

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

**Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) aktiviert  $\beta_1$ -Integrin via  
CD63 und fördert Migration und Adhäsion hämatopoietischer Stamm- und  
Progenitorzellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Matthias Wilk

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med Rainer Haas

Korreferent: Prof. Dr. med. Roland Meisel

**Meinen Eltern und meinem Bruder Wolfram**

## Zusammenfassung

Die allogene Stammzelltransplantation stellt für einige maligne hämatologische Erkrankung die einzige kurative Therapieoption dar. Der intravenösen Verabreichung des Stammzelltransplantates nach entsprechender Konditionierungstherapie folgt das Ankommen (*Homing*) und das Anwachsen (*Engraftment*) der hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (Hematopoietic Stem- and Progenitor Cells, HSPC) im Knochenmark. *Homing* und *Engraftment* sind neben anderen Faktoren abhängig von der Expression und dem Aktivitätsstatus von Integrinen, allen voran  $\beta_1$ -Integrinen. Integrine vermitteln Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte und nehmen auf diese Weise Einfluss auf Adhäsion und Migration von HSPC. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Regulation des Aktivitätsstatus des auf HSPC besonders hoch exprimierten  $\beta_1$ -Integrins VLA-4 abhängig von dem löslichen Serumprotein Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) ist. TIMP-1 ist ein bifunktionales Protein, das sowohl Matrixmetalloproteinasen hemmt als auch direkte zytokinähnliche Effekte auf verschiedene Zelltypen ausübt. Im hämatopoietischen System ist TIMP-1 bekannt als Stimulator der Erythropoese, welcher komplementär zu Erythropoietin wirkt. Ein Rezeptor für diese Funktion konnte bisher nicht beschrieben werden.

In diesem Projekt konnte mit Hilfe der hochauflösenden *super resolution STED* Mikroskopie gezeigt werden, dass CD63 und das  $\beta_1$ -Integrin als Rezeptorkomplex für TIMP-1 auf humanen CD34<sup>+</sup> HSPC dienen. Durch diesen Rezeptorkomplex werden direkte zytokinähnliche Effekte von TIMP-1 auf CD34<sup>+</sup> Zellen ausgeübt. So fördert TIMP-1 die Adhäsions- und Migrationseigenschaften von CD34<sup>+</sup> HSPC, indem es das  $\beta_1$ -Integrin in seine aktive Konformation versetzt. Auf diese Weise übt TIMP-1 auch einen antiapoptotischen Effekt auf CD34<sup>+</sup> HSPC aus. Durch die Verwendung spezifischer Signalwegsinhibitoren konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass diese Effekte maßgeblich durch den MAPK und den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg vermittelt werden.

Auch in mononukleären Zellen (MNC) des murinen Knochenmarks stellt CD63 ein Bindungs- und Rezeptorprotein für TIMP-1 dar. Letzteres wirkt auch auf murine MNC als Stimulus für Migration und Adhäsion *in vitro*. Im Rahmen eines Mausmodells zur allogenen Stammzelltransplantation *in vivo* wurden murine Knochenmark MNC verwendet, die *in vivo* oder *ex vivo* mit TIMP-1 stimuliert und anschließend in letal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert wurden. Die zuvor mit TIMP-1 behandelten Transplantate zeigten ein besseres *Homing* und *Short-Term-Engraftment* von murinen Knochenmark MNC und von den unreiferen Lineage<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup> (LSK<sup>+</sup>) hämatopoietischen Vorläuferzellen nach sechs Wochen in Milz und Knochenmark der Empfängermäuse.

Mit Blick auf die für TIMP-1 im hämatopoietischen System initial beschriebene Funktion als Stimulator der Erythropoese (Erythroid Potentiating Activity, EPA) konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für TIMP-1 beschrieben werden. Darüber hinaus gelang es, die EPA Funktion von TIMP-1 im Mausmodell zu bestätigen und zu quantifizieren.

## Abkürzungsverzeichnis

ADAM	Protease
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Ang-1	Signalwegprotein
<i>bcl-x<sub>L</sub></i>	antiapoptisches Gen
BFU-E	Burst Forming Unit - Erythrocyte
BM	Bone Marrow, Knochenmark
C57BL/6	Mausstamm
CBSC	Cord Blood Stem Cell, Nabelschnurstammzelle
CD	Cluster of Differentiation
CD29	β <sub>1</sub> -Integrin
CD45R/B220	Oberflächenprotein
CD63	Oberflächenprotein
CFC	Colony Forming Cell Assay
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester, Zellfarbstoff
c-Kit	Oberflächenprotein CD117
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
CXCR4	Oberflächenprotein, Adhäsionsmolekül
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECM	Extracellular Matrix
EPA	Erythroid Potentiating Activity
FBS	Fetal Bovine Serum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FH535	synthetischer Wnt/β-Catenin-Signalwegsinhibitor
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte - Colony Stimulating Factor, Zytokin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM6001	synthetischer Metalloproteinaseinhibitor
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia Effect
Gy	Gray, Energiedosis
HSC	Hematopoietic Stem Cell
HSPC	Hematopoietic Stem and Progenitor Cell
HUIV26	Kollagen IV Fragment
IB	Immunoblot
IP	Immunpräzipitation
K562	Leukämie-Zelllinie
kDa	Kilodalton
l	Liter

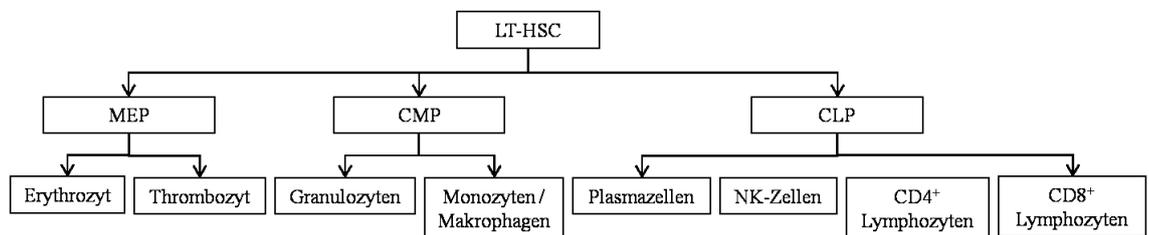
lin	Lineage-Marker
LSK <sup>+</sup>	Lineage <sup>-</sup> , Sca-1 <sup>+</sup> , c-Kit <sup>+</sup>
LT-HSC	Long-Term Hematopoietic Stem Cell
m	Meter
M	Molar
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase, Signalwegprotein
MCF10A	Brustepithelzelllinie
mKitL	c-kit Ligand
MEK	Mitogen-activated or extracellular signal-regulated protein kinase, Signalwegprotein
MMP	Matrix Metalloproteinases
MNC	Mononuclear Cells
MSC	Mesenchymal Stem Cell
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PBSC	Peripheral Blood Stem Cells
PD98059	synthetischer MEK Inhibitor
PI3K	Phosphatidylinositolkinase-3
Ras/Rho	Signalwegproteine
rm	recombinant murine
RNA	Ribonucleid Acid, Ribonukleinsäure
Sca-1	Oberflächenprotein
SCF	Stem Cell Factor
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDF	Stromal Derived Factor
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
shRNA	small hairpin RNA
sKitL	c-Kit Ligand
STED	Stimulated Emission Depletion
Ter119	Oberflächenprotein
Tie-1	Signalwegprotein
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein, Zytokin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, Zytokin
VLA-4	Very Late Antigen-4, $\alpha_4/\beta_1$ Integrin. CD49d/CD29
Wnt	Wachstumsfaktor
Wnt/ $\beta$ -catenin pathway	Signalweg
WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	II
1 Einleitung .....	1
1.1 Stammzellnische.....	2
1.2 Tetraspanine und Integrine .....	3
1.3 Matrixmetalloproteinasen und ihre physiologischen Inhibitoren.....	5
1.4 Stammzelltransplantation .....	8
2 Zielsetzung der Arbeit .....	11
3 The tissue inhibitor of metalloproteinases-1 improves migration and adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells. Wilk CM, Schildberg FA, Lauterbach MA, Cadeddu RP, Fröbel J, Westphal V, Tolba RH, Hell SW, Czibere A, Bruns I, Haas R. Exp Hematol. 2013 May 6.....	12
4 Diskussion .....	13
4.1 Phänomenologische Betrachtungen mit humanen HSPC .....	13
4.2 Funktionelle Betrachtungen mit humanen HSPC .....	15
4.3 Phänomenologische Betrachtungen mit murinen Knochenmark MNC .....	19
4.4 <i>In vitro</i> Versuche mit murinen Knochenmark MNC.....	19
4.5 <i>In vivo</i> Versuche mit murinen Knochenmark MNC .....	20
4.6 Untersuchungen zur Erythropoiese im humanen Modell.....	24
4.7 Untersuchungen zur Erythropoiese im murinen Modell .....	26
5 Schlussfolgerungen .....	27
6 Literaturverzeichnis.....	28

# 1 Einleitung

Hämatopoietische Stammzellen (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC) haben die Aufgabe, die Blutbildung im Knochenmark zeitlebens sicherzustellen. HSC gehören zu den adulten oder auch somatischen Stammzellen, die nicht nur im Rahmen der Embryonalentwicklung, sondern ein Leben lang ihre Funktion wahrnehmen. HSC machen im Knochenmark mit einer Frequenz von einer HSC pro  $10^5$  Knochenmarkzellen nur eine kleine Population aus (1). Sie teilen sich einerseits, um sich selbst zu regenerieren und andererseits, um Tochterzellen zu bilden, die sich über definierte Progenitorzellen in die Zellen myeloischer oder lymphatischer Art differenzieren. Diese Art der Zellteilung wird als asymmetrische Zellteilung bezeichnet, da stets aus einer Stammzelle jeweils eine neue Stammzelle und eine sich differenzierende Progenitorzelle entsteht (2). Die myeloischen Progenitorzellen (*Common Myeloid Progenitor*, CMP) entwickeln sich einerseits zu Erythrozyten und Thrombozyten und andererseits zu Granulozyten und Monozyten. Die lymphatischen B- und T-Lymphozyten sowie die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) entstammen einer gemeinsamen lymphatischen Progenitorzelle (*Common Lymphoid Progenitor*, CLP, Abb. 1).



**Abb.1 Schematische Darstellung der Differenzierungsstufen hämatologischer Stamm- und Progenitorzellen.** Long-Term HSC (LT-HSC), Megacaryocyte/Erythroid Progenitor (MEP), Common Myeloid Progenitor (CMP), Common Lymphoid Progenitor (CLP), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

Für die sehr unreifen blutbildenden Vorläuferzellen, die noch das für diese Zellen typische Oberflächenprotein CD34 tragen, findet die Bezeichnung hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen (*Hematopoietic Stem- und Progenitor Cells*, HSPC) Anwendung. Im Unterschied zu HSC sind nicht alle HSPC vollständig repopulationsfähig. Unter der Repopulationsfähigkeit einer hämatopoietischen Stammzelle versteht man ihre Eigenschaft, die gesamte Blutbildung eines Organismus aus einer einzigen Zelle regenerieren zu können.

## 1.1 Stammzellnische

Um eine ausreichende Blutbildung zu gewährleisten, ist ein Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen nötig. Dieses Gleichgewicht ist das Ergebnis einer Regulation in der Stammzellnische. Die Stammzellnische ist das *Microenvironment*, in dem zelluläre Komponenten, die extrazelluläre Matrix (*Extracellular Matrix*, ECM) und das humorale Milieu die Selbsterneuerung und Differenzierung von HSC ermöglichen (3).

Zu den zellulären Komponenten zählen unter anderem knochenbildende Osteoblasten, endotheliale Zellen, Knochenmarkstromazellen und mesenchymale Stammzellen (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC). MSC sind adhärente, fibroblastenähnliche Zellen, die <0,1% der Knochenmarkzellen ausmachen. MSC und HSC sezernieren Wachstumsfaktoren verschiedener Art, wie zum Beispiel das Wnt- oder auch das in dieser Studie untersuchte TIMP-1 Protein (4-5). Solche parakrinen und autokrinen Mechanismen sind Teil des humoralen *Microenvironments*, das die Voraussetzung für die Erhaltung der Stammzeleigenschaften und für die Reaktion der HSC auf physiologische Stimuli darstellt. Durch Adhäsion an Stromazellen und Bindegewebe des Knochenmarks werden die HSC an diesem Ort des *Microenvironments* gehalten. HSC können jedoch auch unter physiologischen Bedingungen die Stammzellnische verlassen und im peripheren Blut zirkulieren und wieder zurückkehren (6-7). Die ECM des Knochenmarks besteht aus einem fibrillären Proteinnetzwerk, das aus den Kollagentypen I, III, IV und V (8) sowie aus Proteoglykanen, Fibronectin und Laminin zusammengesetzt ist (9-10). Zusätzlich zu der Gerüstfunktion dient die ECM im Knochenmark auch als Reservoir für Wachstumsfaktoren, die in Folge der Degradation der fibrillären ECM Struktur durch Matrixmetalloproteinasen freigesetzt werden können (10). Die Adhäsion von HSC in der Stammzellnische und die Ausschüttung von HSC aus der Stammzellnische ist ein Gleichgewichtsprozess, der durch die Eigenschaften von Adhäsionsmolekülen gesteuert wird. Eine wichtige Rolle als Adhäsionsmoleküle spielen CD44, Selektine und vor allem Integrine, allen voran das  $\beta_1$ -Integrin als VLA-4 ( $\alpha_4/\beta_1$ ), aber auch c-Kit (CD117) und CXCR4 (CD184) (11-14).

## 1.2 Tetraspanine und Integrine

Tetraspanine wie CD63 sind eine Familie von Transmembranproteinen, die über vier Transmembrandomänen verfügen. Zur Zeit sind mindestens 33 stark konservierte Tetraspanine beim Menschen bekannt (15). Sie verfügen über einen intrazellulären N- und C-Terminus sowie über zwei extrazelluläre Domänen. Das hier betrachtete Tetraspanin CD63 wurde 1990 erstmals beschrieben (16) und verfügt über 238 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht je nach Glykosylierungsgrad von 40-55 kDa (17).

Da zunächst über die Funktion von Tetraspaninen nur wenig bekannt war, wurden sie initial als Gerüstbausteine für Membrankomplexe dargestellt (18). Eine Gruppe solcher Komplexe sind Verbindungen zwischen Tetraspaninen und Integrinen (19-21). Der erste derartige Komplex bestehend aus dem Tetraspanin CD9 und  $\alpha_2/\beta_3$ -Integrin wurde 1989 von Slupsky *et al.* beschrieben (22). Es ist wahrscheinlich, dass Tetraspanin-Integrin-Komplexe nicht nur aus jeweils einem der jeweiligen Proteine bestehen, sondern aus größeren Gruppen von Proteinen, die als „*tetraspan web*“ bezeichnet werden (23).

Tetraspanine nehmen durch ihre Assoziation mit Integrinen an der Steuerung von Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakten teil (24). Dies schließt auch die Förderung promigratorischer Eigenschaften verschiedener Zelltypen wie zum Beispiel humaner B-Zellen ein (25). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Tetraspanine an Signalgebungskaskaden beteiligt sein können. Dabei verstärken Tetraspanine adhäsionsfördernde Eigenschaften und potenzieren die Aktivität der Signalkaskaden, die von Integrinen in Gang gesetzt werden (26).

Die Assoziation des Tetraspanins CD63 mit dem Integrin VLA-4 ( $\alpha_4/\beta_1$ ) wurde im hämatopoietischen System erstmals 1996 in T-Zellen beschrieben (27). Auf CD34<sup>+</sup> HSPC wurde dieser Komplex bereits im Zusammenhang mit Eigenschaften der Megakaryopoese dargestellt (28).

Integrine sind ubiquitär vorkommende transmembranäre Strukturproteine, die als obligate Heterodimere über je eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ - Untereinheit verfügen (29). Bisher sind 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert, die zusammen 24 verschiedene Integrindimere bilden (30-31). Das Molekulargewicht der Integrine variiert zwischen

90 und 160 kDa (32). Integrine erfüllen grundsätzlich zwei Funktionen. Einerseits gewährleisten sie Adhäsion, wobei zwischen Zell-Zell-Kontakten und Zell-Matrix-Kontakten unterschieden wird. Andererseits vermitteln Integrine als Geweberezeptoren Signalgebungsprozesse.

Integrine binden mit ihren zytoplasmatischen Enden an Proteine des Zytoskeletts. Mit Hinblick auf die Gewährleistung von Adhäsionseigenschaften vermitteln Integrine auf diese Weise Stabilität zwischen der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Zytoskelett. Bezüglich der Rolle als Oberflächenrezeptoren wird auf diese Weise ein *outside-in* sowie ein *inside-out Signaling* ermöglicht (33). Unter einem *outside-in Signaling* versteht man die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen durch einen externen Stimulus. Dies kann verschiedene Eigenschaften der Zellen wie zum Beispiel das Zellwachstum, die Zellteilung, die zelluläre Differenzierung, die Apoptoserate oder den Zellzyklus beeinflussen (34-36). Beim *outside-in Signaling* handelt es sich um ein Phänomen, bei dem sich die Adhäsionseigenschaften eines Integrins durch Signale aus dem Inneren der Zelle verändern (37-39). Dies wiederum kann die Adhäsions- und Migrationseigenschaften der gesamten Zelle beeinflussen (40).

Auf hämatopoietischen Zellen kommen Integrine vornehmlich in ihrer inaktiven Form vor (41), können jedoch durch verschiedene Stimulatoren in ihre aktive Konformation versetzt werden, wodurch sich die Affinität zu Strukturproteinen im Sinne des *inside-out Signalings* verändern kann (38,42-44). Besonders wichtig für die Überführung von Integrinen aus der passiven in die aktive Konformation sind die zytoplasmatischen Domänen der Integrine (45-46). Durch diese werden intrazelluläre Signalwege wie zum Beispiel die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), das Ras/Rho System sowie der MAP Kinase-Signalweg aktiviert (47).

HSPC adhären vornehmlich mit Hilfe des Integrins VLA-4 ( $\alpha_4/\beta_1$ ) an das in der ECM des Knochenmarkes vorkommende Fibronectin (14). VLA-4 ist somit maßgeblich an der Steuerung von Adhäsion und Migration von HSC beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse, in denen das  $\beta_1$ -Integrin (CD29) *ausgeknoct* war, nach allogener Stammzelltransplantation auf Grund eines Adhäsionsdefektes (*outside-in Signaling*) und möglicherweise eines Migrationsdefektes (*inside-out Signaling*) kein *Homing* mehr zeigten (48). Über das *outside-in Signaling* von VLA-4 ist im hämatopoietischen System bekannt, dass es im differenzierten Zusammenspiel mit

Fibronectin bestimmte Schritte der Erythropoiese steuert (49). Eshghi *et al.* beschreiben die Erythropoiese als zweiseitigen Prozess, der zunächst von Erythropoietin und erst in der zweiten Hälfte der etwa 14-tägigen Reifungsdauer von VLA-4 abhängig sei. Ein blockierender Antikörper gegen  $\beta_1$ -Integrin ist darüber hinaus dazu im Stande, die Bildung von hämatopoietischen Progenitorcolonien *in vitro* sowie die medulläre Blutbildung *in vivo* zu hemmen (50). Ähnlich wirkt sich eine Blockade des  $\alpha_4$ -Integrins aus, auch dort kommt es zu einer verminderten Bildung von hämatopoietischen Colonien in Langzeitkulturen *in vitro* (51). *In vivo* führt eine Blockade der  $\alpha_4$  Untereinheit zu einer Störung des *Homingprozesses* (52). Das  $\alpha_4$ -Integrin und das  $\beta_1$ -Integrin sind im Gegensatz zum  $\alpha_6$ -Integrin unabdingbar für das *Homing* von HSC (53).

### 1.3 Matrixmetalloproteinasen und ihre physiologischen Inhibitoren

Nicht nur die HSC erfahren eine Regulierung, sondern auch die Stammzellnische unterliegt einem ständigen Umbau. Maßgeblich daran beteiligt sind Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (54-55), eine Proteinfamilie, die mehr als 20 Mitglieder umfasst (56). Allen MMP ist gemein, dass sie in ihrem aktiven Zentrum ein  $Zn^{2+}$  Ion komplexieren (55). Für MMP existieren verschiedene Klassifikationssysteme. Zum einen kann man MMP nach ihrer Lokalisation in membrangebundene MMP und sezernierte MMP unterteilen. Es ist aber auch möglich, MMP mit Hinblick auf ihre Interaktionspartner in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromolysine und Matrilysine zu unterscheiden. Die Regulation der MMP-Aktivität geschieht auf unterschiedlichen Ebenen. Zum einen kann die Expression von MMP auf dem Level der Transkription, zum anderen auf der Ebene der Präkursoraktivierung gesteuert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Hemmung der proteolytischen Aktivität von MMP durch natürliche Inhibitoren (54). Mit Hilfe dieser Variante werden lösliche Plasma-MMP durch das in der Leber gebildete  $\alpha_2$ -Makroglobulin in ihrer Funktion gesteuert, während gewebsständige MMP durch die Familie der Tissue Inhibitor of Metalloproteinasen (TIMP) gehemmt werden (56).

MMP sind dazu in der Lage, die meisten Komponenten der ECM zu degradieren (54-55). Dabei fallen Nebenprodukte degradierter Bestandteile des Stromas an, die selbst wiederum Signalwege der umgebenden Zellen aktivieren können. Als Beispiel ist das

als „HUIV26“ bezeichnete Fragment von Kollagen IV zu nennen. Dieses Fragment entsteht durch die Aktivität von MMP in Melanomzellen sowie in Blasen- und Brustkrebszellen und weist im Vergleich zu gesundem Gewebe einen förderlichen Effekt auf die (Tumor-) Angiogenese auf (57).

Im Knochenmark werden MMP nicht nur von Stromazellen, sondern auch von Zellen der Hämatopoese selbst gebildet. MMP-2 und MMP-9 werden von myeloischen Zellen und Megakaryozyten gebildet, während MMP-2 auch in Erythroblasten vorgefunden werden kann (58).

Die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus der ECM und von Zelloberflächen des Knochenmarkes durch MMP-Aktivität beeinflusst die Interaktion von HSC und Stromazellen. Dies kann Wachstum, Differenzierung und Migration von HSC fördern (59). Als Beispiel lässt sich hier die Rolle der durch SDF-1 $\alpha$  aktivierten pro-MMP-9 anführen. Pro-MMP-9 löst dabei von der Oberfläche von Stromazellen den membrangebundenen c-kit-Liganden mKitL ab. mKitL wird somit zu sKitL und fördert in dieser Form die Proliferation und Motilität von HSC (60).

Auch bei der Transplantation hämatopoietischer Stammzellen haben MMP eine hohe Bedeutung. SDF-1 $\alpha$  spielt eine entscheidende Rolle in Migration und *Homing* von hämatopoietischen Stammzellen einerseits durch die bereits oben erwähnte Steuerung von MMP-9. Andererseits können die zu den MMP zählenden Gelatinasen SDF-1 $\alpha$  selbst inaktivieren (61). Zudem korreliert der Plasmaspiegel der MMP-9 mit der Anzahl zirkulierender CD34<sup>+</sup> HSC im Blut (62). Zusammenfassend zeigt sich, dass MMP eine entscheidende Rolle in der Regulation der Hämatopoese spielen (63).

Als natürliche Inhibitoren der MMP fungieren die Mitglieder der Familie der Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Diese umfasst vier strukturell verwandte Mitglieder, die als TIMP-1 bis TIMP-4 bezeichnet werden (64). Die Erstbeschreibung von TIMP-1 gelang 1981 durch Yasui *et al.* als Kollagenaseinhibitor im Knorpel von embryonalen Knochen des Huhns (65). TIMP-1 verfügt über eine Sequenz von 184 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 28,5 kDa (66). Westbrook *et al.* identifizierten 1984 ein Zytokin, das sie als Erythroid Potentiating Activity (EPA) (67-69) bezeichneten, welches von humanen T-Lymphozyten sezerniert wird. Die Bezeichnung EPA ist auf die Eigenschaft von TIMP-1 zurückzuführen, das Wachstum erythroider Vorläuferzellen (68,70) und vor allem das Wachstum großer erythroider Kolonien zu

fördern (67). Die Beschreibung der strukturellen Identität von EPA mit TIMP-1 gelang erst 1985 durch Docherty *et al.* (71). Das Gen für TIMP-1 befindet sich auf Chromosom Xp11.1-p11.4.

Wie die Bezeichnung Tissue Inhibitor of Metalloproteinases bereits nahelegt, sind TIMP endogene Inhibitoren von Matrixmetalloproteinasen (72-73). Grundsätzlich ist es möglich, die MMP-inhibierende Funktion von TIMP-1 von seinen direkten zytokinähnlichen Effekten zu trennen.

Chesler *et al.* konnten zeigen, dass die EPA-Wirkung von TIMP-1 durch das C-terminale Ende des Proteins vermittelt wird. Der N-Terminus hingegen verfügt über Amino- und Carbonylgruppen, welche die  $Zn^{2+}$ -Ionen des aktiven Zentrums von Matrixmetalloproteinasen komplexieren (74-79). Auf diese Weise können TIMP die MMP in einem 1:1 Verhältnis reversibel in ihrer Funktion hemmen (72-73). Grundsätzlich können alle TIMP Proteine alle MMP inhibieren, jedoch mit unterschiedlicher Effizienz. Das hier untersuchte TIMP-1 Protein hemmt vor allem MMP-1 (Kollagenase-1), MMP-3 (Stromelysin-1 / Progelatinase), MMP-7 (Matrilysin) und MMP-9 (Gelatinase B). Der Verlust des Gleichgewichtes zwischen MMP und TIMP kann in verschiedene pathologische Prozesse münden. Darunter fallen auch verstärkte Tumordinvasion, Metastasierung und Angiogenese (80-82). Die Expression von TIMP-1 ist nicht konstitutiv, sondern induzierbar. In Bezug auf das hämatopoietische System ist die Expression von TIMP-1 durch Erythropoietin induzierbar, während im selben Zuge die Expression von pro-MMP-9 und MMP-9 reduziert wird (83).

Der C-Terminus spielt wie oben angedeutet bei der Ausübung der zytokinähnlichen Funktionen eine wichtige Rolle. Darüber hinaus können TIMP durch das C-terminale Ende pro-MMP binden und damit die Aktivierung in MMP regulieren (84). TIMP-1 bindet dabei mit seinem Hämopexin-ähnlichen C-Terminus an pro-MMP9 und pro-MMP-2 (72-73,85-86). In seiner durch den C-Terminus vermittelten Funktion als zytokinähnliche Substanz fördert TIMP-1 das Wachstum von Zellen der CML Zelllinie K562 (71) sowie von Zellen humaner und muriner Erythroleukämiezelllinien (87-88). Zudem übt TIMP-1 direkten Einfluss auf hämatopoietische Vorläuferzellen verschiedener Differenzierung aus (89). In Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) korreliert die Expression von TIMP-1, nicht aber die Expression von MMP mit dem

Malignitätsgrad. Dies lässt einen Rückschluss auf einen von MMP unabhängigen antiapoptotischen Effekt durch TIMP-1 zu (90).

Außerhalb des hämatopoietischen Systems stimuliert TIMP-1 das Zellwachstum von Keratinozyten (91), Fibroblasten (76) und diversen Krebszelllinien (76) wie der Osteosarkomzelllinie MG-63 (92) und der immortalisierten Brustepithelzelllinie MCF10A (93).

Ergänzend zur Förderung des Zellwachstums hemmt TIMP-1 den programmierten Zelltod in Burkitt-Lymphomzellen (94-95) und in verschiedenen Brustkrebszellarten (96-97). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der antiapoptotische Effekt durch die Induktion des antiapoptotischen Gens *bcl-x<sub>L</sub>* vermittelt wird und tatsächlich MMP-unabhängig ist (95). Auch klinisch gewinnt die Bestimmung des Serumspiegels von TIMP-1 an Bedeutung. So gibt es Hinweise darauf, dass ein erhöhter TIMP-1 Serumspiegel mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Multiplem Myelom (98) oder Brustkrebs (99) assoziiert ist. Vor diesem Hintergrund gewinnt das TIMP-1 Protein auch klinisch an Bedeutung.

Neue Bestrebungen zielen darauf hin, Wirkmechanismen dieser MMP-unabhängigen TIMP Funktionen genauer zu untersuchen. Dazu konnten Jung *et al.* zeigen, dass TIMP-1 in der immortalisierten Brustepithelzelllinie MCF10A an das Tetraspanin CD63 bindet und über diese Bindung das  $\beta_1$ -Integrin aktiviert. Diese Aktivierung führt in der untersuchten Zelllinie unter anderem zu einer geringeren Apoptoserate (10,93). Dassé *et al.* gelang zudem der Nachweis, dass TIMP-1 zur Differenzierung hämatopoietischer Progenitorzellen Caspase-3 aktiviert (100). Der Rezeptor für die zytokinähnlichen Funktionen auf hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen ist jedoch bislang nicht beschrieben worden.

#### **1.4 Stammzelltransplantation**

Unter hämatopoietischer Stammzelltransplantation versteht man die Übertragung entweder eigener (autologer) oder von einem Spender stammender (allogener) blutbildender Stamm- und Progenitorzellen. Die allogene Stammzelltransplantation findet bei einer Reihe hämatologischer Erkrankungen, allen voran bei der Akuten

Myeloischen Leukämie (AML) (101) und der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) (102) Anwendung. Weiterhin ist sie eine Therapieoption bei Stoffwechselerkrankungen und angeborenen Immundefekten und Hämoglobinopathien (z.B. Severe Combined Immunodeficiency, SCID). Die autologe Stammzelltransplantation wird vor allem beim Multiplen Myelom, bei rezidivierten B-Zell-Lymphomen und rezidivierten Keimzelltumoren durchgeführt.

Bei allen Verfahren der allogenen Stammzelltransplantation wird zunächst eine Konditionierungstherapie vor der Übertragung der Stammzellen durchgeführt. Unter einer solchen Konditionierung versteht man eine Ganzkörperbestrahlung des Patienten und oder das Verabreichen einer Chemotherapie. Die Konditionierung dient dazu, einen Großteil oder aber alle malignen Zellen vor der Transplantation zu eradizieren. In diesem Zusammenhang unterscheidet man grundsätzlich zwischen myeloablativen und nicht-myeloablativen Konditionierungsverfahren. Bei myeloablativen Verfahren ist das Ziel der Konditionierungstherapie die komplette Zerstörung des bestehenden blutbildenden Systems. Nicht-myeloablativ Verfahren sind neue therapeutische Ansätze, bei denen die Dosis der Bestrahlung und / oder Chemotherapie nicht ausreicht, um das gesamte blutbildende System zu ablädieren. Stattdessen machen sich diese Verfahren den immunologischen *graft-versus-leukemia* (GvL) Effekt zu Nutze, um verbleibende Leukämiezellen zu eliminieren (103-104).

Als Transplantationsverfahren unterscheidet man zwischen der Transplantation von peripheren Blutstammzellen (*Peripheral Blood Stem Cells*, PBSC), Knochenmark und Nabelschnurblutzellen (*Cord Blood Stem Cells*, CBSC). Am häufigsten werden zurzeit PBSC transplantiert. Die Phase der Aplasie bis zum Anwachsen des Transplantates ist bei der PBSC Transplantation kürzer als bei der Knochenmarktransplantation (105). Die Entscheidung für das eine oder andere Verfahren hängt von der Grunderkrankung des Patienten und der Kompatibilität des verfügbaren Spenders ab (106).

Neben der GvHD stellt die Infektionsgefahr in der Aplasiephase nach der Transplantation das größte Risiko dar. Gegenstand der aktuellen Forschung ist es, durch ein beschleunigtes *Homing* und *Engraftment* die vulnerable Phase der Aplasie zu verkürzen.

Unter *Homing* versteht man die Rückkehr der HSPC in die Milz und das Knochenmark. Bei der Stammzelltransplantation verläuft der Prozess des *Homings*

schrittweise. Zunächst adhären die intravenös verabreichten HSPC an endotheliale Zellen der Gefäße der Blut-Knochenmark-Schranke. Diese Adhäsion wird vornehmlich durch VLA-4 auf den HSPC und *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) seitens der endothelialen Zellen vermittelt. Neben der VCAM-1/VLA-4 Achse bewirken auch L-Selectin und das Glykoprotein CD44 eine Adhäsion der HSPC an Gefäßoberflächen. Dem Vorgang der Adhäsion und des *Rollings* entlang der luminalen Gefäßwand folgt die Transmigration der HSPC in das Knochenmark. Als Chemokin dienen hier der *Stromal Derived Factor-1* (SDF-1 $\alpha$ ) und der *Stem Cell Factor* (SCF), die die zielgerichtete aktive Migration der HSPC durch das Endothel ermöglichen. SDF-1 $\alpha$  ist der Ligand des auf HSPC exprimierten Rezeptors CXCR4 (107-108). Das Zusammenspiel von SDF-1 $\alpha$  und CXCR4 ist neben der VCAM-1/VLA-4 Achse essentiell für das Stammzellhoming. In der ECM des Knochenmarks endet das *Homing* in gefäßnahen endostealen Bereichen. In diesem letzten Schritt spielen Matrixmetalloproteinasen wie MMP-2 und MMP-9 eine besondere Rolle und ermöglichen es den HSPC, einen Ort mit optimalen trophischen Begebenheiten zu finden (109-111).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Wie eingangs erwähnt, ist TIMP-1 im hämatopoietischen System unter anderem als Stimulator der Erythropoese bekannt. Vor diesem Hintergrund bestand das Ziel der vorliegenden Studie zunächst darin, den TIMP-1 Rezeptor auf CD34<sup>+</sup> HSC zu identifizieren.

Im nächsten Schritt sollte die Wirkung von TIMP-1 auf das Verhalten humaner und muriner HSC untersucht werden. Dabei kamen neben klonogenen CFC-Versuchen vor allem Apoptose-, Adhäsions- und Migrationsversuche zur Anwendung. Diese wurden im weiteren Verlauf zusammen mit spezifischen Signalwegsinhibitoren durchgeführt. Dies ermöglichte es, jene Signalwege zu identifizieren, die in die Vermittlung der TIMP-1 Effekte involviert sind.

Um die biologische Relevanz der zuvor beobachteten TIMP-1 Wirkung auf humane und murine HSC nun *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Mausmodell gewählt, in dem eine allogene Stammzelltransplantation zwischen kongenen Mausstämmen durchgeführt wurden. Dabei wurden entweder die Spendermäuse *in vivo* oder zuvor isolierte murine Knochenmark MNC *ex vivo* mit rekombinantem murinem TIMP-1 stimuliert. Nach der Verabreichung dieser behandelten Transplantate an die Empfängermause sollten das *Homing* und das *Short-Term-Engraftment* der Spenderzellen in Knochenmark und Milz mit Hilfe von klonogenen Versuchen und unter Verwendung der Durchflusszytometrie untersucht werden.

Eine mögliche TIMP-1 Wirkung auf die Erythropoese wurde anhand einer Dosis-Wirkungs-Beziehung *in vitro* überprüft. Daran schlossen sich die entsprechenden Experimente in einem *in vivo* Mausmodell an.

**3 The tissue inhibitor of metalloproteinases-1 improves migration and adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells. Wilk CM, Schildberg FA, Lauterbach MA, Cadeddu RP, Fröbel J, Westphal V, Tolba RH, Hell SW, Czibere A, Bruns I, Haas R. Exp Hematol. 2013 May 6.**

## 4 Diskussion

Die Funktion und Relevanz des TIMP-1 Proteins in seiner Rolle als Inhibitor von Matrixmetalloproteinasen ist ausführlich untersucht und in der Literatur beschrieben worden (56). Die vorliegende Studie schließt sich neueren Untersuchungen über eine zytokinähnliche Wirkung von TIMP-1 in verschiedenen Gewebezusammenhängen an (89). Allen gemeinsam ist dabei die bereits eingangs erwähnte Abhängigkeit der MMP-inhibierenden Wirkung vom N-Terminus des TIMP-1 Proteins, während die zytokinähnlichen Wirkungen durch das C-terminale Ende des TIMP-1 Proteins vermittelt werden (70).

### 4.1 Phänomenologische Betrachtungen mit humanen HSPC

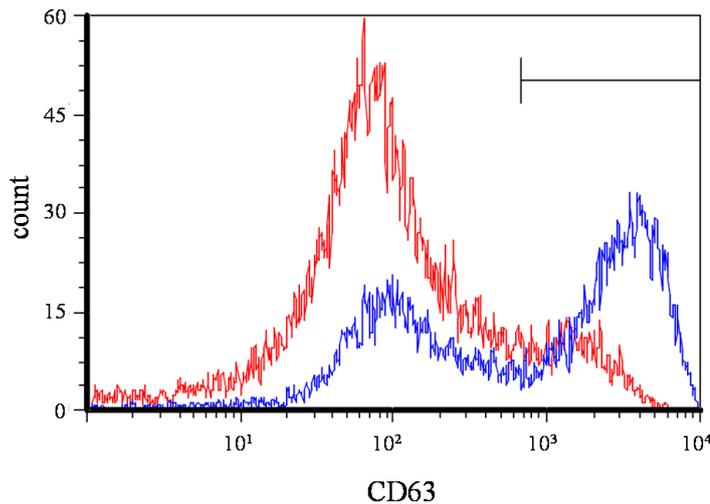
Ausgehend von den Untersuchungen von Jung *et al.* zur zytokinähnlichen Wirkungsweise von TIMP-1 in der immortalisierten Brustepithelzelllinie MCF10A standen am Beginn dieser Studie zunächst Untersuchungen zur Co-lokalisation und Interaktion von TIMP-1 mit dem in MCF10A beschriebenen Rezeptorkomplex aus dem Tetraspanin CD63 und  $\beta_1$ -Integrin (93).

Die Untersuchung der Co-lokalisation wurde unter Zuhilfenahme von fluoreszenzmikroskopischen Methoden durchgeführt. Am Anfang wurde die Fluoreszenzmikroskopie humaner CD34<sup>+</sup> HSPC verwendet und in der Folge die höher auflösende konfokale Lasermikroskopie in Anspruch genommen. Um eine möglichst genaue Aussage über Nachbarschaftsbeziehungen und die zelluläre Verteilung von TIMP-1, CD63 und dem  $\beta_1$ -Integrin treffen zu können, fand die hoch auflösende *super resolution* STED Mikroskopie Anwendung (*Stimulated Emission Depletion*, STED). Diese fluoreszenzmikroskopische Methode basiert auf einer speziellen Variante der Fluoreszenz-Laser-Raster-Mikroskope. Sie bietet die Möglichkeit, durch Stimulation und Depletion der Emissionen von Fluoreszenzfarbstoffen ein Signal zu erhalten, dessen Auflösung nicht von der Beugung des Lichtes begrenzt ist (112-114). Aus diesem Grunde war es möglich, in den für diese Studie erzielten Aufnahmen eine Auflösung von etwa 70 nm zu erreichen, während die Auflösung des konfokalen Lasermikroskops bei etwa 200 nm lag. Dieser Zuwachs an Genauigkeit erlaubte eine Aussage über die Verteilung und topographische Beziehung der beobachteten

Strukturen - nämlich von TIMP-1, CD63 und  $\beta_1$ -Integrin (115). Die Aufnahmen zeigten, dass TIMP-1, CD63 und auch das  $\beta_1$ -Integrin im Rahmen der oben genannten Auflösung auf der Zelloberfläche co-lokalisiert sind. Eine Bindung von TIMP-1 an CD63 konnte jedoch erst mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation gezeigt werden. Die Bindung von CD63 an das  $\beta_1$ -Integrin hingegen wurde bereits von Han *et al.* auf CD34<sup>+</sup> Nabelschnurblutzellen nachgewiesen (28). Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass TIMP-1 an CD34<sup>+</sup> HSPC über das Transmembranprotein CD63 bindet. Eine solche Bindung erlaubt die Aussage, dass CD63 als Rezeptorprotein für TIMP-1 dient.

Im Zuge der weiteren Untersuchungen wurde die funktionelle Relevanz der Bindung von TIMP-1 an CD34<sup>+</sup> HSPC untersucht. Die nachfolgenden Experimente bestätigten die Annahme, dass TIMP-1 den nun beschriebenen Rezeptorkomplex aktiviert, was sich darin widerspiegelt, dass das  $\beta_1$ -Integrin vermehrt in seiner aktiven Konformation vorliegt, wenn die Zellen zuvor mit rekombinantem TIMP-1 stimuliert worden waren. Dies ist im Sinne des *outside-in Signalings* zu verstehen. Um die Abhängigkeit der zytotropen Effekte des TIMP-1 Proteins von dem direkten TIMP-1 Bindungspartner CD63 klären zu können, wurde CD63 transient mit Hilfe eines shRNA Vektors in primären CD34<sup>+</sup> HSPC herunterreguliert. Die Effizienz dieses *Knockdowns* kann Abbildung 2 entnommen werden. Es handelt sich hier nicht um einen *Knockout*, sondern um einen inkompletten *Knockdown*. Während CD63 auf 55,2% jener CD34<sup>+</sup> HSPC exprimiert ist, die mit dem *non-effective-control* Vektor transfiziert worden sind, ist CD63 nur noch auf 13,3% solcher CD34<sup>+</sup> HSPC vorhanden, die mit dem *Knockdown*-Vektor transfiziert wurden.

Die Versuche zu Abbildung 2 wurden selbstständig vom Promovenden nach Einarbeitung durch Herrn Dipl.-Biol. R.-P. Cadeddu durchgeführt.



**Abb. 2 Histogram Plot nach Markierung von CD63.** Auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität logarithmisch dargestellt, während auf der Y-Achse die Anzahl der gemessenen Zellen aufgetragen ist. Die blaue Linie spiegelt die Expression von CD63 auf Zellen wider, die mit einem *non-effective-control*-Vektor transfiziert worden sind. Die rote Linie gibt Aufschluss über die Expression von CD63 nach dem *Knockdown*. Das eingezeichnete Gate (schwarze Linie) diente der oben erwähnten Quantifizierung des *Knockdowns*.

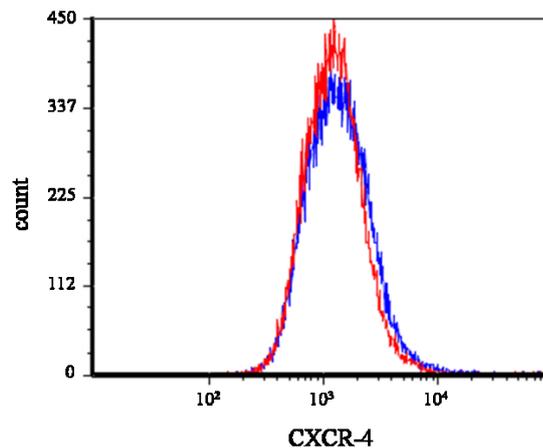
## 4.2 Funktionelle Betrachtungen mit humanen HSPC

Wie bereits von Jung *et al.* auf Brustepithelzelllinien beschrieben worden ist, führt die TIMP-1 Stimulation von Zellen zu einer Aktivierung des  $\beta_1$ -Integrins (93). In den folgenden Versuchen zeigt sich, dass der TIMP-1 Effekt auf den Aktivierungsstatus des  $\beta_1$ -Integrins nach Herunterregulation von CD63 weitgehend aufgehoben wird. Wird folglich die Menge an CD63 als direktes Rezeptorprotein für TIMP-1 reduziert, so wird auch der TIMP-1 Effekt auf den Aktivierungsstatus des  $\beta_1$ -Integrins vermindert. Vor diesem Hintergrund erweist sich das aktivierte  $\beta_1$ -Integrin als Schlüsselmechanismus für weitere TIMP-1 Effekte im Sinne des *inside-out Signalings*.

In diesem Zusammenhang ist in der Literatur beschrieben, dass ein in seine aktivierte Konformation versetztes  $\beta_1$ -Integrin die Zellmigration von hämatopoietischen Zellen fördert (116-120). Aus diesem Grunde wurde der Einfluss von TIMP-1 auf die Migration von  $CD34^+$  HSPC in verschiedenen TIMP-1 Konzentrationen untersucht. Während Dassé *et al.* beispielsweise eine TIMP-1 Konzentration von 100 ng/ml entsprechend 3,6 nM wählten (100), wurden in dieser Studie Konzentrationen von 0,1 nM, 1 nM und 10 nM getestet. Dabei konnte ein maximaler Effekt bei 1 nM beobachtet werden. Bei dieser Konzentration durchwanderte die größte Anzahl an  $CD34^+$  HSPC die im Durchmesser 5  $\mu\text{m}$  großen Poren des im Rahmen des

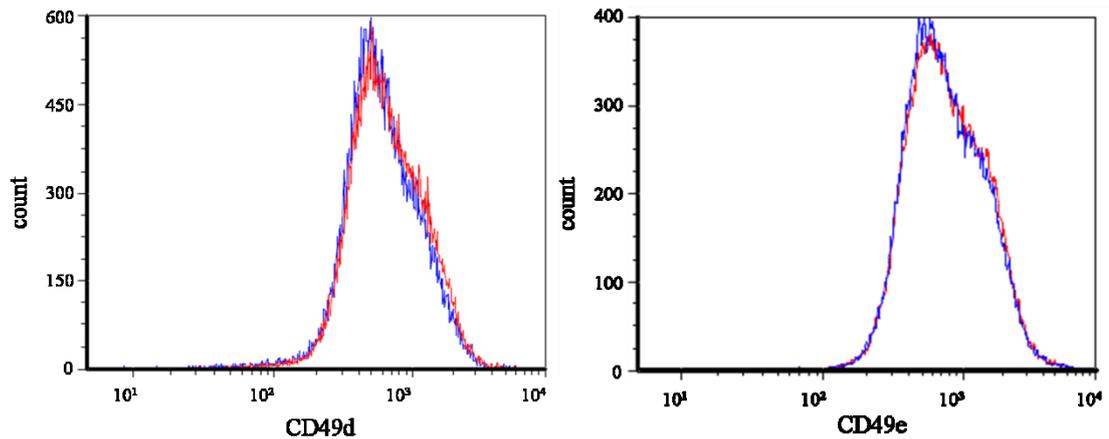
Migrationsversuches verwendeten Zellsiebes in eine mit dem CXCR4 Liganden SDF-1 $\alpha$  versetzte Vertiefung. Das Zellsieb mit seinen Poren stellt ein vereinfachtes Modell der Blut-Knochenmark-Schranke dar - analog kann die Migration als Diapedesevorgang interpretiert werden. Letzterer ist während der experimentellen und klinischen Stammzelltransplantation von besonderer Bedeutung, da auch dort die Stammzellen während des *Homings* ins Knochenmark die Blut-Knochenmarkschranke durch aktive Migration überwinden und im Knochenmark die endostealen Gebiete aufsuchen.

In einer sich daran anschließenden Untersuchung zeigte sich, dass die Expression des SDF-1 $\alpha$  Rezeptors CXCR4 selbst nicht durch die Stimulation mit TIMP-1 beeinflusst wird (Abb. 3).



**Abb. 3 Expression des SDF-1 $\alpha$  Liganden CXCR4.** Auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität logarithmisch dargestellt, während auf der Y-Achse die Anzahl der gemessenen Zellen aufgetragen ist. Die Expression von CXCR4 ohne TIMP-1 Stimulation ist durch eine blaue Linie gekennzeichnet. Die rote Linie zeigt sich eine vergleichbare Verteilung nach Zusatz von TIMP-1.

Ebendies konnte auch für die Expression der  $\alpha$ -Untereinheiten der Integrine VLA-4 (CD49d,  $\alpha_4/\beta_1$ ) und VLA-5 (CD49e,  $\alpha_5/\beta_1$ ) festgestellt werden (Abb. 4). Dies deutet ebenfalls daraufhin, dass der Migrationsvorteil TIMP-1 stimulierter Zellen auf die Aktivierung der Konformation des  $\beta_1$ -Integrins im Sinne eines verstärkten *inside-out Signalings* beruht und nicht auf die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen zurückzuführen ist.



**Abb. 4 Expression der Integrine CD49d/CD29 (VLA-4) und CD49e/CD29 (VLA-5).** Auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität logarithmisch dargestellt, während auf der Y-Achse die Anzahl der gemessenen Zellen aufgetragen ist. Die blauen Linien repräsentieren jeweils die unstimulierten Kontrollen, die roten Linien zeigen die TIMP-1 stimulierten Proben. Die Expression auch dieser Adhäsionsmoleküle ist von der Stimulation mit TIMP-1 unabhängig.

Neben einer verstärkten Zellmigration ist mit der Aktivierung des  $\beta_1$ -Integrins auch ein verstärktes Adhäsionsverhalten an das in der Knochenmarknische vorkommende Glykoprotein Fibronectin assoziiert. Fibronectin dient, wie eingangs erwähnt, als Ligand von Integrinen wie VLA-4, das auf HSPC besonders hoch exprimiert ist (14). Eine Aktivierung des  $\beta_1$ -Integrins führt zu einem verstärkten Adhäsionseffekt (121-123). Auch dieser Effekt konnte nach TIMP-1 Stimulation von primären CD34<sup>+</sup> HSPC beobachtet werden. Dies deutet auf ein durch TIMP-1 initiiertes *inside-out Signaling* hin. Wenn CD63 als direkter TIMP-1 Bindungspartner im Rahmen eines *Knockdown* herunterreguliert war, war der adhäsionsfördernde Effekt von TIMP-1 erwartungsgemäß verringert. Dieser Versuch bestätigte, dass CD63 als essentiell für die zytokinähnlichen Effekte von TIMP-1 ist und somit als Rezeptorprotein für TIMP-1 auf HSPC beschrieben werden kann.

Darüber hinaus ist bekannt, dass die Blockierung von  $\beta_1$ -Integrin zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration des als Tumorsuppressor wirkenden Transkriptionsfaktors p53 führt (124). Eine starke intrazelluläre Anhäufung von p53 wiederum kann die Apoptose durch Aktivierung von Caspasen induzieren. Wird das  $\beta_1$ -Integrin zum Beispiel durch TIMP-1 Stimulation in seiner aktiven Konformation gehalten, verringert es den durch p53 bedingten programmierten Zelltod. Zudem induziert TIMP-1 die Expression des antiapoptotisch wirkenden Gens *bcl-x<sub>L</sub>* (95). Ein damit im Einklang

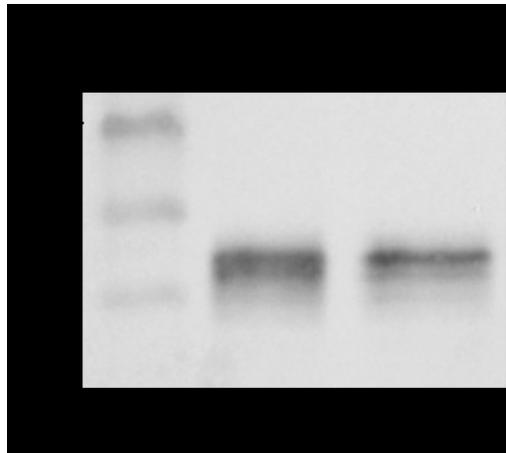
stehender antiapoptotischer Effekt von TIMP-1 konnte auch in dieser Arbeit in primären CD34<sup>+</sup> HSPC beobachtet werden. Als Korrelat der Apoptose wurde die aktivierte *cleaved*-Caspase-3 verwendet, die zentral in der Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalweges steht (125).

Bei der Untersuchung der in das TIMP-1 *Signaling* involvierten Signalwege standen der MAPK Signalweg, der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg und der PI-3 Kinase Signalweg im Vordergrund. Dabei wurden Inhibitoren für Signalwege verwendet, die in der Literatur in Zusammenhang mit endogenen TIMP-1 Funktionen Erwähnung finden. Indem die Signalwegs-inhibitoren in Kombination mit TIMP-1 in verschiedenen Versuchen Anwendung fanden, konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob der jeweils blockierte Signalweg durch TIMP-1 aktiviert wird. Es zeigte sich, dass eine Hemmung des MAPK Signalweges durch den Inhibitor PD98059 ebenso wie die Hemmung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges zu einer Abschwächung des TIMP-1 Effektes führten. Diese Beobachtungen sind kompatibel mit den Untersuchungen von Liu *et al.*. Liu *et al.* konnten zeigen, dass TIMP-1 unter anderem den MAPK Signalweg aktiviert, um humane Brustepithelzellen vor Apoptose zu schützen (97). Ebenso stehen die hier erhobenen Daten im Einklang mit der Arbeit von Egea *et al.*, die die Rolle von TIMP-1 auf humane MSC untersucht haben und dabei zeigen konnten, dass TIMP-1 via CD63 den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg einbezogen haben (126). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die von TIMP-1 auf humane CD34<sup>+</sup> HSPC ausgeübten Effekte vor allem über den MAPK Signalweg und den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg vermittelt werden.

Um die Unabhängigkeit der oben beschriebenen TIMP-1 Effekte von der MMP-inhibierenden Funktion von TIMP-1 zu verdeutlichen, wurde der synthetische Breitspektrum MMP-Inhibitor GM6001 hinsichtlich seiner Wirkung auf Adhäsion, Migration und Apoptose getestet. Dabei hatte GM6001 weder eine agonistische noch eine antagonistische Wirkung auf die TIMP-1 Effekte. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass TIMP-1 in CD34<sup>+</sup> HSPC Adhäsion und Migration verstärkt und diese Zellen gleichzeitig vor der Apoptose schützt. Diese Effekte sind abhängig von der Anwesenheit von CD63 und unabhängig von der MMP-inhibierenden Funktion von TIMP-1. Die Versuche zu Abbildung 3 und 4 wurden selbstständig durchgeführt.

### 4.3 Phänomenologische Betrachtungen mit murinen Knochenmark MNC

Im nächsten Schritt stand die Übertragung der in humanen Zellen gewonnenen Erkenntnisse auf ein *in vivo* Modell im Vordergrund. Dazu sollte zunächst gezeigt werden, dass CD63 auch in murinen Knochenmark MNC als direkter Bindungspartner für TIMP-1 dient. Dazu wurde eine Co-Immunpräzipitation mit Lysaten muriner Knochenmark MNC durchgeführt, die die Bindung von CD63 an TIMP-1 bestätigte (Abb. 5). Die Versuche zu Abbildung 5 wurden selbstständig nach Anleitung von Frau Dr. J. Fröbel durchgeführt.



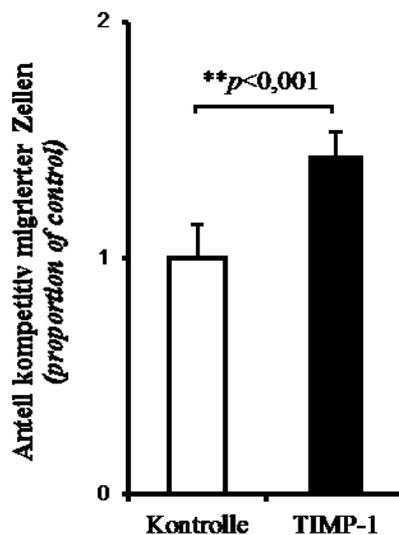
**Abb. 5 Co-Immunpräzipitation von CD63 und TIMP-1 aus murinen Knochenmark MNC.** Links: Proteinleiter. Mitte: Westernblot mit rekombinantem murinem TIMP-1 (rmTIMP-1). Rechts Co-Immunpräzipitation (IP) von CD63. Bei beiden Banden wurde TIMP-1 markiert (Immunoblot, IB). Auch auf murinen Knochenmark MNC bindet TIMP-1 an CD63.

### 4.4 *In vitro* Versuche mit murinen Knochenmark MNC

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die im humanen System beobachteten Effekte auch in murinen Knochenmark MNC hervorrufbar sind. Dazu wurden die Migrations- und Adhäsionsanalysen mit murinen Knochenmark MNC *in vitro* wiederholt. Die Ergebnisse unterstützen die gezeigten Resultate mit humanen CD34<sup>+</sup> HSPC. Da Nishimura *et al.* zeigen konnten, dass humanes TIMP-1 das Wachstum muriner Zellen nicht beeinflusst (127), wurde in diesem Projekt zur Stimulation von murinen Knochenmark MNC murines rekombinantes TIMP-1 (rmTIMP-1) verwendet. Dabei konnte beobachtet werden, dass murine Knochenmark MNC nach Stimulation mit

rmTIMP-1 wie im humanen Modell verstärkte Adhäsions- und Migrationseigenschaften aufweisen.

Zur genaueren Differenzierung der Migrationseigenschaften wurde zudem ein kompetitiver Migrationsassay mit murinen Knochenmark MNC durchgeführt, um einen direkten Vergleich zwischen TIMP-1 stimulierten und unstimulierten Zellen zu erhalten (Abb. 6). Dafür wurden unbehandelte murine Knochenmark MNC entnommen und in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde über Nacht mit rmTIMP-1 inkubiert und dann mit dem intrazellulären Farbstoff CFSE markiert, die andere Gruppe wurde über Nacht nicht mit TIMP-1 stimuliert und mit dem intrazellulären Farbstoff Texas Red markiert. Beide Zellgruppen wurden dann im Verhältnis 1:1 in einen *Transwell*-Migrationsassay eingebracht. Dabei zeigte sich, dass die zuvor mit TIMP-1 versetzten Zellen den unstimulierten Zellen gegenüber einen Migrationsvorteil aufwiesen. Die Versuche zu Abbildung 6 wurden vom Promovenden selbstständig durchgeführt. Dabei wurde die Methode vom Promovenden entwickelt.



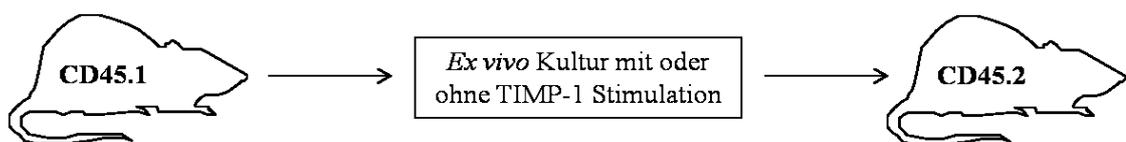
**Abb. 6** Kompetitiv migrierte murine BM MNC. Darstellung als *proportion of control*. Im Vergleich zeigt sich, dass TIMP-1 stimulierte murine BM MNC im direkten kompetitiven Vergleich zu nicht stimulierten Zellen ein verstärktes Migrationsverhalten *in vitro* zeigen.

#### 4.5 *In vivo* Versuche mit murinen Knochenmark MNC

Auch für die Effekte, die zuvor in den *in vivo* Versuchen beobachtet werden konnten, kann das aktivierte  $\beta_1$ -Integrin als unverzichtbar erachtet werden. Die im Rahmen dieser Versuche durchgeführte allogene Stammzelltransplantation bei Mäusen sollte eine

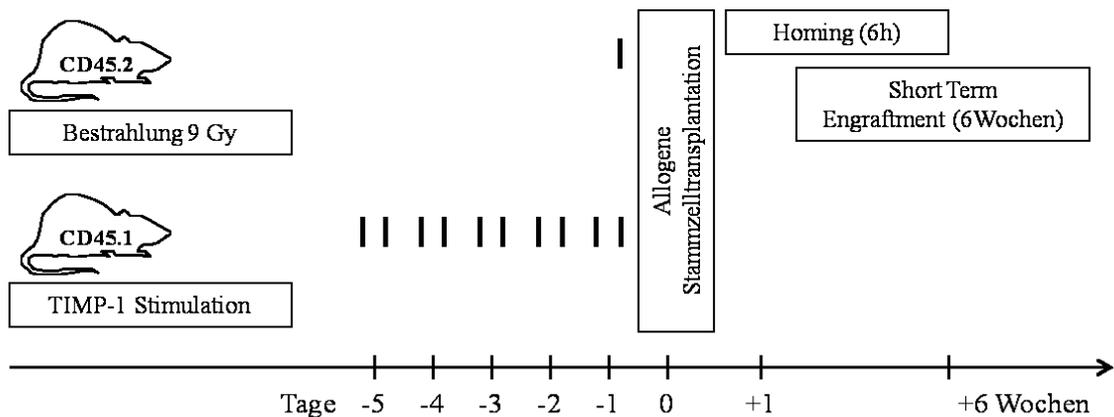
Übertragung der *in vitro* gemessenen Effekte bezüglich Adhäsions- und Migrationseigenschaften von HSPC *in vivo* erlauben. In Analogie zu verstärkten Adhäsions- und Migrationseigenschaften *in vitro* konnten in den *in vivo* Experimenten verstärkte *Homing*-Eigenschaften beobachtet werden. Wie eingangs erwähnt, versteht man unter dem Stammzell-*Homing* die Rückkehr von Stamm- und Progenitorzellen in das Knochenmark. Dieser Effekt spielt vor allem im Rahmen der Stammzelltransplantation eine klinisch relevante Rolle.

Als Transplantationsmodell wurde ein kongenes beziehungsweise koisogenes System gewählt. Unter einem solchen System versteht man zwei Organismen, die sich lediglich in einem Genloкус unterscheiden. In diesem Falle fand der Mausstamm C57BL/6 Verwendung, wobei eine Kohorte den Oberflächenmarker CD45.1 und eine zweite CD45.2 exprimiert. Dies ermöglichte die Rückverfolgung der Spenderzellen in den Empfängermausen nach allogener Stammzelltransplantation. Für die Transplantationsversuche wurde zunächst Knochenmark MNC von unstimulierten C57BL/6 CD45.1 Mäusen verwendet. Die gewonnenen MNC wurden *ex vivo* mit rmTIMP-1 stimuliert und sodann in kongene CD45.2 Mäuse transplantiert (Abb. 7). Dabei konnte drei Stunden nach Transplantation eine signifikant erhöhte Anzahl von Spender MNC in Milz und Knochenmark der Empfängermause beobachtet werden, wenn sie mit rmTIMP-1 stimulierten Knochenmark MNC transplantiert worden waren. Dies kann als verstärktes Progenitorzell-*Homing* gewertet werden.



**Abb. 7** Procedere der allogenen Transplantation mit *ex vivo* Stimulation. Den CD45.1 Spendermäusen wurde unbehandeltes Knochenmark entnommen. Dieses wurde *ex vivo* mit rmTIMP-1 stimuliert und dann in zuvor letal bestrahlte CD45.2 Empfängermause transplantiert.

Im nächsten Schritt wurden die Spendermäuse direkt mit rmTIMP-1 für fünf Tage stimuliert, bevor ihr Knochenmark in die zuvor letal bestrahlten Empfängermause transplantiert wurde. Auf diese Weise konnte die *ex vivo* Stimulation mit rmTIMP-1 umgangen werden (Abb. 8).



**Abb. 8** Procedere der allogenen Stammzelltransplantation mit Verabreichung von rmTIMP-1 an die Spendermäuse. CD45.2 Spendermäuse wurden vor der Transplantation mit 9 Gy letal bestrahlt. CD45.1 Spendermäuse wurden vor Entnahme von Knochenmark für fünf Tage mit rmTIMP-1 stimuliert. Das *Homing* wurde nach sechs Stunden, das *Short-Term-Engraftment* wurde nach sechs Wochen beurteilt.

Auch hier zeigte sich drei Stunden nach Transplantation eine erhöhte Anzahl von MNC sowohl in Milz und Knochenmark der Empfängermause als auch signifikant mehr LSK<sup>+</sup> Zellen an eben diesen Orten. LSK<sup>+</sup> Zellen sind unreife murine hämatopoietische Progenitorzellen, die die Oberflächenmarker sca-1 und c-Kit (CD117) exprimieren, nicht hingegen die *Lineage*-Marker, zu denen unter anderem CD3, CD11b, CD45R/B220 sowie Ter119 zählen. Murine LSK<sup>+</sup> Zellen können nicht äquivalent zu humanen CD34<sup>+</sup> Zellen als voll repopulationsfähige Stammzellen beurteilt werden. Sie sind eher als Progenitorzellen zu bewerten, von denen ca. 10% eine Langzeit-repopulationsfähigkeit aufweisen (128). In den Transplantationsversuchen fiel auf, dass nicht nur mehr Spender-MNC in Milz und Knochenmark aufzufinden waren, sondern eben auch ein erhöhter Anteil an LSK<sup>+</sup> Spenderzellen. Das bedeutet, dass es nach vorhergehender rmTIMP-1 Stimulation der Spendermause zu einem verstärkten *Homing* sowohl von MNC als auch von Progenitorzellen der murinen Blutbildung gekommen ist. Diese Sicht wird durch eine verstärkte Koloniebildung aus murinen Milz-MNC der Empfängermause unterstützt. Im Rahmen der *Homing*-Versuche wurden die Milzen der Empfängermause entnommen und homogenisiert. Aus der gewonnenen Zellsuspension wurden sodann CFC-Versuche angesetzt. Darin zeigte sich eine verstärkte Koloniebildung aus den Milzen jener Mäuse, die zuvor im Rahmen der Transplantation Knochenmark von rmTIMP-1 stimulierten Spendermäusen erhalten

hatten. Dies kann ebenfalls als Korrelat eines verstärkten *Homings* von rmTIMP-1 vorbehandelten Zellen gewertet werden.

Vor dem Hintergrund des verstärkten *Homings* wurde das Knochenmark der Spendermäuse detaillierter untersucht. Dabei fiel keine Erhöhung des Anteils von LSK<sup>+</sup> Zellen in dem mit rmTIMP-1 stimulierten Knochenmark auf. Bei gleicher eingesetzter Zellzahl konnte aber eine deutlich erhöhte Koloniezahl im Knochenmark aus den zuvor mit TIMP-1 behandelten Mäusen gemessen werden. Insofern ergibt sich kein Anhalt auf eine Expansion des Progenitorzellpools durch rmTIMP-1 Stimulation. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Grundlage für das verstärkte *Homing* auf einem Überlebensvorteil und auf einem verstärkten aktiven Einwandern von rmTIMP-1 stimulierten Zellen in Milz und Knochenmark der Empfängermause beruht.

Das Verhalten der humanen HSPC *in vitro* hinsichtlich Adhäsion und Migration ist analog zum Verhalten der murinen Progenitorzellen *in vivo* mit Blick auf das *Homing*. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das  $\beta_1$ -Integrin durch seine oben beschriebene Wirkung auf Adhäsion und Migration das *Homing* von hämatopoietischen Präkursorzellen beeinflusst. Potocnik *et al.* (48) beschreiben, dass Mäuse eben dann kein Stamm- und Progenitorzell-*Homing* zeigen, wenn sie mit murinem Knochenmark transplantiert wurden, welches ein herunterreguliertes  $\beta_1$ -Integrin aufwies. Ein im Gegenzug durch TIMP-1 Behandlung verstärkt aktiviertes  $\beta_1$ -Integrin kann als Ursache für ein verstärktes *Homing* im kongenen Transplantationsmodell gewertet werden.

Die Experimente zum *Short-Term-Engraftment* wurden in dieser Studie auf Grund ihrer Komplexität nur am Rande behandelt. Die erhobenen Daten zeigen jedoch, dass noch sechs Wochen post transplantationem eine signifikant höhere Spenderzellzahl im Knochenmark derjenigen Empfängermause zu verzeichnen ist, die mit Knochenmark der rmTIMP-1 Gruppe transplantiert worden waren. Dies weist auf eine langfristige Wirkung von rmTIMP-1 im allogenen Transplantationsmodell hin und steht im Einklang mit den Daten von Rossi *et al.*. Diese Arbeitsgruppe transplantierte Knochenmark von TIMP<sup>-/-</sup> *Knockout*-Mäusen in kongene Wildtypmäuse und konnte einerseits in den TIMP-1<sup>-/-</sup> Mäusen Defekte in Zellzyklus und Stammzellpool beobachten und andererseits eine beeinträchtigte Langzeitrepopulation beschreiben (124). Zusammengefasst lässt sich aus den kongenen Knochenmarktransplantationsversuchen im Mausmodell schlussfolgern, dass TIMP-1

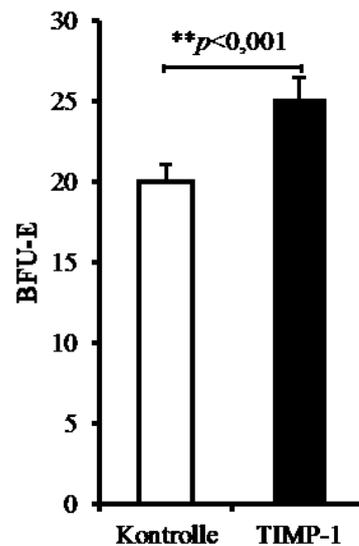
eine grundsätzliche, biologisch relevante Rolle in der Regulation der Hämatopoiese spielt, indem es durch Beeinflussung der Adhäsions- und Migrationseigenschaften von Knochenmark MNC *Homing* und *Engraftment* von LSK<sup>+</sup> Progenitorzellen fördert.

Kürzlich untersuchten auch Nakajima *et al.* und Qi *et al.* die Rolle von TIMP-3 auf murine HSC (129-130). Obgleich alle TIMP-1 Proteine eine große Sequenzhomologie und eine Gemeinsamkeit an struktureller Ähnlichkeit ausweisen (89), verfügen alle TIMP-Proteine über ein eigenes Spektrum an zu hemmenden MMP. Dabei hemmt TIMP-1 die meisten MMP außer MMP19 und membrangebundene MMP (84,131). TIMP-3 hemmt vor allem ADAM Proteasen (64,132). Mit Blick auf MMP-unabhängige Effekte ist über TIMP-3 bekannt, dass es die Angiogenese hemmt (133). TIMP-3 interagiert mit VEGFR-2 (134) und dem Angiotensin II Typ 2 Rezeptor (135). Nakajima *et al.* konnten zeigen, dass TIMP-3 die HSC Proliferation dadurch fördert, indem es *in vivo* und *ex vivo* zu einem Zellzykluseintritt ruhender HSC beiträgt. Dieser Effekt wurde durch die Interferenz von Ang-1 und Tie-2 hervorgerufen und war unabhängig von der MMP-Hemmung durch TIMP-3. Obwohl die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit einen anderen Rezeptor als für TIMP-3 beschreiben, heben auch diese Arbeiten die förderliche Wirkung von TIMPs auf das Überleben und die Proliferation von HSPC hervor. So kommen Qi *et al.* zu dem Schluss, dass TIMP-3 Überexpression zu einer verstärkten Stammzellzirkulation führt, die wiederum eine Akkumulation in der Milz bedingt. Shen *et al.* schließlich stellen fest, dass TIMP-1 und TIMP-3 trotz struktureller Ähnlichkeit nicht austauschbar sind. Zusammenfassend lässt sich unter Berücksichtigung der publizierten Studien feststellen, dass TIMP Proteine das Verhalten von HSPC beeinflussen. Obwohl einige Aspekte wie antiapoptotische Effekte und Förderung der Proliferation bei TIMP-1 und TIMP-3 ähnlich sind, scheint CD63 vor allem bei TIMP-1 als Rezeptorprotein aus HSPC eine Schlüsselrolle zu spielen.

#### **4.6 Untersuchungen zur Erythropoiese im humanen Modell**

Wie eingangs erwähnt, ist TIMP-1 in der Hämatopoiese als Induktor der Erythropoiese bekannt. Die Daten von Gasson *et al.* (68), in denen eine EPA Funktion von TIMP-1 beschrieben worden ist, konnten in verschiedenen Versuchsaufbauten bestätigt werden. Zum einen fördert TIMP-1 die Bildung von erythroiden Kolonien

(*Burst Forming Units-Erythrocytes*, BFU-E) aus humanen CD34<sup>+</sup> HSPC. Die in diesem Rahmen durchgeführten Versuche zur Bestimmung der optimalen TIMP-1 Konzentration ergaben denselben Wert wie die Migrationsversuche und zeigten, dass eine Konzentration von 1 nM nötig ist, um einen maximalen EPA Effekt zu erzielen. Dieser maximale EPA Effekt bestand in einer um den Faktor 1,3 erhöhten Anzahl an BFU-E (Abb. 9). Die Versuche zu Abbildung 9 wurden vom Promovenden selbstständig durchgeführt.



**Abb. 9 Anzahl an BFU-E mit und ohne TIMP-1 Stimulation CD34<sup>+</sup>HSPC.** Anzahl an Burst Forming Units-Erythrocytes (BFU-E) aus 2000 CD34<sup>+</sup> HSPC mit und ohne TIMP-1 Stimulation: TIMP-1 unterstützt die Erythropoiese humaner HSPC.

Um die Abhängigkeit des EPA Effektes von dem Rezeptorprotein CD63 zu zeigen, wurden *Knockdown*vektoren zur Herunterregulation von CD63 verwendet. Erwartungsgemäß konnte hier jedoch nicht festgestellt werden, dass der *Knockdown* von CD63 zur Aufhebung des durch TIMP-1 verursachten EPA Effektes führt (Daten nicht gezeigt). Dies ist aller Wahrscheinlichkeit nach der Tatsache geschuldet, dass es sich bei dem gewählten *Knockdown*verfahren um ein transientes Verfahren handelt, das seine Wirkung nicht über die Kulturzeit von 14 Tagen aufrechterhalten kann. In humane Zellen eingebrachte Plasmide unterliegen einer Degradation intrazellulärer DNA-abbauender Enzyme und wirken aus diesem Grunde nur für einige Tage effektiv. Es kann darüber hinaus davon ausgegangen werden, dass TIMP-1 seine EPA Funktion in der zweiten Hälfte der 14-tägigen Kulturzeit ausübt. Darauf weisen Untersuchungen

von Eshghi *et al.* hin, die belegen, dass der Beginn der Erythropoese vor allem abhängig von EPO ist. In einem zweiten, späteren Entwicklungsschritt tritt jedoch das  $\beta_1$ -Integrin in den Vordergrund der Regulation der Erythropoese (49). Aus diesen Versuchsergebnissen lässt sich im Umkehrschluss aber nicht schlussfolgern, dass CD63 nicht auch die EPA Funktion von TIMP-1 als Rezeptorprotein vermittelt.

#### 4.7 Untersuchungen zur Erythropoese im murinen Modell

Zuletzt wurde der Einfluss von rmTIMP-1 auf die Hämatopoese *in vivo* untersucht. Die *in vivo* Stimulation von Mäusen mit rmTIMP-1 führt zu einer verstärkten Erythropoese, die sich in einem erhöhtem Hämoglobinwert, erhöhten Erythrozyten- und Retikulozytenanzahl äußert (Tabelle 1). Mit diesen Ergebnissen aus dem Mausmodell können die Daten von Niskanen *et al.* unterstützt werden, die einen Effekt von TIMP-1 auf die Bildung der erythroiden Reihe im Mausmodell postulierten (136). Die Versuche zu Tabelle 1 wurden selbstständig vom Promovenden unter Aufsicht von Herrn Dr. F. A. Schildberg, Institut für molekular Medizin und experimentelle Immunologie, Universität Bonn, durchgeführt.

		Erythrozyten [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ]	Hämoglobin [g/dl]	Hämatokrit [%]	Retikulozyten [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]
Kontrolle	Mittelwert	10,1	16,0	58,0	214
	Standardabweichung	0,9	1,6	6,3	42
TIMP-1	Mittelwert	12,0	18,0	65,0	257
	Standardabweichung	0,7	1,5	4,7	31
	<i>p</i> -Wert	<0,01	<0,01	0,02	0,03

**Tabelle 1 Auszüge aus dem Blutbildern TIMP-1 stimulierter Mäuse.** TIMP-1 führt auch *in vivo* zu einer Verstärkung der erythroiden Differenzierung.

## 5 Schlussfolgerungen

Mit dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die Wirkung von TIMP-1 auf hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gewonnen werden. So hat TIMP-1 als Serumprotein bifunktionale Eigenschaften, indem es – wie bereits bekannt – zum einen Metalloproteinasen hemmt und zum anderen als Zytokin innerhalb der Hämatopoese fungiert.

Dabei konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 an CD63 auf HSPC bindet und auf diese Weise das  $\beta_1$ -Integrin CD29 aktiviert. Diese Bindung hat sowohl einen antiapoptischen Effekt als auch eine verstärkte Adhäsion und Migration zur Folge. Um die biologische Relevanz dieser Wirkung *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Mausmodell verwendet, in welchem eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt wurde. Zu diesem Zwecke wurden die Knochenmark MNC *in vivo* und *ex vivo* mit TIMP-1 stimuliert und danach in kongene Empfängermause transplantiert. Der Effekt von TIMP-1 auf die Stammzelltransplantation wurde anhand des *Homings* und des *Short-Term-Engraftments* der behandelten Transplantate bewertet. Dabei konnte festgestellt werden, dass TIMP-1 das Einwandern der Spenderzellen in Knochenmark und Milz fördert. Zudem konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 auch *in vivo* die erythroide Differenzierung fördert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass TIMP-1 zum einen mit seinem N-Terminus MMP hemmt und somit die ECM vor Degradation schützt. Auf diese Weise entsteht ein *Microenvironment*, in welches hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen einwandern und dort ihrer Funktion nachkommen können. Zum anderen fördert TIMP-1 mit seinem C-terminalen Ende die Migration von HSPC in das zuvor geschaffene *Microenvironment*. Dort verbessert TIMP-1 durch direkte Stimulation von HSPC deren Adhäsion, schützt sie vor Apoptose und fördert die Erythropoese. TIMP-1 nimmt somit eine entscheidende Rolle in der komplexen Regulation hämatopoietischer Stammzellen ein.

Inwiefern TIMP-1 einen potentiell förderlichen Effekt zur Verkürzung der Aplasiephase in klinischer Anwendung finden könnte, bedarf weiterer Untersuchungen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Metcalf, D. On hematopoietic stem cell fate. *Immunity* 26, 669-673 (2007).
2. Suda, T., Suda, J. & Ogawa, M. Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2520-2524 (1984).
3. Jones, D.L. & Wagers, A.J. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 11-21 (2008).
4. Reya, T., *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414 (2003).
5. Clark, I.M., Swingler, T.E., Sampieri, C.L. & Edwards, D.R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1362-1378 (2008).
6. Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A.P., Johnson, F.L. & Weissman, I.L. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 294, 1933-1936 (2001).
7. Massberg, S., *et al.* Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* 131, 994-1008 (2007).
8. Janowska-Wieczorek, A., Matsuzaki, A. & L, A.M. The Hematopoietic Microenvironment: Matrix Metalloproteinases in the Hematopoietic Microenvironment. *Hematology* 4, 515-527 (2000).
9. Siler, U., *et al.* Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood* 96, 4194-4203 (2000).
10. Chirco, R., Liu, X.W., Jung, K.K. & Kim, H.R. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 25, 99-113 (2006).
11. Wagers, A.J., Allsopp, R.C. & Weissman, I.L. Changes in integrin expression are associated with altered homing properties of Lin(-/lo)Thy1.1(lo)Sca-1(+)-c-kit(+) hematopoietic stem cells following mobilization by cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 30, 176-185 (2002).
12. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977-988 (2006).
13. Imai, Y., Shimaoka, M. & Kurokawa, M. Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. *Int J Hematol* 91, 569-575 (2010).
14. Simmons, P.J., Zannettino, A., Gronthos, S. & Leavesley, D. Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk Lymphoma* 12, 353-363 (1994).
15. Rubinstein, E. The complexity of tetraspanins. *Biochem Soc Trans* 39, 501-505 (2011).
16. Metzelaar, M.J., *et al.* CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 266, 3239-3245 (1991).
17. Azorsa, D.O., Hyman, J.A. & Hildreth, J.E. CD63/Pltgp40: a platelet activation antigen identical to the stage-specific, melanoma-associated antigen ME491. *Blood* 78, 280-284 (1991).
18. Maecker, H.T., Todd, S.C. & Levy, S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 11, 428-442 (1997).

19. Berditchevski, F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 114, 4143-4151 (2001).
20. Berditchevski, F., *et al.* Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. *J Biol Chem* 276, 41165-41174 (2001).
21. Berditchevski, F. & Odintsova, E. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol* 146, 477-492 (1999).
22. Slupsky, J.R., Seehafer, J.G., Tang, S.C., Masellis-Smith, A. & Shaw, A.R. Evidence that monoclonal antibodies against CD9 antigen induce specific association between CD9 and the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 264, 12289-12293 (1989).
23. Rubinstein, E., *et al.* CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* 26, 2657-2665 (1996).
24. Yanez-Mo, M., Mittelbrunn, M. & Sanchez-Madrid, F. Tetraspanins and intercellular interactions. *Microcirculation* 8, 153-168 (2001).
25. Domanico, S.Z., Pelletier, A.J., Havran, W.L. & Quaranta, V. Integrin alpha 6A beta 1 induces CD81-dependent cell motility without engaging the extracellular matrix migration substrate. *Mol Biol Cell* 8, 2253-2265 (1997).
26. Shaw, A.R., *et al.* Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers beta 1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 270, 24092-24099 (1995).
27. Mannion, B.A., Berditchevski, F., Kraeft, S.K., Chen, L.B. & Hemler, M.E. Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associated with integrin alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29). *J Immunol* 157, 2039-2047 (1996).
28. Han, P., Guo, X. & Story, C. Role of beta(1)-integrins and their associated tetraspanin molecules in fibronectin-enhanced megakaryopoiesis. *Cytotherapy* 6, 465-475 (2004).
29. Hynes, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549-554 (1987).
30. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687 (2002).
31. Humphries, J.D., Byron, A. & Humphries, M.J. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 119, 3901-3903 (2006).
32. Humphries, M.J. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28, 311-339 (2000).
33. Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. & Yamada, K.M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 793-805 (2001).
34. Schwartz, M.A. & Assoian, R.K. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 114, 2553-2560 (2001).
35. Shimaoka, M., Takagi, J. & Springer, T.A. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 485-516 (2002).
36. Frisch, S.M. & Sreaton, R.A. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13, 555-562 (2001).
37. Shattil, S.J., Kim, C. & Ginsberg, M.H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 288-300 (2010).

38. Ye, F., Kim, C. & Ginsberg, M.H. Reconstruction of integrin activation. *Blood* (2011).
39. Shattil, S.J. & Newman, P.J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 104, 1606-1615 (2004).
40. Arnaout, M.A., Goodman, S.L. & Xiong, J.P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 19, 495-507 (2007).
41. Ye, F., Kim, C. & Ginsberg, M.H. Reconstruction of integrin activation. *Blood* 119, 26-33 (2012).
42. Nishida, N., *et al.* Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity* 25, 583-594 (2006).
43. Yan, B. & Smith, J.W. A redox site involved in integrin activation. *J Biol Chem* 275, 39964-39972 (2000).
44. Chigaev, A., *et al.* Conformational regulation of alpha 4 beta 1-integrin affinity by reducing agents. "Inside-out" signaling is independent of and additive to reduction-regulated integrin activation. *J Biol Chem* 279, 32435-32443 (2004).
45. Lu, C., Takagi, J. & Springer, T.A. Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem* 276, 14642-14648 (2001).
46. Hughes, P.E., *et al.* Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem* 271, 6571-6574 (1996).
47. Kinashi, T. Integrin regulation of lymphocyte trafficking: lessons from structural and signaling studies. *Adv Immunol* 93, 185-227 (2007).
48. Potocnik, A.J., Brakebusch, C. & Fassler, R. Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity* 12, 653-663 (2000).
49. Eshghi, S., Vogelesang, M.G., Hynes, R.O., Griffith, L.G. & Lodish, H.F. Alpha4beta1 integrin and erythropoietin mediate temporally distinct steps in erythropoiesis: integrins in red cell development. *J Cell Biol* 177, 871-880 (2007).
50. Williams, D.A., Rios, M., Stephens, C. & Patel, V.P. Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions. *Nature* 352, 438-441 (1991).
51. Miyake, K., Weissman, I.L., Greenberger, J.S. & Kincade, P.W. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med* 173, 599-607 (1991).
52. Papayannopoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., Priestley, G.V. & Wolf, N.S. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9647-9651 (1995).
53. Qian, H., *et al.* Distinct roles of integrins alpha6 and alpha4 in homing of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 110, 2399-2407 (2007).
54. Sternlicht, M.D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516 (2001).
55. Brinckerhoff, C.E. & Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 207-214 (2002).
56. Bourboulia, D. & Stetler-Stevenson, W.G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 20, 161-168 (2010).
57. Xu, J., *et al.* Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Cell Biol* 154, 1069-1079 (2001).

58. Ogawa, M., Kawamoto, M. & Yamanaka, N. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in human bone marrow tissues-an immunohistochemical study. *J Nihon Med Sch* 67, 235-241 (2000).
59. Bergers, G., *et al.* Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2, 737-744 (2000).
60. Heissig, B., *et al.* Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625-637 (2002).
61. McQuibban, G.A., *et al.* Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 276, 43503-43508 (2001).
62. Carion, A., *et al.* Stromal-derived factor 1 and matrix metalloproteinase 9 levels in bone marrow and peripheral blood of patients mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and chemotherapy. Relationship with mobilizing capacity of haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* 122, 918-926 (2003).
63. Yu, X.F. & Han, Z.C. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Histol Histopathol* 21, 519-531 (2006).
64. Brew, K., Dinakarandian, D. & Nagase, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477, 267-283 (2000).
65. Yasui, N., Hori, H. & Nagai, Y. Production of collagenase inhibitor by the growth cartilage of embryonic chick bone: isolation and partial characterization. *Coll Relat Res* 1, 59-72 (1981).
66. Carmichael, D.F., *et al.* Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2407-2411 (1986).
67. Westbrook, C.A., Gasson, J.C., Gerber, S.E., Selsted, M.E. & Golde, D.W. Purification and characterization of human T-lymphocyte-derived erythroid-potentiating activity. *J Biol Chem* 259, 9992-9996 (1984).
68. Gasson, J.C., Bersch, N. & Golde, D.W. Characterization of purified human erythroid-potentiating activity. *Prog Clin Biol Res* 184, 95-104 (1985).
69. Gasson, J.C., *et al.* Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature* 315, 768-771 (1985).
70. Chesler, L., Golde, D.W., Bersch, N. & Johnson, M.D. Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood* 86, 4506-4515 (1995).
71. Docherty, A.J., *et al.* Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318, 66-69 (1985).
72. Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. & Thorgeirsson, U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74, 111-122 (1997).
73. Murphy, G. & Willenbrock, F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol* 248, 496-510 (1995).
74. Tuuttila, A., *et al.* Three-dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 284, 1133-1140 (1998).
75. Murphy, G., *et al.* The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30, 8097-8102 (1991).
76. Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. & Iwata, K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a

- wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 298, 29-32 (1992).
77. Huang, W., Meng, Q., Suzuki, K., Nagase, H. & Brew, K. Mutational study of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) locates an inhibitory region for matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 272, 22086-22091 (1997).
  78. Willenbrock, F. & Murphy, G. Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med* 150, S165-170 (1994).
  79. Huang, W., *et al.* Folding and characterization of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expressed at high yield in *E. coli*. *FEBS Lett* 384, 155-161 (1996).
  80. Hojilla, C.V., Mohammed, F.F. & Khokha, R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer* 89, 1817-1821 (2003).
  81. Stetler-Stevenson, W.G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 103, 1237-1241 (1999).
  82. Kleiner, D.E. & Stetler-Stevenson, W.G. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 43 Suppl, S42-51 (1999).
  83. Kadri, Z., *et al.* Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ* 11, 573-580 (2000).
  84. Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. & Petitfrere, E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49, 187-198 (2004).
  85. Olson, M.W., *et al.* Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *J Biol Chem* 275, 2661-2668 (2000).
  86. Olson, M.W., Gervasi, D.C., Mobashery, S. & Fridman, R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 272, 29975-29983 (1997).
  87. Murate, T., *et al.* Erythroid potentiating activity of tissue inhibitor of metalloproteinases on the differentiation of erythropoietin-responsive mouse erythroleukemia cell line, ELM-I-1-3, is closely related to its cell growth potentiating activity. *Exp Hematol* 21, 169-176 (1993).
  88. Lambert, E., *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J* 372, 767-774 (2003).
  89. Stetler-Stevenson, W.G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 1, re6 (2008).
  90. Oelmann, E., *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 99, 258-267 (2002).
  91. Bertaux, B., Hornebeck, W., Eisen, A.Z. & Dubertret, L. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol* 97, 679-685 (1991).
  92. Yamashita, K., *et al.* Tyrosine phosphorylation is crucial for growth signaling by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *FEBS Lett* 396, 103-107 (1996).

93. Jung, K.K., Liu, X.W., Chirco, R., Fridman, R. & Kim, H.R. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J* 25, 3934-3942 (2006).
94. Guedez, L., *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 regulation of interleukin-10 in B-cell differentiation and lymphomagenesis. *Blood* 97, 1796-1802 (2001).
95. Guedez, L., *et al.* In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 102, 2002-2010 (1998).
96. Li, G., Fridman, R. & Kim, H.R. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 59, 6267-6275 (1999).
97. Liu, X.W., Bernardo, M.M., Fridman, R. & Kim, H.R. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* 278, 40364-40372 (2003).
98. Guedez, L. & Stetler-Stevenson, W.G. The prognostic value of TIMP-1 in multiple myeloma. *Leuk Res* 34, 576-577 (2010).
99. Nakopoulou, L., *et al.* Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J Pathol* 197, 307-313 (2002).
100. Dasse, E., *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes hematopoietic differentiation via caspase-3 upstream the MEKK1/MEK6/p38alpha pathway. *Leukemia* 21, 595-603 (2007).
101. Oliansky, D.M., *et al.* The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the therapy of acute myelogenous leukemia in adults: an evidence-based review. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 137-180 (2008).
102. Hahn, T., *et al.* The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the therapy of acute lymphoblastic leukemia in adults: an evidence-based review. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 1-30 (2006).
103. Alyea, E.P., *et al.* Impact of conditioning regimen intensity on outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 1047-1055 (2006).
104. Alyea, E.P., *et al.* Comparative outcome of nonmyeloablative and myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients older than 50 years of age. *Blood* 105, 1810-1814 (2005).
105. Couban, S., *et al.* A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood* 100, 1525-1531 (2002).
106. Kanda, Y., *et al.* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). *Blood* 102, 1541-1547 (2003).
107. Jung, Y., *et al.* Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* 38, 497-508 (2006).
108. Ceradini, D.J., *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10, 858-864 (2004).
109. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home? *Blood* 106, 1901-1910 (2005).
110. Yusuf, R.Z. & Scadden, D.T. Homing of hematopoietic cells to the bone marrow. *J Vis Exp* (2009).
111. Chute, J.P. Stem cell homing. *Curr Opin Hematol* 13, 399-406 (2006).

112. Westphal V, L.M., Di Nicola A, Hell SW. Dynamic far-field fluorescence nanoscopy. *New J. Phys.* 9, 435 (2007).
113. Hell, S.W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19, 780-782 (1994).
114. Hell, S.W. Far-field optical nanoscopy. *Science* 316, 1153-1158 (2007).
115. Eggeling, C., *et al.* Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457, 1159-1162 (2009).
116. Regen, C.M. & Horwitz, A.F. Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J Cell Biol* 119, 1347-1359 (1992).
117. Gao, J.X. & Issekutz, A.C. The beta 1 integrin, very late activation antigen-4 on human neutrophils can contribute to neutrophil migration through connective tissue fibroblast barriers. *Immunology* 90, 448-454 (1997).
118. Chuluyan, H.E., Osborn, L., Lobb, R. & Issekutz, A.C. Domains 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) both support very late activation antigen-4 (CD49d/CD29)-dependent monocyte transendothelial migration. *J Immunol* 155, 3135-3134 (1995).
119. Fassler, R., *et al.* Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *J Cell Biol* 128, 979-988 (1995).
120. Oostendorp, R.A. & Dormer, P. VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells. *Leuk Lymphoma* 24, 423-435 (1997).
121. Levesque, J.P., Haylock, D.N. & Simmons, P.J. Cytokine regulation of proliferation and cell adhesion are correlated events in human CD34+ hemopoietic progenitors. *Blood* 88, 1168-1176 (1996).
122. Levesque, J.P., Leavesley, D.I., Niutta, S., Vadas, M. & Simmons, P.J. Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J Exp Med* 181, 1805-1815 (1995).
123. Sanchez-Aparicio, P., Dominguez-Jimenez, C. & Garcia-Pardo, A. Activation of the alpha 4 beta 1 integrin through the beta 1 subunit induces recognition of the RGDS sequence in fibronectin. *J Cell Biol* 126, 271-279 (1994).
124. Rossi, L., Ergen, A.V. & Goodell, M.A. TIMP-1 deficiency subverts cell-cycle dynamics in murine long-term HSCs. *Blood* 117, 6479-6488 (2011).
125. Porter, A.G. & Janicke, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 99-104 (1999).
126. Egea, V., *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E309-316 (2012).
127. Nishimura, K., *et al.* Inhibitory activity on matrix metalloproteinases and cell-proliferating activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)-contrastive difference between human and bovine TIMP-1s on mouse cell proliferation. *Growth Factors* 23, 135-142 (2005).
128. Challen, G.A., Boles, N., Lin, K.K. & Goodell, M.A. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A* 75, 14-24 (2009).
129. Nakajima, H., *et al.* TIMP-3 recruits quiescent hematopoietic stem cells into active cell cycle and expands multipotent progenitor pool. *Blood* 116, 4474-4482 (2010).
130. Shen, Y., *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) regulates hematopoiesis and bone formation in vivo. *PLoS One* 5(2010).

131. Baker, A.H., Edwards, D.R. & Murphy, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115, 3719-3727 (2002).
132. Amour, A., *et al.* TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 435, 39-44 (1998).
133. Anand-Apte, B., *et al.* Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 817-823 (1997).
134. Qi, J.H., *et al.* A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 9, 407-415 (2003).
135. Kang, K.H., Park, S.Y., Rho, S.B. & Lee, J.H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with angiotensin II type 2 receptor and additively inhibits angiogenesis. *Cardiovasc Res* 79, 150-160 (2008).
136. Niskanen, E., Gasson, J.C., Teates, C.D. & Golde, D.W. In vivo effect of human erythroid-potentiating activity on hematopoiesis in mice. *Blood* 72, 806-810 (1988).

## 7 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Rainer Haas, Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, danke ich herzlich für die Möglichkeit, in seiner Klinik zu promovieren. Ich möchte ihm ebenso für anregende Diskussionen, hilfreiche Impulse, die Freiheit bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen danken. Ich verdanke ihm eine intensive, engagierte und geduldige Begleitung meiner ersten wissenschaftlichen Schritte.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Ingmar Bruns danken. Als Betreuer dieser Promotion hat er sich herausragend für das Gelingen des Projektes eingesetzt. Dank seiner fachlichen Expertise hat er dieses Projekt als steter Motivator durch zahllose kreative Ideen und sachkundige Vorschläge sehr bereichert. Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. A. Czibere für seinen kompetenten Rat und für die professionelle Begleitung dieser Arbeit danken.

Weiterhin gilt allen Mitarbeitern im hämatologischen Forschungslabor mein Dank für die freundschaftlich-kollegiale Arbeitsatmosphäre und die stete Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Julia Fröbel, Herrn Dipl.-Biol. Ron-Patrick Cadeddu und Frau Annemarie Koch für ihre zuverlässige und geduldige Unterstützung im Labor und ihr großes Engagement.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Dr. Frank A. Schildberg für sein großartiges und professionelles Engagement und seine Unterstützung bei großen Teilen des Projektes. Ich möchte ihm ganz besonders für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Zuge der Kooperation zur Durchführung der *in vivo* Versuche danken. Weiterhin möchte ich in diesem Zusammenhang Herrn Prof. Dr. René H. Tolba für die Ermöglichung und die sachkundige Unterstützung der *in vivo* Versuche danken.

Zudem möchte ich meinen Dank an Herrn Dr. Marcel A. Lauterbach für sein Engagement im Rahmen der Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen richten. Mein Dank für die Ermöglichung dieser Kooperation zur Durchführung der STED Mikroskopie gebührt weiterhin dem Direktor des Institutes, Herrn Prof. Dr. Stefan W. Hell sowie Herrn Dr. Volker Westphal.

Das Projekt wurde großzügig durch eine Spende der Leukämie Lymphomliga e.V. Düsseldorf unterstützt. Dafür gebührt ihr und stellvertretend ihrem Vorsitzenden, Herrn Prof. Dr. Jan von Knop, mein herzlicher Dank.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung, ihre großartige Geduld und Begleitung während meines Studiums und während dieser Promotion.

Schließlich bin ich Frau Dr. Alina Henn sehr dankbar für Ihre geduldige und sachkundige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

## **8 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den