

In vitro-Stammzellkultur

In vitro-Amplifikation humaner hämatopoetischer Stammzellen im 3D-System

LISA MARX-BLÜMEL^{1,2}, CHRISTIAN MARX³, ANDREAS SCHOBER⁴, JAMES F. BECK^{1,2}

¹ ABTEILUNG HÄMATOLOGIE UND ONKOLOGIE, KLINIK FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN, UNIVERSITÄTSKLINIKUM JENA

² RESEARCH CENTER LOBEDA, UNIVERSITÄTSKLINIKUM JENA

³ ZENTRUM FÜR PANDEMIE-IMPfstOFFE UND -THERAPEUTIKA (ZEPAI), PAUL-EHRLICH-INSTITUT, LANGEN

⁴ INSTITUTE FÜR MIKRO AND NANOTECHNOLOGIEN MACRONANO®, TU ILMENAU

A promising strategy to increase the numbers of hematopoietic stem cells (HSCs) for clinical applications, like stem cell transplantation, is offered by advanced *in vitro* culture systems. We developed artificial 3D bone marrow-like scaffolds made of polydimethylsiloxane (PDMS) mimicking the natural HSC niche *in vitro*. These 3D PDMS scaffolds in combination with an optimized culture medium allow the amplification of high numbers of undifferentiated HSCs by activating specific molecular signaling pathways.

DOI: 10.1007/s12268-022-1798-2

© Die Autorinnen und Autoren 2022, korrigierte Publikation 2022

■ Hämatopoetische Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die Kapazität zur unbegrenzten Vermehrung und können in alle Typen von Blutzellen differenzieren und das Blutssystem damit regenerieren [1, 2]. Innerhalb der HSC-Population unterscheidet man zwischen sehr unreifen *long-term* HSCs (LT-HSCs) und bereits determinierten *short-term* HSCs (ST-HSCs) [3]. Im Gegensatz zu den selten vorkommenden LT-HSCs haben ST-HSCs nur ein kurzfristiges Potenzial zur Repopularisierung des Blutsystems und differenzieren schnell weiter in multipotente Progenitorzellen (MPPs) und anschließend in myeloide (MLP) oder lymphoide Progenitorzellen (*common lymphoid progenitor*, CLP) [2]. Da Blutzellen eine begrenzte Lebensdauer haben, müssen sie stetig durch Differenzierung aus HSCs nachgebildet werden, um das hämatopoetische System zu erhalten [1, 2]. Wegen dieser Fähigkeiten werden HSCs auch für Stammzelltransplantationen (*HSC transplantation*, HSCT) eingesetzt, einer Möglichkeit, anderweitig nicht behandelbare Krebserkrankungen – wie beispielsweise chronische oder akute Leukämien – zu thera-

pieren. HSCT wird zudem bei einem breiten Spektrum nicht maligner angeborener oder erworbener Krankheiten, wie schweren Immundefekten (z. B. *severe combined immunodeficiency* und Wiskott-Aldrich-Syndrom), schwer verlaufenden hämatologischen Erkrankungen (z. B. Beta-Thalassämie major und Sichelzellanämie) oder den erworbenen Formen schwerer aplastischer Anämien eingesetzt [4, 5]. Patienten profitieren dabei von hohen Mengen an transplantierten HSCs. Trotz stetiger Weiterentwicklung der HSCT stehen aber oft nicht genügend Stammzellen im Spendermaterial zur Verfügung, was den Erfolg der HSCTs deutlich verringert [2, 4, 5].

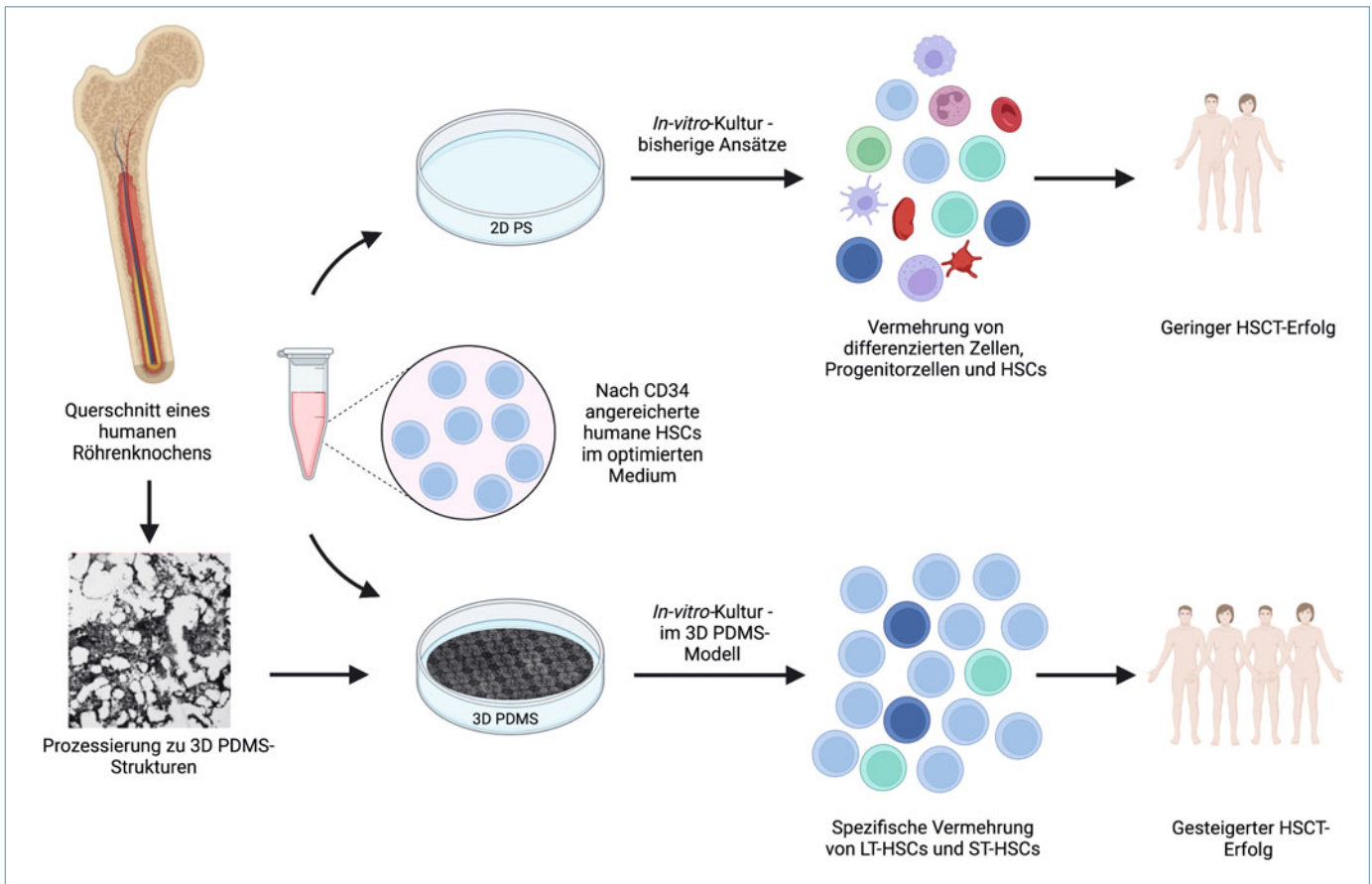
In vitro-Kultivierung humaner HSCs

Eine Möglichkeit diese Hürde zu überwinden, stellt die Nutzung eines *In vitro*-Kultivierungssystems dar, welches die Proliferation von HSCs unter Erhalt ihrer Pluripotenz unterstützt. HSCs lassen sich aus gesunden Spendern aus dem peripheren Blut nach Mobilisierung durch Wachstumsfaktoren, dem Knochenmark (KM) mittels Punktion oder dem Nabelschnurblut gewinnen. Bis zu

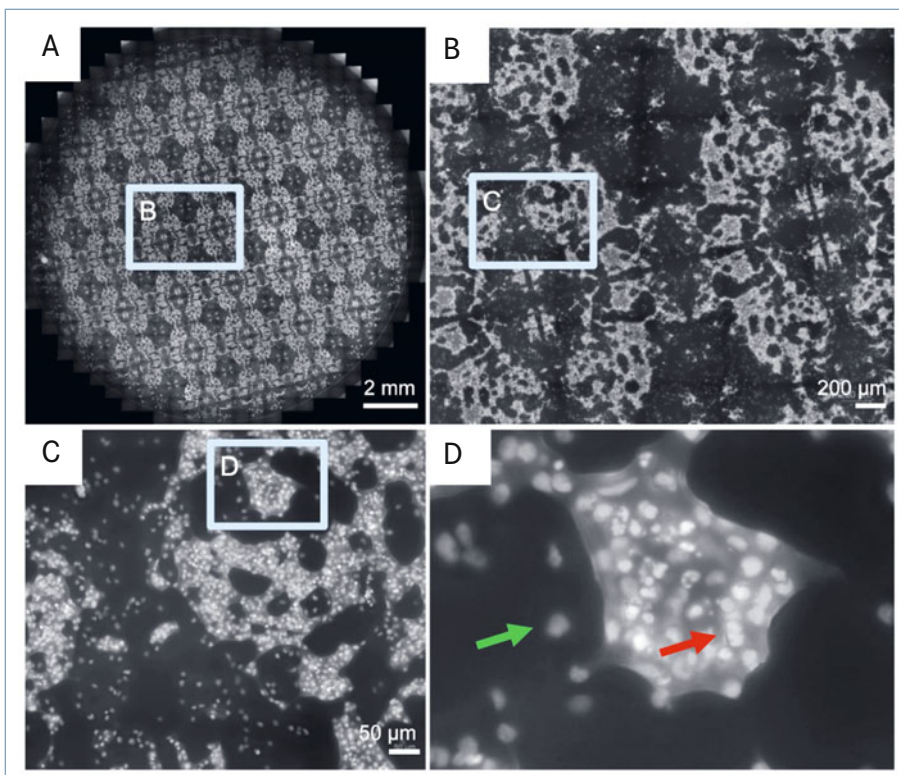
einem gewissen Differenzierungsgrad tragen alle HSC-Subtypen das Antigen CD34 auf ihrer Oberfläche [6]. Daher werden die Transplantate nach der Isolation aus den Spendern anhand dieses Oberflächenmarkers mit HSCs und determinierten Progenitorzellen angereichert. Diese Zellpopulation ist wichtig für eine erfolgreiche und effiziente Repopularisierung nach einer HSCT [4]. *In vivo* sind HSCs adulter Individuen vor allem in der Stammzellnische des menschlichen KMs zu finden, welche erheblichen Einfluss auf die Funktionsweise von HSC hat [2, 7]. Äußere Einflüsse und intrinsische Faktoren, wie beispielsweise molekulare Signalwege, Interaktionen der HSCs mit anderen dort ansässigen Zelltypen, aber auch geometrische und physikalische Gegebenheiten im KM, spielen eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften [2, 8, 9]. *In vitro* teilen sich HSCs selten symmetrisch im Sinne der Selbsterneuerung. Es findet meist eine symmetrische Teilung in zwei Progenitorzellen des blutbildenden Systems oder eine asymmetrische Teilung statt, wodurch neben einer Stammzelle eine spezifische Progenitorzelle generiert wird [2]. Eine vielversprechende Möglichkeit, HSCs unter Beibehaltung ihrer Stammzeleigenschaften *in vitro* zu vermehren, liegt in der Nutzung von dreidimensionalen (3D-) Kultivierungssystemen, welche die Stammzellnische simulieren, um so optimale Bedingungen für eine symmetrische Teilung im Sinne der Selbsterneuerung zu schaffen [2, 10, 11].

3D-PDMS-Strukturen ermöglichen eine effektive HSC *In vitro*-Kultivierung

Um die Stammzellnische *in vitro* nachzuahmen, haben wir künstliche 3D-Strukturen basierend auf dem Querschnitt eines humanen Röhrenknochens aus Polydimethylsiloxan (PDMS) entwickelt [10]. Dazu wurde die Morphologie des KMs analysiert und mittels multiskaliger Gestaltung von Mikro- und Nanotexturen und Polymer-Strukturierungsmethoden direkt auf die biokompatiblen PDMS-Substrate übertragen (**Abb. 1** und **Abb. 2**). Zusätzlich haben wir ein kommer-



▲ **Abb. 1:** Anhand des Querschnitts eines humanen Röhrenknochens wurden künstliche 3D-Strukturen aus Polydimethylsiloxan (PDMS) zur *In vitro*-Kultivierung humaner hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) entwickelt. 3D-PDMS-Strukturen ermöglichen eine effizientere *In vitro*-Expansion von *long term* (LT)- und *short term* (ST)-HSCs als 2D-Polystyrol (PS)-Substrate. Dies ist entscheidend für den Erfolg einer HSC-Transplantation (HSCT). Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.



ziell erhältliches HSC-Kultivierungsmedium durch Zugabe verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren und des Histondeacetylase-Inhibitors Valproinsäure in Analogie zu bereits publizierten Studien optimiert [2, 10, 12]. In Kombination mit den 3D-PDMS-Strukturen konnte somit eine geeignete Möglichkeit geschaffen werden, um humane HSCs während 14-tägiger *In vitro*-Kultivierung zu amplifizieren und gleichzeitig deren Pluripotenz und Fähigkeit zur Selbsterneuerung zu erhalten [10, 11]. Polystyrol (PS) ist momentan das *state-of-the-art*-Material für

◀ **Abb. 2:** Humane HSCs siedeln während der *In vitro*-Kultivierung größtenteils in Vertiefungen der 3D-PDMS-Strukturen (roter Pfeil), aber auch außerhalb (grüner Pfeil). Dargestellt ist die fluoreszenzmikroskopische Analyse DRAQ5™-gefärbter HSCs während der *In vitro*-Kultivierung auf 3D-PDMS-Strukturen. A, Übersicht. B–D, Vergrößerungen der vorigen Teilabbildung. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axio Scan.Z1-Mikroskop gemacht.

alle Bereiche der Zellkultivierung. Wir konnten jedoch zeigen, dass die 3D-PDMS-Kultivierungsstrukturen deutlich besser geeignet sind, um HSCs *in vitro* effektiv zu vermehren als zweidimensionale (2D-) (herkömmliche) Zellkulturplatten. Auch 3D-PS-Strukturen, die analog zu denen aus PDMS anhand der KM-Morphologie hergestellt wurden, erwiesen sich als nicht zielführend (Abb. 1, [10, 11]).

Molekulare Signalwege beeinflussen den Stammzellerhalt *in vitro*

Analysen mittels Durchflusszytometrie zeigten, dass eine Beschichtung der 3D-PDMS-Strukturen mit Siliziumoxid (SiOn) zur Steigerung der Oberflächenhydrophilie zwar die Ausbeuten an HSCs weiter anheben konnte, jedoch wurde die Subfraktion der unreifen LT-HSCs am besten auf unbeschichteten 3D-PDMS vermehrt. In diesem Zusammenhang konnten wir beobachten, dass HSCs während der *In vitro*-Kultivierung innerhalb der Vertiefungen der 3D-PDMS-Strukturen wuchsen und sich vermehrten (Abb. 2, [10]). Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, dass nahezu alle Zellen innerhalb der Vertiefungen der 3D-PDMS-Strukturen den Oberflächenmarker CD34 exprimierten (Abb. 3). Die SiOn-Beschichtung begünstigte das Zellwachstum nicht nur innerhalb, sondern auch außerhalb sowie an den Wänden der Kavitäten. Zellen, die außerhalb wuchsen, hatten jedoch deutlich weniger oder gar kein CD34-Signal [10]. Die SiOn-beschichteten 3D-PDMS-Strukturen schienen also das Wachstum der HSCs stärker anzuregen als die unbeschichteten Strukturen, förderten aber gleichzeitig deren Differenzierung. Damit übereinstimmend wurden in *colony forming unit* (CFU) Assays die meisten unreifen Kolonien von HSCs gebildet, die zuvor auf unbeschichteten 3D-PDMS-Strukturen kultiviert wurden [10, 11]. Proteom- und Transkriptomanalysen der HSCs, die 14 Tage auf unbeschichteten 3D-PDMS-Strukturen kultiviert wurden, zeigten Veränderungen des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, einhergehend mit einer Aktivierung von *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP)-, *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF1 α)- und *forkhead box O* (FOXO)-vermittelten Signalwegen. Weitere Analysen zeigten, dass HSCs, die auf 3D-PDMS kultiviert wurden, dadurch bedingt eine geringere mitochondriale Respiration, dafür aber einen gesteigerten Glucose- und

Cholesterinstoffwechsel hatten [11]. Diese Aktivierung kann eine Expansion von HSCs begünstigen und ihre Stammzeleigenschaften erhalten [13]. Die SiOn-Beschichtung der 3D-PDMS-Strukturen hingegen führte zu einer proinflammatorischen Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, einer deutlich schwächeren Aktivierung von SREBP-, HIF1 α - und FOXO-Signalwegen und dadurch zu geringeren Ausbeuten an LT-HSCs [11]. Zusammenfassend konnte durch die Kombination biotechnologischer sowie zell- und molekularbiologischer Ansätze die *In vitro*-Kultivierung humaner HSCs durch unsere 3D-PDMS-Strukturen optimiert werden. Die Anwendung dieser *in vitro* amplifizierten HSCs *in vivo* steht noch aus, könnte aber in Zukunft helfen, ein großes Problem der Transplantationsmedizin zu lösen.

Danksagung

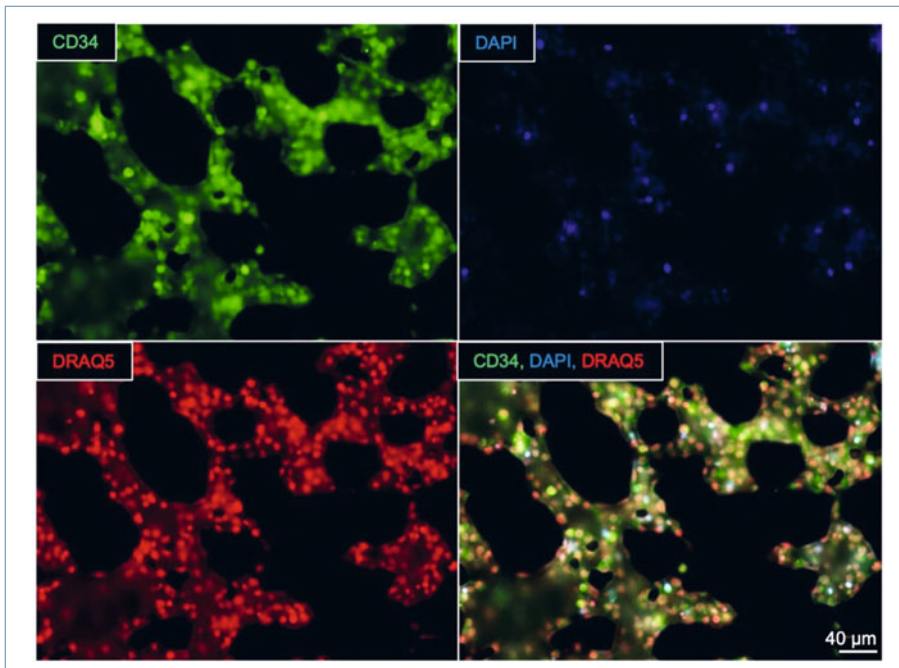
Die Autoren bedanken sich bei Prof. Dr. Zhao-Qi Wang und Dr. Jürgen Sonnemann für hilfreiche Diskussionen und ihre Unterstützung. Dieses Projekt wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (VIP+, 03VP00592) und die Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e. V. (DJCLS R 13/18) unterstützt. Lisa Marx-Blümel wurde durch ein Stipendium der Graduierten-Akademie der Friedrich-Schiller-Universität Jena gefördert. ■

Literatur

- [1] Prochazkova M, Chavez MG, Prochazka J et al. (2015) Embryonic versus adult stem cells. In: Vishwakarma A, Sharpe P, Songtao S, Ramalingam M (Hrsg.) Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences. Elsevier, Cambridge, 249–262
- [2] Walasek MA, Van Os R, De Haan G (2012) Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Ann N Y Acad Sci* 1266: 138–150
- [3] Cheng H, Zheng Z, Cheng T (2020) New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell* 11: 34–44
- [4] Niederwieser D, Baldomero H, Szer J et al. (2016) Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. *Bone Marrow Transplant* 51: 778–785
- [5] Gupta AO, Wagner JE (2020) Umbilical cord blood transplants: current status and evolving therapies. *Front Pediatr* 8: 570282
- [6] Laurenti E, Gottgens B (2018) From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553: 418–426
- [7] Kumar S, Geiger H (2017) HSC niche biology and HSC expansion *ex vivo*. *Trends Mol Med* 23: 799–819
- [8] Zhang P, Zhang C, Li J et al. (2019) The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Res Ther* 10: 327
- [9] Wang Z, Ema H (2016) Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 103: 498–509
- [10] Marx-Blümel L, Marx C, Weise F et al. (2020) Biomimetic reconstruction of the hematopoietic stem cell niche for *in vitro* amplification of human hematopoietic stem cells. *PLoS One* 15 :e0234638

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 3:** Der Stammzellcharakter humaner HSCs bleibt auf 3D-PDMS-Strukturen erhalten. Ein Großteil der Zellen bleibt während der *In vitro*-Kultivierung CD34-positiv und nur wenige Zellen sterben. Dargestellt ist die fluoreszenzmikroskopische Analyse von HSCs, die mit DRAQ5™ (alle Zellen, rot), DAPI (tote Zellen, blau) und einem Anti-CD34-Antikörper (Stammzellmarker, grün) gefärbt wurden. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axio Imager 2 ApoTome-Mikroskop (strukturierte Beleuchtung) gemacht.

- [11] Marx-Blümel L, Marx C, Sonnemann J et al. (2021) Molecular characterization of hematopoietic stem cells after *in vitro* amplification on biomimetic 3D PDMS cell culture scaffolds. *Sci Rep* 11: 21163
- [12] Chaurasia P, Gajzer DC, Schaniel C et al. (2014) Epigenetic reprogramming induces the expansion of cord blood stem cells. *J Clin Invest* 124: 2378–2395
- [13] Kobayashi H, Morikawa T, Okinaga A et al. (2019) Environmental optimization enables maintenance of quiescent hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell Rep* 28: 145–158.e9

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Lisa Marx-Blümel
 Abteilung Hämatologie und Onkologie
 Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
 Universitätsklinikum Jena
 Am Klinikum 1
 D-07747 Jena
 Lisa.Marx-Bluemel@med.uni-jena.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Lisa Marx-Blümel

2009–2015 Studentin der Biochemie/Molekularbiologie und Molecular Medicine an der Universität Jena. 2016–2022 Promotion am Universitätsklinikum Jena (UKJ) in der Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie betreut von Prof. Dr. J. F. Beck. Seit 2022 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am UKJ.



Andreas Schober

Studium der Physik und Promotion. 1994–1997 Gruppenleiter am Institut für Molekulare Biotechnologie, Universität Jena. 1997–2003 Gruppenleiter bei der MERCK KGaA, Darmstadt, und am Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT), Jena. 2002 Habilitation. Ab 2004 an der TU Ilmenau, 2006 zwei Nachwuchsforscherguppen. Seit 2011 Professor für Nanobiosystemtechnik, TU Ilmenau.



Christian Marx

2006–2011 Studium der Biochemie und molekularen Biologie an der Universität Bayreuth. 2011–2015 Promotion an der Universität Jena. 2015–2022 Wissenschaftler/Postdoc am Leibniz-Institut für Altersforschung in Jena. Seit 2019 Habilitation/Dozent an der Universität Jena. Seit 2022 Wissenschaftler am Paul-Ehrlich-Institut in Langen.



James F. Beck

1980–1988 Doppelstudium Humanmedizin/Biochemie an der FU Berlin. 1988 Approbation. 1989 Promotion. 1998 Habilitation. 1999–2007 Professor und Leiter der Pädiatrischen Onkologie/Hämatologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Greifswald. Seit 2007 Professor und Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Jena.