageJ (Fiji)` Plugins *dot analyse2* die Bestimmung des mittleren Partikelabstandes d sowie des Ordnungsparameter Ψ_6 durchgeführt werden. Abb. 3.3 zeigt beispielhaft die Auswertung eines REM-Bildes eines mit PS1058 hergestellten Arrays (Abb. 3.3a) und dem entsprechenden Analysebild, in dem die Verbindungen zu den sechs nächsten Nachbarpartikeln zum jeweils zentralen Partikel dargestellt werden (Abb. 3.3b). Der für diesen AuNP-Array bestimmte mittlere Partikelabstand beträgt 76,1±14,0 nm und weist einen Ordnungsparameter von 0,57 auf.

Es wurden pro Polymertyp jeweils drei Ansätze der goldsalzbeladenen mizellaren Lösungen hinsichtlich AuNP-Array-Bildung auf Glasträgern charakterisiert und in Tabelle 3.1 gelistet. Die mittleren Partikelabstände d aus drei Lösungsansätzen betragen 25,7±1,2 nm (PS154), 37,0±2,6 nm (PS288), 77,7±8,4 nm (PS1058) und 124,3±14,5 nm (PS3365).

Je größer der mittlere Partikelabstand d, desto größer ist auch die Standardabweichung SD_d. Der relative Fehler des mittleren Partikelabstandes (SD_d/d) ist beim kleinsten Partikelabstand etwa 8% und beim größten Partikelabstand etwa 20%. Die berechneten mittleren Partikel-

Tabelle 3.1.: Partikeldichten von AuNP-Arrays auf Glasträgern. Pro Polymer wurden drei Ansätze der goldsalzbeladenen mizellaren Lösungen charakterisiert.

Diblock-Copolymer PS(x)-*b*-P2VP(y)	d **[nm]**	SD_d/d **[%]**	Ψ_6	n **[μm^{-2}]**
PS(154)-*b*-P2VP(33)	24,9±2,1	8,4	N/A	1862,39
	26,2±2,0	7,6	N/A	1682,16
	25,9±2,2	8,5	N/A	1721,35
PS(288)-*b*-P2VP(81)	37,7±9,4	24,9	N/A	812,43
	36,8±4,5	12,2	N/A	852,66
	36,6±3,4	9,3	N/A	862,00
PS(1058)-*b*-P2VP(495)	80,7±14,6	18,1	0,55	177,31
	76,3±14,8	19,4	0,58	198,34
	76,1±14,0	18,4	0,57	199,39
PS(3365)-*b*-P2VP(1114)	124,0±28,0	22,6	0,52	75,10
	125,2±25,4	20,3	0,56	73,66
	123,8±22,7	18,3	0,57	75,34

x Anzahl Styrolmonomere, Polystyrol (PS)
y Anzahl 2-Vinylpyridinmonomere, Poly(2-vinylpyridin) (P2VP)
d mittlerer Partikelabstand mit Standardabweichung (SD_d)
Ψ_6 hexagonale Ordnung
n Partikeldichte

dichten n betragen für PS(3365)-*b*-P2VP(1114) 74,7±0,7 μm^{-2}, für PS(1058)-*b*-P2VP(495) 192,7±10,2 μm^{-2}, für PS(288)-*b*-P2VP(81) 842,4±21,5 μm^{-2} und für PS(154)-*b*-P2VP(33) 1755,3±77,4 μm^{-2}. Der Unterschied zwischen der geringsten Partikeldichte (Partikelabstände von ca. 124 nm) zur höchsten Partikeldichte (Partikelabstände von ca. 26 nm) beträgt Faktor 23,5. Die vier mittleren Partikelabstände überlappen sich nicht in Bezug auf ihre Streuung, wodurch sich eine relativ kontinuierliche Abstandsskalierung von ca. 26 bis 124 nm ergibt. Die korrespondierenden Partikeldichten liefern die Basis für die gezielte Untersuchung der Abhängigkeit zellulärer Effekte von der Liganden- bzw. Rezeptorendichte.

3.2. Charakterisierung des Biohybridhydrogels

Da die Biohybridhydrogele die strukturgebende Zellkulturmatrix in den Versuchen sind, wurden im Folgenden die Eigenschaften erfasst, die Rückschlüsse auf einen Vergleich mit der strukturgebenden biologischen Nische von HSPZ zulassen. So wurden neben dem Maleimid-Funktionalisierungsgrad von HM, der maßgeblich die Netzwerkdichte bestimmt, auch das mechanische Verhalten der Gele bei Schwellung, Scherung, Kompression sowie die lokale Elastizität, Strukturhomogenität und Maschenweite ermittelt.

3.2.1. Mittlerer Maleimid-Funktionalisierungsgrad des Heparin-Maleimid-Konjugats

Für die Bildung der Hydrogelmatrix wurden gleiche Volumina von gelöstem HM und sPEGthiol miteinander gemischt (Abschnitt 2.10.3.1). In der theoretischen Annahme eines maximalen Vernetzungsgrades der Matrix, wurde die *Click*-Reaktion von Maleimid- und Thiol-Gruppe stöchiometrisch ausgeglichen, indem der Maleimid-Funktionalisierungsgrad (siehe dazu Abschnitt 2.10.2) der HM-Charge die eingesetzte Menge an sPEGthiol bestimmte. Der mittlere Funktionalisierungsgrad über die in Tabelle 2.17 gelisteten HM-Chargen betrug 4,9±0,3. Bei einer konstanten Konzentration c(HM) von 2 nmol/µl errechnet sich ein mittlerer Feststoffgehalt (HM+sPEGthiol) bezogen auf die Präpolymerlösung von näherungsweise 5,2±0,1%.

3.2.2. Mechanische Eigenschaften der Gelmatrix

3.2.2.1. Schwellverhalten

gravimetrische Charakteristik der Gele Es wurden Gele mit kalkuliertem Feststoffgehalt, d. h. Masse HM+sPEGthiol bezogen auf die Gesamtmasse der Präpolymerlösung, von 3,8% gravimetrisch untersucht (siehe dazu Abschnitt 2.10.4.1). Die Trockenmasse W_t des gefriergetrockneten, zuvor ausgeschwollenen Gels als arithmetisches Mittel mit SD aus 6 technischen Replikaten betrug 9,9±0,48 mg. Die initiale Feststoffmasse (HM+sPEGthiol) eines jeden Gels betrug 6,3 mg, sodass die Gele durch die Präparation in Phosphatpuffer (0,1 M, pH ≈6,4 bei RT) und die Schwellung in PBS um eine Feststoffmasse von 3,6 mg zunahmen, was einer Massezunahme um 57% entspricht. Folglich banden die Gele bei Schwellung elektrostatisch Ionen aus der Natriumphosphatlösung sowie phosphatgepufferten Salzlösung (PBS), z. B. Na^+, K^+, Cl^- sowie Hydrogen- und Dihydrogenphosphat und möglicherweise auch Hydratwasser.

Der Quellungsfaktor q als arithmetisches Mittel mit SD aus den 6 technischen Replikaten betrug 17,62±0,99. Dies bedeutet, dass die Gele das 17,6-fache ihrer Trockenmasse in Wasser binden, wenn das Lösungsmittel PBS ist. Schließlich betrug der Wassergehalt als arithmetisches Mittel mit SD aus 6 technischen Replikaten 94,3±0,31%. Dieser hohe Wassergehalt wird im Vergleich der Durchmesser eines geschwollenen Gels mit einem an Luft getrockneten eindrucksvoll sichtbar und entspricht nach Trocknung der Reduktion des Durchmessers auf etwa ein Drittel (Abb. 3.4). Darüber hinaus wird die Struktur der Hydrogelmatrix geschwollener Gele maßgeblich durch die elektrostatischen Effekte zwischen polyanionischem Heparin und den im Puffer gelösten Kationen stabilisiert (siehe Abb. 2.8b und Abb. 3.5a). Ein Tränken der Gele in ddH_2O lässt diese so weit anschwellen (Abb. 3.5b), dass diese ihre Formstabilität verlieren (Abb. 3.5c) und schon bei leichten Berührungen zerbersten können.

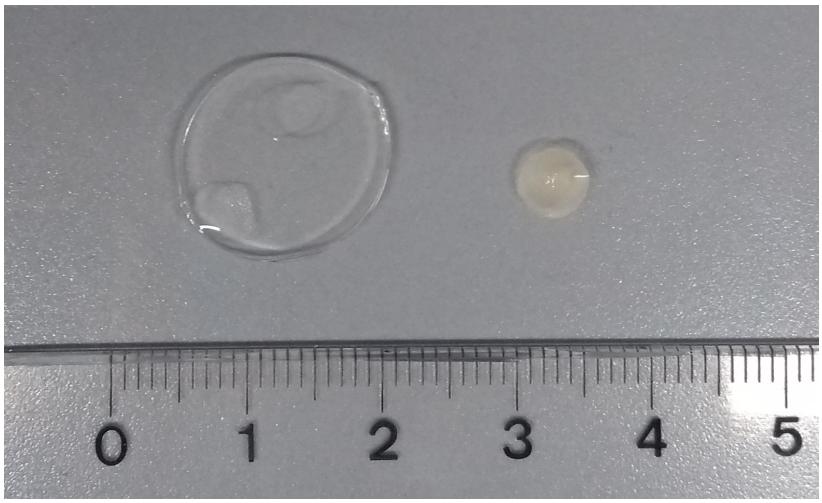
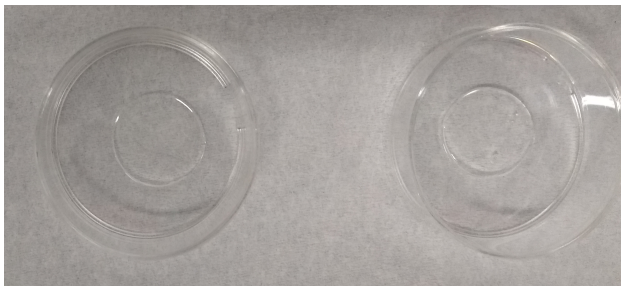
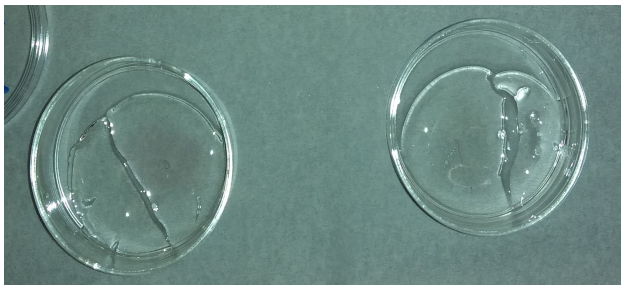


Abbildung 3.4.: Fotografie der Hydrogelscheiben vor und nach Trocknung an Luft. Der Durchmesser der Gelscheibe reduziert sich durch den Wasserverlust bei Trocknung auf etwa ein Drittel. Ziffern des Maßstabs in cm.

(a) Gele vor Wasserschwellung



(b) Gele nach Wasserschwellung



(c) Gel nach Wasserschwellung auf Pinzette

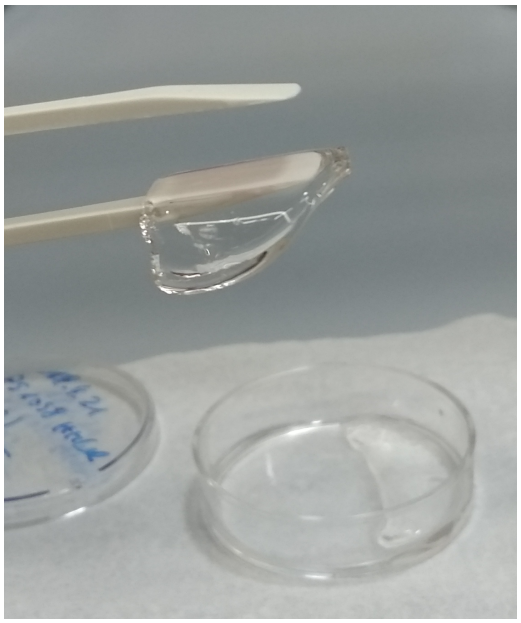


Abbildung 3.5.: Einfluss von deionisiertem Wasser auf die Hydrogelmatrix. In PBS äquilibrierte Hydrogele (a) unterlaufen nach Tränken in doppelt deionisiertem Wasser nach ca. 1,5 h durch die Aufnahme von Wasser eine erhebliche Volumenvergrößerung (b) und verlieren ihre Formstabilität (c). Fotografien.

volumetrische Charakteristik der Gele Für die volumetrische Untersuchung der Hydrogelmatrix wurden Gelscheiben zweier HM-Chargen (Funktionalisierungsgrad 4,5 und 4,6) jeweils als technische Triplikate verwendet. Deren kalkulierter Feststoffgehalt (HM+sPEGthiol bezogen auf Präpolymerlösung) betrug in Näherung 3,8%. Die radiale Schwellung S_{radial} wurde, wie in Abschnitt 2.10.4.1 beschrieben, als arithmetisches Mittel mit SD aus 3 technischen Replikaten bestimmt und betrug für S_{radial}(HM 4,5) 1,061±0,016 mm und für S_{radial}(HM 4,6) 1,023±0,027 mm. Das entspricht einer relativen Längenänderung ΔL_{radial}(HM 4,5) von 6,0% sowie ΔL_{radial}(HM 4,6) von 2,2%.

Der Einfluss der ermittelten eindimensionalen Längenzunahme des Hydrogelkörpers auf die an der Hydrogeloberfläche gebundenen Nanostruktur ist irrelevant, da der relative Fehler des mittleren Goldnanopartikelabstandes (SD_d/d, Tabelle 3.1) mit ≥7,6% größer ist als die durch Schwellung verursachte relative Längenänderung von ≤6,0%. Darüber hinaus wird angenommen, dass bei Gelen mit höherem Feststoffgehalt, so wie sie in den HSPZ-Experimenten genutzt wurden, der eindimensionale Längenzuwachs durch die höhere Anzahl von Vernetzungspunkten geringer ausfällt.

3.2.2.2. Bestimmung von Elastizitätsmoduln und Maschenweiten

Zur mechanischen Charakteristik der Hydrogelkörper wurde deren Deformationsverhalten unter mechanischer Belastung getestet. Da Hydrogele viskoelastische Materialien sind, wurde der E-Modul als Materialkennwert des Hydrogelkörpers bei 37°C sowohl durch Rotationsrheometrie als auch Kompression bestimmt. Getestet wurden zwei Geltypen, ausgeschwollene Gelscheiben mit und ohne durchlaufenen Sterilisationsprozess derselben HM-Charge (Funktionalisierungsgrad 4,6) und mit unterschiedlichem Feststoffgehalt. In Oszillationsversuchen konnte zunächst im Amplitudentest der lineare viskoelastische Bereich, in welchem der Speichermodul G' konstant war, bei einer konstanten Frequenz von 0,5 rad/s, 1 rad/s und 5 rad/s für den Bereich von 0,4 Pa bis mindestens 100 Pa bestimmt werden (Abb. 3.6a). Über den Frequenztest konnte der lineare Frequenzbereich von 0,2 rad/s bis 30 rad/s (Abb. 3.6b) bestimmt werden, in welchem der Speichermodul G' den Verlustmodul G'' überwiegt. Aus den Messwerten wurde $G' >> G''$ abgeleitet, sodass $G^* \approx G'$ (Formel 2.11 und 2.12) gilt. Damit zeigte der Hydrogelkörper ein annähernd ideal elastisches, gelähnliches Verhalten.

Für die Berechnung des E-Moduls E_{osz} (siehe Formel 2.13) aus den Rotationsrheometriedaten wurde die allgemeine elastische Materialkonstante $\nu = 0{,}45$ für Hydrogele eingesetzt. Daher ist in dieser Berechnung die alleinige Variable der komplexe Schermodul (Schubmodul) G^*. Pro Geltyp wurde das arithmetische Mittel aus drei technischen Replikaten gebildet und mit der SD angegeben. Der Einfluss des initialen Feststoffgehalts (HM+sPEGthiol bezogen auf die Präpolymerlösung) korreliert deutlich mit dem Wert des E-Moduls E_{osz}. So weisen Gelscheiben mit einem initialen Feststoffgehalt von 3,81% einen geringeren komplexen Schermodul G^* und

(a) Speichermodul von Hydrogelscheiben in Abhängigkeit der Schubspannung.

(b) Speichermodul von Hydrogelscheiben in Abhängigkeit der Kreisfrequenz.

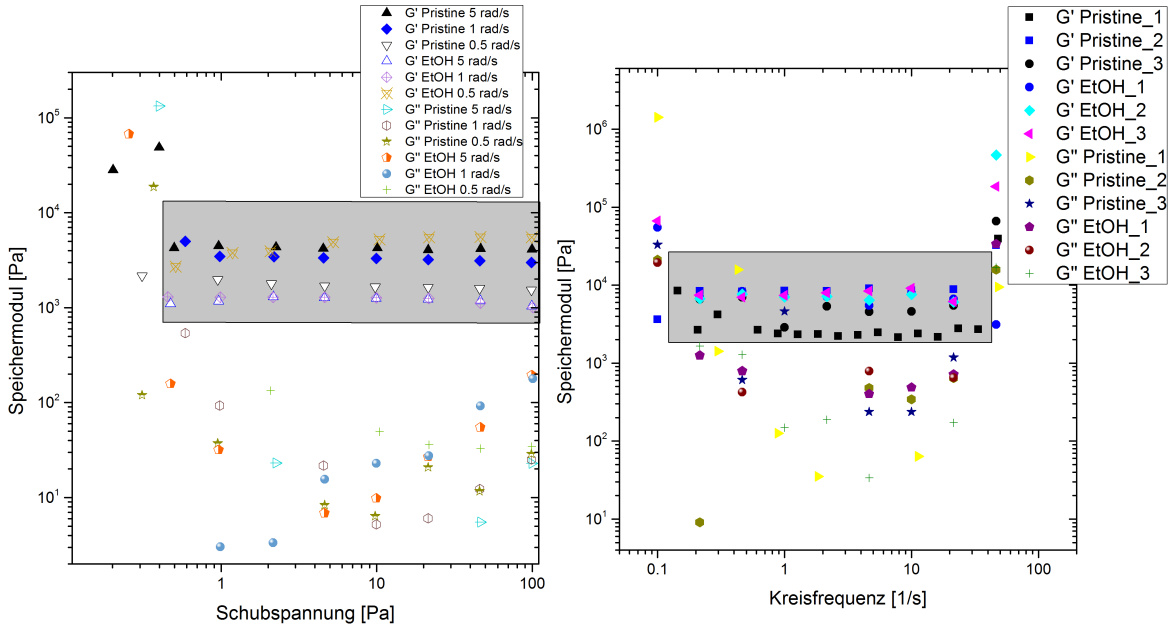


Abbildung 3.6.: Rotationsrheometrie von Hydrogelscheiben mit initialem Feststoffgehalt von 5,03%. Das Diagramm des Amplitudentests zeigt den Speicher- und Verlustmodul in Abhängigkeit von der Schubspannungsamplitude bei einer konstanten Frequenz von 0,5 rad/s, 1 rad/s und 5 rad/s (a). Das Diagramm des Frequenztests zeigt den Speicher- und Verlustmodul in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz bei konstanter Schubspannungsamplitude von 1 Pa (b). Der lineare viskoelastische Bereich ist jeweils grau hinterlegt. Messtemperatur 37°C. Messung technischer Triplikate von unbehandelten Gelen (Pristine) sowie mit 80% (v/v) Ethanol(EtOH)-sterilisierten Gelen. G'=Speichermodul, G''=Verlustmodul. Diagramme erstellt von Johanna Hafner.

Tabelle 3.2.: Mechanische Eigenschaften der Hydrogele

Feststoffgehalt [%] [(a)]	**3,81**		**5,03**	
Gelbehandlung	**unbehandelt**	**sterilisiert**	**unbehandelt**	**sterilisiert**
ξ [nm]	13,1±0,4	12,7±2,9	9,3±1,7	8,4±1,2
G^* [kPa]	1,9±0,2	2,1±1,0	5,3±2,5	7,3±0,3
E_{osz} [kPa] [(b)]	5,5±0,5	6,0±2,7	15,4±7,3	21,1±0,9
E_{komp} [kPa] [(c)]	N/A	N/A	25,5±2,6	23,6±1,6
$G_{0,MPT}$ [kPa] [(d)]	N/A	N/A	(9,0±3,6)×10^{-3}	N/A

[(a)] HM+sPEGthiol bezogen auf Präpolymerlösung
[(b)] aus oszillierenden Scherversuchen geschwollener Gele berechnet
[(c)] in uniaxialer Kompression geschwollener Gele ermittelt
[(d)] ungeschwollene Gele
Mittelwerte von Triplikaten mit SD

damit auch geringeren E-Modul E_{osz} als Gelscheiben mit einem höheren initialen Feststoffgehalt von 5,03% auf (Tabelle 3.2). Gele geringeren initialen Feststoffgehaltes dehnen sich mehr als Gele höheren initialen Feststoffgehaltes unter Einwirken gleicher Spannung. Darüberhinaus weisen unbehandelte Gelscheiben einen geringeren komplexen Schermodul G^* und entsprechend geringeren E-Modul E_{osz} als EtOH-sterilisierte Gelscheiben desselben initialen Feststoffgehaltes

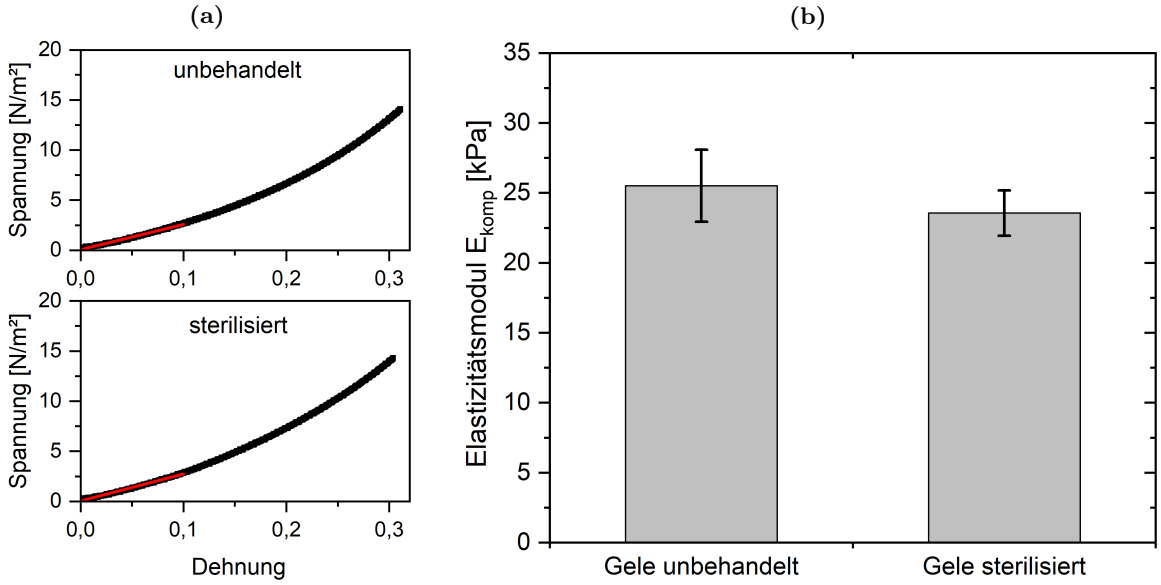


Abbildung 3.7.: Bestimmung des E-Moduls E_{komp} über uniaxiale Kompression. Exemplarische Spannungs-Dehnungs-Kurven für unbehandelte (a oben) und sterilisierte Gele (a unten). Ermittlung des mittleren E-Moduls E_{komp} aus der linearen Spannungs-Dehnungs-Kurve im Dehnungsbereich 0–10% (0–0,1; rot markiert in (a)), grafisch aufgetragen in (b) als Mittelwerte von Triplikaten mit SD.

auf (Tabelle 3.2).

Geltypen höheren initialen Feststoffgehaltes wurden auch für HSPZ-Kultivierungen eingesetzt. Daher wurde über eine Kompressionsmessung eine exaktere Bestimmung des E-Moduls E_{komp} durchgeführt. Sowohl für technische Triplikate unbehandelter als auch EtOH-sterilisierter Gelscheiben wurde E_{komp} aus der linearen Spannungs-Dehnungs-Kurve im Dehnungsbereich von 0 bis 10% bestimmt (Abb. 3.7a). Der E_{komp} beträgt für unbehandelte Gele 25,5±2,6 kPa und liegt unwesentlich höher im Vergleich zum E_{komp} von sterilisierten Gelen mit 23,6±1,6 kPa (Tabelle 3.2 und Abb. 3.7b). Der Sterilisationsprozess (80% (v/v) EtOH; Ab- und Anschwellen der Gele) beeinflusst die untersuchten mechanischen Eigenschaften unwesentlich.

Da die Hydrogelmatrix ein dreidimensionales Netzwerk darstellt, wurde die Netzkettenlänge, d. h. der Abstand zwischen zwei Netzpunkten als Maschenweite ξ bestimmt, um abschätzen zu können, wieweit lösliche Moleküle bestimmter Größenordnung frei durch das Hydrogelnetzwerk diffundieren können. Die Maschenweite ξ wurde aus dem in der Rotationsrheometrie ermittelten Speichermodul G' nach Formel 2.15 berechnet und ist in Tabelle 3.2 aufgelistet. Mit höherem initialen Feststoffgehalt nimmt auch die Anzahl an Netzpunkten und folglich die Netzwerkdichte zu, sodass Gelscheiben mit einem initialen Feststoffgehalt von 5,03% eine kleinere Maschenweite ξ aufweisen als Gelscheiben mit einem initialen Feststoffgehalt von 3,81% (Tabelle 3.2). Sterilisierte Gele haben im Vergleich zu unbehandelten Gelen desselben initialen Feststoffgehaltes eine etwas reduzierte Maschenweite, was vermutlich durch eine räumliche Verdichtung der Netzketten während des Ab- und Anschwellens der Gele während

des Sterilisationsprozesses bedingt ist. Die für HSPZ-Kultivierungen eingesetzten sterilisierten Gele mit höherem initialen Feststoffgehalt weisen eine Maschenweite von 8,4±1,2 nm auf. Dieser Netzpunktabstand ermöglicht eine Diffusion von ≤8 nm-großen Molekülen innerhalb des Netzwerkes. So kann auch das Chemokin SDF-1α (8 kDa, Durchmesser ≈5 nm; Crump et al., 1997), welches als Signalmolekül für HSPZ-Kulturversuche verwendet wurde, innerhalb des Gelnetzwerks diffundieren.

Für das vorliegende Hydrogelsystem wurde außerdem die mikrorheologische MPT-Methode (siehe Abschnitt 2.10.4.4) durchgeführt, vorrangig um die Homogenität der Verteilung der Matrixkomponenten HM und sPEGthiol beurteilen zu können. Die beiden unterschiedlich fluoreszierenden Partikel-Typen wurden jeweils der gelösten HM- bzw. sPEGthiol-Fraktion beigegeben, ehe beide Komponenten für die Vernetzungsreaktion durchmischt wurden. Wie oben bestimmt, liegt die Maschenweite des hierfür verwendeten Gels im geschwollenen Zustand mit 9,3±1,7 nm wesentlich unterhalb des Nenndurchmessers von 200 nm der Tracerpartikel, die bei der MPT-Methode eingesetzt wurden. Somit wurden die Partikel im auspolymerisierten Netzwerk gefangen und konnten sich in der kontinuierlichen Gelstruktur durch ihre Brown'sche Molekularbewegung in alle Richtungen bewegen. Elastisch gefangene Partikel werden im Gegensatz zu frei diffundierenden Partikeln in ihrer Bewegungsexkursion eingeschränkt. Die Abb. 3.8a und 3.8d zeigen die Trajektorien eines jeden Partikels im Bildausschnitt eines Gels. Die Trajektorien sind punktuell lokalisiert, die Partikel somit im Gel gefangen. Die Verteilung beider ins Gel eingebetteten Tracerpartikel-Typen (grün, rot) ist für jede der beiden Mischvarianten gleichmäßig über den gesamten Bildausschnitt, was auf eine homogene Gelzusammensetzung bzw. Netzwerkbildung hinweist. Es sind keine Makroporen erkennbar. Das manuelle Pipettieren ist daher für die Gelbildung eine effiziente Mischmethode.

Aus den Koordinaten der Partikelzentroide der Trajektorien wurde das MSD ($\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$) zu jedem Zeitpunkt ermittelt. Das MSD der einzelnen Partikel-Typen bleibt für alle Mischvarianten konstant über die Zeit τ (Abb. 3.8 b, c, e, f) und beträgt im Mittel in Näherung $1 \times 10^{-3} \mu m^2$. Diese zeitunabhängigen MSDs sind charakteristisch für elastisch gefangene Partikel und bestätigen ein gelähnliches Netzwerk.

Pro Mischvariation wurden technische Duplikate gefertigt und pro Probe vier verschiedene Positionen der Gelschicht nahe der Glasoberfläche aufgezeichnet. Das mittlere MSD aller Partikel eines Typs (rot oder grün) über alle vier Positionen eines Gels zeigt, dass die Streuung zwischen den MSDs der verschiedenen Positionen größer ist als die Streuung zwischen den MSDs beider Partikel-Typen (Abb. 3.9a links). Dies weist auf eine Einbettung der Partikel in ein stabil verbundenes Netzwerk hin. Der Vergleich der mittleren MSDs aller vier Gele zeigt, dass diese nicht signifikant unterschiedlich sind - weder von Mischvariation zu Mischvariation, noch von Duplikat zu Duplikat (Abb. 3.9a rechts). Mithilfe der mittleren MSDs konnten außerdem die lokalen viskoelastischen Eigenschaften der ungeschwollenen Gele als Schermodul

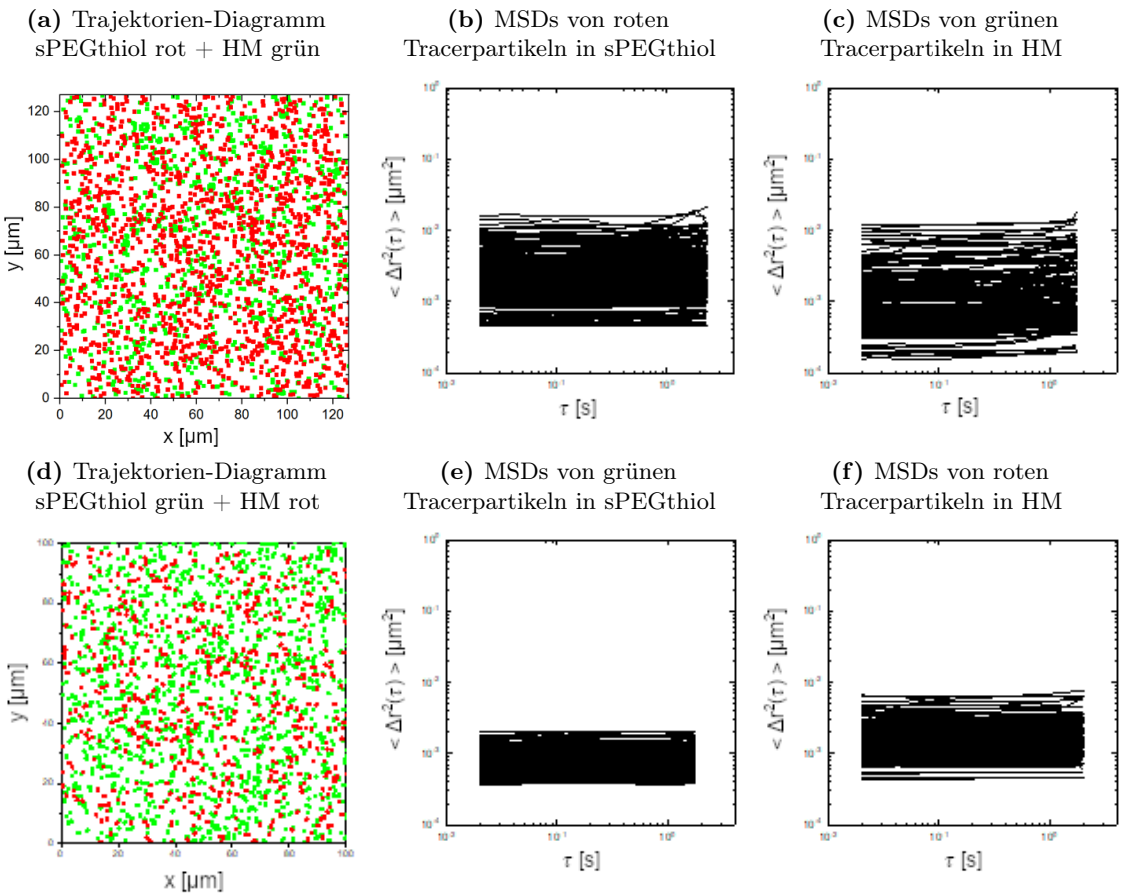


Abbildung 3.8.: MPT Messungen von Gelen zwei verschiedener Mischvariationen zur Bewertung der Gelhomogenität. Bildausschnitte eines Hydrogels mit homogen einpolymerisierten grün und rot fluoreszierenden Partikeln mit 0,2 µm Durchmesser (a, d). Dargestellt sind die Trajektorien der durch Brown'sche Molekularbewegung verursachten Fluktuation eines jeden Partikels (a, d). Partikel gleicher Fluoreszenz wurden initial in jeweils einer der beiden Vernetzungskomponenten des Hydrogels dispergiert: rote in sPEGthiol + grüne in HM (a) bzw. grüne in sPEGthiol + rote in HM (d). Konstantes mittleres Verschiebungsquadrat (*mean square displacement*, MSD, $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$) aller Partikel über die Zeit τ, doppelt logarithmische Auftragung (b, c, e, f).

$G_{0,\mathrm{MPT}}$ bestimmt werden. Der gemittelte $G_{0,\mathrm{MPT}}$ eines jeden Gels ist von der Frequenz (ω) unabhängig und beträgt ≈10 Pa (Abb. 3.9b, Tabelle 3.2). Er unterscheidet sich nicht signifikant von Gel zu Gel (Abb. 3.9b). Damit zeigen die Gele eine hohe Reproduzierbarkeit in der Herstellung von Replikat zu Replikat.

Das primäre Ziel der Analytik mittels MPT-Methode war die Darstellung einer homogenen Mischung beider Matrix-Komponenten durch einfaches Durchmischen mittels Pipettieren. Es konnte eine Materialheterogenität ausgeschlossen werden. Sekundär war die mikrorheologische Charakteristik der Matrix ungeschwollener Gele, die ebenso bei allen Replikaten ähnlich ist, aber um etwa drei Größenordnungen von der Makrorheologie geschwollener Gele abweicht.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass für Zellkulturversuche genutzte sterilisierte Hydrogelmatrices einen mittleren Feststoffgehalt (HM+sPEGthiol bezogen auf die Präpo-

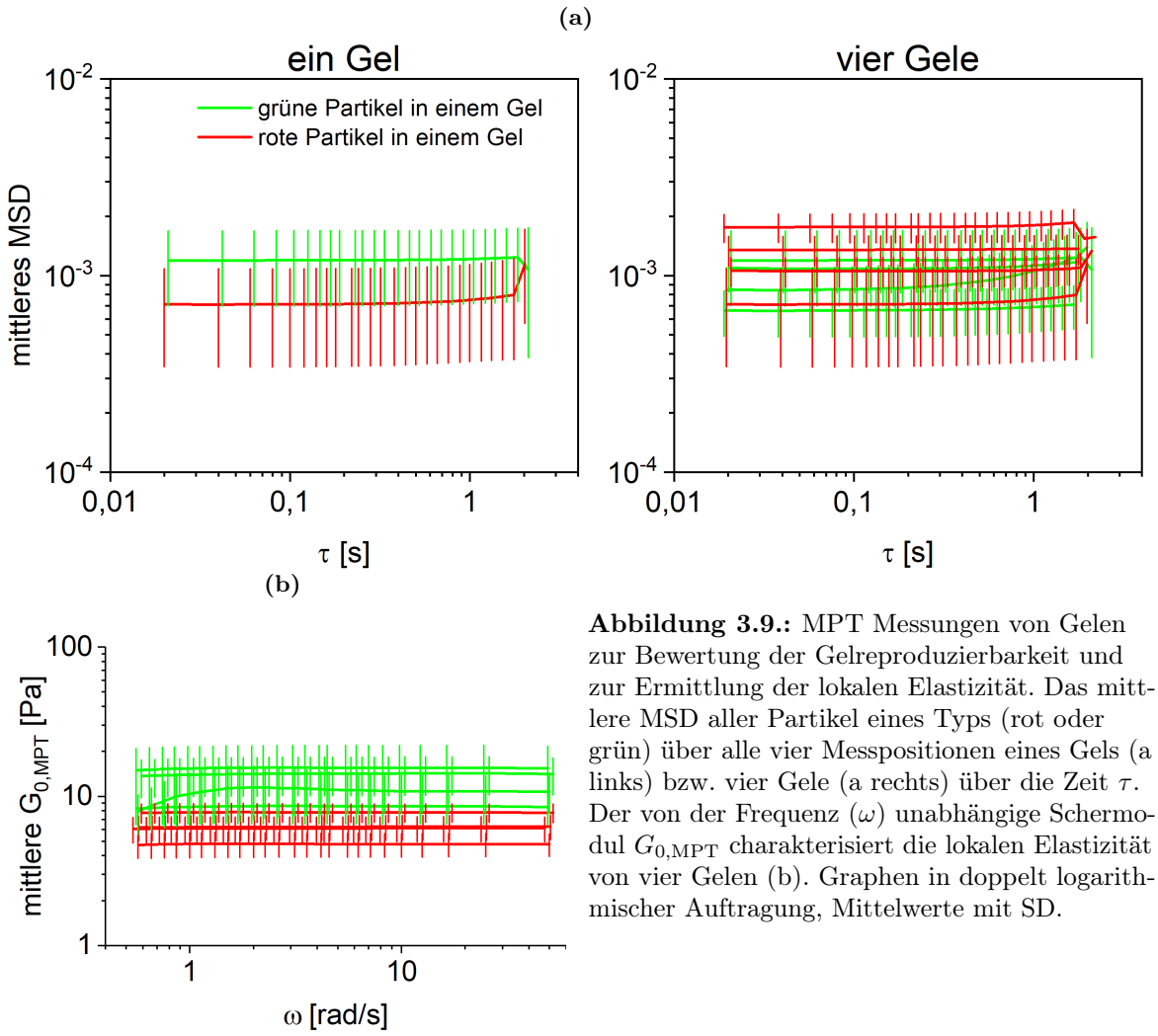


Abbildung 3.9.: MPT Messungen von Gelen zur Bewertung der Gelreproduzierbarkeit und zur Ermittlung der lokalen Elastizität. Das mittlere MSD aller Partikel eines Typs (rot oder grün) über alle vier Messpositionen eines Gels (a links) bzw. vier Gele (a rechts) über die Zeit τ. Der von der Frequenz (ω) unabhängige Schermodul $G_{0,\mathrm{MPT}}$ charakterisiert die lokalen Elastizität von vier Gelen (b). Graphen in doppelt logarithmischer Auftragung, Mittelwerte mit SD.

lymerlösung) von ≈5,2±0,1%, eine Maschenweite ξ von 8,4±1,2 nm und einen E_{komp} von 23,6±1,6 kPa aufweisen.

3.2.3. Nachweis der Nanostrukturanbindung auf der Hydrogeloberfläche

3.2.3.1. Stromlose Abscheidung von Gold an der hydrogelgebundenen Nanostruktur

Für den qualitativen Nachweis des Übertrages der AuNP auf die Hydrogeloberfläche wurde die stromlose Abscheidung elementaren Goldes an den AuNP durchgeführt (Abschnitt 2.12.1). Durch die Reduktion von Au^{3+} aus einer wässrigen Lösung mit NH_2OH an der AuNP-Oberfläche konnte der Größenzuwachs durch die Reflexion violetten Lichts sichtbar gemacht werden. In der Abb. 3.10 (rechts) ist die Violettfärbung der Hydrogeloberfläche der kreisrunden Gelscheibe deutlich erkennbar, während der kreisrunde Bereich des AuNP-Array Glasträgers, der in Kontakt mit dem Gel bei der Polymerisation war, ungefärbt erscheint und

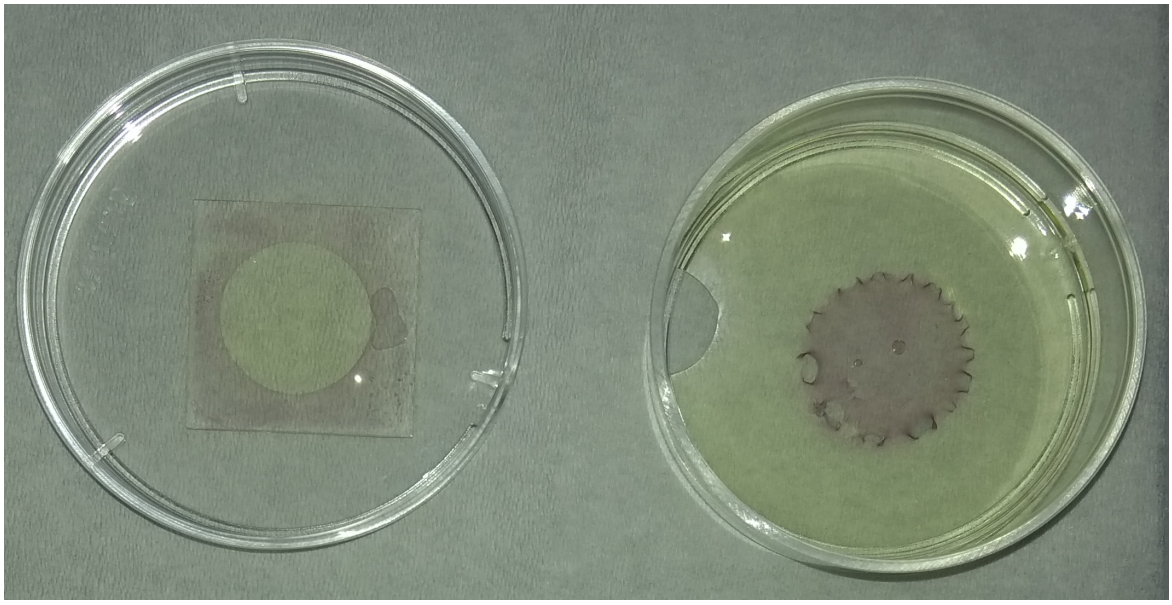


Abbildung 3.10.: Fotografie zum qualitativen Nachweis des Transfers des AuNP-Arrays auf die Hydrogeloberfläche. Visualisierung durch Anwachsen der Nanopartikeldurchmesser mittels stromloser Abscheidung von Gold aus einer Lösung mit Au^{3+} mithilfe von NH_2OH. AuNP dienen als Keime für die Reduktion zu elementarem Gold und Partikelvergrößerung, was zu veränderter Oberflächenplasmonenresonanz und Lichtreflexion - hier violettes Licht - führt. Nur der Randbereich des vom Gel gelösten AuNP-Array Trägerdeckgläschens erscheint violett (links). Die gesamte Hydrogeloberfläche (ehemals Kontaktfläche zum Trägerglas) erscheint violett und weist auf gebundene AuNP hin (rechts).

lediglich die gelkontaktfreien Randbereiche des Glasträgers violett erscheinen (Abb. 3.10 links). Die geloberflächengebundenen AuNP konnten so für alle vier verschiedene Polymer-Arrays erfolgreich nachgewiesen werden. Dies bestätigt eindeutig den erfolgreichen Transfer vom AuNP-Array Glasträger auf die Hydrogeloberfläche.

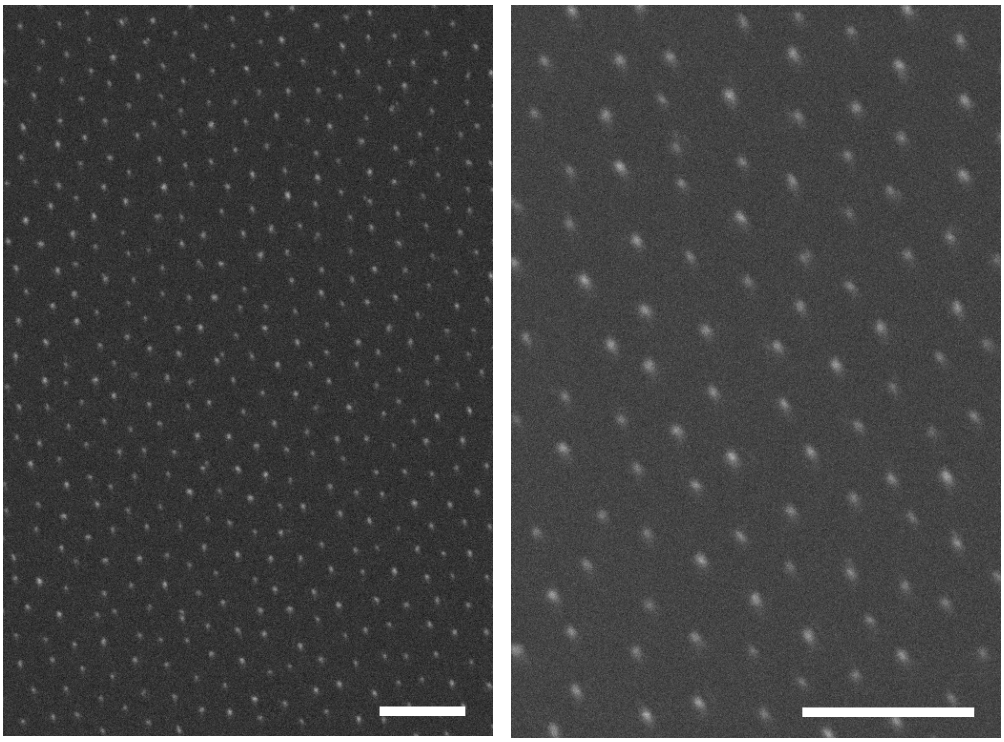
3.2.3.2. REM-Aufnahmen nanostrukturierter Hydrogele

Für eine hochaufgelöste Bildgebung von hydrogeloberflächengebundenen AuNP-Arrays wurden wie in Abschnitt 2.12.2 beschrieben REM-Aufnahmen von getrockneten nanostrukturierten Hydrogelen angefertigt. Durch die massive Schrumpfung (siehe dazu Abschnitt 3.2.2.1) der Gele durch die für die REM-Analytik erforderliche vollständige Trocknung der Proben, können auf diese Weise nur Hydrogele, die ein AuNP-Array mit größeren Partikelabständen wie z. B. derer vom PS1058- oder PS3365-Polymer tragen, visualisiert werden.

Abb. 3.11 zeigt beispielhaft die quasi-hexagonale Struktur des AuNP-Arrays auf einem Glasträger (Abb. 3.11a, 3.11b), aus dessen Herstellungscharge der AuNP-Array für den Übertrag auf das Hydrogel in Abb. 3.11c und 3.11d stammt. Die AuNP sind deutlich über den gesamten Bildausschnitt verteilt erkennbar (Abb. 3.11c, 3.11d). Der irreguläre und stark reduzierte AuNP-Abstand auf der trockenen Hydrogeloberfläche ist als Artefakt der

(a) AuNP-Array auf Glasträger. 50.000× vergrößert

(b) AuNP-Array auf Glasträger. 100.000× vergrößert



(c) AuNP-Array auf Hydrogel. 50.000× vergrößert

(d) AuNP-Array auf Hydrogel. 100.000× vergrößert

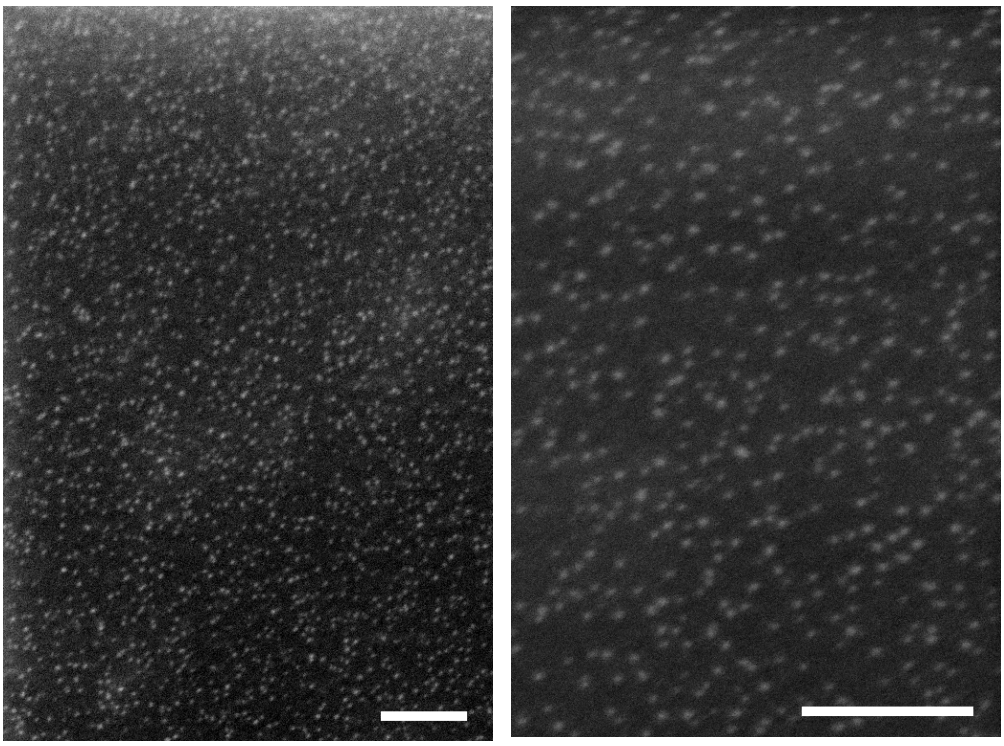


Abbildung 3.11.: REM-Bilder von AuNP-Arrays vor und nach Transfer auf Hydrogel. AuNP-Array (mittlerer Interpartikelabstand ≈78 nm) auf Glasträger vor dem Übertrag auf die Hydrogeloberfläche (a, b). Auf die Hydrogeloberfläche übertragener AuNP-Array (c, d). Die irregulären und reduzierten Interpartikelabstände der AuNP auf dem Gel sind bedingt durch die massive Schrumpfung bei Entwässerung und Trocknung. Maßstab = 200 nm

Entwässerung und Geltrocknung zu bewerten, da es beim Entwässerungsprozess durch den Wasserverlust zu einer starken Volumenabnahme des Gelkörpers (siehe Abschnitt 3.2.2.1 und Abb. 3.4) und höchstwahrscheinlich auch zu einer Spannungsbildung vor allem an der Grenzfläche, welche die Hydrogeloberfläche bildet, kommt. Die relativ kontiniuierliche Verteilung der AuNP auf dem Hydrogel im REM-Bild stellt den erfolgreichen Übertrag des AuNP-Arrays auf die Hydrogeloberfläche dar.

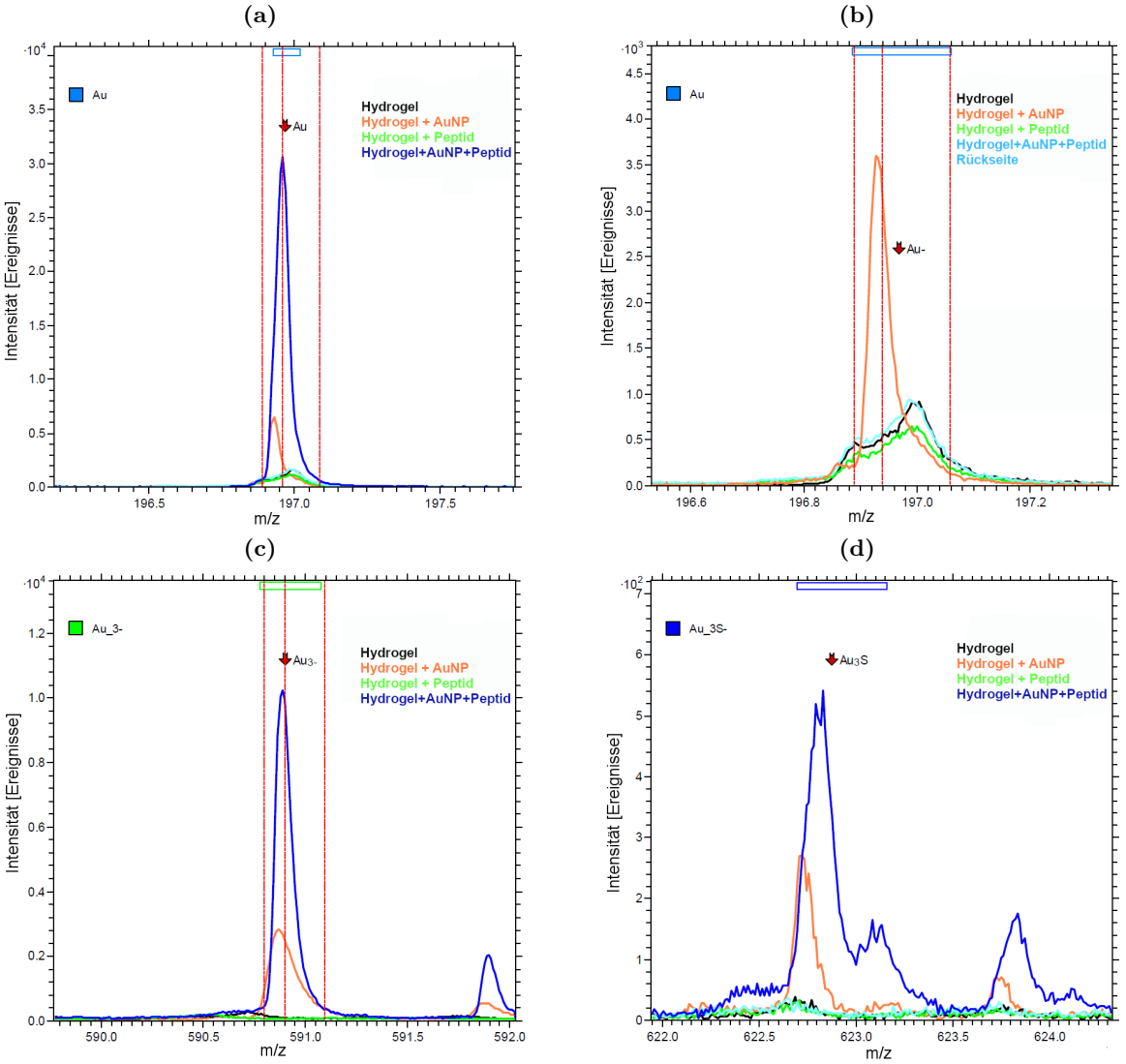


Abbildung 3.12.: Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrum zum Nachweis der AuNP-Anbindung an die Hydrogeloberfläche. Die Messung erfolgte an getrockneten Gelen mit oberflächlicher AuNP-Strukturierung (Hydrogel+AuNP, Hydrogel+AuNP+Peptid) und zur Kontrolle ohne Strukturierung (Hydrogel, Hydrogel+Peptid, Unterseite der Probe Hydrogel+AuNP+Peptid). Die relative Intensität der negativ geladenen Atome und Moleküle Au^- (a, b), Au_3^- (c), Au_3S^- (d) ist gegen das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) aufgetragen.

3.2.3.3. ToF-SIMS nanostrukturierter Hydrogele

Für den Nachweis des AuNP-Transfers vom Glasträger auf die Hydrogeloberfläche durch eine chemische Bindung zwischen Gold der AuNP und sPEGthiol bzw. -thiolat der Hydrogeloberfläche [Au-S-PEG] wurde als Oberflächenanalytik die ToF-SIMS an getrockneten Hydrogelen durchgeführt (Abschnitt 2.12.3). Bei der statischen Messung mit wenigen Nanometern Nachweistiefe ist ein deutliches Gold (Au^-)-Signal für die nanostrukturierten Hydrogeloberflächen, sowohl ohne (Hydrogel+AuNP) als auch mit Peptidfunktionalisierung (Hydrogel+AuNP+Peptid), detektiert worden, welches bei den Kontrollgelen (Hydrogel, Hydrogel+Peptid und Unterseite der Probe Hydrogel+AuNP+Peptid) nicht erscheint (Abb. 3.12a und 3.12b). Bei leichter Erosion (mit 2,5 keV Ar_{1200} Clustern) zeigen die tiefenintegrierten Daten ebenfalls nur bei den nanostrukturierten Hydrogelen deutlich detektierte Signale für Au_3^- (Abb. 3.12c).

Der spezifische Nachweis einer bestehenden kovalenten Gold-Thiolat-Bindung zwischen AuNP und Hydrogel [Au-S-PEG] für die Proben Hydrogel+AuNP sowie Hydrogel+AuNP+Peptid und auch zwischen AuNP und dem *IDSP*-Peptid [Au-S-(Cys)-PEG6-Peptid] bei der Probe Hydrogel+AuNP+Peptid, konnte durch die massenspektrometrische Detektion von Au_3S^- mit sich deutlich von den unstrukturierten Proben absetzenden Signalintensitäten der nanostrukturierten Hydrogeloberflächen erbracht werden (Abb. 3.12d). Für alle Goldsignale liegt die Intensität der Probe Hydrogel+AuNP+Peptid jeweils um ein Vielfaches über der der Probe Hydrogel+AuNP, obwohl beide Gele theoretisch dieselbe AuNP-Dichte ($1755{,}3 \pm 77{,}4\,\mu m^{-2}$) aufweisen. Die höhere Signalgebung könnte mit einer besseren oberflächlichen Exposition der AuNP durch die Peptidfunktionalisierung und ein damit einhergehendes Reduzieren des Einsinkens ins Gel der AuNP bei Trocknung erklärt werden.

Mithilfe der ToF-SIMS-Analyse von getrockneten Gelen konnte die oberflächliche Bindung von Gold an die Hydrogeloberfläche nachgewiesen werden und bestärkt den in Abschnitt 3.2.3.2 mittels REM dargestellten, erfolgreichen AuNP-Array-Übertrag auf die Hydrogeloberfläche.

3.2.4. Bindungsvermögen löslicher Biomoleküle

3.2.4.1. Relativer Nachweis der Peptidfunktionalisierung

Die Überprüfung einer erfolgreichen Anbindung der Peptidkonstrukte - hier beispielhaft für C-PEG6-TQIDSPLN (*IDSP*-Peptid) - an die AuNP strukturierter Hydrogele erfolgte mittels Flugzeitmassenspektrometrie. Die Spektren von positiv geladenen Fragmenten, die charakteristisch für Aminosäuren des Peptidmotivs sind, werden in Abb. 3.13 dargestellt. Bis auf $C_4H_6N^+$ (Prolin), liegt die Signalintensität für alle anderen gezeigten Fragmente: $C_4H_5O^+$ (Threonin), $C_4H_6NO^+$ (Glutamin), $C_3H_6NO_2{}^+$ (Aspartat), $C_2H_6NO^+$ (Serin) und $C_3H_7N_2O^+$

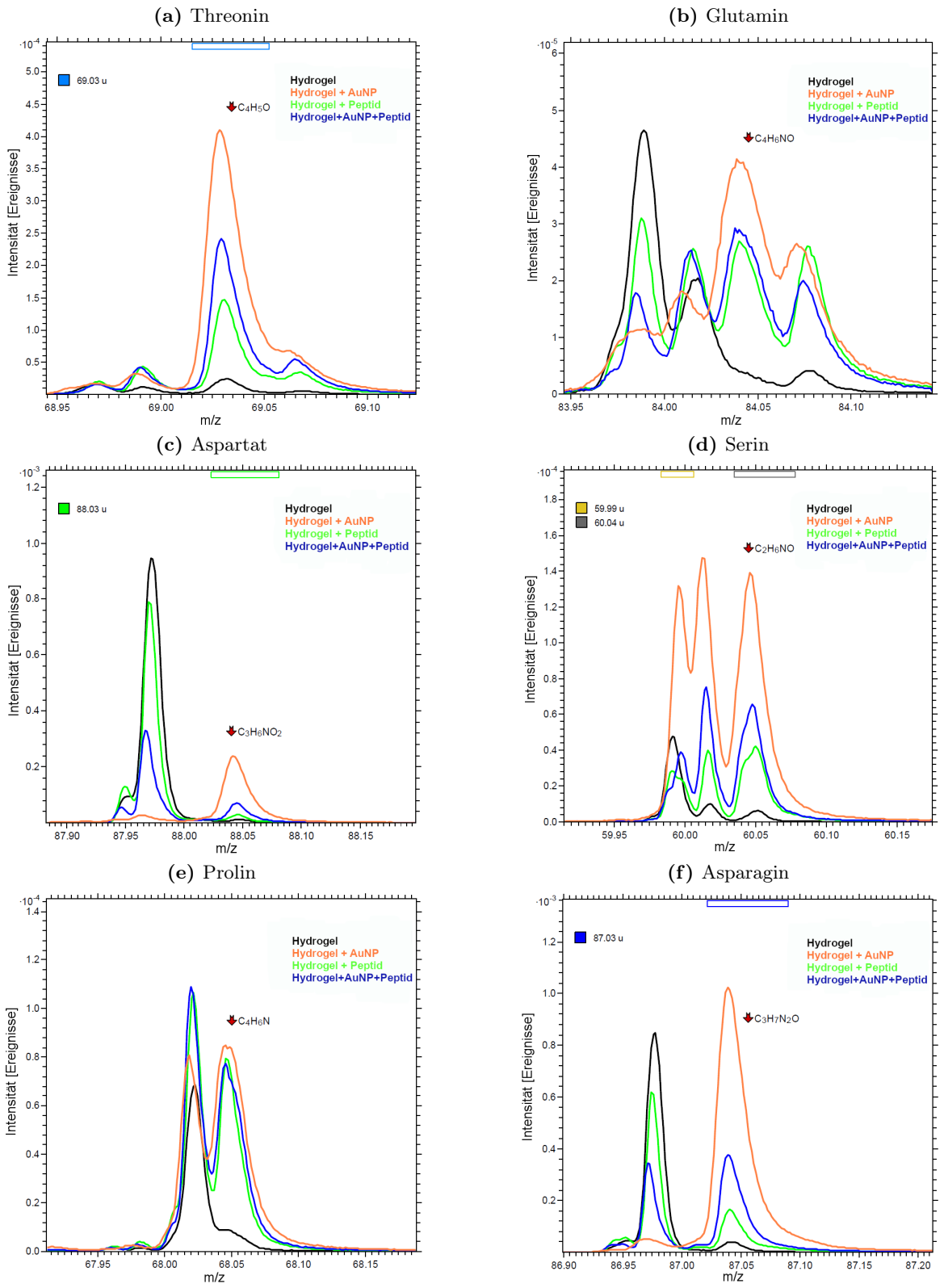


Abbildung 3.13.: Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrum einzelner Aminosäurefragmente zum Nachweis der Peptidfunktionalisierung von AuNP auf Hydrogeloberflächen. Auf die Gesamtintensität normierte Graphen der Fragmente $C_4H_5O^+$ (Threonin), $C_4H_6NO^+$ (Glutamin), $C_3H_6NO_2{}^+$ (Aspartat), $C_2H_6NO^+$ (Serin), $C_4H_6N^+$ (Prolin) und $C_3H_7N_2O^+$ (Asparagin). Die Intensität der positiv geladenen Fragmente ist als Funktion des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) aufgetragen.

(Asparagin) der peptidfunktionalisierten nanostrukturierten Probe (Hydrogel+AuNP+Peptid) höher als die der unstrukturierten Kontrollprobe (Hydrogel+Peptid). Für $C_4H_6N^+$ (Prolin) sind beide Intensitäten annähernd gleich hoch. Die leicht erhöhte Teilchenmenge von Aminosäurefragmenten bei der nanostrukturierten peptidfunktionalisierten Hydrogeloberfläche im Vergleich zur unstrukturierten Oberfläche weist auf ein höheres oberflächliches Vorkommen des Peptids hin. Dies wird höchstwahrscheinlich durch die hochaffine kovalente Bindung über Cysteinthiolat an die AuNP verursacht.

Die Signalintensitäten aller Aminosäurefragmente der reinen Hydrogeloberfläche (Probenname „Hydrogel") liegt um ein Vielfaches niedriger als die der peptidfunktionalisierten unstrukturierten Hydrogeloberfläche und lässt somit das Vorhandensein von Peptid aus dem Peptidkonstrukt ausschließen. Auffällig sind jedoch die sehr starken Signalintensitäten aller Aminosäurefragmente für die nichtpeptidfunktionalisierte nanostrukturierte Probe (Hydrogel+AuNP), die jeweils deutlich höher als die der peptidfunktionalisierten nanostrukturierten Probe liegen. Da hier mit der SIMS-Analyse nur Aminosäurefragmente detektiert werden, kann nicht auf einen Aminosäuresequenz-spezifischen Ursprung aus dem *IDSP*-Peptid geschlossen werden. Es ist daher durchaus denkbar, dass eine präparative (über die Kritisch-Punkt-Trocknungsanlage) oder post-präparative Kontamination von Fremdpeptid oder -protein, das über Carbonsäuren und Aminen mit (wenn auch schwacher) Bindungsaffinität zu Gold (Ouellette und Rawn, 2018) an der Oberfläche akkumulierte, Grund der hohen Signalintensitäten sind.

Zwar konnte mithilfe der ToF-SIMS-Analyse eine gering höhere Peptidmenge auf nanostrukturierten im Vergleich zu unstrukturierten peptidfunktionalisierten Geloberflächen demonstriert werden, dennoch liefert dies keinen eindeutigen Beweis der spezifischen Peptidfunktionalisierung der hydrogelgebundenen Nanostrukturen.

3.2.4.2. Immobilisierung löslichen SDF-1α durch die Hydrogelmatrix

Die Gelmatrix ist ein Netzwerk aus Heparin-Maleimid-Konjugat verknüpft über sternförmiges PEGthiol. Die für sterilisierte Hydrogele berechnete Maschenweite von ca. 8,4 nm erlaubt, dass das Chemokin SDF-1, im speziellen SDF-1α, weitestgehend frei im Gelkörper diffundieren kann (siehe Abschnitt 3.2.2.2). Heparin weist durch Sulfatreste innerhalb der Molekülkette vielfach negative Ladungen auf, was die Bindung von SDF-1α über positiv geladene Aminosäurereste ermöglicht. Auf diese Weise kann SDF-1α aus der Lösung im Gel immobilisiert und auch wieder ins Medium abgegeben werden. Dieses Bindungs- und Freigabevermögen der Matrix wurde nach bestimmten Zeitintervallen über Konzentrationsmessungen der Überstände mittels ELISA erfasst. Die Hydrogele zeigten diesbezüglich ein konzentrations- sowie zeitabhängiges Aufnahme- und Abgabeprofil, das mit rekombinantem humanem SDF-1α getestet wurde.

Je höher die Inkubationskonzentration war, desto höher war die abgegebene Menge SDF-1α

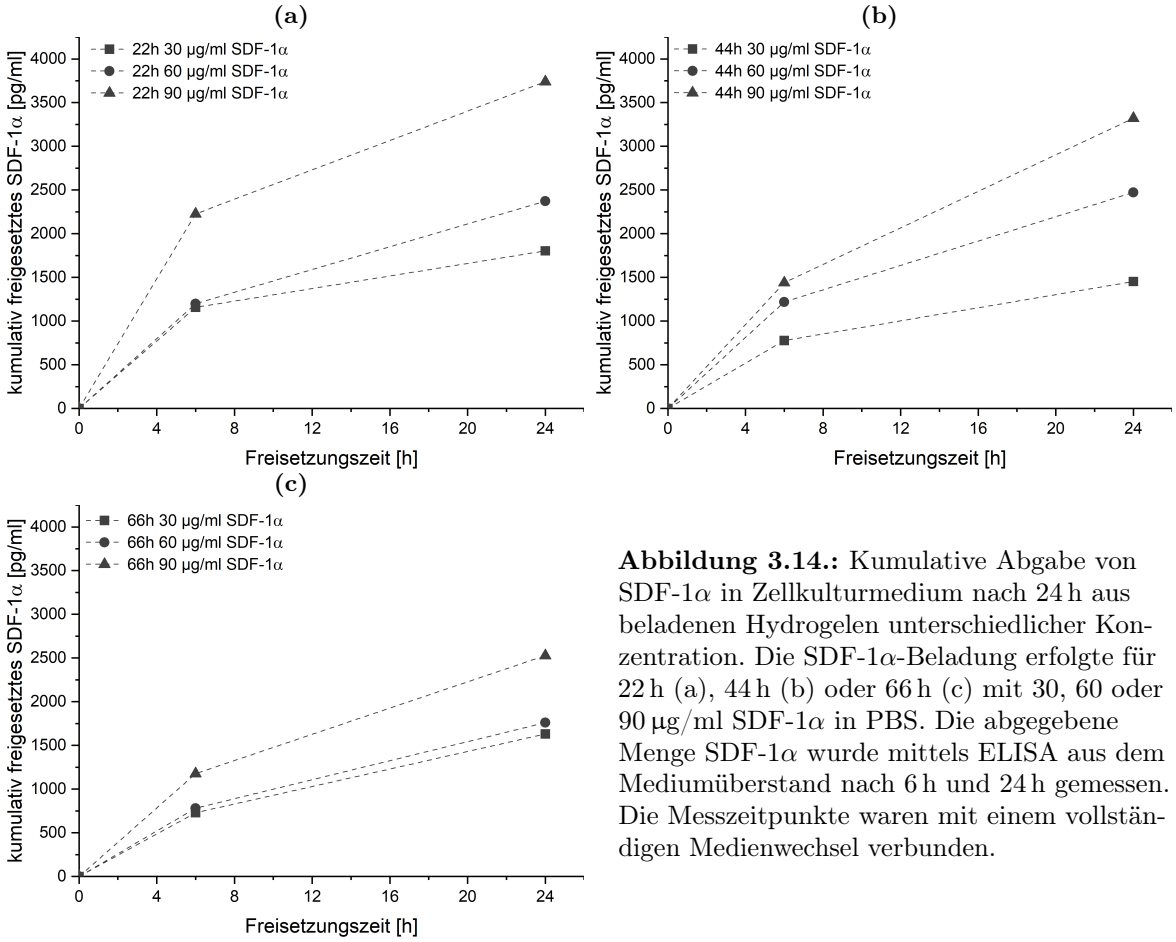


Abbildung 3.14.: Kumulative Abgabe von SDF-1α in Zellkulturmedium nach 24 h aus beladenen Hydrogelen unterschiedlicher Konzentration. Die SDF-1α-Beladung erfolgte für 22 h (a), 44 h (b) oder 66 h (c) mit 30, 60 oder 90 µg/ml SDF-1α in PBS. Die abgegebene Menge SDF-1α wurde mittels ELISA aus dem Mediumüberstand nach 6 h und 24 h gemessen. Die Messzeitpunkte waren mit einem vollständigen Medienwechsel verbunden.

pro Zeit (Abb. 3.14). Anhand der initial getesteten Inkubationsdauer von 22, 44 und 66 h in Kombination mit den Inkubationskonzentrationen 30, 60, 90 µg/ml konnte festgestellt werden, dass bei der höchsten Inkubationskonzentration von 90 µg/ml die SDF-1α-Abgabe nach 24 h umso geringer war, je länger zuvor inkubiert wurde (Abb. 3.14). Dagegen resultierte bei der geringeren Inkubationskonzentration von 60 µg/ml eine Verdopplung der Inkubationszeit von 22 auf 44 h in eine gleichbleibene SDF-1α-Abgabe nach 24 h, während bei einer 66 h Inkubation die SDF-1α-Abgabe nach 24 h erniedrigt war (Abb. 3.14). Bei der geringsten Inkubationskonzentration von 30 µg/ml resultiert die kürzeste Inkubationsdauer (22 h) mit der höchsten SDF-1α-Abgabe nach 24 h, die bei einer 44- und 66-stündigen Inkubation geringer und mit annähernd gleichem Niveau gekennzeichnet ist (Abb. 3.14).

Bei allen Inkubationskonzentrationen war eine verlängerte Inkubationsdauer nicht mit einer vermehrten SDF-1α-Abgabe verbunden. Daraus wird geschlussfolgert, dass die Inkubationsdauer hier lediglich einen Effekt auf die Diffusionstiefe innerhalb des Gels hat. Bei einer hohen Inkubationskonzentration von 90 µg/ml fördert vermutlich der hohe SDF-1α-Konzentrationsgradient innerhalb der Hydrogelmatrix die Penetration des Moleküls mit längerer Inkubationszeit bis tief in das Gel hinein, sodass umgekehrt dieser lange Diffusionsweg bei der SDF-1α-Freigabe

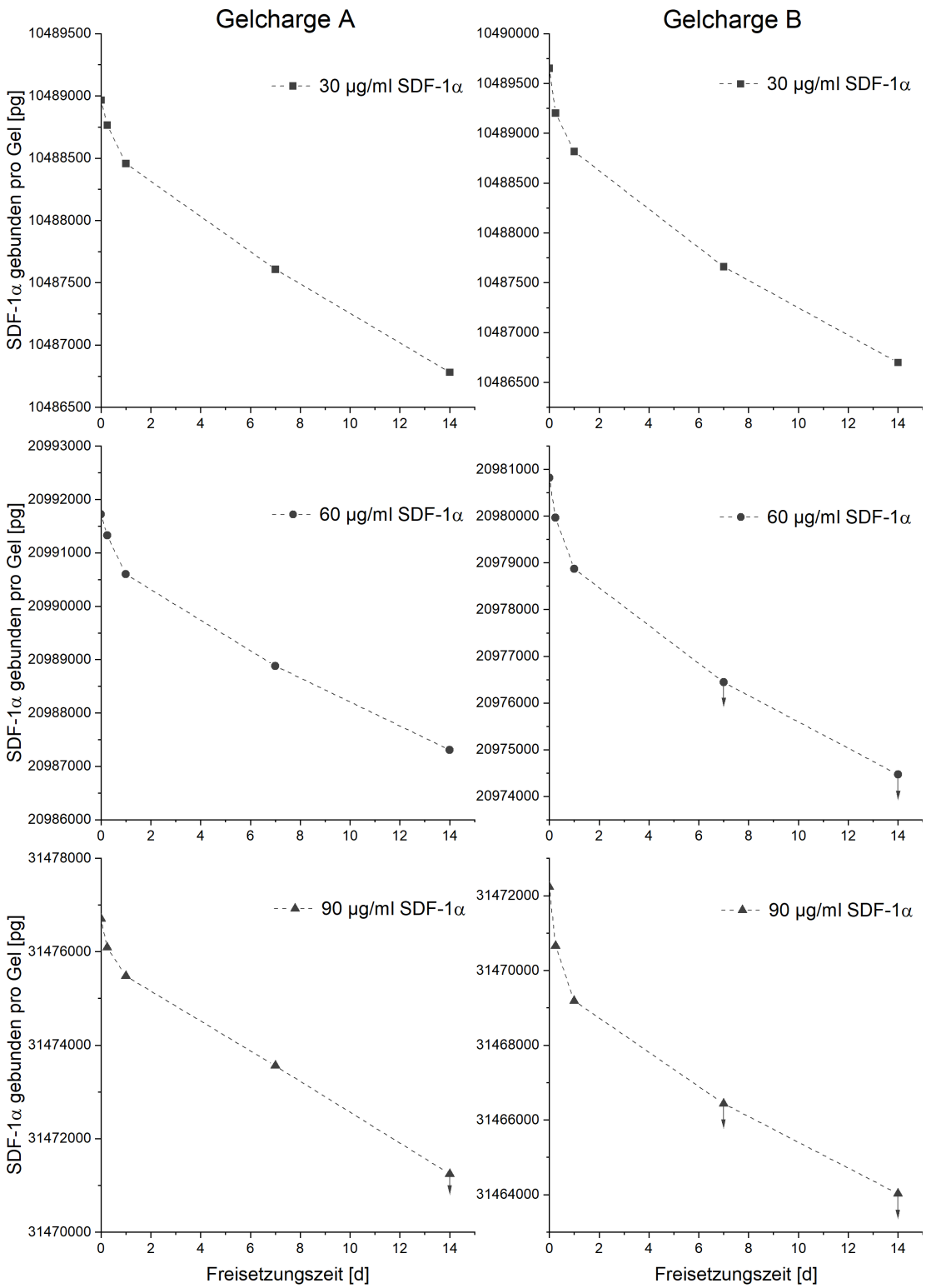


Abbildung 3.15.: Abnahme der hydrogelgebundenen Menge SDF-1α als Funktion der Zeit. Die Abnahme entspricht der Abgabe ins Zellkulturmedium. Analyse für zwei verschiedene Gelpräparationschargen (A, B). Die SDF-1α-Beladung erfolgte für 22 h mit 30, 60 oder 90 µg/ml SDF-1α in PBS. Die abgegebene Menge SDF-1α wurde mittels ELISA aus dem Mediumüberstand nach 6 h, 24 h, 7 und 14 Tagen gemessen. Die Messzeitpunkte waren mit einem vollständigen Medienwechsel verbunden. Pfeile kennzeichnen mögliche niedrigere Konzentrationen, bedingt durch Erreichen der unteren Messgrenze des ELISA.

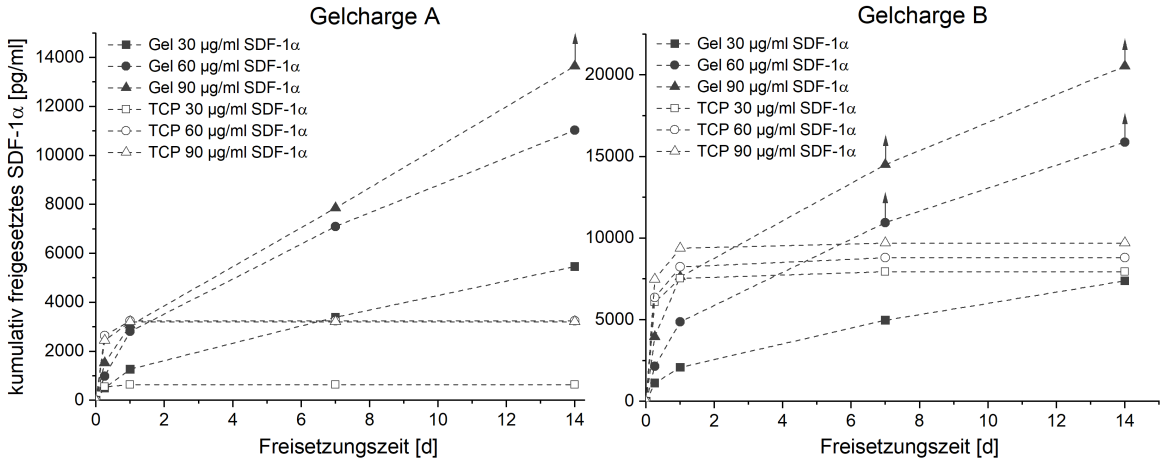


Abbildung 3.16.: Aufsummierte Abgabe von SDF-1α aus Hydrogelen in überstehendes SDF-1α-freies Zellkulturmedium über einen Zeitraum von zwei Wochen. Analyse für zwei verschiedene Gelpräparationschargen (A, B). Gele sowie zum Vergleich 1% (w/v) BSA-beschichtetes TCP wurden für 22 h mit SDF-1α unterschiedlicher Konzentration (30, 60, 90 µg/ml) in PBS inkubiert. Die abgegebene Menge SDF-1α wurde mittels ELISA aus dem Mediumüberstand zum Zeitpunkt nach 6 h, 24 h, 7 d und 14 d gemessen. Messzeitpunkte waren mit einem vollständigen Medienwechsel verbunden. Pfeile kennzeichnen mögliche höhere Konzentrationen, bedingt durch Erreichen der oberen Messgrenze des ELISA.

ins Medium in eine geringere abgegebene Menge resultiert. Während geringer konzentrierte Inkubationslösungen (30 und 60 µg/ml) die Immobilisierung in den oberflächlichen Schichten des Gels gewährleistet, wodurch aufgrund des geringeren Diffusionsweges SDF-1α schneller ins Medium freigegeben wird. Dadurch ist die abgegebene SDF-1α-Menge relativ konstant und unabhängig von der Inkubationsdauer.

Für weitere Untersuchungen des längerfristigen Freisetzungsvermögens der Gele nach SDF-1α-Beladung wurde nur noch mit einer Inkubationsdauer von 22 h gearbeitet. Je höher die Inkubationskonzentration bei einer 22-stündigen Beladung der Gele, desto höher ist die vom Gel gebundene Gesamtmenge SDF-1α und desto mehr SDF-1α geht in einem bestimmten Zeitintervall - hier bis zu 14 Tagen gemessen - in die Lösung über (Abb. 3.15). Das Abgabeprofil wird hierbei vom Konzentrationsgradienten zwischen matrixgebundenem SDF-1α und der überstehenden Lösung, hier dem Zellkulturmedium, angetrieben. Wie aus Abb. 3.16 ersichtlich, hat die Abgabe von SDF-1α, welches auf 1% (w/v) BSA-beschichtetem TCP adsorbierte, nach 24 h bereits ein Desorptionsplateau erreicht. Dagegen hält die Abgabe von SDF-1α aus den Gelen über den gemessenen Zeitraum von zwei Wochen kontinuierlich an. Dabei steigt die Abgabe mit erhöhter Aufnahme, d. h. je höher die Inkubationskonzentration, desto mehr SDF-1α wird im Gel immobilisiert und entsprechend stark ist das antreibende Konzentrationsgefälle zur Abgabe. Die Gele nahmen nach 22 h bei den verwendeten Inkubationskonzentrationen von 30, 60 oder 90 µg/ml jeweils 10,49 µg, 20,99 µg und 31,48 µg SDF-1α (siehe Abb. 3.15, Zeitpunkt 0) aus 350 µl auf. Daraus ergibt sich, dass ca. 99,9% der theoretisch verfügbaren

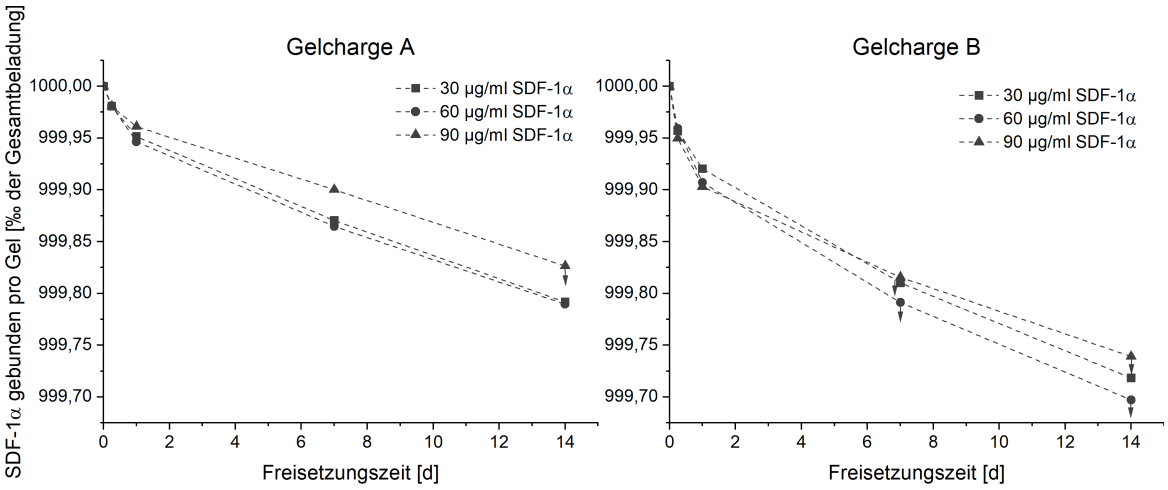


Abbildung 3.17.: Relative Abgabe von SDF-1α aus mit SDF-1α-beladenen Hydrogelen über einen Zeitraum von zwei Wochen. Analyse für zwei verschiedene Gelpräparationschargen (A, B). Die Beladung erfolgte durch Inkubation der Gele mit SDF-1α unterschiedlicher Konzentration (30, 60, 90 µg/ml PBS). Angegeben ist die in dem Überstand aufsummierte abgegebene Menge SDF-1α zum Zeitpunkt nach 6 h, 24 h, 7 d und 14 d in Relation zur initial aus der Inkubationskonzentration aufgenommenen Menge SDF-1α. Zu den jeweiligen Messzeitpunkten erfolgte ein vollständiger Medienwechsel.

Masse an SDF-1α unabhängig von der Inkubationskonzentration aufgenommen wurden. Die Gele befanden sich somit noch nicht in ihrer Aufnahmesättigung.

Durch dieses hohe Bindungsvermögen der Gele für SDF-1α verbleiben nach zwei Wochen, wie in Abb. 3.17 gezeigt, noch mehr als 99,96% im Gel. Dies entspricht einer relativen Änderung von weniger als 1‰ der aufgenommenen Menge SDF-1α im Verlauf von zwei Wochen. Einem schnellen SDF-1α-Aufnahmeprofil steht ein langsames SDF-1α-Abgabeprofil gegenüber. Durch das Vermögen des Chemokin-beladenen Hydrogels, über einen längeren Zeitraum (von mindestens zwei Wochen) SDF-1α kontinuierlich in das überstehende Medium abzugeben, können Effekte einer permanenten SDF-1α-Verfügbarkeit auf HSPZ in Zellexperimente ohne regelmäßige Zugabe des Wachstumsfaktors untersucht werden. Die von den Gelen ins Medium abgegebene Menge SDF-1α war im Vergleich zur Beladungsmenge bei den hier getesteten Inkubationskonzentrationen nur marginal unterschiedlich. Da die Gele für einen Zellkulturzeitraum von maximal zwei Wochen angedacht waren, wurde daher bei Zellkulturversuchen nur noch mit einer Inkubationskonzentration von 30 µg/ml gearbeitet.

3.2.5. Einbettung der Gele in *Wells*

Für die Anwendung der Hydrogele als Zellkultursubstrat wurden die Gele als kreisrunde Gelscheiben mit einem finalen Durchmesser von ca. 15,5 mm gefertigt (Abschnitt 2.10.3.1). In dieser Dimension können sie in eine 24-*Well* Zellkulturplatte platziert werden. Allerdings

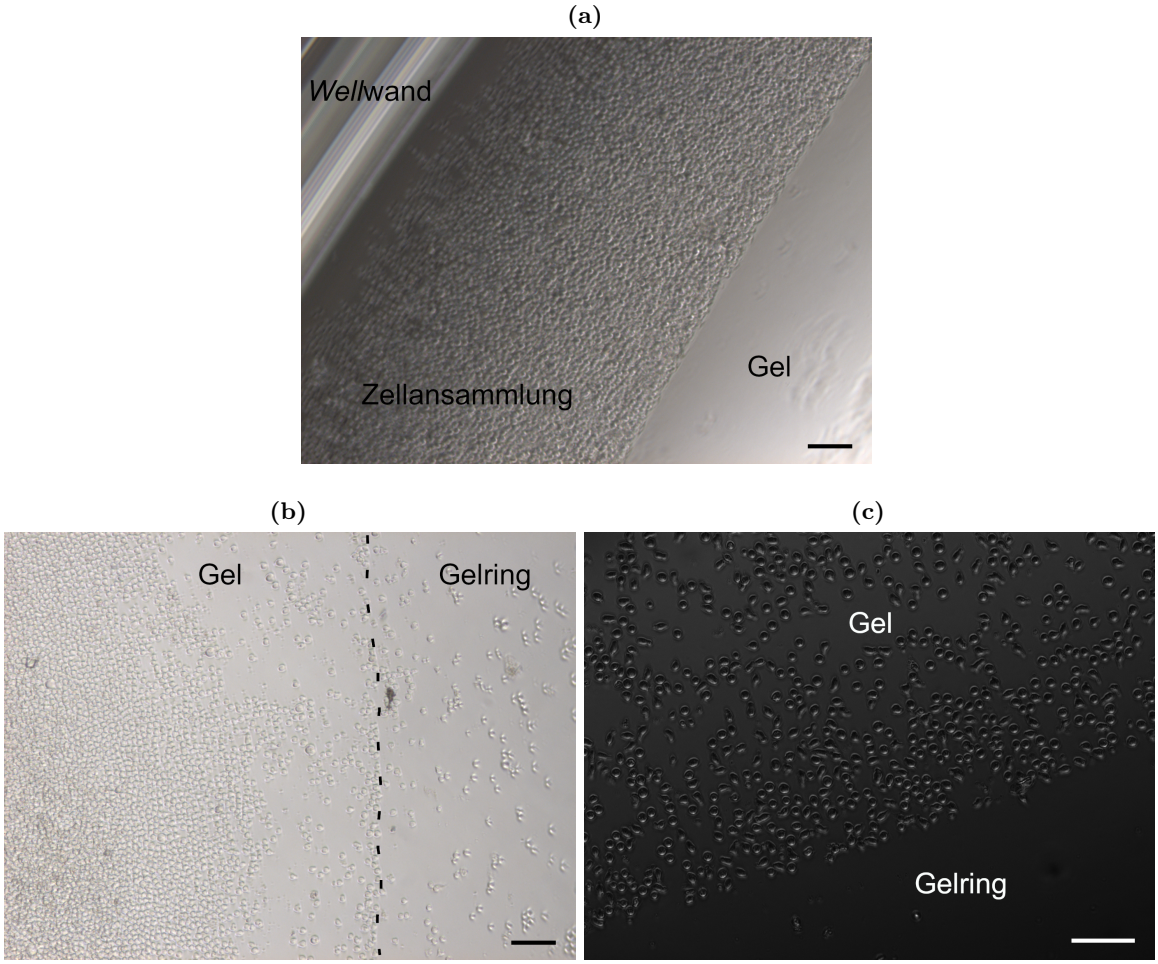


Abbildung 3.18.: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Hydrogelscheiben und deren Einbettung in *Wells* von Zellkulturplatten. Eine lose in ein *Well* eingesetzte Hydrogelscheibe liegt nicht dicht genug am *Well*rand an, sodass sich eingesäte KG-1a Zellen im entstandenen Spalt am *Well*boden sammeln (a). Durch Füllen des Spalts mit zusätzlicher Präpolymerlösung des gleichen Gels, formt sich ein Gelring, der das Sedimentieren der KG-1a Zellen in den Spalt verhindert (b). Die schwarzgestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen Gelscheibenrand und Gelring. In ein *Well* eingebette Gelscheibe mit kultivierten HSPZ auf der Gelscheibenoberfäche (c). Zellkulturplatte im 24-*Well* Format. Maßstab = 100 µm

verbleibt ein Leerraum zwischen Gelrand und *Well*rand, in dem sich aufgrund des Niveauunterschiedes von Geloberfläche zu *Well*boden Zellen aus der Suspension ansammeln - so wie am Beispiel von KG-1a Zellen in Abb. 3.18a. Um dies zu verhindern, wurde der Ringspalt mit steriler Präpolymerlösung befüllt (Abschnitt 2.10.3.3). Der so entstandene Gelring besitzt durch die Adhäsion zum *Well*rand ein zur Geloberfläche orientiertes Gefälle, das die Sedimentation eingesäter Zellen auf die Geloberfläche unterstützt (Abb. 3.18b). Diese Fixierung der Gelscheiben in die *Wells* der Zellkulturplatte ermöglichte den Kontakt nahezu aller Zellen mit der zweidimensionalen Geloberfläche und konnte für die HSPZ-Kultivierung erfolgreich eingesetzt werden (Abb. 3.18c). Außerdem war so sichergestellt, dass jeglicher Totraum wie z. B. der Spalt unterhalb des Gels, abgedichtet ist, um bei der Zellernte so viele Zellen wie

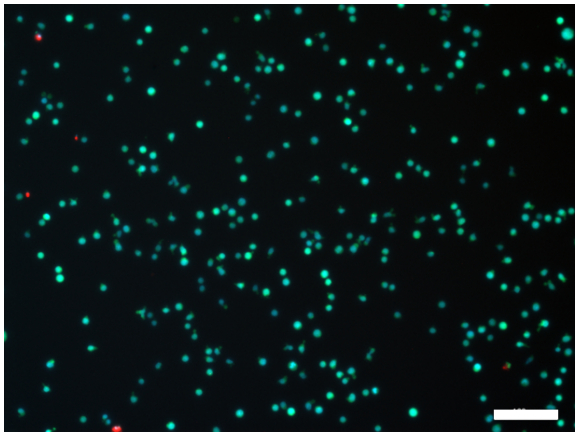
möglich zu erhalten.

3.3. Zellverhalten auf nanostrukturierten Biohybridhydrogelen

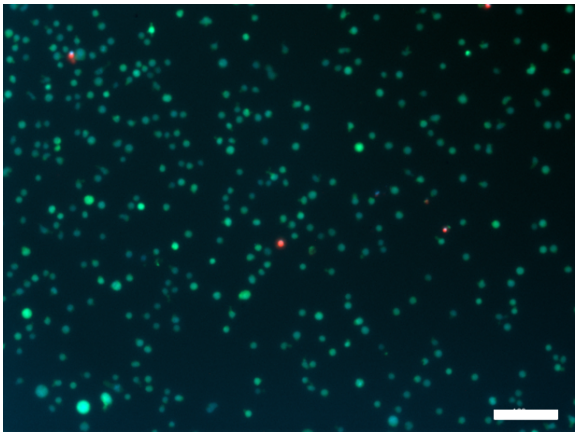
3.3.1. Zellverträglichkeit der Biohybridhydrogelmatrix

Um die Zytokompatibilität der Hydrogelmatrix zu bewerten, wurden drei verschiedene, einander komplementierende *Assays* durchgeführt (siehe Abschnitt 2.19). Dabei wurden KG-1a Zellen als Modellzelllinie für HSPZ zur Analyse der Lebens- und Funktionsfähigkeit verwendet. KG-1a Zellen wurden für die Lebend-tot-Färbung sowie Durchflusszytometrie direkt auf den unstrukturierten Hydrogelen sowie Referenzoberflächen TCP bzw. Glas oder für die Messung der metabolischen Aktivität mittels WST-1 *Assay* im Mediumüberstand der jeweiligen Oberflächen für 24 h kultiviert.

(a) TCP



(b) Hydrogel



(c)

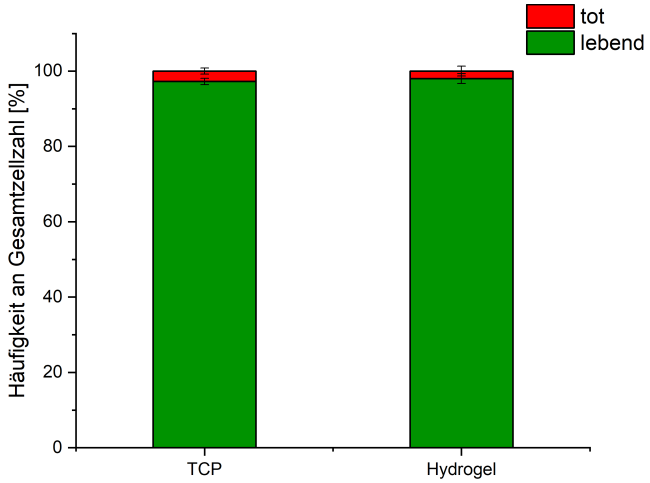


Abbildung 3.19.: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von KG-1a Zellen zur Unterscheidung lebender und toter Zellen. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder von KG-1a auf TCP (a) und Hydrogel (b). Überlagerung der Fluoreszenzen von Lebendfarbstoff Calcein (grün), Hoechst 33342 (blau), und Totfarbstoff Propidiumiodid (rot). Maßstab = 100 µm. Relative Häufigkeit toter bzw. lebender KG-1a Zellen an der Gesamtzellzahl pro Bild nach 24 h Kultur auf TCP bzw. Hydrogel (c). Auszählung von vier Bildausschnitten pro Oberfläche, Mittelwert mit SD

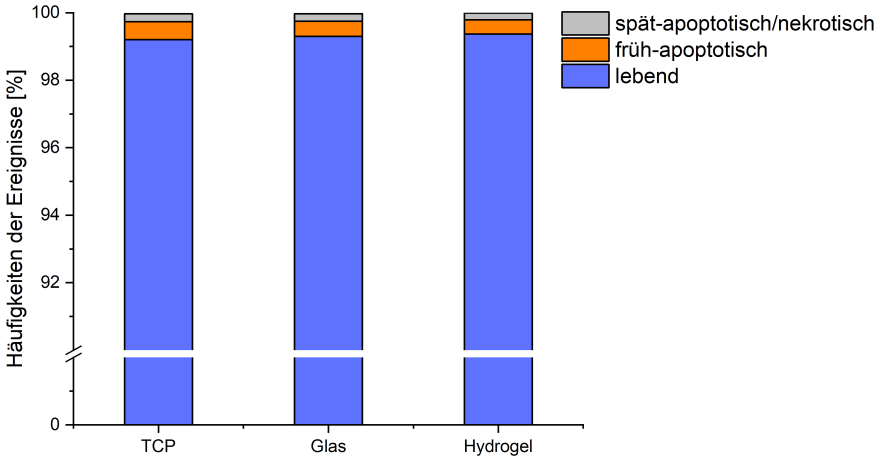


Abbildung 3.20.: Durchflusszytometrische Analyse von KG-1a Zellen nach 24 h Kultur auf unstrukturierten, zweidimensionalen Oberflächen. Angabe der relativen Häufigkeit detektierter früh-apoptotischer Zellen durch Markierung mit FITC-Annexin V (orange), spät-apoptotischer bis nekrotischer Zellen durch SYTOX® AADvanced™ (grau) und unmarkierter Zellen mit intakter Membranintegrität (blau). Der Vergleich zwischen den Kulturoberflächen TCP, Glas und Hydrogel ist als Säulendiagramm dargestellt.

Während der Fluoreszenzmikroskopie der Lebend-tot-Färbung mit Calcein, Hoechst 33342 und Propidiumiodid wurde eine Autofluoreszenz der Gele im blauen und grünen Kanal gemessen (Vergleich Hintergrund Abb. 3.19b zu Abb. 3.19a), die wahrscheinlich auf die Maleimidgruppen im Maleimid-Thiol-Konjugat zurückzuführen ist (Robin et al., 2013; Xie et al., 2018). Die Emission von blauem und grünem Licht in den häufig genutzten Kanälen für „DAPI" und „FITC" ist in Kombination mit einer starken Geldicke (≈0,8 mm) und der Fixierung in der *Well*platte für die Anwendung von einfacher inverser Fluoreszenzmikroskopie nachteilig. Durch die Bildauswertung von vier Bildausschnitten pro Oberfläche konnte der durchschnittliche Anteil vitaler KG-1a Zellen auf dem Hydrogel mit 98,00±1,32% und 2,00±1,32% toter Zellen beziffert werden, während auf der Referenzoberfläche TCP der durchschnittliche Anteil vitaler KG-1a Zellen mit 97,24±0,83% und mit 2,76±0,83% toten KG-1a nicht signifikant unterschiedlich war (Abb 3.19c).

Die hohe Vitalität der Zellen auf den Hydrogelen im Vergleich zu den Standardzellkultursubstraten TCP und Glas konnte auch über die Membranintegrität von KG-1a durch FITC-Annexin V/ SYTOX® AADvanced™ -Färbung ermittelt werden. So zeigte die durchflusszytometrische Analyse für membranintegere lebende Zellen, die doppelt negativ (Annexin V^- $SYTOX^-$) sind, eine relative Häufigkeit von 99,4% für die Hydrogel-, 99,3% für die Glas- und 99,2% für die TCP-Kultur (Abb. 3.20). Für früh-apoptotische Zellen (Annexin V^+ $SYTOX^-$) lag der Zellanteil bei 0,43% auf Hydrogelen, 0,45% auf Glas und 0,53% auf TCP und war damit einander sehr ähnlich. Dies gilt auch für den spät-apoptotisch/nekrotischen Zellanteil (Annexin V^+ $SYTOX^+$), der auf Hydrogelen 0,20%, auf Glas 0,23% und auf TCP 0,24% betrug (Abb. 3.20). Schließlich zeigten KG-1a Zellen mithilfe des WST-1 Testes nach

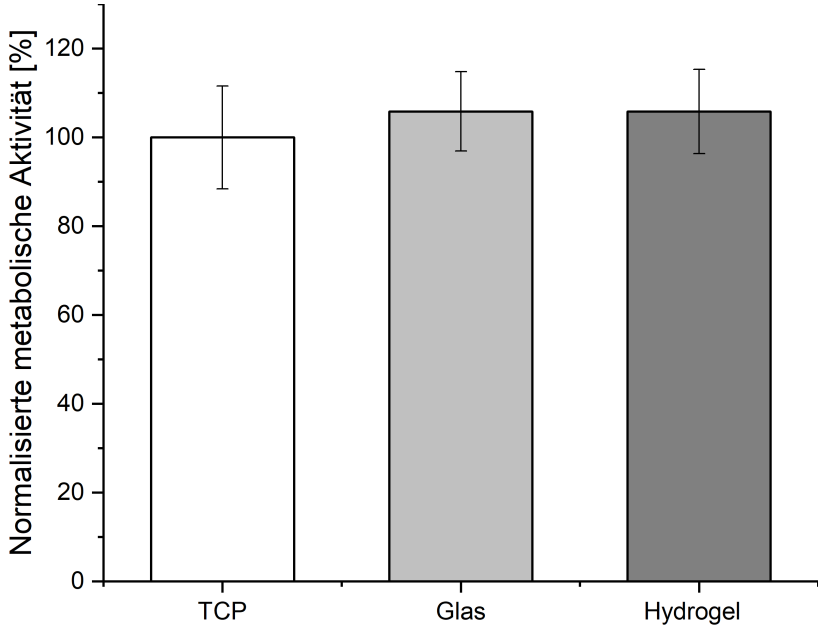


Abbildung 3.21.: Relative Stoffwechselaktivität von KG-1a Zellen nach 24 h Kultur im Mediumüberstand von unstrukturierten, zweidimensionalen Oberflächen. Messung der Stoffwechselaktivität über *water soluble tetrazolium*-1 (WST-1) *Assay*. Relative metabolische Aktivität der Zellen in Glas- bzw. Hydrogel-Mediumüberstand auf der im TCP-Mediumüberstand normiert. Mediumüberstände aus Über-Nacht-Inkubation des jeweiligen Kultursubsrates gewonnen. Mittelwerte mit SD aus technischen Triplikaten eines Experiments

24 h Inkubation im Mediumüberstand der Hydrogele mit 105,8±9,5% eine leicht erhöhte metabolische Aktivität nach Normierung auf die Stoffwechselaktivität von Zellen im Mediumüberstand von TCP (100±11,6%). Diese erhöhte Aktivität war vergleichbar mit den Zellen, die im Mediumüberstand von Glas (105,8±8,9%) inkubiert worden waren (Abb. 3.21).

In allen drei *Assays* beweist sich die Gelmatrix als exzellent zytokompatibel. Die unstrukturierte Hydrogeloberfläche ist für eine Zellkulturanwendung mindestens genauso geeignet wie die Standardkulturoberflächen TCP und Glas.

3.3.2. Zelladhäsion von HSPZ und deren Nachkommen

Die einfachste Methode die Zelladhäsion für eine Zellpopulation in statischer Kultur zu charakterisieren geht über einen Wasch-*Assay*, bei dem der Anteil von Zellen bestimmt wird, der nach ein- oder mehrmaligem Waschen auf dem Substrat übrig bleibt. Während leichtes Ankippen der *Well*platte und oberflächliches Absaugen des Mediums - so wie z. B. im Rahmen des Mediumaustausches für den EdU *Assay* praktiziert (2.20.2) - zu keiner Zellabnahme führte, löste selbst die schonendste Zugabe von Flüssigkeit am *Well*rand mittels Pipette die Zellen entlang des Strömungsflusses (Pipettierflusses). Die Definition von Adhäsion bei der Evaluation mittels Wasch-*Assay* ist daher unmittelbar verbunden mit einem adhäsiven Widerstand der Zelle, der mindestens so groß sein muss wie die durch Pipettieren erzeugte Scherkraft.

Aus diesem Grund und wegen der mangelnden Reproduzierbarkeit eines Wasch-*Assay* wurde er für die qualitative sowie quantitative Beschreibung der Zelladhäsion für das zu testende Hydrogelsystem als ungeeignet angesehen. Der Zugang zu technisch aufwendigeren Adhäsions*assays* (Khalili und Ahmad, 2015) war leider nicht gegeben. Schließlich beschränkte man sich auf die Zellmorphologie zur Beschreibung des Adhäsionsverhaltens von HSPZ-Kulturen auf nanostrukturierten Hydrogelen. So wurden sowohl rasterelektronenmikroskopische als auch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 8 Tage währenden HSPZ-Kulturen auf PS154- und PS1058-strukturierten und *LDV*-Peptid-funktionalisierten Hydrogelen angefertigt.

3.3.2.1. REM-Aufnahmen von adhärierten Zellen auf nanostrukturierten Hydrogelen

Die Abb. 3.22a zeigt exemplarisch eine REM-Bildaufnahme von HSPZ und deren Nachkommen nach 8 Tagen Kultur auf einem PS154-strukturierten und *LDV*-Peptid-funktionalisierten Hydrogel. Die Zelldichte war präparationsbedingt wesentlich geringer als in der lebenden Kultur. Zu sehen sind Zellen unterschiedlicher Morphologie, die primär in sphärisch oder polarisiert eingeteilt werden können. In Abb. 3.22b sind im oberen Bereich des Bildes zwei Zellen in für hämatopoetische Zellen typisch polarisierter Morphologie erkennbar: Der Frontpol ist gekennzeichnet durch flache, sich dem Substrat annähernde Membranausstülpungen, den Lamellipodien. Daran schließt sich das erhabene Zellmassezentrum an und abschließend bildet ein sich fußförmig verjüngender Membranausläufer, der Uropod, den Rückpol der Zelle.

In Abb. 3.22c sind dagegen zwei Zellen sphärischer Morphologie zu sehen, die eine gemeinsame abgeflachte Interaktionsfläche als Symmetrieachse besitzen, was auf den Abschluss einer mitotischen Zellteilung hindeutet. Ihre Membranoberfläche lässt Mikrovilli-ähnliche Strukturen vermuten. Die Abb. 3.23a zeigt eine absolut sphärische Zelle, deren Oberfläche Mikrovilli-ähnliche Strukturen ebenfalls vermuten lässt. In Abb. 3.23b ist eine sphärische Zelle gezeigt, deren Substrat-zugewandte Seite bereits einige flächige Membranausstülpungen aufweist. In Abb. 3.23c ist eine kompakt-polarisierte und in Abb. 3.23d eine elongiert-polarisierte Zelle erkennbar.

Alle Morphologien, die von einer ideal sphärischen abweichen, vergrößern ihre Kontaktfläche mit dem unterliegenden Substrat. Es kann daher angenommen werden, dass jegliche Zellabflachung bis hin zur Polarisation mit einer erhöhten Oberflächeninteraktion einhergeht, die potentiell auch adhäsiven Charakter besitzt.

3.3.2.2. Immunfluoreszenzfärbungen von adhärierten Zellen auf nanostrukturierten Hydrogelen

Für die Immunfluoreszenzfärbung subzellulärer Strukturen, insbesondere der Plasmamembranproteine CXCR4 als ein Frontpolmarker und Prominin-1 (CD133) als ein Uropodmarker

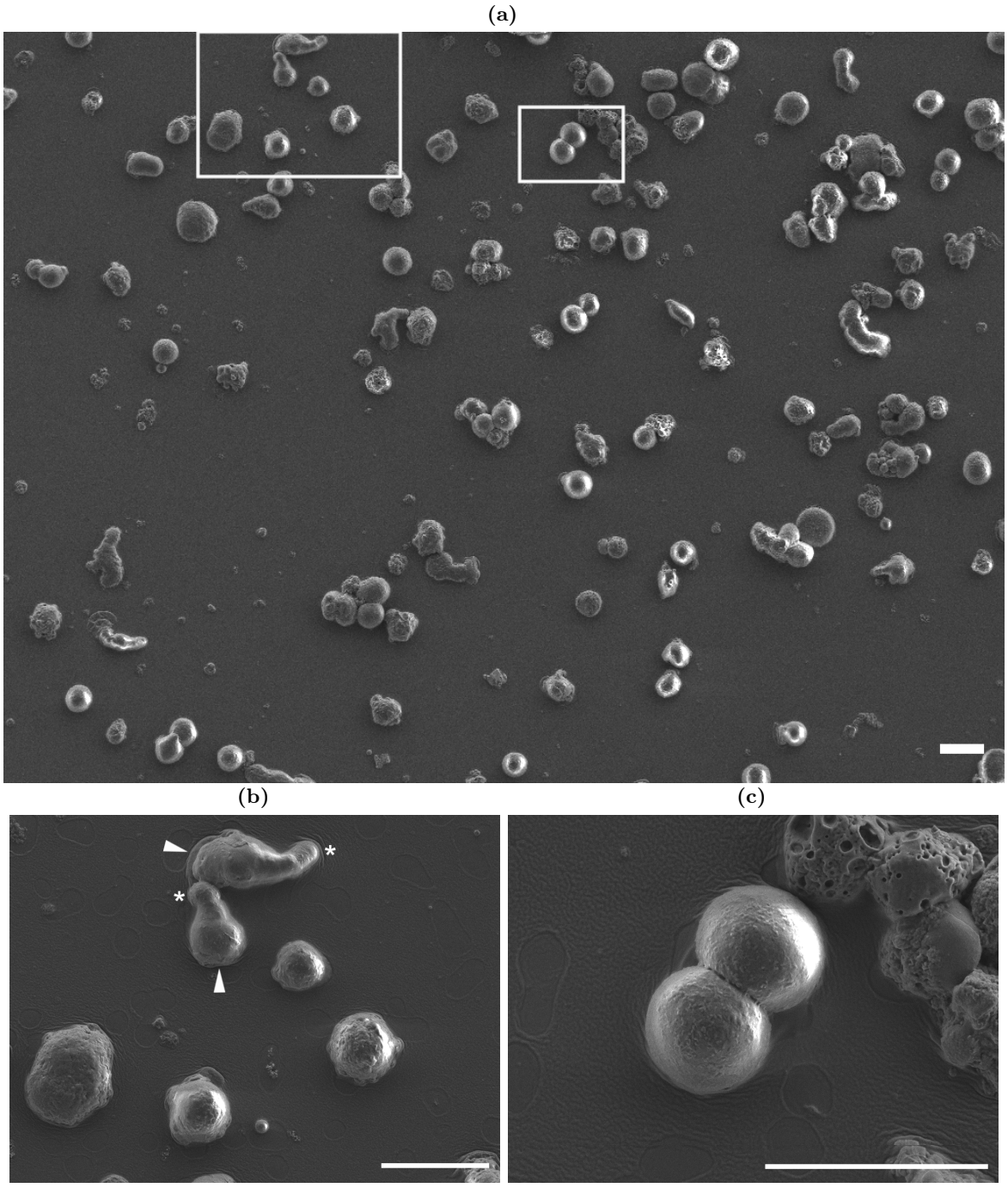


Abbildung 3.22.: REM-Bilder verschiedener Morphologien einer HSPZ-Kultur nach 8 Tagen auf einem PS154-nanostrukturierten und *LDV*-Peptid-funktionalisierten Hydrogel. Eingerahmte Bereiche vergrößert in (b) und (c). Zwei polarisierte Zellen, bei denen ein Dreieck den Frontpol, ein Stern den Uropod markiert (b). Zwei sphärische Zellen, die aus einer Zellteilung hervorgegangen sind (c). Maßstab = 10 µm

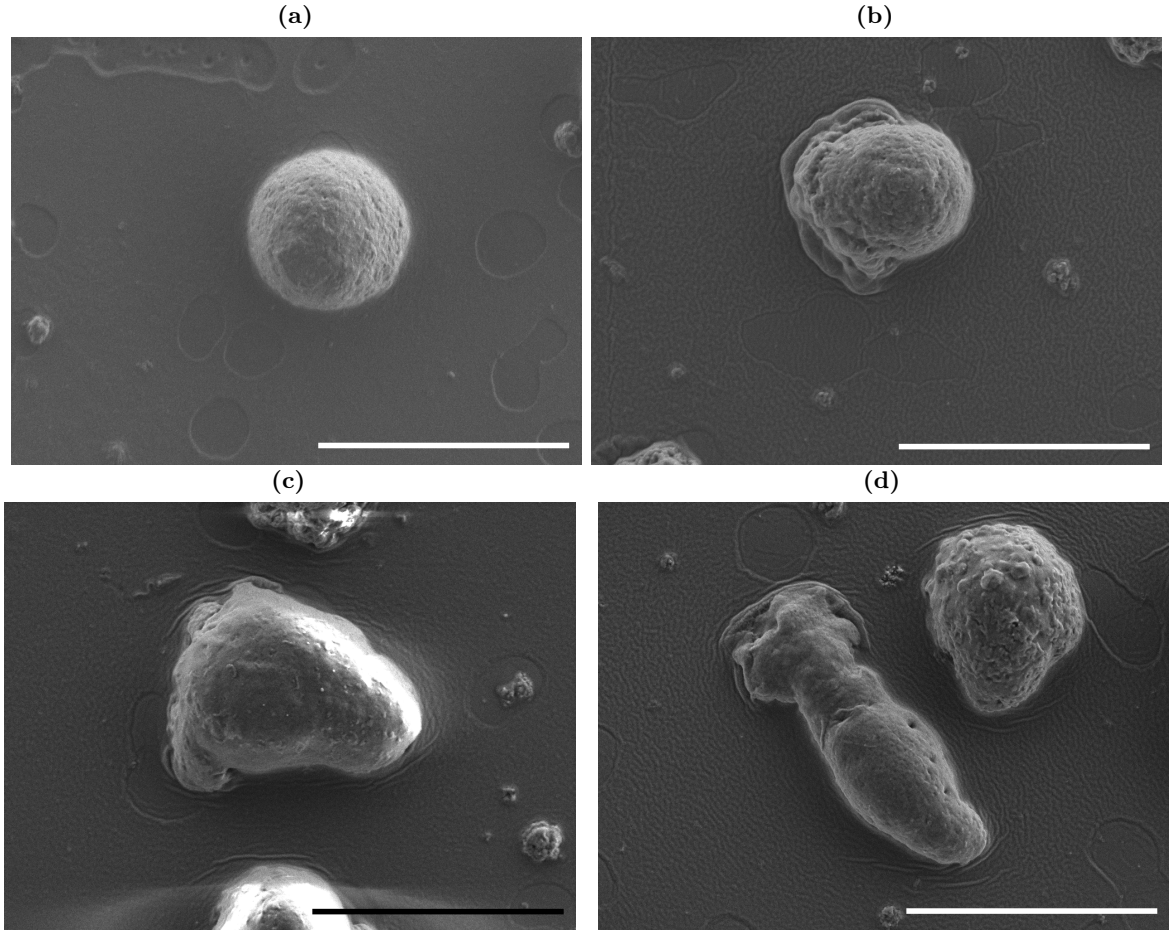


Abbildung 3.23.: Verschiedene Morphologien einer HSPZ-Kultur nach 8 Tagen auf einem PS154-nanostrukturierten und *LDV*-Peptid-funktionalisierten Hydrogel. Eine absolut sphärische Zelle (a), eine teilweise sphärische Zelle mit dem Substrat angenäherten Membranausstülpungen, eine kompakt-polarisierte Zelle (c) und elongiert-polarisierte neben einer partiell polarisierten Zelle (d). Maßstab = 10 µm

in polarisierten und migrierenden Zellen, wurden HSPZ auf PS154- und PS1058-strukturierten *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gelen in speziellen Silikonringen für die spätere Entnahme der Gele für die Mikroskopie kultiviert. Aufgrund der hohen Zelldichte nach 8 Tagen Kultur waren morphologisch polarisierte Zellen selten. Außerdem wurden vermehrt Zellfragmentbestandteile in der Kultur gefunden. Durch die Waschschritte bei Färbung wurden zahlreiche Zellen abgespült und durch das Minimieren von Waschschritten kamen auch apoptotische Körper auf dem Gel zum Erliegen. Nach der Färbung (siehe dazu Abschnitt 2.17.1) wurden die Gele in umgekehrter Orientierung auf einem Deckglas im inversen Fluoreszenzmikroskop bei 630-facher Vergrößerung in Öl-Immersion mikroskopiert.

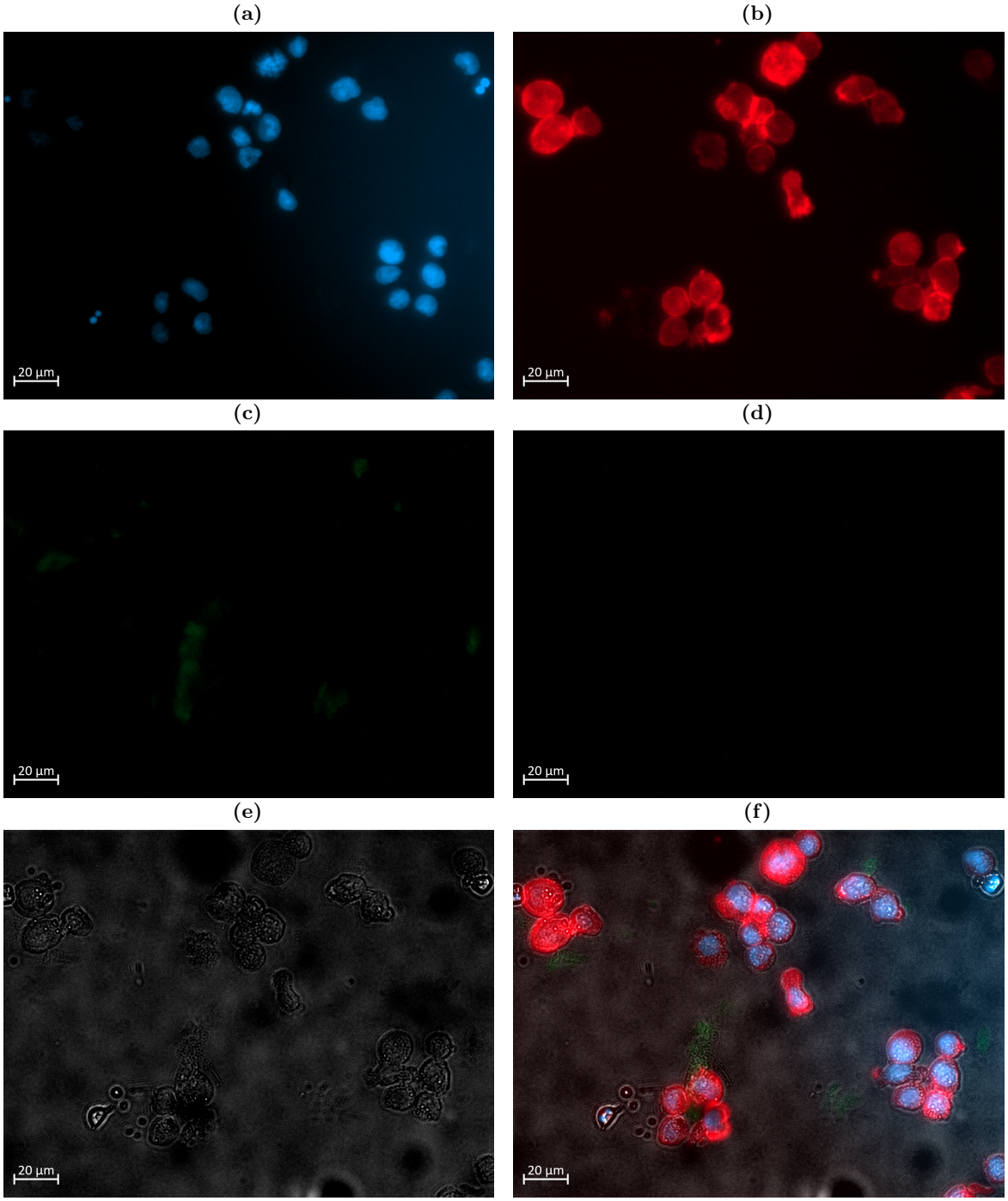


Abbildung 3.24.: Sekundärantikörperkontrolle der Immunfluoreszenzfärbung einer 8-tägigen HSPZ Kultur auf PS154+*LDV*-Peptid Gel. Zellkern/DNA (blau)(a), f-Aktin (rot)(b), CXCR4 (grün)(c), Prominin-1 (orange)(d), Durchlicht-Hellfeld (e), Überlagerung der Bilder (a)-(e) in (f). Maßstab = 20 µm

Die wenigen verbliebenen und vorwiegend unpolarisierten Zellen zeigten ein kortikales Zytoskelett aus f-Aktin (Abb. 3.24b, 3.25b, 3.26b, 3.27b). Die Sekundärantikörperkontrolle in Abb. 3.24 zeigte im grünen und orangefarbenen Kanal keine relevante Fluoreszenz (Abb. 3.24c,

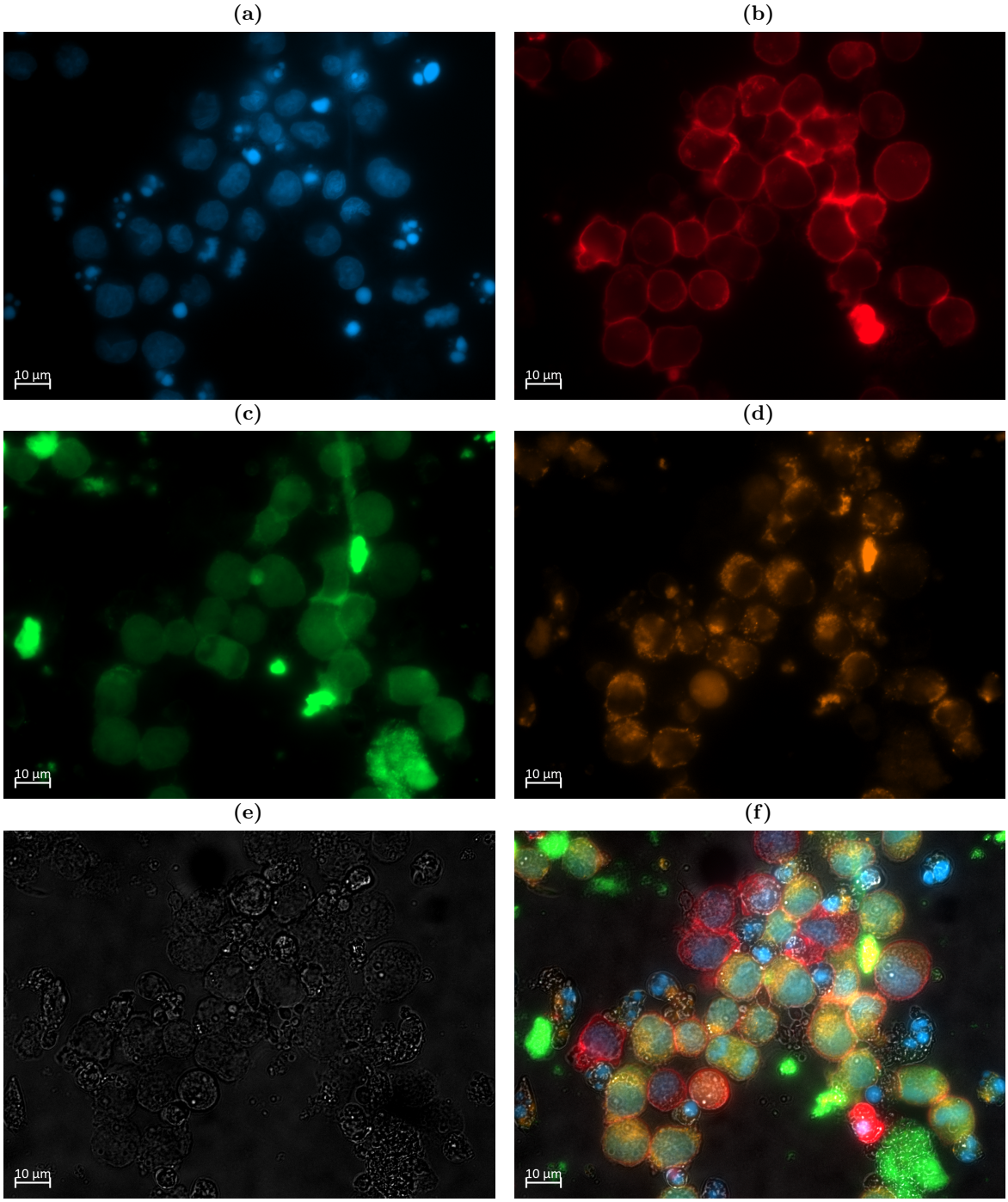


Abbildung 3.25.: Immunfluoreszenzfärbung einer 8-tägigen HSPZ Kultur auf PS1058+*LDV*-Peptid Gel. Zellkern/DNA (blau)(a), f-Aktin (rot)(b), CXCR4 (grün)(c), Prominin-1 (orange)(d), Durchlicht-Hellfeld (e), Überlagerung der Bilder (a)-(e) in (f). Maßstab = 10 µm

3.24d) und damit keine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper - weder von den Zellen, noch vom Substrat. Jedoch interagierten Primärantikörper spezifisch mit ihrer Zielstruktur oder auch unspezifisch mit dem Zelltrümmern und potentiell auch dem Gel, sodass partiell Färbeagglomerate durch die Primärantikörper-bindenden Sekundärantikörper entstanden

waren, wie in Bereichen höchster Fluorezenzintensitäten für CXCR4 und Prominin-1 zu sehen ist (Abb. 3.25c, 3.25d). Die indirekte Immunfluoreszenz macht sowohl $CXCR4^-$ als auch $CXCR4^+$ Zellen erkennbar, wobei CXCR4 gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt war (Abb. 3.25c, 3.26c, 3.27c).

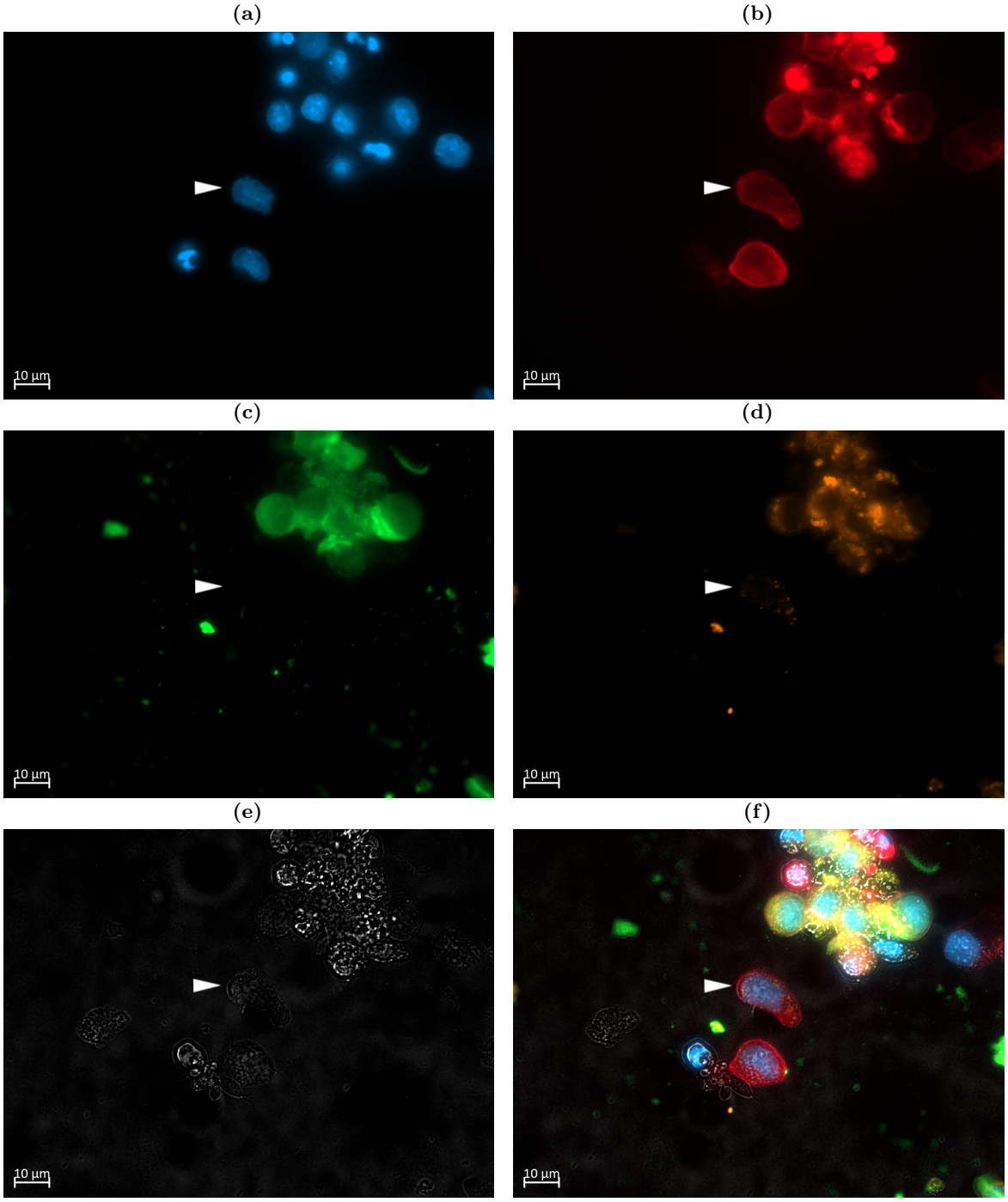


Abbildung 3.26.: Immunfluoreszenzfärbung einer 8-tägigen HSPZ Kultur auf PS154+*LDV*-Peptid Gel. Zellkern/DNA (blau)(a), f-Aktin (rot)(b), CXCR4 (grün)(c), Prominin-1 (orange)(d), Durchlicht-Hellfeld (e), Überlagerung der Bilder (a)-(e) in (f). Das weiße Dreieck markiert eine polarisierte Zelle. Maßstab = 10 µm

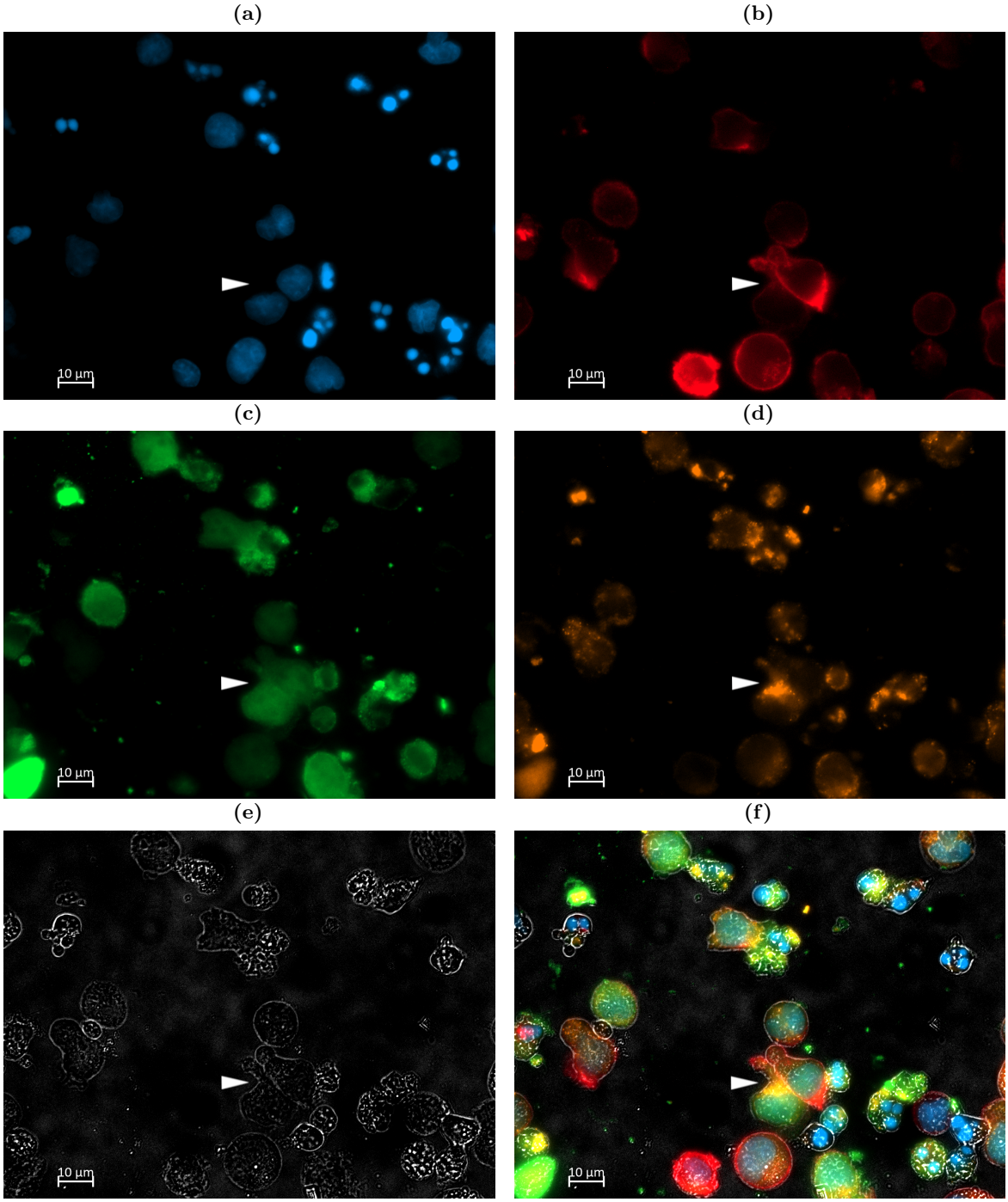


Abbildung 3.27.: Immunfluoreszenzfärbung einer 8-tägigen HSPZ Kultur auf PS154+*LDV*-Peptid Gel. Zellkern/DNA (blau)(a), f-Aktin (rot)(b), CXCR4 (grün)(c), Prominin-1 (orange)(d), Durchlicht-Hellfeld (e), Überlagerung der Bilder (a)-(e) in (f). Das weiße Dreieck markiert zwei polarisierte Zellen. Maßstab = 10 µm

Eine Konzentrierung des Rezeptors CXCR4 am Frontpol polarisierter Zellen konnte nicht beobachtet werden, nicht zuletzt wegen der äußerst geringen Zahl an polarisierten Zellen. In Abb. 3.26 ist eine vereinzelt polarisierte Zelle auf einem PS154-Gel zu sehen, die jedoch CXCR4$^-$ ist (Abb. 3.26c). Die Abb. 3.27c zeigt mittig zwei aneinander liegende polarisierte

Zellen, die $CXCR4^+$ sind. Unpolarisierte $CXCR4^-$ sind zugleich $CD133^{-/schwach}$ (Abb. 3.25c, 3.26c, 3.27c im Vergleich mit Abb. 3.25d, 3.26d, 3.27d). $CD133^+$ Zellen wiesen keine homogene Verteilung von Prominin-1 über die gesamte Zelloberfläche auf, sondern die Fluoreszenz stellt sich in Form von Clustern über die gesamte Zelloberfläche dar. Eine konzentrierte Lokalisation von CD133 im Uropod von polarisierten Zellen konnte anhand der Aufnahmen nicht beobachtet werden (Abb. 3.26d und Abb. 3.27d).

Insgesamt ist kein offensichtlicher Unterschied zwischen dem PS1058- und PS154-strukturierten *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gel in Anzahl und Färbung der auf dem Substrat verbliebenen Zellen auszumachen. Aus den Immunfluoreszenzfärbungen lässt sich nicht auf eine Ligandendichte-abhängige Adhäsion der für 8 Tage kultivierten HSPZ auf den Gelen schließen.

3.3.3. Motilitätsuntersuchungen kultivierter HSPZ

Um die Dynamik der Zelladhäsion und Zellmotilität von HSPZ bei der Interaktion mit verschiedenen nanostrukturierten und funktionalisierten Geloberflächen beschreiben zu können, wurden Zeitrafferaufnahmen über einen Zeitraum von 20 min zum Zeitpunkt 48 h nach Zellaussaat auf den Hydrogelen bzw. TCP angefertigt (Abschnitt 2.18). Diese wurden mit und ohne SDF-1α-Beladung der Gele durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Chemokinstimulation unterstützend auf die Polarisation und Adhäsion der Zellen auf dem jeweiligen Substrat wirkt.

Anhand der Bilder wurden die Zellen in zwei verschiedene Zellmorphologien eingeteilt: rundlich erscheinende Zellen wurden in sphärische, asphärische Zellen in polarisierte kategorisiert. Als polarisiert wurden Zellen definiert, die entlang der Ebene (Kulturoberfläche) gestreckt sind und damit eine Längsachse aufweisen. Die binarische Kategorisierung aller Zellen innerhalb des Bildausschnittes zum Zeitpunkt 0 min, nach 10 min und nach 20 min erfolgte manuell für jede Oberfläche. Abb. A.1 (Anhang) zeigt die binarische Zählung anhand einer Beispieloberfläche. Da Zellpolarisation eine Vorausssetzung für Lokomotion ist (Sánchez-Madrid und del Pozo, 1999), wurde der relative Anteil polarisierter Zellen für die *LDV*- bzw. *IDSP*-Peptid-funktionalisierten Gele mit und ohne SDF-1α-Beladung und zum Vergleich auf TCP in Abb. 3.28 dargestellt.

Auf den meisten Oberflächen überwog die relative Häufigkeit sphärischer Zellen, wobei der Polarisierungsgrad auf den Hydrogelen insgesamt höher war als auf TCP, und ungeachtet von Ausreißern max. 51% auf den Gelen betrug (Abb. 3.28). Mit Hilfe eines gepaarten t-Tests (Vergleich von gleichen Donoren) konnte eine signifikante Erhöhung polarisierter HSPZ bei TCP durch Zugabe von SDF-1α in einer Endkonzentration von 90 ng/ml festgestellt werden ($p = 0,017$, Abb. 3.28a). Die Mittelwerte mit SD liegen bei 28,9±5,7% (TCP) und 35,7±3,9% (TCP+SDF-1α). Eine signifikante Erhöhung des Polarisierungsgrades der HSPZ-Population durch den Einfluss von SDF-1α konnte auch auf den *IDSP*-Peptid-funktionalisierten Gelen

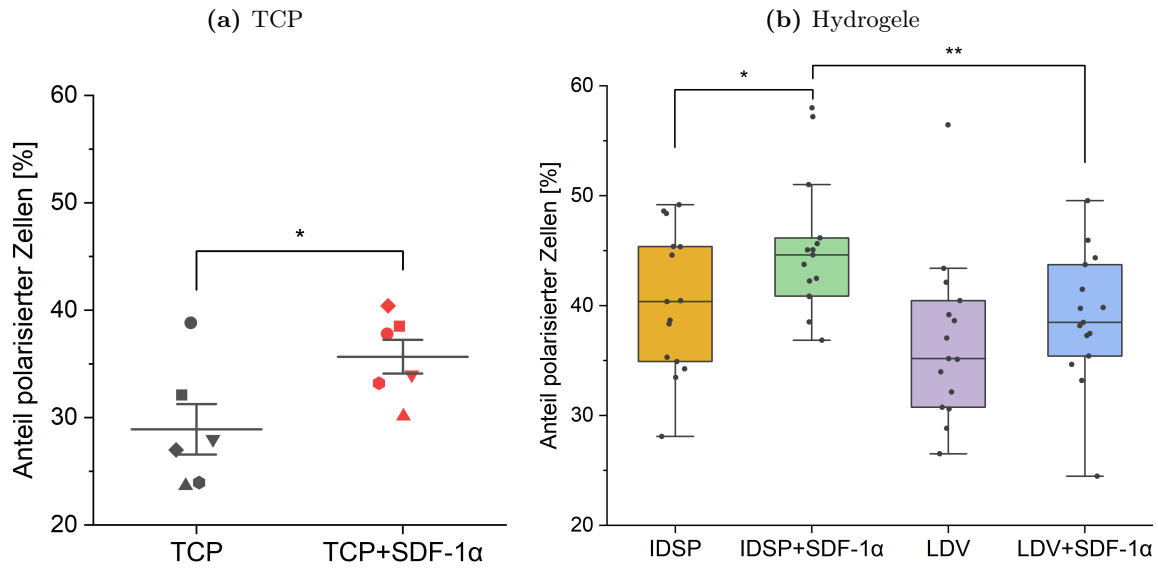


Abbildung 3.28.: Anteil polarisierter HSPZ mit und ohne Einfluss von SDF-1α nach 48 h auf unterschiedlichen Oberflächen. Anteil polarisierter HSPZ auf TCP mit SDF-1α (90 ng/ml) und ohne Zugabe von SDF-1α (a). Mittelwerte mit SD aus sechs unabhängigen Experimenten, gleiche Symbole kennzeichnen gleiche Experimente, statistische Signifikanz über gepaarten t-Test. Anteil polarisierter HSPZ auf funktionalisierten Hydrogelen (b). Funktionalisierung mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid mit (+SDF-1α) und ohne SDF-1α-Beladung der Gele. Boxplots aus fünf verschiedenen Geloberflächen aus drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung, statistische Signifikanz über gepaarten t-Test innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung und über ungepaarten t-Test zwischen verschiedener Peptidfunktionalisierung. * p<0,05, ** p<0,01

beobachtet werden ($p = 0,028$, Abb. 3.28b) mit einem Anstieg der Mittelwerte polarisierter Zellen von 40,4±6,4% auf 45,2±6,1% bei den SDF-1α-beladenen Gelen.

Auf den *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gelen ist der Polarisierungsgrad nach gepaartem t-Test statistisch nicht signifikant unterschiedlich, auch wenn eine geringe Erhöhung der Mittelwerte des polarisierten Zellanteils (36,7±7,4% zu 38,9±6,0%) auf mit SDF-1α-beladenen Gelen vorlag. Im Vergleich SDF-1α-beladener Gele unterschiedlicher Peptidfunktionalisierung zeigten sich auf den *IDSP*-Peptid-funktionalisierten Gelen signifikant (Vergleich von unterschiedlichen Donoren, daher ungepaarter t-Test mit $p = 0,008$) mehr polarisierte Zellen in Bezug auf die Gesamtpopulation als auf den *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gelen (Abb. 3.28b).

Desweiteren wurde geprüft, inwieweit die Nanostrukturierung auf den Hydrogeloberflächen im Zusammenspiel mit der Peptidfunktionalisierung und einer SDF-1α-Freisetzung aus dem Gel Einfluss auf den Polarisierungsgrad der HSPZ nehmen. Innerhalb der vier Vergleichsgruppen, die in Abb. 3.29 dargestellt sind, konnten keine signifikanten Unterschiede mittels einfacher ANOVA (mit wiederholten Messungen) und Tukey-Test bei dem hier vorliegenden Experimentumfang von $n = 3$ ermittelt werden. Folglich hat die alleinige Verfügbarkeit von SDF-1α bereits einen Effekt auf die Zellmorphologie zugunsten erhöhter Polarisation. Die dabei getesteten Peptidligandendichten scheinen bei der Polarisation keine wesentliche Rolle zu spielen.

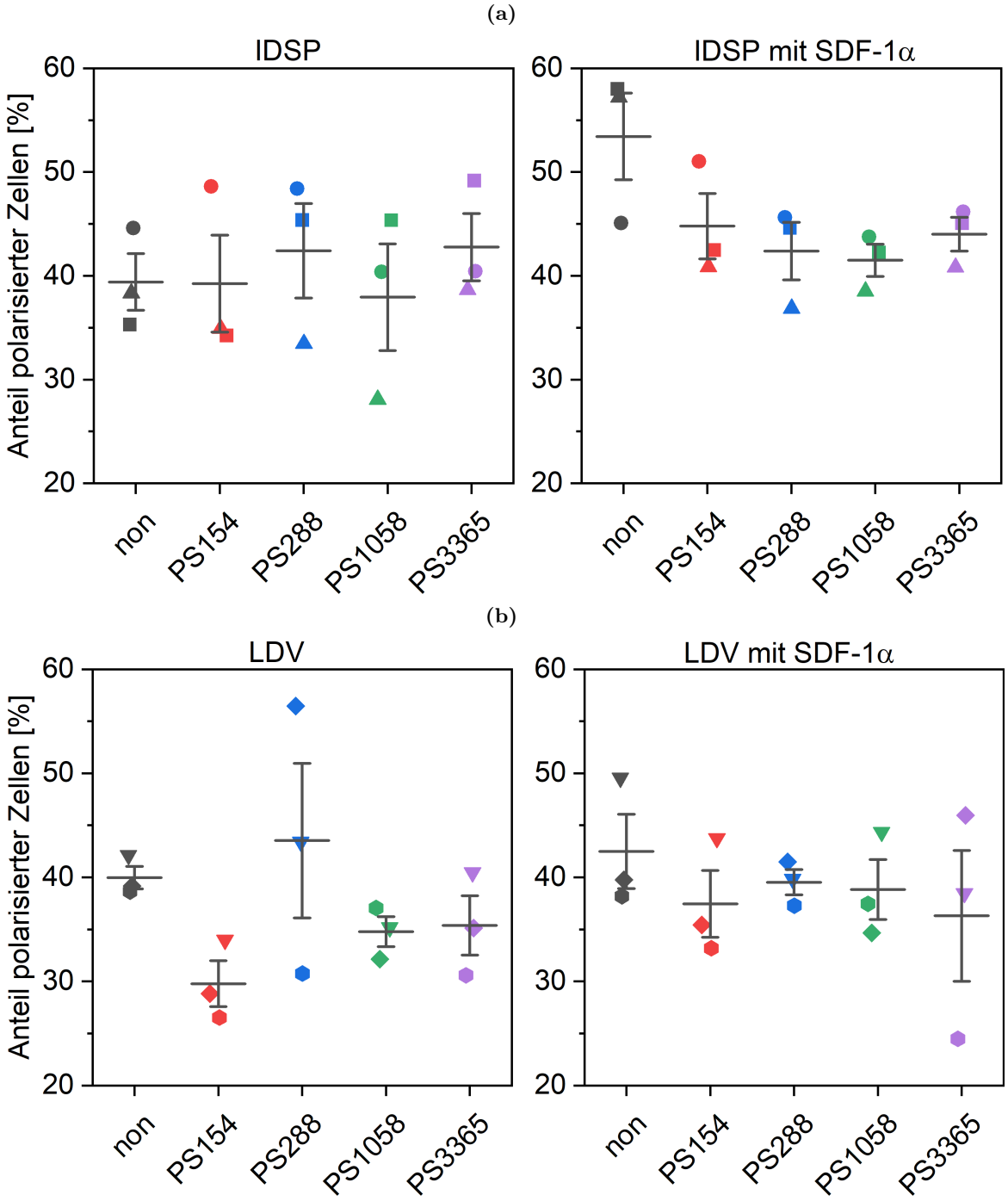


Abbildung 3.29.: Anteil polarisierter HSPZ nach 48 h auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung der Nanostruktur (PS*) mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid mit und ohne SDF-1α-Beladung sowie unstrukturierte Hydrogele (non). Mittelwerte mit SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung, gleiche Symbolgeometrien kennzeichnen gleiche Experimente. Auf statistische Signifikanz über Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung geprüft. * $p < 0,05$

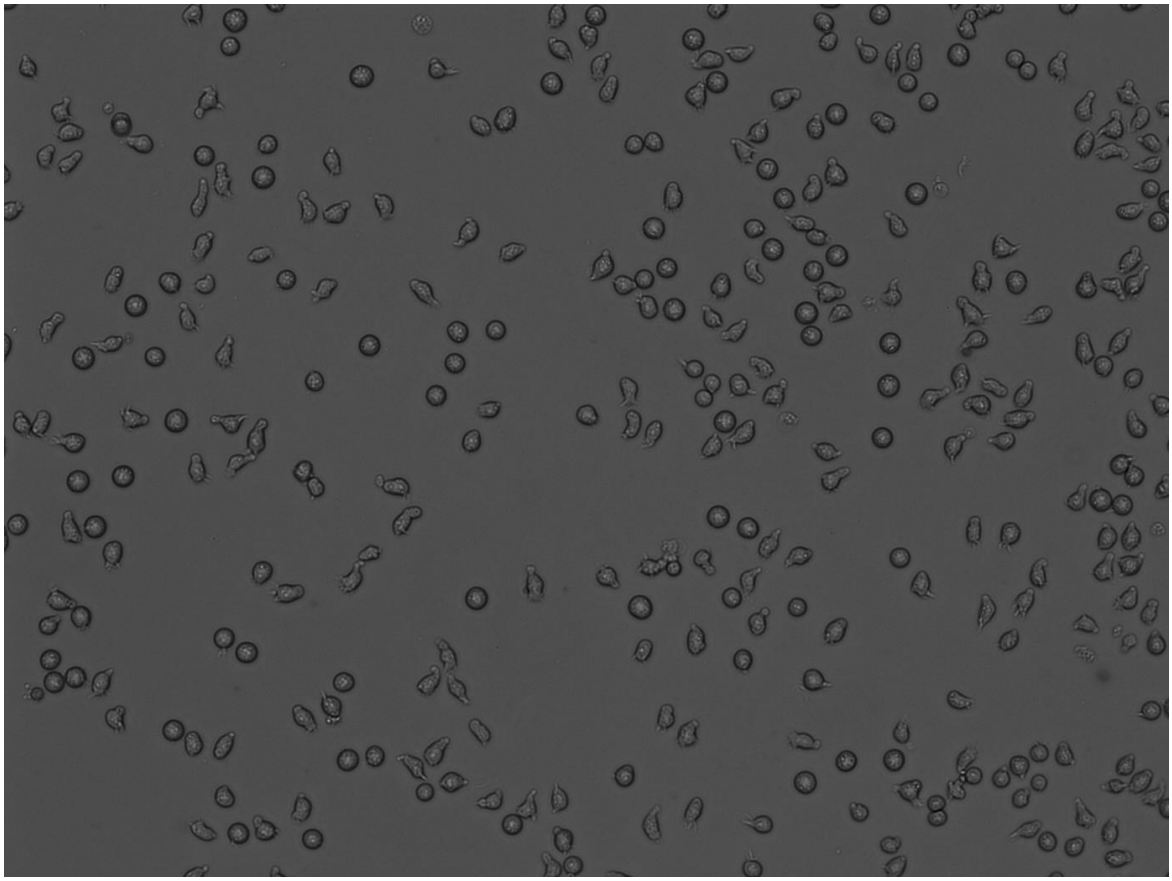


Abbildung 3.30.: Animierte Bilderfolge der Zeitraffer-Mikroskopie zur Nachverfolgung der Zellbewegung auf Hydrogeloberflächen. Gezeigt ist exemplarisch eine Bilderfolge der Zellen auf unstrukturiertem, SDF-1α-beladenem Hydrogel zum Aufnahmezeitpunkt 48 h nach Aussaat der HSPZ. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen im Abstand von 30 s über einen Zeitraum von 20 min. Wichtiger Hinweis: Die Animation kann nur in der elektronischen pdf-Version der Arbeit nach Aktivierung der Formularfunktion in gängigen pdf-Programmen wie z. B. `Adobe Acrobat`, `okular`, `PDF X-Change` oder `Foxit-Reader` angezeigt werden.

In den Zeitrafferaufnahmen in Abb. 3.30 ist die Dynamik der Polarisation nachverfolgbar. Die Vorderkante polarisierter Zellen lässt schon bei nur 100-facher Vergrößerung deutlich Filopodien erkennen. Auch bei einigen sphärischen Zellen sind Filopodien erkennbar. In beiden Fällen ist die Aus- und Rückbildung der Filopodien so dynamisch, dass bei der Bildrate von 1/30 s bestehende Filopodien innerhalb von 30 s zurückgebildet und neue ausgebildet wurden (Abb. 3.30). Die Filopodienbildung ist auf unstrukturierten wie strukturierten Gelen gleichermaßen zu beobachten.

In den Zeitrafferaufnahmen ließ sich die Zellmotilität visuell gut verfolgen. Abb. 3.30 zeigt beispielhaft an einer Aufnahmesequenz für ein unstrukturiertes SDF-1α-beladenes Gel wie sich polarisierte und sphärische Zellen über die Dauer von 20 min bewegen. Dabei gibt es sowohl polarisierte als auch sphärische Zellen, die über die gesamte Dauer ungerichtet um

ihr Massezentrum schwanken. Und es gibt Zellen, sowohl polarisierte als auch sphärische, die über die gesamte Dauer eine Nettobewegung von ihrem Massezentrumsursprung weg vollzogen haben. Für eine genauere Analyse letzterer Zellmotilität wurde nur die Bewegung der polarisierten Zellen berücksichtigt, denn es wurde die Morphologie als Indikator für eine Interaktion mit der Oberfläche festgelegt.

Es konnte beobachtet werden, dass für alle bewegenden Zellen innerhalb des Bildausschnittes eine gemeinsame bevorzugte Nettobewegung stattfand. Obwohl die Platte makroskopisch eben ausgerichtet war und das Auftreten von thermischen Gradienten durch das Befüllen der Bereiche zwischen den *Wells* mit PBS maximal möglich reduziert wurde, konnte oft eine passive Leitrichtung der Zellmotilität beobachtet werden. Es wird vermutet, dass diese durch eine thermische Konvektionsströmung im Medium, verursacht durch die kontinuierliche Wärmezufuhr des Heizeinsatzes, erzeugt wurde. Für eine vergleichende Analyse der unterschiedlichen Oberflächen war es daher erforderlich, die Daten der manuellen Klickverfolgung um die jeweilige „passive Bewegung" (Hintergrundfluss) zu korrigieren. Dazu wurde zunächst ein zweidimensionaler Geschwindigsvektor des Hintergrundflusses ($\vec{v}_{\mathrm{Fluss}}$) als mittlerer Geschwindigkeitsvektor ($\langle\vec{v}_i(t)\rangle$) aller mittleren Geschwindigkeitsvektoren von Bild zu Bild klickverfolgter polarisierter Zellen i berechnet:

$$\vec{v}_{\mathrm{Fluss}} = \begin{pmatrix} v_x \\ v_y \end{pmatrix} = \frac{\sum_{i=1}^{N}\langle\vec{v}_i(t)\rangle}{N} \tag{3.1}$$

Im Folgenden wurde dieser Hintergrundflussvektor vom individuellen Geschwindigkeitsvektor von Bild zu Bild abgezogen ($\vec{v}_{\mathrm{i,korr}}(t) = \vec{v}_i(t) - \vec{v}_{\mathrm{Fluss}}$). Mit den korrigierten Geschwindigkeiten konnte ein neuer korrigierter Bewegungspfad für die klickverfolgten polarisierten Zellen berechnet werden. Der Effekt dieser Korrektur wird anhand eines Beispieldatensatzes in Abb. 3.31 gezeigt, wo jeweils 12 migrierende polarisierte Zellen auf einem PS154- (Abb. 3.31a) bzw. PS1058- (Abb. 3.31b) strukturierten, LDV-Peptid-funktionalisierten und mit SDF-1α beladenen Gel klickverfolgt wurden. Im Vergleich der zweidimensionalen Bewegungspfaddiagramme der unkorrigierten Geschwindigkeitsvektoren (Abb. 3.31c, 3.31e) ist zu sehen, dass der Hintergrundfluss auf der PS1058-strukturierten Geloberfläche größer ist als auf der PS154-strukturierten Geloberfläche, da auf der PS1058-strukturierten Geloberfläche die Bewegungsexkursionen geradliniger in den III. Quadranten gerichtet sind (Abb. 3.31e) als die auf der PS154-strukturierten Geloberfläche (Abb. 3.31c).

Nach Korrektur um den jeweiligen Oberflächen-spezifischen Hintergrundflussvektor repräsentiert das korrigierte zweidimensionale Bewegungspfaddiagramm die Motilität der Zellen auf der jeweiligen Oberfläche, die für beide Oberflächen nun die vergleichbare ungerichtete Bewegungsexkursionen relativ zum Hintergrundflussvektor abbildet (Abb. 3.31d, 3.31f). Ferner illustriert Abb. A.2 wie die Direktionalität der unkorrigierten Bewegung deutlich mit der mitt-

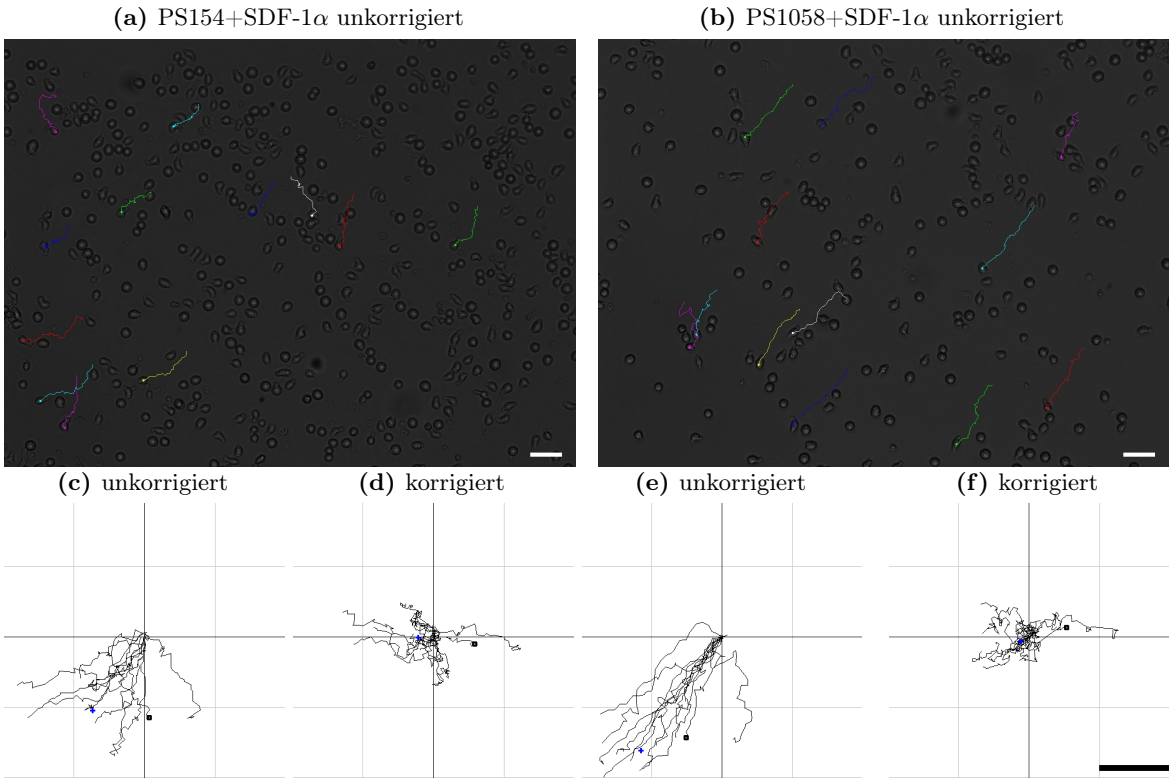


Abbildung 3.31.: Akkumulierte Wegstrecke durch Klickverfolgung von 12 repräsentativ migrierenden polarisierten Zellen pro Oberfläche. Dargestellt sind die Migrationspfade von polarisierten Zellen auf PS154- (a) bzw. PS1058- (b) strukturierten, *LDV*-Peptid-funktionalisierten + SDF-1α beladenen Gelen. Korrespondierende Klickverfolgungsdiagramme illustrieren zweidimensional die innerhalb von 20 min zurückgelegten Bewegungspfade von 12 Zellen, beginnend im Koordinatenursprung (c - f), wobei (d) und (f) die um den oberfächeneigenen passiven Hintergrundflussvektor korrigierten Bewegungspfade darstellen. Das blaue Kreuz markiert den Schwerpunkt aller Pfadendpunkte. Maßstab = 50 µm.

leren unkorrigierten Geschwindigkeit korreliert (Abb. A.2a, A.2c). Wogegen diese Korrelation bei den um den Hintergrundflussvektor korrigierten Daten aufgehoben ist (Abb. A.2b, A.2d). Die Direktionalität - das Verhältnis aus euklidischer Distanz zur akkumulierten Distanz - gibt dabei das Maß der Geradlinigkeit der Bewegung an (nicht geradlinig=0$\leq y \leq$1=geradlinig).

Das Migrationsverhalten der HSPZ nach 48 h Kultur wird im Folgenden über die Hintergrundflussvektor korrigierten Geschwindigkeiten, die mittlere korrigierte Geschwindigkeit, beschrieben. In Abb. 3.32 werden die korrigierten mittleren Geschwindigkeiten polarisierter Zellen auf den Oberflächen dargestellt. Die Zugabe von SDF-1α in den TCP-Kulturen bewirkte eine signifikante Reduktion der korrigierten mittleren Geschwindigkeit ($p = 0,0048$, gepaarter t-Test, fünf Donoren, Abb. 3.32a). Die Mittelwerte mit SD liegen bei 0,10±0,01 µm/s (TCP) und 0,08±0,01 µm/s (TCP+SDF-1α). Dieser signifikante Unterschied ist auch in der unkorrigierten mittleren Geschwindigkeit vorhanden und daher robust. Die mittlere korrigierte Geschwindigkeit auf *IDSP*-Peptid-funktionalisierten Gelen ohne SDF-1α-Beladung ist mit 0,08±0,01 µm/s signifikant höher (ungepaarter t-Test, $p = 0,001$) als auf *LDV*-Peptid-funktionalisierten

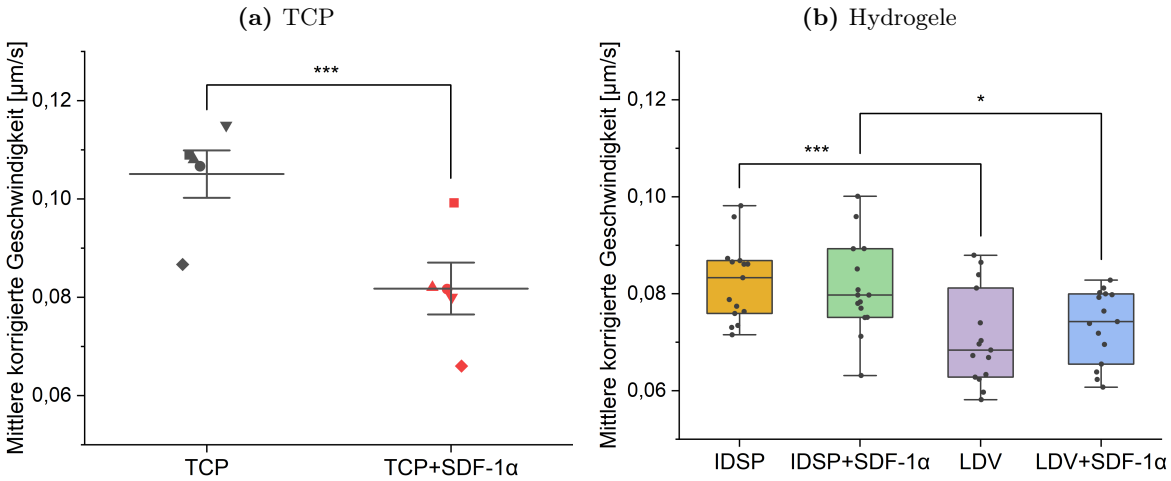


Abbildung 3.32.: Einfluss von SDF-1α auf die mittlere korrigierte Geschwindigkeit migrierender HSPZ nach 48 h auf unterschiedlichen Oberflächen. Mittlere korrigierte Geschwindigkeit migrierender polarisierter HSPZ auf TCP mit SDF-1α (90 ng/ml) und ohne Zugabe von SDF-1α (a). Mittelwerte mit SD aus fünf unabhängigen Experimenten, gleiche Symbole kennzeichnen gleiche Experimente, statistische Signifikanz über gepaarten t-Test. Mittlere korrigierte Geschwindigkeit migrierender polarisierter HSPZ auf funktionalisierten Hydrogelen (b). Funktionalisierung mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid mit (+SDF-1α) und ohne SDF-1α-Beladung der Gele. Boxplots aus 5 verschiedenen Geloberflächen aus drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung, statistische Signifikanz über gepaarten t-Test innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung und über ungepaarten t-Test zwischen verschiedener Peptidfunktionalisierung getestet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$

Gelen ohne SDF-1α-Beladung (0,07±0,01 µm/s, Abb. 3.32b). Im Gruppenvergleich der Gele gleicher Peptidfunktionalisierung weist die SDF-1α-Beladung der Gele keinen signifikanten Einfluss auf die mittlere korrigierte Geschwindigkeit migrierender HSPZ gegenüber der Gruppe der Gele ohne Beladung auf (gepaarter t-Test, Abb. 3.32b). Dagegen weist zwischen den beiden Gruppen SDF-1α-beladener Gele die *IDSP*-Peptid-Funktionalisierung eine signifikant erhöhte mittlere korrigierte Geschwindigkeit migrierender HSPZ (0,08±0,01 µm/s) im Vergleich zur *LDV*-Peptid-Funktionalisierung auf (0,07±0,01 µm/s, ungepaarter t-Test, $p = 0,02$, Abb. 3.32b).

Um zu prüfen, ob die Peptidligandendichte eine Auswirkung auf die mittlere korrigierte Migrationsgeschwindigkeit hat, wurde ein paarweiser Vergleich nanostrukturierter Gele gleicher Peptidfunktionalisierung ohne bzw. mit SDF-1α-Beladung mit der unstrukturierten Kontrolle durchgeführt (Tukey-Test im Rahmen einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen). Hierbei zeigten weder die strukturierten *IDSP*-Peptid-funktionalisierten Gele, noch die strukturierten *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gele sowohl ohne als auch mit SDF-1α-Beladung, einen signifikanten Unterschied der mittleren korrigierten Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich mit der Migrationsgeschwindigkeit auf dem unstrukturierten Gel (Abb. 3.33a, 3.33b). Lediglich das PS154-strukturierte *IDSP*-Peptid-Gel + SDF-1α zeigt im Vergleich zur unstrukturierten Kontrolle (non; 0.07±0.01 µm/s) eine nicht signifikant erhöhte (0.09±0.01 µm/s)

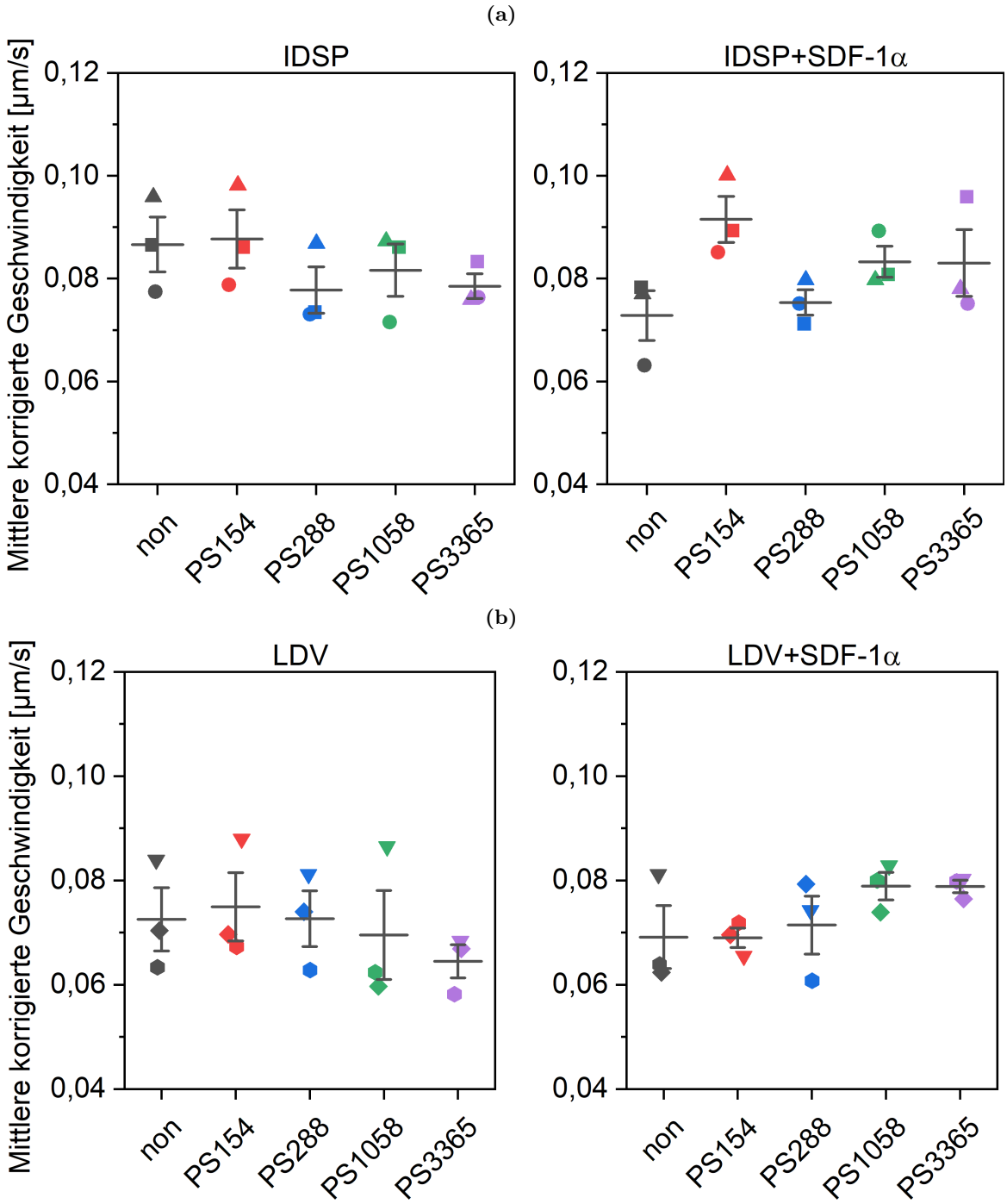


Abbildung 3.33.: Einfluss der Nanostrukturierung auf die mittlere korrigierte Geschwindigkeit migrierender HSPZ nach 48 h auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung der Nanostruktur (PS*) mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid mit und ohne SDF-1α-Beladung sowie unstrukturierte Hydrogele (non). Mittelwerte mit SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung, gleiche Symbolgeometrien kennzeichnen gleiche Experimente. Auf statistische Signifikanz über Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung geprüft. * $p < 0,05$

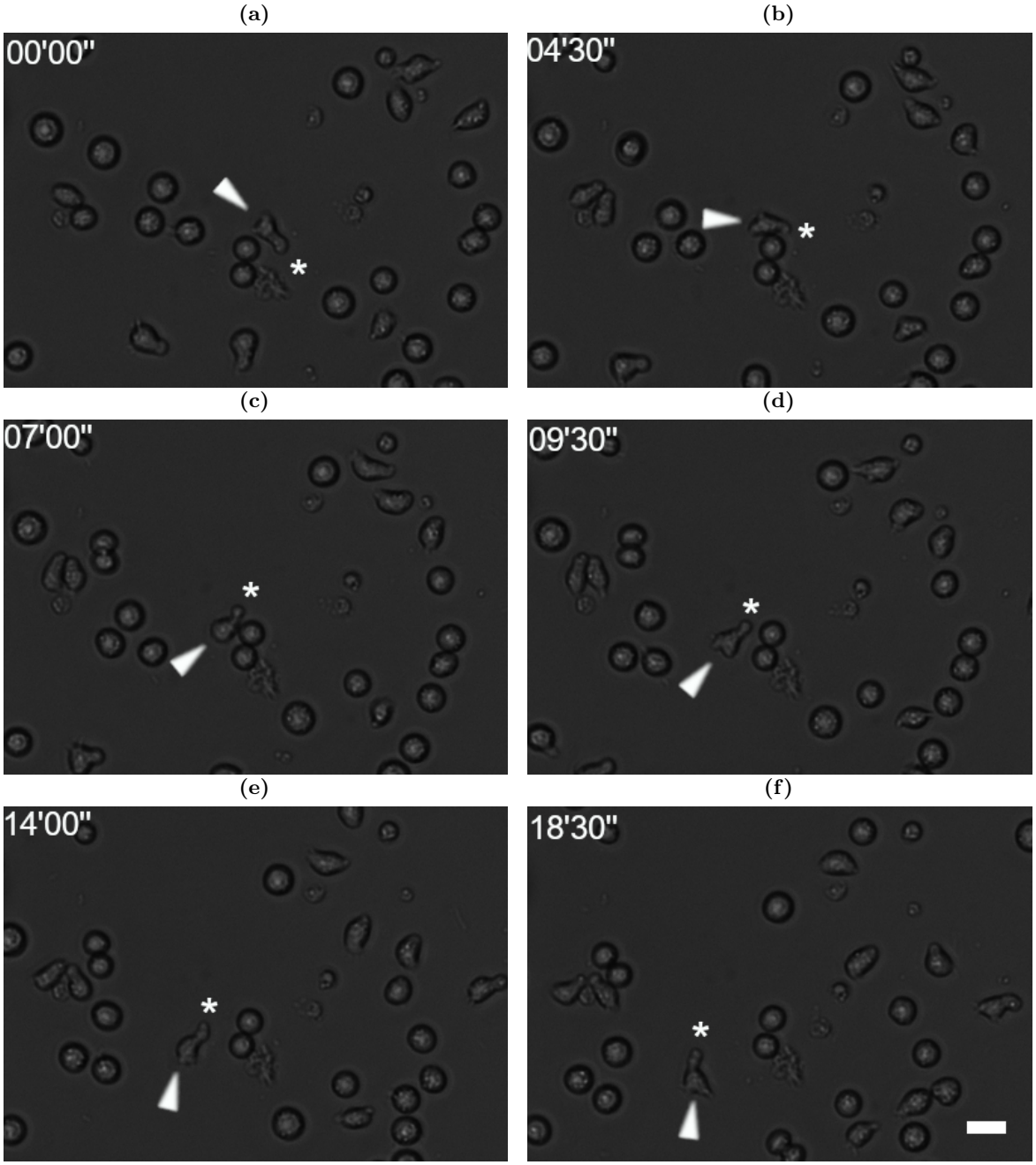


Abbildung 3.34.: Bildsequenz der Durchlichtmikroskopie zur Migration von polarisierten HSPZ nach 48 h auf PS3365-strukturiertem und *LDV*-Peptid-funktionalisiertem Gel. Migrierende polarisierte Zellen bewegen sich ausschließlich in zellfreien Bereichen entlang der Substratoberfläche. Beispielhaft ist eine Zelle markiert: der Frontpol zeigt in Migrationsrichtung (Dreieck), der Uropod (Stern) kennzeichnet den Rückpol. Zeitangabe (oben links im Bild) in min's". Maßstab = 20 µm

korrigierte Migrationsgeschwindigkeit. Folglich hat die unterschiedliche Nanostrukturierung der Geloberfläche und die damit einhergehende verschiedene Peptidligandendichte keinen unmittelbaren Effekt auf die mittlere korrigierte Geschwindigkeit migrierender HSPZ.

Der Einfluss von SDF-1α auf die mittlere korrigierte Geschwindigkeit migrierender HSPZ auf

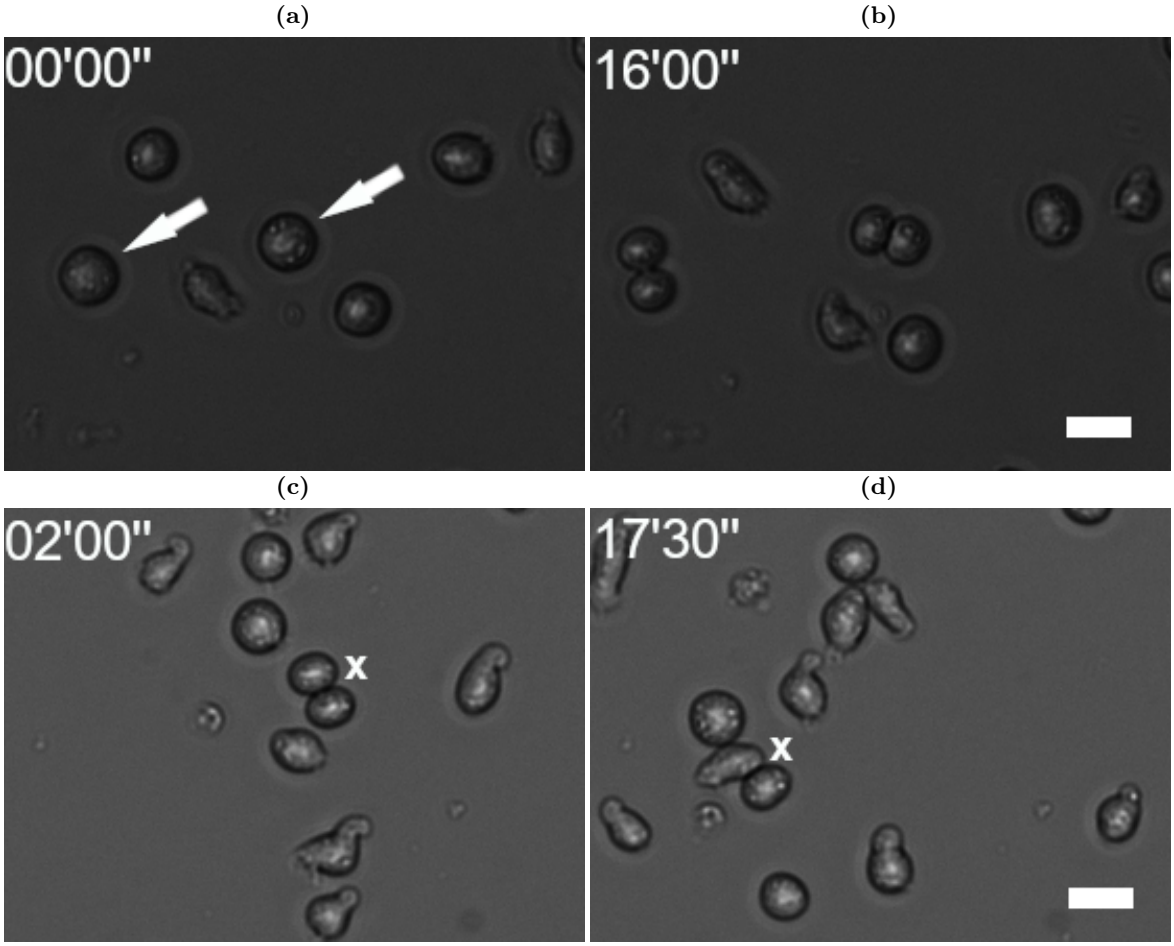


Abbildung 3.35.: Durchlichtmikroskopie von HSPZ nach 48 h auf funktionalisierten nanostrukturierten Hydrogelen. Zahlreiche Zellteilungen sind bei den Zeitrafferaufnahmen dokumentiert worden. Zwei Mutterzellen während der Mitose (Pfeile in (a)) und deren Tochterzellen nach bzw. während Zytokinese (b) auf PS288-strukturiertem und *LDV*-Peptid-funktionalisiertem Gel (a, b). Aus einer Teilung hervorgegangene Schwesterzellen (c), von denen eine (markiert mit einem Kreuz) bereits nach 15,5 min morphologisch polarisiert (d). Zellen auf PS154-strukturiertem, *IDSP*-Peptid-funktionalisiertem + SDF-1α beladenem Gel (c, d). Zeitangabe (oben links im Bild) in min's". Maßstab = 20 µm

den Gelen ist folglich nur in Kombination mit der Peptidfunktionalisierung bewertbar. Auf TCP resultiert die Zugabe einer definierten SDF-1α-Konzentration in eine deutliche reduzierte mittlere korrigierte Geschwindigkeit, und erreicht damit das Geschwindigkeitsniveau, mit welchem sich Zellen auf den Hydrogelen ohne SDF-1α-Verfügbarkeit maximal (*IDSP*-Peptid-funktionalisierten Gele) bewegen. Die Freisetzung von SDF-1α aus den beladenen Gelen bewirkt bei den HSPZ keinen reduzierenden Effekt auf die mittlere korrigierte Geschwindigkeit. Allein die unterschiedliche Peptidfunktionalisierung bewirkt eine signifikant unterschiedliche mittlere korrigierte Geschwindigkeit auf migrierende HSPZ.

Zellen bewegen sich stets aneinander vorbei, niemals übereinander hinweg und migrieren somit nur auf zellfreier Substratfläche (Abb. 3.34). Zellen, die in direktem Kontakt miteinander

stehen sind meist Schwesterzellen. Das sieht man anhand zahlreicher mitaufgezeichneter Zellteilungen sehr deutlich. Während der Teilung kann sich die Mutterzelle in einem passiven Bewegungsstrom befinden. Zellteilungen wurden bei relativ großen, ausschließlich sphärischen Zellen beobachtet. Dabei befindet sich die Teilungsebene senkrecht zur Matrixoberfläche. Nach erfolgter Zytokinese sind zwei sphärische Zellen kleineren Durchmessers als der der Mutterzelle sichtbar (Abb. 3.35a und 3.35b). Sie liegen direkt nebeneinander für einen Zeitraum von minimal beobachteten 15,5 min, ehe sie polarisieren und aktiv migrieren (Abb. 3.35c und 3.35d).

3.3.4. Proliferationsanalyse der HSPZ-Kultur auf nanostrukturierten Hydrogelen

3.3.4.1. Populationswachstum und Generationszeiten

Ein Indikator für die Vermehrung der HSPZ und deren Nachkommen auf den unterschiedlichen Oberflächen bildete die Ermittlung der Gesamtzellzahl nach 6 (D6) und 12 (D12) Kulturtagen. Die mittlere Gesamtzellzahl pro Bedingung wurde als Mittel aus drei unabhängigen Experimenten erfasst. Die Wachstumskurven sind in Abb. 3.36 dargestellt. Die Zellzahlexpansion sowohl auf den *IDSP*-Peptid- als auch den *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gelen und deren Kontrolloberflächen ist untereinander sehr ähnlich. Die Gesamtzellzahl stieg innerhalb der ersten 6 Tage von $2{\times}10^4$ auf $\approx 1{\times}10^6$ für *IDSP*-Peptid-Kulturen bzw. auf $\approx 8{\times}10^5$ für *LDV*-Peptid-Kulturen. Damit wiesen beide Peptidfunktionalisierungen einen höheren Anstieg auf als für die darauf folgenden 6 Kulturtage, die ein weiteres Wachstum auf $\approx 3{,}2{\times}10^7$ für *IDSP*-Peptid-Kulturen bzw. auf $\approx 1{,}3{\times}10^7$ für *LDV*-Peptid-Kulturen kennzeichnen (Abb. 3.36a, 3.36b). In durchlichtmikroskopischen Aufnahmen stellten sich die für 6 Tage expandierten HSPZ auf allen Oberflächen in hoher Zelldichte und in ähnlicher Morphologie dar. Dagegen waren die Kulturen nach 12-tägiger Expansion auf allen Oberflächen durch eine im Vergleich zu D6 geringere Zelldichte mit Vorkommen apoptotischer Körper und Zelltrümmer-Aggregate gekennzeichnet (Abb. A.3, Abb. A.4).

Wie Abb. 3.37a verdeutlicht, war das Expansionspotential aller Populationen nach 6-tägiger Kultur signifikant reduziert (gepaarter t-Test: *IDSP*-Peptid $p = 1 \times 10^{-13}$, *LDV*-Peptid $p = 1,5 \times 10^{-17}$). Zwischen den *IDSP*- und *LDV*-Peptid-Kulturen (jeweils Mittelwert aller 9 verschiedenen Oberflächen aus 3 unabhängigen Experimenten zusammen) gibt es signifikante Unterschiede. So ist nach beiden Expansionsintervallen von je 6 Tagen (D6, D12) die Gesamtzellzahl der *LDV*-Peptid-Kulturen der der *IDSP*-Peptid-Kulturen signifikant unterlegen (ungepaarter t-Test: D6 $p = 1,4 \times 10^{-4}$; D12 $p = 1,5 \times 10^{-3}$, Abb. 3.37a).

Schließlich zeigten sich zwischen den verschiedenen Kulturoberflächen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung für die *IDSP*-Peptid-Kulturen nach beiden Expansionsintervallen keine

(a) *IDSP*-Peptid **(b)** *LDV*-Peptid

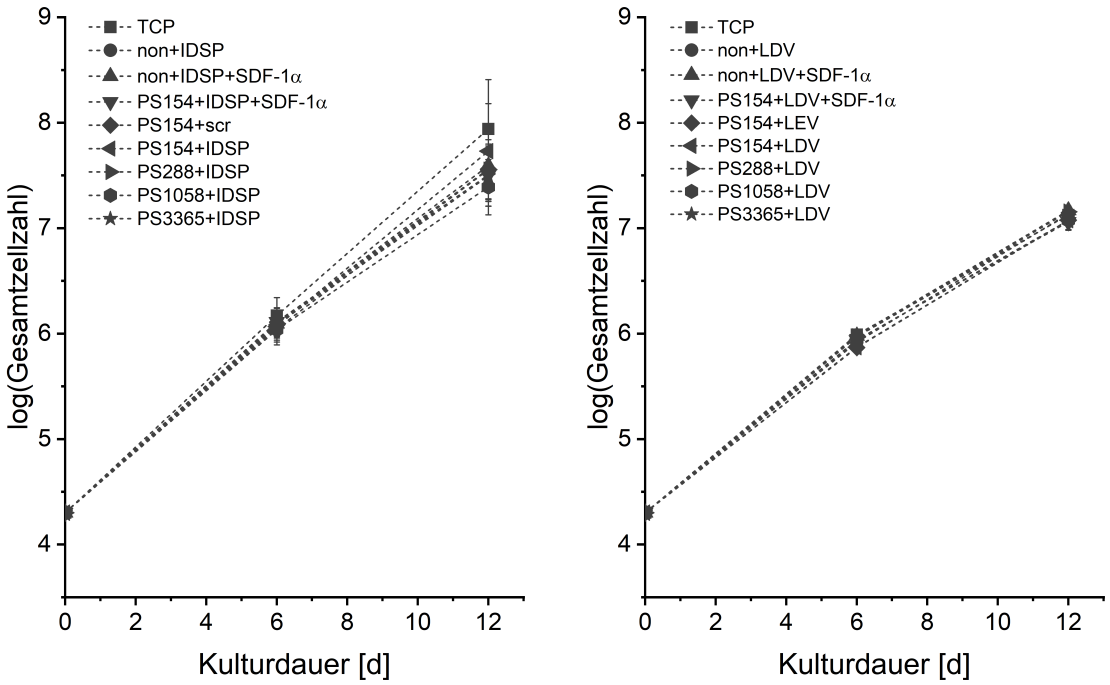


Abbildung 3.36.: Gesamtzellzahl von HSPZ nach 6 und 12 d auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung der Nanostruktur (PS*) mit *IDSP*-Peptid bzw. scr-Peptid als Kontrolle in (a), Funktionalisierung der Nanostruktur (PS*) mit *LDV*-Peptid bzw. *LEV*-Peptid als Kontrolle in (b), unstrukturierte Hydrogele (non). Halblogarithmische Darstellung, wobei die Ordinate den dekadischen Logarithmus der mittleren Gesamtzellzahl als Funktion der Kultivierungszeit (lineare Skalierung) der HSPZ auf den Oberflächen zeigt. Mittelwerte mit SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten.

signifikanten Unterschiede in der Gesamtzellzahl (Abb. 3.37b). Für die *LDV*-Peptid-Kulturen dagegen waren Unterschiede in der Gesamtzellzahl nach der ersten 6-tägigen Kultur auf folgenden Oberflächen statistisch signifikant: Auffällig ist die signifikant reduzierte Gesamtzellzahl der Populationen auf den PS154-nanostrukturierten *LDV*-Peptid-funktionalisierten Hydrogelen (Mittelwert mit SD 743750±68488) und der gleichartig niedrigen Gesamtzellzahl der PS154-nanostrukturierten Kontrollpeptid (*LEV*)-funktionalisierten Hydrogelen (Mittelwert mit SD 736250±59398) im Vergleich zu TCP ($p = 3,2 \times 10^{-5}$, $p = 2,1 \times 10^{-5}$), non+SDF-1α ($p = 1,3 \times 10^{-4}$, $p = 8,8 \times 10^{-5}$), PS154+SDF-1α ($p = 0,02$, $p = 0,01$), PS288 ($p = 2,8 \times 10^{-4}$, $p = 1,8 \times 10^{-4}$), PS1058 ($p = 0,02$, $p = 0,016$) und PS3365 ($p = 4,0 \times 10^{-4}$, $p = 2,6 \times 10^{-4}$), berechnet durch Tukey-Test im Rahmen einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen (Abb. 3.37c links). Nur noch für die unstrukturierten Hydrogele (non) wurde eine relativ geringe Gesamtzellzahl ermittelt (Mittelwert mit SD 827500±67523), die im Vergleich mit der Gesamtzellzahl auf den Oberflächen TCP ($p = 0,004$), non+SDF-1α ($p = 0,02$) und PS288 ($p = 0,046$) signifikant verringert war (Abb. 3.37c links). Diese Resultate für die absolute Zellzahl als Indikator des Proliferationspotentials von HSPZ kultiviert für ein erstes

Intervall von 6 Tagen auf *LDV*-Peptid-funktionalisierten Hydrogelen lässt keinen direkten Zusammenhang von *LDV*-Peptid-Ligandendichte auf die erhaltene Gesamtzellzahl der Population erkennen. Nach dem zweiten Kulturintervall von weiteren 6 Tagen (D12) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen in den Gesamtzellzahlen der *LDV*-Peptid-Kulturen auf den verschiedenen Oberflächen ermittelt werden (Abb. 3.37c rechts).

Als weiterer Indikator für die Zellexpansion wurde die Generationszeit t_g der Gesamtpopulation auf den unterschiedlichen Oberflächen berechnet und für drei unabhängige Experimente gemittelt (siehe dazu Abschnitt 2.20.1, Formel 2.17). Die mittlere Generationszeit für das erste Kulturintervall von 6 Tagen (0.–6. Tag) lag ziemlich genau bei 24 h für alle *IDSP*-Peptid-Kulturen. Für das zweite Kulturintervall (6.–12. Tag) dauerte die mittlere Generationszeit für alle *IDSP*-Peptid-Kulturen länger, ist aber für die unstrukturierten Oberflächen mit ca. 1,26 d geringer als für die strukturierten Geloberflächen, deren mittlere Generationszeit zwischen 1,35 bis 1,47 d beträgt (Tab. 3.3). Aufgrund der geringen Anzahl von Experimenten und entsprechend großer Schwankungsbreite unterschieden sich die Generationszeiten von unstrukturierten und strukturierten Oberfläche in dem zweiten Kulturintervall nicht signifikant.

Tabelle 3.3.: Mittlere Generationszeiten von HSPZ kultiviert auf unstrukturierten und nanostrukturierten Oberflächen. Funktionalisierung der Nanostruktur mit *IDSP*-Peptid bzw. scr-Peptid (Kontrolle). Angabe für zwei Kulturintervalle vom 0.–6. Tag sowie vom 6.–12. Tag als mittlere Generationszeit±SD.

Oberfläche	**Generationszeit [d]**	
	0.–6. Tag	**6.–12. Tag**
TCP	1,00±0,11	1,25±0,25
non+IDSP	1,04±0,06	1,26±0,15
non+IDSP+SDF-1α	1,02±0,07	1,26±0,14
PS154+IDSP+SDF-1α	1,01±0,08	1,37±0,15
PS154+scr	1,04±0,09	1,40±0,28
PS154+IDSP	1,05±0,10	1,35±0,31
PS228+IDSP	1,02±0,07	1,37±0,23
PS1058+IDSP	1,05±0,06	1,47±0,27
PS3365+IDSP	1,02±0,06	1,46±0,33

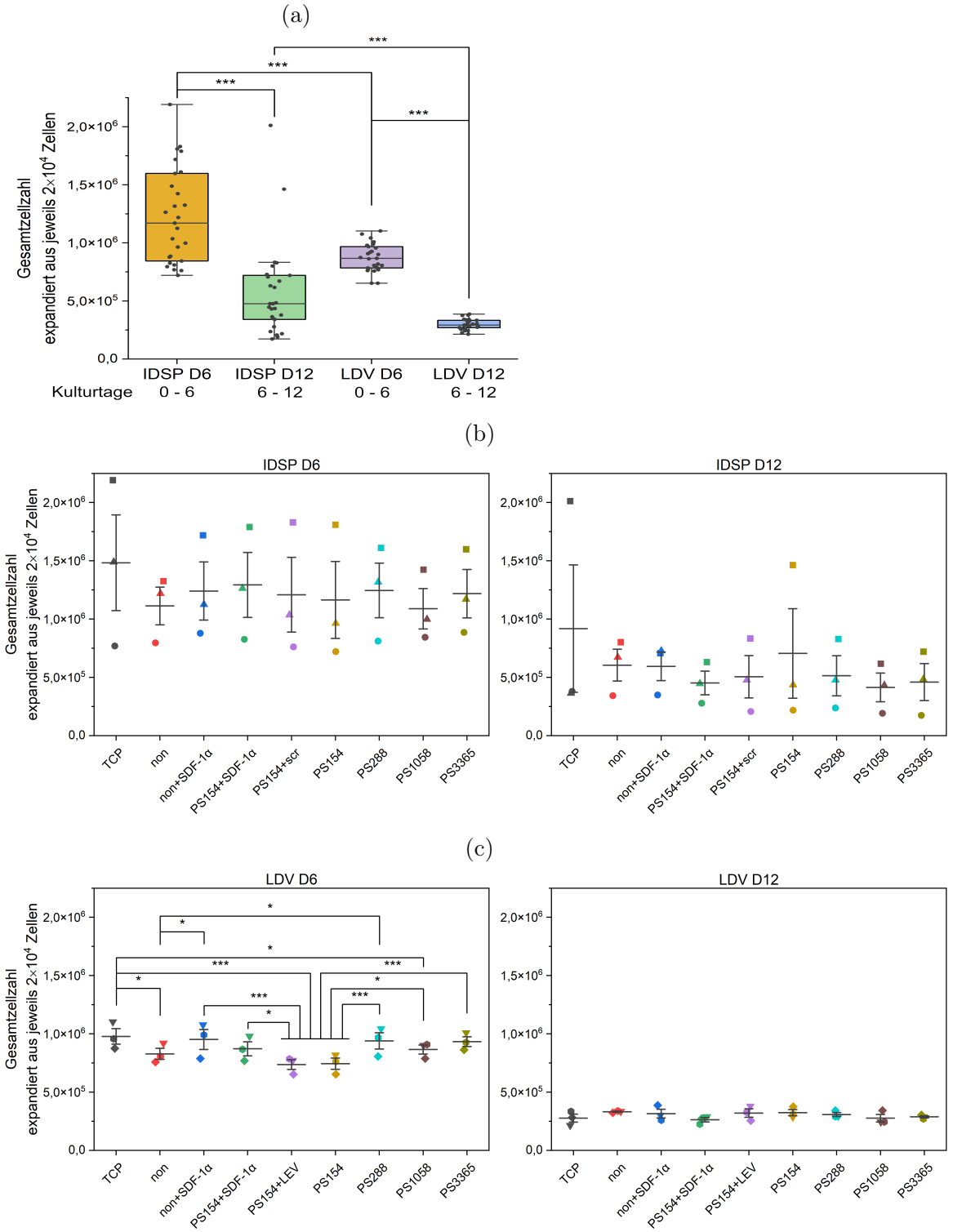


Abbildung 3.37.: Expansion von HSPZ nach 6 bzw. 12 Tagen auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung unstrukturierter (non) und nanostrukturierter (PS*) Hydrogele mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid oder Kontrollpeptid (scr, LEV), ggf. mit SDF-1α-Beladung. TCP als Vergleich. Dargestellt ist die Gesamtzellzahl, die aus der Expansion von 2×10^4 eingesäten HSPZ nach 6 Tagen (D6) Kultur bzw. nach Zellernte und Rücksaat von 2×10^4 Zellen an D6 und weiteren 6 Tagen (D12) Kultur auf den angegebenen Oberflächen ermittelt wurde. Boxplots aus allen 9 verschiedenen Oberflächen aus drei unabhängigen Experimenten pro

Peptidfunktionalisierung, statistische Signifikanz über gepaarten t-Test innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung und über ungepaarten t-Test zwischen verschiedener Peptidfunktionalisierung (a). Mittelwerte mit SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung, gleiche Symbolgeometrien kennzeichnen gleiche Experimente; auf statistische Signifikanz über Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung geprüft (b, c). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$

Für die *LDV*-Peptid-Kulturen lag die mittlere Verdopplungszeit für das erste Kulturintervall (0.–6. Tag) im Vergleich zu den *IDSP*-Peptid-Kulturen mit 1,1 d insgesamt etwas höher (Tab. 3.4). Die längsten Generationszeiten (non 1,12±0,02 d, PS154+*LDV* und PS154+*LEV* 1,15±0,03 d) resultierten aus den niedrigsten Gesamtzellzahlen (s. o.). Auch die mittlere Generationszeit zwischen 6.–12. Kulturtag dauerte im Vergleich zu den *IDSP*-Peptid-Kulturen länger, sie beträgt zwischen 1,48 und 1,62 d. Für die *LDV*-Peptid-Kulturen war keine Tendenz einer Unterscheidung von strukturierten und unstrukturierten Oberfläche hinsichtlich längerer oder kürzerer Verdopplungszeit für das zweite Kulturintervall erkennbar. Die allgemein längeren Generationszeiten der *LDV*-Peptid-Kulturen ist durch die Berechnung aus der Gesamtzellzahl konsistent mit dem oben über die Gesamtzellzahl festgestellten reduzierten Expansionspotential aller Populationen der *LDV*-Peptid-Kulturen im Vergleich mit den *IDSP*-Peptid-Kulturen.

Tabelle 3.4.: Mittlere Generationszeiten von HSPZ kultiviert auf unstrukturierten und nanostrukturierten Oberflächen. Funktionalisierung der Nanostruktur mit *LDV*-Peptid bzw. *LEV*-Peptid (Kontrolle). Angabe für zwei Kulturintervalle vom 0.–6. Tag sowie vom 6.–12. Tag als mittlere Generationszeit±SD.

Oberfläche	**Generationszeit [d]**	
	0.–6. Tag	**6.–12. Tag**
TCP	1,07±0,03	1,60±0,11
non+LDV	1,12±0,02	1,48±0,01
non+LDV+SDF-1α	1,08±0,04	1,52±0,09
PS154+LDV+SDF-1α	1,10±0,03	1,62±0,07
PS154+LEV	1,15±0,03	1,51±0,09
PS154+LDV	1,15±0,03	1,50±0,06
PS228+LDV	1,08±0,03	1,52±0,04
PS1058+LDV	1,10±0,02	1,60±0,09
PS3365+LDV	1,08±0,02	1,56±0,03

3.3.4.2. Zellzyklusaktivitätsmessung mittels EdU *Assay*

Im Anschluss der Motilitätsuntersuchungen von HSPZ, wurden diese Kulturen für eine Endanalyse der Zellzyklusaktivität durch die direkte Messung der *de novo* DNA-Synthese durch Inkorporation von EdU genutzt (siehe Abschnitt 2.20.2). Nach Kupfer-katalysierter *Click*-Reaktion mit Alexa Fluor™ 488 Azid konnte während der S-Phase des Zellzyklus eingebautes

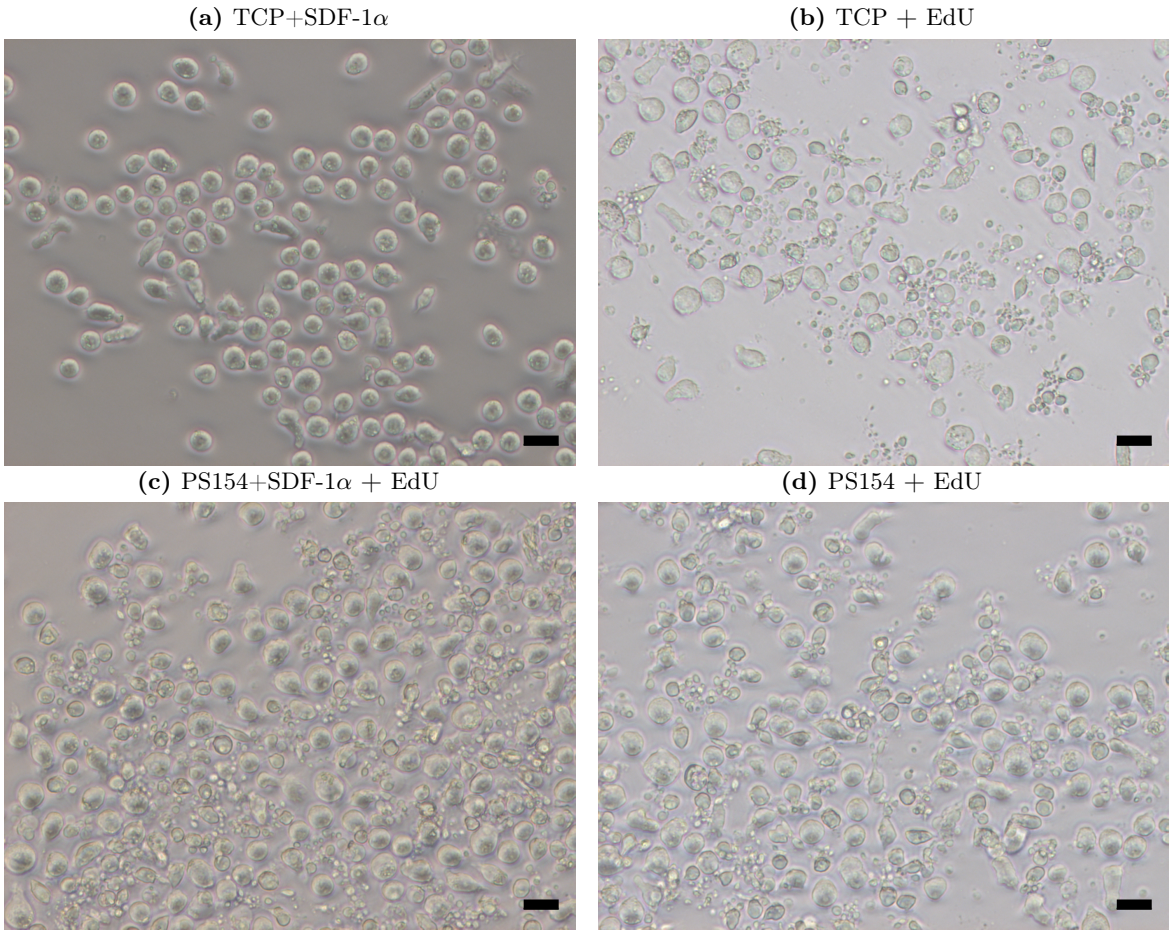


Abbildung 3.38.: Zytotoxische Wirkung von EdU auf proliferierende HSPZ auf verschiedenen Oberflächen. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HSPZ am Tag 4 auf Zellkulturplastik (TCP) (a) sowie am Tag 4 nach 24-stündiger EdU-Inkubation (1 μM) auf TCP (b) und PS154-nanostrukturierten und *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gelen mit und ohne SDF-1α (c, d). In den EdU-inkubuerten Kulturen sind zahlreiche Zelltrümmer zu sehen. Maßstab = 20 µm

EdU markiert und der Anteil an EdU$^+$ Zellen an der Gesamtpopulation durchflusszytometrisch bestimmt werden. Einschränkend war jedoch festzustellen, dass die 24 h-Inkubation mit 1 µM EdU zu erheblichem Zelltod in allen Kulturen führte. In den repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 3.38b, 3.38c, 3.38d ist der Zelluntergang anhand der zahlreichen Zelltrümmer in den EdU-Kulturen deutlich zu erkennen und steht damit in klarem Kontrast zu der EdU-freien Kontrollkultur (Abb. 3.38a). Während die EdU-freie Kontrolle („TCP+SDF-1α") über alle 6 Experimente eine über den Vitalitätsfarbstoff Viobility™ 405/452 definierte sehr hohe Vitalität von im Mittel 98,6±0,45% aufwiesen, war die Vitalität der EdU-Kulturen wesentlich geringer mit Schwankungen zwischen minimal 68% und maximal 90%. Die in allen Kulturen merklich reduzierte Vitalität ist Resultat der EdU-Inkorporation und dessen zytotoxische Wirkung (Ligasová et al., 2015).

Für die übrigen als vital definierten Zellen wurde die Analyse der Anteilsverteilung von EdU$^+$ und EdU$^-$ Zellen durchgeführt und ist in Abb. 3.39 dargestellt. Daraus ist ersichtlich,

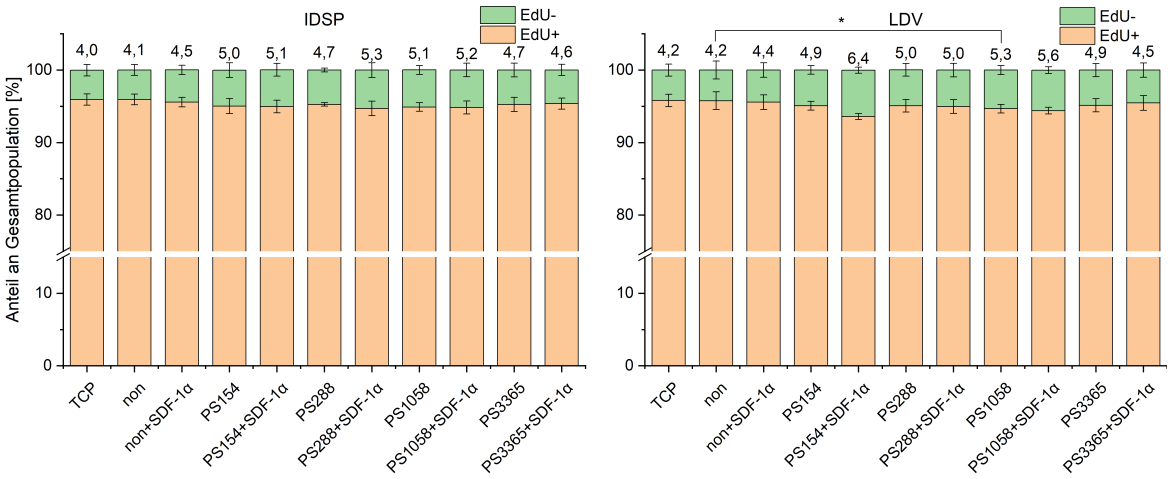


Abbildung 3.39.: Proliferationsanalyse über Anteile von EdU$^+$ und EdU$^-$ Zellen auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung unstrukturierter (non) und nanostrukturierter (PS*) Hydrogele mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid mit und ohne SDF-1α-Beladung. Einbau von 5-Ethinyl-2'-desoxyuridin (EdU) in DNA-replizierende Zellen (EdU$^+$) von Kulturtag 3 zu 4. Zellzyklus-inaktive Zellen in G_0-Phase sind EdU$^-$. Durchflusszytometrische Detektion nach Kupfer-katalysierter *Click*-Reaktion mit Alexa Fluor™ 488 Azid. Angabe relativer Zellanteile an der Gesamtpopulation als Mittelwerte mit SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung. Auf statistische Signifikanz über Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung geprüft, wobei * $p < 0,05$.

dass in allen Kulturen auf den jeweiligen Oberflächen, sowohl bei den *IDSP*- als auch *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gelen, der relative Anteil an EdU$^+$ Zellen mit $\geq$93,6% stark dominierte. Alle EdU$^+$ Zellen kennzeichnen aktiv proliferierende Zellen, die während ihrer S-Phase des Zellzyklus EdU in die replizierte DNA eingebaut haben. Demgegenüber steht ein relativer Anteil an Zellzyklus-ruhenden EdU$^-$ Zellen von 4,0–6,4%. Der Einfluss von SDF-1α wurde über gepaarten t-Test zwischen gleicher Peptidfunktionalisierung (gleiche Donorquellen), über ungepaarten t-Test zwischen verschiedener Peptidfunktionalisierung (verschiedene Donorquellen) geprüft und ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede des EdU$^-$ Zellanteils. Zwischen den Hydrogelproben wurde mittels einfacher ANOVA (mit wiederholten Messungen) und Tukey-Test innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung mit bzw. ohne SDF-1α-Beladung auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft. Dabei überwog nur der EdU$^-$ Zellanteil der Kultur auf dem PS1058-nanostrukturierten *LDV*-Gel ($p = 0,03$, Abb. 3.39) signifikant den auf der Kontrolle (unstrukturiertes *LDV*-Gel).

3.3.5. Differenzierungsanalyse kultivierter HSPZ auf nanostrukturierten Hydrogelen

3.3.5.1. Phänotypische Charakterisierung der HSPZ

Der spezifische primäre Membranrezeptor für das *IDSP*- sowie *LDV*-Peptid ist Integrin $\alpha_4\beta_1$. SDF-1α ist der Ligand für den Membranrezeptor CXCR4 (CD184). Um die potentielle Rezeption der Liganden durch die HSPZ über die Kulturintervalle auf den verschiedenen Oberflächen beurteilen zu können, wurde bei der durchflusszytometrischen Phänotypisierung der Zellexpansionskulturen auch die Expression von Integrin α_4 (CD49d) und CD184 mit untersucht. So exprimierten 98,8±0,9% (Mittelwert mit SD über 6 Experimente) der über $CD34^+$ isolierten Zellen CD49d. Den Anteil $CD49d^+$ Zellen an der Gesamtpopulation nach 6 und 12 Kulturtagen zeigt die Abb. 3.40a. Dieser ist unabhängig von der Peptidfunktionalisierung und lag nach 6 Kulturtagen bei nahezu 100% und nach 12 Kulturtagen bei mehr als 98% (Abb. A.5). HSPZ und deren Nachkommen wiesen damit eine hohe, über die Kulturzeit von 12 Tagen stabile Expression von CD49d unabhängig von den getesteten Kulturbedingungen auf. Die Zellen waren somit auch zu jedem Zeitpunkt potentiell rezeptiv für die ihnen gebotenen Integrin $\alpha_4\beta_1$-spezifischen Adhäsionsmotive *IDSP* bzw. *LDV*. Die Expression des Integrin β_1 (CD29) wurde in Vorexperimenten für HSPZ geprüft und war über 12 Kulturtage für die Gesamtpopulation konstant hoch, sodass diese durchgehend als $CD29^+$ angesehen wird (Abb. A.6).

Der Anteil $CD184^+$ Zellen an frisch isolierten $CD34^+$ Zellen schwankte stark mit 71,5±21,4% (Mittelwert±SD aus 6 Nabelschnurblutaufreinigungen). Nach 6 Kulturtagen nahm der Anteil $CD184^+$ Zellen an der Gesamtpopulation bei beiden Peptidfunktionalisierungen ab (Abb. 3.40b). Signifikante Unterschiede des $CD184^+$ Zellanteils waren zwischen den Oberflächenkulturen non+SDF-1α und PS154 ($p = 0,02$) der *IDSP*-Peptidfunktionalisierung und zwischen non und PS1058 ($p = 0,02$) der *LDV*-Peptidfunktionalisierung auszumachen. Nach 12 Kulturtagen sank der Anteil $CD184^+$ Zellen an der Gesamtpopulation bei beiden Peptidfunktionalisierungen weiter und lag bei allen Oberflächenkulturen auf ähnlichem Niveau mit 34,3±2,1% der *IDSP*-Peptidfunktionalisierung und 44,9±1,6% der *LDV*-Peptidfunktionalisierung (Mittelwert ± SD über alle Oberflächen, Abb. 3.40b). Je Kulturoberfläche unterschied sich die Coexpression von CD184 zwischen $CD34^+$ und $CD34^-$ Zellen unwesentlich.

Um eine mögliche Synergie zwischen dem angesprochenen Integrin- und Zytokin-Signalweg zu gewährleisten, bedarf es einer Coexpression beider Rezeptormoleküle in der Zellmembran. Dahingehend analysiert veranschaulicht die Abb.3.41a hämatopoetische Progenitoren als $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellsubpopulation und deren prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation nach 6 und 12 Tagen Kultur auf verschiedenen Geloberflächen. Verfügbares SDF-1α

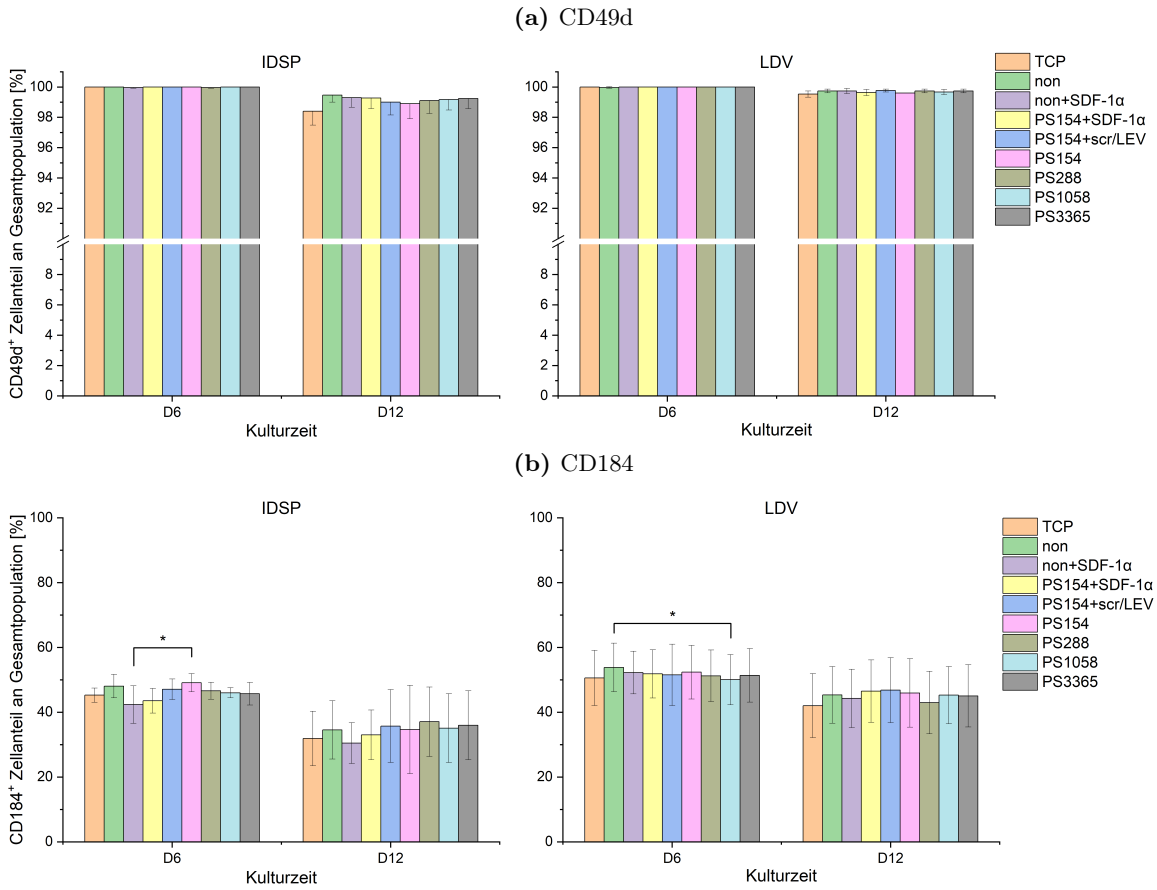


Abbildung 3.40.: Durchflusszytometrische Analyse der Adhäsionsmarker CD49d und CD184 auf HSPZ nach 6 bzw. 12 Tagen auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung unstrukturierter (non) und nanostrukturierter (PS*) Hydrogele mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid oder Kontrollpeptid (scr bzw. LEV), ggf. mit SDF-1α-Beladung. TCP als Vergleich. Als Marker für Adhäsion dienen Integrin α_4 (CD49d; Teil des Integrin $\alpha_4\beta_1$-Rezeptors für *IDSP* und *LDV*) und CD184 (Rezeptor für SDF-1α). Dargestellt sind Säulendiagramme als prozentuale Anteile Marker-positiver Zellen an der Gesamtpopulation nach 6 (D6) bzw. 12 (D12) Kulturtagen, wobei jede Säule den Mittelwert mit SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung repräsentiert (a, b). Auf statistische Signifikanz über Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung geprüft (b). * $p < 0,05$

in der HSPZ-Kultur bewirkt sowohl auf unstrukturierten als auch PS154-nanostrukturierten Gelen nach 6 Kulturtagen eine signifikante Reduktion des $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellanteils bei Gelen mit *IDSP*-Peptidfunktionalisierung von 27,0±4,5% (non) bzw. 26,7±4,4% (PS154) auf 21,5±4,8% (non+SDF-1α) bzw. 21,3±4,1% (PS154+SDF-1α) (non *vs.* non+SDF-1α mit $p = 0,003$; PS154 *vs.* PS154+SDF-1α mit $p = 0,003$; Abb. 3.41a links). Eine ähnliche Tendenz deutet sich auch für Gele mit *LDV*-Peptidfunktionalisierung nach 6 Kulturtagen an (Abb. 3.41a rechts), wobei die Unterschiede in den prozentualen Zellanteilen keine statistische Signifikanz aufwiesen, was - wie auch bei *IDSP*-Peptidfunktionalisierung - über Tukey-Test im Rahmen einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen geprüft wurde. Dieser Trend

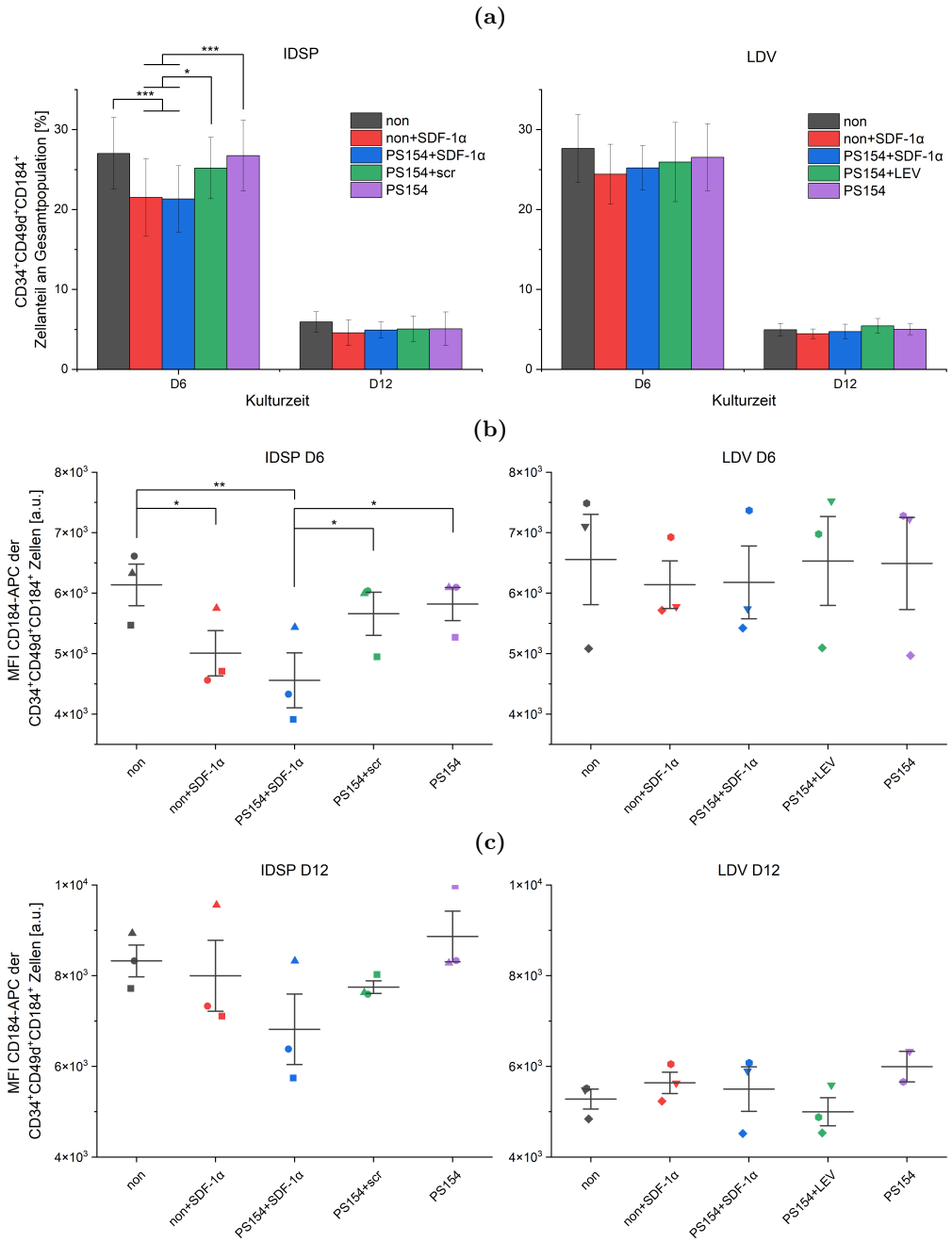


Abbildung 3.41.: Durchflusszytometrische Analyse von hämatopoetischen Progenitoren als $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Subpopulation nach 6 bzw. 12 Tagen auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung unstrukturierter (non) und nanostrukturierter (PS154) Hydrogele mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid oder Kontrollpeptid (scr bzw. LEV), ggf. mit SDF-1α-Beladung. $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellen coexprimieren die Marker CD34 (HSPZ), CD49d (Integrin α_1 z. B. in Integrin $\alpha_4\beta_1$, dem Rezeptor für *IDSP* und *LDV*) und CD184 (Rezeptor für SDF-1α). Säulendiagramme stellen die prozentualen Anteile $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellen an der Gesamtpopulation nach 6 (D6) bzw. 12 (D12) Kulturtagen dar, wobei jede Säule den Mittelwert mit SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung repräsentiert (a). Punkt-Intervall-Diagramme (b) und (c) zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD184-Färbung mit Allophycocyanin (APC) von $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellen, wobei die Mittelwertlinie mit SD das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung darstellt und Punkte gleicher Symbolgeometrien gleiche Experimente kennzeichnen. Auf statistische Signifikanz über Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung geprüft (a, b, c). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$

war nach 12 Kulturtagen bei beiden Peptidfunktionalisierung nicht mehr präsent, insbesondere weil sich der $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellanteil an der Gesamtpopulation auf allen Oberflächen auf unter 6% stark reduzierte (Abb. 3.41a).

Da die $CD184^+$ Zellverteilung im Histogramm eine zweigipflige Verteilung vermuten lässt (Abb. A.7), die sich jedoch auch nicht über eine bivariate Darstellung trennen ließ, wurde zur Charakterisierung der $CD184^+$-Verteilung die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Parameter bestimmt. Die MFI meint hier den arithmetischen Mittelwert aller innerhalb der Subpopulation $CD34^+CD49d^+CD184^+$ befindlicher $CD184^+$ Signalintensitäten (APC-Fluoreszenzintensitäten in willkürliche Einheiten, *arbitrary units* (a.u.)). Die Abb. 3.41b und 3.41c visualisieren die MFIs für die $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Subpopulation auf den bereits in Abb. 3.41a dargestellten Oberflächen, im Speziellen die unstrukturierten und PS154-nanostrukturierten Gele mit und ohne SDF-1α-Beladung. So war bei den Gelen mit *IDSP*-Peptidfunktionalisierung die MFI (CD184-APC) der $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellen auf SDF-1α-beladenen Hydrogelen im Vergleich zu der MFI der $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellen auf unbeladenen Gele nach 6 Kulturtagen signifikant vermindert (non *vs.* non+SDF-1α mit $p = 0,04$; PS154 *vs.* PS154+SDF-1α mit $p = 0,02$; Abb. 3.41b links). Derartige Unterschiede zwischen den MFIs der $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellen auf SDF-1α-beladener und unbeladener Hydrogeloberfläche nach 6 Kulturtagen waren bei *LDV*-Peptidfunktionalisierung der Gele nicht zu erkennen (Abb. 3.41b rechts). Nach 12 Tagen Kultur waren MFIs der $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellen sowohl auf *IDSP*-Peptid- als auch *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gelen unabhängig der SDF-1α-Beladung nicht signifikant verschieden.

Für die durchflusszytometrische Differenzierungsanalyse frisch isolierter $CD34^+$ Zellen (D0), und der für 6 (D6) bzw. 12 Tagen (D12) auf den unterschiedlichen Oberflächen kultivierten HSPZ wurden die Stammzellmarker CD34, CD38 und CD45RA als Vielfachfärbung verwendet (siehe Abschnitt 2.21.1) und als Auswertungsparameter die relativen Häufigkeiten der phänotypischen Stammzell-Subpopulationen bestimmt. Anhand des Stammzellkardinalmarkers $CD34^+$, wonach die HSPZ-Isolierung an D0 erfolgt, erkennt man, dass der Anteil $CD34^+$ Zellen auf allen Oberflächen mit fortschreitender Kulturzeit abnahm (Abb. 3.42). Im Vergleich der verschiedenen Oberflächen nach 6 Kulturtagen wiesen bei der *IDSP*-Peptid-Experimentreihe die TCP-Kultur (46,1±7,0%), die PS154+SDF-1α-Kultur (47,3±3,3%) sowie die PS1058-(47,1±4,1%) und PS3365-Kultur (47,5±3,5%) die geringsten $CD34^+$ Zellanteile an der Gesamtpopulation auf (Abb. 3.42 links). Diese waren entsprechend signifikant verringert gegenüber der Kulturoberfläche, die den höchsten $CD34^+$ Zellanteil an der Gesamtpopulation aufweist: die HSPZ-Kultur auf unstrukturiertem Gel (non mit 53,8±5,0%; non *vs.* TCP mit $p = 0,003$, non *vs.* PS154+SDF-1α mit $p = 0,01$, non *vs.* PS1058 mit $p = 0,01$, non *vs.* PS3365 mit $p = 0,02$; Abb. 3.42 links).

Bei der *LDV*-Peptid-Experimentreihe zeigten die Kulturen nach 6 Kulturtagen auf den Ober-

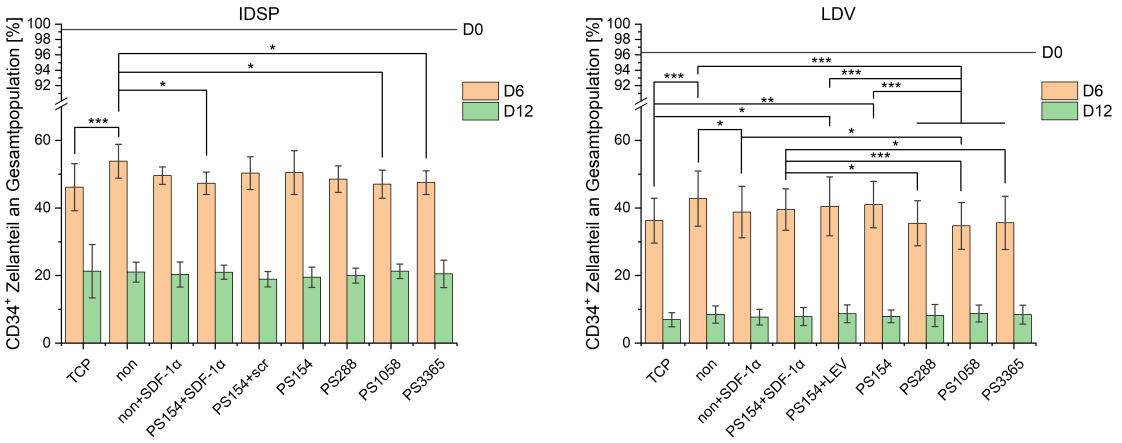


Abbildung 3.42.: Durchflusszytometrische Analyse des Anteils CD34$^+$ Zellen an der Gesamtpopulation nach 6 (D6) bzw. 12 (D12) Kulturtagen auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung unstrukturierter (non) und nanostrukturierter (PS*) Hydrogele mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid oder Kontrollpeptid (scr bzw. LEV), ggf. mit SDF-1α-Beladung. TCP als Vergleich. Mittelwert des CD34$^+$ Zellanteils der Startpopulation als Referenzlinie (D0). Säulen geben Mittelwerte mit SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung an. Auf statistische Signifikanz über Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung geprüft, wobei signifikante Unterschiede nur nach 6 Kulturtagen mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ resultierten.

flächen PS1058 (34,7±6,9%), PS288 (35,5±6,6%), PS3365 (35,6±7,9%) und TCP (36,2±6,6%) die geringsten CD34$^+$ Zellanteile an der Gesamtpopulation (Abb. 3.42 rechts). Der CD34$^+$ Zellanteil war entsprechend zu den höheren CD34$^+$ Zellanteilen wie auf den Oberflächen non (42,8±8,2%; non *vs.* PS1058 mit $p = 1,5 \times 10^{-5}$, non *vs.* PS288 mit $p = 5,3 \times 10^{-5}$, non *vs.* PS3365 mit $p = 6,6 \times 10^{-5}$, non *vs.* TCP mit $p = 2,0 \times 10^{-4}$), PS154 (41,0±6,9%; PS154 *vs.* PS1058 mit $p = 3,0 \times 10^{-4}$, PS154 *vs.* PS288 mit $p = 0,001$, PS154 *vs.* PS3365 mit $p = 0,002$, PS154 *vs.* TCP mit $p = 0,005$), PS154+LEV (40,5±8,7%; PS154+LEV *vs.* PS1058 mit $p = 7,9 \times 10^{-4}$, PS154+LEV *vs.* PS288 mit $p = 0,003$, PS154+LEV *vs.* PS3365 mit $p = 0,004$, PS154+LEV *vs.* TCP mit $p = 0,01$) und PS154+SDF-1α (39,5±6,1%; PS154+SDF-1α *vs.* PS1058 mit $p = 0,004$, PS154+SDF-1α *vs.* PS288 mit $p = 0,02$, PS154+SDF-1α *vs.* PS3365 mit $p = 0,03$) signifikant reduziert (Abb. 3.42 rechts). Nach 12 Kulturtagen waren signifikante Unterschiede im CD34$^+$ Zellanteil zwischen den verschiedenen Oberflächenkulturen bei beiden Peptidfunktionalisierungen nicht mehr vorhanden (Abb. 3.42).

Bezieht man den relativen Anteil CD34$^+$ Zellen auf die in 3.3.4.1 ermittelte Gesamtzellzahl mit ein, dann erhält man die berechnete absolute CD34$^+$ Zellzahl. Diese wurde für alle Expansionskulturen ermittelt. Signifikant verschiedene CD34$^+$ Absolutzellzahlen ergaben sich aber nur für die *LDV*-Peptid-Experimentreihe nach 6 Kulturtagen, was höchstwahrscheinlich durch die geringe Mittelwert-Streubreite der Gesamtzellzahl (Abb. 3.37c) in Kombination mit zahlreichen signifikant unterschiedlichen CD34$^+$ Zellanteilen (siehe oben) bedingt ist. Daher werden in Abb. 3.43 nur die CD34$^+$ Absolutzellzahlen der *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gele nach 6 Kulturtagen gezeigt. TCP und unstrukturierte Gele wiesen hier die höchsten

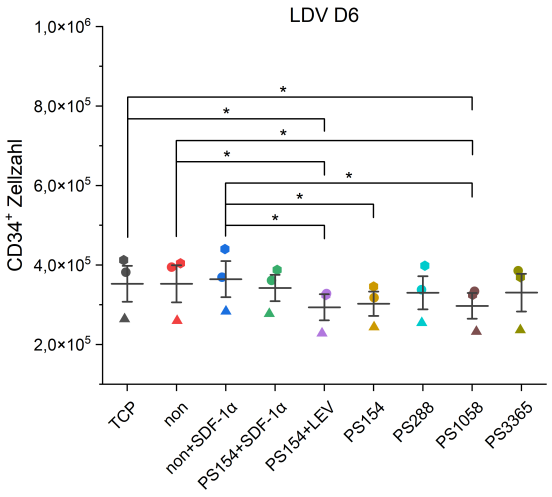


Abbildung 3.43.: Berechnete absolute $CD34^+$ Zellzahl von HSPZ nach 6 Tagen (D6) Kultur auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung unstrukturierter (non) und nanostrukturierter (PS*) Hydrogele mit *LDV*-Peptid oder Kontrollpeptid (LEV), ggf. mit SDF-1α-Beladung. TCP als Vergleich. Mittelwertlinien mit SD aus drei unabhängigen Experimenten, wobei gleiche Symbolgeometrien gleiche Experimente kennzeichnen. Auf statistische Signifikanz über Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen geprüft. * $p < 0,05$

Absolutzellzahlen an $CD34^+$ auf (TCP: $3,53 \times 10^5 \pm 6,4 \times 10^4$; non: $3,53 \times 10^5 \pm 6,6 \times 10^4$; non+SDF-1$\alpha$: $3,64 \times 10^5 \pm 6,4 \times 10^4$), sodass deren $CD34^+$ Absolutzellzahlen signifikant größer waren als die $CD34^+$ Absolutzellzahlen auf der Kontrolloberfläche PS154+LEV ($2,94 \times 10^5 \pm 4,6 \times 10^4$; TCP *vs.* PS154+LEV mit $p = 0,03$, non *vs.* PS154+LEV mit $p = 0,03$, non+SDF-1α *vs.* PS154+LEV mit $p = 0,0008$) und PS1058-nanostrukturierten Oberfläche ($2,97 \times 10^5 \pm 4,6 \times 10^4$; TCP *vs.* PS1058 mit $p = 0,0049$, non *vs.* PS1058 mit $p = 0,047$, non+SDF-1α *vs.* PS058 mit $p = 0,01$; Abb. 3.42). Im weiteren Kulturverlauf expandierten die absoluten $CD34^+$ Zellzahlen, sodass sich bezogen auf die absolute $CD34^+$ Zellzahl an D0 ein Expansionsfaktor von 46,2 (TCP) bis 60,5 (PS288) ergab.

Neben CD34 wurden mithilfe der beiden weiteren Progenitormarker CD38 und CD45RA die vier Subpopulationen $CD34^+CD38^+CD45RA^-$ (CMP/MEP), $CD34^+CD38^+CD45RA^+$ (GMP), $CD34^+CD38^-CD45RA^+$ (CLP), $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ (HSZ bis MPP) bestimmt. Starke donorabhängige Varianzen der relativen Häufigkeiten dieser Subpopulationen konnten bereits bei isolierten $CD34^+$ Zellen festgestellt werden. So wiesen bspw. die frisch isolierten $CD34^+$ HSPZ für die Stammzellsubpopulation $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ eine relative Häufigkeit von 3,13±4,82% auf (Mittelwert±SD, 6 Experimente). Daher wurde eine donorinterne Normierung vorgenommen, wofür zunächst die $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ Zellen als Population mit hohem Stammzellpotential definiert wurden, während $CD34^+CD38^+$ Zellen als Population mit beginnender Differenzierung, sog. determinierte Progenitoren, definiert wurden. Zu jedem einzelnen Analysezeitpunkt erfolgte die Normierung, indem für jedes Experiment und jeder Oberfläche individuell die relative Häufigkeit von $CD34^+CD38^+$ Zellen ($f_{34^+38^+}$) zu der relativen Häufigkeit von $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ ($f_{34^+38^-45RA^-}$) Zellen in Relation gesetzt wurde, um so eine Größe zu erhalten, die im Folgenden als Differenzierungsquotient Q (Formel 3.2) bezeichnet wird.

$$Q = \frac{f_{34^+38^+}}{f_{34^+38^-45RA^-}} \tag{3.2}$$

Der Differenzierungsquotient Q gilt somit als Maßzahl beginnender Differenzierung, indem er die Relation von $CD34^+CD38^+$ zu $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ Zellen angibt.

Um die Differenzierungsquotienten zwischen den Experimenten (Donoren) vergleichen zu können, wurden experimentintern die Differenzierungsquotienten aller Oberflächen auf den Differenzierungsquotienten der Oberfläche PS154+*IDSP* bzw. PS154+*LDV* normiert:

$$Q_{\mathrm{norm},IDSP}(X) = \frac{Q(X)}{Q(\mathrm{PS154}{+}IDSP)} \quad \text{bzw.} \quad Q_{\mathrm{norm},LDV}(X) = \frac{Q(X)}{Q(\mathrm{PS154}{+}LDV)} \tag{3.3}$$

Abb. 3.44a stellt die auf PS154 normalisierten Differenzierungsquotienten aller Oberflächen von drei Experimenten in Abhängigkeit von Peptidfunktionalisierung und Kulturzeit dar. Mithilfe des gepaarten t-Tests zwischen D6 und D12 der *IDSP*-Peptidfunktionalisierung ergab sich ein signifikant erhöhter mittlerer normalisierter Differenzierungsquotient für die Kulturen nach 12 Tagen (IDSP D12: Median=1,16; Mittelwert±SD=1,34±0,51) im Vergleich zu denselben Kulturen nach 6 Tagen (IDSP D6: Median=0,86; Mittelwert±SD=0,87±0,12; $p = 7,2 \times 10^{-5}$; Abb. 3.44a). Dies liegt darin begründet, dass für die *IDSP*-Kulturen nach 6 Tagen die Normierungsoberfläche PS154, die die Oberfläche mit der höchsten *IDSP*-Ligandendichte ohne SDF-1α-Beladung ist, die HSPZ-Kultur mit dem höchsten Differenzierungsgrad war, während nach 12 Kulturtagen diese Normierungsoberfläche den geringsten Differenzierungsgrad kennzeichnet (Abb. 3.44b).

Auch auf *LDV*-Peptid-funktionalisierten Gelen kennzeichnete am Analysetag 6 die Normierungsoberfläche PS154 die Kultur mit dem zweithöchsten Differenzierungsgrad (Abb. 3.44c links). Anders als jedoch bei den *IDSP*-Gelen verblieb nach 12 Tagen Kultur der Differenzierungsgrad der Normierungsoberfläche PS154 im Vergleich zu den anderen Oberflächenkulturen hoch (Abb. 3.44c rechts), sodass im Mittel kein signifikanter Unterschied zum Kulturtag 6 bestand (Abb. 3.44a, LDV D12: Median=0,90; Mittelwert±SD=0,91±0,34; LDV D6: Median=0,88; Mittelwert±SD=0,89±0,14). Daraus resultierte, dass mittels ungepaarten t-Test der normalisierte Differenzierungsquotient Q_{norm} für die Kulturen nach 12 Tagen auf *IDSP*-Gelen signifikant unterschiedlich zu dem auf den *LDV*-Gelen war (Abb. 3.44a, $p = 8,7 \times 10^{-4}$).

Bei genauerem Blick auf den Differenzierungsgrad der HSPZ-Kulturen nach 6 Tagen auf den Oberflächen mit *IDSP*-Peptidfunktionalisierung wird deutlich, dass den geringsten Differenzierungsgrad die PS3365-Kultur zeigte, sodass dieser zum höchsten Differenzierungsgrad der PS154-Kultur auch signifikant erniedrigt war (Abb. 3.44b links). Weitere niedrige Differenzierungsgrade wiesen die non+SDF-1α-Kultur, PS1058- und TCP-Kultur auf. Sowohl die SDF-1α-Beladung der PS154-nanostrukturierten Gele mit *IDSP*-Peptidfunktionalisierung (PS154+SDF-1α) als auch die Funktionalisierung der PS154-Nanostruktur mit dem Kontrollpeptid (PS154+scr) bewirkten eine Verringerung der Differenzierung im Vergleich zu der ausgeprägten Differenzierung auf dem PS154-Gel in gleichem Maße (Abb. 3.44b links).

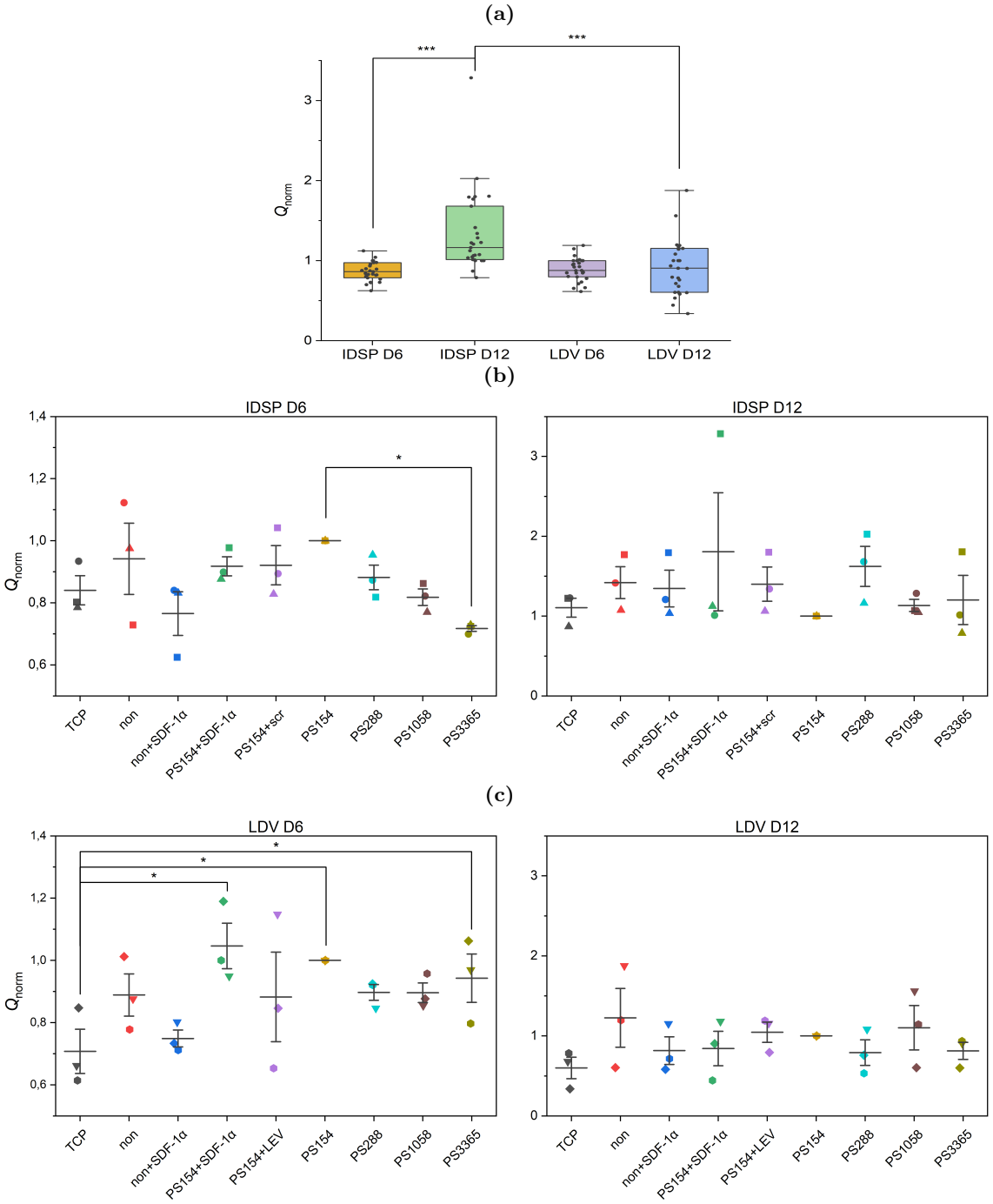


Abbildung 3.44.: Differenzierung von HSPZ nach 6 (D6) bzw. 12 (D12) Kulturtagen auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung unstrukturierter (non) und nanostrukturierter (PS*) Hydrogele mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid oder Kontrollpeptid (scr, LEV), ggf. mit SDF-1α-Beladung. TCP als Vergleich. Dargestellt ist der Differenzierungsquotient Q, der als Relation relativer Häufigkeiten von $CD34^+CD38^+$ zu $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ Zellen definiert ist, und auf den Differenzierungsquotienten der PS154-Oberfläche normiert ist (Q_{norm}). Boxplots aus allen 9 verschiedenen Oberflächen aus drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung, statistische Signifikanz über gepaarten t-Test innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung und über ungepaarten t-Test zwischen verschiedener Peptidfunktionalisierung geprüft (a). Punkt-Intervall-Diagramme mit Mittelwerten±SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung, gleiche Symbolgeometrien kennzeichnen gleiche Experimente; auf statistische Signifikanz über Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung geprüft (b, c). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$

Für die Differenzierungsgrade der HSPZ-Kulturen nach 6 Tagen auf den Oberflächen mit *LDV*-Peptidfunktionalisierung war feststellbar, dass die TCP- und non+SDF-1α-Kultur die geringsten Differenzierungsgrade aufzeigten (Abb. 3.44c links). Nur die im Mittel geringste Differenzierung auf TCP äußerte sich in einer signifikante Erniedrigung im Vergleich zu den im Mittel drei höchsten Differenzierungen auf PS3365, PS154 und PS154+SDF-1α. Die SDF-1α-Beladung der PS154-nanostrukturierten Gele mit *LDV*-Peptidfunktionalisierung (PS154+SDF-1α) bewirkte hier keine erkennbare Änderung des Differenzierungsgrades, während die Funktionalisierung der PS154-Nanostruktur mit dem Kontrollpeptid *LEV* (PS154+LEV) eine Reduktion des Differenzierungsgrades im Vergleich zum Differenzierungsgrad der PS154-Kultur bewirkte. Merkliche Unterschiede hinsichtlich des Differenzierungsgrades nach 12 Kulturtagen war für beide Peptidfunktionalisierungen nicht erkennbar (Abb. 3.44b rechts, 3.44c rechts).

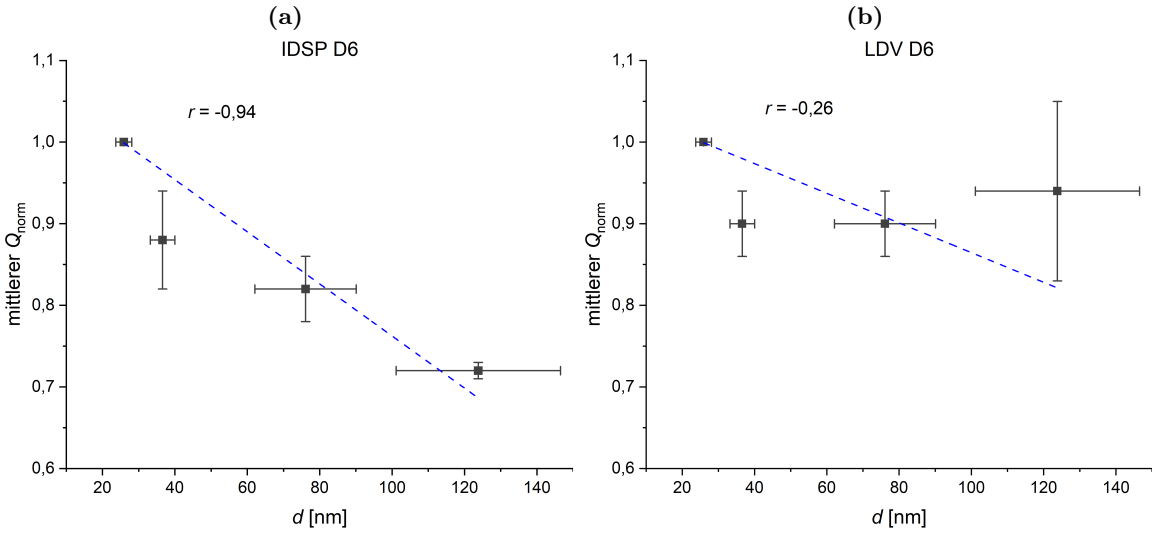


Abbildung 3.45.: Zusammenhang des mittleren normalisierten Differenzierungsquotienten (Q_{norm}) und den mittleren AuNP-Abständen (d) strukturierter Hydrogele. HSPZ wurden für 6 Tage (D6) auf nanostrukturierten Hydrogelen kultiviert, deren Nanostruktur definierte mittlere AuNP-Abstände d besaßen und die mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid funktionalisiert war. Bestimmt wurde der Differenzierungsquotient der HSPZ, der als Relation relativer Häufigkeiten von $CD34^+CD38^+$ zu $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ Zellen definiert ist, und auf den Differenzierungsquotienten der PS154-nanostrukturierten Oberfläche normiert wurde (Q_{norm}). Der mittlere Q_{norm} ist in Abhängigkeit von d und damit der Peptidligandendichte dargestellt. Fehlerbalken stellen die SD von d und Q_{norm} in x- bzw. y-Richtung dar. Die blaue Kurve gibt die lineare Anpassung mit x-Fehler an und zeigt eine negative Korrelation für die *IDSP*-Peptidfunktionalisierung (a) an, jedoch nicht für die *LDV*-Peptidfunktionalisierung (b); Pearson Korrelationskoeffizient r.

Desweiteren wurde überprüft, ob die Variation der Peptidligandendichte auf der Hydrogeloberfläche einen Effekt auf den Differenzierungsgrad der HSPZ-Kultur ausübt. Die Abhängigkeit des normierten Differenzierungsgrades (Q_{norm}) vom Interpartikelabstand (d) der Nanostruktur wird in Abb. 3.45 graphisch dargestellt. Mithilfe einer linearen Anpassungen mit x-Fehler und York-Regression in `OriginPro` konnte eine starke negative Korrelation (Pearson Korrelationskoeffizient $r = -0,94$) zwischen Q_{norm} und d nach 6-tägiger Kultur bei *IDSP*-Peptidfunktionalisierung bestätigt werden (Abb. 3.45a). Je geringer die *IDSP*-Peptiddichte

auf dem Hydrogel war, desto geringer ausgeprägt war auch die Differenzierung von HSPZ nach 6 Kulturtagen. Eine derartige Korrelation konnte für die *LDV*-Peptidfunktionalisierung gleicher mittlerer AuNP-Abstände bezüglich des Differenzierungsgrades der D6 HSPZ-Kultur nicht festgestellt werden (Pearson Korrelationskoeffizient $r = -0,26$; Abb. 3.45b). Gleiches gilt für beide Peptidfunktionalisierungen nach 12-tägiger HSPZ-Kultur.

3.3.5.2. Koloniebildungspotential der HSPZ nach Kultur auf nanostrukturierten Hydrogelen

Das Proliferations- und Differenzierungspotential myeloider Progenitoren in den frisch isolierten $CD34^+$ Zellen (D0) sowie in den für 6 (D6) und 12 (D12) Tage auf den unterschiedlichen Oberflächen expandierten HSPZ wurde mithilfe des CFU-*Assay* (Abschnitt 2.21.2) eruiert. Die manuelle Auszählung der gebildeten Kolonien aus ≈500 ausgesäten Zellen pro Kulturschale erfolgte nach ihrer Morphologie visuell über Lichtmikroskopie. Dabei wurden die Kolonietypen in drei Kategorien eingeteilt: „rote" (BFU-E, Abb. 3.46a, 3.46b), „weiße" (CFU-GM/G/M, Abb. 3.46c, 3.46e, 3.46d) und „gemischte" Kolonien (CFU-GEMM, Abb. 3.46f, 3.46g). Die Koloniegröße ist annähernd proportional zum proliferativen Potential des Progenitors. Das konnte auch in den *CFU* Ansätzen beobachtet werden, wo D0-Ansätze tendenziell größere Kolonien jeden Typs bildeten, D6-Ansätze hingegen bereits kleinere, die bei D12-Kulturen im Ausmaß nochmals geringer ausfielen.

Neben dem reduzierten proliferativen Potential ließ - wie Abb. 3.47 darstellt - das myeloide Differenzierungspotential der Kulturen bei beiden Peptidfunktionalisierungen (*IDSP*- und *LDV*-Peptid) mit der Kulturzeit nach, sodass die Gesamtkoloniezahl der für 6 Tage kultivierten Populationen wesentlich höher lag als die der für 12 Tage kultivierten Populationen. Die Gesamtkoloniezahl beider Peptid-Experimentreihen war für HSPZ nach 6-tägiger Kultur im Vergleich zur Gesamtkoloniezahl ihrer jeweiligen Startpopulation ähnlich oder höher. Die Gesamtkoloniezahl für HSPZ nach 12 Tagen Kontakt mit den jeweiligen Oberflächen lag unterhalb ihrer Startpopulation (D0), wobei diese Reduktion für die *IDSP*-Peptid-Experimentreihe größer war als für die *LDV*-Peptid-Experimentreihe. Das resultierte höchstwahrscheinlich aus der Donorverschiedenheit zwischen beiden Peptid-Experimentreihen und damit dem Umstand, dass für die drei Experimente der *LDV*-Peptid-Experimentreihe die Gesamtkoloniezahl der Startpopulation (53±25) gegenüber der Gesamtkoloniezahl der Startpopulation der *IDSP*-Peptid-Experimentreihe (80±14) wesentlich niedriger war. Dagegen wiesen die nach 12 Tagen kultivierten HSPZ über alle Oberflächen (einschließlich TCP) hinweg sowohl für die *IDSP*- als auch für die *LDV*-Peptid-Experimentreihe ähnliche Gesamtkoloniezahlen auf (*IDSP* D12 ≈40; *LDV* D12 ≈48).

Neben der Gesamtkoloniezahl unterschieden sich auch die Zahl an verschiedenen Kolonietypen sowie die Relationen der Kolonietypen zueinander für die HSPZ nach 12 -tägiger Kultur bei

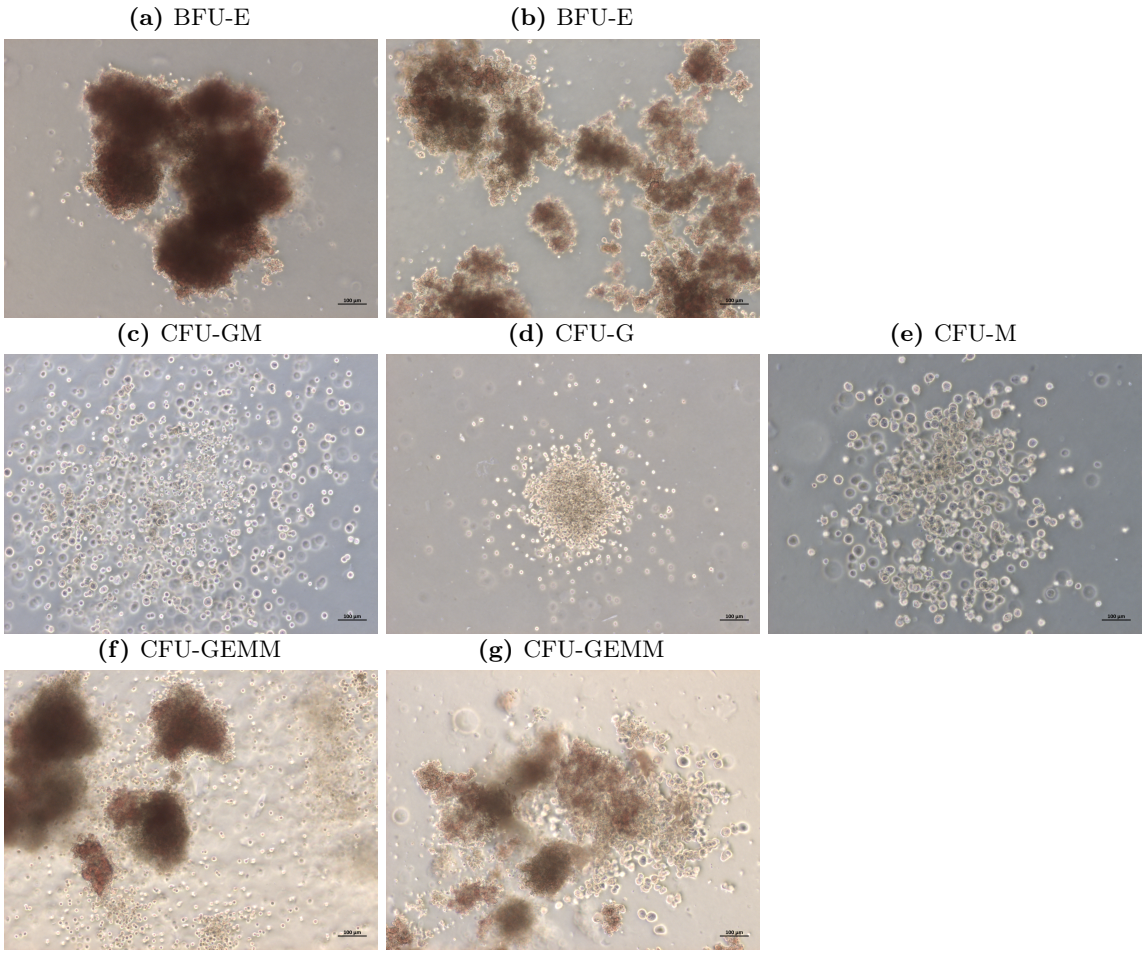


Abbildung 3.46.: Visuelle Einteilung der Kolonietypen des CFU-*Assay* anhand ihrer Morphologie im Lichtmikroskop. Gezeigt sind repräsentative Bilder der unterschiedbaren Kolonietypen 14 Tage nach Aussaat von HSPZ, welche 6 Tage *in vitro* kultiviert wurden. Kolonietypen: *burst-forming unit-erythroid* (BFU-E), *colony-forming unit-granulocyte, macrophage* (CFU-GM), *colony-forming unit-granulocyte* (CFU-G), *colony-forming unit-macrophage* (CFU-M), *colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte* (CFU-GEMM). Maßstab = 100 µm

beiden Peptid-Experimentreihen nicht signifikant (getestet mittels Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung). Dagegen wurden zwischen den verschiedenen Kulturoberflächen signifikante Unterschiede für HSPZ nach 6-tägiger Kultur festgestellt. Für die *IDSP*-Peptid-Experimentreihe nach 6-tägiger Kultur war die CFU-GM/G/M-Koloniebildung der HSPZ auf TCP und dem PS3365-strukturierten Gel im Vergleich zum unstrukturierten SDF-1α-beladenen Gel signifikant erniedrigt (beide $p = 0,01$). Die Mittelwerte mit SD liegen bei 46,1±9,2 (TCP), 46,8±10,6 (PS3365) und 61,1±11,4 (non+SDF-1α). Die Relationen der Kolonietypen zueinander blieben davon unberührt.

Für die *LDV*-Peptid-Experimentreihe nach 6-tägiger Kultur war innerhalb der Gruppe SDF-1α-beladener Gele ebenfalls die CFU-GM/G/M-Koloniebildung der HSPZ auf dem unstrukturierten SDF-1α-beladenen Gel im Vergleich zu der CFU-GM/G/M-Koloniebildung

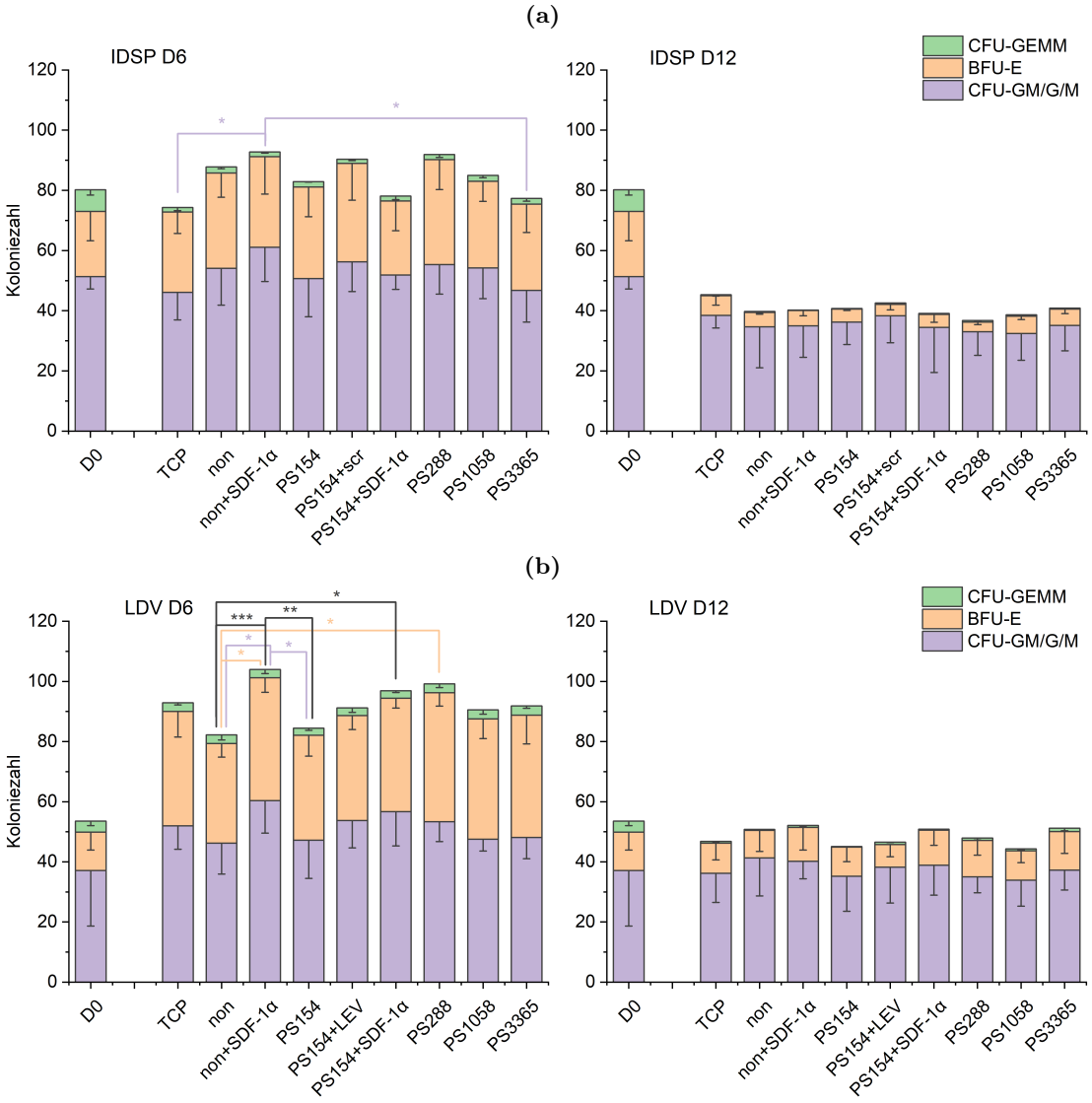


Abbildung 3.47.: Auswertung des CFU-*Assay* zur Ermittlung des myeloiden Koloniebildungspotentials von frisch isolierten CD34$^+$ Zellen (D0) sowie von HSPZ nach 6 (D6) und 12 (D12) Tagen *in vitro* Kultur auf definierten Oberflächen. Oberfächenfunktionalisierung unstrukturierter (non) sowie nanostrukturierter (PS*) Hydrogele mit *IDSP*- bzw. *LDV*-Peptid oder mit Kontrollpeptid (scr, LEV), ggf. mit SDF-1α-Beladung. TCP als Vergleich. Angegeben sind die Absolutwerte gezählter Kolonietypen (BFU-E; CFU-GM/G/M; CFU-GEMM) als gestapelte Säulen, die in der Summe die Gesamtkoloniezahl anzeigen, bei gleicher Einsaatzellzahl pro Bedingung. Mittelwerte mit SD aus jeweils drei unabhängigen Experimenten pro Peptidfunktionalisierung. Auf statistische Signifikanz über Tukey-Test einer einfachen ANOVA mit wiederholten Messungen innerhalb gleicher Peptidfunktionalisierung geprüft, wobei die signifikanten Unterschiede in Gesamtkoloniezahl (schwarz), Anzahl CFU-GM/G/M (lila), und Anzahl BFU-E (hellrot) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ angezeigt sind. *colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte* (CFU-GEMM); *burst-forming unit-erythroid* (BFU-E); *colony-forming unit-granulocyte, macrophage* (CFU-GM), *-granulocyte* (CFU-G), *-macrophage* (CFU-M)

der HSPZ auf unstrukturierten unbeladenen und PS154-strukturierten Gelen signifikant erhöht ($p = 0,02$, $p = 0,03$). Hierbei betrugen die Mittelwerte mit SD 60,3±10,8 (non+SDF-1α), 46,2±10,3 (non) und 47,2±12,7 (PS154). Außerdem war die BFU-E-Koloniebildung der HSPZ auf dem unstrukturierten Gel gegenüber der BFU-E-Koloniebildung der HSPZ auf dem PS288-strukturierten Gel in der Gruppe der nanostrukturierten Gele sowie gegenüber der BFU-E-Koloniebildung der HSPZ auf dem unstrukturierten SDF-1α-beladenen Gel in der Gruppe der SDF-1α-beladenen Gele signifikant erniedrigt ($p = 0,02$, $p = 0,04$). Die Mittelwerte mit SD betrugen 33,1±4,5 (non), 42,9±4,4 (PS288) und 40,9±4,8 (non+SDF-1α). Trotz der signifikanten Unterschiede in der Anzahl eines Kolonietypen blieben auch hier die Relationen der Koloniezahl der Typen zueinander davon unberührt. In Bezug auf die Gesamtkoloniezahl fiel innerhalb der Gruppe SDF-1α-beladener Gele die signifikante Erhöhung von unstrukturiertem+SDF-1α-beladenem Gel und PS154-strukturiertem+SDF-1α-beladenem Gel im Vergleich mit dem unstrukturierten unbeladenen Gel auf ($p = 0,004$, $p = 0,04$) sowie die signifikante Erhöhung von unstrukturiertem+SDF-1α-beladenem Gel im Vergleich mit dem PS154-strukturierten Gel ($p = 0,007$). Die Mittelwerte mit SD betrugen hierbei 104,0±9,7 (non+SDF-1α), 96,9±9,0 (PS154+SDF-1α), 82,2±10,9 (non) und 84,4±11,4 (PS154).

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, ein multifunktionales Zellkultursubstrat auf Hydrogelbasis für HSPZ zu entwickeln und es hinsichtlich seiner verschiedenen Funktionalitäten - einzeln und im Zusammenspiel - in Wechselwirkung mit HSPZ zu testen. Dazu werden als erstes die kennzeichnenden Merkmale des Biohybridhydrogels beschrieben und diskutiert. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse der Zellversuche in Bezug auf Zellpolarisation, Zellmotilität, Proliferation und Differenzierung der HSPZ interpretiert und in den Literaturkontext gesetzt.

4.1. Die multiplen Funktionalitäten des Biohybridhydrogels

Um das HSPZ-Verhalten in der physiologischen Nische besser zu verstehen, werden für die *in vitro* Kultur Substrate benötigt, die verschiedene Eigenschaften der physiologischen Nische wiedergeben können. Mithilfe einer zweidimensionalen Zellkulturplattform auf Hydrogelbasis sollten in dieser Arbeit elementare Funktionalitäten der physiologischen HSZ-Nische nachgebildet werden. Dazu wurde ein Gelsystem entwickelt, dessen Matrixelastizität, Bindungseigenschaft von Zytokinen und Präsentation von Nanostrukturen derjenigen der Knochenmarksnische angepasst werden kann.

Konventionelle zweidimensionale Zellkultursubstrate für die Kultur von hämatopoetischen Zellen beschränken sich vorrangig auf Beschichtungen der Standardkulturgefäße und Oberflächen aus Glas und Plastik mit Biomolekülen oder dünnen Polymerfilmen mit funktionellen Gruppen zur Biofunktionalisierung (Madihally et al., 1999; Sagar et al., 2006; Jiang et al., 2006; Franke et al., 2007; Chen et al., 2012; Winkler et al., 2017a; Loeffler et al., 2018; Chen et al., 2018). Die damit einhergehende Einschränkung der Matrixsteifigkeiten jenseits physiologischer Werte versucht man mit dem Einsatz von Hydrogelen zu begegnen. Dabei werden bevorzugt Hydrogele für eine Oberflächenfunktionalisierung benutzt, die eine zellinerte, proteinabweisende Matrix wie z. B. PEG (Lee-Thedieck et al., 2012; Blakney et al., 2012), Poly(acrylamid) (Choi und Harley, 2012, 2017), Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) (Gralla-Koser, 2018), Poly(vinylalkohol-*co*-itaconsäure) (Kumar et al., 2013; Muduli et al., 2017) oder elektrisch neutrale zwitterionische Polyelektrolyte (Bai et al., 2019) zur Basis haben.

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit ein Hydrogel auf PEG-Heparin-Basis gewählt, das proteinaffin und somit in der Lage ist, lösliche Biomoleküle zu binden. Desweiteren ist durch

oberflächliche AuNP-Array-Anbindung die Biofunktionalisierbarkeit mit präzisen Abständen im Nanometerberich möglich. Nachfolgend werden die daraus resultierenden funktionalen Eigenschaften im Vergleich - sofern möglich - zur physiologischen Nische und zu anderen Gelsystemen diskutiert.

4.1.1. Elastizität der Hydrogelmatrix

Physikalische Kräfte haben Einfluss auf Selbsterneuerung und Differenzierung einer Stammzelle (Vining und Mooney, 2017). Die biomechanischen Eigenschaften innerhalb der Knochenmarksnische sind mit den histologischen Strukturen wie innere Knochenoberfläche, Blutgefäße und dem Grundgewebe (retikulärem Bindegewebe) verbunden und variieren in unterschiedlicher Ausprägung. Daher wurde für das Gelsystem eine Hydrogelmatrix gewählt, dessen Matrixelastizität einstellbar ist. Solch eine Einstellbarkeit der Gelsteifigkeit kann mit Gelen aus sternförmigem PEG (sPEG) und Heparin sehr gut realisiert werden (Freudenberg et al., 2016, und Referenzen darin). Freudenberg et al. (2009) entwickelten derartige Biohybridgele durch Vernetzung der Aminoendgruppen von 4-armigem sPEG mit den EDC/Sulfo-NHS-aktivierten Carboxylgruppen des Heparins. Durch Konstanthalten des Heparingehaltes und Variation der eingesetzten Menge sPEG erzielten sie systematisch variierende Vernetzungsgrade, die unterschiedliche physikalische Eigenschaften in Form von Speichermodul, Permeabilität und Schwellungsgrad mit sich brachten, wogegen die biomolekulare Zusammensetzung (Heparin) invariant blieb (Freudenberg et al., 2009). Neben der Variation des molaren Verhältnisses sPEG:Heparin kann durch Abwandlung des Molekulargewichtes beider Komponenten die Maschenweite des Netzwerks, Steifigkeit und Schwellung weiter justiert werden (Welzel et al., 2011). Anders als bei den bisher genannten sPEG-Heparin-Gelen erfolgte in dieser Arbeit die Vernetzungsreaktion über *Click*-Chemie von sPEGthiol und HM. Da diese schnell, spezifisch und unter „zellfreundlichen" Bedingungen im wässrigen Milieu abläuft, wurde sie auch schon zur *in situ*-Einbettung von Zellen, wie z. B. humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) (Tsurkan et al., 2013) oder humane $CD34^+$ Zellen des peripheren Blutes (Gvaramia et al., 2017), für die dreidimensionale Kultur verwendet.

Die mechanischen Eigenschaften des Biohybridhydrogelkörpers dieser Arbeit wurden maßgeblich vom Maleimidfunktionalisierungsgrad - im Mittel 4,9±0,3 Maleimidgruppen pro Heparinmolekül - bestimmt, da sich danach die Ausbildung möglicher Bindungen mit 4-armigem sPEGthiol richtete. Auspolymerisierte und geschwollene Gele mit einem initialen Feststoffgehalt (HM+sPEGthiol in Präpolymerlösung) von rund 5% wiesen einen mittels Kompressionstest berechneten E-Modul von 23,6±1,6 kPa nach Sterilisierung mit 80% EtOH auf. Der E-Modul der sterilisierten Gele stellt eine mechanische Eigenschaft des Hydrogelkörpers dar, die auch in der *in vivo* Knochenmarksnische im Bereich zwischen Knochenmark (≈0,1 kPa) und innerer Knochenoberfläche (2–100 kPa) anzutreffen ist (Ivanovska et al., 2017).

Der E-Modul der Hydrogelmatrix ist am ehesten mit dem mittels AFM ermittelten Belastungsverhalten von *in vitro* sezernierter Osteoidmatrix kultivierter humaner Osteoblasten vergleichbar, das bei einer Dicke von 350±100 nm ein E_{osteoid} ≈27±10 kPa zeigte (Engler et al., 2006). Damit entspricht der E-Modul des Hydrogels dem physiologischen E-Modul des Knochenmarks im Bereich der osteoblastenreichen endostalen Zone.

Das HSPZ-Verhalten auf Hydrogelen in einem annähernd vergleichbaren Elastizitätsbereich zeigt, dass die Zellmorphologie eng mit der Matrixsteifigkeit verbunden ist. Choi und Harley (2012) kultivierten für 24 h murine $\text{Lin}^-\text{Kit}^+\text{Sca-1}^+$ Zellen auf zweidimensionalen Poly(acrylamid)-Gelen mit Kollagen Typ I-Beschichtung. Zellen auf Gelen mit einem E-Modul von 0,71–8,95 kPa wiesen bei gleichartiger Viabilität eine signifikant kleinere Zellfläche und eine geringere zytoskelettale Dichte (F-Aktin) auf als auf 196 kPa Gelen. Inwieweit dabei die Zellmorphologie auf eine Interaktion über den Kollagen Typ I-spezifischen Integrinrezeptor $\alpha_2\beta_1$ beruht, ist fraglich, da andere Untersuchungen von humanen CD34^+ Zellen widerum keine signifikante Adhäsion zu Kollagen Typ I feststellten (Franke et al., 2007; Shin et al., 2014a).

In einer weitergehenden Studie mit Kollagen Typ I, Fibronektin oder Laminin-beschichteten Poly(acrylamid)-Gelen verglichen Choi und Harley (2017) die Zellmorphologie muriner $\text{Lin}^-\text{Kit}^+\text{Sca-1}^+$ Zellen auf „steifen" 44 kPa und „weichen" 3,7 kPa Gelen (E-Modul). Auf den 44 kPa Gelen war die Polarisierung und Zellfläche im Vergleich zu den rundlich erscheinenden Zellen auf 3,7 kPa Gelen erhöht. Während sich die Proliferation nach 24 h Kultur unabhängig von der Substratsteifigkeit zeigte, erhielten die steiferen Fibronektin-beschichteten Gele signifikant mehr multipotente myeloide Progenitoren (CFU-GEMM) im Vergleich zu den weicheren Fibronektin-beschichteten Gelen (Choi und Harley, 2017). Dieser Effekt wurde aufgehoben, wenn der 24 h Kultur ein Myosin II-Inhibitor (Blebbistatin), ein *Rho-associated protein kinase* (ROCK)-Inhibitor (Y-27632) oder Antikörper gegen Integrin $\alpha_5\beta_1$ bzw. $\alpha_\text{v}\beta_3$ zugesetzt wurden, was auf die Rolle der Integrinaktivierung und Aktomyosin-Kontraktilität zur Rezeption der Steifigkeit und Modulation früher HSZ-Entwicklungsspezifikation hindeutet. Die in dieser Arbeit verwendeten Biohybridhydrogele befinden sich mit ihrem E-Modul von ≈24 kPa ziemlich genau in der Mitte zwischen dem von Choi und Harley (2017) untersuchten Steifigkeitsbereich. Da die Oberfläche mit Liganden funktionalisiert wurde, die ebenfalls Integrinrezeptoren ansprechen, ist eine interaktionsbasierte Differenzierungsdetermination der HSPZ erwartbar.

Auch die Expansion von HSPZ wurden in Abhängigkeit von der Matrixsteifigkeit in Studien untersucht. Für die 10-tägige *ex vivo* Expansion von $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ Zellen aus Nabelschnurblut auf zweidimensionalen Poly(vinylalkohol-*co*-itaconsäure) Hydrogelen in Kombination mit CS1-Oligopeptidfunktionalisierung eigneten sich solche mit einem Speichermodul von 12,2 kPa besonders (Kumar et al., 2013). Auch wenn im Vergleich dazu Gele mit einem

Speichermodul von 10,3 kPa und 3,7 kPa die Expansion in geringerem Maße förderten, war der Expansionsfaktor gegenüber den unfunktionalisierten Gelen gleicher Steifigkeit signifikant gesteigert. In der vorliegenden Arbeit beträgt der Speichermodul G' sterilisierter Biohybridgele ≈7,3 kPa. Da er innerhalb des zuvor genannten Steifigkeitsbereiches liegt und die Gele u. a. mit *LDV*-Peptid (Minimalsequenz im CS1-Peptid) funktionalisiert wurden, sind Unterschiede zwischen funktionalisiertem und unfunktionalisiertem Gel durchaus denkbar.
Gvaramia et al. (2017) nutzten sPEG-Heparin-Gele mit den Speichermoduln von rund 0,5 kPa, 1,5 kPa und 3 kPa für eine 7-tägige Kultur humaner $CD34^+$ Zellen aus dem peripheren Blut. Auf den verschieden steifen zweidimensionalen Gelen wurde kein signifikanter Unterschied in der Proliferation, präziser der Expansion der Gesamtzellzahl, festgestellt. Dagegen war die Proliferation in dreidimensionalen Gelen bei gleicher Viabilität antiproprtional zur Gelsteifigkeit. Dabei war die Proliferation in den weichesten (G' ≈0,5 kPa) dreidimensionalen Gelen im Vergleich zu der auf den zweidimensionalen Gelen bereits eingeschränkt. Diese mit der Steifigkeit zunehmend reduzierte Proliferation in der dreidimensionalen Kultur war zugleich korreliert mit einem erhöhten Anteil zellzyklusruhender Zellen und damit erhöhtem Anteil $CD34^+$ Zellen sowie *long-term culture initiating cells* (LTC-IC) (Gvaramia et al., 2017). Dieses HSPZ-Verhalten war begründet durch erhöhte räumliche Restriktion, die eine erhöhte Steifigkeit in der dreidimensionalen Matrix mit sich bringt. Solch eine steifigkeitsabhängige Restriktion des Proliferationsverhaltens von HSPZ ist daher für die in dieser Arbeit durchgeführte zweidimensionale Kultur von HSPZ nicht zu erwarten. Da die in dieser Arbeit genutzten Biohybridgele eine sehr ähnliche biochemische Matrixzusammensetzung, aber eine wesentlich höhere Steifigkeit (G' ≈7,3 kPa) besitzten, bleibt der biomechanische Einfluss der Matrix auf HSPZ unabschätzbar. Schließlich wurde in dieser Arbeit keine Steifigkeitsvariation der Matrix untersucht, sondern vorrangig der Einfluss der Ligandendichte auf das HSPZ-Verhalten auf Basis einer einheitlichen, der Knochenmarksmatrix entsprechenden Steifigkeit.

Interessanterweise konnte über die mikrorheologische Untersuchung des Gels eine lokale Elastizität von $G_{0,\mathrm{MPT}}$ 9,0±3,6 Pa bestimmt werden, die um den Faktor ≈600 kleiner ist als der makrorheologisch bestimmte Schermodul (G^*=5,3±2,5 kPa). Solch eine Diskrepanz ist auch von anderen Gelsystemen bekannt (Pawelzyk et al., 2014; Oelschlaeger et al., 2016; Roether et al., 2018). Eine Hypothese dafür war, dass Kettensegmente der Polymere bei Vernetzung gestreckt und außerhalb ihres Lösungsgleichgewichtes vorlagen. Dieses lokalisierte Fehlen von elastischen Rückstellkräften war über die Tracerpartikel nicht beprobbar, trägt aber zur makrorheologisch bestimmten Elastizität bei. Unabhängig von einer Erklärung des Unterschiedes der makro- and mikrorheologischen Resultate um mehrere Größenordnungen, ist der lokale Modul $G_{0,\mathrm{MPT}}$ vermutlich die relevantere physikalische Größe, die eine Zelle als strukturelle und mechanische Eigenschaften ihrer Umgebung erfährt.

4.1.2. Bindung und Freisetzung von Zytokinen

Die Biohybridhydrogele besitzen durch Heparin als Matrixkomponente eine Zytokin-bindende Eigenschaft. Diese wurde in der Arbeit gezielt genutzt, um SDF-1α zu immobilisieren und über die Kulturdauer hinweg eine fortwährende Verfügbarkeit an der Geloberfläche und in der Lösung zu gewährleisten. SDF-1 reguliert verschiedene Schlüsselfunktionen der HSPZ, darunter die chemotaktische Mobilisierung über Blutgefäße in die Knochenmarksnische und die Aufrechterhaltung des HSPZ-Reservoirs (Lévesque et al., 2003; Sugiyama et al., 2006; Tzeng et al., 2011; Greenbaum et al., 2013; Zhang et al., 2016; Crane et al., 2017).

Heparin weist durch seinen hohen Sulfatierungsgrad innerhalb der Molekülkette vielfach negative Ladungen auf, die die Bindung von SDF-1α über positiv geladene Aminosäurereste (SDF-1α besitzt eine positive Gesamtladung von +8, Amara et al., 1999) - speziell über das in der Einleitung dargestellte Heparin-bindende Motiv BBXB (B=basische Aminosäure) ermöglichen und die SDF-1α-Dimerisierung am Heparinmolekül fördern (Sadir et al., 2001; Fermas et al., 2008). Die elektrostatischen Interaktionen sind die treibende Kraft für eine schnelle Immobilisation des SDF-1α-Moleküls aus der Lösung an die Heparingelmatrix. Wie schnell und effizient dieser Bindungsprozess ablaufen kann, haben Prokoph et al. (2012) durch die Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoff-markiertem SDF-1α (5 µg/ml) aus dem Überstand in oberflächengebundene sPEG-Heparin-Gele visualisiert. Gele mit einer Schichtdicke von ca. 50 µm zeigten bereits nach 1 min eine homogene Penetration des Moleküls im gesamten Gel. Verschiedene Beladungskonzentrationen (2,5–15 µg/ml) resultierten in einer linearen Korrelation zwischen verwendeter SDF-1α-Konzentration und matrixgebundener Menge SDF-1α (Prokoph et al., 2012). Die Effizienz der Bindung von SDF-1α aus der Lösung an die Gelmatrix konnte auch bei den Biohybridhydrogelen dieser Arbeit beobachtet werden, die bei einer Geldicke von ≈800 µm und unabhängig von der Inkubationskonzentration (30, 60 oder 90 µg/ml) ca. 99,9% der verfügbaren Masse an SDF-1α aufgenommen hatten. Dabei wurde selbst bei den verhältnismäßig hohen eingesetzten Konzentrationen eine Sättigung der Gele nicht erreicht. Prokoph et al. (2012) wiesen eine vergleichbar hohe Immobilisationseffizienz von ≈99,6% unabhängig von der SDF-1α-Inkubationskonzentration aus.

Diese Beobachtungen reflektieren die hohe Affinität von SDF-1α zu Heparin (K_d=27,7 nM) (Sadir et al., 2001) sowie die enorme Bindungskapazität von Heparin, das als einzelnes Molekül von 9 kDa bis zu 6 SDF-1α-Moleküle aufnehmen kann (Sadir et al., 2001). Vorraussetzung für die effiziente SDF-1α-Aufnahme in das Gel ist, dass es keine sterischen Beschränkungen beim Eindringen gibt. Dies war für die sterilisierten Biohybridhydrogele mit einer Maschenweite von ca. 8,4 nm und auch für die Gele von Prokoph et al. (2012) mit 6,5 nm gegeben, sodass SDF-1α (8 kDa, Durchmesser ≈5 nm; Crump et al., 1997) in den Gelkörper diffundieren konnte. Nicht nur die Bindung, sondern auch die Freigabe von SDF-1α in eine überstehende Lösung ist auf diesem Weg möglich. Für die Biohybridhydrogele stieg die abgegebene Menge SDF-1α

systematisch mit der beladenen Menge SDF-1α. Dieses Freisetzungsverhalten beschrieben auch Prokoph et al. (2012). Allerdings war die relative Abgabe nach 7 Tagen mit 2,4% (Prokoph et al., 2012) im Vergleich zu 0,02% der hier untersuchten Biohybridhydrogele um einen Faktor von ca. 100 wesentlich höher. Dies ist erklärbar durch die Kombination aus einem mindestens 16-fachen Geldickenunterschied und einem etwa 110-fachen Unterschied des Heparingehalts (bei gleichem Molekulargewicht des Heparins) zwischen beiden Untersuchungen.

Neben SDF-1α können die negativ geladenen *N*- und *O*-sulfatierten Gruppen des Heparins auch mit den positiv geladenen basischen Aminosäureresten anderer Zytokine elektrostatisch interagieren, z. B. mit Wachstumsfaktoren wie *Fibroblast growth factor-2* (Faham et al., 1996; Zieris et al., 2010) und *Vascular endothelial growth factor* (Ono et al., 1999; Zieris et al., 2010), aber auch mit den frühwirkenden hämatopoetischen Zytokinen TPO, SCF und Flt3L (Kishimoto et al., 2009; Müller et al., 2016). Für TPO, SCF und Flt3L konnten Müller et al. (2017) mittels Beladung von sPEG-Heparin-Gelen mit diesen drei Zytokinen eine dem SDF-1α vergleichbare Bindungs- und Freisetzungskinetik darstellen. Die Aufnahme war quantitativ und die über 7 Tage beobachtete, kontinuierliche Freisetzung war unabhängig von der Inkubationskonzentration und unabhängig vom jeweiligen Zytokin (Müller et al., 2017). Die getesteten Gele besaßen ein Speichermodul von $G' \approx$8,7 kPa und damit eine ähnliche berechnete Maschenweite von $\approx$8 nm wie die in dieser Arbeit verwendeten Biohybridhydrogele ($G' \approx$7,3 kPa; Maschenweite$\approx$8,4 nm). Da dem Kulturmedium in dieser Arbeit ebenfalls die frühwirkenden Zytokine TPO, SCF und Flt3L, sowie IL-3 zugesetzt wurden, ist davon auszugehen, dass neben SDF-1α auch diese hämatopoetischen Zytokine in der Matrix immobilisiert und dann wieder aus dem Reservoir kontinuierlich ins Medium abgegeben wurden.

Die Biohybridhydrogele dieser Arbeit zeichnen sich durch ein hohes Bindungsvermögen für SDF-1α aus, sodass Gele vor Zellkultureinsatz mit einem Reservoir an SDF-1α beladen werden konnten und das Chemokin für eine längere Kulturdauer (hier für bis zu 2 Wochen getestet) kontinuierlich bereitgestellt wurde, was einem Verlust durch Proteinhydrolyse, z. B. durch die Spaltung von SDF-1α an der Zelloberfläche über die membrangebundene Form der Dipeptidylpeptidase IV (CD26/DPP IV, Proost et al., 1998; Sadri et al., 2022), entgegenwirken sollte. Darüber hinaus ist es auch aus folgendem Grund wahrscheinlich, dass die Bioaktivität des SDF-1α über diesen Zeitraum erhalten blieb. Proteine, welche größer als die Dimension der Maschenweite sind, können das Gelnetzwerk nicht durchdringen. Das hat den Vorteil, dass der SDF-1α-Abbau durch Proteasen, wie bspw. Matrix-Metalloproteinase-2 (72 kDa; McQuibban et al., 2001; Peng et al., 2012), die auch HSPZ sezernieren (Janowska-Wieczorek, 2000; Saw et al., 2019), durch die Gelstruktur verhindert wird und das Gel so zum Erhalt der biologischen Aktivität von SDF-1α beiträgt.

Die Konzentration von SDF-1 in der physiologischen Nische - gemessen im Knochenmarkaspirat gesunder Proband:innen - beträgt ungefähr 95$\pm$30 ng/ml (Petit et al., 2002). Die in

dieser Arbeit charakterisierten Biohybridgele für Zellkulturanwendungen gaben nach 14 Tagen kumulativ etwa 5–8 ng/ml ins Medium ab. Das Hydrogel als SDF-1α-Reservoir mit wesentlich höherer Konzentration im Vergleich zum Medium stellt sicher, dass nach Bedarf SDF-1α aus der Matrix mobilisiert und in Richtung einer physiologischen Konzentration angeglichen werden kann. Auf diese Weise konnte in den Experimenten der HSPZ-Kultur permanent SDF-1α präsentiert werden - sowohl löslich über Abgabe ins überstehende Medium als auch gebunden an der Geloberfläche.

4.1.3. Nanostrukturierung zur präzisen Anbindung von Integrin $\alpha_4\beta_1$ Liganden

Zusätzlich zu der ungeordneten oberflächlichen Bindung von SDF-1α und Freisetzung über die Hydrogelmatrix wurden den HSPZ immobilisierte Integrin $\alpha_4\beta_1$ Peptidliganden in regelmäßiger Anordnung präsentiert. Für die oberflächliche Nanostrukturierung der Hydrogele konnten AuNP-Arrays auf Glasträgern mit signifikant unterschiedlichem Partikelabstand d von 25,7±1,2 nm (PS154), 37,0±2,6 nm (PS288), 77,7±8,4 nm (PS1058) und 124,3±14,5 nm (PS3365) in quasi-hexagonaler Anordnung generiert werden. Der Transfer der AuNP-Arrays von den Glasträgern auf die Hydrogeloberfläche erfolgte simultan mit der Gelmatrixbildung. Über stromlose Abscheidung elementaren Goldes an AuNP konnte der Übertrag des AuNP-Arrays an Gelen im geschwollenen Zustand nachgewiesen werden. REM-Bildgebung sowie ToF-SIMS-Analyse von getrockneten Gelen konnte gleichfalls die Goldbindung an die Geloberfläche bestätigen. Die eindimensionale Längenzunahme durch Schwellung ist in Relation zur Varianz mittlerer Interpartikelabstände der AuNP-Arrays vernachlässigbar klein, sodass die bestimmte Partikeldichte der Arrays in Näherung der auf der Hydrogeloberfläche entspricht. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass durch das Ab- und wieder Anschwellen während des Sterilisationsprozesses die AuNP-Verteilung auf der Hydrogeloberfläche nicht massiv beeinträchtigt wird.

Da die BCML-Technik auf anorganische Träger limitiert ist, ist eine Anwendung der damit generierten Nanostruktur auf flexible, polymerbasierte Materialien automatisch mit einem Transfer verbunden. Für eine Nanostrukturierung von Polymeren wie PS, Polydimethylsiloxan oder PEG-Diacrylat bedeutet dies, dass der Nanopartikelarray mit einem geeigneten Linkermolekül inkubiert wird, ehe die Polymerlösung aufgegossen wird (Graeter et al., 2007; Lohmüller et al., 2011; Guasch et al., 2016). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit durch sPEGthiol als Bestandteil der Präpolymerlösung auf einen Linker verzichtet werden. Der Nanopartikeltransfer von ridigen Trägern auf polymere Hydrogele während deren Polymerisation wurde bisher vielfach angewandt und umfasst neben Poly(acrylamid)- (Oria et al., 2017) und Poly(N-acryloylglycinamid)- (Deng et al., 2017) überwiegend PEG-Diacrylat-Gele (Graeter et al., 2007; Aydin et al., 2010; Platzman et al., 2013; Guasch et al., 2016; Muth et al., 2013; Winkler

et al., 2017b; Kratzer et al., 2019). So konnten nanostrukturierte PEG-Diacrylat-Gele mit einem variablen E-Modul über vier Größenordnungen hinweg ($E_{\mathrm{PEG35000-DA}}$ =0,6 kPa≤ $E \leq$ 6 MPa=$E_{\mathrm{PEG700-DA}}$) geschaffen werden (Lohmüller et al., 2011). Die bisher etablierten nanostrukturierten Hydrogele bestehen bewusst aus einer zellinerten, proteinabweisenden Matrix, um Zellen allein über die Biofunktionalisierung der Nanostruktur Liganden in kontrollierten Abständen anbieten zu können. Das wurde praktisch umgesetzt durch Funktionalisierung mit cRGD, um dessen Ligandendichteeinfluss auf adhärente und semi-adhärente Zelllinien zu beschreiben (Aydin et al., 2010; Platzman et al., 2013; Guasch et al., 2016; Oria et al., 2017; Deng et al., 2017). Dabei wurden Partikelabstände von ≈22 nm (Platzman et al., 2013) bis ≈200 nm (Oria et al., 2017) untersucht und in Abhängigkeit von der Matrixelastizität Limits für eine effektive Adhäsion definiert. Auf cRGD-nanostrukturierten PEG700-Diacrylat-Gelen (E =70 kPa–1,25 MPa) wiesen semi-adhärente KG-1a Zellen ein adhäsives Limit bei ≈40 nm Partikelabstand, adhärente Fibroblastenzellen REF52 dagegen bei ≈110 nm auf (Platzman et al., 2013). Diese Anwendung erweiternd wurden bifunktionale Gele entwickelt, die die adhäsive RGD-Sequenz nun innerhalb der PEG700-Diacrylat-Matrix und eine Dll1-nanostrukturierte Oberfläche besaßen, um vorrangig den Einfluss der Dll1-Dichte auf Proliferation, Expansion oder Differenzierung der humaner $CD34^+$ HSPZ zu erforschen (Winkler et al., 2017b; Kratzer et al., 2019). Diese vorausgegangenen Studien zur HSPZ-Kultur auf nanostrukturierten Hydrogelen bildeten die Grundlage für das hier entwickelte Gelsystem. Die Nanostruktur wurden in dieser Arbeit auf eine biohybride Gelmatrix übertragen, welche durch ihre intrinsische Fähigkeit, reversibel Zytokine zu binden, die bisherigen Gelsysteme um eine Funktionalität erweitert hat.

Der Durchmesser der AuNP ist in grober Näherung 10 nm und kann nach Peptidligandenfunktionalisierung aus sterischen Gründen theoretisch von nur einem Integrinrezeptor (Durchmesser 8–12 nm; Erb et al., 1997; Xiong et al., 2001, 2002) gebunden werden. So gibt die AuNP-Dichte an der Hydrogeloberfläche die maximale Integrinrezeptordichte vor, die hämatopoetische Zellen lokal in ihrer Zellmembran ausbilden können. Ein für Integrincluster permissiver Interpartikelabstand wurde bisher mithilfe von cRGD-funktionalisierten AuNP-Arrays mit proteinabweisenden, rigiden (E ≥6 MPa) Oberflächen ermittelt. Speziell für die Adhäsion hämatopoetischer Zellen wurde eine kritische Interpartikeldistanz von ≈32 nm (Altrock et al., 2012) auf cRGD-nanostrukturierten, PEG-passivierten Glassubstraten bzw. <45 nm (Muth et al., 2013) auf cRGD-nanostrukturierten PEG700-Diacrylat-Gelen festgestellt. Da RGD das Bindemotiv für Integrin $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_{\mathrm{v}}\beta_3$ ist, in dieser Arbeit jedoch die AuNP-Funktionalisierung mit Integrin $\alpha_4\beta_1$ Peptidliganden vorgenommen wurde, wird für diese Arbeit angenommen, dass für ein forciertes Integrinclustern ähnliche Partikelabstände erforderlich sind. Daher ist zu erwarten, dass die Hydrogelnanostrukturierung mit PS154- und PS288-gebildeten AuNP-Arrays für ein Integrinclustern besonders geeignet seien.

Die spezifische Biofunktionalisierung der hydrogelgebundenen Nanostruktur mit den Pep-

tidkonstrukten konnte am Beispiel des *IDSP*-Peptids durch ToF-SIMS-Analyse nur bedingt erfolgen. Vermutlich ist selbst mit der höchsten AuNP-Dichte ($n_{PS(154)}$=1755,3±77,4 μm^{-2}), die hierbei verwendet wurde, in Kombination mit dem in Summe nur 9 Aminosäuren beinhaltenden Peptidkonstrukt, der Unterschied detektierter Signale der Aminosäurefragmente zw. strukturierter und unstrukturierter Probe zu gering. Zwar wurden anhand Au_3S^- auch kovalente Gold-Thiolat-Bindungen mittels ToF-SIMS nachgewiesen, doch kann dabei nicht der Ursprung des Schwefelatoms geklärt werden - ob nun vom sPEGthiol (Teil der Matrix) oder vom Cystein (Teil des Peptidkonstrukts) abstammend. Der Nachweis der spezifischen Anbindung des Peptides am AuNP über ToF-SIMS könnte aber zukünftig durch die Detektion des Fragments $AuSC_3H_7NO_2^+$ (m/z=317,99; Nie et al., 2021), welches die Au-Cysteinthiolat-Bindung enthält, erfolgen.

4.2. Integrin $\alpha_4\beta_1$ Liganden haben Einfluss auf Zellpolarisation und -motilität

Die Zellmembran von Säugerzellen besitzt aufgrund geladener Zucker und Sialinsäurereste in der Glykokalix eine negative Oberflächenladung (van Damme et al., 1994; Fairhurst et al., 2007). In Interaktion mit dem negativ geladenen polyanionischen Heparin als Matrixbaustein verhindert die elektrostatische Repulsion prinzipiell die Befestigung der Zelle an der Hydrogeloberfläche. So konnte in Vorversuchen dieser Arbeit TCP-adsorbiertes Heparin keine Anheftung von KG-1a Zellen vermitteln. In anderen Studien wurde die Interaktion von HSPZ zu Heparin als wesentlich schwächer im Vergleich zu Kollagen Typ I oder Fibronektin beschrieben (Franke et al., 2007; Kurth et al., 2011). Mit dem durch Heparin erzeugten nichtzelladhäsiven Matrixhintergrund sollte in dieser Arbeit die Adhäsivität der nanostrukturierten $\alpha_4\beta_1$ Integrinliganden für HSPZ deutlich werden. Die oberflächliche Nanostrukturierung der zweidimensionalen Biohybridhydrogele diente dabei der präzisen Anbindung von Peptidkonstrukten, die die Minimalbindesequenz *IDSP* aus VCAM-1 bzw. *LDV* aus Fibronektin zur spezifischen Interaktion mit dem Integrinrezeptor $\alpha_4\beta_1$ präsentierten. Integrin $\alpha_4\beta_1$ ist ein Zelladhäsionsrezeptor und für hämatopoetische Zellen für den Eintritt und Rückhalt im Knochenmark sowie den Austritt aus diesem wichtig (Alon et al., 1995; Craddock et al., 1997). Daher wäre ein logischer Ansatz gewesen, mithilfe der peptidfunktionalisierten Hydrogele das Adhäsionsverhalten von HSPZ direkt zu charakterisieren. In Vorversuchen mit HSPZ-Modellzelllinien unter Verwendung von Adhäsionsmedium (Zusatz von Mn^{2+}) musste jedoch anhand des Wasch-*Assay* festgestellt werden, dass die Adhäsion hämatopoetischer Zellen an den funktionalisierten Geloberflächen zu schwach ist, um dem Strömungsfluss zu widerstehen. Daher musste auf eine alternative Analyse für die Adhäsion ausgewichen werden, die Rückschlüsse auf eine adhäsive Interaktion zwischen Zelle und Substratoberfläche zulässt.

Da HSPZ semi-adhärent und motil sind, wurde die aktive Fortbewegung der Zellen auf der Oberfläche als Parameter gewählt. Über Leukozyten ist bekannt, dass für ihre Extravasion eine beständige Adhäsion unter Beteiligung von Integrinen am Gefäßendothel unabdingbar ist, um Migration zu ermöglichen (Rose et al., 2007). Für HSZ konnte ein ähnliches Migrationsverhalten beobachtet werden, wobei beispielhaft folgende Studien erwähnt werden. Die Lebendtier-Bildgebung von HSZ bei Mäusen konnte deren Morphologie und Motilität in der Knochenmarksnische *in vivo* darstellen. Die Mehrheit der HSZ wiesen dabei eine dynamische, nichtsphärische Morphologie sowie signifikante Motilität auf, wobei sie eine langsame, fortschreitende Bewegung vollzogen, die durch kurze Abschnitte mit eingeschränkter Bewegung unterbrochen wurde (Upadhaya et al., 2020). LT-HSZ im Normalzustand zeigten ein eingeschränktes motiles Verhalten, während ein Teil der LT-HSZ nach Aktivierung hoch motil wird (Christodoulou et al., 2020). Lee-Thedieck et al. (2012) konnten außerdem verdeutlichen, dass die Adhäsion und Motilität von humanen HSPZ auf Fibronektin-funktionalisierten PEG-Diacrylat-Gelen auf festeren (E >38 kPa) Substraten im Gegensatz zu weicheren (E ≤20 kPa) verstärkt war.

Eine Voraussetzung für HSPZ-Motilität auf den Gelen in der vorliegenden Arbeit ist die spezifische Bindung des Zellrezeptors Integrin $\alpha_4\beta_1$ mit dem auf der Substratoberfläche präsentierten Liganden mit dem Bindemotiv *IDSP* oder *LDV*. Wie die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, wurde von der gesamten Zellpopulation auf jeder Oberfläche über die gesamte Kulturperiode hinweg Integrin α_4 (CD49d) und Integrin β_1 (CD29) stabil und hoch exprimiert. Der sehr hohe Anteil CD49d$^+$ Zellen an der Gesamtpopulation frisch isolierter CD34$^+$ HSPZ aus Nabelschnurblut ist kongruent mit Gigant et al. (2001) und Denning-Kendall et al. (2003), was die Wichtigkeit dieses CAM für das *Homing* zirkulierender HSPZ zur fetalen Knochenmarksnische am Ende der Schwangerschaft verdeutlicht (Surbek et al., 2000). Das über die Expansionsphase hinweg unveränderte Expressionsniveau steht im Einklang mit anderen Studien, welche ebenfalls nach HSPZ-Expansion keinen Effekt durch die Zytokine (TPO, SCF, Flt3L und IL-3) auf die Expressionshöhe ausmachen konnten (Saeland et al., 1992; Dravid und Rao, 2002). Die über die nanostrukturierte Geloberfläche vorgegebene Integrin $\alpha_4\beta_1$-Ligandendichte beeinflusste die CD49d$^+$-Expression ebenfalls nicht. Die Zellen waren also zu jedem Zeitpunkt potentiell rezeptiv für die angebotenen Peptidliganden.

4.2.1. Die Zellpolarisation als Indikator der Zell-Material-Interaktion

Eine weitere Voraussetzung für Motilität, insbesondere für eine zielgerichtete Fortbewegung, die Zellmigration, ist die Einnahme einer polarisierten Morphologie. Diese erlaubt intrazellulär generierte Kraft in eine netto resultierende Ortsveränderung umzuwandeln (Sánchez-Madrid und del Pozo, 1999). *In vitro* wurden bei adhärenten HSPZ in Cokultur auf mesenchymalen Stromazellen verschiedenste morphologisch erkennbare Typen von Protrusionen der Plasma-

membran identifiziert: Sphärische Zellen mit Mikrovilli oder Filopodien, asphärische Zellen mit Magnupodium oder Lamellipodium sowie Uropod (Freund et al., 2006; Reichert et al., 2015). Die klassische polarisierte Morphologie bei migrierenden Leukozyten ist die Ausbildung einer Lamellipodium-ähnlichen Struktur an der Migrationsfront und einer Pseudopodium-ähnlichen Struktur am gegenüberliegenden Rückpol, des Uropods (Sánchez-Madrid und del Pozo, 1999; Hind et al., 2016). Diese Morphologie der Zellpolarität ist auch bei *in vitro* Kultur von $CD34^+$ HSPZ aus Nabelschnurblut in Kontakt mit unbeschichtetem TCP zu sehen (Giebel et al., 2004) und wurde auch von Zellen der HSPZ-Kulturen auf den Biohybridhydrogelen dieser Arbeit gezeigt (in Durchlichtmikroskopie- und REM-Bildgebung). Zusätzlich zu dieser Polarisationsmorphologie wurden in Studien gezeigt, dass die Zelle biochemisch polarisiert ist, gekennzeichnet durch Membranmikrodomänen (*Lipid rafts*), die im Frontpol mit Gangliosid GM3 und CXCR4 (CD184) angereichert sind und im Uropod mit Gangliosid GM1, Prominin-1 (CD133) und verschiedenen CAMs wie CD43, CD44, ICAM-1, ICAM-3, PSGL-1 (Bauer et al., 2008). Dagegen unterliegen CD34 und CD45 keiner solchen polarisierten Verteilung in der Zellmembran (Bauer et al., 2008). Gvaramia et al. (2017) visualisierten bei einer 48 h-Kultur von humanen $CD34^+$ Zellen auf weichen ($G' \approx 0{,}5$ kPa) zweidimensionalen sPEG-Heparin-Gelen deren Polarisierung über die Konzentration des CD133-Markers in Uropod-ähnliche Fortläufer. Solch eine deutliche Segregation der Polmarker in polarisierten Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Durch die geringe Adhäsion der kultivierten HSPZ an den Biohybridhydrogelen dieser Arbeit, der zahlreichen Waschschritte bei der Immunfluoreszenzfärbung und der geringe Anteil an Tag 2 von im Mittel nur ca. 45% der Zellpopulation, die die oben genannte Polarisationsmorphologie zeigte, konnten kaum polarisierte Zellen hinsichtlich der Polmarker CXCR4 und Prominin-1 (CD 133) gefärbt werden. Eine Konzentrierung von CXCR4 im Frontpol konnte nicht klar dargestellt werden und auch die Prominin-1-Färbung war nicht auf den Rückpol beschränkt, sondern stellte sich in Form von Clustern über die gesamte Zelle verteilt dar. Auf Grund der Geldicke und den optischen Eigenschaften des Gels (schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis durch hohe Autofluoreszenz sowie das reduzierte Fluoreszenzsignal durch Absorption) war bei einfacher (nicht konfokaler) Immunfluoreszenzmikroskopie die bildgebende Auflösung und Fokussierung für eine klare Abgrenzung der Polmarker unzureichend.

4.2.2. Die Zellmotilität ist ligandentypabhängig

Obwohl der Nachweis von Zellpolarisation auf subzellulärer Ebene mit Polaritätsmarkern über Fluorenzmikroskopie nicht erfolgreich war, konnte die Polarisierung der gesamten Zelle mittels Durchlichtmikroskopie bestimmt werden, um den Polarisierungsgrad der Zellkulturen auf den verschiedenen Oberflächen zu ermitteln. Zusätzlich wurde die Bewegung der polarisierten Zellen anhand von Zeitrafferaufnahmen verfolgt, um ihre Geschwindigkeit zu charakterisieren.

Auf diese Weise sollte indirekt auf eine potentiell adhäsive Interaktion der HSPZ über $\alpha_4\beta_1$ mit den nanostrukturierten Peptidliganden der Geloberfläche geschlossen werden.

In der Studie mit einer 1-tägigen TCP-Kultur von $CD34^+$ HSPZ aus Nabelschnurblut wurde von Giebel et al. (2004) berichtet, wie sich der Anteil polarisierter Zellen von 37,7±19,9% zu 64,9±18,7% durch Stimulation mit frühwirkenden Zytokinen (TPO, SCF, Flt3L) in serumfreiem Medium erhöhte. In der vorliegenden Arbeit wurden HSPZ auf den Biohybridgelen in serumfreiem Medium mit den hämatopoetischen Zytokinen TPO, SCF, Flt3L und IL-3 kultiviert und zeigten an Kulturtag 2 einen ähnlich hohen Polarisierungsgrad zwischen 30–50%. Dieser ist auch in vergleichbarer Größenordnung mit Reichert et al. (2015), die für humane $CD34^+$ Zellen des peripheren Blutes nach 1- und 7-tägiger Kultur auf einer konfluenten Schicht humaner mesenchymaler Stromazellen in serumfreiem Medium mit den Zytokinen SCF, Flt3L und IL-3 einen Polarisierungsgrad von ca. 60% und 42% bestimmten.

Für die Biohybridgele insgesamt sieht man eine Abhängigkeit des Polarisierungsgrades vom Ligandentyp *IDSP* bzw. *LDV*, jedoch keine Abhängigkeit von der Ligandendichte. Der Polarisierungsgrad war auf *IDSP*-funktionalisierten Biohybridhydrogelen insgesamt höher als auf *LDV*-funktionalisierten, ein Unterschied, der durch die Verfügbarkeit von SDF-1α signifikant verstärkt wurde. Eine Ligandentypabhängigkeit war ebenfalls in der Motilitätsanalyse beobachtbar, wo die mittleren korrigierten Geschwindigkeiten für *IDSP*-Gele gegenüber *LDV*-Gele (jeweils mit und ohne SDF-1α) signifikant erhöht waren.

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede des Polarisierungsgrades und der Geschwindigkeit polarisierter Zellen in Abhängigkeit vom Ligandentyp könnte die unterschiedliche Bindungsaffinität des Integrinrezeptors $\alpha_4\beta_1$ gegenüber beiden Bindungsmotiven sein. Für eine *outside-in* Aktivierung des Integrins durch den Liganden ist die Einnahme der gestreckten, offenen Konformation des Integrins nötig. Li und Springer (2018) bestimmten die intrinsische Affinität der offenen $\alpha_4\beta_1$ Konformation für das VCAM-Fragment, das die Domäne 1 (inkl. *IDSP*) und 2 beinhaltet, und für das *connecting segment* (IIICS)-Region (inkl. *LDV*) von Fibronektin - sie betrug 70 nM bzw. 1.000 nM. Demnach besitzt die offene $\alpha_4\beta_1$ Konformation für *LDV* (IIICS Fibronektin) eine 14-fach geringere intrinsische Affinität als für *IDSP* (D1 VCAM-1). Damit im Einklang konnten zuvor schon Chan und Aruffo (1993) durch *in vitro* Migrations- und Adhäsionsexperimenten mit Lymphozyten demonstrieren, dass deren $\alpha_4\beta_1$-vermittelte Adhäsions- sowie Migrationseffizienz auf VCAM-1-beschichteten Oberflächen höher als die auf Fibronektin-beschichteten Oberflächen war, und das unabhängig vom Aktivierungsstatus der Zelle. Darüber hinaus konnte für VCAM-1 und Fibronektin eine optimale Beschichtungsdichte für eine maximale Migrationseffizienz der Lymphozyten bestimmt werden, ober- und unterhalb derer die Migrationseffizienz erniedrigt war (Chan und Aruffo, 1993). Diese Beobachtung führte zur Hypothese, dass je avider die Zellen bei hohen Ligandendichten binden, desto weniger effizient konnten sie migrieren.

Die geringere Bindungsaffinität des aktivierten $\alpha_4\beta_1$ Integrins für den extrazellulären Liganden im Vergleich zum zellulären könnte von der HSPZ durch Erhöhung der Avidität über das Clustern von Integrinmolekülen ausgeglichen werden. Erst eine genügend hohe Ligandendichte würde ein Integrinclustern gewährleisten und somit eine effiziente Integrinaktivierung. Möglicherweise gibt es für den extrazellulären Liganden *LDV* auch eine ähnlich kritische Dichte, die nötig ist, um über Rezeptorclustern eine effektive Adhäsion zu gewährleisten wie das bisher anhand der RGD-Sequenz, dem Bindemotiv für Integrin $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$, bestimmt wurde (Altrock et al., 2012; Muth et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch weder für den Polarisierungsgrad der Zellkultur, noch für die mittlere korrigierte Geschwindigkeit polarisierter Zellen eine Ligandendichteabhängigkeit zwischen den einzelnen nanostrukturierten Geloberflächen festgestellt werden. Das ist wider der Erwartungshaltung, da in früheren Studien von Altrock et al. (2012) und Muth et al. (2013) mit nanostrukturierten cRGD-Oberflächen eine klar dichteabhängige Adhäsion für HSPZ gezeigt wurde.

Allerdings ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Studien auf die hier vorliegende in zwei Gesichtspunkten eingeschränkt. Zum einen besteht eine nicht vergleichbare Matrixsteifigkeit - rigide ($E \geq$6 MPa) gegenüber weiche ($E \approx$24 kPa) Oberflächen, und zum anderen wurden unterschiedliche Integrine - $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ gegenüber $\alpha_4\beta_1$ angesprochen. Diese Integrine unterscheiden sich vor allem durch ihre sehr verschiedenen Ligandenbindungsstärken. So ist von $\alpha_5\beta_1$ bekannt, dass der Übergang vom geknickt-geschlossenen in den gestreckt-offenen Zustand mit einer ≈5.000-fachen Erhöhung der Ligandenbindungsaffinität verbunden ist - im Vergleich dazu nur 600–800-fach für $\alpha_4\beta_1$ (Li und Springer, 2018). Im hochaffinen Zustand des Integrins bindet $\alpha_5\beta_1$ Fibronektin 1.000-fach stärker als $\alpha_4\beta_1$ Fibronektin (Li und Springer, 2018). Dass sich zusätzlich die Matrixelastizität auf das Integrin-vermittelte Adhäsionsverhalten von Zellen aus wirken kann, liegt in der Natur von Integrinen. Da sie Rezeptoren der Krafttransduktion sind, wirkt sich die Matrixsteifigkeit auch auf die Effizienz der Ligandenbindung und Integrinaktivierung aus. Dies ist erklärbar mit dem Mechanismus der molekularen Kupplung mit den Bestandteilen EZM–Integrin–Adapterprotein–Aktin(zytoskelett) (siehe Einleitung 1.1.2.2).

Matrixsteifigkeiten im MPa bis GPa-Bereich ist für Zellen auf planen Oberflächen quasi undeformierbar (Yip et al., 2013), sodass die Aktomyosin-Kontraktionen der Zelle, die über die Integrine zur Matrix geleitet werden, eine maximal hohe Krafttransduktion erlaubt. Daher bieten RGD-funktionalisierte rigide Matrizes wie z. B. Glas ($E_{Glas} \approx$70 GPa; (Schneider et al., 2006) ideale Voraussetzungen für Adhäsionsstudien von HSPZ. Im Vergleich zu rigiden Matrizes verhält es sich auf wesentlich weicheren Matrizes anders, wozu auch das in dieser Arbeit genutzte Biohybridhydrogel ($E \approx$24 kPa) zählt. Oria et al. (2017) fanden mithilfe von cRGD-nanostrukturierten Poly(acrylamid)-Gelen (E von 0,5 bis 150 kPa) heraus, dass es eine optimale Steifigkeit für die Bildung von Fokaladhäsionen in adhärenten Zellen gibt, die mit Zunahme des Ligandenabstandes abnimmt. Je weiter Integrinliganden auf weichen Matrizes auseinander

liegen, umso höher ist die durch intrazelluläre Aktin-Myosin-Kontraktilität übertragene Kraft pro einzelnes Integrin (*force load*). Somit kann, trotz deformierbarer weicher Matrix, bei Erreichen eines Kraftschwellenwertes das intrazelluläre Adapterprotein Talin entfaltet (Elosegui-Artola et al., 2016) und weitere Integrine (zu Clustern) und Adapterproteine rekrutiert werden, was die Adhäsion wachsen und reifen lässt. So bildeten sich in den adhärenten Zellen bspw. bei einem Ligandenabstand von 100 nm Fokaladhäsionen nur auf Gelen mit einem E-Modul zwischen 10 kPa und 30 kPa (Oria et al., 2017). Die Ergebnisse der Studie von Oria et al. (2017) sind zur Abschätzung einer effektiven Integrinaktivierung mit dem weichen Matrixhintergrund in dieser Arbeit nur schwer anwendbar, da HSPZ nur semi-adhärent und zudem motil sind. Sie bilden entsprechend keine reifen Fokaladhäsionen aus, sondern nur Adhäsionskomplexe mit transienter Natur bzw. nur naszierende Adhäsionen (<250 nm).

Allerdings zeigten Platzman et al. (2013) mit KG-1a, einer Modellzelllinie für hämatopoetische Stammzellen, dass je niedriger cRGD-Ligandendichte bzw. je größer der AuNP-Abstand auf PEG-Diacrylat-Gelen (E=70 kPa–1,25 MPa) war, desto effektiver war die Adhäsion im Vergleich zu gleichartig nanostrukturierten Glassubstraten (E=64 GPa). In einer weiteren Studie von Lee-Thedieck et al. (2012) wurde ebenfalls der Einfluss der Matrixsteifigkeit auf die Integrin-vermittelte Adhäsion von HSPZ verdeutlicht, indem sie zeigten, dass unter vergleichbarer Fibronektin-Funktionalisierungsdichte von PEG-Diacrylat-Gelen die Anzahl adhärenter HSPZ auf weichen ($E \leq$20 kPa) Gelen geringer war als auf harten ($E >$38 kPa). Bereits Paszek et al. (2009) berichteten, dass Integrinclustern auf starren Substraten mit hoher Ligandendichte robust auftritt, aber bei geringer Ligandendichte oder auf nachgiebigen Substraten beeinträchtigt ist. Sie schrieben den Integrinen eine Funktion als sensorische Moleküle zu, die die Matrixeigenschaften bereits wahrnehmen, bevor multi-molekulare Adhäsionskomplexe gebildet werden. Auch wenn die semi-adhärenten HSPZ im Gegensatz zu adhärenten Zellen wegen ihres rasch veränderlichen Adhäsionsverhaltens *per se* kleinere Integrinligandenabstände bevorzugen, so scheint die Tendenz, auf weichen Matrizes größere Integrinligandenabstände für eine effektive Integrinansprache zu benötigen, ebenfalls zuzutreffen. Daher ist die ursprüngliche Annahme in Abschnitt 4.1, dass die Nanostrukturierung der Biohybridhydrogele mit Partikelabständen von ca. 26 nm (PS154) und ca. 37 nm (PS288) für ein $\alpha_4\beta_1$ Integrinclustern besonders geeignet wären, zu relativieren, denn für die Biohybridhydrogele mit ihrer relativ weichen Matrix sind optimale Kraftschwellenwerte für $\alpha_4\beta_1$ in Ligandenbindung mit *LDV* oder *IDSP* durchaus auch mit den größeren Partikelabständen von ca. 78 nm (PS1058) und ca. 124 nm (PS3365) denkbar. Die Ligandendichteunabhängigkeit des Polarisations- und Motilitätsverhalten der HSPZ auf den nanostrukturierten Hydrogelen gibt leider keinen Rückschluss darüber, bei welchen AuNP-Abständen das *LDV*- bzw. *IDSP*-Peptid $\alpha_4\beta_1$ Integrin effektiv aktivieren konnte.

Die geringeren polarisations- und motilitätsfördernden Effekte von *LDV* im Vergleich zu *IDSP* sind kaum auf die physiologischen Nische übertragbar, in der stets das Vollprotein

Fibronektin vorkommt, da in dieser Arbeit die LDV-Sequenz aus Fibronektin isoliert betrachtetet wurde. Wie in der Einleitung, Abschnitt 1.1.2.1, geschildert, liegen für Fibronektin parallel zu den Bindesequenzen für α_4-Integrine auch Bindungsequenzen für andere Integrine wie z. B. die RGD-Sequenz für $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ vor, die das Adhäsionsverhalten der Zelle weiter modulieren können. Wie gegensätzlich sich Adhäsion allein durch das Ansprechen verschiedener Integrinsubtypen in ein und derselben Zelle äußern kann, wurde von Amschler et al. (2018) eindrücklich demonstriert. Auf nanostrukturierten bifunktionalen Glasträgern, die zugleich $\alpha_4\beta_1$ (VCAM-1) und $\alpha_5\beta_1/\alpha_v\beta_3$ (RGD) ansprachen, nahmen adhärente Zellen (humane Melanomzellen) eine intermediäre Morphologie an, die durch die Inhibition des RGD-vermittelten Spreitens bei hohen VCAM-1-Dichten gekennzeichnet war.

4.2.3. Die Verstärkung der Polarisierung durch SDF-1α

Wissenschaftliche Erhebungen haben bisher ein umfassendes Bild eines synergetischen, proadhäsiven Effekts von SDF-1 und $\alpha_4\beta_1$ Integrin auf das Adhäsionsverhalten hämatopoetischer Zellen geliefert (siehe Abschnitt 1.1.2.3). Ein Beleg dafür, dass eine Signalgebung durch SDF-1α in den HSPZ-Kulturen auf den Biohybridhydrogelen gegeben war, ist der Nachweis der Expression seines Rezeptors CXCR4 (CD184). Einschränkend muss festgestellt werden, dass die Startpopulation frisch isolierter $CD34^+$ Zellen im Mittel nur aus 72% $CD184^+$ Zellen bestand (konsistent mit 79,7±18,0%; Denning-Kendall et al., 2003), daher ein Teil der Population zu Beginn der Kulturperiode nicht rezeptiv für SDF-1α über CXCR4 (CD184) war. Daher war der Effekt von SDF-1α auf die Polarisation der Gesamtzellpopulation vermutlich nicht vollständig ausgeprägt. Dennoch war der polarisationsverstärkende Effekt von SDF-1α auf HSPZ, die sich auf den Biohybridhydrogelen befanden deutlich ausgeprägt. Dies spricht für die vielen Studien, die verdeutlichten, dass SDF-1 die Polarisation und Migration von HSPZ auslöst (Aiuti et al., 1997; Kim und Broxmeyer, 1998; Möhle et al., 1998; Peled et al., 2000). Einzelne Studien mit hämatopoetischen Zellen belegten, dass SDF-1 schnell und zeitweilig die $\alpha_4\beta_1$ Integrin-vermittelte Adhäsion sowohl zu Fibronektin als auch zu VCAM-1 verstärken kann (Hidalgo et al., 2001; Sanz-Rodríguez et al., 2001). In einer kürzlich erschienenen Publikation von Bessy et al. (2021) wurde auch die hoch polarisierte Zellmorphologie von HSPZ in Kontakt mit Osteoblasten dargestellt. In der kleinen, magnupodiumartigen Kontaktzone der HSPZ waren u. a. intrazellulär das Zentrosom und membranär die Rezeptoren CXCR4 und $\alpha_4\beta_1$ lokalisiert. Parallel dazu wurde gezeigt, dass Mikro*well*-Beschichtungen mit den Liganden SDF-1 oder VCAM-1 zwar eine polarisierte Zellmorphologie wie im Kontakt mit Osteoblasten aufwiesen, doch nur die SDF-1-Beschichtung die Polarisierung des Zentrosoms und assoziierter Mikrotubuli induzieren konnte. Eine derartige Positionierung des Zentrosoms in die Kontaktzone könnte auch das Zellteilungsverhalten hinsichtlich Quieszenz und/oder einer Asymmetrie beeinflussen (Ho und Wagner, 2007; Yamashita et al., 2007; Shin et al.,

2014a; Venkei und Yamashita, 2018; Florian et al., 2018).

Wie bereits oben erwähnt, hatte die SDF-1α-Beladung der Biohybridhydrogele keinen Effekt auf die Migrationsgeschwindigkeit von HSPZ gezeigt. Passend dazu hatten Lee-Thedieck et al. (2012) beobachtet, wie die Zugabe von löslichem SDF-1α die Migrationsgeschwindigkeit humaner CD34$^+$ HSPZ auf Fibronektin-funktionalisierten PEG-Diacrylat-Gelen mit einer relativ hohen Steifigkeit von >38 kPa (E-Modul) signifikant erhöhte, wogegen die Migrationsgeschwindigkeit auf Gelen mit einer geringen Steifigkeit von ≤20 kPa unverändert blieb. Da Fibronektin u. a. auch von $\alpha_4\beta_1$ gebunden wird, kann aus der Studie von Lee-Thedieck et al. (2012) abgeleitet werden, dass ähnlich weiche Gele wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Biohybridhydrogele ($E \approx$24 kPa), einen geschwindigkeitsverstärkenden Effekt von SDF-1α auf HSPZ verhindert haben könnten. Peled et al. (1999a) konnten demonstrieren, dass unter Scherströmungsbedingungen insbesondere die Copräsentation von immobilisiertem SDF-1 eine verstärkende Wirkung auf die Adhäsion von humanen CD34$^+$ HSPZ an VCAM-1 hat. Die adhäsionsverstärkende Wirkung von immobilisiertem SDF-1 zu VCAM-1 konnte in Lymphozyten mit der Induktion von $\alpha_4\beta_1$ Integrinclustern und damit einhergehenden $\alpha_4\beta_1$ Integrin Aviditätserhöhung zu VCAM-1 dargestellt werden (Grabovsky et al., 2000). Inwieweit die HSPZ in der vorliegenden Arbeit das von der Biohydridhydrogelmatrix immobilisierte SDF-1α oder das im Medium gelöste SDF-1α banden, darüber kann keine klare Aussage getroffen werden.

Darüber hinaus wurde von Peled et al. (2000) berichtet, dass die statische Adhäsion von humanen CD34$^+$ HSPZ von der Integrin $\alpha_5\beta_1$-Bindung zu Fibronektin dominiert wird. Die SDF-1-induzierte Polarisation und Migration der CD34$^+$CD184$^+$ Zellen erfordert dagegen die Beteiligung des Integrins $\alpha_4\beta_1$ mit seinen schwachen Adhäsions-Deadhäsions-Wechselwirkungen zu Fibronektin (Peled et al., 2000). Weiterhin wurde in der Studie von Azab et al. (2009) mit humanen Myelomazellen gezeigt, dass eine SDF-1-induzierte Adhäsionsverstärkung über $\alpha_4\beta_1$ von den GTPasen RhoA sowie Rac1 abhängig war. Doch während RhoA sowohl für Adhäsion als auch Migration (Chemotaxis) wichtig war, konnte für Rac1 nur eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion, nicht aber Migration demonstriert werden (Azab et al., 2009). Das verdeutlicht die unterschiedliche Regulation adhäsiver Kontakte bei beiden Prozessen und unterstreicht den in dieser Arbeit beobachteten unterschiedlichen Einfluss von SDF-1α auf Polarisation und Migration. Schließlich beschrieben Jung et al. (2019), wie die Immunzellmigration von der molekularen Assoziation von $\alpha_4\beta_1$ Integrinclustern, CXCR4 und *Vascular endothelial growth factor receptor-2* mithilfe prozessiertem Syndecan-1 beruht (siehe Schema Abb. 1.11 in der Einleitung). Dabei ist die Aktivierung von CXCR4 durch SDF-1 zentral (Jung et al., 2019); aber auch die Heparanase-induzierte Abspaltung der Ektodomäne von Syndecan-1 durch Matrix-Metalloproteinase-9 (Yang et al., 2007; Purushothaman et al., 2010). Für das vorliegende Gelsystem ist nicht bekannt, ob bei den kultivierten HSPZ eine Syndecan-1-Ektodomänenabspaltung stattfand und ob bei einer Ligandendichte überhaupt ein

$\alpha_4\beta_1$ Integrinclustern möglich wurde. Das könnte ebenfalls eine Ursache für die unveränderte Migrationsgeschwindigkeit auf SDF-1α-beladenen Biohybridhydrogele sein.

Zwar konnte weder im Polarisierungsgrad der Zellkultur, noch in der Geschwindigkeit polarisierter Zellen eine Ligandendichteabhängigkeit festgestellt werden, so konnte doch eine klare Abhängigkeit vom Ligandentyp nachgewiesen werden. Ob diese Interaktion auch einen wechselseitigen Effekt auf HSPZ-Erhalt oder Differenzierung hatte, wurde durch die phänotypische Analyse der kultivierten Zellpopulationen näher aufgeklärt.

4.3. Die Proliferation von HSPZ ist nanostrukturunabhängig

Es gibt verschiedenste Strategien die numerische Expansion funktionaler HSZ *ex vivo* zu forcieren (Papa et al., 2020, und Referenzen darin). Viele biomaterialbasierte Ansätze verfolgen bei der Kultur von HSPZ das Ziel eine möglichst hohe Multiplikation der Gesamt- und der $CD34^+$ Zellzahl zu erreichen (z. B. Ferreira et al., 2018; Ingavle et al., 2019, und Referenzen darin). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die verschiedenen funktionalen Aspekte des Biohybridhydrogels in Wechselwirkung mit HSPZ zu einer Änderung des Zellverhaltens führt. Dabei bietet es sich an, die Proliferation zu untersuchen, weil Proliferation exponentielles Wachstum darstellt und kleine Änderungen des Zellteilungsverhaltens in großen Änderungen der Zellzahl sichtbar werden können. Bspw. hat für eine Zellkultur in exponentiellem Wachstum die Verkürzung der Generationszeit um nur 15% eine Vervierfachung des Expansionsfaktors nach 12 Kulturtagen zur Folge. Deswegen wurde die Gesamtzellzahl in Abhängigkeit der Peptidfunktionalisierung (*IDSP*, *LDV*) und des Peptidligandenabstandes für zwei aufeinander folgende 6-tägige Kulturintervalle bestimmt. Die Gesamtzellzahl von 2×10^4 HSPZ bei Einsaat vergrößerte sich nach 12 Tagen auf $\approx1{,}3\times10^7$ für die *LDV*-Peptid-Experimentreihe bzw. $\approx3{,}2\times10^7$ für die *IDSP*-Peptid-Experimentreihe. Daraus berechnet sich eine 650- bzw. 1600-fache Expansion der Gesamtzellzahl, die ungefähr dem vom Mediumhersteller angegebenen 300–1000-fachen Expansionsfaktor der Gesamtzellzahl nach 12 Tagen entspricht (PromoCell GmbH, 2021) und daher im erwarteten Rahmen ist.

Nach 12-tägiger Kultur waren in dieser Arbeit keine Unterschiede in der Gesamtzellzahl zwischen den Oberflächen sowohl innerhalb der *IDSP*-Peptid-Kulturen, als auch innerhalb der *LDV*-Peptid-Kulturen erkennbar. Es gibt Biomaterialstudien zum Einfluss des *LDV*-Motivs auf die Proliferation von HSPZ, die, wie diese, nach einem über 6 Kulturtage hinausgehenden Zeitraum ebenfalls keine signifikanten Differenzen in der Gesamtzellzahl zwischen den verschiedenen Kulturoberflächen ausmachen konnten. Jiang et al. (2006) untersuchten dies bei humanen $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut mithilfe von Kulturoberflächen aus Polyethylenterephthalat mit kovalent immobilisiertem CS1-Peptid (ELIDVPST; 2,0–2,3 $\mathrm{nmol/cm^2}$). Nach 10-tägiger Expansion zeigte sich im Vergleich zu TCP kein Unterschied in der Zellzahl

der gesamten Zellpopulation (Jiang et al., 2006). In einer weiteren Studie mit murinen c-Kit$^+$Lin$^-$ HSPZ auf Hydrogelen aus PEG-Diacrylat, kovalent funktionalisiert mit PEG-CS1 (25 µg/cm^2), war die 14-tägige Expansion ebenfalls vergleichbar mit der auf den Kontrolloberflächen PEG-Diacrylat, TCP und Fibronektin-beschichtetem TCP (Cuchiara et al., 2016). Dagegen gibt es auch Hydrogelstudien wie z. B. Winkler et al. (2017b), die einen deutlichen Proliferationsunterschied aufgrund verschiedener Oberflächeneigenschaften erst am Ende der examinierten Kulturdauer feststellten. Winkler et al. (2017b) expandierten 14 Tage lang humane CD34$^+$ Zellen aus Nabelschnurblut in Medium mit Zytokinen (SCF, Flt3L, IL-6 und IL-3) auf Dll1-nanostrukturierten PEG-Diacrylat-Gelen, deren Expansionsfaktor sich erst an Tag 14 im Vergleich mit der Kontrolloberfläche TCP signifikant unterschied. Einschränkend muss erwähnt werden, dass dabei auch keine Unterschiede zwischen den Kulturen mit den drei verschiedenen Dll1-Ligandendichten bestanden. Darüber hinaus ist Dll1 ein zellulärer Ligand des Notch-Signalweges, welcher für konzentrationsabhängige proliferative Effekte in HSZ und Progenitoren bekannt ist (Delaney et al., 2005; Dallas et al., 2007; Lampreia et al., 2017; Ge et al., 2022), während der in der vorliegenden Arbeit verwendete zelluläre Ligand *IDSP* einen Integrinrezeptor anspricht. Proliferative Effekte durch Integrinansprache wurden bereits in Studien für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ gezeigt, und zwar dass dessen Aktivierung die Proliferation bei HSZ reduzierte (Umemoto et al., 2012; Khurana et al., 2016).

Für die in dieser Arbeit getesteten Biohybridhydrogele proliferierten die HSPZ innerhalb des ersten 6-tägigen Kulturintervalls unabhängig von der verwendeten Kulturoberfläche mit einer Generationszeit von ca. 24–27,6 h signifikant stärker als im zweiten 6-tägigen Kulturintervall mit einer Generationszeit von ca. 30–38,9 h. Das reduzierte Proliferationspotential der Progenitoren innerhalb des zweiten Kulturintervalls im Vergleich zum ersten konnte in der reduzierten Größe der gebildeten Kolonien des CFU-*Assay* bestätigt werden. Ko et al. (2007) berichteten bei der Kultur von aus Nabelschnurblut isolierten CD34$^+$ Zellen über eine teilungsinaktive Anlaufphase (*lag*-Phase), die nach Kulturbeginn einen Zeitraum von 24 bis 40 h umfasst. Dieser Anlaufphase schließt sich die exponentielle Phase (*log*-Phase) mit Verdopplungszeiten von 26±0,7 h für CD34$^+$ Zellen und 15,9±2,4 h für CD34$^-$ Zellen an, wie anhand einer 6-tägigen Kultur in Medium mit den Zytokinen SCF, TPO, Flt3L und G-CSF ermittelt wurde (Ko et al., 2007). Die in der vorliegenden Arbeit berechnete Generationszeit für die ersten 6 Kulturtage berücksichtigt nicht die teilungsinaktive Anlaufphase. Daher ist die für das erste Kulturintervall erhobene Generationszeit nur eine Näherung und für das zweite Kulturintervall eine Mischung aus teilungsaktiven CD34$^+$ Zellen, die sich erneuern und/oder zu CD34$^-$ Zellen differenzieren, die mit höherer Teilungsrate weitere CD34$^-$ Zellen bilden. Zugleich scheiden einige Zellen durch Zelltod aus, was vor allem nach 12 Kulturtagen mikroskopisch erkennbar war (Abschnitt 3.3.4.1).

Um im Verlauf der Kulturzeit numerisch zur Zellexpansion beizutragen, muss sich eine Zelle im teilungsaktiven Zellzyklus befinden. Um herauszufinden, ob eine Wechselwirkung zwischen

HSPZ und den verschiedenen nanostrukturierten Biohybridhydrogelen zu einer geänderten Zellzyklusaktivität der Zellpopulation führt, wurde in dieser Arbeit zusätzlich, mithilfe von EdU als Indikator für die DNA-Replikation in der S-Phase, der aktive Zellzyklus bestimmt. Bei frisch aus Nabelschnurblut isolierten $CD34^+$ Zellen ist anzunehmen, das sich 1,5±0,8% der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus befinden, so wie es Koenig et al. (2001) in ihrer Studie bestimmt hatten. Für die Biohybridhydrogele wurde der Zellanteil, der innerhalb von Kulturtag 3 auf Kulturtag 4 eine S-Phase durchlaufen hatte, bestimmt. Es wiesen alle Kulturen unabhängig von der Kulturoberfläche mit ≥93,6% eine sehr hohe Zellzyklusaktivität auf, nur noch wenige Zellen befanden sich in der inaktiven G_0-Phase (4,0–6,4%). Der Zusatz von Zytokinen ins Kulturmedium ist eine effektive Methode zur Vervielfältigung von $CD34^+$ Zellen *in vitro* (z. B. Costa et al., 2018; Tajer et al., 2019). Da dem Kulturmedium in dieser Arbeit die Zytokine TPO, SCF, Flt3L und IL-3 zugesetzt wurden, ist die Inversion der anteilsmäßigen Zyklusaktivität innerhalb einer jeden Population wahrscheinlich durch die Zytokine induziert worden. Die Zytokine SCF, TPO und Flt3L zählen zu den im hierarchischen Differenzierungsmodell frühwirkenden, d. h. die Selbsterneuerung induzierenden Zytokinen und IL-3 als intermediärwirkendes Zytokin (Flores-Guzmán et al., 2013).

Dass eine Zytokinbeigabe die HSPZ-Proliferation induzieren kann, demonstrierte bspw. Holm et al. (1999). Sie bestimmten dabei speziell die Dauer der S-Phase und die Verdopplungszeit nach *in vitro* Stimulation von humanen G-CSF mobilisierten $CD34^+$ Zellen aus dem peripheren Blut mit den Zytokinen SCF, IL-3 und IL-6. Die Zytokinzugabe reduzierte die Dauer der S-Phase und die Verdopplungszeit drastisch, was fast ausschließlich die reifere $CD34^+CD38^+$ Subpopulation betraf, wogegen die unreife $CD34^+CD38^-$ Subpopulation kaum in den aktiven Zellzyklus überging (Holm et al., 1999). Da der von Holm et al. (1999) genutzte Zytokinmix nicht exakt dem in dieser Arbeit verwendeten entspricht, bleibt es fraglich, welche $CD34^+$ Subpopulationen in den aktiven Zyklus geführt wurden. Eine Studie, die exakt denselben Zytokinmix verwendeten, ist Rossmanith et al. (2001). Sie sahen für die Expansion von $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut in Kurzzeitkultur die frühwirkenden Zytokine TPO, SCF, Flt3L als essentiell an und zeigten wie die zusätzliche Gabe von IL-3 die Expansion vor allem primitiver Progenitoren nochmals verstärken konnte. Dass es vor allem auf eine Kombination mehrere Zytokine für eine HSPZ-Expansion ankommt, zeigten Knapp et al. (2017). Sie haben für HSZ ($CD34^+CD38^-CD45RA^-CD90^+CD49f^+$) aus Nabelschnurblut gezeigt, dass die Kombination der fünf Zytokine SCF, FLT3L, IL-3, IL-6 und G-CSF den größten Effekt auf das Überleben und auf die Proliferation hat, sodass 82% der Zellen bereits zwei Teilungen innerhalb von 4 Tagen durchschritten hatten (Knapp et al., 2017). Die vermutete Zytokin-induzierte Zellzyklusaktivitätssteigerung und vermehrte Proliferation der Zellpopulationen ist wahrscheinlich der dominierendere Einfluss gegenüber einer Wechselwirkung zwischen HSPZ und den verschiedenen nanostrukturierten Biohybridhydrogelen. Das könnte erklären, warum in dieser Arbeit keine Änderung des Zellzyklusstatus der Population zwischen den

verschiedenen Geloberflächen gemessen werden konnte.

Allerdings konnte bei den *LDV*-Peptid-Kulturen nach 6 Kulturtagen auf den PS154-nanostrukturierten Hydrogelen mit *LDV*- sowie Kontrollpeptid (*LEV*)-Funktionalisierung ohne SDF-1α eine signifikant niedrigere Gesamtzellzahl im Vergleich zu allen anderen Oberflächen, mit Ausnahme der unstrukturierten Hydrogele, gemessen werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche Wechselwirkung der Zellen mit Oberflächen höchster Partikeldichte (PS154) innerhalb eines kurzen Zeitfensters hin, weil mit fortschreitender Kulturdauer nach 12 Tagen, wie bereits diskutiert, keine Unterschiede mehr in der Gesamtzellzahl messbar waren. Bei den *IDSP*-Peptid-Kulturen waren Gesamtzellzahlunterschiede zw. den Oberflächen über den gesamten Kulturzeitraum aufgrund der größeren Streuung - wahrscheinlich durch Donorvariation verursacht - nicht messbar.

Da die Gesamtzellzahl lediglich Ausdruck des Zellteilungspotentials der gesamten HSPZ-Population ist, ist für die Abschätzung der dabei durchschrittenen Differenzierungsstufen die Analyse der phänotypischen Identität der Zellen nötig.

4.4. Die komplexe Wirkung des Biohybridhydrogels auf die HSPZ-Differenzierung

Die Hämatopoese beinhaltet Zellvermehrung durch mitotische Zellteilungen. Wie zuvor in Abschnitt 4.3 dargestellt wurde, finden in der proliferierenden HSPZ-Kultur unzählige mitotische Zellteilungen statt. Dabei ist es entscheidend, ob sich eine HSPZ bei der Teilung selbst erneuert und/oder differenziert. Dies wird über symmetrische und asymmetrische Teilungen verwirklicht (Huang et al., 1999; Punzel et al., 2003; Giebel et al., 2006; Ho und Wagner, 2007), wobei nur symmetrische Teilungen numerisch zur Stammzellexpansion beitragen.

4.4.1. Die Dynamik der CD34$^+$ Zellpopulation

Wie bereits in der Einleitung 1.1.1 erwähnt, wird CD34 häufig als kardinaler Marker zur Identifizierung und Charakterisierung von HSPZ genutzt, da dessen Expression im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich abnimmt. Die Proteinexpression des Oberflächenantigens CD34 diente auch in dieser Arbeit als ein wesentliches Merkmal differenzierungspotenter Progenitoren. Der relative Zellanteil von CD34$^+$ an der Gesamtpopulation war in dieser Arbeit auf allen Oberflächen >96% zu Kulturbeginn und zeichnete sich durch eine fortschreitende Abnahme auf 34,7–53,8% nach 6 und auf 6,9–21,3% nach 12 Kulturtagen aus. Dies zeigt deutlich die mit der Proliferation zunehmende Dominanz der differenzierenden Zellteilungen. Auch andere vergleichbare nanostrukturierte Hydrogelsysteme waren nicht in der Lage zusammen mit

ihrem jeweiligen zytokinsupplementierten Medium die kontinuierliche Reduktion des $CD34^+$ Zellanteils aufzuhalten. Bei cRGD- bzw. Dll1-nanostrukturierten Gelen ging der $CD34^+$ Zellanteil auf ≈20% nach 7 Tagen (Muth, 2012) bzw. ≈25% nach 10–11 Tagen (Winkler et al., 2017b) zurück.

Signifikante Unterschiede des relativen $CD34^+$ Zellanteils waren in der vorliegenden Arbeit nur nach 6 Kulturtagen zwischen verschiedenen Kulturoberflächen zu sehen. Am deutlichsten war dabei der höhere $CD34^+$ Zellanteil der Kultur auf unstrukturiertem Gel ohne SDF-1α-Beladung in Bezug auf die TCP-Kultur. Allerdings konnte kein korrespondierender Unterschied der absoluten $CD34^+$ Zellzahl gefunden werden, da sich Änderungen des $CD34^+$ Zellanteils und der Gesamtzellzahl in diesem Fall ausglichen. Ähnlich verhielt es sich für die nanostrukturierten Gele mit *LDV*-Peptid-Funktionalisierung, wo die $CD34^+$ Zellanteile nach 6 Tagen bei allen Gele mit der höchsten Partikeldichte (PS154) signifikant höher lagen als auf allen Gelen mit geringerer Partikeldichte, was sich aber in Relation mit der jeweiligen Gesamtzellzahl wieder aufhob. Es gibt nur wenige Studien, die eine $CD34^+$ Expansion unter dem Einfluss einer präzise definierten Ligandendichte, so wie sie in dieser Studie bestimmt wurde, betrachtet haben. Eine davon wurde von Delaney et al. (2005) mithilfe eines oberflächenimmobilisierten Dll1-Konstruktes ($Dll1^{ext-IgG}$) in Kombination mit dem Fibronektin-Fragment CH-296 (RGD- und LDV-Motiv enthaltend) durchgeführt. Humane $CD34^+CD38^-$ HSPZ wurden 21 Tage auf verschiedenen Dll1-Konstrukt-„Dichten", die definierten Inkubationskonzentrationen auf TCP entsprachen, kultiviert. Im Vergleich zu Kontrolloberflächen ohne Dll1 führten geringere Inkubationskonzentrationen (Ligandendichten) zu signifikant höheren Gesamtzellzahlen, die auch mit höheren $CD34^+$ Absolutzellzahlen einhergingen, als höhere Inkubationskonzentrationen. Allerdings war in der frühen Kulturphase zwischen 3. und 6. Kulturtag der Anteil von apoptotischen (Annexin V^+) $CD34^+$ Zellen auf geringeren Ligandendichten im Vergleich zu höheren Ligandendichten etwa 3-fach geringer, was natürlich den weiteren Wachstumsverlauf der Population beeinflusst. In einer weiterführende Studie von Winkler et al. (2017b) wurde der Einfluss der Dll1-Dichte als nanostrukturierte Präsentation über AuNP auf zweidimensionalen PEG-Diacrylat-Hydrogelen mit RGD-Peptid auf $CD34^+$ HSPZ bestimmt. Dabei sank der relative Zellanteil von $CD34^+$ an der Gesamtpopulation kontinuierlich und war nach 14 Tagen nicht signifikant verschieden zwischen nano- und unstrukturierten Oberflächen. Lediglich die $CD34^+$ Absolutzellzahl war für nanostrukturierte Gele mit höheren Dll1-Dichten im Vergleich zum unstrukturierten Hydrogel (ohne Dll1) signifikant erhöht, jedoch nicht innerhalb der nanostrukturierten Oberflächen. Auch das über klonogenem *Assay* gemessene myeloide Differenzierungspotential der expandierten Populationen war zu jedem Analysezeitpunkt zwischen verschiedenen Oberflächen gleichartig.

Obwohl in beiden Studien eine Ligandenabhängigkeit bei einer bestimmten Dll1-Dichte auf die $CD34^+$ Zellzahl berichtet wurde, konnte ähnliches HSPZ-Verhalten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Das könnte zum einen daran liegen, dass andere Liganden und damit

auch andere Signalwege angesprochen wurden. Zum anderen wurde bei Delaney et al. (2005) nur die absolute Zahl von $CD34^+$ Zellen erhoben und nicht ins Verhältnis der Gesamtpopulation bezogen, deren Zellviabilität auch ligandendichteabhängig ist. Auch bei Winkler et al. (2017b) wurden nur signifikante Unterschiede in der Gesamtzellzahl, nicht jedoch im relativen $CD34^+$ Anteil gesehen, woraus sich in Multiplikation signifikant verschiedene $CD34^+$ Absolutzellzahlen allein auf Basis unterschiedlicher Gesamtzellzahlen ergaben. Da die absolute $CD34^+$ Zellzahl als alleinige Maßgröße, um einen ligandenabhängigen Effekt auf die selbsterneuerende Teilung von HSPZ zu bestimmen, ungenügend erscheint, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich der Grad der Differenzierung untersucht.

4.4.2. Die Abhängigkeit des Differenzierungsgrades von Ligandentyp und -dichte

Wie in der Einleitung Abschnitt 1.1.1 im klassisch hierarchischen Differenzierungsmodell von HSZ dargestellt, stellt die CD34 Proteinexpression allein kein akkurates Maß für das Stammzell- bzw. Differenzierungspotential von HSPZ dar, da der Großteil der Zellen keine multipotenten Progenitoren darstellt (Majeti et al., 2007). Aus diesem Grund wurde zum einen die Phänotypisierung auf Coexpression zweier weiterer hämatopoetische HSPZ-Marker ausgeweitet und zum anderen die Klonogenität in Bezug auf myeloide Differenzierung der kultivierten Zellen bestimmt.

Dazu wurden zusätzlich zu CD34 die CD38 und CD45RA Marker genutzt, die auf primitiven Zellen fehlen bzw. nur sehr schwach exprimiert sind (Cossarizza et al., 2017). Über diese Färbekombination konnten $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ Zellen als Population mit hohem Stammzellpotential (HSZ bis MPP) und $CD34^+CD38^+$ Zellen als determinierte Progenitoren voneinander abgegrenzt werden. Analytisch wurde ein phänotypischer Differenzierungsgrad (Differenzierungsquotient Q) bestimmt, der auf den Differenzierungsgrad der Kultur mit höchster Integrin $\alpha_4\beta_1$-Ligandendichte (PS154) normiert wurde (Q_{norm}). Der mittlere Q_{norm} steigt für beide Peptid-Experimentreihen von Kulturtag 6 zu 12 an, was sich auch in einer für alle Zellpopulationen reduzierten Gesamtkoloniezahl des CFU-*Assay* zeigte.

Da der Differenzierungsquotient Q aus der Relation determinierter Progenitoren mit $CD34^+CD38^+$ Phänotyp zu multipotenten Zellen mit $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ Phänotyp hervorgeht, wäre erwartbar, dass ein geringerer Differenzierungsgrad mit einer vermehrten Bildung von Kolonien des Typs CFU-GEMM verbunden ist. Das konnte aber zu beiden Analysezeitpunkten bei keiner der kultivierten Zellpopulationen im Vergleich miteinander festgestellt werden. Das liegt vor allem daran, dass die Zahl multipotenter Progenitoren in der Zellpopulation nach 6 Tagen so gering ist, dass im Durchschnitt nur 1–4 CFU-GEMM auf weniger als 100 Kolonien insgesamt gezählt wurden. Die Messung mittels CFU-*Assay* ist deshalb nicht sensitiv genug, um mögliche Veränderungen feststellen zu können.

Der Differenzierungsgrad der HSPZ-Populationen zeigte eine Ligandentypabhängigkeit, indem die Experimentreihe für den zellulären Liganden *IDSP* nach 12 Kulturtagen insgesamt eine fortgeschrittenere Differenzierung als für den extrazellulären Liganden *LDV* aufwies. Im zeitlichen Verlauf ist diese Entwicklung unterschiedlich ausgeprägt. Während der mittlere Q_{norm} beider Experimentreihen an Kulturtag 6 noch vergleichbar hoch waren, stieg dieser bis Kulturtag 12 für die *IDSP*-Peptid-Experimentreihe signifikant an, aber nicht für die *LDV*-Peptid-Experimentreihe. Der für die *IDSP*-Peptid-Experimentreihe signifikante Anstieg resultierte dadurch, dass der Differenzierungsgrad der Zellpopulation auf der Normierungsoberfläche - dem nanostrukturierten PS154 mit *IDSP*-Peptidfunktionalisierung - nach 6 Tagen im Vergleich zu allen anderen Oberflächen den höchsten Differenzierungsquotient Q, nach 12 Tagen jedoch den niedrigsten Differenzierungsquotient Q aufwies. Der Unterschied im Differenzierungsgrad zwischen *LDV* und *IDSP* korrespondiert dabei mit dem unterschiedlichen Einfluss der Liganden auf Polarisation und Motilität (siehe Abschnitt 4.2), die bereits nach zwei Kulturtagen erhoben wurden. Dies weist insgesamt auf eine zeitlich dynamische Änderung des Differenzierungseinflusses des *IDSP*-Peptids hin.

In diesem Zusammenhang konnte am Kulturtag 6 eine ausgeprägte negative Korrelation zwischen normiertem Differenzierungsgrad Q_{norm} und Partikelabstand d für den Liganden *IDSP* festgestellt werden. Daraus ergibt sich ein signifikant erniedrigter Q_{norm} der PS3365-Kultur im Vergleich zum Q_{norm} der PS154-Kultur, welcher die höchste *IDSP*-Peptiddichte angeboten wurde. Scheinbar treibt die höchste *IDSP*-Peptiddichte innerhalb von 6 Tagen die Differenzierung von $CD34^+$ HSPZ zu $CD34^+CD38^+$ voran, während die geringste *IDSP*-Peptiddichte sogar einen Q_{norm} unterhalb dem der unstrukturierten Kontrolle zeigt. Die ausgeprägte Abhängigkeit der Differenzierung von der *IDSP*-Ligandendichte wurde nach jetziger Kenntnis bisher noch nicht berichtet. Daher kann im Folgenden über denkbare Ursachen für die Wechselwirkung zwischen Biohybridgelsystem und Zellverhalten nur spekuliert werden.

Die Integrin $\alpha_4\beta_1$-spezifische Minimalsequenz *IDSP* ist dem Membranprotein VCAM-1 entlehnt. Ein Einzeleffekt des VCAM-1 auf HSPZ wurde u. a. von Mende et al. (2019) im Rahmen einer Interaktomanalyse von HSZ und Nischenzellen bestimmt. Dabei wurden murine $Lin^-Kit^+Sca\text{-}1^+$ Zellen, eine primitive Population, welche HSZ und MPP umfasst, in mit Zytokinen (SCF, IL-3, IL-6) versetztem Medium 8 Tage lang in Einzelzellkultur kultiviert. Die Zugabe von ungebundenem, rekombinant murinem VCAM-1 (500 ng/ml) reduzierte signifikant das Koloniewachstum (Mende et al., 2019). Da es keine oberflächendefinierte Präsentation von VCAM-1 gab und VCAM-1 gelöst im Medium verteilt war, kann nicht auf eine lokale VCAM-1 Konzentration um die Zelle oder gar $\alpha_4\beta_1$-Rezeptordichte geschlossen werden. Dennoch zeigt diese Studie, dass die selbsterneuernde Teilung von $Lin^-Kit^+Sca\text{-}1^+$ Zellen durch Interaktion mit VCAM-1 eingeschränkt wurde. Dies untermauert die Beobachtung des erhöhten Differenzierungsgrades bei höchster *IDSP*-Ligandendichte in dieser Arbeit.

Die Integrin $\alpha_4\beta_1$-spezifische Minimalsequenz *LDV* ist dem EZM-Protein Fibronektin entlehnt. Im Unterschied zu *IDSP* konnte bei *LDV* am Kulturtag 6 unter den Zellpopulationen weder signifikant verschiedene Differenzierungsgrade noch eine Abhängigkeit des Q_{norm} von der Peptiddichte festgestellt werden. Es ergab sich aber für die Zellpopulationen mit höchster *LDV*-Peptidligandendichte - sowohl mit als auch ohne SDF-1α-Gelbeladung - ein signifikant erhöhter Q_{norm} im Vergleich zu TCP. Eine auf den ersten Blick in ihrer Grundaussage widersprechende Studie zur *LDV*-peptiddichteabhängigen HSPZ-Expansion ist die von Chen et al. (2012). In deren Studie wurden humane $CD34^+$ Zellen in Expansionsmedium (mit SCF, TPO, Flt3L) für 10 Tage auf kovalent an TCP gebundene Oligopeptid CS1 (EILDVPST)-Oberflächen kultiviert. Die Zellpopulation, die auf hoher CS1-Dichte (2,40 µmol/cm^2) wuchs, hatte im Vergleich zur Population auf 1,5-fach geringerer CS1-Dichte und im Vergleich der Population auf hoher Kontrollpeptid (EILEVPST)-Dichte die $CD34^+CD45^+$-Zellzahl signifikant erhöht. $CD34^+CD45^+$ Zellen wurden in der Studie jedoch nicht als Progenitoren, sondern als HSZ definiert. Die CD34CD45-Zweifachfärbung diente dabei der Anwendung eines etablierten Protokolls nach Keeney et al. (1998) zur präzisen Zählung von $CD34^+$ mittels Durchflusszytometrie, da CD45 ein allgemeiner Leukozytenmarker ist und von $CD34^+$ moderat (*dim*) coexprimiert wird. Für eine Beurteilung des Differenzierungsgrades hätte aber eine Subphänotypisierung der $CD34^+CD45^+$-Population vorgenommen werden müssen (Dmytrus et al., 2016). Es ist wahrscheinlich, dass die in der Studie von Chen et al. (2012) den $CD34^+$ Zellen angebotene hohe CS1-Dichte die Proliferation und Differenzierung zu $CD34^+CD38^+$ vorangetrieben hat, da z. B. $CD34^+CD45^+$ Zellen aus dem Knochenmark zugleich eine sehr hohe Coexpression von CD38 aufweisen (Median ≈95%; Carvalho et al., 2009). Das wäre konsistent mit der Beobachtung des im Vergleich zum TCP signifikant erhöhten Q_{norm} der Kulturen nach 6 Tagen auf Biohybridhydrogelen mit höchster *LDV*-Peptidligandendichte.

Wie lässt sich aber die Abhängigkeit des Q_{norm} von der *IDSP*-Peptiddichte, nicht aber von der *LDV*-Peptiddichte erklären, wenn sowohl *LDV*- als auch *IDSP*-Peptid, beide Liganden denselben Rezeptor, das Integrin $\alpha_4\beta_1$, ansprechen? Wie im Abschnitt 4.2 diskutiert, ist es wahrscheinlich, dass die Affinität der offenen $\alpha_4\beta_1$ Konformation zu *IDSP* höher ist als zu *LDV* (Li und Springer, 2018). Möglicherweise gibt es im Gegensatz zum extrazellulären Liganden *LDV* für den zellulären Liganden *IDSP* einen mit der Ligandendichte graduell abgestuften Differnzierungseinfluss. Für *LDV* könnte es einen Grenzwert im Sinne einer kritischen Dichte geben, die Differenzierungseffekte hervorrufen kann. Dies wäre angelehnt an der kritischen Dichte, die nötig ist, um über Rezeptorclustern eine effektive Adhäsion zu gewährleisten - wie das bisher anhand der RGD-Sequenz, dem Bindemotiv für Integrin $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ - bestimmt wurde (Altrock et al., 2012; Muth et al., 2013).

Schließlich ist die isolierte Betrachtung von Effekten durch *LDV* im physiologischen Kontext schwierig zu diskutieren, da neben *LDV* im Fibronektin zugleich weitere Integrinbindesequenzen, wie z. B. RGD, präsentiert werden (siehe Abschnitt 4.2). Wie entscheidend sich ein

simultanes Ansprechen von $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1/\alpha_v\beta_3$ auf das HSPZ-Verhalten *in vitro* auswirken kann, wurde anhand der Synergie der RGD- und LDV-Sequenz aus Fibronektin von Yokota et al. (1998) gezeigt. Die Koloniebildung, d. h. Gesamtkoloniezahl im CFU-*Assay*, humaner $CD34^+$ Zellen war nur dann signifikant vergrößert, wenn die Zellen mit im Medium gelösten Fibronektinfragmenten vorinkubiert wurden, die beide Bindemotive, RGD und LDV, enthielten (Yokota et al., 1998). Neben dem Zellteilungsverhalten von HSPZ allgemein machten Huygen et al. (2002) eine interessante Beobachtung zu den Phasen innerhalb des Zellzyklus in *ex vivo* Kultur. Frisch aus Nabelschnurblut isolierte $CD34^+$ Zellen befinden sich in der G_0/G_1-Phase, in der die Interaktion zu Fibronektin über $\alpha_4\beta_1$ Integrin dominiert. Nach der mitogenen Aktivierung (mit SCF, TPO, Flt3L) wird, besonders in der S-Phase, die Interaktion zu Fibronektin über $\alpha_5\beta_1$ Integrin bevorzugt (Huygen et al., 2002). Dabei schwankt während des Zellzyklustransits von HSPZ nicht nur die Bindung zu Fibronektin, sondern auch die zu VCAM-1 reversibel (Huygen et al., 2002; Gothot et al., 2003). Diese Beobachtungen verdeutlichen die Wichtigkeit des Integrin $\alpha_4\beta_1$ für HSPZ in der Zellzyklusruhe (G_0) und während des Eintritts in den aktiven Zellzyklus (G_1-Phase).

Da Integrin $\alpha_4\beta_1$ wie alle Integrine ein Rezeptor der Mechanotransduktion ist, bleibt fraglich, inwieweit eine vom intrazellulären Aktomyosin-Komplex über die molekulare Kupplung wirkende Krafttransduktion zur Hydrogeloberfläche die Potenz hat, Differenzierung in HSPZ voranzutreiben oder zu unterdrücken. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Korrelation zwischen *IDSP*-Ligandendichte und Q_{norm} impliziert lediglich eine Wechselwirkung, gibt aber nicht die absolute Richtung der Differenzierung vor. *In vitro* Studien mit adhärenten Zellen zeigten bereits, dass die Differenzierung durch die Spezifität der Integrinbindung (bei Osteoblasten, Keselowsky et al., 2005) und der präsentierten Matrixsteifigkeit (bei mesenchymalen Stammzellen, Huebsch et al., 2010; Engler et al., 2006) beeinflusst wird. Dass die mechanischen Eigenschaften der Mikroumgebung einer Zelle einen direkten Einfluss auf die transkriptionelle Regulation der Genexpression haben kann, wurde über die transkriptionellen Coaktivatoren *yes-associated protein* (YAP) und *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif* (TAZ) beschrieben (Dupont et al., 2011; Dupont, 2016). Die Modulation des Stammzellschicksals durch YAP/TAZ ist bisher für viele verschiedene Stammzellen beschrieben worden (Lian et al., 2010; Heng et al., 2020; Li et al., 2021b). Für HSZ konnte die Wichtigkeit der YAP-Aktivierung bisher nur für die embryonale Hämatopoese dargelegt werden (Lundin et al., 2020) und eine *Yap/Taz*-Deletion in Mäusen störte die adulte Hämatopoese nicht (Donato et al., 2018). Die Ligandentyp- und Ligandendichteabhängigkeit des Differenzierungsgrades, wie in dieser Arbeit auf *IDSP*-nanostrukturierten Biohybridhydrogelen festgestellt, könnte daher möglicherweise durch die Beteiligung des Transkriptionsfaktors YAP oder TAZ reguliert werden. Um dieser Hypothese nachzugehen wäre eine Transkriptomanalyse notwendig, die jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurde.

4.4.3. Der marginale Einfluss von SDF-1α auf die HSPZ-Differenzierung

Schließlich bleibt noch zu diskutieren, inwiefern die Beladung des unstrukturierten und PS154-nanostrukturierten Biohybridhydrogels mit dem Zytokin SDF-1α Einfluss auf die Differenzierung von HSPZ genommen hat. Wie in Abschnitt 4.2.3 erwähnt, waren nur rund 72% der Startpopulation $CD184^+$ Zellen und damit rezeptiv für SDF-1α über CXCR4. Ein veränderter Differenzierungsgrad, der auf die SDF-1α-Wirkung und die Verschiedenheit der Kulturoberflächen zurückführbar ist, war lediglich in Tendenzen an Kulturtag 6 zu sehen.

Auf unstrukturierten Geloberflächen reduzierte die Bereitstellung von SDF-1α durch die Gelbeladung den Differenzierungsgrad der Zellpopulation. Entsprechend war das myeloide Koloniebildungspotenzial, d. h. die Gesamtkoloniezahl der Zellpopulation auf unstrukturierten Gelen mit SDF-1α-Beladung nach 6 Tagen im Vergleich zu unstrukturierten Gelen ohne SDF-1α-Beladung leicht erhöht (*IDSP*-Peptid-Experimentreihe, Donoren 1–3) bzw. signifikant erhöht (*LDV*-Peptid-Experimentreihe, Donoren 4–6). Diese signifikant erhöhte Gesamtkoloniezahl bei der *LDV*-Peptid-Experimentreihe ging einher mit einer signifikant erhöhten CFU-GM/G/M- sowie BFU-E-Koloniebildung der Kultur auf unstrukturierten Gelen mit SDF-1α-Beladung im Vergleich zu unstrukturierten Gelen ohne SDF-1α-Beladung. Das Ansprechen des CXCR4 (CD184) durch SDF-1α-Bindung konnte anhand des $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellanteils und zusätzlich durch die MFI von CD184-APC dieser Subpopulation abgeleitet werden. Diese waren auf unstrukturierten Gelen mit SDF-1α-Beladung im Vergleich zu unstrukturierten Gelen ohne SDF-1α-Beladung für die *IDSP*-Peptid-Experimentreihe signifikant und für die *LDV*-Peptid-Experimentreihe tendenziell reduziert. Es wird vermutet, dass CXCR4 durch SDF-1α-Bindung aktiviert und der Rezeptor-Ligand-Komplex internalisiert worden ist. Es ist bekannt, dass SDF-1 nach Rezeptoraktivierung die CXCR4-Internalisierung triggern kann (Scala, 2015; Sadri et al., 2022). Kräter et al. (2017) beobachteten mithilfe von SDF-1, gebunden an dezellularisierten EZM-Gerüsten, dass nur die adhärenten humanen HSPZ das EZM-gebundene SDF-1 internalisierten, während die nichtadhärenten HSPZ nur löslich zugegebenes SDF-1 internalisierten. Wie bereits diskutiert, bleibt in der vorliegenden Arbeit unklar, in welchem Grad die HSPZ adhärierten und inwieweit das von der Biohydridhydrogelmatrix immobilisierte SDF-1α oder das im Medium gelöste SDF-1α bevorzugt gebunden wurde.

Die tendenzielle Reduktion der Differenzierung von HSPZ auf Biohybridhydrogelen mit SDF-1α-Verfügbarkeit deckt sich mit Beobachtungen in anderen Studien, in denen die Funktion der CXCR4/SDF-1-Achse für HSPZ untersucht wurde. In der *in vitro* Studie von Mende et al. (2019) wurde bei Zugabe von ungebundenem, rekombinant murinem SDF-1 (200 ng/ml) zum Zytokinmedium (SCF, IL-3, IL-6) nach 8 Tagen ein signifikant erhöhtes Koloniewachstum von murinen $Lin^-Kit^+Sca\text{-}1^+$ Zellen beobachtet, was den fördernden Einfluss auf die selbsterneuernde Zellteilung unterstreicht. In *in vivo* Studien im murinen SDF-1- bzw. CXCR4-Deletionsmodell wurde von reduzierter Quieszenz und Hyperproliferation der HSPZ (Nie

et al., 2008; Tzeng et al., 2011) sowie erhöhtem oxidativen Stress in HSZ (Zhang et al., 2016) berichtet.

Die Kombination aus spezifischer Integrin $\alpha_4\beta_1$-Bindesequenz mit SDF-1α-Beladung wurde in dieser Arbeit nur mit der höchsten Partikeldichte (PS154; Partikelabstand ca. 26 nm) getestet. Wie in Abschnitt 4.2 erläutert, ist unklar, ob bei dieser hohen Ligandendichte auf der relativ weichen Hydrogelmatrix eine effektive $\alpha_4\beta_1$-Aktivierung stattfand. Daher gilt folgende Argumentation unter der Annahme einer potentiellen $\alpha_4\beta_1$-Aktivierung. Tendenziell scheint das jeweilige Kontrollpeptid (in höchster AuNP-Dichte) die Differenzierung weniger voranzutreiben als die jeweilige spezifische Integrin $\alpha_4\beta_1$-Sequenz das vermag. Die Kombination aus SDF-1α-Gelbeladung mit spezifischem Integrin $\alpha_4\beta_1$-Liganden (in höchster Ligandendichte) zeigte im Vergleich zum unbeladenen Gel nur für den zellulären Liganden *IDSP* eine marginale Tendenz zu verringerter Differenzierung. Da der $CD34^+CD49d^+CD184^+$ Zellanteil und zusätzlich die MFI von CD184-APC dieser Subpopulation auf PS154+*IDSP*+SDF-1α Gelen im Vergleich zu dieser Subpopulation auf PS154+*IDSP* Gelen signifikant reduziert war, wird geschlussfolgert, dass CXCR4 (CD184) durch SDF-1α-Bindung aktiviert und der Rezeptor-Ligand-Komplex internalisiert worden ist. Dies war für die *LDV*-Peptid-Experimentreihe nicht feststellbar. Der Prozess der SDF-1-induzierten CXCR4-Internalisierung erfordert die Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptorkinasen, die CXCR4-Phosphorylierung und Rekrutierung von β-Arrestin (Haribabu et al., 1997; Orsini et al., 1999; Cheng et al., 2000; Sadri et al., 2022). Neben solch einer möglichen Stimulation des β-Arrestin-Signalwegs konvergiert die aktivierte SDF-1/CXCR4-Achse über G-Protein gekoppelte Signaltransduktion intrazellulär mit der Integrinsignalgebung (siehe Einleitung 1.1.2.3) und mündet in einem resultierende Effekt dieses *Crosstalks*. Man könnte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit auf einen gegenläufigen Effekt von differenzierungsfördernder hoher $\alpha_4\beta_1$-Ligandendichte und differenzierungshindernder SDF-1α-Wirkung schließen. Anders als für die Zelladhäsion berichtet wurde, für die SDF-1α die $\alpha_4\beta_1$-vermittelte Adhäsion synergetisch verstärkt (siehe Einleitung 1.1.2.3), deutet es im Hinblick auf die HSPZ-Differenzierung, vor allem auf nanostrukturierten *IDSP*-Gelen, effektorisch eher auf ein antagonistisches Zusammenspiel zwischen SDF-1α und $\alpha_4\beta_1$ hin. Ob der Effekt der SDF-1α-Verfügbarkeit durch die matrixgebundene oder lösliche Form von SDF-1α oder das gleichzeitige Vorhandensein beider Formen vermittelt wurde, bleibt offen.

Schließlich muss im Zusammenhang mit dem Differenzierungsverhalten von HSPZ auf den Biohybridhydrogelen darauf hingewiesen werden, dass die Kulturen unter dem maßgeblichen Einfluss der frühwirkenden hämatopoetischen Zytokinen TPO, SCF, Flt3L und IL-3 standen. Die Supplementierung mit diesem Zytokinmix war erforderlich, um aus der limitierten Zahl an $CD34^+$ einer Nabelschnurblutspende durch Expansion genügend Zellen für eine robuste weitergehende Analyse wie z. B. der Phänotypisierung mittels Durchlfusszytometrie erhalten zu können. Für andere Hydrogelsysteme, die eine *ex vivo* Expansion von $CD34^+$ forcierten,

ist die Zytokinbeigabe ebenso erforderlich. Bspw. sahen Bai et al. (2019) in ihren Vorexperimenten, dass $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut ohne Zytokinbeigabe während 14 Tagen keine Zellexpansion, aber unter Zugabe von TPO, SCF, Flt3L, IL-3 und IL-6 eine ca. 22-fache Expansion aufwiesen. Mit diesem Zytokinmedium proliferierten $CD34^+$ HSPZ in einem dreidimensionalen zwitterionischen Hydrogel zunehmend bis Tag 7 (Dominanz von G_1 und $S+G_2$/M-Phasen), während dann aufgrund der limitierenden Kapazität des dreidimensionalen Gels der Anteil an Zellen in G_0-Phase zunehmend bis >95% anstieg, sodass der Anteil an $CD34^+CD45RA^-$ über die 14 Kulturtage hinweg relativ konstant bei ca. 76% lag. Gefolgt von einer weiteren 10-tägigen Expansion in einem frischen Gel erreichte man eine zu TCP massiv erhöhte absolute Anzahl von phänotypischen HSZ ($CD34^+CD38^-CD45RA^-CD49f^+CD90^+$). Maßgeblich bei diesem Experiment von Bai et al. (2019) war die Inhibierung der Differenzierung, was auch anhand des Expressionprofils (mRNA) durch Herabregulierung von Genen der Differenzierung, Zellzyklusaktivierung, Zytokinproduktion und Hochregulation von Genen der Adhäsion zu erkennen war. Selbstverständlich war die Dreidimensionalität das dominierende Charakteristikum des Gelsystems bei Bai et al. (2019) und ist daher nicht vergleichbar mit den zweidimensionalen Biohybridhydrogelen in dieser Arbeit. Es soll damit nur deutlich gemacht werden, wie eine biphasische Kombination aus einer frühen zytokininduzierten Expansionsphase und einer späten matrixdominierten Differenzierungsinhibitionsphase effektiv HSZ expandieren kann. Das liegt womöglich u. a. darin begründet, dass LT-HSZ ihre selbsterneuerenden, symmetrischen Teilungen „zählen" und *in vivo* nach vier solcher Teilungen in einen Zustand der Dormanz übergehen, da eine fünfte Teilung sonst mit dem Verlust ihres Langzeit-Regenerationspotentials verbunden sein würde (Bernitz et al., 2016). Bei einer angenommenen Generationszeit von ca. 24 h wären damit selbsterneuerende Teilungen nur zu Beginn der Kultur bis zu ca. 5 Tagen dominierend. Dies könnte die Beschränkung der Differenzierungseffekte auf die ersten 6 Kulturtage in der vorliegenden Arbeit erklären.

5. Zusammenfassung und Perspektive

Um die funktionellen Interaktionen humaner HSPZ mit ihrer physiologischen Nische zu verstehen, sind artifizielle Nischenmodelle zur Untersuchung einzelner biochemischer und biophysikalischer Nischenbestandteile hervorragend geeignet. Dabei können vor allem bei zweidimensionalen Zellkulturplattformen einzelne Parameter besonders gut isoliert und justierbar betrachtet werden, weil damit definierte Strukturen im Nanometerbereich einfacher erzeugt und deren Zellinteraktion auf molekularer Ebene unmittelbar studiert werden können. Daher war es Zielsetzung dieser Arbeit, ein zweidimensionales, nanostrukturiertes Zellkultursubstrat auf Hydrogelbasis mit multiplen Funktionen für die *in vitro* HSPZ-Kultur zu entwickeln, und es hinsichtlich seiner einzelnen und zusammenspielenden Funktionalitäten in Wechselwirkung mit HSPZ zu untersuchen. Dabei standen hier speziell folgende Fragen im Fokus: Hat hat die $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Peptidligandendichte einen Einfluss auf das HSPZ-Verhalten? Sind die zelluläre und die extrazelluläre $\alpha_4\beta_1$ Integrinbindesequenz gleichwertig oder induzieren sie unterschiedliches HSPZ-Verhalten? Existiert ein kooperativer Effekt zwischen gleichzeitig aktiviertem $\alpha_4\beta_1$ Integrin- und SDF-1α-Rezeptor, der sich im HSPZ-Verhalten widerspiegelt?

Um diese Fragen beantworten zu können, wurde das hier verwendete Biohybridhydrogel entwickelt, welches drei elementare Funktionalitäten der Knochenmarksnische nachbildet: (i) die Matrixelastizität, (ii) die Bindung und Freisetzung von Zytokinen und (iii) die nanostrukturelle Präsentation von zelladhäsiven Liganden. Die Matrixelastizität der Hydrogele blieb dabei innerhalb des physiologischen Knochenmarkssteifigkeitsbereiches unverändert. Die Nanostrukturierung der Hydrogeloberfläche über AuNP in quasi-hexagonaler Anordnung erfolgte für vier verschiedene Partikelabstände, was durch Immobilisation von Peptidkonstrukten, die entweder das zelluläre *IDSP* oder das extrazelluläre *LDV* als Integrin $\alpha_4\beta_1$-spezifisches Bindemotiv enthielten, eine Variation der präsentierten Ligandendichte ermöglicht. Die biohybride Matrix aus kovalent verknüpftem sPEGthiol und HM war durch die Heparinketten außerdem in der Lage, mit hoher Kapazität und Spezifität das Chemokin SDF-1α elektrostatisch und reversibel zu binden, was die Untersuchung von potentiellen synergetischen Effekten der aktivierten SDF-1α- und $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Signalwege auf das HSPZ-Verhalten erlaubt.

Der Einfluss dieser multifunktionalen Geleigenschaften wurde in phänomenologischen Untersuchungen an aus Nabelschnurblut isolierten $CD34^+$ HSPZ in Form von Zellpolarisierung, Zellmotilität, Proliferation und Ausprägung der Differenzierung untersucht. Die entsprechenden

Schlüsselergebnisse der beobachteten Effekte aufgrund der HSPZ-Wechselwirkungen mit den Geloberflächen sind in Abb. 5.1 schematisch dargestellt und im Folgenden zusammengefasst:

- Der Polarisierungsgrad der HSPZ-Kulturen zeigte eine deutliche Abhängigkeit vom Ligandentyp *IDSP* bzw. *LDV*, jedoch keine Abhängigkeit von der Ligandendichte. Der Anteil polarisierter Zellen war auf *IDSP*-funktionalisierten Biohybridhydrogelen insgesamt höher.
- Der Grad der Motilität der polarisierten Zellen war für beide $\alpha_4\beta_1$ Integrinliganden unabhängig von der Ligandendichte. Die Geschwindigkeiten migrierender HSPZ waren auf *IDSP*-Gelen gegenüber *LDV*-Gelen insgesamt signifikant erhöht. Sowohl dieser migrationsfördernde als auch der polarisationsfördernde Effekt kann primär mit der für *IDSP* höheren Bindungsaffinität des aktivierten $\alpha_4\beta_1$ Integrins erklärt werden.
- Die Beladung der Gele mit SDF-1α hatte hauptsächlich Einfluss auf die Polarisation, was sich in einer klaren Erhöhung des Polarisationsgrades der HSPZ-Population äußerte. Die Motilität polarisierter HSPZ blieb von der SDF-1α-Verfügbarkeit dagegen unbeeinflusst. Die Induktion der Zellpolarisation durch SDF-1α bedeutet nicht zugleich eine Verstärkung der Motilität von HSPZ auf den Biohybridhydrogelen und weist auf eine unterschiedliche Regulation beider Prozesse hin.
- Nach 12 Kulturtagen konnten keine Unterschiede in der Gesamtzellzahl zwischen allen Oberflächen festgestellt werden. Zwar wurde in der *LDV*-Experimentreihe nach 6 Kulturtagen auf Gelen mit höchster Partikeldichte (ohne SDF-1α-Beladung) die niedrigste Gesamtzellzahl bestimmt, doch die absolute $CD34^+$ Zellzahl blieb unverändert. Die Proliferation von HSPZ insgesamt und die Expansion $CD34^+$ Zellen im Speziellen sind daher unabhängig von einer Nanostrukturierung mit den Integrin $\alpha_4\beta_1$-Liganden.
- Auf die Differenzierung von HSPZ hatte SDF-1α einen geringen Effekt, was nach 6 Kulturtagen bei unstrukturierten Gelen durch eine leichte Reduktion des Differenzierungsgrades und eine leicht erhöhte myeloide Gesamtkoloniezahl des CFU-*Assays* zu erkennen war.
- Nach 6 Kulturtagen ergab sich für die nanostrukturierte Präsentation von *IDSP* auf den Hydrogeloberflächen eine ausgeprägte negative Korrelation zwischen dem normiertem Differenzierungsgrad Q_{norm} und dem Partikelabstand d. Somit trieb die höchste *IDSP*-Peptiddichte die Differenzierung von $CD34^+$ HSPZ zu $CD34^+CD38^+$ am meisten voran. Der Einfluss von verfügbarem SDF-1α in Kombination mit dieser höchsten *IDSP*-Peptiddichte äußerte sich in einem marginal reduzierten Differenzierungsgrad. Im Gegensatz dazu waren der normierte Differenzierungsgrad und die *LDV*-Peptiddichte unkorreliert und die Kombination der höchsten *LDV*-Peptiddichte mit SDF-1α-Verfügbarkeit beeinflusste den Differenzierungsgrad nicht.

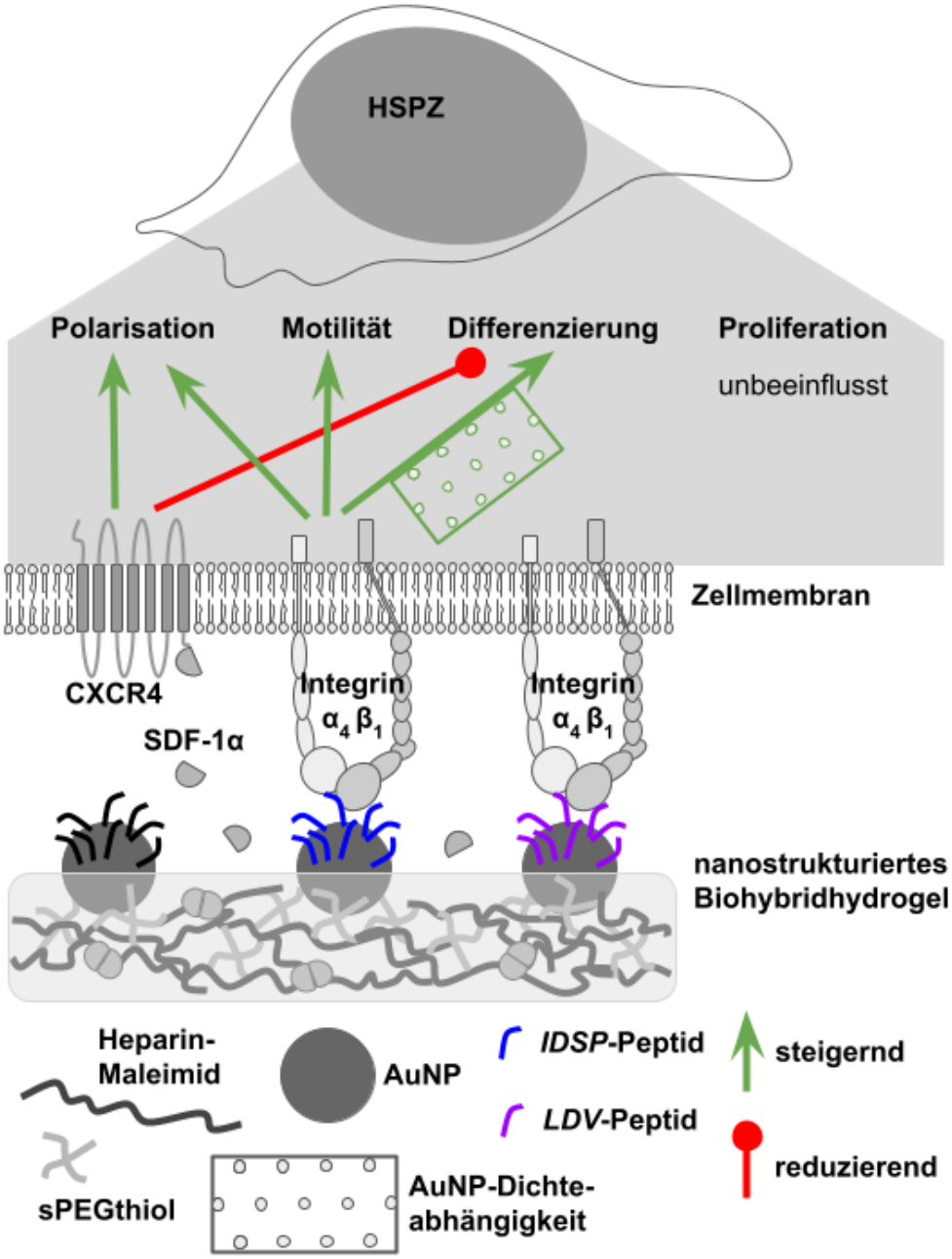


Abbildung 5.1.: Schema der beobachteten Effekte des multifunktionalen nanostrukturierten Hydrogelsystems auf HSPZ. Dargestellt sind die verschiedenen Funktionalitäten des Gelsystems: I. Nanostrukturelle Präsentation des zellulären *IDSP*- oder des extrazellulären *LDV*-Integrin $\alpha_4\beta_1$-Liganden, immobilisiert an AuNP definierter Dichte; II. Elastizität der Hydrogelmatrix übertragen durch AuNP–Peptid–$\alpha_4\beta_1$ Integrin; III. Verfügbarkeit von SDF-1α durch Matrix-Bindung und -Freisetzung. Die Funktionalitäten haben entweder einen steigernden oder reduzierenden Effekt (grüner Pfeil bzw. rote Verknüpfung) auf das Zellverhalten in Form von Polarisation, Zellmotilität, Differenzierungsgrad und Proliferation.

Die Ergebnisse zeigen insgesamt eine deutliche Interaktion zwischen HSPZ und dem hier untersuchten multifunktionalen, nanostrukturierten Biohybridhydrogelsystem, welches sich daher als geeignete Zellkulturplattform zum systematischen Studium des HSPZ-Verhaltens erweist, um die Fragestellung dieser Arbeit zu beantworten. Dass die $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Peptidligandendichte einen Einfluss auf das HSPZ-Verhalten hat, konnte hier nur für die Differenzierung der HSPZ auf nanostrukturierten *IDSP*-Gelen festgestellt werden, während Proliferation, Polarisation und Motilität von der Ligandendichte unbeeinflusst blieb. Auch konnte die Frage, ob die zelluläre oder extrazelluläre Integrinbindesequenz verschiedene Einflüsse auf das HSPZ-Verhalten haben, klar mit ja beantwortet werden, da deutliche Unterschiede in Bezug auf Polarisation und Motilität beobachtet wurden und nur für *IDSP* ein Differenzierungseinfluss feststellbar war. Schließlich konnte ein kooperativer Effekt zwischen gleichzeitig aktiviertem $\alpha_4\beta_1$ Integrin- und SDF-1α-Rezeptor auf HSPZ im Sinne einer Synergie für die Zellpolarisation bei beiden Integrinliganden festgestellt werden. Dagegen scheint der resultierende Effekt von SDF-1α in Kombination mit dem *IDSP*-Liganden auf die HSPZ-Differenzierung antagonistischer Natur zu sein.

Dabei kann das signifikant unterschiedliche HSPZ-Verhalten zwischen zellulärem (*IDSP*) und extrazellulärem (*LDV*) Integrinbindemotiv am wahrscheinlichsten durch die unterschiedliche Bindungsaffinität des aktivierten $\alpha_4\beta_1$ Integrins für die verschiedenen Liganden erklärt werden. Bei der durch die *IDSP*-Ligandendichte beeinflusste HSPZ-Differenzierung bleibt es allerdings noch unklar, ob eine effizientere $\alpha_4\beta_1$ Integrin-Aktivierung bei hohen oder niedrigen *IDSP*-Ligandendichten stattfindet. Auch förderte die Gelbeladung mit SDF-1α die Polarisierung der HSPZ-Population und reduzierte tendenziell den Differenzierungsgrad. All diese Effekte waren nur innerhalb des ersten Kulturintervalls von 6 Tagen messbar gewesen, was generell auf eine frühe Determinierung primitiver HSPZ unter diesen Versuchsbedingungen für ihr weiteres Entwicklungsschicksal deutet.

Eine Limitierung der hier präsentierten Versuchen ist die Beschränkung auf wenige und relative große Zeitintervalle. Weitergehende Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Differenzierung sind daher notwendig, um Änderungen in der Differenzierung aufgrund extrinsischer Signale der Oberflächen innerhalb des frühen Zeitfenster von $\leq$6 Kulturtagen aufzulösen. Auch wurde bisher der Differenzierungseinfluss von SDF-1α nicht für die größeren Partikelabstände (37,0$\pm$2,6 nm (PS288); 77,7$\pm$8,4 nm (PS1058); 124,3$\pm$14,5 nm (PS3365)) und damit geringeren *IDSP*-Ligandendichten erfasst, da sich evtl. ein synergetisch erniedrigter Differenzierungsgrad bei geringster (PS3365) *IDSP*-Ligandendichte ergeben könnte. Des Weiteren beschränkte sich die Differenzierungsanalytik allein auf eine Immunphänotypisierung der Zellpopulation mit $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ Zellen als Population mit hohem Stammzellpotential (HSZ bis MPP) und $CD34^+CD38^+$ Zellen als determinierte Progenitoren. Da mit einer $CD34^+$ Startpopulation gearbeitet wurde, deren $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ Zellanteil donorvariabel schwankte, würde eine phänotypische Aufreinigung dieser unreiferen Population ($CD34^+CD38^-CD45RA^-$) als

Startpopulation eine robustere Basis für eine nachfolgende Differenzierungsanalytik über Phänotypisierung der kultivierten Zellpopulation liefern. Schließlich könnte über die Phänotypisierungsanalyse hinaus auch die Genexpression der Zellpopulation näher charakterisiert werden. Zum Beispiel über den Transkriptionsfaktor HOXB4, welcher die selbsterneuernden Teilungen von HSZ reguliert (Schiedlmeier et al., 2007; Zheng et al., 2007; Huang et al., 2016). Noch umfassender wäre eine Transkriptomanalyse der Zellpopulation, um ein Expressionsprofil mit Hilfe der mRNA-Sequenzierung zu erstellen und über Gen-Ontologie Anreicherungsanalyse eine funktionale Interpretation der hoch- und herunter-regulierten Gene bioinformatisch auszuwerten (Koch et al., 2018).

Eine weitere Limitierung des mit Integrin $\alpha_4\beta_1$-Liganden nanostrukturierten Gelsystems war, dass das Adhäsionsverhalten von HSPZ nicht über einen simplen Wasch-*Assay* bestimmt werden konnte. Da Adhäsionstests auf Basis von Scherstress eher ungeeignet sind, könnte eine direkte Messung der Adhäsionskräfte bspw. über AFM-basierte Einzelzell-Kraftspektroskopie als Methode zur Quantifizierung der initialen Adhäsionsphase der Zelle erfolgen (Khalili und Ahmad, 2015). Darüber hinaus könnte die bei der HSPZ-Polarisation auftretende Segregation intrazellulärer Markermoleküle besonders gut in einem bildgestützten Durchflusszytometer wie z. B. dem *ImageStream*® System zur morphometrischen Analyse der Zellen visualisiert und multiparametrisch ausgewertet werden (Zuba-Surma et al., 2007; Megrelis und Delon, 2014). Ein anderes Maß der Zellmotilität bzw. migratorischen Aktivität könnte auch die Bestimmung des Phosphorylierungsstatus der α_4-Kette des Integrins sein, indem Zelllysate einer Western Blot Analyse hinsichtlich α_4-pS988 unterzogen werden. Denn über den von Jung et al. (2019) postulierten Mechanismus der Multiprotein-Komplex-Assoziation von $\alpha_4\beta_1$ Integrinclustern, CXCR4, *Vascular endothelial growth factor receptor-2* und Syndecan-1-Ektodomäne kann die α_4-Kette am Serin-988 der zytoplasmatischen Domäne durch aktivierte Proteinkinase A phosphoryliert werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit können zukünftig noch weitere offene Fragen über multifunktionale nanostrukturierte Biohybridgelsysteme beantworten werden, zum Beispiel: Welche Kombination aus Partikelabstand und Ligandentyp auf der Hydrogeloberfläche ist für ein Clustern von Integrin $\alpha_4\beta_1$ bestmöglich geeignet? Muss ein $\alpha_4\beta_1$ Integrinclustern überhaupt vorliegen, um Differenzierungseffekte auszulösen? Welche Matrixsteifigkeit bietet den Schwellenwert für optimale Mechanosensitivität und -transduktion des $\alpha_4\beta_1$ Integrins? Die große Herausforderung für die Weiterentwicklung nichtrigider Matrizes in Kombination mit nanostrukturierten Integrinliganden - wie bei diesem Biohybridhydrogel - wird daher sein, das Matrixsteifigkeitsoptimum für eine effektive Integrinaktivierung zu bestimmen. Dies kann nur durch die Variation der Matrixsteifigkeit bei verschiedenen fixen Ligandendichten erfolgen.

A. Anhang

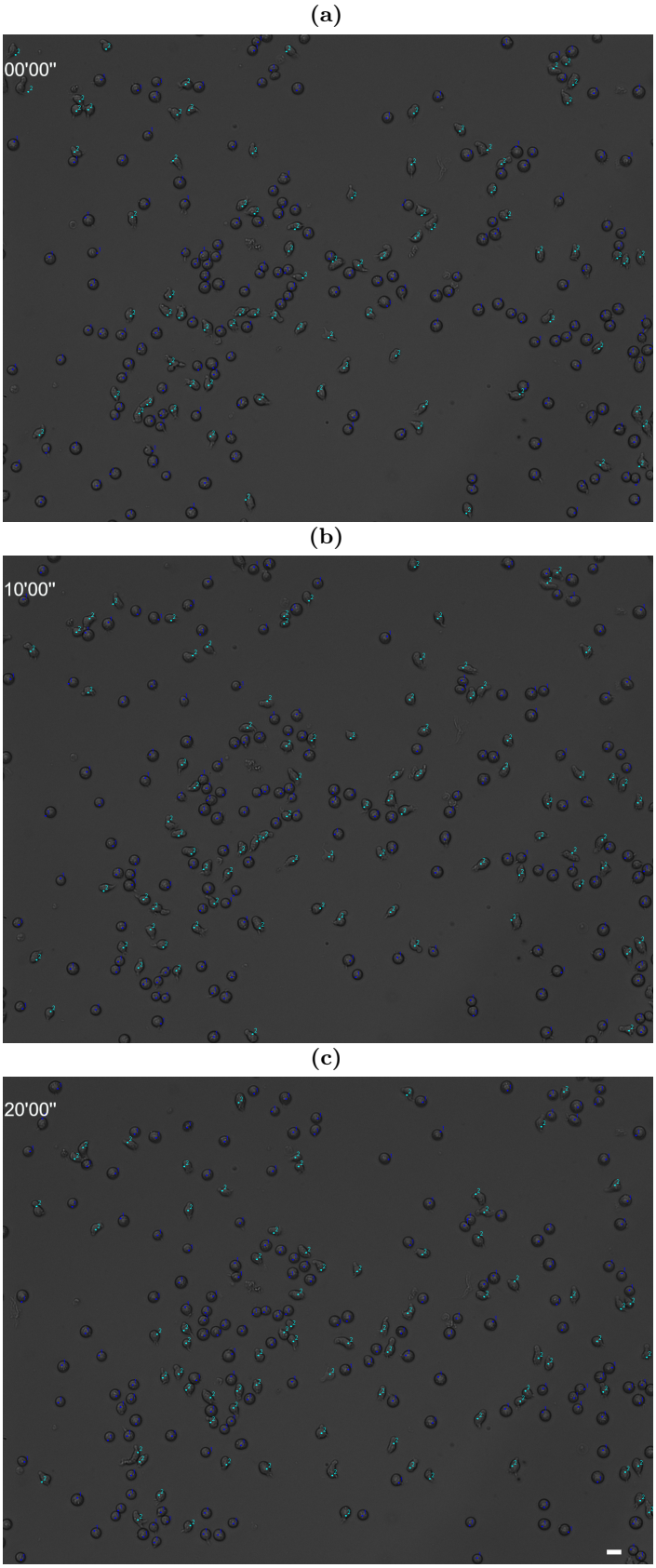


Abbildung A.1.: Binarische Kategorisierung der HSPZ-Kultur nach 48 h auf einem PS154-strukturierten und *IDSP*-Peptid-funktionalisierten Gel. Zuweisung 1 (blau) entspricht sphärischer, 2 (türkis) polarisierter Zellmorphologie. Durchlichtmikroskopische Zeitrafferaufnahmen (a – c) im Abstand von 10 min. Zeitangabe (oben links im Bild) in min's". Maßstab = 20 µm

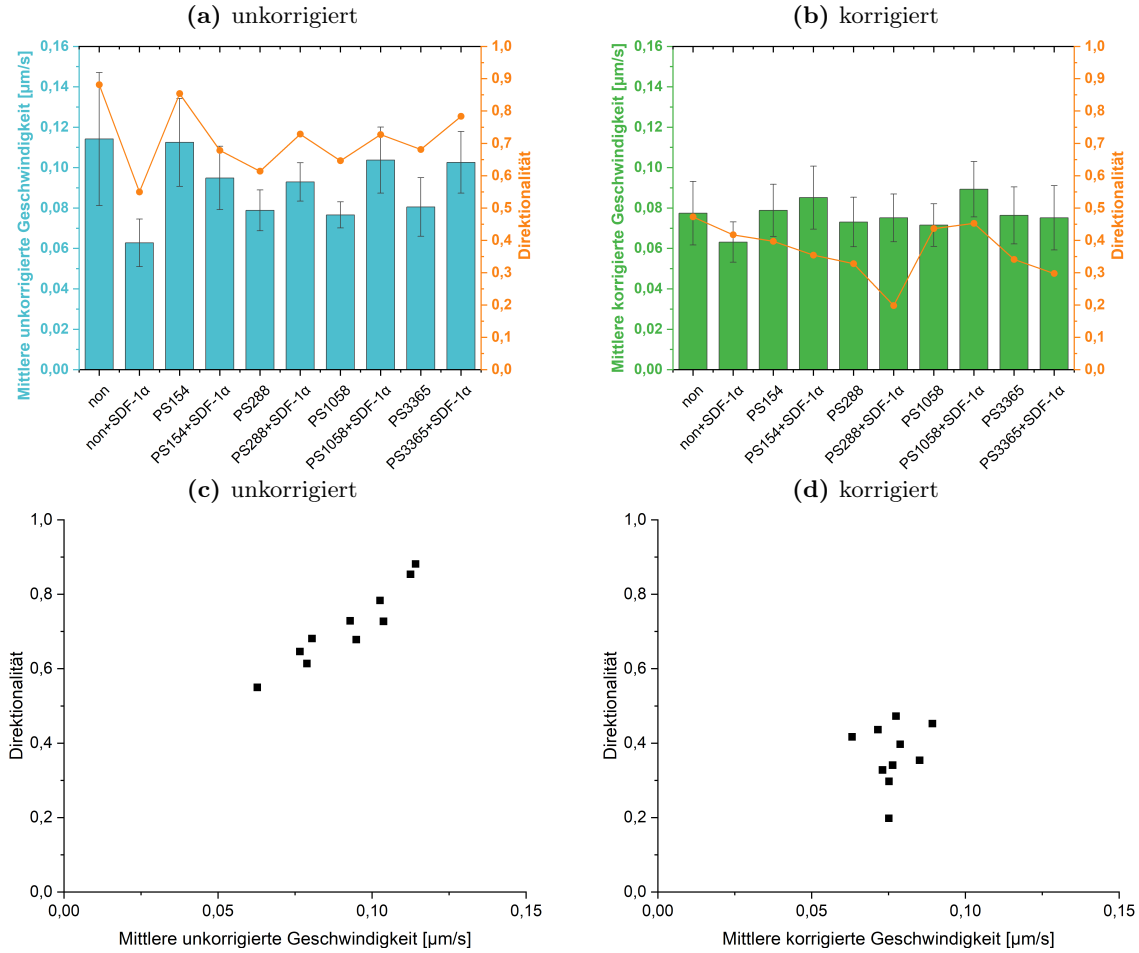


Abbildung A.2.: Zusammenhang von mittlerer unkorrigierter Geschwindigkeit und der Direktionalität der Bewegung von migrierenden HSPZ auf funktionalisierten Hydrogelen. Hydrogele mit Nanostruktur (PS*) bzw. ohne Nanostruktur (non). Funktionalisierung mit *IDSP*-Peptid mit (+SDF-1α) und ohne SDF-1α-Beladung der Gele. Gezeigt ist der Datensatz eines Experimentes, wobei die Geschwindigkeit von 12 polarisierten Zellen pro Oberfläche gemittelt wurde (Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung in (a) und (b)). Die Direktionalität, berechnet aus dem Verhältnis aus euklidischer zu akkumulierter Distanz, ist das Maß der Geradlinigkeit der Bewegung. Korrelation der Direktionalität mit der mittleren Geschwindigkeit unkorrigierter Werte in (a) und (c), welche nach Korrektur der Geschwindigkeiten um den Hintergrundflussvektor in (b) und (d) völlig verschwindet.

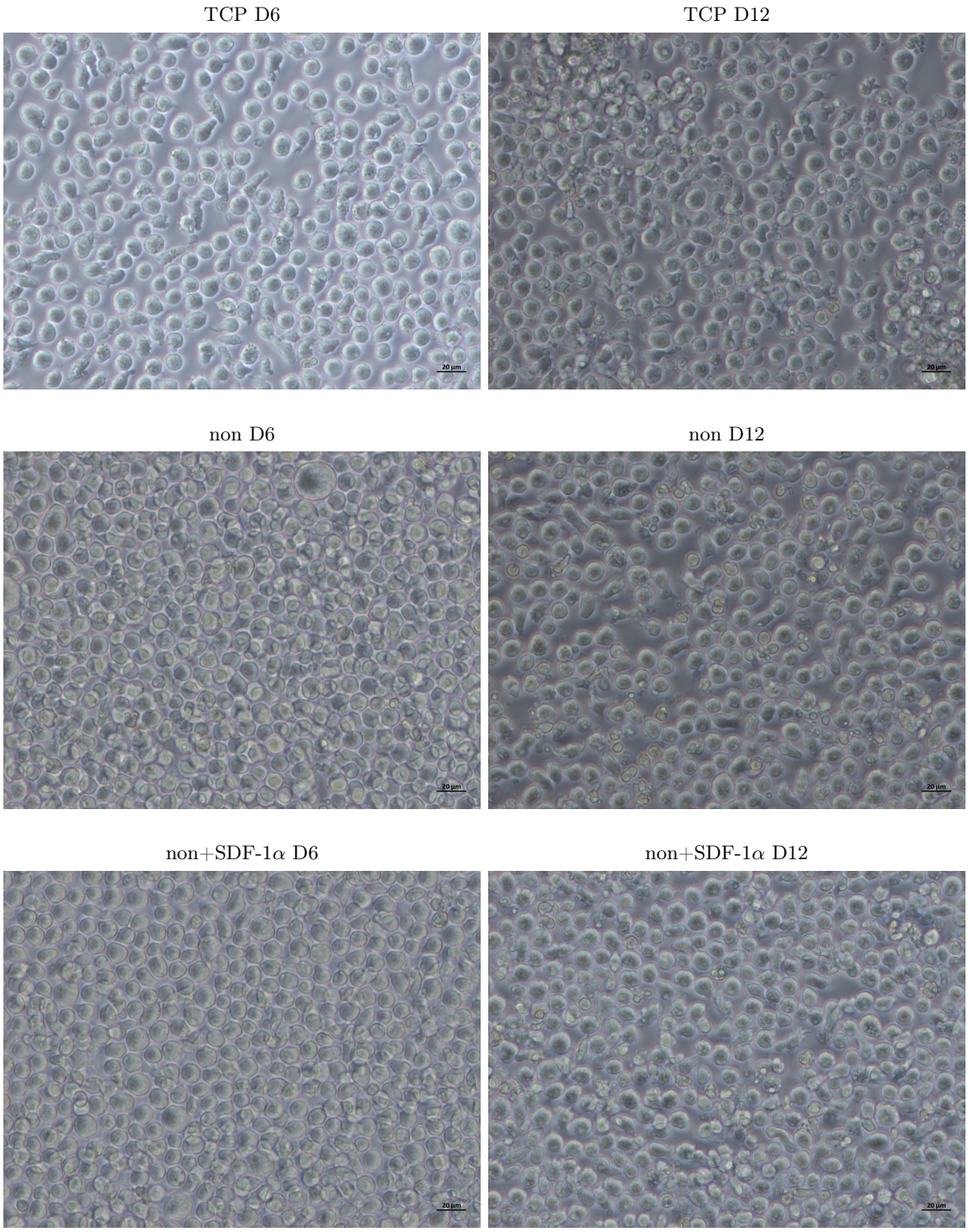
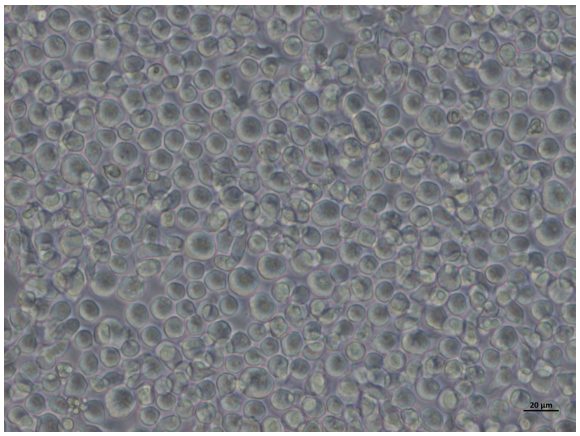
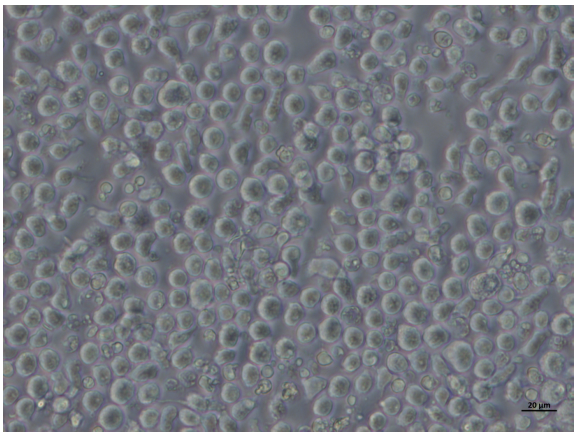


Abbildung A.3.: Repräsentative durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HSPZ-Kulturen auf verschiedenen Oberflächen. Kulturzeit nach 6 (D6) bzw. 12 (D12) Tagen Kultur auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung unstrukturierter (non) und nanostrukturierter (PS*) Hydrogele mit *IDSP*-Peptid oder Kontrollpeptid (scr), ggf. mit SDF-1α-Beladung. TCP als Vergleich. Maßstab = 20 µm

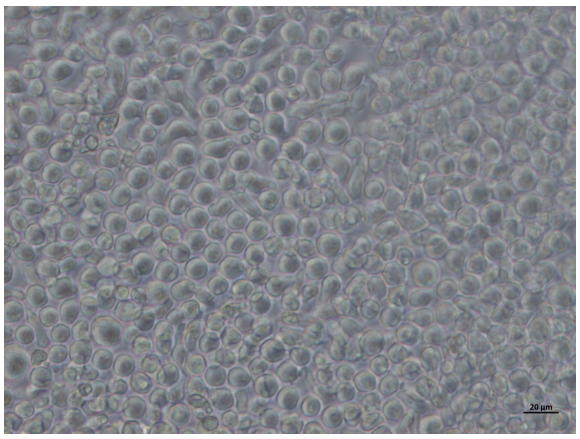
PS154+SDF-1α D6



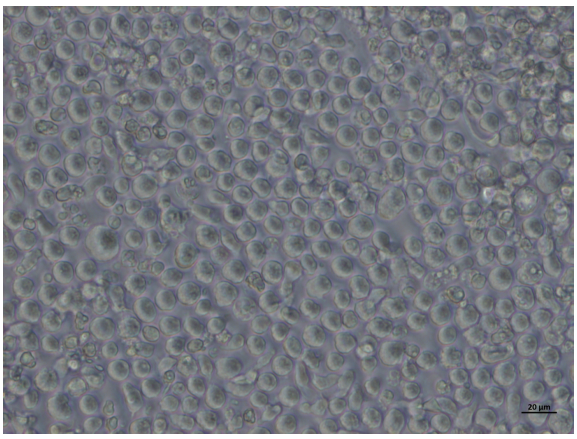
PS154+SDF-1α D12



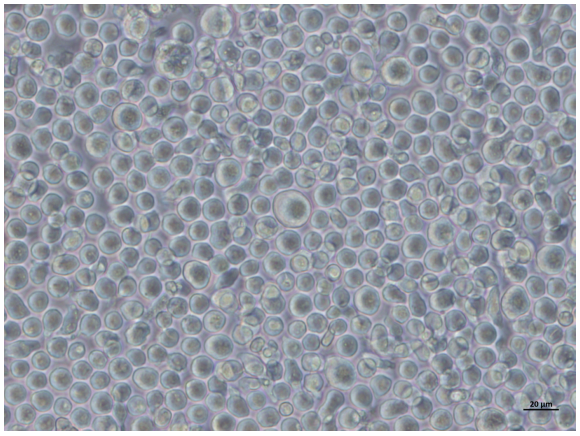
PS154+scr D6



PS154+scr D12



PS154 D6



PS154 D12

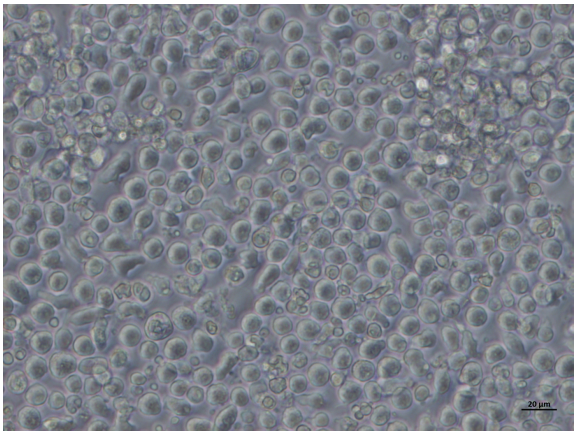
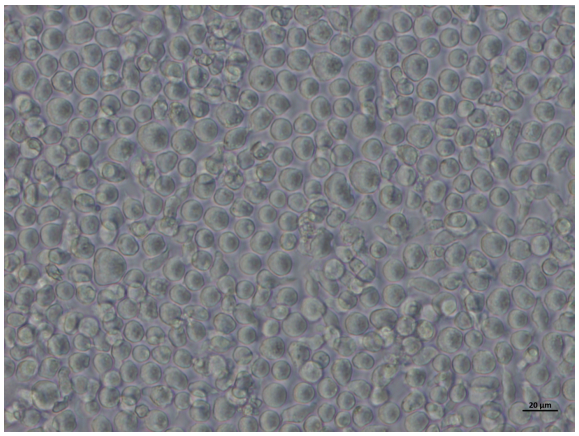
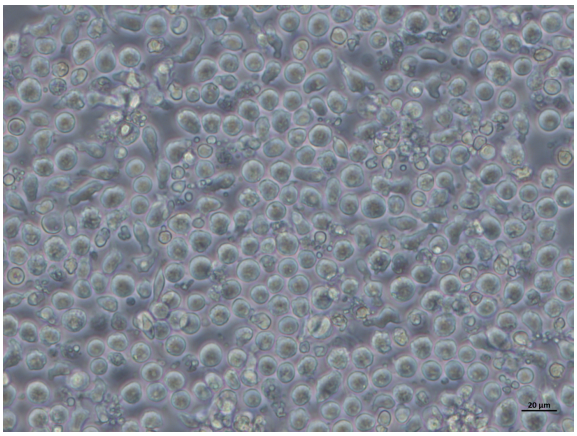


Abbildung A.3.: fortlaufend

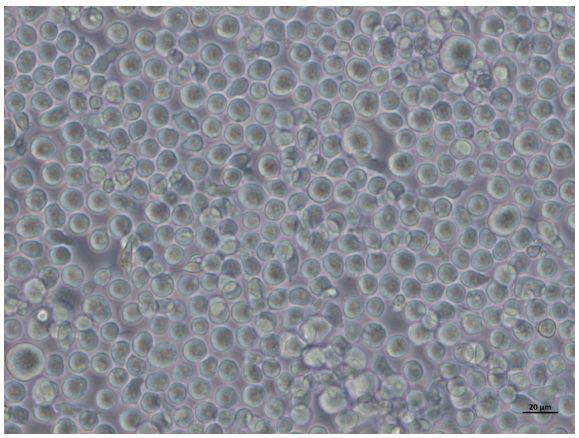
PS288 D6



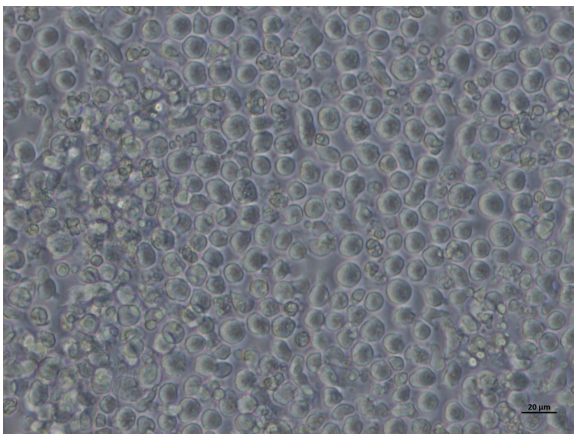
PS288 D12



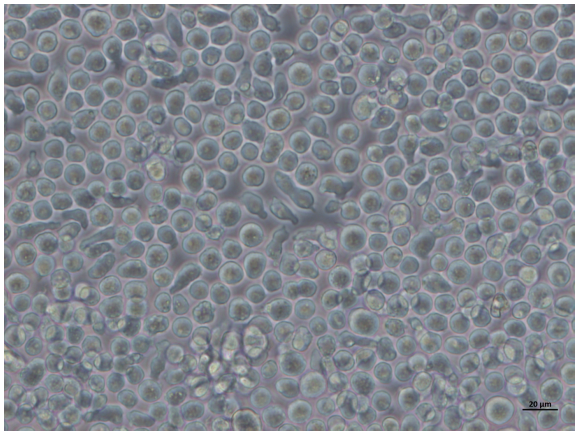
PS1058 D6



PS1058 D12



PS3365 D6



PS3365 D12

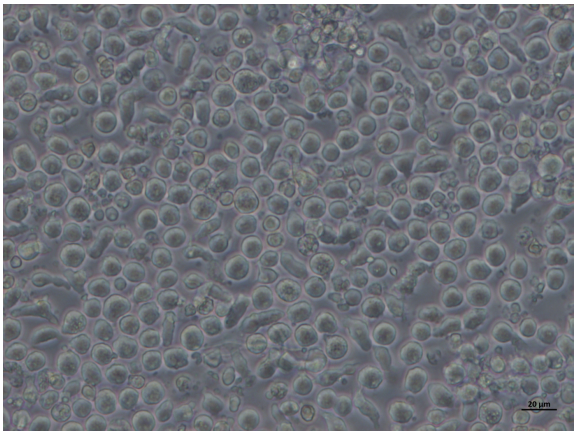


Abbildung A.3.: fortlaufend

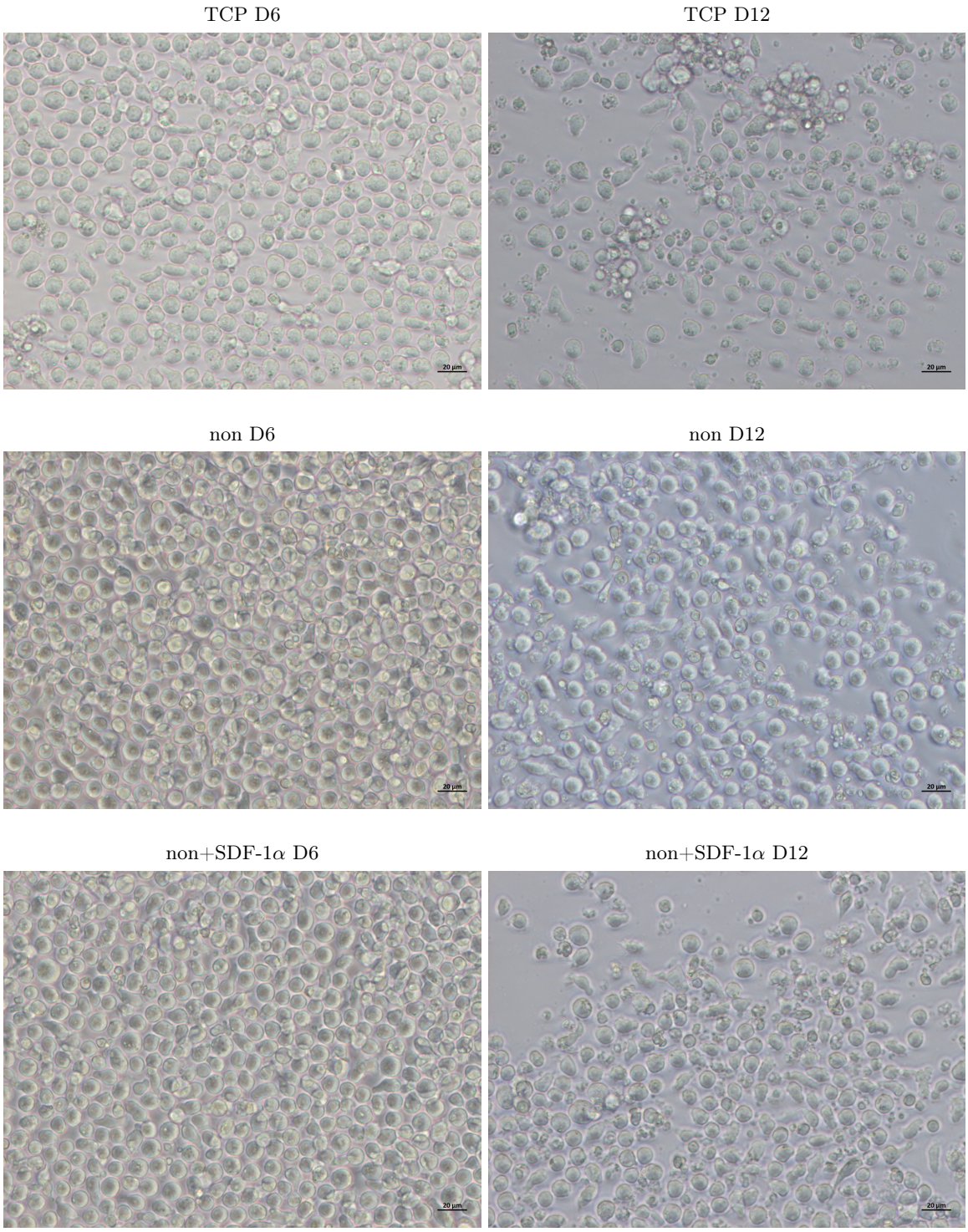
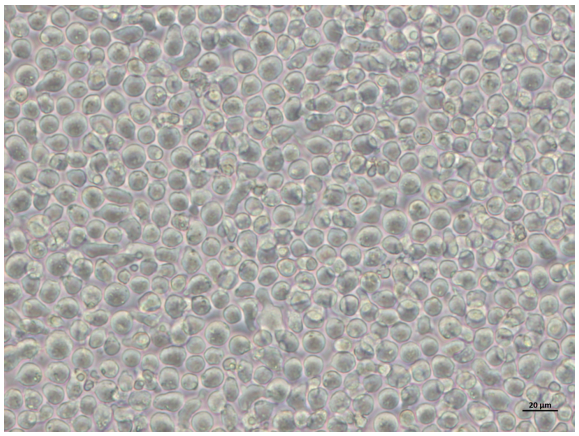
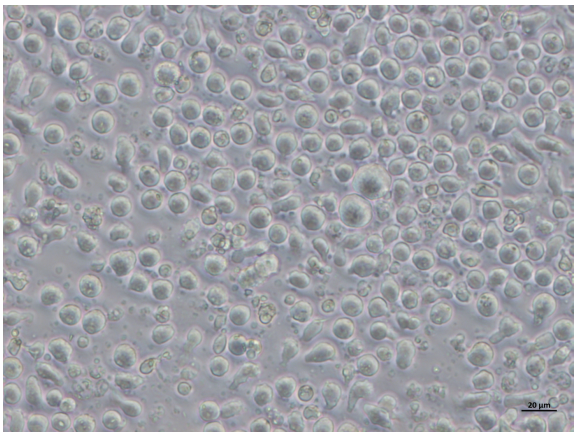


Abbildung A.4.: Repräsentative durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HSPZ-Kulturen auf verschiedenen Oberflächen. Kulturzeit nach 6 (D6) bzw. 12 (D12) Tagen Kultur auf funktionalisierten nanostrukturierten und unstrukturierten Hydrogelen. Funktionalisierung unstrukturierter (non) und nanostrukturierter (PS*) Hydrogele mit *LDV*-Peptid oder Kontrollpeptid (LEV), ggf. mit SDF-1α-Beladung. TCP als Vergleich. Maßstab = 20 µm

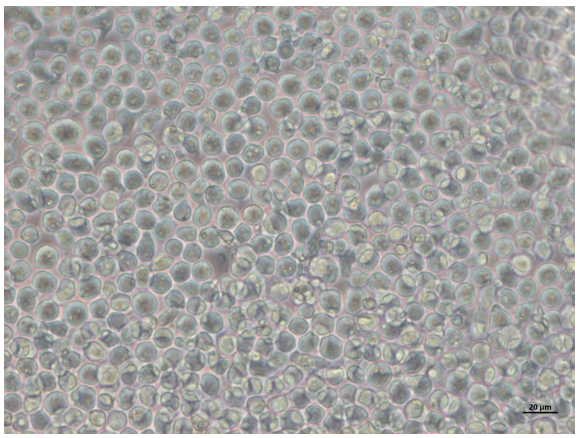
PS154+SDF-1α D6



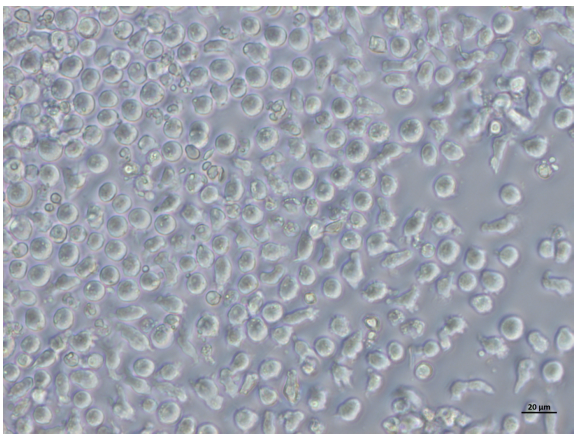
PS154+SDF-1α D12



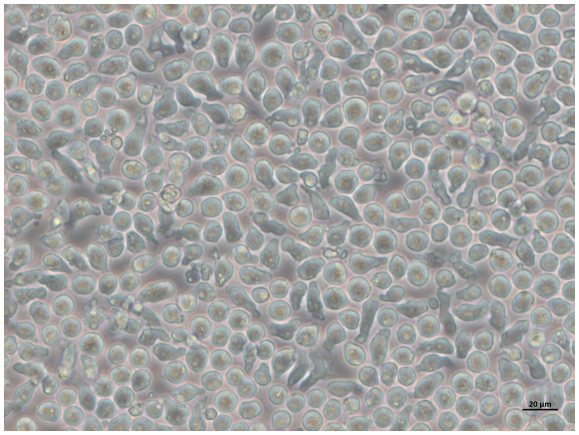
PS154+LEV D6



PS154+LEV D12



PS154 D6



PS154 D12

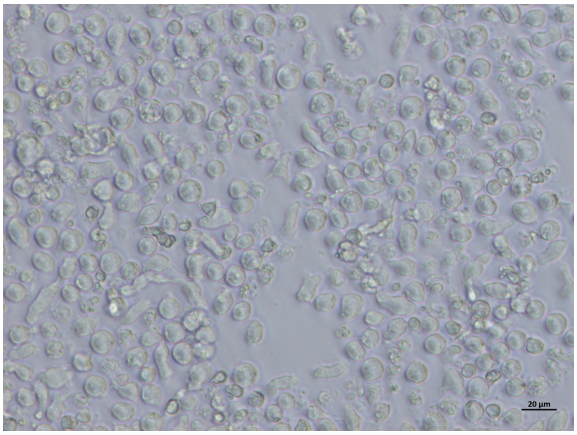
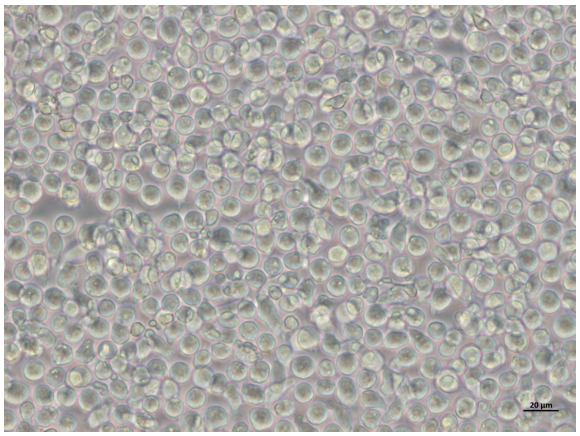
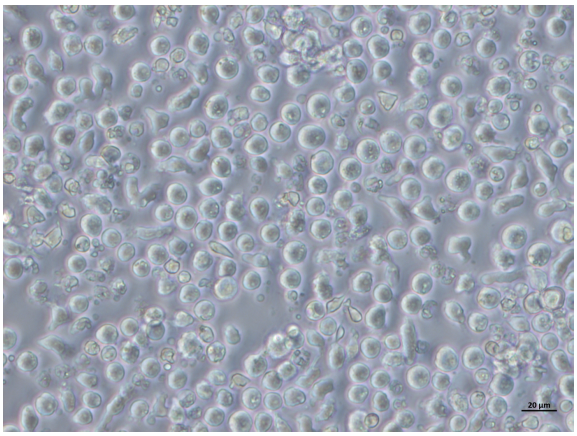


Abbildung A.4.: fortlaufend

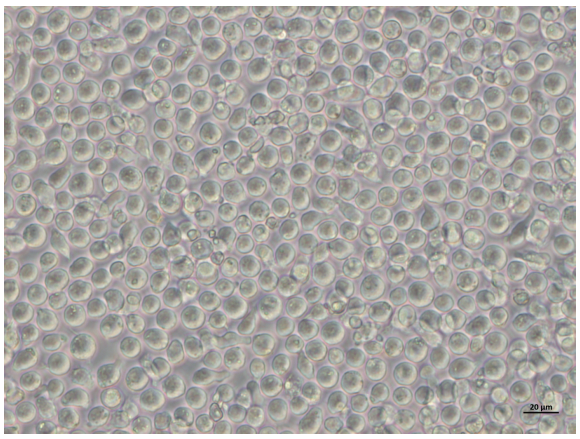
PS288 D6



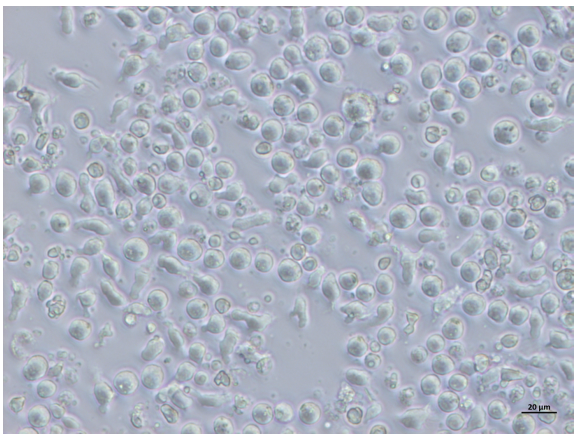
PS288 D12



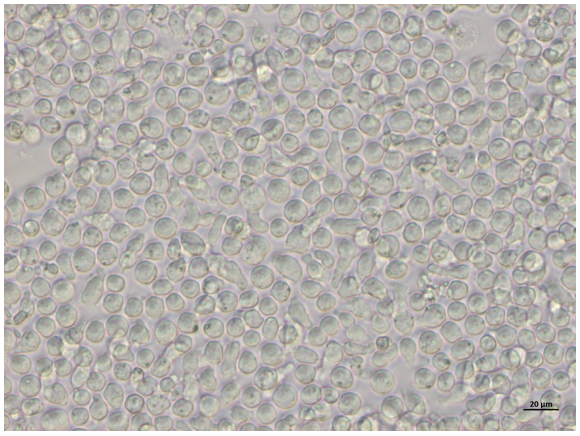
PS1058 D6



PS1058 D12



PS3365 D6



PS3365 D12

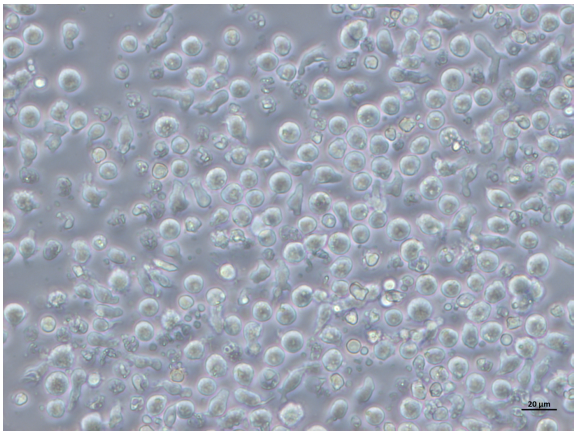


Abbildung A.4.: fortlaufend

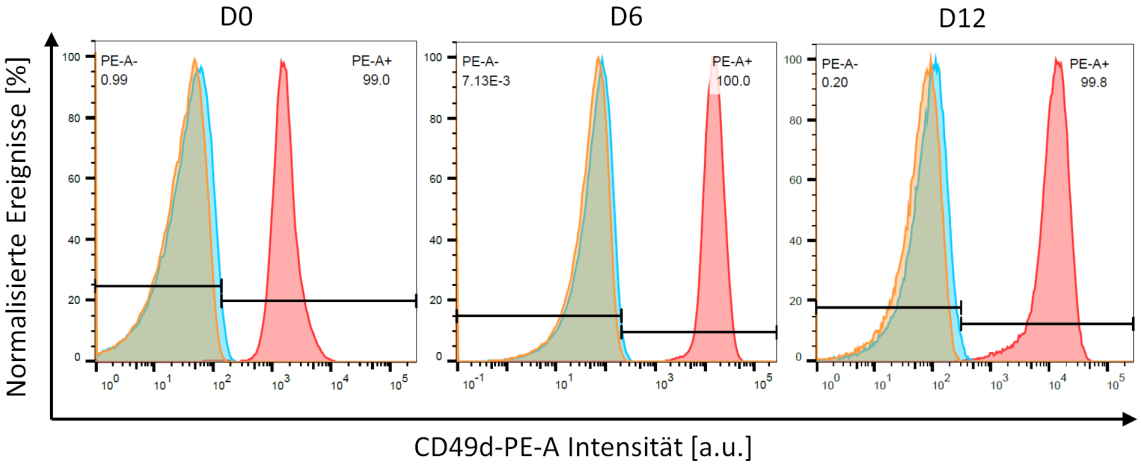


Abbildung A.5.: Durchflusszytometrische Analyse der CD49d-Expression kultivierter HSPZ im Zeitverlauf. Analysezeitpunkte zum HSPZ-Isolationstag (D0), nach 6 (D6) und 12 (D12) Tagen *ex vivo* Kultur auf Hydrogel. Überlagerung der Histogramme im B2-Kanal der ungefärbten (orange) Probe, Isotypkontroll-Färbung (blau) und spezifischen CD49d-Phycoerythrin (PE)-Färbung (rot) der gleichen Probe. Die y-Achse gibt die auf den Modus der jeweiligen Verteilung normalisierten Ereignisse an, die x-Achse die PE-Fluoreszenzintensität des Pulsintegrals (A).

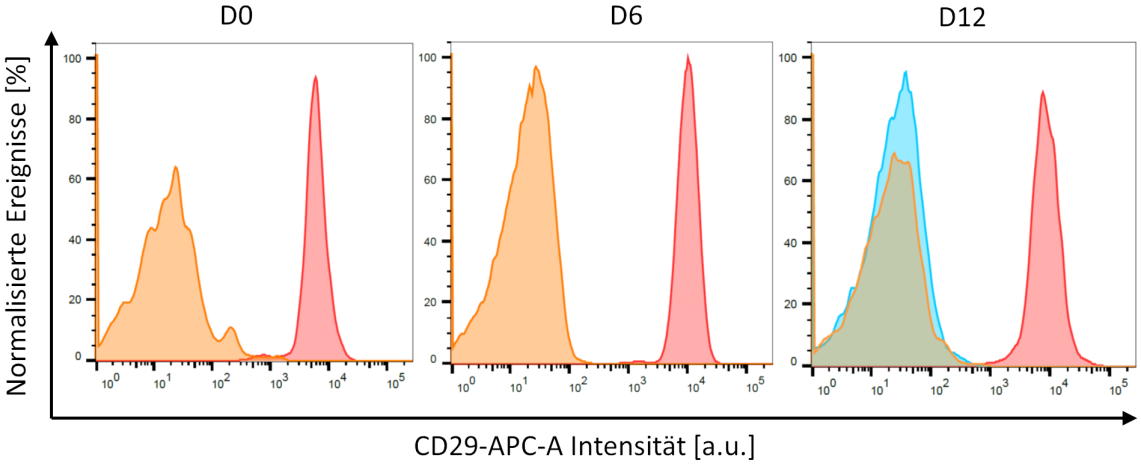


Abbildung A.6.: Durchflusszytometrische Analyse der CD29-Expression kultivierter HSPZ im Zeitverlauf. Färbung zum HSPZ-Isolationstag (D0), nach 6 (D6) und 12 (D12) Tagen *ex vivo* Kultur auf unstrukturiertem Hydrogel, Messung gefärbter Zellen nach Fixierung (3,7% (v/v) Formaldehyd in PBS). Überlagerung der Histogramme im R1-Kanal der ungefärbten (orange) Probe, Isotypkontroll-Färbung (blau) und spezifischen CD29-Allophycocyanin (APC)-Färbung (rot) der gleichen Probe. Die y-Achse gibt die auf den Modus der jeweiligen Verteilung normalisierten Ereignisse an, die x-Achse die APC-Fluoreszenzintensität des Pulsintegrals (A).

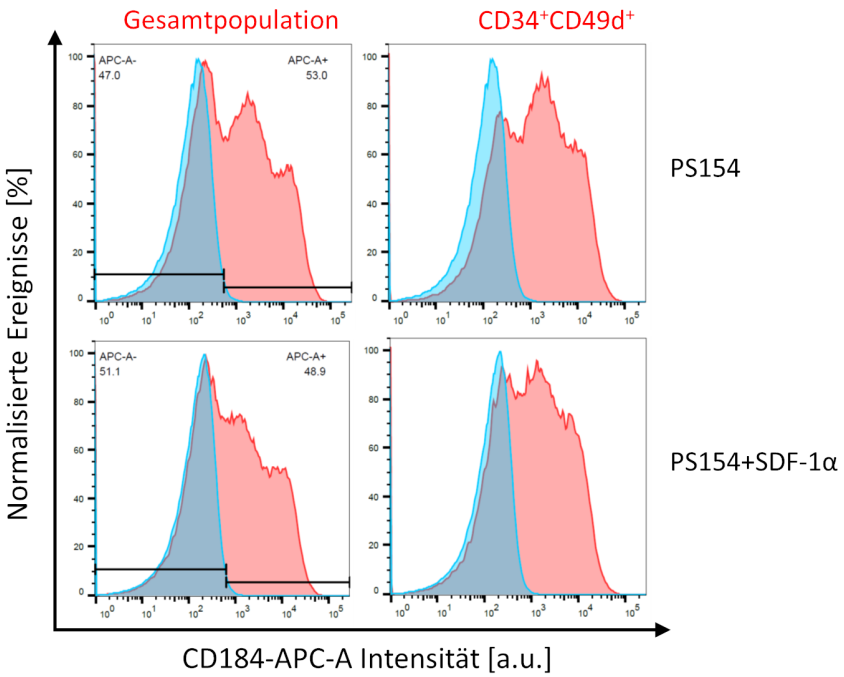


Abbildung A.7.: Durchflusszytometrische Analyse der CD184-Expression kultivierter HSPZ. Analysezeitpunkt nach 6 Tagen *ex vivo* Kultur auf PS154-nanostrukturiertem Hydrogel (mit *IDSP*-Peptidfunktionalisierung) mit und ohne SDF-1α-Beladung. Überlagerung der Histogramme im R1-Kanal der Isotypkontroll-Färbung (blau) und spezifischen CD184-Allophycocyanin (APC)-Färbung (rot) der gleichen Probe. Die Diagramme links zeigen die spezifische CD184-APC-Fluoreszenzsignalverteilung der Gesamtpopulation, während die Diagramme rechts die spezifische CD184-APC-Fluoreszenzsignalverteilung der $CD34^+CD49d^+$ Subpopulation darstellen. Die Ordinate gibt die auf den Modus der jeweiligen Verteilung normalisierten Ereignisse an, die Abszisse die APC-Fluoreszenzintensität des Pulsintegrals (A).

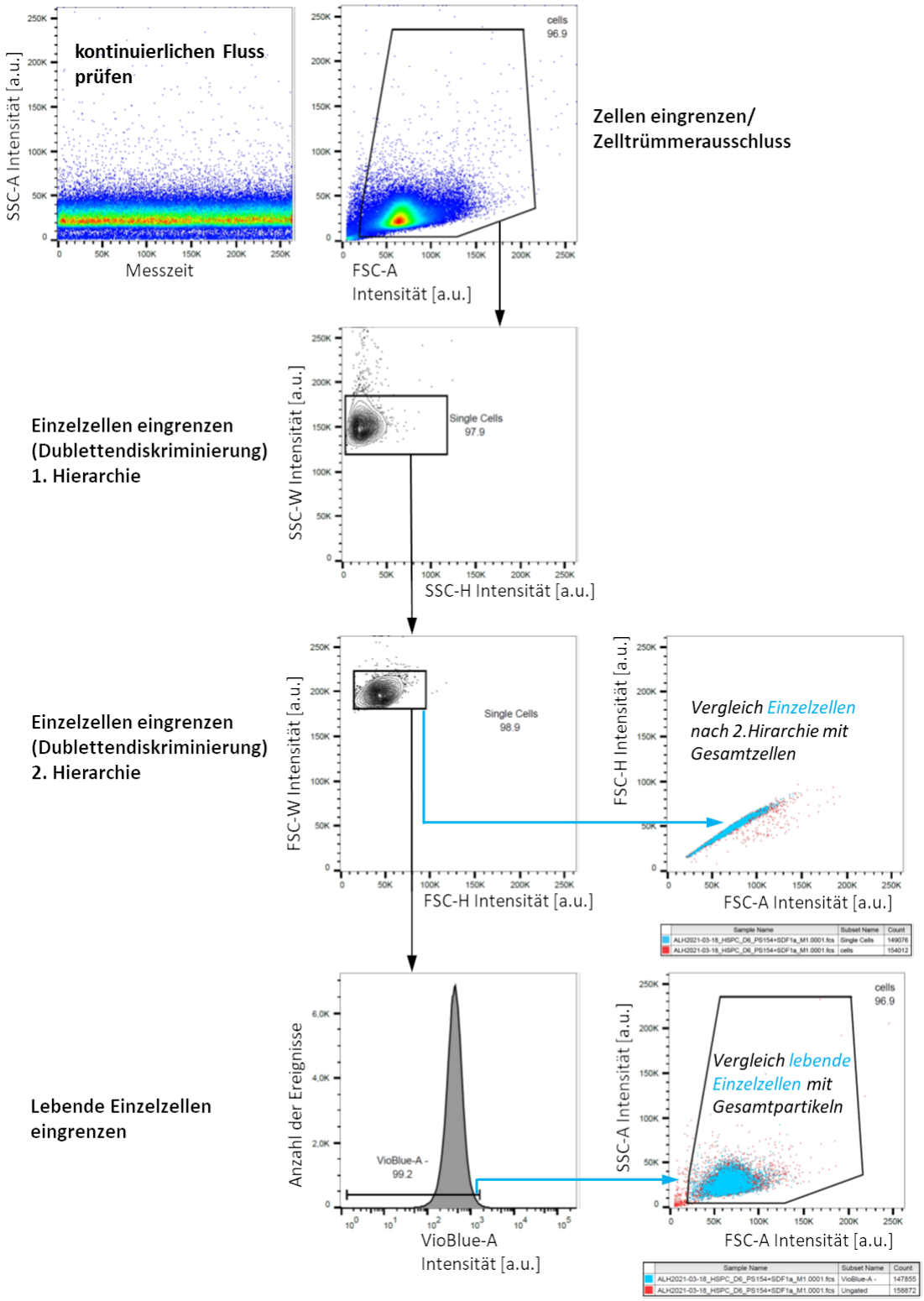


Abbildung A.8.: Hierarchisches Vorgehen zur Grenzsetzung in der graphischen Darstellung durchflusszytometrischer Messsignale von gefärbten HSPZ und deren Abkömmlinge. Repräsentatives Beispiel zum Analysezeitpunkt nach 6 Tagen der HSPZ *ex vivo* Kultur auf PS154-nanostrukturiertem Hydrogel mit *IDSP*-Peptidfunktionalisierung und SDF-1α-Beladung. Nach Ausgrenzen der Zelltrümmer erfolgt der Ausschluss von Dubletten (Doppelzellen bzw. Zellaggregat) über zweistufiges

Regionensetzen im SSC und FSC durch Konturliniendarstellung (2%-Abstufung) der Ereignisdichte beider voneinander unabhängigen Pulsgrößen Weite (W) und Höhe (H). Spannungspulsparameter: Pulsweite (W), Pulshöhe (H), Pulsintegral (A). FSC- und SSC-Singale in linearer Skalierung. Die erhaltene Einzelzellpopulation wurde zwecks Totzellausschluss weiter nach ihrer Fluoreszenz des Vitalitätsfarbstoffs Viobility™ 405/452 im VioBlue-Kanal (x-Achse in *log*-Skalierung) mithilfe des Histogramms eingegrenzt. Zahlenwerte geben den relativen Zellanteil an.

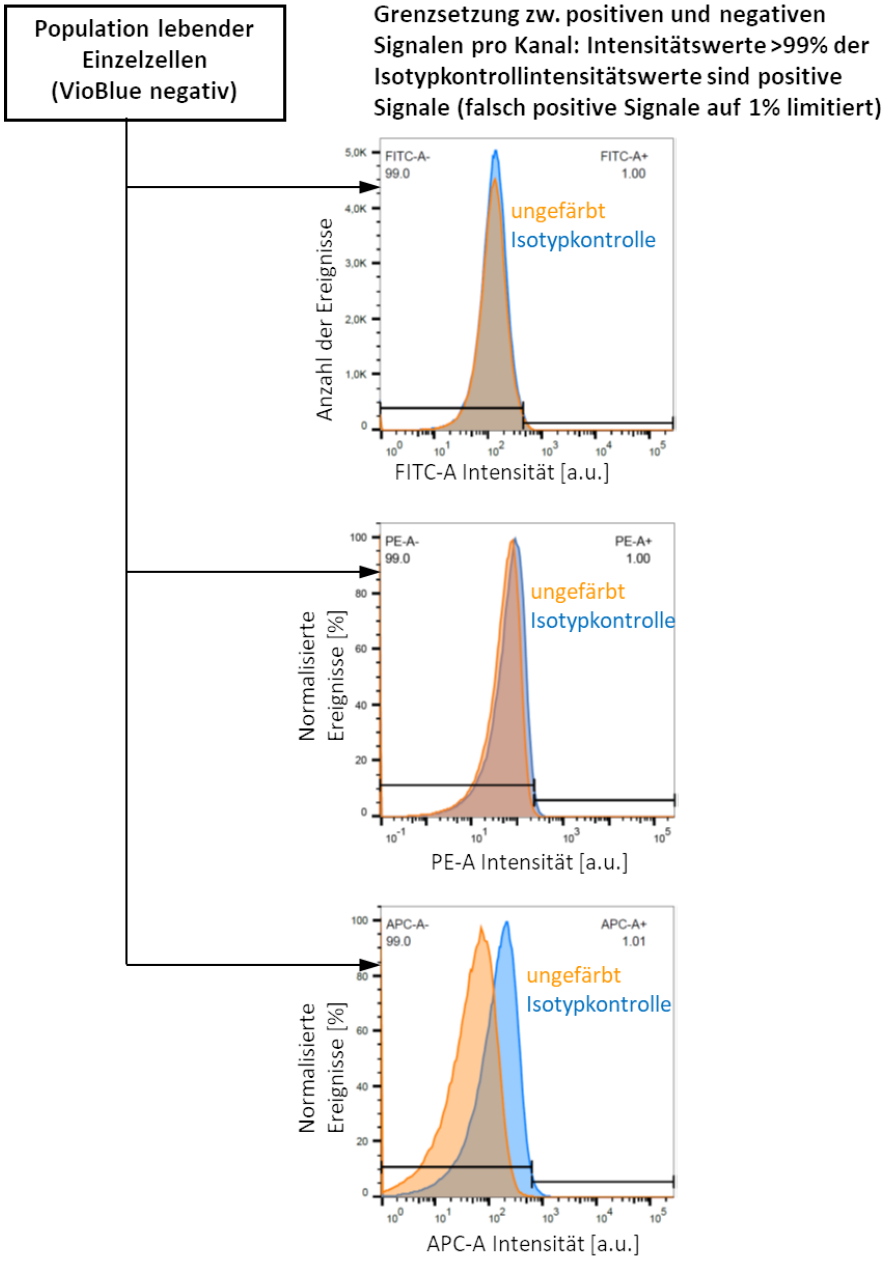


Abbildung A.9.: Hierarchisches Vorgehen zur Grenzsetzung - Fortsetzung von Abb. A.8. Die in Abb. A.8 ausgewählte Lebendzellpopulation (VioBlue negativ) wird für die bisektorielle Grenzsetzung negativer vs. positiver Singale pro Kanal mithilfe der Isotypenkontroll-Färbung in Histogrammdarstellung verwendet. Die y-Achse der Histogramme gibt die Absolutanzahl der Ereignisse oder die auf den Modus der jeweiligen Verteilung normalisierten Ereignisse an und die x-Achse die Fluoreszenzintensität des Pulsintegrals (A) des jeweiligen Messkanals in *log*-Skalierung. Gezeigt ist eine Überlagerung der Histogramme der ungefärbten Probe (orange) mit der Isotypkontroll-Färbung (blau) der gleichen Probe. Zahlenwerte geben den relativen Zellanteil an.

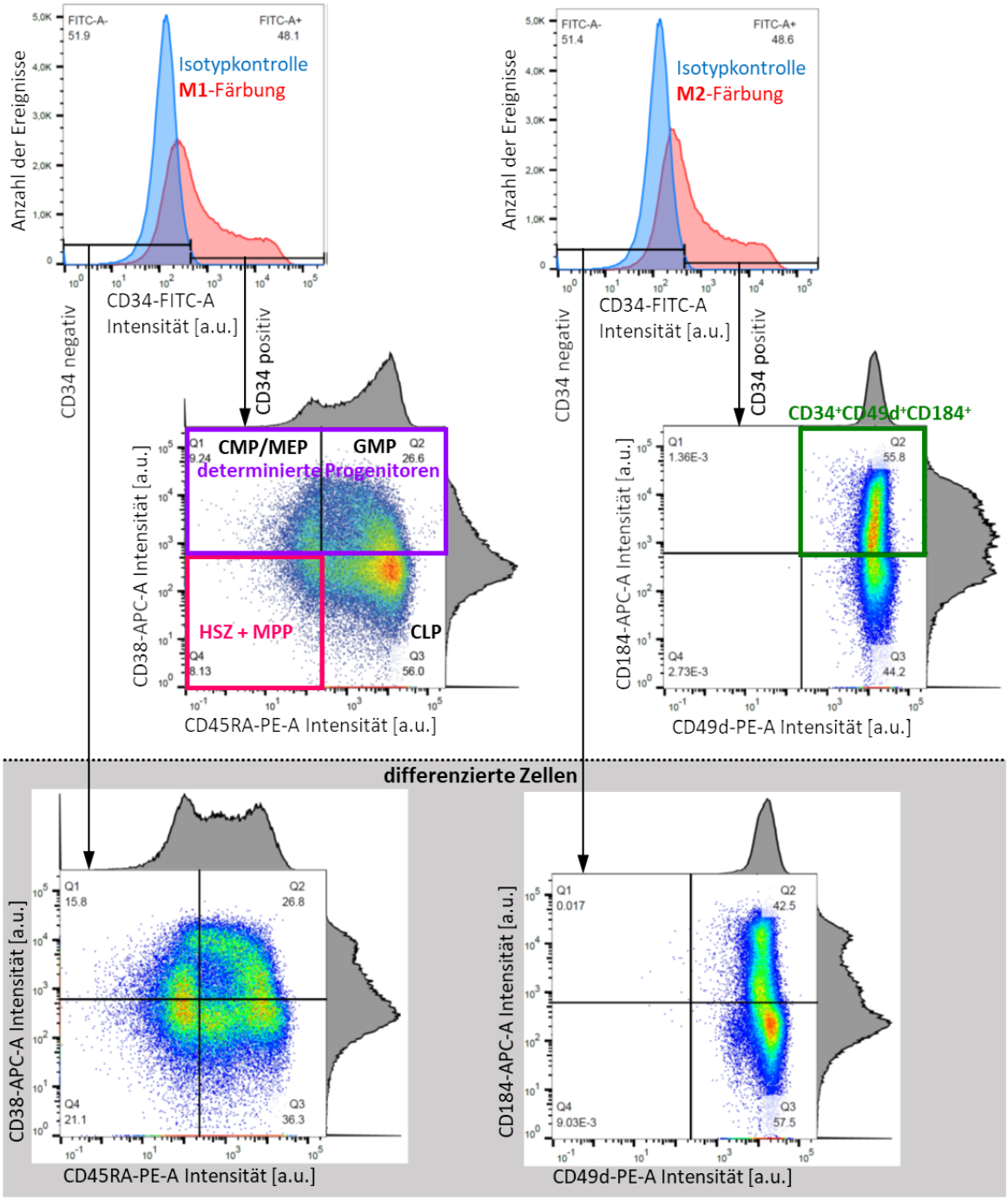


Abbildung A.10.: Hierarchisches Vorgehen zur Grenzsetzung - Fortsetzung von Abb. A.9. Die in Abb. A.9 festgelegten Grenzen werden für die Einteilung der $CD34^+$ bzw. $CD34^-$ Population und deren Subpopulationen in Quadranten (Q) angewandt. Zahlenwerte geben den relativen Zellanteil an. Histogramm der Isotypkontroll-Färbung (blau) und spezifischen Multi(M)-Färbung (rot) der gleichen Probe in Überlagerung. Im Histogramm gibt die y-Achse gibt die Absolutanzahl der Ereignisse an, in der farbkodierten Ereignisdichte-Darstellung (blau/grün = niedrige Zelldicht, gelb = mittlere Zelldichte, rot/orange = hohe Zelldichte) gibt die y- und die x-Achse die Fluoreszenzintensität des Pulsintegrals (A) in *log*-Skalierung an; zusätzlich die kanalspezifischen Histogramme (grauflächig) an den Achsen. Subpopulationen: $CD34^+CD38^+CD45RA^-$ (CMP/MEP), $CD34^+CD38^+CD45RA^+$ (GMP), $CD34^+CD38^-CD45RA^+$ (CLP), $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ (HSZ bis MPP); farbig rechteckig eingegrenzte Regionen sind für die Analyse definierte Populationen: $CD34^+CD38^+$ = determinierte Progenitoren (violett), $CD34^+CD38^-CD45RA^-$ = HSZ bis MPP (pink), $CD34^+CD49d^+CD184^+$ (grün); alle $CD34^-$ Populationen stellen differenzierte Zellen dar und wurden für eine weitere Analyse nicht einbezogen (grauer Hindergrund).

Referenzen

AbuSamra, D. B., Aleisa, F. A., Al-Amoodi, A. S., et al. (2017). Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. *Blood advances*, 1(27):2799–2816.

Adair, B. D., Xiong, J.-P., Maddock, C., et al. (2005). Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin alphaVbeta3 in a complex with fibronectin. *The Journal of cell biology*, 168(7):1109–1118.

Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research*, 6(2):105–121.

Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T., & Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). 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. *The Journal of experimental medicine*, 185(1):111–120.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774):193–197.

Alban, S. (2007). Kohlenhydrate III: Aminoglykane und Glykosaminoglykane. In Hänsel, R. & Sticher, O., Herausgeber, *Pharmakognosie — Phytopharmazie*, Seiten 655–704. Springer Berlin Heidelberg.

Alemany, A., Florescu, M., Baron, C. S., Peterson-Maduro, J., & van Oudenaarden, A. (2018). Whole-organism clone tracing using single-cell sequencing. *Nature*, 556(7699):108–112.

Alon, R. & Feigelson, S. W. (2012). Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts. *Current opinion in cell biology*, 24(5):670–676.

Alon, R., Kassner, P. D., Carr, M. W., et al. (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *The Journal of cell biology*, 128(6):1243–1253.

Altrock, E., Muth, C. A., Klein, G., Spatz, J. P., & Lee-Thedieck, C. (2012). The significance of integrin ligand nanopatterning on lipid raft clustering in hematopoietic stem cells. *Biomaterials*, 33(11):3107–3118.

Amara, A., Lorthioir, O., Valenzuela, A., et al. (1999). Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *The Journal of biological chemistry*, 274(34):23916–23925.

Amschler, K., Kossmann, E., Erpenbeck, L., et al. (2018). Nanoscale Tuning of VCAM-1 Determines VLA-4-Dependent Melanoma Cell Plasticity on RGD Motifs. *Molecular cancer research : MCR*, 16(3):528–542.

Anjos-Afonso, F., Currie, E., Palmer, H. G., et al. (2013). CD34(-) cells at the apex of the human hematopoietic stem cell hierarchy have distinctive cellular and molecular signatures. *Cell stem cell*, 13(2):161–174.

Anthis, N. J. & Campbell, I. D. (2011). The tail of integrin activation. *Trends in biochemical sciences*, 36(4):191–198.

Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., et al. (2003). Long-Term Hematopoietic Stem Cells Require Stromal Cell-Derived Factor-1 for Colonizing Bone Marrow during Ontogeny. *Immunity*, 19(2):257–267.

Arai, A., Nosaka, Y., Kanda, E., et al. (2001). Rap1 is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in regulation of beta1 integrin-mediated hematopoietic cell adhesion. *The Journal of biological chemistry*, 276(13):10453–10462.

Arnaout, M. A., Mahalingam, B., & Xiong, J.-P. (2005). Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annual review of cell and developmental biology*, 21:381–410.

Arnold, M., Cavalcanti-Adam, E. A., Glass, R., et al. (2004). Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 5(3):383–388.

Arroyo, A. G., Yang, J. T., Rayburn, H., & Hynes, R. O. (1999). α4 Integrins Regulate the Proliferation/Differentiation Balance of Multilineage Hematopoietic Progenitors In Vivo. *Immunity*, 11(5):555–566.

Asada, N., Takeishi, S., & Frenette, P. S. (2017). Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *International journal of hematology*, 106(1):45–54.

Aydin, D., Louban, I., Perschmann, N., et al. (2010). Polymeric substrates with tunable elasticity and nanoscopically controlled biomolecule presentation. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 26(19):15472–15480.

Azab, A. K., Azab, F., Blotta, S., et al. (2009). RhoA and Rac1 GTPases play major and differential roles in stromal cell-derived factor-1-induced cell adhesion and chemotaxis in multiple myeloma. *Blood*, 114(3):619–629.

Baccin, C., Al-Sabah, J., Velten, L., et al. (2020). Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nature cell biology*, 22(1):38–48.

Bai, T., Li, J., Sinclair, A., et al. (2019). Expansion of primitive human hematopoietic stem cells by culture in a zwitterionic hydrogel. *Nature medicine*, 25(10):1566–1575.

Bao, M., Xie, J., & Huck, W. T. S. (2018). Recent Advances in Engineering the Stem Cell Microniche in 3D. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 5(8):1800448.

Bard, A., Rondon, R., Marquez, D. T., Lanterna, A. E., & Scaiano, J. C. (2018). How Fast Can Thiols Bind to the Gold Nanoparticle Surface? *Photochemistry and photobiology*, 94(6):1109–1115.

Barry, S. T., Ludbrook, S. B., Murrison, E., & Horgan, C. M. (2000). Analysis of the alpha4beta1 integrin-osteopontin interaction. *Experimental cell research*, 258(2):342–351.

Baryawno, N., Przybylski, D., Kowalczyk, M. S., et al. (2019). A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell*, 177(7):1915–1932.e16.

Baryawno, N., Severe, N., & Scadden, D. T. (2017). Hematopoiesis: Reconciling Historic Controversies about the Niche. *Cell stem cell*, 20(5):590–592.

Bauer, N., Fonseca, A.-V., Florek, M., et al. (2008). New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133). *Cells, tissues, organs*, 188(1-2):127–138.

Baumheter, S., Singer, M. S., Henzel, W., et al. (1993). Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5132):436–438.

Becker, K. A., Ghule, P. N., Therrien, J. A., et al. (2006). Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *Journal of cellular physiology*, 209(3):883–893.

Becton Dickinson GmbH (2005). Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung.

Bello, A. B., Park, H., & Lee, S.-H. (2018). Current approaches in biomaterial-based hematopoietic stem cell niches. *Acta biomaterialia*, 72:1–15.

Belyavsky, A., Petinati, N., & Drize, N. (2021). Hematopoiesis during Ontogenesis, Adult Life, and Aging. *International journal of molecular sciences*, 22(17).

Benninghoven, A. (1994). Chemical Analysis of Inorganic and Organic Surfaces and Thin Films by Static Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(10):1023–1043.

Bergiers, I., Andrews, T., Vargel Bölükbaşı, Ö., et al. (2018). Single-cell transcriptomics reveals a new dynamical function of transcription factors during embryonic hematopoiesis. *eLife*, 7.

Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., et al. (1993). α4β7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*, 74(1):185–195.

Bernitz, J. M., Kim, H. S., MacArthur, B., Sieburg, H., & Moore, K. (2016). Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions. *Cell*, 167(5):1296–1309.e10.

Bertrand, J. Y., Chi, N. C., Santoso, B., et al. (2010). Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature*, 464(7285):108–111.

Bessy, T., Candelas, A., Souquet, B., et al. (2021). Hematopoietic progenitors polarize in contact with bone marrow stromal cells in response to SDF1. *The Journal of cell biology*, 220(11).

Bevers, E. M. & Williamson, P. L. (2016). Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. *Physiological reviews*, 96(2):605–645.

Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., et al. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of human biology*, 40(6):463–471.

Blakney, A. K., Swartzlander, M. D., & Bryant, S. J. (2012). The effects of substrate stiffness on the in vitro activation of macrophages and in vivo host response to poly(ethylene glycol)-based hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 100(6):1375–1386.

Boisset, J.-C., van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., et al. (2010). In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, 464(7285):116–120.

Bolduan, P. (2018). Synthese und Charakterisierung von biologisch-aktiven Hydrogelen und deren Anwendung in der Stammzellforschung. *Technische Universität Dortmund*, Dissertation.

Borck, A. (2005). Herstellung und Untersuchung von biokompatiblen Materialien für medizintechnische Anwendungen. *Technische Universität Braunschweig*, Dissertation.

Böttcher, R. T., Veelders, M., Rombaut, P., et al. (2017). Kindlin-2 recruits paxillin and Arp2/3 to promote membrane protrusions during initial cell spreading. *The Journal of cell biology*, 216(11):3785–3798.

Bromberger, T., Klapproth, S., Rohwedder, I., et al. (2021). Binding of Rap1 and Riam to Talin1 Fine-Tune β2 Integrin Activity During Leukocyte Trafficking. *Frontiers in immunology*, 12:702345.

Broudy, V. C. (1997). Stem Cell Factor and Hematopoiesis. *Blood*, 90(4):1345–1364.

Brown, J., Greaves, M. F., & Molgaard, H. V. (1991). The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *International immunology*, 3(2):175–184.

Brown, J. D., Dillon, H. E., Kaweesa, D. V., & Harada, A. M. (2017). The impact of transient heat transfer on tissue culture cell distribution. *Biosystems Engineering*, 163:28–36.

Brown, K. R. & Natan, M. J. (1998). Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles in Solution and on Surfaces. *Langmuir*, 14(4):726–728.

Broxmeyer, H. E., Kohli, L., Kim, C. H., et al. (2003). Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *Journal of leukocyte biology*, 73(5):630–638.

Buenrostro, J. D., Corces, M. R., Lareau, C. A., et al. (2018). Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation. *Cell*, 173(6):1535–1548.e16.

Bundesärztekammer (2019). Beschluss der Bundesärztekammer über die erste Fortschreibung der Richtlinie zur Herstellung und Anwendung von hämatopoetischen Stammzellzubereitungen. *Deutsches Ärzteblatt Online*.

Bungartz, G., Stiller, S., Bauer, M., et al. (2006). Adult murine hematopoiesis can proceed without beta1 and beta7 integrins. *Blood*, 108(6):1857–1864.

Butler, J. M., Nolan, D. J., Vertes, E. L., et al. (2010). Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell*, 6(3):251–264.

Buxboim, A., Rajagopal, K., Brown, A. E. X., & Discher, D. E. (2010). How deeply cells feel: methods for thin gels. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal*, 22(19):194116.

Cai, S., Liu, Y., Zheng Shu, X., & Prestwich, G. D. (2005). Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 26(30):6054–6067.

Calderwood, D. A., Campbell, I. D., & Critchley, D. R. (2013). Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(8):503–517.

Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960):841–846.

Cancelas, J. A. (2011). Adhesion, migration, and homing of murine hematopoietic stem cells and progenitors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 750:187–196.

Cao, H., Heazlewood, S. Y., Williams, B., et al. (2016). The role of CD44 in fetal and adult hematopoietic stem cell regulation. *Haematologica*, 101(1):26–37.

Capila, I. & Linhardt, R. J. (2002). Heparin-Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(3):390–412.

Carlsson, A. E. (2018). Membrane bending by actin polymerization. *Current opinion in cell biology*, 50:1–7.

Carrel, A. (1923). A METHOD FOR THE PHYSIOLOGICAL STUDY OF TISSUES IN VITRO. *The Journal of experimental medicine*, 38(4):407–418.

Carvalho, J. M., de Souza, M. K., Buccheri, V., et al. (2009). CD34-positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analyses on the bone marrow of healthy allogenic donors.

Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina, 127(1):12–18.

Casanova, M. R., Reis, R. L., Martins, A., & Neves, N. M. (2020). Surface biofunctionalization to improve the efficacy of biomaterial substrates to be used in regenerative medicine. *Materials Horizons*, 7(9):2258–2275.

Case, L. B. & Waterman, C. M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nature cell biology*, 17(8):955–963.

Cavalcanti-Adam, E. A., Micoulet, A., Blümmel, J., et al. (2006). Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. *European journal of cell biology*, 85(3-4):219–224.

Celebi, B., Mantovani, D., & Pineault, N. (2011). Effects of extracellular matrix proteins on the growth of haematopoietic progenitor cells. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 6(5):055011.

Chan, J. R., Hyduk, S. J., & Cybulsky, M. I. (2001). Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *The Journal of experimental medicine*, 193(10):1149–1158.

Chan, P. Y. & Aruffo, A. (1993). VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin. *The Journal of biological chemistry*, 268(33):24655–24664.

Changede, R., Xu, X., Margadant, F., & Sheetz, M. P. (2015). Nascent Integrin Adhesions Form on All Matrix Rigidities after Integrin Activation. *Developmental cell*, 35(5):614–621.

Chen, L., Yan, C., & Zheng, Z. (2018). Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors. *Materials today (Kidlington, England)*, 21(1):38–59.

Chen, L.-Y., Chang, Y., Shiao, J.-S., et al. (2012). Effect of the surface density of nanosegments immobilized on culture dishes on ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. *Acta biomaterialia*, 8(5):1749–1758.

Chen, Y., Lee, H., Tong, H., Schwartz, M., & Zhu, C. (2017). Force regulated conformational change of integrin αVβ3. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 60-61:70–85.

Cheng, H., Zheng, Z., & Cheng, T. (2020). New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein & cell*, 11(1):34–44.

Cheng, Z. J., Zhao, J., Sun, Y., et al. (2000). beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *The Journal of biological chemistry*, 275(4):2479–2485.

Chinthalapudi, K., Rangarajan, E. S., & Izard, T. (2018). The interaction of talin with the cell membrane is essential for integrin activation and focal adhesion formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41):10339–10344.

Chitteti, B. R., Kacena, M. A., Voytik-Harbin, S. L., & Srour, E. F. (2015). Modulation of hematopoietic progenitor cell fate in vitro by varying collagen oligomer matrix stiffness in the presence or absence of osteoblasts. *Journal of Immunological Methods*, 425:108–113.

Chiu, Y. G. & Aljitawi, O. S. (2019). VCAM-1+ macrophages usher hematopoietic stem and progenitor cell to vascular niche "hotspots". *Annals of translational medicine*, 7(Suppl 3):S116.

Choi, J. S. & Harley, B. A. C. (2012). The combined influence of substrate elasticity and ligand density

on the viability and biophysical properties of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials*, 33(18):4460–4468.

Choi, J. S. & Harley, B. A. C. (2017). Marrow-inspired matrix cues rapidly affect early fate decisions of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science advances*, 3(1):e1600455.

Choi, W. I., Kim, M., Tae, G., & Kim, Y. H. (2008). Sustained release of human growth hormone from heparin-based hydrogel. *Biomacromolecules*, 9(6):1698–1704.

Christodoulou, C., Spencer, J. A., Yeh, S.-C. A., et al. (2020). Live-animal imaging of native haematopoietic stem and progenitor cells. *Nature*, 578(7794):278–283.

Chua, K.-N., Chai, C., Lee, P.-C., et al. (2006). Surface-aminated electrospun nanofibers enhance adhesion and expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Biomaterials*, 27(36):6043–6051.

Clements, J. M., Newham, P., Shepherd, M., et al. (1994). Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. *Journal of cell science*, 107 (Pt 8):2127–2135.

Cluzel, C., Saltel, F., Lussi, J., et al. (2005). The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells. *The Journal of cell biology*, 171(2):383–392.

Collins, S. J., Gallo, R. C., & Gallagher, R. E. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*, 270(5635):347–349.

Connell, B. J., Sadir, R., Baleux, F., et al. (2016). Heparan sulfate differentially controls CXCL12α- and CXCL12γ-mediated cell migration through differential presentation to their receptor CXCR4. *Science signaling*, 9(452):ra107.

Copley, M. R., Beer, P. A., & Eaves, C. J. (2012). Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell stem cell*, 10(6):690–697.

Cossarizza, A., Chang, H.-D., Radbruch, A., et al. (2017). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European journal of immunology*, 47(10):1584–1797.

Costa, M. H. G., de Soure, A. M., Cabral, J. M. S., Ferreira, F. C., & da Silva, C. L. (2018). Hematopoietic Niche - Exploring Biomimetic Cues to Improve the Functionality of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Biotechnology journal*, 13(2).

Coutu, D. L., Kokkaliaris, K. D., Kunz, L., & Schroeder, T. (2017). Three-dimensional map of nonhematopoietic bone and bone-marrow cells and molecules. *Nature biotechnology*, 35(12):1202–1210.

Craddock, C. F., Nakamoto, B., Elices, M., & Papayannopoulou, T. h. (1997). The role of CS1 moiety of fibronectin in VLA mediated haemopoietic progenitor trafficking. *British journal of haematology*, 97(1):15–21.

Crane, G. M., Jeffery, E., & Morrison, S. J. (2017). Adult haematopoietic stem cell niches. *Nature reviews. Immunology*, 17(9):573–590.

Crisan, M. & Dzierzak, E. (2016). The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Development (Cambridge, England)*, 143(24):4571–4581.

Crocker, J. C. & Grier, D. G. (1996). Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1):298–310.

Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., et al. (1997). Solution structure and basis for functional

activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO journal*, 16(23):6996–7007.

Cuchiara, M. L., Coşkun, S., Banda, O. A., et al. (2016). Bioactive poly(ethylene glycol) hydrogels to recapitulate the HSC niche and facilitate HSC expansion in culture. *Biotechnology and bioengineering*, 113(4):870–881.

Curnis, F., Longhi, R., Crippa, L., et al. (2006). Spontaneous formation of L-isoaspartate and gain of function in fibronectin. *The Journal of biological chemistry*, 281(47):36466–36476.

Curtis, A. S. (2001). Cell reactions with biomaterials: the microscopies. *European cells & materials*, 1:59–65.

Cybulsky, M. I., Fries, J. W., Williams, A. J., et al. (1991). Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *The American Journal of Pathology*, 138(4):815–820.

Dallas, M. H., Varnum-Finney, B., Martin, P. J., & Bernstein, I. D. (2007). Enhanced T-cell reconstitution by hematopoietic progenitors expanded ex vivo using the Notch ligand Delta1. *Blood*, 109(8):3579–3587.

Dalton, JR, W. T., Ahearn, M. J., McCredie, K. B., et al. (1988). HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood*, 71(1):242–247.

Dar, A., Goichberg, P., Shinder, V., et al. (2005). Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nature immunology*, 6(10):1038–1046.

Dar, A., Kollet, O., & Lapidot, T. (2006). Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Experimental hematology*, 34(8):967–975.

Darling, N. J., Hung, Y.-S., Sharma, S., & Segura, T. (2016). Controlling the kinetics of thiol-maleimide Michael-type addition gelation kinetics for the generation of homogenous poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biomaterials*, 101:199–206.

de Haan, G. & Lazare, S. S. (2018). Aging of hematopoietic stem cells. *Blood*, 131(5):479–487.

de Sauvage, F. J., Hass, P. E., Spencer, S. D., et al. (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*, 369(6481):533–538.

Decker, M., Leslie, J., Liu, Q., & Ding, L. (2018). Hepatic thrombopoietin is required for bone marrow hematopoietic stem cell maintenance. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6384):106–110.

Delaney, C., Heimfeld, S., Brashem-Stein, C., et al. (2010). Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nature medicine*, 16(2):232–236.

Delaney, C., Milano, F., Cicconi, L., et al. (2016). Infusion of a non-HLA-matched ex-vivo expanded cord blood progenitor cell product after intensive acute myeloid leukaemia chemotherapy: a phase 1 trial. *The Lancet Haematology*, 3(7):e330–e339.

Delaney, C., Varnum-Finney, B., Aoyama, K., Brashem-Stein, C., & Bernstein, I. D. (2005). Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells. *Blood*, 106(8):2693–2699.

Della Berhanu, Mortari, F., de Rosa, S. C., & Roederer, M. (2003). Optimized lymphocyte isolation methods for analysis of chemokine receptor expression. *Journal of Immunological Methods*, 279(1-2):199–207.

Deng, J., Zhao, C., Spatz, J. P., & Wei, Q. (2017). Nanopatterned Adhesive, Stretchable Hydrogel to Control Ligand Spacing and Regulate Cell Spreading and Migration. *ACS nano*, 11(8):8282–8291.

Denning-Kendall, P., Singha, S., Bradley, B., & Hows, J. (2003). Cytokine expansion culture of cord blood CD34+ cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 21(1):61–70.

Derakhshani, M., Abbaszadeh, H., Movassaghpour, A. A., et al. (2019). Strategies for elevating hematopoietic stem cells expansion and engraftment capacity. *Life sciences*, 232:116598.

Di Giacomo, F., Lewandowski, D., Cabannes, E., et al. (2012). Heparan sulfate mimetics can efficiently mobilize long-term hematopoietic stem cells. *Haematologica*, 97(4):491–499.

Dick, J. E. (2003). Stem cells: Self-renewal writ in blood. *Nature*, 423(6937):231–233.

Ding, L. & Morrison, S. J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, 495(7440):231–235.

Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., & Morrison, S. J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481(7382):457–462.

Dircio-Maldonado, R., Flores-Guzman, P., Corral-Navarro, J., et al. (2018). Functional Integrity and Gene Expression Profiles of Human Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Generated In Vitro. *Stem cells translational medicine*, 7(8):602–614.

Dmytrus, J., Matthes-Martin, S., Pichler, H., et al. (2016). Multi-color immune-phenotyping of CD34 subsets reveals unexpected differences between various stem cell sources. *Bone marrow transplantation*, 51(8):1093–1100.

Dolgalev, I. & Tikhonova, A. N. (2021). Connecting the Dots: Resolving the Bone Marrow Niche Heterogeneity. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9:622519.

Donato, E., Biagioni, F., Bisso, A., et al. (2018). YAP and TAZ are dispensable for physiological and malignant haematopoiesis. *Leukemia*, 32(9):2037–2040.

Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell stem cell*, 10(2):120–136.

Dravid, G. & Rao, S. G. A. (2002). Ex vivo expansion of stem cells from umbilical cord blood: expression of cell adhesion molecules. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 20(2):183–189.

Driscoll, T. P., Bidone, T. C., Ahn, S. J., et al. (2021). Integrin-based mechanosensing through conformational deformation. *Biophysical journal*, 120(20):4349–4359.

Drury, L. J., Ziarek, J. J., Gravel, S., et al. (2011). Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(43):17655–17660.

Dupont, S. (2016). Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. *Experimental cell research*, 343(1):42–53.

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350):179–183.

Dutta, A. S., Crowther, M., Gormley, J. J., et al. (2000). Potent Cyclic Monomeric and Dimeric Peptide Inhibitors of VLA-4 (alpha4beta1 Integrin)-Mediated Cell Adhesion Based on the Ile-Leu-Asp-Val Tetrapeptide. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 6(7):321–341.

Dutta, P., Hoyer, F. F., Grigoryeva, L. S., et al. (2015). Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. *The Journal of experimental medicine*, 212(4):497–512.

Dykstra, B., Olthof, S., Schreuder, J., Ritsema, M., & de Haan, G. (2011). Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*, 208(13):2691–2703.

Elgundi, Z., Papanicolaou, M., Major, G., et al. (2019). Cancer Metastasis: The Role of the Extracellular Matrix and the Heparan Sulfate Proteoglycan Perlecan. *Frontiers in oncology*, 9:1482.

Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., et al. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/Fibronectin binding site. *Cell*, 60(4):577–584.

Elosegui-Artola, A., Oria, R., Chen, Y., et al. (2016). Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nature cell biology*, 18(5):540–548.

Elosegui-Artola, A., Trepat, X., & Roca-Cusachs, P. (2018). Control of Mechanotransduction by Molecular Clutch Dynamics. *Trends in cell biology*, 28(5):356–367.

Ema, H. & Nakauchi, H. (2000). Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood*, 95(7):2284–2288.

Eng, E. T., Smagghe, B. J., Walz, T., & Springer, T. A. (2011). Intact alphaIIbbeta3 integrin is extended after activation as measured by solution X-ray scattering and electron microscopy. *The Journal of biological chemistry*, 286(40):35218–35226.

Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677–689.

Erb, E. M., Tangemann, K., Bohrmann, B., Müller, B., & Engel, J. (1997). Integrin alphaIIb beta3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. *Biochemistry*, 36(24):7395–7402.

Erle, D. J., Briskin, M. J., Butcher, E. C., et al. (1994). Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(2):517–528.

Esko, J. D., H. Prestegard, J., & Linhardt, R. J. (2015). *Essentials of Glycobiology: Proteins That Bind Sulfated Glycosaminoglycans*. Cold Spring Harbor (NY), 3rd. Auflage.

Esplin, B. L., Shimazu, T., Welner, R. S., et al. (2011). Chronic exposure to a TLR ligand injures hematopoietic stem cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(9):5367–5375.

Faham, S., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Linhardt, R. J., & Rees, D. C. (1996). Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5252):1116–1120.

Fairhurst, D., Rowell, R. L., Monahan, I. M., et al. (2007). Microbicides for HIV/AIDS. 2. Electrophoretic fingerprinting of CD4+ T-cell model systems. *Langmuir*, 23(5):2680–2687.

Fanni, D., Angotzi, F., Lai, F., et al. (2018). Four stages of hepatic hematopoiesis in human embryos and fetuses. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 31(6):701–707.

Fantin, A., Tacconi, C., Villa, E., et al. (2021). KIT Is Required for Fetal Liver Hematopoiesis.

Frontiers in cell and developmental biology, 9:648630.

Fermas, S., Gonnet, F., Sutton, A., et al. (2008). Sulfated oligosaccharides (heparin and fucoidan) binding and dimerization of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL 12) are coupled as evidenced by affinity CE-MS analysis. *Glycobiology*, 18(12):1054–1064.

Ferreira, M. S. V., Jahnen-Dechent, W., Labude, N., et al. (2012). Cord blood-hematopoietic stem cell expansion in 3D fibrin scaffolds with stromal support. *Biomaterials*, 33(29):6987–6997.

Ferreira, S. A., Motwani, M. S., Faull, P. A., et al. (2018). Bi-directional cell-pericellular matrix interactions direct stem cell fate. *Nature communications*, 9(1):4049.

Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., et al. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, 75(12):2417–2426.

Flores-Guzmán, P., Fernández-Sánchez, V., & Mayani, H. (2013). Concise review: ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells: basic principles, experimental approaches, and impact in regenerative medicine. *Stem cells translational medicine*, 2(11):830–838.

Flores-Merino, M. V., Chirasatitsin, S., Lopresti, C., et al. (2010). Nanoscopic mechanical anisotropy in hydrogel surfaces. *Soft matter*, 6(18):4466–4470.

Florian, M. C., Klose, M., Sacma, M., et al. (2018). Aging alters the epigenetic asymmetry of HSC division. *PLoS biology*, 16(9):e2003389.

Földesi, B. (2018). Die Top 10 der DNA-Farbstoffe und Sonden. *www.biomol.com/de/ressourcen/biomol-blog/die-top-10-der-dna-farbstoffe-und-sonden*.

Fontaine, S. D., Reid, R., Robinson, L., Ashley, G. W., & Santi, D. V. (2015). Long-term stabilization of maleimide-thiol conjugates. *Bioconjugate chemistry*, 26(1):145–152.

Foudi, A., Jarrier, P., Zhang, Y., et al. (2006). Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4-/- chimeric mice. *Blood*, 107(6):2243–2251.

Franke, K., Pompe, T., Bornhäuser, M., & Werner, C. (2007). Engineered matrix coatings to modulate the adhesion of CD133+ human hematopoietic progenitor cells. *Biomaterials*, 28(5):836–843.

Freudenberg, U., Hermann, A., Welzel, P. B., et al. (2009). A star-PEG-heparin hydrogel platform to aid cell replacement therapies for neurodegenerative diseases. *Biomaterials*, 30(28):5049–5060.

Freudenberg, U., Liang, Y., Kiick, K. L., & Werner, C. (2016). Glycosaminoglycan-Based Biohybrid Hydrogels: A Sweet and Smart Choice for Multifunctional Biomaterials. *Advanced Materials*, 28(40):8861–8891.

Freudenberg, U., Sommer, J.-U., Levental, K. R., et al. (2012). Using Mean Field Theory to Guide Biofunctional Materials Design. *Advanced Functional Materials*, 22(7):1391–1398.

Freudenberg, U., Zieris, A., Chwalek, K., et al. (2015). Heparin desulfation modulates VEGF release and angiogenesis in diabetic wounds. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 220(Pt A):79–88.

Freund, D., Bauer, N., Boxberger, S., et al. (2006). Polarization of human hematopoietic progenitors during contact with multipotent mesenchymal stromal cells: effects on proliferation and clonogenicity. *Stem cells and development*, 15(6):815–829.

Fröbel, J., Landspersky, T., Percin, G., et al. (2021). The Hematopoietic Bone Marrow Niche Ecosystem. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9:705410.

Fukuda, K., Bledzka, K., Yang, J., et al. (2014). Molecular basis of kindlin-2 binding to integrin-linked

kinase pseudokinase for regulating cell adhesion. *The Journal of biological chemistry*, 289(41):28363–28375.

Ganuza, M., Hall, T., Finkelstein, D., et al. (2017). Lifelong haematopoiesis is established by hundreds of precursors throughout mammalian ontogeny. *Nature cell biology*, 19(10):1153–1163.

Gao, L., Decker, M., Chen, H., & Ding, L. (2021). Thrombopoietin from hepatocytes promotes hematopoietic stem cell regeneration after myeloablation. *eLife*, 10.

García-Bernal, D., Parmo-Cabañas, M., Dios-Esponera, A., et al. (2009). Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion. *Immunity*, 31(6):953–964.

García-García, A. & Méndez-Ferrer, S. (2020). The Autonomic Nervous System Pulls the Strings to Coordinate Circadian HSC Functions. *Frontiers in immunology*, 11:956.

Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y., & Waterman, C. M. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*, 26:315–333.

Gardner, J. R. & Woods, R. (1977). The hydrophilic nature of gold and platinum. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 81(2):285–290.

Ge, Y., Wang, J., Zhang, H., et al. (2022). Fate of hematopoietic stem cells determined by Notch1 signaling (Review). *Experimental and therapeutic medicine*, 23(2):170.

Gekas, C., Dieterlen-Lièvre, F., Orkin, S. H., & Mikkola, H. K. A. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Developmental cell*, 8(3):365–375.

Giebel, B., Corbeil, D., Beckmann, J., et al. (2004). Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 104(8):2332–2338.

Giebel, B., Zhang, T., Beckmann, J., et al. (2006). Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. *Blood*, 107(5):2146–2152.

Gigant, C., Latger-Cannard, V., Bensoussan, D., et al. (2001). Quantitative expression of adhesion molecules on granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, bone marrow, and cord blood CD34+ cells. *Journal of hematotherapy & stem cell research*, 10(6):807–814.

Giladi, A., Paul, F., Herzog, Y., et al. (2018). Single-cell characterization of haematopoietic progenitors and their trajectories in homeostasis and perturbed haematopoiesis. *Nature cell biology*, 20(7):836–846.

Gilchrist, A. E., Lee, S., Hu, Y., & Harley, B. A. C. (2019). Soluble Signals and Remodeling in a Synthetic Gelatin-Based Hematopoietic Stem Cell Niche. *Advanced healthcare materials*, 8(20):e1900751.

Glavey, S. V., Naba, A., Manier, S., et al. (2017). Proteomic characterization of human multiple myeloma bone marrow extracellular matrix. *Leukemia*, 31(11):2426–2434.

Goetz, C., Hammerbeck, C., & Bonnevier, J. (2018). *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert. Springer International Publishing, Cham.

Golan, K., Kumari, A., Kollet, O., et al. (2018). Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. *Cell stem cell*, 23(4):572–585.e7.

Goldfinger, L. E., Han, J., Kiosses, W. B., Howe, A. K., & Ginsberg, M. H. (2003). Spatial restriction

of alpha4 integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and alpha4beta1-dependent cell migration. *The Journal of cell biology*, 162(4):731–741.

Goodell, M. A., Rosenzweig, M., Kim, H., et al. (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nature medicine*, 3(12):1337–1345.

Gothot, A., Giet, O., Huygen, S., & Beguin, Y. (2003). Binding and migration across fibronectin and VCAM-1 of cycling hematopoietic progenitor cells. *Leukemia & lymphoma*, 44(8):1379–1383.

Goult, B. T., Yan, J., & Schwartz, M. A. (2018). Talin as a mechanosensitive signaling hub. *The Journal of cell biology*, 217(11):3776–3784.

Grabovsky, V., Feigelson, S., Chen, C., et al. (2000). Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *The Journal of experimental medicine*, 192(4):495–506.

Graeter, S. V., Huang, J., Perschmann, N., et al. (2007). Mimicking cellular environments by nanostructured soft interfaces. *Nano letters*, 7(5):1413–1418.

Gralla-Koser, R. (2018). Polymer Model System for Mechanosensitivity Studies: Decoupling Mechanics from Biological and Topographical Cues. *Karlsruher Institut für Technologie*, Dissertation.

Grassinger, J., Haylock, D. N., Storan, M. J., et al. (2009). Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with alpha9beta1 and alpha4beta1 integrins. *Blood*, 114(1):49–59.

Greenbaum, A., Hsu, Y.-M. S., Day, R. B., et al. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*, 495(7440):227–230.

Grinenko, T., Arndt, K., Portz, M., et al. (2014). Clonal expansion capacity defines two consecutive developmental stages of long-term hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*, 211(2):209–215.

Guan, J.-L. & Hynes, R. O. (1990). Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor α4β1. *Cell*, 60(1):53–61.

Guasch, J., Diemer, J., Riahinezhad, H., et al. (2016). Synthesis of Binary Nanopatterns on Hydrogels for Initiating Cellular Responses. *Chemistry of Materials*, 28(6):1806–1815.

Gupta, P., McCarthy, J. B., & Verfaillie, C. M. (1996). Stromal fibroblast heparan sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells. *Blood*, 87(8):3229–3236.

Gvaramia, D., Müller, E., Müller, K., et al. (2017). Combined influence of biophysical and biochemical cues on maintenance and proliferation of hematopoietic stem cells. *Biomaterials*, 138:108–117.

Hahn, A. T., Jones, J. T., & Meyer, T. (2009). Quantitative analysis of cell cycle phase durations and PC12 differentiation using fluorescent biosensors. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(7):1044–1052.

Hamann, A., Andrew, D. P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B., & Butcher, E. C. (1994). Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(7):3282–3293.

Han, X., Wang, R., Zhou, Y., et al. (2018). Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. *Cell*, 172(5):1091–1107.e17.

Hao, J., Zhou, H., Nemes, K., et al. (2021). Membrane-bound SCF and VCAM-1 synergistically

regulate the morphology of hematopoietic stem cells. *The Journal of cell biology*, 220(10).

Haribabu, B., Richardson, R. M., Fisher, I., et al. (1997). Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *The Journal of biological chemistry*, 272(45):28726–28731.

He, C., Ji, H., Qian, Y., et al. (2019). Heparin-based and heparin-inspired hydrogels: size-effect, gelation and biomedical applications. *Journal of materials chemistry. B*, 7(8):1186–1208.

Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., et al. (2002). Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell*, 109(5):625–637.

Heng, B. C., Zhang, X., Aubel, D., et al. (2020). Role of YAP/TAZ in Cell Lineage Fate Determination and Related Signaling Pathways. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8:735.

Henninger, J., Santoso, B., Hans, S., et al. (2017). Clonal fate mapping quantifies the number of haematopoietic stem cells that arise during development. *Nature cell biology*, 19(1):17–27.

Hidalgo, A., Sanz-Rodriguez, F., Rodriguez-Fernández, J. L., et al. (2001). Chemokine stromal cell-derived factor-1α modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology*, 29(3):345–355.

Hind, L. E., Vincent, W. J. B., & Huttenlocher, A. (2016). Leading from the Back: The Role of the Uropod in Neutrophil Polarization and Migration. *Developmental cell*, 38(2):161–169.

Ho, A. D. & Wagner, W. (2007). The beauty of asymmetry: asymmetric divisions and self-renewal in the haematopoietic system. *Current opinion in hematology*, 14(4):330–336.

Hoffman, R., Heslop, H., Weitz, J. I., et al., Herausgeber (2018). *Hematology: Basic principles and practice*. Elsevier, Philadelphia, PA, 7th edition. Auflage.

Holm, M., Thomsen, M., Høyer, M., & Hokland, P. (1999). Dynamic cell cycle kinetics of normal CD34+ cells and CD38+/- subsets of haemopoietic progenitor cells in G-CSF-mobilized peripheral blood. *British journal of haematology*, 105(4):1002–1013.

Holst, J., Watson, S., Lord, M. S., et al. (2010). Substrate elasticity provides mechanical signals for the expansion of hemopoietic stem and progenitor cells. *Nature biotechnology*, 28(10):1123–1128.

Hoogewerf, A. J., Kuschert, G. S., Proudfoot, A. E., et al. (1997). Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*, 36(44):13570–13578.

Hua, P., Kronsteiner, B., van der Garde, M., et al. (2019). Single-cell assessment of transcriptome alterations induced by Scriptaid in early differentiated human haematopoietic progenitors during ex vivo expansion. *Scientific reports*, 9(1):5300.

Huang, E. J., Nocka, K. H., Buck, J., & Besmer, P. (1992). Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Molecular biology of the cell*, 3(3):349–362.

Huang, S., Law, P., Francis, K., Palsson, B. O., & Ho, A. D. (1999). Symmetry of initial cell divisions among primitive hematopoietic progenitors is independent of ontogenic age and regulatory molecules. *Blood*, 94(8):2595–2604.

Huang, X., Lee, M.-R., Cooper, S., et al. (2016). Activation of OCT4 enhances ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells by regulating HOXB4 expression. *Leukemia*, 30(1):144–153.

Huber, H. M., Heiden, M., & Seitz, R. (1999). Hämatopoetische Stammzellen: Zulassung und Qualitätskontrollen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 42(2):105–

112.

Huebsch, N., Arany, P. R., Mao, A. S., et al. (2010). Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nature materials*, 9(6):518–526.

Hui, T., Sørensen, E. S., & Rittling, S. R. (2015). Osteopontin binding to the alpha 4 integrin requires highest affinity integrin conformation, but is independent of post-translational modifications of osteopontin. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 41:19–25.

Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science*, 119(Pt 19):3901–3903.

Humphries, M. J., Sheridan, J., Mould, A. P., & Newham, P. (1995). Mechanisms of VCAM-1 and fibronectin binding to integrin alpha 4 beta 1: implications for integrin function and rational drug design. *Ciba Foundation symposium*, 189:177–91; discussion 191–9.

Hutter, E. & Fendler, J. H. (2004). Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Advanced Materials*, 16(19):1685–1706.

Huygen, S., Giet, O., Artisien, V., et al. (2002). Adhesion of synchronized human hematopoietic progenitor cells to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1 fluctuates reversibly during cell cycle transit in ex vivo culture. *Blood*, 100(8):2744–2752.

Hynes, R. O. & Naba, A. (2012). Overview of the matrisome–an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(1):a004903.

Ikuta, K., Ingolia, D. E., Friedman, J., Heimfeld, S., & Weissman, I. L. (1991). Mouse hematopoietic stem cells and the interaction of c-kit receptor and steel factor. *International journal of cell cloning*, 9(5):451–460.

Imai, Y., Shimaoka, M., & Kurokawa, M. (2010). Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. *International journal of hematology*, 91(4):569–575.

Ingavle, G., Vaidya, A., & Kale, V. (2019). Constructing Three-Dimensional Microenvironments Using Engineered Biomaterials for Hematopoietic Stem Cell Expansion. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 25(4):312–329.

Ito, K. & Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(4):243–256.

Ivanovs, A., Rybtsov, S., Welch, L., et al. (2011). Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *The Journal of experimental medicine*, 208(12):2417–2427.

Ivanovska, I. L., Swift, J., Spinler, K., et al. (2017). Cross-linked matrix rigidity and soluble retinoids synergize in nuclear lamina regulation of stem cell differentiation. *Molecular biology of the cell*, 28(14):2010–2022.

Jacobsen, K., Kravitz, J., Kincade, P. W., & Osmond, D. G. (1996). Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood*, 87(1):73–82.

Jalkanen, S. & Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *The Journal of cell biology*, 116(3):817–825.

Janmey, P. A., Fletcher, D. A., & Reinhart-King, C. A. (2020). Stiffness Sensing by Cells. *Physiological reviews*, 100(2):695–724.

Janowska-Wieczorek, A. (2000). Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34+ cells in response to chemokines. *Experimental hematology*, 28(11):1274–1285.

Jansen, L. E., Birch, N. P., Schiffman, J. D., Crosby, A. J., & Peyton, S. R. (2015). Mechanics of intact bone marrow. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 50:299–307.

Janssens, R., Struyf, S., & Proost, P. (2018). The unique structural and functional features of CXCL12. *Cellular & molecular immunology*, 15(4):299–311.

Jiang, X.-S., Chai, C., Zhang, Y., et al. (2006). Surface-immobilization of adhesion peptides on substrate for ex vivo expansion of cryopreserved umbilical cord blood CD34+ cells. *Biomaterials*, 27(13):2723–2732.

Johnson, Z., Proudfoot, A. E., & Handel, T. M. (2005). Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(6):625–636.

Jones, E. Y., Harlos, K., Bottomley, M. J., et al. (1995). Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1.8 A resolution. *Nature*, 373(6514):539–544.

Jung, O., Beauvais, D. M., Adams, K. M., & Rapraeger, A. C. (2019). VLA-4 phosphorylation during tumor and immune cell migration relies on its coupling to VEGFR2 and CXCR4 by syndecan-1. *Journal of cell science*, 132(20).

Jung, Y., Wang, J., Havens, A., et al. (2005). Cell-to-cell contact is critical for the survival of hematopoietic progenitor cells on osteoblasts. *Cytokine*, 32(3-4):155–162.

Jurecic, R. (2019). Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. *Advances in experimental medicine and biology*, 1169:195–211.

Kapur, R., Majumdar, M., Xiao, X., et al. (1998). Signaling through the interaction of membrane-restricted stem cell factor and c-kit receptor tyrosine kinase: genetic evidence for a differential role in erythropoiesis. *Blood*, 91(3):879–889.

Karigane, D. & Takubo, K. (2017). Metabolic regulation of hematopoietic and leukemic stem/progenitor cells under homeostatic and stress conditions. *International journal of hematology*, 106(1):18–26.

Karimi, F., O'Connor, A. J., Qiao, G. G., & Heath, D. E. (2018). Integrin Clustering Matters: A Review of Biomaterials Functionalized with Multivalent Integrin-Binding Ligands to Improve Cell Adhesion, Migration, Differentiation, Angiogenesis, and Biomedical Device Integration. *Advanced healthcare materials*, 7(12):e1701324.

Kästle, G., Boyen, H.-G., Weigl, F., et al. (2003). Micellar Nanoreactors—Preparation and Characterization of Hexagonally Ordered Arrays of Metallic Nanodots. *Advanced Functional Materials*, 13(11):853–861.

Katagiri, K. & Kinashi, T. (2012). Rap1 and integrin inside-out signaling. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 757:279–296.

Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.-M., et al. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 124(2):407–421.

Kaushansky, K., Lok, S., Holly, R. D., et al. (1994). Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*, 369(6481):568–571.

Kechagia, J. Z., Ivaska, J., & Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the

microenvironment. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(8):457–473.

Keeney, M., Chin-Yee, I., Weir, K., et al. (1998). Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Cytometry*, 34(2):61–70.

Keselowsky, B. G., Collard, D. M., & García, A. J. (2005). Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(17):5953–5957.

Khalili, A. A. & Ahmad, M. R. (2015). A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International journal of molecular sciences*, 16(8):18149–18184.

Khurana, S., Schouteden, S., Manesia, J. K., et al. (2016). Outside-in integrin signalling regulates haematopoietic stem cell function via Periostin-Itgav axis. *Nature communications*, 7:13500.

Kiel, M. J. & Morrison, S. J. (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nature reviews. Immunology*, 8(4):290–301.

Kieusseian, A., La Brunet de Grange, P., Burlen-Defranoux, O., Godin, I., & Cumano, A. (2012). Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver. *Development (Cambridge, England)*, 139(19):3521–3530.

Kim, C. H. & Broxmeyer, H. E. (1998). In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood*, 91(1):100–110.

Kim, M., Carman, C. V., Yang, W., Salas, A., & Springer, T. A. (2004). The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin alphaLbeta2. *The Journal of cell biology*, 167(6):1241–1253.

Kishimoto, S., Nakamura, S., Nakamura, S.-i., et al. (2009). Cytokine-immobilized microparticle-coated plates for culturing hematopoietic progenitor cells. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 133(3):185–190.

Kissa, K. & Herbomel, P. (2010). Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*, 464(7285):112–115.

Klapproth, S., Bromberger, T., Türk, C., Krüger, M., & Moser, M. (2019). A kindlin-3-leupaxin-paxillin signaling pathway regulates podosome stability. *The Journal of cell biology*, 218(10):3436–3454.

Klemke, M., Weschenfelder, T., Konstandin, M. H., & Samstag, Y. (2007). High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *Journal of cellular physiology*, 212(2):368–374.

Klinke, R. & Pape, H.-C., Herausgeber (2010). *Physiologie: ... 68 Tabellen*. Thieme Electronic Book Library. Thieme, Stuttgart, 6., vollst. überarb. aufl.. Auflage.

Knapp, D. J. H. F., Hammond, C. A., Miller, P. H., et al. (2017). Dissociation of Survival, Proliferation, and State Control in Human Hematopoietic Stem Cells. *Stem cell reports*, 8(1):152–162.

Ko, K.-H., Odell, R., & Nordon, R. E. (2007). Analysis of cell differentiation by division tracking cytometry. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71(10):773–782.

Koch, C. M., Chiu, S. F., Akbarpour, M., et al. (2018). A Beginner's Guide to Analysis of RNA

Sequencing Data. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 59(2):145–157.

Koeffler, H. P., Billing, R., Lusis, A. J., Sparkes, R., & Golde, D. W. (1980). An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood*, 56(2):265–273.

Koeffler, H. P. & Golde, D. W. (1978). Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science (New York, N.Y.)*, 200(4346):1153–1154.

Koenig, J. M., Luttge, B., Benson, N. A., & Christensen, R. D. (2001). Cell cycle status of CD34+ cells in human fetal bone marrow. *Early Human Development*, 65(2):159–163.

Kollet, O., Spiegel, A., Peled, A., et al. (2001). Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood*, 97(10):3283–3291.

Komoriya, A., Green, L. J., Mervic, M., et al. (1991). The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *The Journal of biological chemistry*, 266(23):15075–15079.

Kondo, M., Weissman, I. L., & Akashi, K. (1997). Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell*, 91(5):661–672.

Kong, F., García, A. J., Mould, A. P., Humphries, M. J., & Zhu, C. (2009). Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *The Journal of cell biology*, 185(7):1275–1284.

Kotzerke, J., Runge, R., Götze, P., et al. (2019). Radio- und Photosensitivierung von Plasmid-DNA durch den DNA-bindenden Liganden Propidiumiodid: Untersuchungen zur Auger-Elektronen-Induktion und zum Nachweis von Cherenkov-Strahlung. *Nuklearmedizin. Nuclear medicine*, 58(4):319–327.

Kraft, S., Klemis, V., Sens, C., et al. (2016). Identification and characterization of a unique role for EDB fibronectin in phagocytosis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 94(5):567–581.

Kräter, M., Jacobi, A., Otto, O., et al. (2017). Bone marrow niche-mimetics modulate HSPC function via integrin signaling. *Scientific reports*, 7(1):2549.

Kratzer, D., Ludwig-Husemann, A., Junges, K., Geckle, U., & Lee-Thedieck, C. (2019). Nanostructured Bifunctional Hydrogels as Potential Instructing Platform for Hematopoietic Stem Cell Differentiation. *Frontiers in Materials*, 5.

Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., & May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87(1):1–13.

Kumar, S. S., Hsiao, J.-H., Ling, Q.-D., et al. (2013). The combined influence of substrate elasticity and surface-grafted molecules on the ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials*, 34(31):7632–7644.

Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., et al. (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, 502(7473):637–643.

Kurth, I., Franke, K., Pompe, T., Bornhäuser, M., & Werner, C. (2011). Extracellular matrix functionalized microcavities to control hematopoietic stem and progenitor cell fate. *Macromolecular bioscience*, 11(6):739–747.

Lagarrigue, F., Kim, C., & Ginsberg, M. H. (2016). The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. *Blood*, 128(4):479–487.

Lagrange, J.-L. (1775). Recherches d'arithmétique. *Nouveaux mémoires de l'Académie royale des sciences et belles-lettres de Berlin*, (Année 1773):265–312.

Laguri, C., Arenzana-Seisdedos, F., & Lortat-Jacob, H. (2008). Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example. *Carbohydrate research*, 343(12):2018–2023.

Lai, A. Y., Lin, S. M., & Kondo, M. (2005). Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(8):5016–5023.

Lai, C.-Y., Yamazaki, S., Okabe, M., et al. (2014). Stage-specific roles for CXCR4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(7):1929–1942.

Lai, W., Li, Y., Mak, S., et al. (2013). Reconstitution of bone-like matrix in osteogenically differentiated mesenchymal stem cell-collagen constructs: A three-dimensional in vitro model to study hematopoietic stem cell niche. *Journal of tissue engineering*, 4:2041731413508668.

Lampreia, F. P., Carmelo, J. G., & Anjos-Afonso, F. (2017). Notch Signaling in the Regulation of Hematopoietic Stem Cell. *Current stem cell reports*, 3(3):202–209.

Lapidot, T., Dar, A., & Kollet, O. (2005). How do stem cells find their way home? *Blood*, 106(6):1901–1910.

Laurenti, E. & Göttgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*, 553(7689):418–426.

Lee, Y. & Ding, L. (2021). A polarized anchor for hematopoietic stem cells: Synapse between stem cells and their niche? *The Journal of cell biology*, 220(10).

Lee-Thedieck, C., Rauch, N., Fiammengo, R., Klein, G., & Spatz, J. P. (2012). Impact of substrate elasticity on human hematopoietic stem and progenitor cell adhesion and motility. *Journal of cell science*, 125(Pt 16):3765–3775.

Lee-Thedieck, C., Schertl, P., & Klein, G. (2021). The extracellular matrix of hematopoietic stem cell niches. *Advanced drug delivery reviews*, 181:114069.

Lee-Thedieck, C. & Spatz, J. P. (2014). Biophysical regulation of hematopoietic stem cells. *Biomaterials science*, 2(11):1548–1561.

Leiss, M., Beckmann, K., Girós, A., Costell, M., & Fässler, R. (2008). The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Current opinion in cell biology*, 20(5):502–507.

Leisten, I., Kramann, R., Ventura Ferreira, M. S., et al. (2012). 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials*, 33(6):1736–1747.

Leppmeier, M. (1997). *Kugelpackungen von Kepler bis heute: Eine Einführung für Schüler, Studenten und Lehrer*. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden.

Lévesque, J.-P., Hendy, J., Takamatsu, Y., Simmons, P. J., & Bendall, L. J. (2003). Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *The Journal of clinical investigation*, 111(2):187–196.

Lévesque, J.-P. & Winkler, I. G. (2011). Hierarchy of immature hematopoietic cells related to blood flow and niche. *Current opinion in hematology*, 18(4):220–225.

Li, D., Xue, W., Li, M., et al. (2018a). VCAM-1+ macrophages guide the homing of HSPCs to a

vascular niche. *Nature*, 564(7734):119–124.

Li, H., Huang, S.-Y., Shi, F.-H., et al. (2018b). α4β7 integrin inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 28(12):903–917.

Li, H., Luo, Q., Shan, W., et al. (2021a). Biomechanical cues as master regulators of hematopoietic stem cell fate. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 78(16):5881–5902.

Li, J. & Springer, T. A. (2018). Energy landscape differences among integrins establish the framework for understanding activation. *The Journal of cell biology*, 217(1):397–412.

Li, Y., Hu, Z., & Li, C. (1993). New method for measuring poisson's ratio in polymer gels. *Journal of Applied Polymer Science*, 50(6):1107–1111.

Li, Y., Wang, J., & Zhong, W. (2021b). Regulation and mechanism of YAP/TAZ in the mechanical microenvironment of stem cells (Review). *Molecular medicine reports*, 24(1).

Li, Z., He, X. C., & Li, L. (2019). Hematopoietic stem cells: self-renewal and expansion. *Current opinion in hematology*, 26(4):258–265.

Lian, I., Kim, J., Okazawa, H., et al. (2010). The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & development*, 24(11):1106–1118.

Liao, Y.-F., Gotwals, P. J., Koteliansky, V. E., Sheppard, D., & van de Water, L. (2002). The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *The Journal of biological chemistry*, 277(17):14467–14474.

Ligasová, A., Strunin, D., Friedecký, D., Adam, T., & Koberna, K. (2015). A fatal combination: a thymidylate synthase inhibitor with DNA damaging activity. *PloS one*, 10(2):e0117459.

Lin, C.-H. & Forscher, P. (1995). Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron*, 14(4):763–771.

Lisignoli, G., Toneguzzi, S., Piacentini, A., et al. (2004). Recruitment and proliferation of T lymphocytes is supported by IFNgamma- and TNFalpha-activated human osteoblasts: Involvement of CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) adhesion molecules and CXCR3 chemokine receptor. *Journal of cellular physiology*, 198(3):388–398.

Liu, Y., Ding, L., Zhang, B., et al. (2020). Thrombopoietin enhances hematopoietic stem and progenitor cell homing by impeding matrix metalloproteinase 9 expression. *Stem cells translational medicine*, 9(6):661–673.

Lodish, H. F. (2008). *Molecular cell biology*. W.H. Freeman, New York, 6th ed.. Auflage.

Loeffler, D., Schneiter, F., Wang, W., et al. (2021). Asymmetric organelle inheritance predicts human blood stem cell fate. *Blood*.

Loeffler, D., Wang, W., Hopf, A., et al. (2018). Mouse and human HSPC immobilization in liquid culture by CD43- or CD44-antibody coating. *Blood*, 131(13):1425–1429.

Löffler, G. & Petrides, P. E., Herausgeber (2003). *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer eBook Collection. Springer Berlin Heidelberg and Imprint Springer, Berlin, Heidelberg, 7th ed. 2003. Auflage.

Lohmann, N., Schirmer, L., Atallah, P., et al. (2017). Glycosaminoglycan-based hydrogels capture inflammatory chemokines and rescue defective wound healing in mice. *Science translational medicine*, 9(386).

Lohmueller, T., Bock, E., & Spatz, J. P. (2008). Synthesis of Quasi-Hexagonal Ordered Arrays of Metallic Nanoparticles with Tuneable Particle Size. *Advanced Materials*, 20(12):2297–2302.

Lohmüller, T., Aydin, D., Schwieder, M., et al. (2011). Nanopatterning by block copolymer micelle nanolithography and bioinspired applications. *Biointerphases*, 6(1):MR1–12.

López-Muñoz, G. A., Pescador-Rojas, J. A., Ortega-Lopez, J., Salazar, J. S., & Balderas-López, J. A. (2012). Thermal diffusivity measurement of spherical gold nanofluids of different sizes/concentrations. *Nanoscale research letters*, 7(1):423.

Lozzio, C. B. & Lozzio, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3):321–334.

Lu, R., Neff, N. F., Quake, S. R., & Weissman, I. L. (2011). Tracking single hematopoietic stem cells in vivo using high-throughput sequencing in conjunction with viral genetic barcoding. *Nature biotechnology*, 29(10):928–933.

Lüllmann-Rauch, R. (2003). *Histologie: Verstehen, Lernen, Nachschlagen ; 10 Tabellen*. Thieme, Stuttgart, 1. aufl.. Auflage.

Lund, S. A., Wilson, C. L., Raines, E. W., et al. (2013). Osteopontin mediates macrophage chemotaxis via α4 and α9 integrins and survival via the α4 integrin. *Journal of cellular biochemistry*, 114(5):1194–1202.

Lundin, V., Sugden, W. W., Theodore, L. N., et al. (2020). YAP Regulates Hematopoietic Stem Cell Formation in Response to the Biomechanical Forces of Blood Flow. *Developmental cell*, 52(4):446–460.e5.

Luo, B.-H., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology*, 25:619–647.

Madihally, S. V., Flake, A. W., & Matthew, H. W. (1999). Maintenance of CD34 expression during proliferation of CD34+ cord blood cells on glycosaminoglycan surfaces. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 17(5):295–305.

Mahadik, B. P., Pedron Haba, S., Skertich, L. J., & Harley, B. A. C. (2015). The use of covalently immobilized stem cell factor to selectively affect hematopoietic stem cell activity within a gelatin hydrogel. *Biomaterials*, 67:297–307.

Majeti, R., Park, C. Y., & Weissman, I. L. (2007). Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell stem cell*, 1(6):635–645.

Majka, M., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., et al. (2001). Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*, 97(10):3075–3085.

Malara, A., Gruppi, C., Abbonante, V., et al. (2019). EDA fibronectin-TLR4 axis sustains megakaryocyte expansion and inflammation in bone marrow fibrosis. *The Journal of experimental medicine*, 216(3):587–604.

Manabe, R., Ohe, N., Maeda, T., Fukuda, T., & Sekiguchi, K. (1997). Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *The Journal of cell biology*, 139(1):295–307.

Manevich, E., Grabovsky, V., Feigelson, S. W., & Alon, R. (2007). Talin 1 and paxillin facilitate

distinct steps in rapid VLA-4-mediated adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1. *The Journal of biological chemistry*, 282(35):25338–25348.

Manz, M. G., Miyamoto, T., Akashi, K., & Weissman, I. L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18):11872–11877.

Martínez-Moreno, M., Leiva, M., Aguilera-Montilla, N., et al. (2016). In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by α4β1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia*, 30(4):861–872.

Matsuo, Y., MacLeod, R. A., Uphoff, C. C., et al. (1997). Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23). *Leukemia*, 11(9):1469–1477.

Maynard, S. A., Winter, C. W., Cunnane, E. M., & Stevens, M. M. (2021). Advancing cell instructive biomaterials through increased understanding of cell receptor spacing and material surface functionalization. *Regenerative engineering and translational medicine*, 7(4):553–547.

McGrath, K. E. & Palis, J. (2005). Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Experimental hematology*, 33(9):1021–1028.

McQuibban, G. A., Butler, G. S., Gong, J. H., et al. (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *The Journal of biological chemistry*, 276(47):43503–43508.

Medvinsky, A. & Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, 86(6):897–906.

Megrelis, L. & Delon, J. (2014). Rapid and robust analysis of cellular and molecular polarization induced by chemokine signaling. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (94).

Mende, N., Jolly, A., Percin, G. I., et al. (2019). Prospective isolation of nonhematopoietic cells of the niche and their differential molecular interactions with HSCs. *Blood*, 134(15):1214–1226.

Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., & Frenette, P. S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*, 452(7186):442–447.

Méndez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., et al. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466(7308):829–834.

Miltenyi Biotec GmbH (2017). MACS® Cell Separation: Select the best.

Möckl, L. (2020). The Emerging Role of the Mammalian Glycocalyx in Functional Membrane Organization and Immune System Regulation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8:253.

Möhle, R., Bautz, F., Rafii, S., et al. (1998). The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 91(12):4523–4530.

Moores, A. & Goettmann, F. (2006). The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. *New Journal of Chemistry*, 30(8):1121.

Moreno-Layseca, P., Icha, J., Hamidi, H., & Ivaska, J. (2019). Integrin trafficking in cells and tissues. *Nature cell biology*, 21(2):122–132.

Morrison, S. J. & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development

and cancer. *Nature*, 441(7097):1068–1074.

Morrison, S. J., Uchida, N., & Weissman, I. L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology*, 11:35–71.

Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Hemmati, H. D., Wright, D. E., & Weissman, I. L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 124(10):1929–1939.

Mould, A. P., Askari, J. A., Craig, S. E., et al. (1994). Integrin alpha 4 beta 1-mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the alternatively spliced IIICS region of fibronectin. *The Journal of biological chemistry*, 269(44):27224–27230.

Mould, A. P., Komoriya, A., Yamada, K. M., & Humphries, M. J. (1991). The CS5 peptide is a second site in the IIICS region of fibronectin recognized by the integrin alpha 4 beta 1. Inhibition of alpha 4 beta 1 function by RGD peptide homologues. *The Journal of biological chemistry*, 266(6):3579–3585.

Moyano, J. V., Carnemolla, B., Domínguez-Jiménez, C., et al. (1997). Fibronectin type III5 repeat contains a novel cell adhesion sequence, KLDAPT, which binds activated alpha4beta1 and alpha4beta7 integrins. *The Journal of biological chemistry*, 272(40):24832–24836.

Muduli, S., Chen, L.-H., Li, M.-P., et al. (2017). Stem cell culture on polyvinyl alcohol hydrogels having different elasticity and immobilized with ECM-derived oligopeptides. *Journal of Polymer Engineering*, 37(7):647–660.

Müller, E., Pompe, T., Freudenberg, U., & Werner, C. (2017). Matrix Growth Factor and Surface Ligand Presentation. In *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*, Seiten 215–231. Elsevier.

Müller, E., Wang, W., Qiao, W., et al. (2016). Distinguishing autocrine and paracrine signals in hematopoietic stem cell culture using a biofunctional microcavity platform. *Scientific reports*, 6:31951.

Muth, C. (2012). Interaktion von hämatopoetischen Stammzellen mit einer biomimetischen nanostrukturierten Nische. *Universität Heidelberg*, Dissertation.

Muth, C. A., Steinl, C., Klein, G., & Lee-Thedieck, C. (2013). Regulation of hematopoietic stem cell behavior by the nanostructured presentation of extracellular matrix components. *PloS one*, 8(2):e54778.

Na Nakorn, T., Traver, D., Weissman, I. L., & Akashi, K. (2002). Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *The Journal of clinical investigation*, 109(12):1579–1585.

Naba, A., Clauser, K. R., Ding, H., et al. (2016). The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 49:10–24.

Nagai, Y., Garrett, K. P., Ohta, S., et al. (2006). Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, 24(6):801–812.

Nagasawa, T. (2000). A chemokine, SDF-1/PBSF, and its receptor, CXC chemokine receptor 4, as mediators of hematopoiesis. *International journal of hematology*, 72(4):408–411.

Nagasawa, T. (2014). CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 92(5):433–439.

Nair, D. P., Podgórski, M., Chatani, S., et al. (2014). The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chemistry of Materials*, 26(1):724–744.

Netelenbos, T., van den Born, J., Kessler, F. L., et al. (2003). In vitro model for hematopoietic progenitor cell homing reveals endothelial heparan sulfate proteoglycans as direct adhesive ligands. *Journal of leukocyte biology*, 74(6):1035–1044.

Newham, P., Craig, S. E., Seddon, G. N., et al. (1997). Alpha4 integrin binding interfaces on VCAM-1 and MAdCAM-1. Integrin binding footprints identify accessory binding sites that play a role in integrin specificity. *The Journal of biological chemistry*, 272(31):19429–19440.

Nie, H.-Y., Romanovskaia, E., Romanovski, V., Hedberg, J., & Hedberg, Y. S. (2021). Detection of gold cysteine thiolate complexes on gold nanoparticles with time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Biointerphases*, 16(2):021005.

Nie, T., Baldwin, A., Yamaguchi, N., & Kiick, K. L. (2007). Production of heparin-functionalized hydrogels for the development of responsive and controlled growth factor delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 122(3):287–296.

Nie, Y., Han, Y.-C., & Zou, Y.-R. (2008). CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine*, 205(4):777–783.

Nielsen, J. S. & McNagny, K. M. (2008). Novel functions of the CD34 family. *Journal of cell science*, 121(Pt 22):3683–3692.

Nielson, L., Smyth, G., & Greenfield, P. (1991). Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. *Biotechnology Progress*, 7(6):560–563.

Nilsson, S. K., Debatis, M. E., Dooner, M. S., et al. (1998). Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 46(3):371–377.

Ninomiya, S., Ichiki, K., Yamada, H., et al. (2009). Precise and fast secondary ion mass spectrometry depth profiling of polymer materials with large Ar cluster ion beams. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 23(11):1601–1606.

Nishida, N., Xie, C., Shimaoka, M., et al. (2006). Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity*, 25(4):583–594.

Nishiya, N., Kiosses, W. B., Han, J., & Ginsberg, M. H. (2005). An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nature cell biology*, 7(4):343–352.

Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., et al. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6039):218–221.

Oelschlaeger, C., Bossler, F., & Willenbacher, N. (2016). Synthesis, Structural and Micromechanical Properties of 3D Hyaluronic Acid-Based Cryogel Scaffolds. *Biomacromolecules*, 17(2):580–589.

Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., et al. (1991). Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *The Journal of experimental medicine*, 174(1):63–71.

Ohishi, K., Varnum-Finney, B., & Bernstein, I. D. (2002). Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. *The Journal of clinical investigation*, 110(8):1165–1174.

Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., et al. (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry*, 276(13):10229–10233.

Olsson, A., Venkatasubramanian, M., Chaudhri, V. K., et al. (2016). Single-cell analysis of mixed-

lineage states leading to a binary cell fate choice. *Nature*, 537(7622):698–702.

Ono, K., Hattori, H., Takeshita, S., Kurita, A., & Ishihara, M. (1999). Structural features in heparin that interact with VEGF165 and modulate its biological activity. *Glycobiology*, 9(7):705–711.

Oostendorp, R. A. & Dörmer, P. (1997). VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells. *Leukemia & lymphoma*, 24(5-6):423–435.

Oria, R., Wiegand, T., Escribano, J., et al. (2017). Force loading explains spatial sensing of ligands by cells. *Nature*, 552(7684):219–224.

Orkin, S. H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature reviews. Genetics*, 1(1):57–64.

Orsini, M. J., Parent, J. L., Mundell, S. J., Marchese, A., & Benovic, J. L. (1999). Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *The Journal of biological chemistry*, 274(43):31076–31086.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., & Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5272):242–245.

Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., et al. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 59(6):1203–1211.

Osborn, L., Vassallo, C., & Benjamin, C. D. (1992). Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *The Journal of experimental medicine*, 176(1):99–107.

Ottersbach, K. (2019). Endothelial-to-haematopoietic transition: an update on the process of making blood. *Biochemical Society transactions*, 47(2):591–601.

Ouellette, R. J. & Rawn, J. D. (2018). Structure and Bonding in Organic Compounds. In *Organic Chemistry*, Seiten 1–30. Elsevier.

Pankov, R. & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of cell science*, 115(Pt 20):3861–3863.

Papa, L., Djedaini, M., & Hoffman, R. (2020). Ex vivo HSC expansion challenges the paradigm of unidirectional human hematopoiesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1466(1):39–50.

Papayannopoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., Priestley, G. V., & Wolf, N. S. (1995). The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(21):9647–9651.

Papayannopoulou, T., Priestley, G. V., Nakamoto, B., Zafiropoulos, V., & Scott, L. M. (2001). Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. *Blood*, 98(8):2403–2411.

Papy-Garcia, D. & Albanese, P. (2017). Heparan sulfate proteoglycans as key regulators of the mesenchymal niche of hematopoietic stem cells. *Glycoconjugate journal*, 34(3):377–391.

Parmo-Cabañas, M., Bartolomé, R. A., Wright, N., et al. (2004). Integrin alpha4beta1 involvement in stromal cell-derived factor-1alpha-promoted myeloma cell transendothelial migration and adhesion: role of cAMP and the actin cytoskeleton in adhesion. *Experimental cell research*, 294(2):571–580.

Paszek, M. J., Boettiger, D., Weaver, V. M., & Hammer, D. A. (2009). Integrin clustering is driven

by mechanical resistance from the glycocalyx and the substrate. *PLoS computational biology*, 5(12):e1000604.

Paszek, M. J., DuFort, C. C., Rossier, O., et al. (2014). The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature*, 511(7509):319–325.

Patsoukis, N., Bardhan, K., Weaver, J. D., et al. (2017). The adaptor molecule RIAM integrates signaling events critical for integrin-mediated control of immune function and cancer progression. *Science signaling*, 10(493).

Paul, F., Arkin, Y., Giladi, A., et al. (2015a). Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell*, 163(7):1663–1677.

Paul, N. R., Jacquemet, G., & Caswell, P. T. (2015b). Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. *Current biology : CB*, 25(22):R1092–105.

Pawelzyk, P., Mücke, N., Herrmann, H., & Willenbacher, N. (2014). Attractive interactions among intermediate filaments determine network mechanics in vitro. *PloS one*, 9(4):e93194.

Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., et al. (1999a). The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *The Journal of clinical investigation*, 104(9):1199–1211.

Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., et al. (2000). The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34+ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, 95(11):3289–3296.

Peled, A., Petit, I., Kollet, O., et al. (1999b). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5403):845–848.

Peng, H., Wu, Y., Duan, Z., Ciborowski, P., & Zheng, J. C. (2012). Proteolytic processing of SDF-1α by matrix metalloproteinase-2 impairs CXCR4 signaling and reduces neural progenitor cell migration. *Protein & cell*, 3(11):875–882.

Pereira, P. D., Serra-Caetano, A., Cabrita, M., et al. (2017). Quantification of cell cycle kinetics by EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)-coupled-fluorescence-intensity analysis. *Oncotarget*, 8(25):40514–40532.

Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., et al. (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature immunology*, 3(7):687–694.

Petty, J. M., Lenox, C. C., Weiss, D. J., Poynter, M. E., & Suratt, B. T. (2009). Crosstalk between CXCR4/stromal derived factor-1 and VLA-4/VCAM-1 pathways regulates neutrophil retention in the bone marrow. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(1):604–612.

Pfaff, M., Tangemann, K., Müller, B., et al. (1994). Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *The Journal of biological chemistry*, 269(32):20233–20238.

Pietras, E. M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., et al. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell stem cell*, 17(1):35–46.

Platzman, I., Muth, C. A., Lee-Thedieck, C., et al. (2013). Surface Properties of Nanostructured Bio-Active Interfaces: Impacts of Surface Stiffness and Topography on Cell-Surface Interactions. *RSC advances*, 3(32):13293–13303.

Pomin, V. H. (2014). NMR chemical shifts in structural biology of glycosaminoglycans. *Analytical*

chemistry, 86(1):65–94.

Pompe, T., Zschoche, S., Herold, N., et al. (2003). Maleic anhydride copolymers–a versatile platform for molecular biosurface engineering. *Biomacromolecules*, 4(4):1072–1079.

Poulos, M. G., Guo, P., Kofler, N. M., et al. (2013). Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis. *Cell reports*, 4(5):1022–1034.

Prokoph, S., Chavakis, E., Levental, K. R., et al. (2012). Sustained delivery of SDF-1α from heparin-based hydrogels to attract circulating pro-angiogenic cells. *Biomaterials*, 33(19):4792–4800.

PromoCell GmbH (2021). Expansion of primitive Hematopoietic Progenitor Cells: Application Note. *PromoCell GmbH*.

Proost, P., Struyf, S., Schols, D., et al. (1998). Processing by CD26/dipeptidyl-peptidase IV reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of stromal-cell-derived factor-1α. *FEBS letters*, 432(1-2):73–76.

Proudfoot, A. E. I., Handel, T. M., Johnson, Z., et al. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4):1885–1890.

Proudfoot, A. E. I. & Uguccioni, M. (2016). Modulation of Chemokine Responses: Synergy and Cooperativity. *Frontiers in immunology*, 7:183.

Punzel, M., Liu, D., Zhang, T., et al. (2003). The symmetry of initial divisions of human hematopoietic progenitors is altered only by the cellular microenvironment. *Experimental hematology*, 31(4):339–347.

Purushothaman, A., Uyama, T., Kobayashi, F., et al. (2010). Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood*, 115(12):2449–2457.

Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C. D., et al. (2007). Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell*, 1(6):671–684.

Raic, A., Naolou, T., Mohra, A., Chatterjee, C., & Lee-Thedieck, C. (2019). 3D models of the bone marrow in health and disease: yesterday, today and tomorrow. *MRS communications*, 9(1):37–52.

Raic, A., Rödling, L., Kalbacher, H., & Lee-Thedieck, C. (2014). Biomimetic macroporous PEG hydrogels as 3D scaffolds for the multiplication of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Biomaterials*, 35(3):929–940.

Rakshit, S. & Sivasankar, S. (2014). Biomechanics of cell adhesion: how force regulates the lifetime of adhesive bonds at the single molecule level. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 16(6):2211–2223.

Ray, P., Lewin, S. A., Mihalko, L. A., et al. (2012). Secreted CXCL12 (SDF-1) forms dimers under physiological conditions. *The Biochemical journal*, 442(2):433–442.

Redondo-Muñoz, J., García-Pardo, A., & Teixidó, J. (2019). Molecular Players in Hematologic Tumor Cell Trafficking. *Frontiers in immunology*, 10:156.

Reichert, D., Friedrichs, J., Ritter, S., et al. (2015). Phenotypic, Morphological and Adhesive Differences of Human Hematopoietic Progenitor Cells Cultured on Murine versus Human Mesenchymal Stromal Cells. *Scientific reports*, 5:15680.

Reya, T. (2003). Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. *Recent progress in hormone research*, 58:283–295.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859):105–111.

Ribeiro-Filho, A. C., Levy, D., Ruiz, J. L. M., Mantovani, M. d. C., & Bydlowski, S. P. (2019). Traditional and Advanced Cell Cultures in Hematopoietic Stem Cell Studies. *Cells*, 8(12).

Rieger, M. A. & Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12).

Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., et al. (1988). Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature*, 332(6162):376–378.

Robin, C., Bollerot, K., Mendes, S., et al. (2009). Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell stem cell*, 5(4):385–395.

Robin, M. P., Wilson, P., Mabire, A. B., et al. (2013). Conjugation-induced fluorescent labeling of proteins and polymers using dithiomaleimides. *Journal of the American Chemical Society*, 135(8):2875–2878.

Rodriguez-Fraticelli, A. E., Wolock, S. L., Weinreb, C. S., et al. (2018). Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature*, 553(7687):212–216.

Roether, J., Bertels, S., Oelschlaeger, C., Bastmeyer, M., & Willenbacher, N. (2018). Microstructure, local viscoelasticity and cell culture suitability of 3D hybrid HA/collagen scaffolds. *PloS one*, 13(12):e0207397.

Romeis, B., Aescht, E., & Mulisch, M. (2010). *Romeis Mikroskopische Technik*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 18. auflage. Auflage.

Rose, D. M., Alon, R., & Ginsberg, M. H. (2007). Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunological reviews*, 218:126–134.

Rossier, O., Octeau, V., Sibarita, J.-B., et al. (2012). Integrins β1 and β3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nature cell biology*, 14(10):1057–1067.

Rossmanith, T., Schröder, B., Bug, G., et al. (2001). Interleukin 3 improves the ex vivo expansion of primitive human cord blood progenitor cells and maintains the engraftment potential of scid repopulating cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 19(4):313–320.

Rossnagl, S., Altrock, E., Sens, C., et al. (2016). EDA-Fibronectin Originating from Osteoblasts Inhibits the Immune Response against Cancer. *PLoS biology*, 14(9):e1002562.

Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., & Millard, P. J. (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Applied and environmental microbiology*, 63(6):2421–2431.

Ruppert, R., Moser, M., Sperandio, M., et al. (2015). Kindlin-3-mediated integrin adhesion is dispensable for quiescent but essential for activated hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*, 212(9):1415–1432.

Sack, U. (2007). *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. S. Karger, Basel.

Sackstein, R. (2011). The biology of CD44 and HCELL in hematopoiesis: the 'step 2-bypass pathway' and other emerging perspectives. *Current opinion in hematology*, 18(4):239–248.

Sadir, R., Baleux, F., Grosdidier, A., Imberty, A., & Lortat-Jacob, H. (2001). Characterization

of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *The Journal of biological chemistry*, 276(11):8288–8296.

Sadri, F., Rezaei, Z., & Fereidouni, M. (2022). The significance of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway in the normal development. *Molecular biology reports*.

Saeland, S., Duvert, V., Caux, C., et al. (1992). Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells. *Experimental hematology*, 20(1):24–33.

Saez, B., Ferraro, F., Yusuf, R. Z., et al. (2014). Inhibiting stromal cell heparan sulfate synthesis improves stem cell mobilization and enables engraftment without cytotoxic conditioning. *Blood*, 124(19):2937–2947.

Sagar, B. M. M., Rentala, S., Gopal, P. N. V., Sharma, S., & Mukhopadhyay, A. (2006). Fibronectin and laminin enhance engraftibility of cultured hematopoietic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 350(4):1000–1005.

Salanga, C. L. & Handel, T. M. (2011). Chemokine oligomerization and interactions with receptors and glycosaminoglycans: the role of structural dynamics in function. *Experimental cell research*, 317(5):590–601.

Salic, A. & Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7):2415–2420.

Salmerón-Sánchez, M. & Dalby, M. J. (2016). Synergistic growth factor microenvironments. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 52(91):13327–13336.

Sánchez-Madrid, F. & del Pozo, M. A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *The EMBO journal*, 18(3):501–511.

Sanz-Rodríguez, F., Hidalgo, A., & Teixidó, J. (2001). Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood*, 97(2):346–351.

Saw, S., Weiss, A., Khokha, R., & Waterhouse, P. D. (2019). Metalloproteases: On the Watch in the Hematopoietic Niche. *Trends in immunology*, 40(11):1053–1070.

Scala, S. (2015). Molecular Pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 Axis–Untapped Potential in the Tumor Microenvironment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(19):4278–4285.

Schaks, M., Giannone, G., & Rottner, K. (2019). Actin dynamics in cell migration. *Essays in biochemistry*, 63(5):483–495.

Schiedlmeier, B., Santos, A. C., Ribeiro, A., et al. (2007). HOXB4's road map to stem cell expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43):16952–16957.

Schneider, A., Francius, G., Obeid, R., et al. (2006). Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: influence of film stiffness on cell adhesion. *Langmuir*, 22(3):1193–1200.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*, 4(1-2):7–25.

Scholze, H. (1988). *Glas: Natur, Struktur und Eigenschaften*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg and s.l., dritte, neubearbeitete auflage. Auflage.

Schreiber, T. D., Steinl, C., Essl, M., et al. (2009). The integrin alpha9beta1 on hematopoietic stem and progenitor cells: involvement in cell adhesion, proliferation and differentiation. *Haematologica*,

94(11):1493–1501.

Schrödel, A. (2010). Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer. *Biologie in unserer Zeit*, 40(5):298.

Scott, L. M., Priestley, G. V., & Papayannopoulou, T. (2003). Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. *Molecular and cellular biology*, 23(24):9349–9360.

Shamri, R., Grabovsky, V., Feigelson, S. W., et al. (2002). Chemokine stimulation of lymphocyte alpha 4 integrin avidity but not of leukocyte function-associated antigen-1 avidity to endothelial ligands under shear flow requires cholesterol membrane rafts. *The Journal of biological chemistry*, 277(42):40027–40035.

Shang, X., Cancelas, J. A., Li, L., et al. (2011). R-Ras and Rac GTPase cross-talk regulates hematopoietic progenitor cell migration, homing, and mobilization. *The Journal of biological chemistry*, 286(27):24068–24078.

Shariatmadar, S., Sharma, S., Cabana, R., et al. (2008). Electronic volume of CD34 positive cells from peripheral blood apheresis samples. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 74(3):182–188.

Sharma, M., Afrin, F., Satija, N., Tripathi, R. P., & Gangenahalli, G. U. (2011). Stromal-derived factor-1/CXCR4 signaling: indispensable role in homing and engraftment of hematopoietic stem cells in bone marrow. *Stem cells and development*, 20(6):933–946.

Shimonaka, M., Katagiri, K., Nakayama, T., et al. (2003). Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *The Journal of cell biology*, 161(2):417–427.

Shin, J.-W., Buxboim, A., Spinler, K. R., et al. (2014a). Contractile forces sustain and polarize hematopoiesis from stem and progenitor cells. *Cell stem cell*, 14(1):81–93.

Shin, J. Y., Hu, W., Naramura, M., & Park, C. Y. (2014b). High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *The Journal of experimental medicine*, 211(2):217–231.

Shinde, A. V., Bystroff, C., Wang, C., et al. (2008). Identification of the peptide sequences within the EIIIA (EDA) segment of fibronectin that mediate integrin alpha9beta1-dependent cellular activities. *The Journal of biological chemistry*, 283(5):2858–2870.

Shyh-Chang, N. & Ng, H.-H. (2017). The metabolic programming of stem cells. *Genes & development*, 31(4):336–346.

Sidhu, I., Barwe, S. P., & Gopalakrishnapillai, A. (2021). The extracellular matrix: A key player in the pathogenesis of hematologic malignancies. *Blood reviews*, 48:100787.

Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(6):1380–1389.

Sillar, J. R., Germon, Z. P., DeIuliis, G. N., & Dun, M. D. (2019). The Role of Reactive Oxygen Species in Acute Myeloid Leukaemia. *International journal of molecular sciences*, 20(23).

Simmons, P. J., Masinovsky, B., Longenecker, B. M., et al. (1992). Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 80(2):388–395.

Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., et al. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem

cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell stem cell*, 7(3):380–390.

Singh, P., Fukuda, S., Liu, L., Chitteti, B. R., & Pelus, L. M. (2018). Survivin Is Required for Mouse and Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell Function. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 36(1):123–129.

Singh, P., Mohammad, K. S., & Pelus, L. M. (2020). CXCR4 expression in the bone marrow microenvironment is required for hematopoietic stem and progenitor cell maintenance and early hematopoietic regeneration after myeloablation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 38(7):849–859.

Sosa-Costa, A., Isern de Val, S., Sevilla-Movilla, S., et al. (2016). Lateral Mobility and Nanoscale Spatial Arrangement of Chemokine-activated α4β1 Integrins on T Cells. *The Journal of biological chemistry*, 291(40):21053–21062.

Spatz, J. P., Mössmer, S., Hartmann, C., et al. (2000). Ordered Deposition of Inorganic Clusters from Micellar Block Copolymer Films. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 16(2):407–415.

Spatz, J. P., Mößmer, S., & Möller, M. (1996a). Mineralization of Gold Nanoparticles in a Block Copolymer Microemulsion. *Chemistry - A European Journal*, 2(12):1552–1555.

Spatz, J. P., Roescher, A., Sheiko, S., Krausch, G., & Möller, M. (1995). Noble metal loaded block lonomers: micelle organization, adsorption of free chains and formation of thin films. *Advanced Materials*, 7(8):731–735.

Spatz, J. P., Sheiko, S., & Möller, M. (1996b). Ion-Stabilized Block Copolymer Micelles: Film Formation and Intermicellar Interaction. *Macromolecules*, 29(9):3220–3226.

Spencer, J. A., Ferraro, F., Roussakis, E., et al. (2014). Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*, 508(7495):269–273.

Spiess, M., Hernandez-Varas, P., Oddone, A., et al. (2018). Active and inactive β1 integrins segregate into distinct nanoclusters in focal adhesions. *The Journal of cell biology*, 217(6):1929–1940.

Springer, T. A. & Wang, J.-H. (2004). The Three-Dimensional Structure of Integrins and their Ligands, and Conformational Regulation of Cell Adhesion. *Advances in protein chemistry*, 68:29–63.

STEMCELL Technologies (2010). Atlas of hematopoietic colonies from cord blood. Version 2.0.0.

Stewart, M. & Hogg, N. (1996). Regulation of leukocyte integrin function: Affinity vs. avidity. *Journal of cellular biochemistry*, 61(4):554–561.

Storb, R. (2012). Edward Donnall Thomas (1920-2012). *Nature*, 491(7424):334.

Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, 111:A3.B.1–A3.B.3.

Su, W., Wynne, J., Pinheiro, E. M., et al. (2015). Rap1 and its effector RIAM are required for lymphocyte trafficking. *Blood*, 126(25):2695–2703.

Subramani, R., Izquierdo-Alvarez, A., Bhattacharya, P., et al. (2020). The Influence of Swelling on Elastic Properties of Polyacrylamide Hydrogels. *Frontiers in Materials*, 7.

Suda, T., Takubo, K., & Semenza, G. L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell stem cell*, 9(4):298–310.

Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6):977–988.

Sumide, K., Matsuoka, Y., Kawamura, H., et al. (2018). A revised road map for the commitment of human cord blood CD34-negative hematopoietic stem cells. *Nature communications*, 9(1):2202.

Sun, J., Ramos, A., Chapman, B., et al. (2014). Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature*, 514(7522):322–327.

Sun, Z., Costell, M., & Fässler, R. (2019). Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nature cell biology*, 21(1):25–31.

Sunchu, B. & Cabernard, C. (2020). Principles and mechanisms of asymmetric cell division. *Development (Cambridge, England)*, 147(13).

Surbek, D. V., Steinmann, C., Bürk, M., et al. (2000). Developmental changes in adhesion molecule expressions in umbilical cord blood CD34 hematopoietic progenitor and stem cells. *American journal of obstetrics and gynecology*, 183(5):1152–1157.

Szade, K., Gulati, G. S., Chan, C. K. F., et al. (2018). Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxidants & redox signaling*, 29(2):191–204.

Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., et al. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5642):103–106.

Tae, G., Scatena, M., Stayton, P. S., & Hoffman, A. S. (2006). PEG-cross-linked heparin is an affinity hydrogel for sustained release of vascular endothelial growth factor. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 17(1-2):187–197.

Taite, L. J., Rowland, M. L., Ruffino, K. A., et al. (2006). Bioactive hydrogel substrates: probing leukocyte receptor-ligand interactions in parallel plate flow chamber studies. *Annals of biomedical engineering*, 34(11):1705–1711.

Tajer, P., Pike-Overzet, K., Arias, S., Havenga, M., & Staal, F. J. T. (2019). Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem Cells for Therapeutic Purposes: Lessons from Development and the Niche. *Cells*, 8(2).

Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. *Genome biology*, 8(5):215.

Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T., & Springer, T. A. (2002). Global Conformational Rearrangements in Integrin Extracellular Domains in Outside-In and Inside-Out Signaling. *Cell*, 110(5):599–611.

Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C. I., et al. (2013). Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell stem cell*, 12(1):49–61.

Tamma, R. & Ribatti, D. (2017). Bone Niches, Hematopoietic Stem Cells, and Vessel Formation. *International journal of molecular sciences*, 18(1).

Tascon GmbH (2021). Technical Note ToF-SIMS.

Teixidó, J., Hemler, M. E., Greenberger, J. S., & Anklesaria, P. (1992). Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *The Journal of clinical investigation*, 90(2):358–367.

Theodosiou, M., Widmaier, M., Böttcher, R. T., et al. (2016). Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *eLife*, 5:e10130.

Thomas, E. D., Buckner, C. D., Banaji, M., et al. (1977). One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 49(4):511–533.

Ticchioni, M., Charvet, C., Noraz, N., et al. (2002). Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood*, 99(9):3111–3118.

Tikhonova, A. N., Dolgalev, I., Hu, H., et al. (2019). The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature*, 569(7755):222–228.

Toth, P. T., Ren, D., & Miller, R. J. (2004). Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 310(1):8–17.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B. J., et al. (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*, 128(2):325–339.

Tsurkan, M. V., Chwalek, K., Prokoph, S., et al. (2013). Defined polymer-peptide conjugates to form cell-instructive starPEG-heparin matrices in situ. *Advanced Materials*, 25(18):2606–2610.

Tzeng, Y.-S., Li, H., Kang, Y.-L., et al. (2011). 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.

Udroiu, I. & Sgura, A. (2021). Growing and aging of hematopoietic stem cells. *World journal of stem cells*, 13(6):594–604.

Ugarte, F. & Forsberg, E. C. (2013). Haematopoietic stem cell niches: new insights inspire new questions. *The EMBO journal*, 32(19):2535–2547.

Umemoto, T., Yamato, M., Ishihara, J., et al. (2012). Integrin-αvβ3 regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*, 119(1):83–94.

Upadhaya, S., Krichevsky, O., Akhmetzyanova, I., et al. (2020). Intravital Imaging Reveals Motility of Adult Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Niche. *Cell stem cell*, 27(2):336–345.e4.

van Damme, M. P., Tiglias, J., Nemat, N., & Preston, B. N. (1994). Determination of the charge content at the surface of cells using a colloid titration technique. *Analytical biochemistry*, 223(1):62–70.

van Janse Rensburg, A., Davies, N. H., Oosthuysen, A., et al. (2017). Improved vascularization of porous scaffolds through growth factor delivery from heparinized polyethylene glycol hydrogels. *Acta biomaterialia*, 49:89–100.

Varnum-Finney, B., Purton, L. E., Yu, M., et al. (1998). The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood*, 91(11):4084–4091.

Velten, L., Haas, S. F., Raffel, S., et al. (2017). Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nature cell biology*, 19(4):271–281.

Venkei, Z. G. & Yamashita, Y. M. (2018). Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *The Journal of cell biology*, 217(11):3785–3795.

Verkaar, F., van Offenbeek, J., van der Lee, M. M. C., et al. (2014). Chemokine cooperativity is caused by competitive glycosaminoglycan binding. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(8):3908–3914.

Vermeulen, M., Le Pesteur, F., Gagnerault, M.-C., et al. (1998). Role of Adhesion Molecules in the Homing and Mobilization of Murine Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood*, 92(3):894–900.

Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature reviews. Immunology*, 15(11):692–704.

Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K., & Horwitz, A. R. (2009). Integrins in cell migration–the actin

connection. *Journal of cell science*, 122(Pt 2):199–206.

Vining, K. H. & Mooney, D. J. (2017). Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(12):728–742.

von Au, A., Vasel, M., Kraft, S., et al. (2013). Circulating fibronectin controls tumor growth. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 15(8):925–938.

Vonderheide, R. H., Tedder, T. F., Springer, T. A., & Staunton, D. E. (1994). Residues within a conserved amino acid motif of domains 1 and 4 of VCAM-1 are required for binding to VLA-4. *The Journal of cell biology*, 125(1):215–222.

Waddington, C. H. (1957). *The Strategy of the Genes.*

Wang, C., Curtis, J. E., Minden, M. D., & McCulloch, E. A. (1989). Expression of a retinoic acid receptor gene in myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 3(4):264–269.

Wang, J. H., Pepinsky, R. B., Stehle, T., et al. (1995). The crystal structure of an N-terminal two-domain fragment of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1): a cyclic peptide based on the domain 1 C-D loop can inhibit VCAM-1-alpha 4 integrin interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12):5714–5718.

Wang, W., Yu, S., Zimmerman, G., et al. (2015). Notch Receptor-Ligand Engagement Maintains Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Niche Retention. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 33(7):2280–2293.

Watcham, S., Kucinski, I., & Gottgens, B. (2019). New insights into hematopoietic differentiation landscapes from single-cell RNA sequencing. *Blood*, 133(13):1415–1426.

Wayner, E. A. & Kovach, N. L. (1992). Activation-dependent recognition by hematopoietic cells of the LDV sequence in the V region of fibronectin. *The Journal of cell biology*, 116(2):489–497.

Welsch, U., Herausgeber (2009). *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen ; [+ mit dem plus im Web, Zugangscode im Buch, www.studentconsult.de*. Elsevier Urban & Fischer, München and Jena, 2., völlig überarb. aufl., 4. nachdr. Auflage.

Welzel, P. B., Prokoph, S., Zieris, A., et al. (2011). Modulating Biofunctional starPEG Heparin Hydrogels by Varying Size and Ratio of the Constituents. *Polymers*, 3(1):602–620.

Wen, L., Marki, A., Roy, P., et al. (2021). Kindlin-3 recruitment to the plasma membrane precedes high-affinity β2-integrin and neutrophil arrest from rolling. *Blood*, 137(1):29–38.

Wielockx, B., Grinenko, T., Mirtschink, P., & Chavakis, T. (2019). Hypoxia Pathway Proteins in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Cells*, 8(2).

Wierenga, P. K., Weersing, E., Dontje, B., de Haan, G., & van Os, R. (2006). Differential role for very late antigen-5 in mobilization and homing of hematopoietic stem cells. *Bone marrow transplantation*, 38(12):789–797.

Wilkinson, A. C., Ishida, R., Kikuchi, M., et al. (2019). Long-term ex vivo haematopoietic-stem-cell expansion allows nonconditioned transplantation. *Nature*, 571(7763):117–121.

Williams, D. A., Rios, M., Stephens, C., & Patel, V. P. (1991). Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions. *Nature*, 352(6334):438–441.

Williams, D. A., Zheng, Y., & Cancelas, J. A. (2008). Rho GTPases and Regulation of Hematopoietic Stem Cell Localization. In *Small GTPases in Disease, Part B*, Band 439 in *Methods in Enzymology*, Seiten 365–393. Elsevier.

Williges, C., Chen, W., Morhard, C., Spatz, J. P., & Brunner, R. (2013). Increasing the order parameter of quasi-hexagonal micellar nanostructures by ultrasound annealing. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 29(4):989–993.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, 135(6):1118–1129.

Winkler, A.-L., Koenig, M., Welle, A., et al. (2017a). Bioinstructive Coatings for Hematopoietic Stem Cell Expansion Based on Chemical Vapor Deposition Copolymerization. *Biomacromolecules*, 18(10):3089–3098.

Winkler, A.-L., von Wulffen, J., Rödling, L., et al. (2017b). Significance of Nanopatterned and Clustered DLL1 for Hematopoietic Stem Cell Proliferation. *Advanced Functional Materials*, 27(21):1606495.

Wirth, F., Lubosch, A., Hamelmann, S., & Nakchbandi, I. A. (2020). Fibronectin and Its Receptors in Hematopoiesis. *Cells*, 9(12).

Wolock, S. L., Krishnan, I., Tenen, D. E., et al. (2019). Mapping Distinct Bone Marrow Niche Populations and Their Differentiation Paths. *Cell reports*, 28(2):302–311.e5.

Wrana, C. (2014). *Polymerphysik: Eine physikalische Beschreibung von Elastomeren und ihren anwendungsrelevanten Eigenschaften*. Springer Spektrum, Berlin.

Wu, W., Kim, C. H., Liu, R., et al. (2012). The bone marrow-expressed antimicrobial cationic peptide LL-37 enhances the responsiveness of hematopoietic stem progenitor cells to an SDF-1 gradient and accelerates their engraftment after transplantation. *Leukemia*, 26(4):736–745.

Xie, Y., Husband, J. T., Torrent-Sucarrat, M., et al. (2018). Rational design of substituted maleimide dyes with tunable fluorescence and solvafluorochromism. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 54(27):3339–3342.

Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., et al. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5541):339–345.

Xiong, J.-P., Stehle, T., Zhang, R., et al. (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5565):151–155.

Xu, Y., Chen, C., Hellwarth, P. B., & Bao, X. (2019). Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. *Bioactive materials*, 4:366–379.

Xue, Y., Li, X., Li, H., & Zhang, W. (2014). Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control. *Nature communications*, 5:4348.

Yadav, P., Vats, R., Bano, A., & Bhardwaj, R. (2020). Hematopoietic Stem Cells Culture, Expansion and Differentiation: An Insight into Variable and Available Media. *International journal of stem cells*, 13(3):326–334.

Yamamoto, K., Miwa, Y., Abe-Suzuki, S., et al. (2016). Extramedullary hematopoiesis: Elucidating the function of the hematopoietic stem cell niche (Review). *Molecular medicine reports*, 13(1):587–591.

Yamashita, Y. M., Mahowald, A. P., Perlin, J. R., & Fuller, M. T. (2007). Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5811):518–521.

Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., et al. (2005). Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3-short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated

transplant recipients. *Blood*, 105(7):2717–2723.

Yang, Y., Macleod, V., Miao, H.-Q., et al. (2007). Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *The Journal of biological chemistry*, 282(18):13326–13333.

Ye, F., Hu, G., Taylor, D., et al. (2010). Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *The Journal of cell biology*, 188(1):157–173.

Ye, F., Kim, C., & Ginsberg, M. H. (2011). Molecular mechanism of inside-out integrin regulation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 9 Suppl 1:20–25.

Ye, H., Wang, X., Li, Z., et al. (2017). Clonal analysis reveals remarkable functional heterogeneity during hematopoietic stem cell emergence. *Cell research*, 27(8):1065–1068.

Yip, A. K., Iwasaki, K., Ursekar, C., et al. (2013). Cellular response to substrate rigidity is governed by either stress or strain. *Biophysical journal*, 104(1):19–29.

Yokota, T., Oritani, K., Mitsui, H., et al. (1998). Growth-Supporting Activities of Fibronectin on Hematopoietic Stem/Progenitor Cells In Vitro and In Vivo: Structural Requirement for Fibronectin Activities of CS1 and Cell-Binding Domains. *Blood*, 91(9):3263–3272.

Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., et al. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell stem cell*, 1(6):685–697.

You, R., Zheng, M., & McKeown-Longo, P. J. (2010). The first type III repeat in fibronectin activates an inflammatory pathway in dermal fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 285(47):36255–36259.

Yu, L., Cecil, J., Peng, S.-B., et al. (2006). Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, 374:174–179.

Yucel, D. & Kocabas, F. (2018). Developments in Hematopoietic Stem Cell Expansion and Gene Editing Technologies. *Advances in experimental medicine and biology*, 1079:103–125.

Yusuf-Makagiansar, H., Anderson, M. E., Yakovleva, T. V., Murray, J. S., & Siahaan, T. J. (2002). Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Medicinal research reviews*, 22(2):146–167.

Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Livingston, A. G., Flake, A. W., & Ogawa, M. (1998). Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Experimental hematology*, 26(4):353–360.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960):836–841.

Zhang, J., Supakorndej, T., Krambs, J. R., et al. (2019a). Bone marrow dendritic cells regulate hematopoietic stem/progenitor cell trafficking. *The Journal of clinical investigation*, 129(7):2920–2931.

Zhang, K. & Chen, J. (2012). The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell adhesion & migration*, 6(1):20–29.

Zhang, P., Li, X., Pan, C., et al. (2022). Single-cell RNA sequencing to track novel perspectives in HSC heterogeneity. *Stem cell research & therapy*, 13(1):39.

Zhang, X., Craig, S. E., Kirby, H., Humphries, M. J., & Moy, V. T. (2004). Molecular basis for the

dynamic strength of the integrin alpha4beta1/VCAM-1 interaction. *Biophysical journal*, 87(5):3470–3478.

Zhang, Y., Dépond, M., He, L., et al. (2016). CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress. *Scientific reports*, 6:37827.

Zhang, Y., Gao, S., Xia, J., & Liu, F. (2018). Hematopoietic Hierarchy - An Updated Roadmap. *Trends in cell biology*, 28(12):976–986.

Zhang, Y., Shen, B., Guan, X., et al. (2019b). Safety and efficacy of ex vivo expanded CD34+ stem cells in murine and primate models. *Stem cell research & therapy*, 10(1):173.

Zheng, C.-L., Zhou, B., & Lu, M. (2007). Regulatory role of HOXB4 in self-renewal of hematopoietic stem cells - review. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*, 15(3):647–651.

Zhong, L., Yao, L., Tower, R. J., et al. (2020). Single cell transcriptomics identifies a unique adipose lineage cell population that regulates bone marrow environment. *eLife*, 9.

Zhou, B. O., Yu, H., Yue, R., et al. (2017). Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nature cell biology*, 19(8):891–903.

Zhou, F., Li, X., Wang, W., et al. (2016). Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution. *Nature*, 533(7604):487–492.

Ziarek, J. J., Veldkamp, C. T., Zhang, F., et al. (2013). Heparin oligosaccharides inhibit chemokine (CXC motif) ligand 12 (CXCL12) cardioprotection by binding orthogonal to the dimerization interface, promoting oligomerization, and competing with the chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4) N terminus. *The Journal of biological chemistry*, 288(1):737–746.

Zieris, A., Chwalek, K., Prokoph, S., et al. (2011). Dual independent delivery of pro-angiogenic growth factors from starPEG-heparin hydrogels. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 156(1):28–36.

Zieris, A., Prokoph, S., Levental, K. R., et al. (2010). FGF-2 and VEGF functionalization of starPEG-heparin hydrogels to modulate biomolecular and physical cues of angiogenesis. *Biomaterials*, 31(31):7985–7994.

Zonari, E., Desantis, G., Petrillo, C., et al. (2017). Efficient Ex Vivo Engineering and Expansion of Highly Purified Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Populations for Gene Therapy. *Stem cell reports*, 8(4):977–990.

Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., & Littman, D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393(6685):595–599.

Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., et al. (1990). Stem cell factor is encoded at the SI locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, 63(1):213–224.

Zuba-Surma, E. K., Kucia, M., Abdel-Latif, A., Lillard, J. W., & Ratajczak, M. Z. (2007). The ImageStream System: a key step to a new era in imaging. *Folia histochemica et cytobiologica*, 45(4):279–290.

Danksagung

Zunächst danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, welches diese Arbeit innerhalb des Förderprogramms NanoMatFutur (FKZ 13N12968) finanziert hat. Außerdem danke ich dem Hochschulbüro für ChancenVielfalt recht herzlich für die finanzielle Unterstützung über die Promotionsabschlussförderung der Leibniz Universität Hannover, welche die Vollendung dieser Arbeit möglich gemacht hat.

Mein tiefster Dank geht an meine Betreuerin Prof. Dr. Cornelia Lee-Thedieck, die es mir ermöglicht hat, dieses herausfordernde Projekt durchzuführen. Sie hat mir das Vertrauen geschenkt und mich durch schwierige Zeiten hindurch jederzeit bestärkt und unterstützt, damit ich dieses Projekt erfolgreich zum Abschluss bringen konnte. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo für seine Bereitschaft bedanken als Korreferent diese Arbeit zu begutachten, sowie bei Prof. Dr. Helge Küster, der ganz selbstverständlich bereit war den Vorsitz der Promotionskommission zu übernehmen.

Dr. Peter Schertl danke ich für alle organisatorischen Bemühungen, die räumliche Ferne zwischen Karlsruhe und Hannover aufzulösen. Ihm und Dr. Nadine Dilger danke ich für ihr offenes Ohr bei fachlichen Fragen und ihren steten Zuspruch. Bei Dr. Toufik Naolou möchte ich mich insbesondere für die Durchführung der NMR-Messungen bedanken. Ich danke von Herzen Hamidreza Pirmhaboub, für seinen unkomplizierten Blick auf die Forschung, seine ansteckende Energie und Hilfsbereitschaft. Vielen Dank an Chandralekha Chatterjee, Anna Mohra und Susanna Ziegler, ihr wart ganz wichtige Kontaktpersonen nach Hannover und tolle Gesprächspartner. Auch allen weiteren Doktoranden der Zellbiologie-Abteilung, namentlich Timna Bergmann, Miriam Frommer, Sophia Meermeyer, Louise Schaar, Pankaj Choubey und Ananya Shrivastava danke ich ganz herzlich für eure Fragen und Feedback bei den Seminaren und das Gefühl, Teil der Arbeitsgruppe gewesen zu sein.

Da diese Arbeit hauptsächlich am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) am Campus Nord, Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) durchgeführt wurde, möchte ich mich als Doktorandin und Infrastrukturnutzerin beim Institutsleier, Herrn Prof. Dr. Christof Wöll für die gewährte Freiheiten zur Durchführung meiner Arbeit bedanken. Ich danke besonders Prof. Dr. Matthias Franzreb für seine stete Unterstützung und Fürsprache, sowie die Ermöglichung in seiner Abteilung Bioprozesstechnik und Biosysteme weitgehend unabhängig und selbstständig forschen zu dürfen und all seinen Doktoranden für das kollegiale Miteinander. Mein Dank geht auch an Dr. Alexander Welle für all die durchgeführten ToF-SIMS Messungen. Ich bin froh und dankbar, dass ich mit Dr. Johanna Hafner (KIT, MVM-AME) zusammen getroffen bin und mit ihr kooperieren durfte. Mein Dank gilt außerdem Udo Geckle (KIT, IAM-ESS), der mir immer Termine zur REM-Messung eingeräumt hat, mit dem ich viele Stunden am REM im Kampf mit den Proben durchgestanden habe und der wie ich die monatelange

Reparatur-Durststrecke ertragen musste.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Hubbuch (KIT, MAB) bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet. Diese Doktorarbeit konnte überhaupt nur durch die Nutzung des Durchflusszytometers in seiner AG umgesetzt werden - vielen Dank, dass mir das gewährt wurde. Im selben Atemzug möchte ich meine finalen Bürokolleginnen Dr. Sarah Gretzinger und Dr. Barbara Schmieg nennen und für all ihre organisatorische Mühe um die Aufrechterhaltung des Laborbetriebs danken. Ihnen, David Grijalva Garces, Svenja Strauß und Cordula Nies ein herzliches Danke für die wohltuenden Gespräche und die gute Arbeitsatmosphäre in den Laboren.

Überdies bin ich diversen Kollaborationspartnern für ihre Hilfestellung zu Beginn der Doktorarbeit dankbar. Erwähnen möchte ich hierbei Prof. Dr. Joachim Spatz und Dr. Fania Geiger vom Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme in Stuttgart für den ermöglichten Besuch zu Beginn meiner Doktorarbeit und den Wissenstransfer zur BCML-Technik durch die tolle Unterweisung von Cornelia Miksch und Maria Sycha. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Carsten Werner, Dr. Uwe Freudenberg und Nelly Rein für die einmalige Möglichkeit, den AuNP-Array-Übertrag auf sPEG-Heparin-Gele am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden (Institut für Biofunktionelle Polymermaterialien) zu testen.

Außerdem liegt es mir am Herzen, ein großes Danke an meine „alte" Arbeitsgruppenkonstellation um Dr. Domenic Kratzer, Dr. Annamarija Raic, Dr. Julia Hümmer, Katharina Brändle, Sabrina Zippel und Saskia Kraus auszusprechen - Danke für das tolle Miteinander und all die fachlichen wie nichtfachlichen Gespräche in Büro, Labor und Mensa.

Zu guter Vorletzt seien meine beiden Eltern und fünf Geschwister hier erwähnt. Auch wenn ihr euch gefragt habt, was ich da überhaupt mache und ich euch durch die Arbeit, die Entfernung und die Pandemie kaum gesehen habe, vielen Dank, dass ihr nie an mir gezweifelt habt. Danke Romy fürs Korrekturlesen. Und das Beste kommt zu Schluss: Mein Ehemann. Ohne sein Selbstverständnis zur Übernahme familiärer Verpflichtungen hätte ich erstens, diese Aufgabe erst gar nicht begonnen und zweitens, nimmer durchstehen können. Du warst, bist und bleibst meine verlässliche Konstante in unserem Leben.

Lebenslauf

Name: Anita Ludwig-Husemann
Geburtsdatum: 23.02.1985
Geburtsort: Dessau

Bildungsgang und Berufserfahrung

04/2021 – 03/2023	Promotionsstudentin an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Naturwissenschaftliche Fakultät. Betreuung: Prof. Dr. Cornelia Lee-Thedieck
10/2018 – 08/2021	Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin), Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Zellbiologie und Biophysik, Abteilung Zellbiologie.
10/2018 – 10/2020	Promotionsstudentin am Karlsruher Institut für Technologie, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften. Betreuung: Prof. Dr. Cornelia Lee-Thedieck
06/2017 – 10/2018	Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin), Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Funktionelle Grenzflächen, Abteilung Bioprozesstechnik und Biosysteme, AG Stammzell-Material-Wechselwirkungen.
12/2015 – 08/2016	Clinical Trial Associate, DOCS International, AMGEN FSP, München.
10/2008 – 03/2015	Studium der Humanbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald. Hauptfach: Biochemie und Molekularbiologie Nebenfächer: Funktionelle Morphologie und Humangenetik Diplomarbeit am Helmholtz Zentrum München, Institute of Diabetes and Regeneration Research; Betreuung: Prof. Dr. Heiko Lickert, Dr. Anika Böttcher Titel: *Flattop function in recruitment of the secretory lineage from intestinal stem cells* Abschluss: Diplom Humanbiologin (Dipl.-Hum.Biol.), Gesamtnote 1,2
10/2007 – 03/2008	Studium der Geschichte und Theologie des Christentums, Universität Leipzig.
10/2004 – 09/2007	Studium der Medizin, Universität Leipzig.
09/1997 – 07/2004	Gymnasium „Walter Gropius" Dessau Allgemeine Hochschulreife, Note 1,2

Publikationsliste

1. C. Chatterjee, P. Schertl, M. Frommer, **A. Ludwig-Husemann**, A. Mohra, N. Dilger, T. Naolou, S. Meermeyer, T. C. Bergmann, A. Alonso Calleja, C. Lee-Thedieck, *Rebuilding the hematopoietic stem cell niche: Recent developments and future prospects*, 2021, Acta Biomaterialia, 132, 129–148
2. J. Hafner, D. Grijalva, **A. Ludwig-Husemann**, S. Bertels, L. Bensinger, A. Raic, J. Gebauer, C. Oelschlaeger, M. Bastmeyer, K. Bieback, C. Lee-Thedieck, N. Willenbacher, *Monitoring matrix remodeling in the cellular microenvironment using microrheology for complex cellular systems*, 2020, Acta Biomaterialia, 111, 254–266
3. D. Kratzer, **A. Ludwig-Husemann**, K. Junges, U. Geckle, C. Lee-Thedieck, *Nanostructured bifunctional hydrogels as potential instructing platform for hematopoietic stem cell differentiation*, 2019, Frontiers in Materials, 5, 81
4. **A. Ludwig-Husemann**, C. Lee-Thedieck, *Multifunctional nanostructured biohybrid hydrogels for hematopoietic stem cell culture*, 2019, BioInterfaces International Graduate School, Trier, Posterbeitrag
5. **A. Ludwig-Husemann**, U. Freudenberg, C. Werner, C. Lee-Thedieck, *Multifunctional nanostructured biohybrid hydrogels for hematopoietic stem cell culture*, 2018, Materials Science and Engineering Congress, Darmstadt, Posterbeitrag
6. **A. Ludwig-Husemann**, U. Freudenberg, C. Werner, C. Lee-Thedieck, *Multifunctional nanostructured biohybrid hydrogels for adult stem cell culture*, 2018, 2nd Theodore von Kármán - Discussion Conference Materials for Life, Bioinspired and Biomimetic Hydrogels, Bergisch Gladbach, Posterbeitrag
7. **A. Ludwig-Husemann**, U. Freudenberg, C. Werner, C. Lee-Thedieck, *Multifunctional nanostructured materials for hematopoietic stem cell culture*, 2017, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Würzburg, Posterbeitrag