

**Humane Primärzellen als
Feederzellen für die Kokultur mit
hämatopoetischen Stammzellen aus
Nabelschnurblut**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von Angela Susanne Magin

aus Alzenau (Unterfranken)

Bonn, im Mai 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Herzog, Institut für Zellbiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

2. Referent: Prof. Dr. Jahnen-Dechent, IZKF BioMat, RWTH Aachen

Tag der Prüfung: 05.07.2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online

elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2005

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die verwendeten digitalen/digitalisierten Bilder entsprechen den Originalen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Bonn, Mai 2005

(Angela Magin)

„Siehst du, Momo“, sagte Beppo Straßenkehrer, „es ist so: Manchmal hat man eine sehr lange Straße vor sich. Man denkt, die ist so schrecklich lang; das kann man niemals schaffen, denkt man.

Und dann fängt man an, sich zu eilen. Und man eilt sich immer mehr. Jedesmal, wenn man aufblickt, sieht man, dass es gar nicht weniger wird, was noch vor einem liegt. Und man strengt sich noch mehr an, man kriegt es mit der Angst, und zum Schluss ist man ganz außer Puste und kann nicht mehr. Und die Straße liegt immer noch vor einem. So darf man es nicht machen.

Man darf nie an die ganze Straße auf einmal denken, verstehst du? Man muss nur an den nächsten Schritt denken, an den nächsten Atemzug, an den nächsten Besenstrich. Und immer wieder nur an den nächsten.

Dann macht es Freude; das ist wichtig, dann macht man seine Sache gut. Und so soll es sein.

Auf einmal merkt man, dass man Schritt für Schritt die ganze Straße gemacht hat. Man hat gar nicht gemerkt wie, und man ist nicht außer Puste. Das ist wichtig.“

Michael Ende, aus „Momo“

Für meine Eltern, weil ihr mich gelehrt habt, meine Straße mit Mut und Zuversicht zu gehen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Abstract.....	13
2	Einleitung & Theorie	15
2.1	Regeneration von Geweben.....	15
2.2	Stammzellen	16
2.3	Therapeutische Verwendung von Stammzellen.....	21
2.4	Hämatopoetische Stammzellen (HSC)	22
2.5	HSC-Quellen für Transplantationen.....	26
2.6	Expansion von HSC	29
2.7	Potenzielle Feederzellen für HSC.....	32
2.7.1	MSC (Mesenchymal Stem Cells).....	35
2.7.2	HUVEC (Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells)	37
2.7.3	WJC (Wharton's Jelly Cells).....	39
2.8	Erwünschte Eigenschaften potenzieller Feederzellen.....	41
2.9	Problemstellung und Zielsetzung.....	46
2.9.1	Problemstellung	46
2.9.2	Zielsetzung.....	47
3	Material und Methoden.....	51
3.1	Allgemeines.....	51
3.2	Zellkulturmethoden.....	51
3.2.1	Standardkulturbedingungen	51
3.2.2	Medien, Medienzusätze und Zytokine	52
3.2.3	Stammhaltung und Passagieren	54
3.2.4	Kryokonservieren und Auftauen	55
3.2.5	Kokultur von HSC mit Feederzellen.....	56
3.3	Verwendete Primärzellen und Zelllinien.....	58
3.3.1	Primärzellen	58
3.3.2	Murine Stromazelllinien	64

3.4	Analytische Methoden	65
3.4.1	Lichtmikroskopie und Fotografieren.....	65
3.4.2	Zellzahlbestimmung	65
3.4.3	Medienanalytik	68
3.4.4	FACS-basierte Methoden.....	69
3.4.5	Funktionelle Charakterisierung.....	71
4	Ergebnisse	79
4.1	Verfügbarkeit der potenziellen Feederzellen	79
4.1.1	Mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblut (CB-MSC)	79
4.1.2	Mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark (MSC)	81
4.1.3	Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC).....	84
4.1.4	Zellen aus dem Bindegewebe der Nabelschnur (WJC)	86
4.2	Charakterisierung der potenziellen Feederzellen.....	88
4.2.1	Charakterisierung spezifischer Eigenschaften der Feederzellen	88
4.2.2	Immunverträglichkeit der potenziellen Feederzellen.....	101
4.2.3	Kompatibilität der potenziellen Feederzellen zu HSC-Medium	103
4.3	Kokultur von HSC mit potenziellen Feederzellen.....	106
4.3.1	MSC als Feederzellen – Zellzahlverhältnis HSC:Feederzellen	106
4.3.2	Direkter Vergleich aller potenziellen Feederzellen.....	108
5	Diskussion.....	117
5.1	Verfügbarkeit der potenziellen Feederzellen	118
5.1.1	Kriterien.....	118
5.1.2	Mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblut (CB-MSC)	119
5.1.3	Mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark (MSC)	122
5.1.4	Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC).....	125
5.1.5	Zellen aus dem Bindegewebe der Nabelschnur (WJC)	128
5.2	Charakterisierung der potenziellen Feederzellen.....	131
5.2.1	Charakterisierung spezifischer Eigenschaften der Feederzellen	131

5.2.2	Immunverträglichkeit der potenziellen Feederzellen.....	153
5.2.3	Kompatibilität der potenziellen Feederzellen zu HSC-Medium	162
5.3	Kokultur von HSC mit potenziellen Feederzellen	166
5.3.1	MSC als Feederzellen – Zellzahlverhältnis HSC:Feederzellen	166
5.3.2	Direkter Vergleich aller potenziellen Feederzellen.....	168
5.4	Abschließende Beurteilung und Ausblick.....	172
6	Danke	175
7	Anhänge.....	177
7.1	Publikationen.....	177
7.2	Abkürzungen.....	179
7.3	CD-Antigene: Alternativnamen, Funktion & zelluläre Expression.....	181
7.4	Geräte, Materialien und Lösungen	183
7.4.1	Geräte.....	183
7.4.2	Verbrauchsmaterialien	184
7.4.3	Laborchemikalien, Medien etc.....	185
7.4.4	Lösungen	186
7.4.5	Antikörper.....	187
7.4.6	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	188
7.5	Literatur.....	191
7.6	Lebenslauf	205

1 Zusammenfassung/Abstract

Zusammenfassung

Nabelschnurblut stellt eine vielversprechende Alternative zu Knochenmark als Quelle für hämatopoetische Stammzellen (HSC) für Transplantationen dar. Die Anzahl der HSC in Nabelschnurblut ist jedoch begrenzt, so dass ihre Transplantation in erwachsene Patienten bisher kritisch ist. Daher wird eine Möglichkeit benötigt, HSC aus Nabelschnurblut durch *ex vivo*-Kultivierung zu vermehren. Die Kokultur der HSC mit Feederzellen bietet dafür eine gute Möglichkeit, da so die physiologische Umgebung der HSC nachgestellt wird. In bisherigen *in vitro*-Versuchen wurden meist murine Zelllinien als Feederzellen verwendet, die jedoch aufgrund ihrer xenogenen Herkunft in der Klinik problematisch sind. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Suche nach humanen Primärzellen, die als klinisch einsetzbare Feederzellen für die Kokultur mit HSC dienen können. Vergleichend wurden mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells = MSC) aus Nabelschnurblut und Knochenmark, Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (human umbilical cord vein endothelial cells = HUVEC) und Zellen aus dem Bindegewebe der Nabelschnur (Wharton's jelly-cells = WJC) untersucht. Alle potenziellen Feederzellen wurden besonders im Hinblick auf ihren möglichen klinischen Einsatz geprüft. Die Untersuchungsparameter waren hierbei u.a. die Verfügbarkeit der Feederzellen, ihre Unterscheidung von HSC und davon abgeleiteten Blutzellen, ihr Überleben in einem klinisch einsetzbaren, für HSC optimierten Medium, die durch sie hervorgerufene Aktivierung allogener T-Zellen sowie ihre Fähigkeit zur Unterstützung des Wachstums von HSC. Es konnte belegt werden, dass alle potenziellen Feederzelltypen für die Kokultur mit HSC im klinischen Einsatz prinzipiell tauglich sind. Besonders hervorzuheben ist die gute Unterstützung der Expansion von hämatopoetischen Vorläuferzellen durch alle getesteten potenziellen Feederzellen, vor allem die Unterstützung der CAFC-Expansion durch MSC und WJC. Zusätzlich zeigte sich, dass WJC aufgrund ihrer einfachen Gewinnung und hohen Proliferationsraten möglicherweise auch für andere zelltherapeutische Anwendungen eingesetzt werden könnten.

Abstract

Umbilical cord blood is a promising source for hematopoietic stem cells (HSC) that can be used as an alternative to bone marrow. As the number of HSC in umbilical cord blood is limited, transplantation in adults is currently still a critical issue. Thus, a possibility to expand HSC from umbilical cord blood via *ex vivo*-cultivation is needed. For this, co-culture of HSC with feeder cells is a good possibility, because this mimicks the physiological environment of HSC. Up to now, most *in vitro*-studies used murine cell lines as feeder cells which poses problems for clinical application because of their xenogenic origin. To overcome these, this work aims to provide and compare several human primary cell types as alternative feeder cells. Namely, mesenchymal stem cells (MSC) from bone marrow and umbilical cord blood, human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) and cells from the umbilical cord matrix tissue (Wharton's jelly-cells = WJC) were included. All these potential feeder cells were tested mainly with respect to their possible clinical application. The parameters used were e.g. availability of the potential feeder cells, their distinction from HSC and other hematopoietic cells derived from these, the feeder cells' survival in a clinically applicable culture media optimised for use with HSC, the activation of allogeneic T-cells and the support for HSC-expansion by the potential feeder cells. It could be shown that all potential feeder cell types might be used in a clinical setup. Hereby, their good support for expansion of hematopoietic progenitors is of paramount importance. Especially MSC and WJC supported the expansion of CAFC to a high extent. Additionally, WJC demonstrated potential for other cell therapeutic applications because of their easy isolation and high proliferation rates.

2 Einleitung & Theorie

2.1 Regeneration von Geweben

Während des ganzen Lebens eines mehrzelligen Organismus spielt die Geweberegeneration eine große Rolle: Beschädigte und gealterte Zellen müssen durch neue ersetzt werden, um die Funktionalität der Gewebe aufrechtzuerhalten. Bei einigen Tieren ist die Regenerationsfähigkeit besonders stark entwickelt. So werfen z.B. Eidechsen, wenn sie in Gefahr geraten, ihren Schwanz ab, um sich zu schützen. Der verlorene Schwanz wächst wieder nach. Auch Seesterne können abgeworfene Arme ersetzen, und Krebse regenerieren Extremitäten, die sie als Notreaktion abgeworfen haben, bei ihren nächsten Häutungen (Campbell N. A. und Reece J. B., 2003). Salamander sind sogar dazu in der Lage, neben ihrem Schwanz auch Beine, Augen, den Kiefer und das Herz zu regenerieren (Tanaka E. M., 2003). Säugetiere wie der Mensch dagegen besitzen solch komplexe Regenerationsvorgänge nicht. Geweberegeneration beschränkt sich auf einzelne Gewebe, wie z.B. das Blut, dessen Zellen fortlaufend erneuert werden. Auch die menschliche Leber kann sich, selbst wenn 2/3 davon entfernt werden, innerhalb von 2 Wochen wieder vollständig regenerieren (Presnell S. C. *et al.*, 2002).

Warum ist die Regenerationsfähigkeit bei den Säugern anders als bei anderen Tieren so beschränkt? Bei Tieren, die Glieder regenerieren, bildet sich an der Stelle, an der sich die Verletzung befindet, zunächst eine Zone von Vorläuferzellen, das so genannte Blastem (Tanaka E. M., 2003). Dieses liegt unter der Haut, die die Wunde zunächst verschließt, und bildet alle Gewebe, die zur Neuentstehung des fehlenden Körperteils notwendig sind. Vermutlich spielt bei der Entstehung des Blastems die Dedifferenzierung von Zellen eine große Rolle, d.h. die Zellen, die das Blastem bilden, verlieren ihren differenzierten Status. Dadurch können sie sich zu Zellen anderer Gewebe als dem ihrer Herkunft neu

differenzieren. Die Untersuchungen dieser Vorgänge auf molekularer und zellulärer Ebene stehen jedoch erst am Anfang.

Bei Säugern dagegen findet keine Blastembildung statt. Geweberegeneration im ausgewachsenen Organismus erfolgt durch so genannte Stamm- und Vorläuferzellen, die spezifisch das Gewebe ihrer Herkunft regenerieren können (Blau H. M. *et al.*, 2001). Ein bekanntes Beispiel sind die hämatopoetischen Stammzellen (HSC), die während des ganzen Lebens eines Organismus dafür sorgen, dass immer ausreichend reife Blutzellen jedes Typs zur Verfügung stehen (Morrison S. J. und Weissman I. L., 1994).

2.2 Stammzellen

Stammzellen werden anhand von vier Kriterien definiert (Verfaillie C. M. *et al.*, 2002-1):

1. die Fähigkeit der Stammzelle zu multiplen aufeinander folgenden Teilungen, wodurch sich die Zelle selbst erneuert,
2. die Fähigkeit einzelner Tochterzellen der Stammzelle, sich zu mehr als einem Zelltyp zu entwickeln,
3. die Fähigkeit der Stammzellen, das Gewebe ihrer Herkunft funktionell zu repopulieren, wenn sie in einen Empfängerorganismus transplantiert werden, in dem dieses beschädigt ist, und
4. die Fähigkeit der Stammzellen, in einem Empfängerorganismus komplett ausdifferenzierte Zellen des Herkunftsgewebes zu bilden, selbst wenn dieses nicht beschädigt ist.

Im allgemeinen Gebrauch gelten die beiden ersten Kriterien als ausreichend für die funktionelle Definition einer Stammzelle. Jedoch hat gerade auf dem Gebiet der Zelltherapie auch das dritte Kriterium eine wichtige Bedeutung. Mittlerweile sind Stammzellen in vielen embryonalen und adulten Geweben von Säugern beschrieben worden (s.u.). Um ihre Herkunft zu verstehen, muss man vom Ursprung der Embryonalentwicklung ausgehen, der

befruchteten Eizelle (Zygote). Wenn diese sich zu teilen beginnt, sind die bei den ersten Teilungen daraus entstehenden Zellen totipotent, d.h. jede einzelne dieser Zellen ist in der Lage, einen kompletten Organismus auszubilden, wenn die geeignete Unterstützung, wie z.B. im Mutterleib, vorhanden ist (Verfaillie C. M. *et al.*, 2002-1). Das Konzept der Totipotenz wurde durch Versuche an Seeigelembryonen bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts etabliert: Wurden die Zellen (= Blastomeren) eines frühen Embryos voneinander getrennt, bildete sich aus jeder Einzelzelle ein vollständiges Tier (Hennig W., 1998). Bei der Maus existieren vergleichbare totipotente Zellen bis zum 8-Zell-Stadium (Verfaillie C. M. *et al.*, 2002-1).

Im Verlauf der Teilungen verlieren die Zellen die Totipotenz, während die aus der Zygote entstandenen Zellen beginnen, sich zu spezialisieren. Im Blastozystenstadium, beim Menschen etwa am 4. – 5. Tag nach der Befruchtung, bilden sich eine innere und eine äußere Zellmasse heraus (Sadler T. W., 1998). Aus Letzterer entwickeln sich später die Versorgungsgewebe, der so genannte Trophoblast, aus dem die Plazenta entsteht. Die innere Zellmasse wird zum Embryo. Dessen Zellen sind im Blastozystenstadium pluripotent, d.h. sie können sich zu allen Geweben des entstehenden Körpers entwickeln. Entnimmt man die Zellen aus Embryonen dieses Entwicklungsstadiums und kultiviert sie unter geeigneten Bedingungen, behalten sie diese Fähigkeit bei und lassen sich außerdem für unbegrenzte Zeit in Kultur halten (Burdon T. *et al.*, 2002). Die so gewonnenen Zellen bezeichnet man als embryonale Stammzellen (embryonic stem cells = ESC). ESC aus Mäusen sind bereits seit 30 Jahren bekannt, wie in einem Übersichtsartikel von Moreadith R. W. und Radford N. B., 1997, erwähnt wird. Sie ermöglichten u.a. die Entwicklung der Knock-out-Maus-Technologie. Die Gewinnung humaner ESC wurde dagegen erst 1998 beschrieben (Shamblott M. J. *et al.*, 1998, Thomson J. A. *et al.*, 1998). Aufgrund der Tatsache, dass man für ihre Präparation Embryonen zerstören muss, ist die Forschung an humanen ESC sehr umstritten.

Bei der weiteren Entwicklung des Embryos differenzieren seine Zellen immer weiter aus und verlieren die Pluripotenz. Jedoch findet man auch im erwachsenen Organismus noch Stamm- und Vorläuferzellen, die dazu dienen, zerstörte Zellen zu ersetzen sowie in Geweben mit hoher Erneuerungsrate wie etwa der Haut oder dem blutbildenden System für den nötigen Erhalt der Zellzahl zu sorgen (Homöostase) (Blau H. M. *et al.*, 2001). Sie werden als adulte Stammzellen (adult stem cells = ASC) bezeichnet. ASC besitzen keine Pluripotenz mehr, sondern lediglich die Differenzierungsfähigkeit zu einem (Unipotenz) bis wenigen reifen Zelltypen (Multipotenz; Stocum D. L., 2001). Neben den bereits seit langer Zeit bekannten HSC sind in letzter Zeit auch Stammzellen in anderen Organen bzw. Geweben beschrieben worden. So sind sowohl die Satellitenzellen des Muskels als auch die Ovalzellen der Leber Stammzellen dieser Gewebe, und auch in der Epidermis, im Darm und Gehirn existieren Stammzellen (Stocum D. L., 2001). Man geht davon aus, dass im adulten Organismus eine strenge Hierarchie der Zellen herrscht (Blau H. M. *et al.*, 2001, Abbildung T-1): Die Stammzellen stellen durch Teilungen Vorläuferzellen zur Verfügung, die nicht mehr die volle Differenzierungsfähigkeit der ursprünglichen Stammzelle aufweisen. Gleichzeitig erneuern sich die Stammzellen durch Teilung selbst. Aus den sich weiter teilenden Vorläuferzellen entstehen unter weiterer Ausdifferenzierung schließlich die reifen, nicht mehr teilungsfähigen Zellen, die zur Regenerierung des Gewebes nötig sind.

Stammzellen scheinen jedoch nicht nur bei physiologischen Regenerationsvorgängen, sondern auch bei der Krebsentstehung beteiligt zu sein. Erstmals wurde dieses Prinzip bereits im Jahr 1958 gezeigt, indem seriell verdünnte Leukämiezellen aus der Maus in Empfängertiere transplantiert wurden. Dabei war lediglich jede 4. Zelle in der Lage dazu, beim Empfänger eine Leukämie zu induzieren, wie einem Übersichtsartikel von Presnell S. C. *et al.*, 2002). Heute ist das Konzept von der so genannten „Krebsstammzelle“ wieder sehr aktuell. Tumorstammzellen konnten nicht nur für Leukämien (Bonnet D. und Dick J. E., 1997, Wang J. C. *et al.*, 1998), sondern auch für Tumoren der Brust (Al-Hajj M. *et al.*, 2003) und des Gehirns (Singh S. K. *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. Ähnlich wie normale

Körperzellen scheinen also auch Krebszellen in hierarchischer Weise organisiert zu sein (Reya T. *et al.*, 2001), die Regenerierung von Tumoren findet analog zur Regenerierung gesunder Gewebe statt.

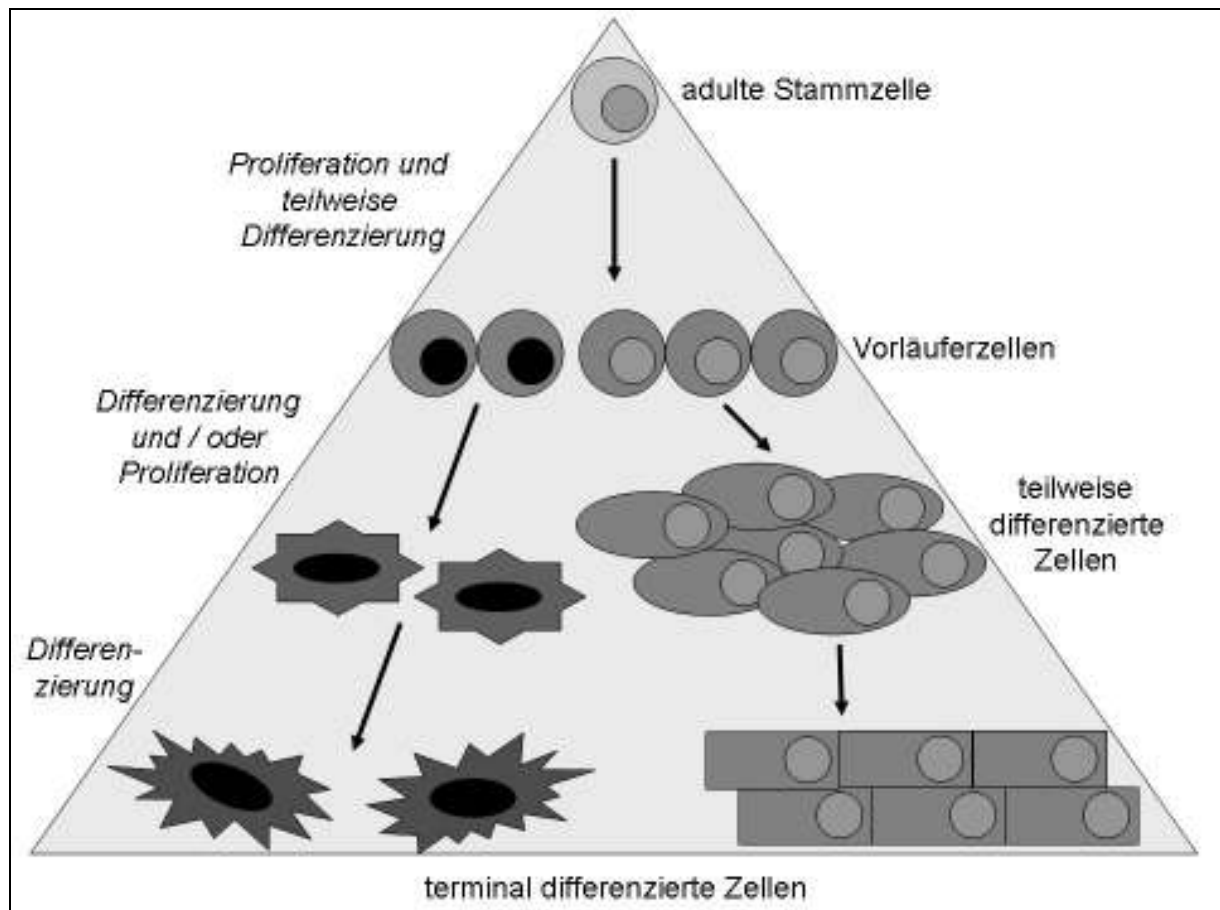


Abbildung T-1: Hierarchie der Stamm- und Vorläuferzellen im adulten Säuger

In Kultur gehalten haben ASC nur ein begrenztes Selbsterneuerungspotenzial, das sich u.a. darauf zurückführen lässt, dass sie weniger Telomerase exprimieren als ESC (Verfaillie C. M. *et al.*, 2002-1). Telomerase ist ein Enzym, das die Enden der Chromosomen, die durch wiederholte Zellteilungen nach und nach kürzer werden, erneuert und dadurch die Zelle vor genetischen Schädigungen schützt. Es erweist sich zudem immer wieder als schwierig, geeignete Kulturbedingungen für ASC zu finden, die nicht zur Ausdifferenzierung der Zellen führen (Presnell S. C. *et al.*, 2002). Auch das Entwicklungspotenzial von ASC ist begrenzt. Bisher war die geltende Lehrmeinung, dass ASC lediglich zu Zelltypen differenzieren können, die der selben Keimschicht angehören, aus der sie selber stammen (Ektoderm,

Endoderm, Mesoderm), häufig sogar nur zu Zellen ihres konkreten Ursprungsgewebes. Vor kurzem wurde jedoch gezeigt, dass möglicherweise auch in adulten Organismen Stammzellen existieren, die über die Keimblattgrenzen hinweg zu vielen oder sogar allen Zelltypen des Körpers differenzieren können (Transdifferenzierung), wenn sie in eine Blastozyste injiziert werden (Jiang Y. *et al.*, 2002). Diese so genannte „Plastizität“ von ASC wird momentan sehr kontrovers diskutiert. Es besteht sogar die Forderung, die Bezeichnung „Stammzelle“ statt für einen jeweils bestimmten Zelltyp eher für ein funktionelles Programm zu verwenden, das von verschiedenen Zelltypen ausgeführt werden kann, ähnlich der Apoptose (Blau H. M. *et al.*, 2001).

Zugleich ist jedoch ungeklärt, worauf die beobachteten Transdifferenzierungsphänomene beruhen. Verschiedene Modelle bieten Erklärungsmöglichkeiten (Verfaillie C. M. *et al.*, 2002-1): Zum einen ist es möglich, dass tatsächlich nicht Transdifferenzierung im eigentlichen Sinn stattfindet, sondern lediglich eine Fusion der Stammzellen mit Gewebezellen, wodurch sie deren Funktionalität annehmen. Die Fusion adulter und fetaler Stammzellen mit ESC wurde beispielsweise *in vitro* bereits nachgewiesen (Terada N. *et al.*, 2002, Ying Q. L. *et al.*, 2002). Andererseits könnte die Transdifferenzierung, die beobachtet wurde, darauf beruhen, dass sich gewebespezifische Stammzellen im Körper in verschiedenen Organen befinden und so z.B. Leberregeneration durch im Knochenmark vorhandene leberspezifische Stammzellen stattfindet (Verfaillie C. M. *et al.*, 2002-1). Eine weitere alternative Interpretation ist, dass durch das Einbringen von Stammzellen aus ihrer spezifischen in eine andere Nische eine Dedifferenzierung gefolgt von einer Redifferenzierung in eine neue Richtung einsetzt, analog zu den Vorgängen beim Kerntransfer beim Klonen von Eukaryoten. Schließlich muss auch noch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass selbst im adulten Organismus einige wenige Stammzellen aus frühen Embryonalstadien persistieren, die ihrerseits Vorläufer für die bekannten adulten Stammzellen sind, und die dokumentierte Entwicklung „über die Keimblattgrenzen“ von diesen primitiveren Zellen ausgeht.

2.3 Therapeutische Verwendung von Stammzellen

Für die Medizin stellen Stammzellen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Geweberegeneration eine sehr interessante therapeutische Option dar. Verschiedene Möglichkeiten der Stammzelltherapie wären denkbar (Stocum D. L., 2001): So könnten z.B. Stammzellen oder daraus entstandene Zellen transplantiert werden. Alternativ könnten Stammzellen dazu verwendet werden, *in vitro* Gewebe zu konstruieren (tissue engineering), die dann transplantiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre es, im Körper befindliche Stammzellen dazu anzuregen, zu proliferieren und differenzieren und so das beschädigte Gewebe zu ersetzen. Auf allen diesen Gebieten ist heute noch viel Forschungs- und Entwicklungsarbeit erforderlich, bevor daraus entwickelte Therapien in der klinischen Routine eingesetzt werden können. Bis heute sind erst wenige klinische Studien zur Stammzelltherapie durchgeführt worden, die meisten Ergebnisse kommen aus Tierversuchen. Eine der wenigen klinischen Studien, die bisher durchgeführt wurde, ist die Behandlung von Osteogenesis imperfecta mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus Knochenmark (Horwitz E. M. *et al.*, 2002). In dieser Studie konnte bei den behandelten Kindern eine Verringerung der Anzahl der Knochenbrüche und ein gesteigertes Wachstum erzielt werden.

Eine Art der Stammzelltherapie wird jedoch bereits seit langer Zeit in der Klinik erfolgreich angewendet, nämlich die Transplantation von HSC. Seit den ersten erfolgreichen Knochenmarkstransplantationen in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts werden HSC-Transplantationen zur Therapie zahlreicher Erkrankungen eingesetzt, sowohl bei malignen Erkrankungen wie Leukämien als auch bei nichtmalignen Erkrankungen wie angeborenen Immunschwächen oder Stoffwechseldefekten (Kaufman R. L. *et al.*, 2004). Die Blutstammzelltransplantation ist mittlerweile in der Klinik fest etabliert. So erhält beispielsweise das Zentrale Knochenmarkspender-Register Deutschland (ZKRD, www.zkrd.de) jedes Jahr Anfragen von rund 1.500 deutschen Patienten und über 10.000 Patienten aus dem Ausland, für die ein Stammzellspender gesucht wird. Jährlich werden vom ZKRD etwa 1.500 Blutstammzellentnahmen von deutschen Spendern vermittelt.

2.4 Hämatopoetische Stammzellen (HSC)

Die Bildung von Blutzellen beginnt im Mausembryo an Tag 7,5 (Kondo M. *et al.*, 2003). Zu diesem Zeitpunkt findet sie im Dottersack statt. Später verlagert sie sich in die Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region, dann in die Leber, die um Tag 12 der Embryonalentwicklung den Hauptanteil an der Hämatopoese hat. Von dort aus migrieren die blutbildenden Zellen ca. an Entwicklungstag 16 – 17 ins Knochenmark, wo sie sich ansiedeln. Das Knochenmark übernimmt dann die Aufgabe der Blutbildung im ganzen adulten Leben des Organismus. Auch beim Menschen findet die Entstehung und Verlagerung der Hämatopoese auf ähnliche Weise statt. Beim Erwachsenen beschränkt sich die Blutbildungsaktivität zu mehr als 95 % auf das Knochenmark (Mayani H. *et al.*, 1992).

Dort befinden sich HSC in Nachbarschaft zu so genannten „stromalen Zellen“ sowie in einer komplexen extrazellulären Matrix. Letztere setzt sich vorwiegend aus Kollagen, aber auch Fibronectin, Laminin und Glykosaminoglykanen zusammen (Dorshkind K., 1990). Zu den zellulären Bestandteilen des Knochenmarkstromas gehören u.a. Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und Adipozyten, die genaue physiologische Identität der Stammzellnische, in der sich die HSC im Knochenmarkstroma befinden, ist jedoch ungeklärt (Taichmann R. S., 2005). Aktuelle Studien lassen jedoch beispielsweise die Beteiligung von Osteoblasten an deren Bildung vermuten (Calvi L. M. *et al.*, 2003, Visnjic D. *et al.*, 2004).

Obwohl HSC die Versorgung mit Blutzellen während des ganzen Lebens sicherstellen, ist es bis heute noch nicht gelungen, im humanen System die ursprünglichsten HSC zu definieren und ihre Anzahl experimentell zu bestimmen. Verschiedene Kriterien sind dafür angewendet worden, darunter die Selektion anhand von Oberflächenantigenen. Das am häufigsten als Selektionskriterium verwendete Antigen auf HSC ist CD34, ein Sialomucin, das eine Rolle bei der Adhäsion von HSC an die stromale Umgebung spielen könnte (Kondo M. *et al.*, 2003). Die genaue Funktion des Moleküls ist jedoch noch ungeklärt. Nicht alle HSC sind CD34-positiv, sondern es finden sich auch unter den CD34-negativen Zellen HSC (Verfaillie

C. M., 2002-2). Eventuell stellen die CD34-negativen HSC sogar den primitiveren Zelltyp dar, so wurde z.B. festgestellt, dass CD34-negative HSC begannen CD34 zu exprimieren, wenn sie in Kultur proliferierten (Dooley D. C. *et al.*, 2004). Die Expression von CD34 scheint reversibel zu sein: Nach Transplantation von CD34-negativen HSC in präimmune Schafembryonen konnten in den Tieren auch CD34-positive HSC gefunden werden und umgekehrt (Guo Y. *et al.*, 2003). Die CD34-negativen HSC wiesen jedoch die höhere Repopulierungsaktivität auf. Zudem wird CD34 auch auf bereits teilweise differenzierten Vorläuferzellen gefunden (Verfaillie C. M., 2002-2).

Ein alternativer Positivmarker für HSC ist CD133 (Kobari L. *et al.*, 2001). Zellen, die anhand dieses Oberflächenmarkers aus Nabelschnurblut isoliert worden waren, zeigten in der genannten Studie bei der Expansion vergleichbare Ergebnisse wie CD34-positive Zellen, auch im Bezug auf ihren Vorläuferzellgehalt und das Differenzierungspotenzial. Andere allgemein anerkannte Eigenschaften von HSC sind die Abwesenheit von Antigenen, die für verschiedene Blutzelltypen spezifisch sind („lineage-negativ“) oder auch die Fähigkeit, den Farbstoff Hoechst-33342 auszuschleusen, wodurch sie bei FACS-Messungen als negative „Side Population“ erscheinen (Verfaillie C. M., 2002-2).

Auch über verschiedene experimentelle Systeme können HSC zumindest retrospektiv definiert werden (Abbildung T-2). Beispielsweise wird ihre Fähigkeit zur Bildung klonogener Kolonien in einem semisoliden Medium häufig als Kriterium herangezogen (in der vorliegenden Arbeit bezeichnet als colony-forming cells = CFC). Die so definierten Zellen stellen jedoch keine HSC dar, sondern eher hämatopoetische Vorläuferzellen (Ploemacher R. E., 1997). HSC sind zwar mit diesem experimentellen System ebenfalls detektierbar, ihre Frequenz ist jedoch viel geringer als die der Vorläuferzellen. Mit dem CFC-Assay können mehrere Vorläuferzelltypen anhand der Morphologie der von ihnen gebildeten Kolonien unterschieden werden: Erythrozyten-Vorläufer (burst-forming units-erythrocyte = BFU-E), Granulozyten-Vorläufer (colony-forming units-granulocyte = CFU-G), Makrophagen-Vorläufer

(CFU-M), Vorläufer von Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM) sowie Vorläufer von Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten und Makrophagen (CFU-GEMM).

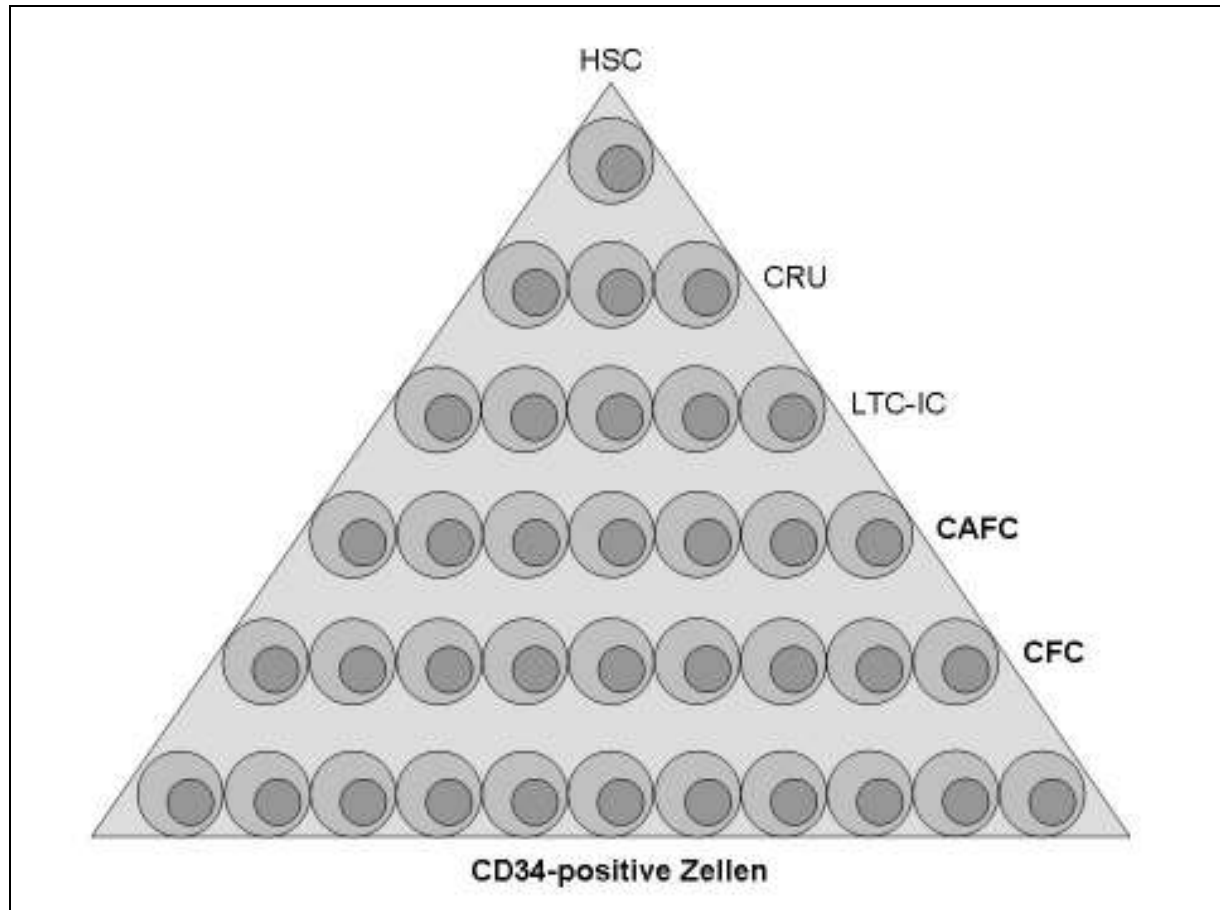


Abbildung T-2: Einstufung von HSC und deren Vorläuferzellen anhand verschiedener experimenteller Systeme – fett gedruckt: im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Kriterien

Ein anderes *in vitro*-System zur Evaluation der HSC-Anzahl ist der so genannte LTC-Assay (LTC = long-term culture; Sutherland H. J. und Eaves C., 1994). Bei diesem Versuchsaufbau werden die Zellen, deren Gehalt an HSC untersucht werden soll, mit steigender Verdünnung auf einer Feederzellschicht aus stromalen Zellen ausgesät und über mehrere Wochen kultiviert. Anschließend werden die Zellen geerntet und im bereits beschriebenen CFC-Assay ausgesät. Die auf diese Weise nachgewiesenen Zellen werden als LTC-IC (long-term culture initiating cells) bezeichnet und stellen sehr primitive hämatopoetische Vorläufer dar.

Vereinfachend kann man bei dieser Methode auch direkt die Anzahl der so genannten CAFC (= cobblestone-area forming cells) auswerten, was zuerst für HSC der Maus beschrieben wurde (Ploemacher R. E. *et al.*, 1989, Ploemacher R. E., 1997). CAFC sind nach mehrwöchiger Kultur (wie für den LTC-IC-Assay beschrieben) als Kolonien eng nebeneinandersitzender runder Zellen, die einem Kopfsteinpflaster ähneln, sichtbar. Eine kürzlich veröffentlichte Studie (Denning-Kendall P. *et al.*, 2003-1) konnte jedoch zeigen, dass die so nachgewiesenen CAFC nicht die selbe Zellpopulation repräsentieren wie LTC-IC: die Frequenz von CAFC ist deutlich höher als die von LTC-IC. Daher geht man davon aus, dass CAFC zwar immer noch frühe hämatopoetische Vorläuferzellen repräsentieren, LTC-IC aber der primitivere Zelltyp sind.

Auch im Tiermodell lässt sich die Frequenz von HSC in einer Probe untersuchen. So können humane Zellen in immundefiziente Mäuse (NOD/SCID = nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency) injiziert werden, deren eigenes blutbildendes System zuvor durch Bestrahlung zerstört wurde (Conneally E. *et al.*, 1997). Die Frequenz der Zellen, die das hämatopoetische System repopulieren können, wird dabei durch steigende Verdünnung der Zellen bestimmt. In diesem experimentellen System können zwar nicht direkt die Frequenzen von HSC ermittelt werden, die das humane hämatopoetische System repopulieren würden. Dennoch stellen die auf diese Weise definierten CRU (= competitive repopulating units) vermutlich die primitivsten experimentell nachweisbaren humanen hämatopoetischen Vorläufer dar. Zusätzlich erlaubt dieses experimentelle System auch eine Aussage zur Funktionalität der Zellen im Körper des Empfängers, was bei den *in vitro*-Systemen nicht der Fall ist.

Trotz dieser Kontroversen zur Identifizierung der humanen HSC wurden diese für die vorliegende Arbeit anhand ihrer CD34-Expression definiert, weil diese einen guten Anhaltspunkt für die Stammzellidentität der Zellen und zudem eine gängige klinisch angewandte Möglichkeit zu deren Isolation über Antikörper bietet.

Definition:

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten steht der Begriff „hämatopoetische Stammzelle“ (HSC) für Blutzellen, die anhand ihrer Expression des Oberflächenmarkers CD34 aufgereinigt wurden, auch wenn dieses Kriterium allein nicht ausreichend für den Beweis des Stammzellstatus einer Zelle ist.

Zur Untersuchung der Frequenz von hämatopoetischen Vorläuferzellen in Proben wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit der CFC- und der CAFC-Assay eingesetzt. Diese Systeme wurden ausgewählt, weil sie einfach anzuwenden sind und in relativ kurzer Zeit eine verlässliche Aussage erlauben.

2.5 HSC-Quellen für Transplantationen

Für Stammzelltransplantationen werden zumeist Zellpräparate verwendet, die nicht nach stammzellspezifischen Markern selektiert wurden, sondern eine heterogene Population darstellen. Die älteste bekannte HSC-Quelle für Transplantationen ist Knochenmark, das bereits seit den 1960er Jahren in der Klinik zu diesem Zweck eingesetzt wird (Kaufman R. L. *et al.*, 2004). Seit der Mitte der 1980er-Jahre werden auch HSC verwendet, die aus Wachstumsfaktor-mobilisiertem peripherem Blut stammen und mittels Apherese gewonnen werden (ebenda). HSC aus dieser Quelle werden mittlerweile immer häufiger verwendet und könnten eventuell die klassische Knochenmarktransplantation ablösen. 1989 wurde die erste Transplantation von Nabelschnurblut-HSC bei einem Patienten mit Fanconi-Anämie durchgeführt (Gluckman E. *et al.*, 1989) und damit gezeigt, dass auch dieses als Quelle für HSC dienen kann. Vor allem aufgrund der einfachen Verfügbarkeit wird Nabelschnurblut heute gerne für Transplantationen eingesetzt. Über 4.000 Transplantationen von Nabelschnurblut wurden weltweit bereits durchgeführt (Ballen K. K., 2005). Doch kann Nabelschnurblut wirklich die herkömmlichen Stammzellquellen ersetzen? In Tabelle T-1

findet sich ein Vergleich der Eigenschaften der genannten Stammzellquellen, der darüber Aufschluss geben soll.

Tabelle T-1: Vergleich unterschiedlicher HSC-Quellen für Transplantationen (adaptiert aus Kaufman R. L. et al., 2004)

Stammzellquelle	Knochenmark	mobilisiertes peripheres Blut	Nabelschnurblut
Schmerz/ Beeinträchtigung des Spenders	Eingriff unter Vollnarkose erforderlich	Wachstumsfaktor-injektionen sowie lange (3 – 6 h) Apherese-prozedur	schmerzfrei
Risiko des Spenders	Risiken von Vollnarkose und Operation	Nebenwirkungen der Wachstumsfaktoren und Apherese-risiko	risikofrei
Toleranz von HLA-Nicht-übereinstimmungen	gering	gering	höher
Dauer bis zur Identifizierung eines geeigneten Spenders	2 – 6 Monate	2 – 6 Monate	weniger als 1 Monat
GVHD-Risiko	höher	am höchsten	niedriger
Risiko von Infektionen im Transplantat	höher	höher	niedriger
Kosten	höher	höher	niedriger
Anwendbarkeit bei adulten Patienten	unproblematisch	unproblematisch	Schwierigkeiten bei der Suche nach ausreichend großen Nabelschnurblut-spenden
Zeit bis zur Ansiedlung der HSC	2 – 3 Wochen	1 – 2 Wochen	3 – 4 Wochen

Ein enormer Vorteil von Nabelschnurblut ist die gegenüber den beiden anderen HSC-Quellen die einfache Gewinnung: Weder eine Vorbehandlung des Spenders wie bei der Mobilisierung von HSC ins periphere Blut noch eine Operation wie zur

Knochenmarkaspiration sind dazu erforderlich. Dies minimiert nicht nur die Risiken für den Spender, sondern senkt auch die Kosten. Auch die höhere Toleranz von HLA-Nichtübereinstimmungen und die niedrigeren Risiken von Graft-versus-Host-Disease (= GVHD; dabei greifen T-Zellen aus dem Transplantat Gewebe des Empfängers an) und Infektionen sprechen für Nabelschnurblut als Stammzellquelle. Problematisch ist dagegen die längere Zeit, die bis zur Ansiedlung der HSC erforderlich ist, sowie die Größe der Transplantate, die für einen erwachsenen Empfänger nur selten ausreichen. In einer Nabelschnurblutspende sind rund 1×10^9 mononukleäre Zellen (MNC) enthalten, für eine Transplantation wird eine minimale Zelldosis von $1,5 \times 10^7$ MNC pro kg Körpergewicht benötigt (Hough R. E. *et al.*, 2004). Damit ist Nabelschnurblut als Stammzellquelle für Empfänger über 66 kg Körpergewicht bislang nur selten und im Rahmen experimenteller Therapien zugänglich und generell für adulte Empfänger aufgrund der niedrigen enthaltenen Zellzahlen kritisch.

Da man Nabelschnurblut als HSC-Quelle auch für die Transplantation erwachsener Patienten nutzbar machen will, wurden bereits verschiedene Strategien untersucht, die in einem Übersichtsartikel von Hough R. E. *et al.*, 2004, beschrieben werden. Eine Strategie verwendete beispielsweise für die der Transplantation vorangehende Chemotherapie Medikamente, die nicht zur kompletten Zerstörung des hämatopoetischen Systems führten. Gleichzeitig wurden starke Immunsuppressiva verabreicht. So konnte eine gute Ansiedlung im Empfänger selbst bei geringen Zelldosen erreicht werden. Zusätzlich trat nur selten eine GVHD auf. Bei dieser Methode ist es unerlässlich, dass die Donorzellen dazu in der Lage sind, eventuell im Patienten verbliebene maligne Zellen zu eliminieren. Dieser Aspekt muss allerdings noch genauer untersucht werden.

Alternativ wurde versucht, die niedrige Zellzahl pro Einheit Nabelschnurblut durch Transplantation von Nabelschnurblut mehrerer Spender zu umgehen. Zwischen 2 und 12 Einheiten Nabelschnurblut wurden Erwachsenen bereits transplantiert. Die Entwicklung

massiverer GVHD, die mit dieser Strategie entstehen könnte, konnte bisher nicht bestätigt werden. Meist siedelten sich kurzfristig HSC mehrerer Spender im Patienten an, dauerhaft war die Hämatopoese dann aber doch lediglich auf Zellen eines einzelnen Spenders zurückzuführen.

Die *ex vivo*-Expansion von HSC aus Nabelschnurblut bietet eine weitere Möglichkeit, die Anzahl der Stammzellen zu vermehren, um sie einem erwachsenen Patienten transplantieren zu können.

2.6 Expansion von HSC

Verschiedene experimentelle Strategien für die *ex vivo*-Expansion von HSC aus Nabelschnurblut wurden bereits *in vitro* untersucht. Dabei muss grundsätzlich zwischen zwei Möglichkeiten unterschieden werden: der isolierten Kultur von HSC oder der Kultur von HSC zusammen mit weiteren Zellen, die als Feederzellen bezeichnet werden und die Expansion unterstützen (Abbildung T-3).

Bei der isolierten Kultur von HSC sollen Zytokine die Expansion der Zellen stimulieren. So erreichten Rollini P. *et al.*, 2004 in 12-wöchiger Kultur von HSC aus humaner fetaler Leber in Medium mit humanem AB-Serum, Flt3L, IL-6, MGDF und SCF eine gute Expansion von Zellen, die fähig zur Repopulation von NOD/SCID-Mäusen waren. Unter denselben Bedingungen konnten jedoch MNC aus Nabelschnurblut nur in der Hälfte der Fälle expandiert werden. Dagegen zeigten Piacibello W. *et al.*, 1999, eine vergleichbare Expansion von CD34-positiven Zellen aus humanem Nabelschnurblut in Medium mit Humanserum sowie drei verschiedenen Kombinationen von Flt3L, SCF, IL-6 und MGDF. Die in 6-wöchiger Kultur expandierten Zellen hatten ebenfalls die Fähigkeit, NOD/SCID-Mäuse zu repopulieren. Auch Delta-1, ein Ligand des Notch-Transmembranrezeptors, förderte bei in 5-wöchiger Kultur expandierten CD34-positiven Zellen aus Nabelschnurblut deren Fähigkeit,

NOD/SCID-Mäuse zu repopulieren (Ohishi 2002). In dieser Studie waren dem serumfreien Medium außerdem SCF, TPO, Flt3L, IL-3, IL-6, IL-7, G-CSF und GM-CSF hinzugefügt worden. In einer anderen Studie (Denning-Kendall P. *et al.*, 2003-2) wurden für aus Nabelschnurblut mit Hilfe von SCF, Flt3L, TPO und G-CSF expandierte Zellen selbst unter serumfreien Bedingungen hohe Expansionsraten gezeigt (MNC: 52-fach und CFC: 7-fach nach 7-tägiger Kultur). Jedoch hatte sich das Profil der Adhäsionsrezeptoren auf den Zellen nach der Kultur deutlich verändert, was dazu führen könnte, dass Defekte bei der Ansiedlung der Zellen im Körper auftreten könnten.

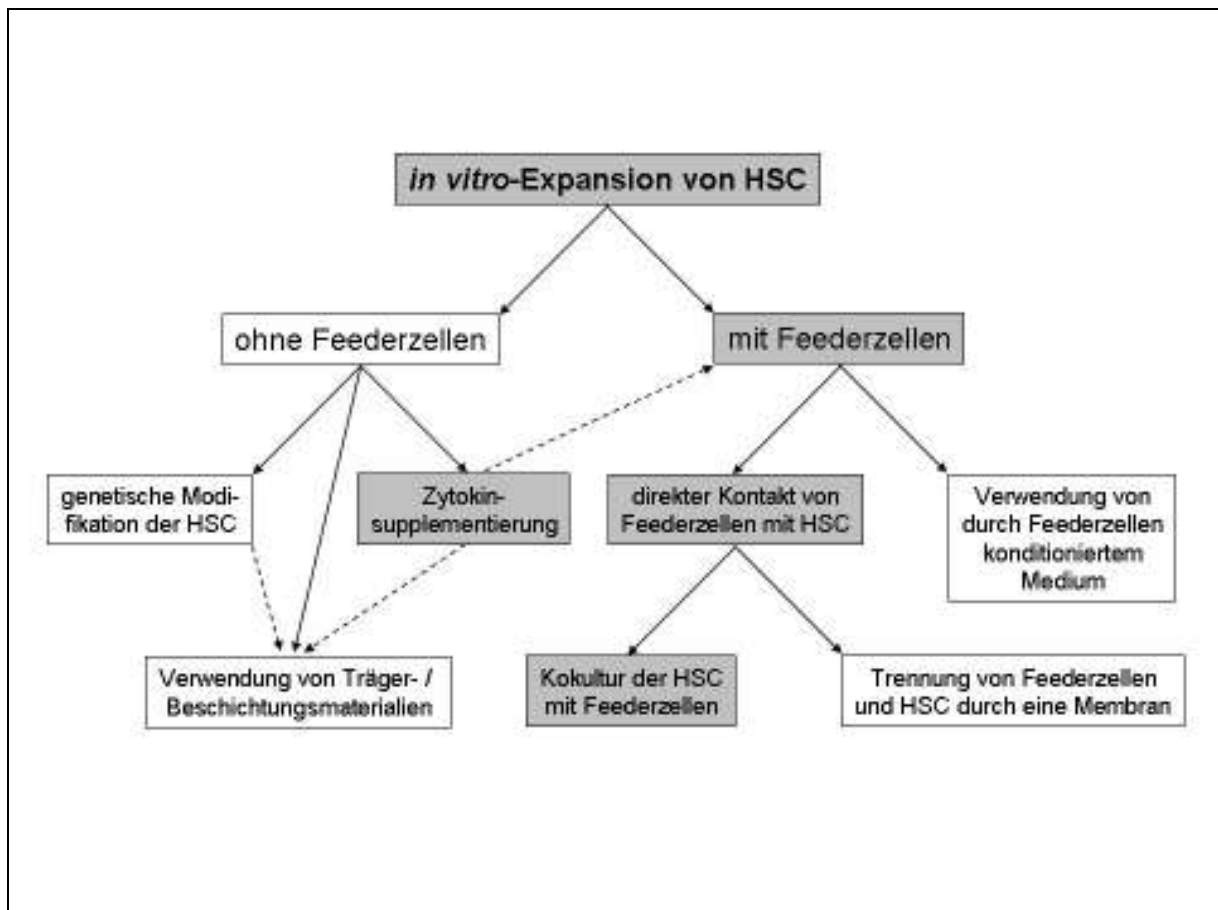


Abbildung T-3: Strategien zur *in vitro*-Expansion von HSC – grau unterlegt: in der vorliegenden Arbeit verwendete Techniken

Zusätzlich wurden HSC auch genetisch manipuliert, um ihre Selbsterneuerung zu fördern. Dafür wurden schon verschiedene Gene eingesetzt. So untersuchten Mulloy J. C. *et al.*, 2003 die virale Transduktion von HSC mit einem Konstrukt, das für das Fusionsprotein AML1-ETO kodierte und zur Selbsterneuerung der HSC führte. Neben CD34-positiven Zellen

waren in den Suspensionskulturen der transduzierten Zellen zusätzlich reifere Blutzellen nachweisbar. Auch hier wurde die Repopulation von NOD/SCID-Mäusen durch die transduzierten Zellen gezeigt. Die konstitutive Expression des Transmembranrezeptors Notch-4 führte ebenfalls zu höheren LTC-IC-Raten und verbesserter Repopulation von NOD/SCID-Mäusen (Vercauteren S. M. und Sutherland H. J., 2004). Das in diesen Ansätzen erreichte gesteigerte Selbsterneuerungspotenzial ist jedoch für die klinische Verwendung kritisch. Durch die Transplantation so modifizierter HSC könnten Leukämien ausgelöst werden, da die physiologische Steuerung der Proliferation der Zellen gestört sein könnte. Daher bieten genetisch modifizierte HSC zwar ein gutes Modell für die Grundlagenforschung zur Selbsterneuerung und Differenzierung von HSC, sind jedoch nicht klinisch einsetzbar.

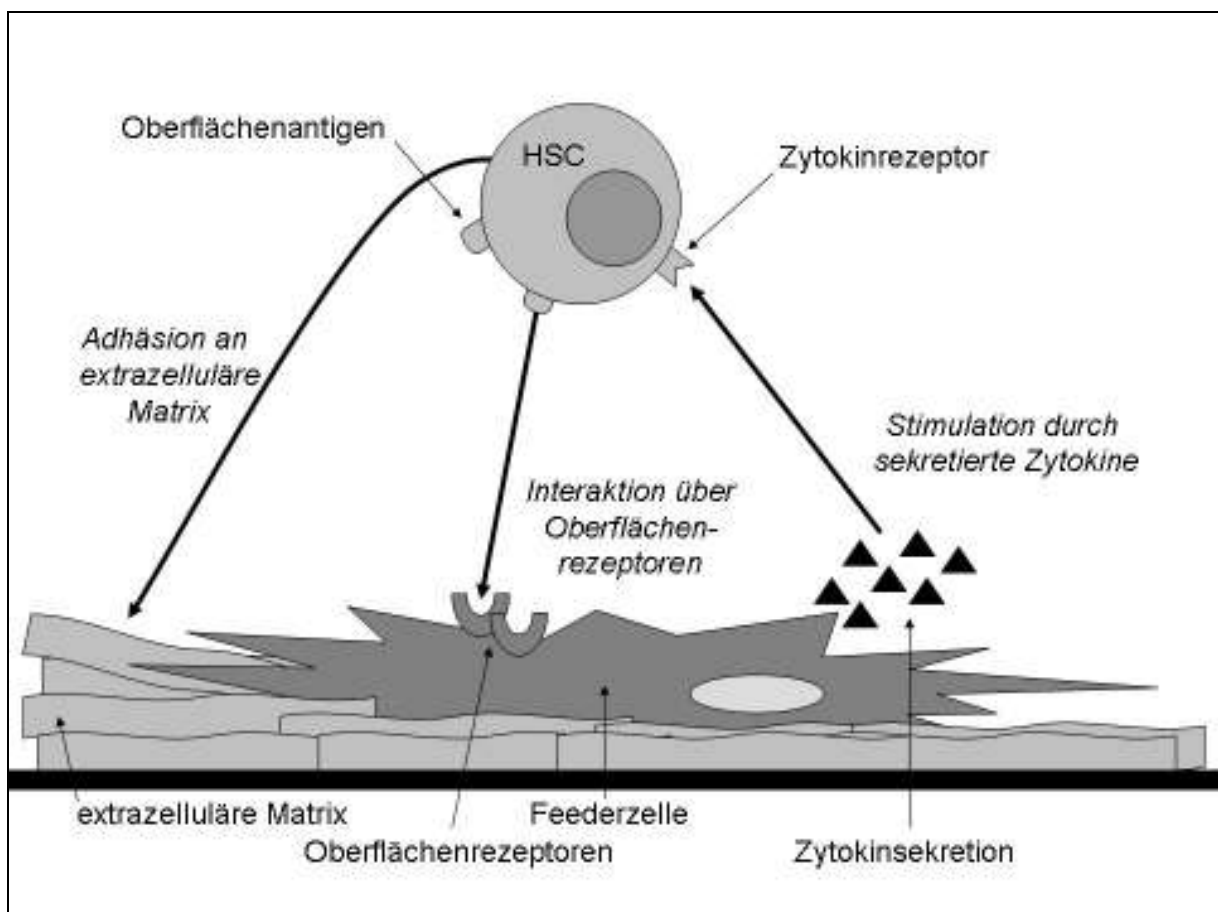


Abbildung T-4: Mögliche Interaktionen von HSC mit Feederzellen

Besser ist es daher, genetisch nicht-modifizierte HSC für die Expansion einzusetzen. Neben der zusätzlichen externen Zytokinsupplementierung der Zellen können auch Feederzellen

dabei die notwendigen Zytokine für die HSC zur Verfügung stellen. Zusätzlich dazu bieten sie den HSC die Möglichkeit der Anheftung an extrazelluläre Matrix-Moleküle und der Interaktion über Zell-Zell-Kontakte (Abbildung T-4). Alleine die extrazelluläre Matrix scheint bereits einen positiven Effekt auf HSC auszuüben: So konnten auf Fibronectin-beschichteten Kulturplatten expandierte HSC aus Knochenmark Mäuse besser repopulieren als parallel in Suspensionskultur gehaltene HSC (Dao M. A. *et al.*, 1998). In einer als „Cytomatrix“ bezeichneten 3-D-Matrix konnten HSC aus Nabelschnurblut sogar in serumfreiem Medium ohne jeglichen Zytokinzusatz in 2-wöchiger Kultur um Faktor 3 (MNC) expandiert werden und hatten die Fähigkeit, sich in NOD/SCID-Mäusen anzusiedeln (Ehring B. *et al.*, 2003). Andererseits unterstützen auch von den Feederzellen sekretierte lösliche Faktoren die Expansion von HSC, wie z.B. in membranseparierten Kokulturen von HSC mit primärem Knochenmarkstroma gezeigt wurde (Verfaillie C. M., 1992). Mit einer murinen stromalen Zelllinie als Feeder konnten in membranseparierten Kokulturen HSC aus Nabelschnurblut expandiert werden, die sich seriell in NOD/SCID-Mäuse transplantieren ließen (Lewis I. D. *et al.*, 2001).

In der direkten Kokultur von HSC mit Feederzellen lassen sich die Vorteile der Verwendung von extern supplementierten sowie von Feederzellen sekretierten Zytokinen und extrazellulärer Matrix kombinieren.

2.7 Potenzielle Feederzellen für HSC

Bereits 1973 wurde beschrieben, dass bei der Kultur von Knochenmark neben hämatopoetischen Zellen auch andere Zelltypen auftreten, wie in einem Übersichtsartikel von Smith F. O. *et al.*, 2004, angemerkt wird. Offensichtlich sind diese Zellen dafür zuständig, die HSC zu versorgen und ihre Proliferation zu regulieren. Auf der Basis dieser Beobachtungen versucht man, *in vitro* möglichst ähnliche Bedingungen für HSC zu schaffen, um ihre optimale Expansion zu gewährleisten.

Dabei wurden schon unterschiedliche Möglichkeiten eingesetzt. Neben komplettem murinem Knochenmarkstroma, das in den oben genannten Studien verwendet wurde, sind zahlreiche Zelltypen und Zelllinien hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Unterstützung der HSC-Expansion untersucht worden. Zelllinien weisen hierbei den Vorteil auf, dass aufgrund der einfachen und schnellen Vermehrung der Zellen in kurzer Zeit große Zellzahlen zur Verfügung stehen. Außerdem bleiben die Eigenschaften der Zellen auch über lange Kulturzeiträume konstant, die Ergebnisse sind damit reproduzierbar und unabhängig von Spendervariabilitäten.

Viele murine Zelllinien wurden in *in vitro*-Experimenten zur Kokultur mit HSC bereits verwendet, darunter auch die in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen verwendete Zelllinie SI/SI mod (Sutherland H. J. *et al.*, 1993). Diese Zelllinie hat hohes Potenzial zur Unterstützung der Expansion von HSC aus Nabelschnurblut (Kokerbeck D., 2002). Die klinische Anwendung der so etablierten Kokultursysteme erscheint jedoch schwierig. Da die als Feederzellen verwendeten Zelllinien muriner Herkunft sind, sind sie bei der Transplantation in den Menschen als xenogen zu betrachten. Davon geht nicht nur eine erhöhte Abstoßungsgefahr, sondern auch das Risiko der Übertragung von Krankheitserregern wie endogener Retroviren aus (Dorling A., 2002). Selbst wenn nach einer Kokultur dieser Zelllinien mit HSC anschließend die Feederzellen abgetrennt würden, oder beide Zelltypen während der Kultur durch eine Membran getrennt waren, könnte die Infektionsübertragung auf die humanen Zellen bereits stattgefunden haben. Daher ist die Kokultur von HSC mit murinen Zelllinien zwar gut geeignet, um neue Reaktorsysteme zu entwickeln und zu testen. Die klinische Anwendbarkeit ist jedoch kritisch zu sehen.

Auch humane Zelllinien wurden bereits für die Kokultur mit HSC konstruiert. So beschreiben Ciccini F. M. *et al.*, 1992, die Etablierung von SV40-immortalisierten Zelllinien aus Knochenmarkstroma, die unterschiedliche Zytokinexpressionsmuster und Unterstützung der Expansion von CFC aus HSC aufwiesen. Trotz ihrer Immortalisierung zeigten die Zelllinien

Zeichen von Seneszenz und hatten lediglich ein Teilungspotenzial von etwa 30 – 40 Zellteilungen. Zwei mittels anderer Vektoren immortalisierte aus Knochenmarkstroma gewonnene Zelllinien waren dazu in der Lage, die Expansion von Nabelschnurblutzellen über 4 Wochen aufrechtzuerhalten (Loeuillet C. *et al.*, 2001). Bei der Analyse der resultierenden Zellen zeigte sich allerdings, dass eine der beiden Zelllinien keine Bildung von Erythrozyten-Vorläufern mehr zuließ, während beide die Entstehung von Granulozyten- und Makrophagen-Vorläufern unterstützten. Kürzlich wurden wiederum 3 mit dem SV40-large T-Antigen immortalisierte Zelllinien beschrieben, von denen 2 aus Knochenmark und 1 aus der Nabelschnur stammten (De Angeli S. *et al.*, 2004). Die Zelllinien exprimierten unterschiedliche hämatopoetische Zytokine, und ihr Kulturüberstand steigerte das klonogene Potenzial von HSC aus Nabelschnurblut in semisolidem Medium. Die direkte Kokultur dieser Zelllinien mit HSC wurde bisher noch nicht untersucht.

Humane Zelllinien sind im Gegensatz zu murinen Zelllinien nicht xenogen, so dass sie prinzipiell auch für die klinische Anwendung in der HSC-Transplantation geeignet erscheinen. Allerdings ist ihr schnelles Wachstum und die in vielen Fällen fehlende Kontaktinhibierung problematisch: da Kokulturen mit höheren Feederzellzahlen als HSC-Zahlen gestartet werden, könnte es leicht dazu kommen, dass die Feederzellen die Expansion der HSC nicht unterstützen, sondern durch ihr eigenes starkes Wachstum verhindern. Daher müssen die Zellen vor der Kokultur wachstumsinhibiert werden. Dies kann beispielsweise durch Bestrahlung erfolgen, wie bereits für eine andere Zelllinie, die für Transplantationen eingesetzt werden soll, untersucht wurde (Klingemann H. G. *et al.*, 1996). Solche Behandlung führt allerdings wiederum teilweise zum Zelltod, und das Vorhandensein abgestorbener Zellen in der Kultur ist vermutlich nicht günstig für die Expansion von HSC.

Könnte man als Feederzellen Primärzellen verwenden, die noch ihre natürliche Kontaktinhibition besitzen, würde man dieses Problem umgehen. Verschiedene

Organe/Gewebe bieten sich für die Gewinnung von potenziellen Feederzellen an. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Quellen werden im Folgenden besprochen.

2.7.1 MSC (Mesenchymal Stem Cells)

Beim Erwachsenen findet die Blutbildung im roten Knochenmark statt, das in der Spongiosa platter und kurzer Knochen sowie den verdickten Enden der Röhrenknochen lokalisiert ist (Betz E. *et al.*, 1997). Daher liegt es nahe, einen Feederzelltyp zu wählen, der ebenfalls in dieser Umgebung zu finden ist. Ein inzwischen sehr ausführlich untersuchter aus dem Knochenmark stammender Zelltyp sind mesenchymale Stammzellen (MSC). Diese wurden erstmals in den 1960er und 1970er Jahren untersucht, wie ein Übersichtsartikel von Phinney D. G., 2002, beschreibt. Damals experimentierte A. Friedenstein mit aus Knochenmark gewonnenen Zellen und konnte nachweisen, dass diese in der Lage waren, nach Transplantation in syngene Empfänger Knochengewebe zu bilden. MSC ähneln stromalen Zellen des Knochenmarks, unterscheiden sich jedoch von diesen beispielsweise durch ihre Zytokinexpressionsmuster (Majumdar M. K. *et al.*, 1998). Sie können typischerweise nicht nur in osteogene, sondern auch adipogene und chondrogene Richtung differenzieren (Pittenger M. F. *et al.*, 1999). Auch ihre Plastizität, d.h. ihre Eigenschaft, zu Zellen anderer Gewebe oder sogar Keimblätter zu differenzieren, ist Gegenstand intensiver Studien geworden (Jiang Y. *et al.*, 2002, Herzog E. L. *et al.*, 2003). Sehr erfolgversprechend für ihre Transplantation erscheint ihre Fähigkeit, eine Immunantwort und damit die Abstoßung in allogenen Empfängern zu unterdrücken (Bartholomew A. *et al.*, 2002).

Mittlerweile konnte die Isolation von MSC nicht nur aus Knochenmark, sondern auch anderen Quellen gezeigt werden. Sie konnten beispielsweise aus Bälkchenknochen mittels Kollagenasebehandlung gewonnen werden (Tuli R. *et al.*, 2003, Sakaguchi Y. *et al.*, 2004). Aus Fettgewebe können MSC ebenfalls mittels enzymatischem Verdau isoliert werden (Zuk P. A. *et al.*, 2002). Interessant ist im Hinblick auf die gewünschte Kokultur von HSC mit MSC

vor allem, dass auch aus Blut MSC gewonnen werden können. Dies wurde sowohl für das Blut gesunder Erwachsener (Zvaifler N. J. *et al.*, 2000) als auch das Blut von Brustkrebspatientinnen beschrieben (Fernandez M. *et al.*, 1997). Auch aus embryonalen Geweben des ersten Trimesters – Blut, Knochenmark und Leber – konnten MSC präpariert werden (Campagnoli C. *et al.*, 2001). Im Bezug auf Nabelschnurblut ist die Datenlage kontrovers. Zwar wurde beschrieben, dass MSC aus Nabelschnurblut isoliert werden können (Erices A. *et al.*, 2000, Goodwin H. S. *et al.*, 2001). Andere Studien konnten MSC zwar in adultem Knochenmark oder Blut von Feten des 2. Schwangerschaftsdrittels nachweisen, jedoch nicht oder nur in extrem niedriger Frequenz in bei der Geburt eines voll ausgereiften Kindes gewonnenem Nabelschnurblut (Wexler S. A. *et al.*, 2003, Yu M. *et al.*, 2004).

Für die Kokultur mit HSC wurden MSC bereits mehrfach eingesetzt. Sie erhielten LTC-IC, wenn sie in osteogene oder stromale Richtung differenziert wurden (Majumdar M. K. *et al.*, 2000). Außerdem konnten sie die gezielte Differenzierung von CD34-positiven HSC zu Megakaryozyten unterstützen (Cheng L. *et al.*, 2000). In Kokultur von HSC aus Nabelschnurblut mit MSC zeigte sich auch, dass die HSC in Anwesenheit der MSC das antiapoptotische Protein BCL-2 stärker exprimierten als in Suspension kultivierte HSC (Kadereit S. *et al.*, 2002). Als Feederzellen für humane ESC wurden MSC ebenfalls bereits erfolgreich eingesetzt (Cheng L. *et al.*, 2003). Interessant für die Kokultur von HSC mit MSC ist zudem, dass MSC zumindest in NOD/SCID-Mäusen die Ansiedlung CD34-positiver Zellen aus Nabelschnurblut erleichtern, besonders dann, wenn die eingesetzten HSC-Konzentrationen gering sind (Noort W. *et al.*, 2002).

MSC stellen daher einen viel versprechenden potenziellen Feederzelltyp für die Kokultur mit HSC dar. Problematisch ist ihre Isolation aus Knochenmark, da hierfür ein zusätzlicher Spender erforderlich ist, dessen Gewebetyp mit dem des Empfängers übereinstimmen sollte. Dennoch ist Knochenmark als natürlicher Ort der Hämatopoese ein sinnvolles Gewebe, um Feederzellen zu gewinnen. Alternativ könnte Nabelschnurblut als Quelle für MSC dienen.

Bestenfalls ließen sich Feederzellen und HSC aus derselben Nabelschnurblutprobe gewinnen, was die Abläufe in der Klinik sehr vereinfachen würde. Beide möglichen Quellen für MSC wurden in die vorliegende Arbeit mit einbezogen.

2.7.2 HUVEC (Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells)

Sucht man nach Feederzellen, die vom selben Spender gewonnen werden können wie die HSC, bietet sich die Nabelschnur als Quelle dafür an. Ein seit langem in der Forschung eingesetzter Zelltyp aus der Nabelschnur sind HUVEC, die Endothelzellen, die die Nabelschnurvene auskleiden. Ihre Isolation wurde erstmals von Jaffe E. A. *et al.*, 1973, beschrieben. HUVEC wurden dort isoliert, indem die Nabelschnurvene mit Kollagenase befüllt und die Endothelzellen somit von den Venenwänden abgelöst wurden. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass die so präparierten Endothelzellen die endotheltypischen Weibel-Palade-Körperchen enthielten und auch sonst Endothelzellen *in situ* ähnelten. Diese Eigenschaften blieben über 5 Passagen (3 Monate) erhalten. HUVEC werden heute in vielen Gebieten der Grundlagenforschung eingesetzt, z.B. für Studien der Adhäsion von Leukozyten an Endothelien (Springer T. A., 1994) oder Untersuchung der Vorgänge, die der Atherosklerose zugrunde liegen (Ross R., 1999).

HUVEC produzieren Zytokine, die bei der Regulation der Teilung von HSC eine Rolle spielen. Im Kulturüberstand von HUVEC wurde neben IL-3 und IL-6 auch SCF nachgewiesen (Yamaguchi H. *et al.*, 1996). Auch Daten zur Kokultur von HUVEC mit HSC liegen in der Literatur bereits mehrfach vor. So konnten beispielsweise Jazwiec B. *et al.*, 1998, zeigen, dass HUVEC die Expansion von mononukleären Zellen und CFU-GM aus CD34-positiven Zellen aus Nabelschnurblut unterstützten, vor allem, wenn direkter Kontakt zwischen Feederzellen und HSC möglich war. Durch Zugabe von IL-1 α konnte die Fähigkeit der HUVEC zur Unterstützung der HSC noch gesteigert werden. Feugier P. *et al.*, 2002, transfektierten HUVEC mit adenoviralen Vektoren, die dazu führten, dass die Zellen

zusätzlich weitere Zytokine produzierten. Am effektivsten für die Kokultur erwiesen sich hierbei die HUVEC, die TPO, SCF und Flt3L transgen exprimierten.

Neben HUVEC sind auch bereits Endothelzellen aus anderen Quellen erfolgreich für die Kokultur mit HSC eingesetzt worden, beispielsweise mikrovaskuläre Zellen aus Schweinegehirnen (Rosler E. *et al.*, 2000) oder auch humane Endothelzellen aus Gehirnblutgefäßen (Chute J. P. *et al.*, 2005). Aufgrund der Herkunft von HSC aus der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region des Embryos wurden auch aus Endothelien dieser Gewebe generierte Zelllinien (murine Herkunft) auf ihre Fähigkeit zur Unterstützung von HSC getestet (Ohneda O. *et al.*, 1998). Tatsächlich förderte eine der beiden untersuchten Zelllinien die Expansion von HSC. Nicht nur HSC, sondern auch andere Stammzellen profitieren von der Kokultur mit Endothelzellen: Shen Q. *et al.*, 2004, zeigten, dass Kokultur mit bovinen Endothelzellen aus der Pulmonararterie oder einer murinen Endothelzelllinie dazu führte, dass aus dem Zerebralkortex von Mausembryonen gewonnene neurale Stammzellen expandierten, ohne dabei starke Differenzierung zu zeigen.

Endothelzellen verfügen also vermutlich über Eigenschaften, die für den Erhalt von Stammzellen erforderlich sind. Daher erscheint es sinnvoll, HUVEC hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit in einem klinisch einsetzbaren Kokultursystem mit HSC zu untersuchen. Die bisher durchgeführten Studien bieten zur praktischen Möglichkeit des klinischen Einsatzes von Endothelzellen wenige Anhaltspunkte, sie beschäftigen sich eher mit grundlagenorientierten Fragestellungen.

Wie bereits oben aufgeführt, ist es möglich, für die Gewinnung von HUVEC die Nabelschnur zu verwenden, aus der auch das Nabelschnurblut stammt, dessen HSC expandiert werden sollen. Für die Entnahme einer Nabelschnur ist keine eigens durchgeführte Operation erforderlich wie etwa bei der Knochenmarkaspiration. Die Nabelschnur wird einfach kurz nach dem Abgang der Plazenta von dieser abgetrennt. Durch diese Vorgehensweise

entsteht kein Risiko für den Spender. Außerdem wird die Nabelschnur üblicherweise nach der Geburt zusammen mit der Plazenta verworfen, so dass hier auch kein Konflikt mit anderen Anwendungen entsteht. Die relativ einfache und schnelle Isolation von HUVEC – laut Marin V. *et al.*, 2001, dauert die Prozedur mit Kollagenaseverdau lediglich 35 min – macht sie ebenfalls für die klinische Anwendung attraktiv. Aus diesen Gründen wurden HUVEC als potenzielle Feederzellen für die Kokultur mit HSC ausgewählt und ihre klinische Anwendbarkeit für diesen Zweck in der vorliegenden Arbeit systematisch untersucht.

2.7.3 WJC (Wharton's Jelly Cells)

Neben der Vene enthält die Nabelschnur auch andere Gewebe, die möglicherweise für die Gewinnung von Feederzellen für HSC nutzbar sind. Die Blutgefäße, die in der Nabelschnur verlaufen, sind eingebettet in ein gallertartiges Bindegewebe, das so genannte Wharton's jelly (Wharton'sche Sülze). Dieses Gewebe ist aufgebaut aus einem Gradienten von Myofibroblasten verschiedener Differenzierungsstufen (Nanaev A. K. *et al.*, 1997). Von der subamniotischen Zone, also dem Bereich unter dem amniotischen Epithel, das die Nabelschnuroberfläche bildet, beginnend zu den Blutgefäßwänden hin zeigen die Zellen immer stärker typische Eigenschaften glatter Muskelzellen. In den Blutgefäßwänden sind vollständig ausdifferenzierte glatte Muskelzellen nachweisbar. Diese Reifung der Zellen entsteht progressiv während der Schwangerschaft (Kobayashi K. *et al.*, 1998): im ersten Trimester sind die Zellen noch undifferenziert, exprimieren dann aber zunehmend den Differenzierungsmarker α -smooth muscle-Actin. Dieses Protein wurde in den Mikrofibrillenbündeln nachgewiesen und könnte daher beim Schutz der Blutgefäße gegen Druck eine Rolle spielen.

Mitchell K. E. *et al.*, 2003, beschrieben eine einfache Methode zur Isolation von fibroblastähnlichen Zellen aus dem Wharton's jelly (WJC). Sie schnitten die Nabelschnur in kleine Stückchen, wobei die Blutgefäße entfernt wurden, und säten diese Stückchen in

Zellkulturplatten aus. Die aus diesen Gewebefragmenten auf den Zellkulturplatten gewachsenen Zellen wiesen Eigenschaften von Stammzellen auf. Neben ihrer Expression von Stammzellmarkern wie CD117 besaßen sie die Fähigkeit, zu Neuronen und Gliazellen zu differenzieren. In einer Folgestudie (Weiss M. L. *et al.*, 2003) wurden die Zellen ins Gehirn erwachsener Ratten injiziert, wo sie sich integrieren konnten und neuronale Eigenschaften annahmen.

Auch auf andere Weise wurden bereits stammzellähnliche Zellen aus der Nabelschnur gewonnen. Romanov Y. A. *et al.*, 2003, verwendeten eine Abwandlung der für die HUVEC-Präparation eingesetzten Methode und isolierten spindelförmige Zellen aus der subendothelialen Schicht der Nabelschnurvene. Diese Zellen konnten, ähnlich wie MSC, *in vitro* in osteogene und adipogene Richtung differenziert werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Covas D. T. *et al.*, 2003. In einer kürzlich veröffentlichten Studie (Sarugaser R. *et al.*, 2005) wurden die Wände der Nabelschnurblutgefäße nicht von innen, sondern von außen mit Kollagenase behandelt, um Zellen zu gewinnen. Diese Zellen hatten wie die in den anderen Veröffentlichungen beschriebenen fibroblastähnliche Morphologie, zeigten MSC-typische Oberflächenmarkerexpression und differenzierten *in vitro* in osteogene Richtung. Ob es sich bei den in den verschiedenen Untersuchungen beschriebenen Zellen wirklich um Zellen unterschiedlicher Herkunft handelt, steht nicht fest.

Für die Kokultur mit HSC wurde noch keiner dieser Zelltypen eingesetzt. Allerdings wurden aus der Plazenta gewonnene MSC bereits erfolgreich in Kokultorexperimenten mit HSC verwendet (Zhang Y. *et al.*, 2004). Dabei war die Expansion von HSC mit diesen Zellen als Feederzellen vor allem dann sehr hoch, wenn gleichzeitig eine Zytokinmischung aus SCF, TPO und Flt3L dem Medium beigefügt wurde. Interessanterweise waren die aus der Plazenta isolierten MSC ähnlich wie die aus Knochenmark gewonnenen in der Lage, die Proliferation allogener T-Zellen zu verhindern. Feederzellen aus der Plazenta wurden zudem

bereits für die Kokultur mit ESC von Affen eingesetzt und konnten deren undifferenziertes Wachstum fördern (Miyamoto K. *et al.*, 2004).

Da die Gewinnung von Zellen aus der Nabelschnurmatrix erst kürzlich beschrieben wurde, liegen auch hier noch keine Untersuchungen zum Einsatz dieser Zellen in der Klinik vor. Für Zellen dieser Herkunft spricht, analog zu HUVEC, die Nabelschnur als Ursprungsgewebe, die für den Spender risikofrei nach der Geburt verwendet werden kann, auch autolog zum Nabelschnurblut. Von den oben aufgeführten Methoden wurde die von Mitchell K. E. *et al.*, 2003, beschriebene für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente ausgewählt. Diese Methode bietet eine im Vergleich zu anderen sehr einfache und schnelle Präparation, was günstig für den klinischen Einsatz ist. Weil über WJC noch sehr wenige Literaturdaten vorliegen, wurden in der vorliegenden Arbeit ihre Gewinnung und ihre Eigenschaften ausführlicher charakterisiert als die der anderen potenziellen Feederzelltypen.

2.8 Erwünschte Eigenschaften potenzieller Feederzellen

Für den klinischen Einsatz der Kokulturexpansion von HSC auf Feederzellen müssen letztere gewissen Anforderungen gerecht werden. Für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Parameter als entscheidend erachtet:

Verfügbarkeit der Feederzellen

Um das Kokultursystem in der klinischen Routine einsetzen zu können, muss sichergestellt werden, dass von jedem der in Frage kommenden Spender ausreichend Feederzellen verfügbar sind. Vor allem, wenn Feederzellen und HSC vom selben Spender verwendet werden sollen (autologe Kokultur), ist dies entscheidend. Aber auch bei der Kokultur von Nabelschnurblutzellen mit zu diesen allogenen Feederzellen müssen letztere in genügender Anzahl vom passenden Spender zu gewinnen sein. Für die in einer Nabelschnurblutprobe durchschnittlich enthaltene Anzahl CD34-positiver Zellen liegen diese bei den beiden in der

vorliegenden Arbeit untersuchten Aussaatverhältnissen von 1 HSC:10 bzw. 20 Feederzellen zwischen $9,7 \times 10^6 - 1,4 \times 10^7$ bzw. $1,9 \times 10^7 - 2,8 \times 10^7$ (s. Tabelle T-2). Ebenso wichtig ist, dass die Prozedur zur Bereitstellung der Feederzellen nicht zu aufwändig sein darf, um einen möglichst reibungslosen Ablauf zu gewährleisten.

Tabelle T-2: Für Kokultur in klinischem Maßstab benötigte Feederzellzahlen und gewünschte Expansionsparameter – Quellenangabe in Klammern: H = Hough R. E. et al., 2004, K = Kaufman R. L. et al., 2004, Y = Yamada T. et al., 2000

Parameter	mononukleäre Zellen (MNC)	CD34-positive Zellen
pro Nabelschnurblutprobe enthalten	1×10^9 (H)	$9,7 \times 10^5 - 1,4 \times 10^6$ (Y)
benötigte Zellzahl pro kg Körpergewicht	$1,5 \times 10^7$ (H)	$1,7 \times 10^5$ (K)
benötigte Zellzahl für 100 kg Körpergewicht	$1,5 \times 10^9$	$1,7 \times 10^7$
gewünschter minimaler Expansionsfaktor	1,5	12 – 18
notwendige Anzahl Feederzellen	nicht definiert	1 HSC:10 Feederzellen: $9,7 \times 10^6 - 1,4 \times 10^7$ 1 HSC:20 Feederzellen: $1,9 \times 10^7 - 2,8 \times 10^7$

Charakterisierbarkeit & Unterscheidung von HSC

Da es nötig sein könnte, nach der Kokultur die Feederzellen von den aus HSC expandierten Zellen zu trennen, sollten sich diese voneinander unterscheiden lassen. Die beste Möglichkeit hierzu wäre ein Oberflächenmolekül, das spezifisch nur auf einer der beiden Zellarten exprimiert wird. Anhand dieses Antigens könnten die Zellen dann mittels FACS oder magnetischer Separation isoliert werden. Des Weiteren ist es auch wichtig, das Oberflächenmarkerprofil der Feederzellen genau zu kennen, um diese vor der Kokultur eindeutig identifizieren zu können.

Immunkompatibilität

Da selbst bei sorgfältigem Trennen der Feederzellen von den HSC und den daraus abgeleiteten Zellen noch Verunreinigungen mit Feederzellen vorhanden sein können, ist es wichtig, die Immunkompatibilität der potenziellen Feederzellen zu kennen. Können diese allogene T-Zellen aktivieren, wäre es möglich, dass diese Reaktion auch im Empfänger des Transplantates auftritt. Findet dagegen keine T-Zell-Aktivierung durch die potenziellen Feederzellen statt, könnte man eventuell sogar auf die Trennung der Zellen nach der Kokultur verzichten und sie zusammen in den Empfänger transplantieren.

Verwendungsmöglichkeit von klinisch zugelassenem Medium

In vielen in der Literatur beschriebenen Experimenten wurden Kulturmedien verwendet, die tierische Bestandteile enthielten. Für den klinischen Einsatz ist ein solches Medium zwar nicht völlig ausgeschlossen, sofern gewisse Bedingungen erfüllt werden. Sicherer wäre es trotzdem, ein Medium zu verwenden, das frei von tierischen Bestandteilen ist. Es existieren bereits einige solcher Medien speziell für die Kultur hämatopoetischer Zellen. Aber auch die Feederzellen müssen die Kultur in diesem Medium überleben, um ausreichende Unterstützung der HSC gewährleisten zu können. Bestenfalls sollten sie innerhalb der gewünschten Kokulturdauer auch kein überproportionales Wachstum zeigen, damit die relativ langsam expandierenden HSC nicht verdrängt werden. Auch der Verbrauch von Grundnährstoffen wie Glukose und Glutamin sowie die Akkumulation von Metaboliten wie Laktat und Glutamat im Medium durch die Feederzellen sollten so stattfinden, dass keine Limitierung bzw. Inhibierung der HSC-Expansion eintritt.

Potential für HSC-Unterstützung in Kokultur in klinisch einsetzbarem Aufbau

Viele der Studien, die zur Kokultur von Feederzellen mit HSC durchgeführt wurden, erfordern längere Vorkultur der Feederzellen oder deren frische Präparation direkt vor der Kokultur. Für den klinischen Einsatz ist das inakzeptabel, weil die Feederzellen zu dem Zeitpunkt zur

Verfügung stehen müssen, der aufgrund der Therapie des Patienten notwendig ist. Daher müssen sich die potenziellen Feederzellen nicht nur kryokonservieren lassen, sondern auch nach dem Auftauen direkt für die Kokultur verwendbar sein. Auch der sonstige Aufbau des Kokultursystems muss möglichst unkompliziert sein. Je weniger Arbeitsschritte nötig sind, desto besser wird die Einsatzmöglichkeit in der klinischen Routine. Komplizierte Fütterungsstrategien sollten daher vermieden werden, besser ist eine kurzzeitige Kokultur, in der keine Mediumwechsel etc. nötig sind.

Die gewünschten Expansionsfaktoren liegen für MNC bei 1,5 und für CD34-positive Zellen bei 12 – 18, wenn diese jeweils selbst als Ausgangsmaterial für die Expansion dienen (Tabelle T-2). In der vorliegenden Arbeit wurden CD34-positive Zellen als Ausgangsmaterial für die Expansion verwendet. In der klinischen Anwendung könnte das Expansionsprotokoll so gestaltet werden, dass eine Nabelschnurblutprobe zunächst aufgetrennt wird: Die CD34-positiven Zellen würden dann für die Kokultur ausgesät, die restlichen Zellen kryokonserviert, um sie später den aus den CD34-positiven Zellen expandierten HSC wieder hinzuzufügen und so ausreichende MNC-Dosen zu erreichen. Zunächst ist das etwas aufwändiger als etwa die aus dem Nabelschnurblut gewonnenen MNC direkt für die Kokultur einzusetzen. Durch dieses Vorgehen wird jedoch vermieden, dass die ganz oder teilweise ausdifferenzierten Zellen im Nabelschnurblut die Expansion der Stammzellen negativ beeinflussen, indem sie diese ebenfalls zur Differenzierung veranlassen. Zusätzlich werden auf diese Weise geringere Feederzellzahlen benötigt und so ein höherer Zeitaufwand bei deren Bereitstellung vermieden.

Da CD34 als Marker für HSC insbesondere nach einer Kultivierung keine Aussage über deren Funktionalität ermöglicht (s. 2.4), wurde nach den Kokulturversuchen nicht die Anzahl der CD34-positiven Zellen in den Proben erfasst, sondern der Gehalt von CFC und CAFC. Diese Systeme erlauben eine bessere Aussage über die Funktionalität der expandierten Zellen, und im klinischen Einsatz ist diese das entscheidende Kriterium. Das Ziel war dabei,

durch die Kokultur der HSC mit Feederzellen Expansionsraten bei CFC und CAFC zu erreichen, die über der für CD34-positive Zellen errechneten Rate liegen. Damit sollte gesichert werden, dass ausreichend funktionelle Zellen in den expandierten Proben enthalten sind.

Anhand der hier definierten Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit MSC, HUVEC und WJC als potenzielle Feederzellen für die Kokultur mit HSC untersucht und die Möglichkeit ihres klinischen Einsatzes analysiert.

2.9 Problemstellung und Zielsetzung

2.9.1 Problemstellung

Nabelschnurblut stellt eine heute bereits häufig verwendete Alternative zu Knochenmark als Quelle von HSC für Transplantationen dar. Es kann nach der Geburt eines Kindes gefahrlos gewonnen und die Zellen kryokonserviert werden. Auf diese Weise stehen in Nabelschnurblutbanken bereits Stammzellspenden von zahlreichen Spendern transplantationsbereit zur Verfügung und können bei Bedarf jederzeit eingesetzt werden. Beispielsweise verfügte NETCORD, eine Dachorganisation von 14 US-amerikanischen öffentlichen Nabelschnurblutbanken, im Jahr 2004 über mehr als 57.000 Einheiten Nabelschnurblut (Kaufman R. L. *et al.*, 2004). Mehr als 2.000 Transplantationen wurden allein mit Nabelschnurblut aus diesen Banken bereits durchgeführt.

Wegen der relativen Naivität der Immunzellen im Nabelschnurblut treten bei Transplantationen von HSC aus Nabelschnurblut weniger Probleme mit GVHD auf, selbst wenn die HLA-Eigenschaften von Spender und Empfänger nicht vollständig übereinstimmen. Daher wäre durch die Verwendung von Nabelschnurblut für viele Patienten, die eine Stammzelltransplantation benötigen, für die aber kein passender Knochenmarkspender gefunden werden kann, ein Transplantat vorhanden.

Den limitierenden Faktor für die Nabelschnurbluttransplantation stellt jedoch die Gesamtzahl der Stammzellen dar, die in den Spenden enthalten sind. Im Regelfall reichen die Stammzellen zwar aus, um ein Kind oder einen leichteren Erwachsenen zu transplantieren, für erwachsene Patienten ab ca. 66 kg Körpergewicht sind aber zu wenige Stammzellen vorhanden (Hough R. E. *et al.*, 2004). Ein Versuch, dieses Problem zu umgehen, ist z.B. die simultane Transplantation mehrerer Nabelschnurblutspenden. Eine weitere Möglichkeit ist die Vermehrung der Stammzellen aus Nabelschnurblut in Kultur, um die für eine Transplantation notwendige Zellzahl zu erreichen.

Für diese so genannte *ex-vivo*-Expansion der Stammzellen werden unterschiedliche Systeme diskutiert (s. Abbildung T-3). Wichtig ist es hierbei zu vermeiden, dass die HSC während der Kulturdauer ausdifferenzieren. Es muss sichergestellt werden, dass auch nach der Expansion noch ausreichend Stammzellen in den Transplantaten enthalten sind. Um die Differenzierung der Zellen möglichst gering zu halten, stellt die Kokultur von HSC mit adhären Zellen, die ein Netzwerk für die Anheftung der HSC bilden, sie über Zell-Zell-Kontakte und Zytokinsekretion versorgen und so ihre Proliferation regulieren, eine vielversprechende Möglichkeit dar. Die adhären Zellen werden in diesem Zusammenhang als "Feederzellen" bezeichnet.

Hohes Potenzial für die Unterstützung der *ex-vivo*-Expansion von HSC haben murine stromale Zelllinien bewiesen (Jelinek N., 2001, Kokerbeck D., 2002, Fischbach T., 2003). Diese Zellen stehen in ausreichenden Zellzahlen zur Verfügung, jedoch entstehen Schwierigkeiten aufgrund mehrerer ihrer Eigenschaften. Zum einen handelt es sich um immortalisierte Zellen, was trotz Bestrahlung zur Wachstumsinhibierung der Zellen vor allem bei der Transplantation in nicht-immunkompetente Empfänger problematisch sein könnte. Außerdem stammen die Zellen aus der Maus und sind somit xenogen, was vor allem wegen des möglichen Vorhandenseins endogener Retroviren vermieden werden sollte. Daher ist es unerlässlich, andere Feederzell-Quellen für die Kokultur mit HSC zu erschließen.

2.9.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die systematische Untersuchung verschiedener Quellen möglicher Feederzellen für die Kokultur mit humanen HSC aus Nabelschnurblut. Hierfür wurden gezielt Primärzellen gewählt, um die bei der Verwendung immortalisierter, möglicherweise transgener und xenogener Zelllinien entstehenden Probleme zu vermeiden. Als Quellen für potenzielle Feederzellen dienten dabei zwei Gewebe/Organe des menschlichen Körpers: Das Knochenmark, in dem HSC im Körper lokalisiert sind, und die Nabelschnur, die vom

selben Spender gewonnen werden kann wie das Nabelschnurblut (Abbildung T-5). Die im Einzelnen näher untersuchten potenziellen Feederzelltypen waren:

- mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark (mesenchymal stem cells = MSC) oder alternativ aus Nabelschnurblut (umbilical cord blood mesenchymal stem cells = CB-MSC)
- Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene (human umbilical cord vein endothelial cells = HUVEC)
- Zellen aus dem Bindegewebe der humanen Nabelschnur (Wharton's jelly cells = WJC)

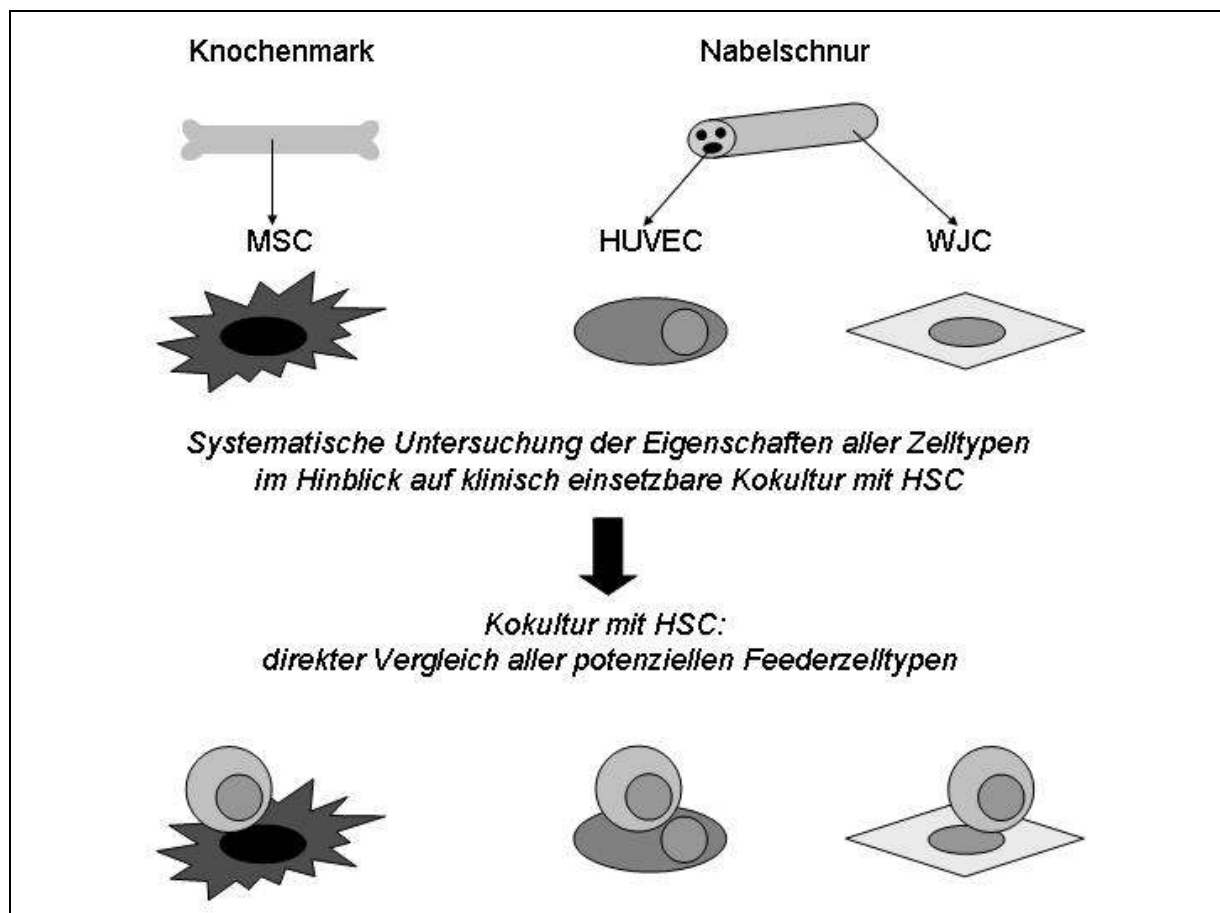


Abbildung T-5: Schematische Darstellung der im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Arbeiten

Besonderer Wert wurde bei der Untersuchung dieser Alternativen auf die klinische Anwendbarkeit der potenziellen Feederzellen gelegt. Dazu wurden neben der Praktikabilität der notwendigen Prozeduren auch Parameter wie die Kompatibilität der Feederzellen zu

klinisch verwendbarem Medium und ihre Immunverträglichkeit in Betracht gezogen. Des Weiteren wurden charakteristische Eigenschaften der einzelnen Feeder-Zelltypen wie z.B. Differenzierung und Oberflächenmarkerexpression untersucht. Schließlich wurde in Kokulturversuchen die Unterstützung der Expansion von HSC durch alle potenziellen Feederzellen direkt verglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeines

Alle Arbeiten wurden in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe S1 unter den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt. Biologisch aktive Abfälle wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren sterilisiert. Auch die für Zellkulturarbeiten verwendeten Geräte und Lösungen wurden mittels geeigneter Methoden (Autoklavieren, Depyrogenisieren) vor der Verwendung sterilisiert oder bereits steril vom Hersteller bezogen.

Alle verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien sind mit Herstellern im Anhang aufgelistet. Auch eine Liste der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper und Lösungen ist dort zu finden.

3.2 Zellkulturmethoden

3.2.1 Standardkulturbedingungen

Alle Primärzellen und Zelllinien wurden in sterilen Einweg-Zellkulturgefäßen kultiviert. Die Kultur der Zellen erfolgte im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37°C in einer feuchtigkeitsgesättigten, 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre. Alle Arbeiten mit Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, in steriler Atmosphäre d.h. unter einer Sterilbank durchgeführt. Medien, Puffer und Arbeitsgeräte wurden für Zellkulturarbeiten mittels geeigneter Methoden sterilisiert.

3.2.2 Medien, Medienzusätze und Zytokine

Grundmedien und Medienzusätze

Für die Kultur der Primärzellen und Zelllinien wurden in folgender Tabelle (Tabelle M-1) angegebene Grundmedien und Medienzusätze verwendet. Mediumwechsel wurden bei den Primärzellen einmal wöchentlich (MSC) bzw. zwei- bis dreimal (HUVEC, WJC) wöchentlich durchgeführt. Die murinen stromalen Zelllinien SI/SI mod und M2-10B4 mod benötigten neben den im Rahmen der normalen Passagen durchgeführten keine zusätzlichen Mediumwechsel. Um zu vermeiden, dass diese Zelllinien ihre Transgene verloren, wurden diese gelegentlich in Selektionsmedien inkubiert.

Tabelle M-1: Zellkulturmedien und Medienzusätze

Zelltyp/-linie (bzw. Experimente)	verwendetes Medium	Zusätze
HSC (Kokulturversuche)	X-Vivo 10	Zytokine s. u.
MSC	DMEM low glucose	10 % FCS
HUVEC	ECGM	Supplements für ECGM
WJC	ECGM	Supplements für ECGM
SI/SI mod	IMDM	10 % FCS
SI/SI mod – Selektionsmedium	IMDM	10 % FCS 0,4 mg/mL G 418 0,06 mg/mL Hygromycin B
M2-10B4 mod	IMDM	10 % FCS
M2-10B4 mod – Selektionsmedium	IMDM	10 % FCS 0,8 mg/mL G 418 0,125 mg/mL Hygromycin B
CAFC-Medium	IMDM	12,5 % FCS 12,5 % HS

Zytokine

Für die Kultur von HSC wurden dem Grundmedium (s. Tabelle M-1) die unten aufgeführten Zytokine in den dort genannten Konzentrationen hinzugefügt. Alle Zytokine wurden in trägerfreier Formulierung verwendet. Die Stammlösungen wurden mit einer Konzentration von jeweils 10 ng/μL in PBS mit 0,5 % HSA angesetzt, sterilfiltriert, zu jeweils 100 μL aliquotiert und bei –80°C aufbewahrt. Für kurze Fristen wurden einmal aufgetaute Aliquots auf 4°C aufbewahrt. Die biologische Funktion der verwendeten Zytokine wird im Folgenden kurz beschrieben.

Stem Cell Factor = SCF (50 ng/mL)

Die Funktionen von SCF *in vivo* sind, wie in einem Übersichtsartikel von Smith M. A. *et al.*, 2001, beschrieben wird, vielfältig. Unter anderem wirkt SCF als Wachstumsstimulator und Apoptose-Suppressor für hämatopoetische Vorläuferzellen, stimuliert die Bildung erythroider Kolonien und moduliert die Zelladhäsion. In bisher durchgeführten Studien zeigt SCF in Kombinationen mit anderen Zytokinen ein hohes Potenzial für die *ex-vivo*-Expansion von HSC.

Flt3Ligand = Flt3L (50 ng/mL)

Flt3L wird von einer Vielzahl von Geweben exprimiert, unter anderem auch von stromalen Fibroblasten des Knochenmarks, die die Umgebung für HSC bilden (Übersichtsartikel von Drexler H. G. und Quentmeier H., 2004). Er beeinflusst die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* kann Flt3L für die Expansion von HSC verwendet werden, seine Wirkung ist dabei jedoch abhängig von Zelltyp und Anwesenheit anderer Wachstumsfaktoren.

Thrombopoietin = TPO (20 ng/mL)

TPO ist, laut Übersichtsartikel von Kuter D. J. und Begley C. G., 2002, der wichtigste physiologische Regulator der Megakaryocyten- und Blutplättchen-Produktion. Außerdem wirkt es, mit anderen Zytokinen wie SCF kombiniert, synergistisch auf das Wachstum myeloider und erythroider Vorläuferzellen. In präklinischen Studien wurde TPO bereits erfolgreich für die Expansion von HSC in Langzeitkulturen aus murinem Knochenmark oder Nabelschnurblutstammzellen eingesetzt.

Interleukin 3 = IL-3 (10 ng/mL)

Die Verwendung von IL-3 in der Kultur von HSC wird u.a. in einem Übersichtsartikel von Ivanovic Z., 2004, analysiert. Für IL-3 werden unterschiedliche Effekte auf HSC beschrieben. Einerseits wurde gezeigt, dass IL-3 die Differenzierung von HSC stimuliert, andererseits wurde beschrieben, dass Zytokincocktails mit IL-3 die Erhaltung oder sogar Selbsterneuerung von HSC fördern. In serumfreiem Medium wurde vorwiegend ein Einfluss von IL-3 auf die Erhaltung von HSC bewiesen, wofür die zusätzliche Anwesenheit von SCF und TPO erforderlich zu sein scheint.

3.2.3 Stammhaltung und Passagieren

Wenn die adhärent wachsenden Zellen in den Zellkulturgefäßen nahezu Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium von den Zellen abgenommen und verworfen. Die auf der Fläche haftenden Zellen wurden dann mit PBS gewaschen, um Reste von Medium und Serum zu entfernen. Danach wurde Trypsin auf die Zellen gegeben (verwendete Trypsinmengen s. Tabelle M-2) und bei 37°C so lange inkubiert, bis die Zellen sich von der Fläche ablösten. Die Zellen wurden in FCS (Primärzellen) bzw. in FCS-haltigem Medium (Zelllinien) aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren. Bei Primärzellen wurde anschließend eine Probe für die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer (s. 3.4.2) entnommen

(üblicherweise 50 µL) und die restlichen Zellen abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets in der aus der Zellzahl berechneten notwendigen Menge frischem Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturgefäße ausgesät. Die Aussaat der Zellen erfolgte nach Zelldichte pro Fläche wie in Tabelle M-3 angegeben. Die murinen Stromazelllinien SI/SI mod und M2-10B4 wurden ohne die Zellzahl zu bestimmen mit Faktor 1:15 – 1:20 verdünnt und auf neue Zellkulturgefäße ausgesät.

Tabelle M-2: Für Passagen verwendete Trypsinmengen

Zellkulturgefäß	verwendete Trypsinmenge
48-Well-Platte (= Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen), 24-Well-Platte	500 µL/Vertiefung
12-Well-Platte	1 mL/Vertiefung
Zell- & Gewebekulturflasche 25 cm²	1 mL/Flasche
Zell- & Gewebekulturflasche 75 cm²	3 mL/Flasche
Zell- & Gewebekulturflasche 175 cm²	5 mL/Flasche

Tabelle M-3: Standardaussaatdichten für Primärzellkultur (Zellen/cm²)

Zelltyp	Aussaatdichte für Kultur [Zellen/cm ²]
MSC	$5 \times 10^2 - 5 \times 10^3$
HUVEC	1×10^4
WJC	1×10^4

3.2.4 Kryokonservieren und Auftauen

Für die Lagerung von Zellen wurden diese kryokonserviert. Hierzu wurde nach dem Abtrypsinieren der adhärennten Primärzellen bzw. murinen Stromazelllinien (s. 3.2.3) die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur). Das Pellet wurde anschließend mit einer Zelldichte von 1×10^6

Zellen/mL (MSC, HUVEC, WJC) bzw. 5×10^6 – 1×10^7 Zellen/mL (SI/SI mod, M2-10B4 mod) in FCS + 10 % DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zu jeweils 1 mL in Kryoröhrchen aliquotiert. Anschließend wurden die Röhrchen in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfe auf -80°C gebracht, wo die Temperatur der Zellsuspension mit einer Rate von ca. $1^\circ\text{C}/\text{min}$ abgekühlt wurde. Nach einem Tag konnten die Kryogefäße aus der Einfrierhilfe entnommen werden. Für kurzfristige Lagerung (maximal ca. 6 Monate) verblieben die Aliquots bei -80°C , für längere Lagerzeiten wurden sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt.

HSC wurden nach der Präparation und Zellzahlbestimmung mit der gleichen Methode kryokonserviert. Als Einfriermedium wurde für diese Zellen Biseko + 10 % DMSO verwendet. Die Aliquots enthielten 1 mL Zellsuspension mit normalerweise etwa 3×10^5 Zellen. Die Zellzahl pro Einfriergefäß wurde jedoch bei einzelnen Spendern zwischen 1×10^5 und 1×10^6 variiert.

3.2.5 Kokultur von HSC mit Feederzellen

Für die vergleichende Kokultur von HSC mit unterschiedlichen Feederzellen wurde zunächst eine Mischung aus HSC 7 verschiedener Spender erstellt, um Spendervariabilitäten innerhalb des Experimentes zu vermeiden. Dabei wurde darauf geachtet, gleiche Zellzahlen von jedem der Spender einzusetzen. Die kryokonservierten HSC wurden aufgetaut und in X-Vivo 10 aufgenommen. Die Zellen wurden dann in Aliquots zu jeweils 1×10^6 lebenden Zellen in 1 mL Einfriermedium wieder kryokonserviert. Die Feederzellen, die für den Versuch verwendet werden sollten, wurden zu je 1×10^6 Zellen kryokonserviert. Diese Aliquots enthielten jeweils nur Zellen eines einzelnen Spenders, um hier gezielt die Spendervariabilität untersuchen zu können.

Am Tag vor der Aussaat der HSC wurden die Primärzellen, die als Feederzellen eingesetzt werden sollten, aufgetaut und mit einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen/cm² auf Schrägröhrchen mit einer Fläche von 10 cm² ausgesät. Pro Zelltyp und Spender wurden dabei Dreifachansätze erstellt. Um kontrollieren zu können, ob die verwendeten HSC eine ausreichende Expansionsfähigkeit besaßen, wurden als Feederzellen in einer Positivkontrolle SI/SI mod benutzt, weil diese Zellen in vorangegangenen Arbeiten (Jelinek N., 2001, Kokerbeck D., 2002, Fischbach T., 2003) gute Unterstützung der Expansion von HSC gezeigt hatten. SI/SI mod wurden mit 80 Gray in einer Gammacell-Anlage bestrahlt, um ihr Wachstum zu inhibieren. Dann wurden sie mit der selben Zelldichte wie die als Feederzellen eingesetzten Primärzellen ebenfalls im Dreifachansatz auf Schrägröhrchen ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert, damit sie an den Boden der Kulturgefäße adhären konnten.

Am nächsten Tag wurde das Medium von den Schrägröhrchen abgenommen, um im Medium schwimmende tote Zellen zu entfernen. Die adhären Zellen in den Röhrchen wurden mit PBS gewaschen. Auf die Feederzellen in jedem Schrägröhrchen wurde eine Zellsuspension mit jeweils 5×10^3 frisch aufgetauten HSC in 3 mL HSC-Medium (s. 3.2.2) ausgesät, was einem Zellzahlverhältnis von 1 HSC:20 Feederzellen entsprach. Um den Anteil koloniebildender Zellen und früher Vorläuferzellen in den verwendeten HSC zu prüfen, wurde ein Teil dieser Zellen für CFC- und CAFC-Assays verwendet (s. 3.4.5). Vom Medium wurde eine Probe für die Medienanalytik (s. 3.4.3) entnommen. Die Kokulturen aus Feederzellen und HSC wurden für 7 Tage im Brutschrank kultiviert.

Am achten Tag wurde das Medium von den Schrägröhrchen abgenommen und in 15-mL-Reaktionsgefäßen gesammelt, wobei pro Schrägröhrchen ein Reaktionsgefäß verwendet wurde. Eine Probe des Kulturüberstandes wurde für die Medienanalytik aufbewahrt. Jedes Schrägröhrchen wurde einzeln mit PBS gewaschen und die Waschlösung mit dem zuvor gesammelten Medium vereinigt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (200 g, 10 min,

Raumtemperatur), die Pellets in je 1 mL PBS aufgenommen und die Zellzahl der HSC und der daraus entstandenen Zellen mittels Zählung in der Neubauer-Zählkammer (s. 3.4.2) bestimmt. Danach wurden die Proben aus den drei Schrägröhrchen, die dieselben Feederzellen enthalten hatten, vereinigt, abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur), wieder in 1 mL PBS aufgenommen und nochmals in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Aus dieser wurden die notwendigen Volumina der Zellsuspension für CFC- und CAFC-Assay berechnet und die Zellen für diese Assays ausgesät.

3.3 Verwendete Primärzellen und Zelllinien

3.3.1 Primärzellen

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) aus Nabelschnurblut

Nabelschnurblutproben für die Gewinnung von HSC wurden mit der Genehmigung der Eltern nach der Geburt eines Kindes entnommen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proben stammen aus dem Malteser-Krankenhaus Jülich, dem Krankenhaus Frechen, dem Maria-Hilf-Krankenhaus Mönchengladbach sowie dem Marienhospital Aachen. Von der Blutentnahme bis zum Beginn der Präparation wurde das Blut auf Raumtemperatur für höchstens 24 h gelagert und transportiert. Ausschließlich Proben mit einem Volumen von mindestens 10 mL wurden für Präparationen verwendet.

Für die Entnahme des Nabelschnurrestblutes wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Entweder wurde es aus der offenen Nabelschnurvene in ein 50-mL-Reaktionsgefäß, das 1 mL PBS mit 1000 U Heparin als Gerinnungshemmer enthielt, getropft, oder die abgeklemmte Nabelschnurvene wurde mit einer Kanüle punktiert und das Blut in einen Nabelschnurblutbeutel mit 20 mL Citratlösung geleitet.

Für die Gewinnung der MNC aus dem Nabelschnurblut wurden in ein LeucoSep-Röhrchen 15 mL Ficoll-Lösung (Dichte: 1,077 g/mL) pipettiert. Diese Lösung wurde durch die Trennscheibe der Röhrchen hindurch nach unten zentrifugiert, so dass sich die Ficoll-Lösung komplett unterhalb der Trennscheibe befand. Pro LeucoSep-Röhrchen wurden dann bis zu 35 mL Nabelschnurblut auf die Trennscheibe geschichtet. Hatten die Proben ein größeres Volumen, wurden mehrere LeucoSep-Röhrchen mit Ficoll-Lösung verwendet. Die Röhrchen wurden für 15 min mit 800 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, wobei die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet wurde, um den entstandenen Gradienten nicht zu zerstören.

Durch die Zentrifugation trennte sich die Lösung in eine klare Plasmaphase (oben), eine weißlich-flockige Interphase (Mitte), den so genannten "buffy coat", und eine durch Erythrozyten rotgefärbte Unterphase auf. Die Plasmaphase wurde abgenommen und verworfen. Der "buffy coat", der die gewünschten MNC enthielt, wurde in ein frisches 50-mL-Reaktionsgefäß überführt. Waren große Nabelschnurblutproben zuvor auf mehrere LeucoSep-Röhrchen verteilt worden, wurden nun die Zellen aus zwei der Gradienten vereinigt. Die Reaktionsgefäße mit den Zellen wurden bis 50 mL mit PBS aufgefüllt, um die Zellen zu waschen, und zentrifugiert (15 min, 400 g, Raumtemperatur, dieser und alle weiteren Zentrifugationsschritte mit eingeschalteter Bremse). Der Überstand wurde in ein frisches 50-mL-Reaktionsgefäß überführt, das Zellpellet mit weiteren 50 mL PBS aufgefüllt und beide Gefäße nochmals abzentrifugiert (15 min, 400 g, Raumtemperatur). Die Zellpellets wurden vereinigt und in 1 mL PBS aufgenommen. Aus dieser Zellsuspension wurde die Zellzahl mittels CASY oder ViCell XR (s. 3.4.2) bestimmt.

Die weitere Aufreinigung der CD34-positiven Zellen aus den mononukleären Zellen erfolgte mit dem MACS-System nach Protokollen des Herstellers. Hierzu wurden die Zellen wiederum abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur) und in HSA-MACS-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden mit FcR-Blocking-Reagenz und mit an paramagnetische

Microbeads gekoppelte, gegen das Oberflächenantigen CD34 gerichtete Antikörpern versetzt (s. Tabelle M-4). Die Zellsuspension wurde für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Tabelle M-4: Eingesetzte Volumina für MACS-Isolation von CD34-positiven Zellen

Zellzahl MNC	Volumen HSA-MACS-Puffer	Volumen Microbeads bzw. FcR-Blocking-Reagenz
1,0x10⁸ – 1,5x10⁸	900 µL	100 µL
bis 2,0x10⁸	850 µL	150 µL
über 2,5x10⁸	750 µL	250 µL

Danach wurde die Zellsuspension mit 10 mL HSA-MACS-Puffer aufgefüllt und für 10 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL HSA-MACS-Puffer aufgenommen und auf eine vorbereitete, durch Spülen mit HSA-MACS-Puffer äquilibrierte MACS-Säule, die in einem starken Magnetfeld positioniert war, pipettiert. Hierbei befand sich auf der Säule ein Sieb, um ein Verstopfen der Säule durch eventuell noch in der Zellsuspension enthaltene Klümpchen zu verhindern. Der Durchlauf der Säule wurde in einem Röhrchen aufgefangen. Die Säule wurde dreimal mit HSA-MACS-Puffer gewaschen. Dann wurde das unter der Säule stehende Röhrchen gegen ein frisches ausgetauscht und die Säule aus dem Magnetfeld entfernt. Mit Hilfe des zur Säule gehörigen Stempels wurden die Zellen mit HSA-MACS-Puffer eluiert. Diese Aufreinigungsschritte wurden mit einer zweiten Säule wiederholt, um die Reinheit der Zellen zu steigern.

Vom Eluat der zweiten Säule wurde die Zellzahl mittels CASY bzw. ViCell XR (s. 3.4.2) bestimmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur) und kryokonserviert (s. 3.2.4). Für Versuche wurden jeweils frisch aufgetaute HSC eingesetzt.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) aus Nabelschnurblut

Nabelschnurblutproben wurden ebenso entnommen und behandelt wie für die Präparation von HSC beschrieben. Für die Gewinnung von MSC aus Nabelschnurblut wurden entweder MNC nach der Dichtegradientenzentrifugation oder der Durchlauf der MACS-Aufreinigung (s. 3.3.1) verwendet. Diese Proben wurden auf Zellkulturflaschen oder -platten ausgesät, wofür verschiedene Medien verwendet wurden (s. 4.1.1). Die Zellen wurden für 2 Tage im Brutschrank inkubiert, anschließend das Medium abgenommen, die adhären gewordenen Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen. Es folgte weitere Inkubation im Brutschrank mit wöchentlichen Medienwechseln. Da in keinem Experiment die Konfluenz der Zellen erreicht wurde, mussten keine Passagen durchgeführt werden.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) aus Knochenmark

Die Methoden und Medien für die Präparation von MSC aus Knochenmark wurden von Claudia Lange (AG Professor Zander, Einrichtung für Knochenmarktransplantation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) übernommen. Auch die Knochenmarkproben wurden freundlicherweise von diesem Institut zur Verfügung gestellt. Heparinisiertes Knochenmark wurde 1:2 mit PBS verdünnt, gemischt und anschließend auf 15 mL Ficoll geschichtet. Die Proben wurden bei 800 g für 20 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten sich eine klare Oberphase, eine weißliche, die MNC beinhaltende Interphase (= "buffy coat") und eine erythrozytenhaltige Unterphase. Die zellhaltige Interphase wurde mit einer 5-mL-Einwegpipette vorsichtig abgesaugt und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 2 – 3-mal mit PBS gewaschen und jeweils bei 200 g für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 5 mL frischem Medium (s. Tabelle M-1) aufgenommen und eine Probe für die Zellzahlbestimmung entnommen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen/cm² auf Zellkulturflaschen ausgesät und für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit den nicht adhärenierten Zellen aus den Flaschen entfernt, die

adhärenten Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium in die Flaschen gefüllt. Es folgte eine weitere Inkubation der Zellen mit einmal wöchentlichem Mediumwechsel, bis die Zellen konfluent geworden waren und passagiert werden konnten. Für Experimente wurden nur MSC verwendet, die zuvor höchstens zehnmal passagiert worden waren.

Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (human umbilical cord vein endothelial cells = HUVEC)

Nabelschnurproben für die Präparation von HUVEC wurden mit der Zustimmung der Eltern entnommen. Die verwendeten Proben stammten aus dem Malteser-Krankenhaus Jülich, dem Maria-Hilf-Krankenhaus Mönchengladbach sowie dem Marienhospital Aachen. Die Präparationsmethode wurde nach Jaffe E. A. *et al.*, 1973, adaptiert.

Nach dem Abgang der Plazenta wurde die Nabelschnur von dieser abgetrennt und in ein Gefäß mit Transportpuffer (PBS + 10 U/mL Heparin) überführt. Bis zum Beginn der Präparation, maximal jedoch 24 Stunden, wurden die Nabelschnüre auf Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die Präparation wurde die Nabelschnur unter der Sterilbank in eine Petrischale (Durchmesser 15 cm) überführt. Beide Enden der Nabelschnur wurden mit einer Schere geradegeschnitten und Teile, die große Thromben und Rupturen in den Gefäßwänden aufwiesen, entfernt. Für die Präparation von HUVEC wurden nur Nabelschnurstücke verwendet, die nach dieser Prozedur noch mindestens 10 cm lang waren. Ein Ende der Vene wurde mittels zweier Pinzetten aufgedehnt und ein Luer-Lock-Adapter w/w mit auf der nach außen zeigenden Seite aufgeschraubtem Stopper so weit in die Vene eingeführt, dass er mit einem sterilen Kabelbinder fixiert werden konnte. Dieser Vorgang wurde am anderen Ende der Nabelschnur wiederholt. Die Stopper wurden von den Adaptern entfernt und stattdessen eine mit PBS gefüllte 10-mL-Einwegspritze auf einen der Adapter aufgeschraubt.

Die Vene wurde nun abwechselnd von beiden Seiten mit PBS gespült, bis Reste von Blut und kleinere noch in der Vene enthaltene Thromben ausgewaschen waren und die aus der Vene kommende Flüssigkeit klar blieb. Danach wurden von beiden Seiten der Vene trypsingefüllte Spritzen aufgeschraubt und die Vene so lange mit Trypsin befüllt, bis sich darin so viel Druck aufgebaut hatte, dass das Trypsin an die Gefäßwände gepresst wurde. Die Nabelschnur wurde mit den daran fixierten Spritzen in eine frische Petrischale überführt und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin auf beiden Seiten aus der Nabelschnur in die Spritzen gezogen und in ein 50-mL-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde mit frischen Spritzen FCS in die Vene gefüllt und einige Male unter leichtem Massieren der Nabelschnur hin- und hergepumpt, um die Ablösung der Endothelzellen von den Venenwänden zu erleichtern. Das FCS wurde mit dem zuvor aus der Vene entnommenen Trypsin vereinigt und der Spülvorgang mit FCS mehrfach wiederholt. Die zellhaltige Suspension aus Trypsin und FCS wurde abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium (s. Tabelle M-1) aufgenommen. Die Zellen wurden in eine Zellkulturflasche (Fläche 25 cm²) überführt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium mit den nicht adhären Zellen aus der Flasche entnommen und verworfen. Die adhären Zellen wurden ein- bis zweimal mit PBS gespült, um verbliebene Erythrozyten zu entfernen. Anschließend wurde frisches Medium in die Flaschen gegeben und die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Für Experimente wurden nur HUVEC eingesetzt, die sechsmal oder weniger häufig passagiert worden waren.

Zellen aus dem Matrixgewebe der Nabelschnur (Wharton's Jelly-Cells = WJC)

Die Nabelschnüre für die Präparation von WJC stammten aus denselben Quellen und wurden bis zum Beginn der Präparation identisch behandelt wie die für die Präparation von

HUVEC verwendeten. Die Präparationsmethode für WJC wurde nach Mitchell K. E. *et al.*, 2003, adaptiert.

Die Enden der Nabelschnüre wurden wie bei der HUVEC-Präparation beschrieben entfernt, um die Kontaminationsgefahr zu verringern. Anschließend wurden mit der Schere schmale Scheiben von der Nabelschnur abgeschnitten und mit PBS beträufelt, um sie feucht zu halten. Die Scheiben wurden in Stücke geschnitten und diese Stücke mit zwei Skalpellenspitzen mit gerader Klinge weiter zerkleinert, bis jedes einzelne Gewebefragment einen Durchmesser von ca. 1 mm hatte. Diese Stücke wurden auf Zellkulturplatten (12, 24 oder 48 Vertiefungen), in denen bereits frisches Medium (s. Tabelle M-1) vorgelegt war, verteilt, wobei pro Vertiefung der Platte jeweils ein einzelnes Gewebestück verwendet wurde. Die Platten wurden im Brutschrank für 7 Tage inkubiert, damit die Zellen aus den Gewebestücken sich auf dem Boden der Vertiefungen adhären konnten. Anschließend wurden die Gewebestücke und das Medium aus den Vertiefungen entfernt und frisches Medium auf die Platten gegeben. Wöchentlich wurde einmal das Medium gewechselt, bis die Zellen in den Vertiefungen konfluent geworden waren und passagiert werden konnten. Für Versuche wurden nur WJC verwendet, die weniger als 15-mal passagiert worden waren.

3.3.2 Murine Stromazelllinien

Beide im Folgenden beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit verwendeten murinen Stromazelllinien sind für nichtkommerzielle Zwecke über die Firma StemCell Technologies Ltd, Vancouver, Kanada, erhältlich.

SI/SI (IL-3, SCF) = SI/SI mod

SI/SI ist eine stromale Zelllinie, die aus Mausembryonen gewonnen wurde, in denen beide Kopien des Gens für SCF durch inaktive Varianten ersetzt waren (Sutherland H. J. *et al.*, 1993). Die Zellen wurden genetisch so verändert, dass sie die humanen Wachstumsfaktoren

IL-3 und SCF produzieren (SI/SI mod). Es wurde beschrieben, dass die Zellen die humane Myelopoese im LTC-IC-Assay (s. 2.4) unterstützen (Hogge D. E. *et al.*, 1996).

M2-10B4 (IL-3, G-CSF) = M2-10B4 mod

Die Zelllinie M2-10B4 mod wurde durch gentechnische Veränderung aus der murinen stromalen Zelllinie M2-10B4 (ATCC-Nummer CRL-1972) gewonnen. Die Ursprungszelllinie stammt aus dem Knochenmark einer (C57BL/6J x C3H/HeJ)-F1-Maus (Lemoine F. M. *et al.*, 1988). Bereits von M2-10B4 wurde festgestellt, dass diese Zellen die humane Myelopoese in Langzeitkulturen unterstützen (Sutherland H. J. *et al.*, 1991, Hogge D. E. *et al.*, 1996). M2-10B4 wurde so modifiziert, dass die Zellen die humanen Wachstumsfaktoren IL-3 und G-CSF produzieren. Die dadurch entstandene M2-10B4 mod wurde als tauglich für den LTC-IC-Assay (s. 2.4) beschrieben (Hogge D. E. *et al.*, 1996).

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Lichtmikroskopie und Fotografieren

Das Mikroskopieren der Zellen erfolgte an Lichtmikroskopen mit Phasen- oder Varelkontrast. Üblicherweise wurde dabei mit 100facher Vergrößerung gearbeitet. Fotografien der Zellen wurden mittels einer über einen Adapter an das Mikroskop angeschlossenen Kamera aufgenommen. Hierfür wurde zumeist ein Objektiv mit 10facher Vergrößerung verwendet (an den entsprechenden Abbildungen angegeben).

3.4.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl in Suspensionen wurden neben der Neubauer-Zählkammer auch die automatischen Zellzählgeräte CASY und ViCell XR eingesetzt. Hierbei wurde die Neubauer-Zählkammer immer dann verwendet, wenn das zur Verfügung stehende Volumen

der Zellsuspension bzw. die erwartete Gesamtzellzahl für eine Zählung mit den automatischen Zellzählgeräten, die große Probenvolumina erfordern, zu gering waren. Das zu Anfang der Arbeit eingesetzte CASY konnte für spätere Messungen aufgrund eines Defektes nicht mehr verwendet werden und wurde daher durch das ViCell XR ersetzt. Beide Geräte lieferten äquivalente Ergebnisse bei ähnlicher Probengröße und konnten daher für die gleichen Experimente benutzt werden. Die im Einzelfall für ein bestimmtes Experiment angewendeten Methoden sind in den jeweiligen Textabschnitten angegeben.

Neubauer-Zählkammer

Für die Zählung in der Neubauer-Zählkammer wurde den zu zählenden Zellen ein Aliquot entnommen (üblicherweise 50 µL) und mit der gleichen Menge Trypanblau versetzt. Die Zählkammer wurde vorbereitet, indem das Deckglas so auf die Kammer gesetzt wurde, dass sich auf den leicht befeuchteten Auflageflächen die so genannten Newton'schen Ringe bildeten. Dadurch wurde garantiert, dass die Höhe der Kammer überall gleichmäßig war und das Kammervolumen dem vom Hersteller angegebenen entsprach. Die mit dem Trypanblau gleichmäßig vermischte Zellsuspension wurde vorsichtig an den Rand der Kammer aufgetragen, so dass sich die Suspension in die Kammer hineinsaugte und luftblasenfrei die Fläche bedeckte. Die Zählkammer wurde auf einem Lichtmikroskop bei 100facher Gesamtvergrößerung unter Phasenkontrast mikroskopiert. Die Zellzahl auf jeweils 4 Großquadraten wurde bestimmt. Hierbei wurden die mit Trypanblau angefärbten und somit blau erscheinenden Zellen als tot, die ungefärbten Zellen als lebend gezählt. Die auf den einzelnen Großquadraten ermittelten Zellzahlen wurden aufsummiert und die Zelldichte in der Ursprungslösung nach folgender Formel bestimmt:

Zellzahl in der Ursprungslösung/mL = (Gesamtzahl lebende Zellen auf 4 Großquadraten / 4 Großquadrate) x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor

$$Z/mL = (\text{durchschnittliche Lebendzellzahl/Großquadrat}) \times 2 \times 10^4$$

Die Viabilität der Zellen wurde ermittelt, indem die Durchschnittslebendzellzahl aus den gezählten Großquadraten durch die Durchschnittsgesamtzellzahl (= lebende + tote Zellen) aus denselben Großquadraten geteilt wurde. Das Ergebnis wurde als Prozentzahl dargestellt.

Die Volumina Zellsuspension, die für Neuaussaaten, Versuchsansätze etc. notwendig waren, wurden grundsätzlich aus der Lebendzellzahl, nicht der Gesamtzellzahl, berechnet.

CASY

Alternativ zur Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wurde das elektronische Zellzählgerät CASY verwendet. Die Proben der Zellsuspension wurden für diese Messungen mit isotonischer Lösung (CASYton oder sterilfiltriertes PBS) verdünnt.

Das Gerät bestimmt die Zellzahl in einer Probe basierend auf dem Prinzip der Widerstandsänderung. Dazu wird die Zellsuspension durch eine Messkapillare geleitet, an der eine Spannung angelegt ist. Beim Durchtritt einer Zelle durch die Kapillare ändert sich der Widerstand und damit der Strom, der vom Gerät registriert wird. Die Anzahl der vom Gerät aufgenommenen Impulse ergibt die Zellzahl in der Probe.

ViCell XR

Das ViCell XR-Gerät diente ebenfalls zur automatisierten Bestimmung der Zellzahl. Für die Messung in diesem Gerät konnte die Zellsuspension entweder unverdünnt oder verdünnt mit isotonischer Lösung (PBS oder Kulturmedium) eingesetzt werden.

Im ViCell XR werden sowohl Zellzahl als auch -vitalität optisch bestimmt. Hierzu wird zunächst die Zellsuspension mit Trypanblau (enthalten im Reagent Pack) verdünnt und durch eine Flusszelle geleitet. In dieser Flusszelle werden mittels einer CCD-Kamera 50 digitale Bilder von den durchströmenden Zellen aufgenommen. Die zum Gerät gehörende

Software wertet die Bilder anschließend aus, wobei unter anderem der Durchmesser (entspricht der Zellgröße), die "Rundheit" (entspricht der Zellform) und die Helligkeit (entspricht der Färbung/Nichtanfärbung mit Trypanblau) der einzelnen Partikel bewertet werden. Anhand von Parametern, die der Benutzer je nach getestetem Zelltyp einstellen muss, wird aus den Bildern die in der Probe enthaltene Anzahl der lebenden (ungefärbten) und toten (mit Trypanblau gefärbten) Zellen sowie deren Viabilität errechnet.

3.4.3 Medienanalytik

Für die Medienanalytik wurden zellfreie Kulturüberstände verwendet. Hierfür wurden Proben aus den entsprechenden Gefäßen entnommen und in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (200 g, 7 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde für die Medienanalytik verwendet, wobei die Proben bis zur Messung bei -80°C aufbewahrt wurden.

Die Geräte zur Messung des Gehaltes von Glukose, Laktat, Glutamin und Glutamat im Medium arbeiten nach dem enzymatisch-amperometrischen Messprinzip. Durch enzymatische Umsetzung des jeweils zu bestimmenden Stoffes an einer Membran mit immobilisiertem Enzym wird Wasserstoffperoxid (H_2O_2) freigesetzt. Dieses zerfällt an einer Platinelektrode zu 2H^+ , Sauerstoff (O_2) und zwei Elektronen (e^-). Die Elektronen erzeugen hierbei einen Stromfluss, der zur Konzentration des Wasserstoffperoxids und damit auch zur Konzentration des jeweiligen zu messenden Stoffes direkt proportional ist.

Glukose

Für die Messung des Glukosegehalts der Proben wurde das Gerät EBIO compact verwendet. In diesem Gerät erfolgt die Umsetzung der Glukose an der Membran durch das Enzym Glukoseoxidase, das die Glukose zu Glukonsäure und H_2O_2 umsetzt.

Laktat

Der Laktatgehalt in den Proben wurde mit einem Laktat-Analysator bestimmt. Das an der Membran dieses Gerätes immobilisierte Enzym Laktatoxidase setzt das in den Proben enthaltene Laktat zu Pyruvat und H_2O_2 um.

Glutamin und Glutamat

L-Glutamin und L-Glutamat wurden simultan im Glutamin-/Glutamat-Analysator bestimmt. Dieses arbeitet mit zwei Sensoren mit jeweils einer Membran. Einer der Sensoren bestimmt den L-Glutamatgehalt der Probe, indem das L-Glutamat durch die an der Membran immobilisierte Glutamatoxidase zu α -Ketoglutarat, H_2O_2 und NH_3 umgesetzt wird. Das L-Glutamin wird mittels zweier an der Membran immobilisierter Enzyme zunächst zu L-Glutamat und NH_3 (entsprechendes Enzym: Glutaminase) und anschließend das L-Glutamat zu α -Ketoglutarat, H_2O_2 und NH_3 umgesetzt. Da das bereits zuvor in der Probe vorhandene, freie L-Glutamat bei der zweiten Reaktion dieser Messung mitbestimmt wird, wird der von der Glutamatsonde bestimmte Wert (nur freies L-Glutamat) von dem Wert der Glutaminsonde (freies L-Glutamat + durch die erste Enzymreaktion aus L-Glutamin entstandenes L-Glutamat) abgezogen, um den reinen L-Glutamin-Wert zu erhalten.

3.4.4 FACS-basierte Methoden

Alle Messungen von mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbten Antigenen in Zellen oder auf der Zelloberfläche wurden in einem FACSCalibur durchgeführt. Als Hüllstrom-Flüssigkeit wurde FACSFlow oder PBS verwendet. Die Daten wurden mit dem Programm CellQuest aufgenommen und ausgewertet.

Oberflächenmarkerfärbung

Für die Färbung von Oberflächenmarkern auf Zellen wurden adhärente Zellen zunächst durch Trypsinieren in Suspension gebracht (s. 3.2.3), in FCS aufgenommen und eine Probe für die Zellzählung entnommen. Während die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde (s. 3.4.2), wurden die restlichen Zellen abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur). Suspensionszellen wurden aus der Kultur bzw. dem Versuchsansatz entnommen, ebenfalls die Zellzahl bestimmt und die übrigen Zellen abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur).

Das Zellpellet wurde in PBS aufgenommen und auf FACS-Röhrchen verteilt, wobei ein Röhrchen normalerweise zwischen $1 \cdot 10^5$ und $5 \cdot 10^5$ Zellen enthielt. Wiederum wurden die Zellen abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einer Mischung aus PBS und den jeweils gewünschten Antikörpern (s. 7.4.5) in den vom Hersteller angegebenen oder selbst austitrierten Konzentrationen aufgenommen. Das Gesamtvolumen der Antikörperlösung betrug jeweils 100 μL (für T-Zell-Stimulationsexperimente s. 3.4.5: 50 μL). Die Zellen wurden für ca. 20 min im Dunkeln bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit jeweils 1 mL PBS gewaschen, abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Um die Zellen zu fixieren, wurde das Zellpellet in FACSfix-Gebrauchslösung resuspendiert. Die gefärbten und fixierten Zellen konnten nun direkt für die FACS-Messung verwendet oder für maximal eine Woche bei 4°C aufbewahrt werden, bevor die Messung der Fluoreszenz der gefärbten Zellen im FACSCalibur erfolgte.

3.4.5 Funktionelle Charakterisierung

HSC

Koloniebildende Zellen: Colony-forming Cell-Assay (CFC-Assay)

Für die Analyse des Anteils an koloniebildungsfähigen Vorläuferzellen in den aus Nabelschnurblut gewonnenen und z.T. durch Kokultur vermehrten hämatopoetischen Zellen wurde der CFC-Assay (colony-forming cell-Assay) herangezogen. Die Zellen (Zellzahlen s. Tabelle M-5) wurden hierfür in IMDM verdünnt und mit Methylzellulose-Medium im Verhältnis 1 Teil Zellsuspension:10 Teile Methylzellulose-Medium gemischt. Jeweils 1 mL dieser Methylzellulose-Zellsuspension wurde auf eine Zellkultur-Petrischale mit Durchmesser 3,5 cm ausgesät. Je zwei Petrischalen mit Methylzellulose-Zellsuspension und eine weitere, offene Schale mit sterilem Wasser wurden in eine Petrischale mit Durchmesser 9,7 cm gestellt und für 14 Tage im Brutschrank kultiviert. Die entstandenen Kolonien wurden mit einer Stereolupe nach den Kriterien der Herstellerfirma des Methylzellulose-Mediums beurteilt und ausgezählt (Abbildung M-1). So konnte die Anzahl koloniebildender Zellen in der Ausgangs-Zellsuspension berechnet werden.

Tabelle M-5: Zellzahlen für Aussaat von CFC-Assays

Probe	Zellzahl/Petrischale
frisch aufgetaut (d. 0)	100
Nach Kultur (d. 7)	300

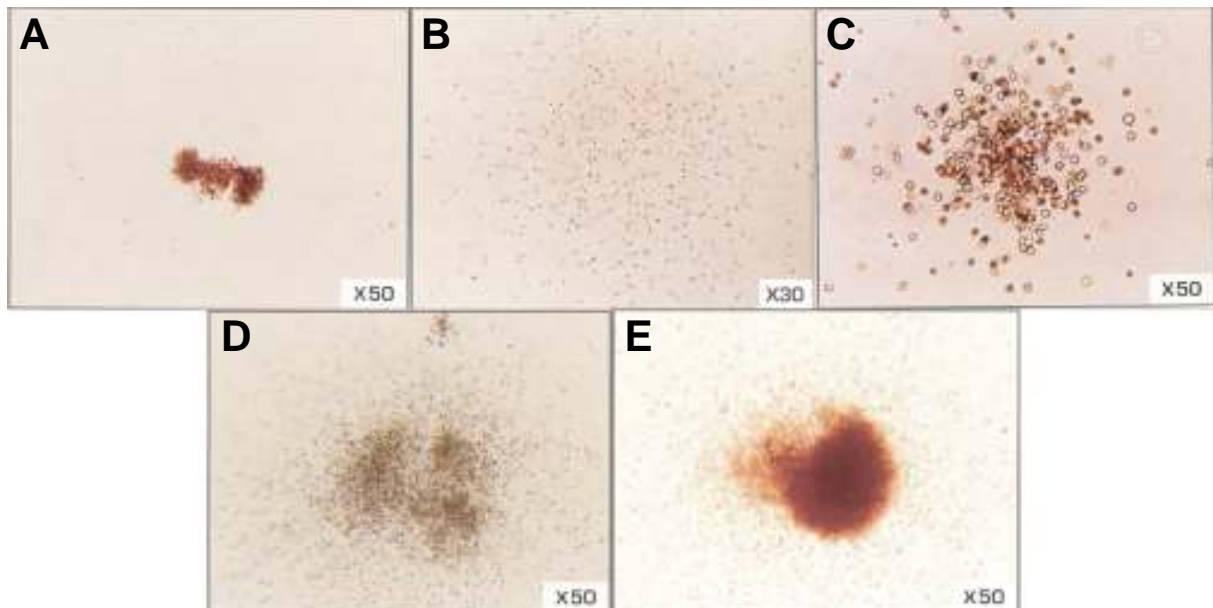


Abbildung M-1: Typische Morphologie hämatopoetischer Kolonien in semisolidem Medium (Bilder aus Eaves A. C. und Lambie K., 1995) – A: BFU-E, B: CFU-G, C: CFU-M, D: CFU-GM, E: CFU-GEMM; Vergrößerung jeweils im Bild angegeben

Cobblestone-Area Forming Cell-Assay (CAFC-Assay)

Der Anteil der frühen Vorläuferzellen konnte in den aus Nabelschnurblut gewonnenen und z.T. durch Kokultur vermehrten hämatopoetischen Zellen anhand der Fähigkeit der frühen Vorläuferzellen, kopfsteinpflasterartige Kolonien zu bilden, bestimmt werden. Die Zellen mit dieser Fähigkeit werden als cobblestone-area forming cells (CAFC) bezeichnet (Ploemacher R. E., 1997). Der Anteil dieser Zellen in einer Zellsuspension wurde wie folgt bestimmt.

Am Tag vor der Aussaat der hämatopoetischen Zellen wurden 96-Well-Platten in der äußersten Reihe der Vertiefungen mit Wasser befüllt, um ein späteres Austrocknen der Zellen zu verhindern. Zellen der murinen stromalen Zelllinien SI/SI mod und M2-10B4 mod wurden geerntet und mit 80 Gray in einer Gammacell-Anlage bestrahlt, um ihr Wachstum zu inhibieren. In die noch verbliebenen Vertiefungen der Platte (6 Reihen mit jeweils 10 Vertiefungen) wurden jeweils 6×10^3 Zellen von jeder der beiden murinen Stromazelllinien in einem Gesamtvolumen von 100 μL CAFC-Medium pro Vertiefung ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am folgenden Tag (d. 0 oder d. 7 des jeweiligen Kokulturversuchs) wurden die hämatopoetischen Zellen auf die vorbereiteten Platten in 6 aufeinanderfolgenden Verdünnungsschritten ausgesät (Zellzahlen/Vertiefung s. Tabelle M-6). Die Zellsuspension hierfür wurde ebenfalls in CAFC-Medium hergestellt und mit einem Volumen von 100 µL/Vertiefung auf die Platten verteilt. Die Platten wurden für 6 Wochen im Brutschrank inkubiert, wobei einmal wöchentlich die Hälfte des Mediums in jeder Vertiefung durch frisches Medium ersetzt wurde. Nach dieser Zeit wurde die Anzahl der Vertiefungen bestimmt, in denen sich kopfsteinpflasterförmige, aus mindestens 6 Zellen bestehende Kolonien gebildet hatten. Diese wurden als „positiv“, die Vertiefungen ohne diese Kolonien als „negativ“ bewertet. Aus der Verdünnung und der Anzahl negativer Vertiefungen konnte die Frequenz der CAFCs in der Ausgangszellsuspension errechnet werden. Dazu wurde die Anzahl der pro Vertiefung ausgesäten hämatopoetischen Zellen gegen den prozentualen Anteil der bei dieser Aussaatdichte gezählten negativen Vertiefungen aufgetragen. Aus diesem Diagramm wurde eine Ausgleichsgerade berechnet, anhand deren Steigung die Frequenz der CAFC in den ausgesäten Zellen bestimmt wurde.

Tabelle M-6: Zellzahlen und Plattenanzahl für CAFC-Assay

Verdünnungsschritt (Reihe)	Zellen/Vertiefung ausgesät an	
	d. 0	d. 7
1	243	1215
2	81	405
3	27	135
4	9	45
5	3	15
6	1	5
ausgesäte Platten pro Versuchsansatz	4	2

MSC

Differenzierungsassays

Die Versuche zur Differenzierung von MSC wurden von Claudia Lange (AG Professor Zander, Einrichtung für Knochenmarktransplantation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt. Der experimentelle Ablauf folgte hierbei den Veröffentlichungen von Pittenger M. F. *et al.*, 1999 (adipogene Differenzierung), Jaiswal N. *et al.*, 1997 (osteogene Differenzierung) und Shakibaei M. und De Souza P., 1997 (chondrogene Differenzierung). Die Prinzipien der Differenzierungsassays sind im folgenden kurzen Überblick beschrieben.

Für die adipogene Differenzierung wurden die Zellen mit 1-Methyl-3-Isobutylxanthin, Dexamethason und Indomethacin in DMEM mit 10 % FCS stimuliert. Die Inkubation im Differenzierungsmedium erfolgte für 2 Wochen, danach wurden die in den Zellen entstandenen Lipidvesikel mittels Sudan-Rot-Färbung sichtbar gemacht.

Die osteogene Differenzierung der Zellen erfolgte mittels Stimulation mit Dexamethason, Natrium- β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure-2-Phosphat in DMEM. Nach 2 Wochen wurde eine Färbung mit Silbernitrat durchgeführt, um von den Zellen während ihrer Differenzierung abgelagerte Calciumkonglomerate nachzuweisen.

Um die chondrogene Differenzierung der Zellen zu induzieren, wurden diese in Alginate-Kügelchen eingebettet, wobei als Medium Ham's F12/DMEM (50:50) mit 10 % FCS und Ascorbinsäure als Differenzierungsstimulus verwendet wurde. Die Bildung des für Chondrocyten typischen Matrixproteins Glukosaminoglykan wurde nach zweiwöchiger Kultivierung mittels Färbung mit Alcianblau nachgewiesen.

WJC

Koloniebildende, fibroblastähnliche Zellen: Colony-forming Units – Fibroblast (CFU-F)

Die Bildung von so genannten CFU-F gilt als Indiz für das Vorhandensein mesenchymaler Stammzellen in Knochenmark und daraus abgeleiteten Zellen (Castro-Malaspina H. *et al.*, 1980). Mit diesem Experiment wurde untersucht, ob auch WJC die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien aus fibroblastförmigen Zellen aufwiesen.

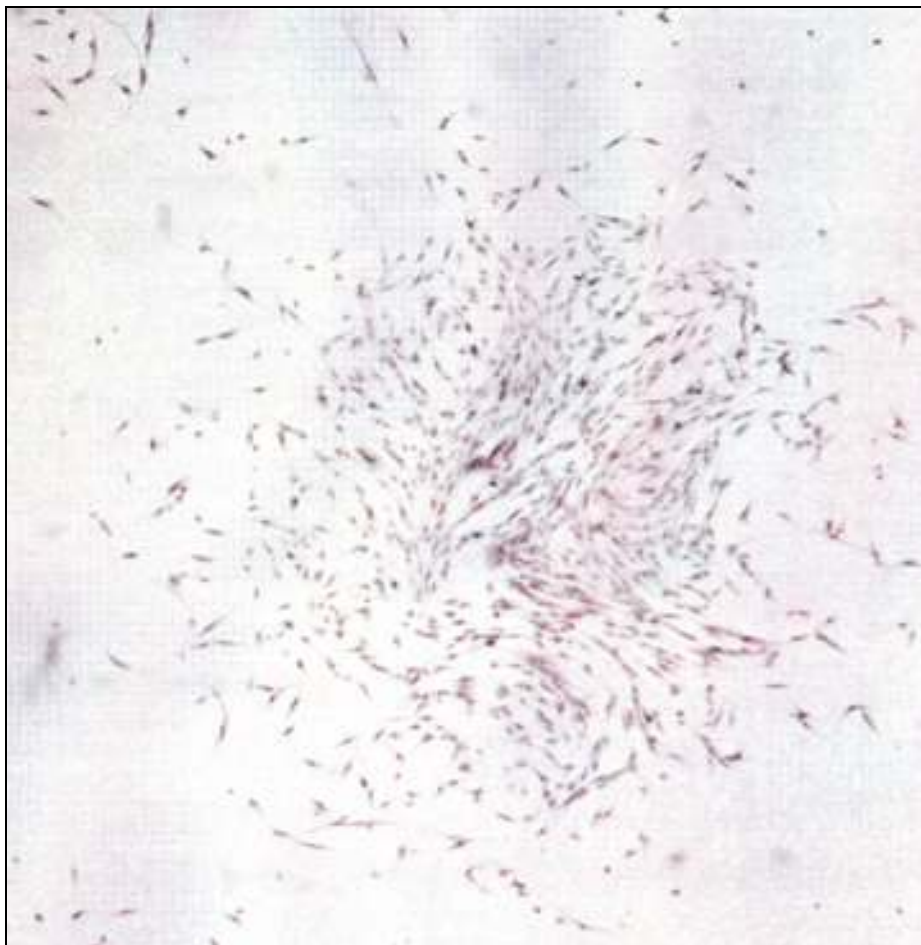


Abbildung M-2: CFU-F (Bild aus SCT, 2002) – Originalvergrößerung 25fach

Dazu wurden WJC mit einer Dichte von 1×10^2 – 1×10^4 Zellen / cm^2 in DMEM + 10 % FCS oder ECGM auf Zellkulturflaschen der Fläche 25 cm^2 ausgesät und für 2 Wochen im Brutschrank kultiviert. Dann wurde das Medium abgenommen, die adhärennten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Methanol für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Das Methanol wurde verworfen und die Zellen bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

Danach wurden die Zellen für 5 min mit Giemsa-Lösung gefärbt und danach mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie erneut luftgetrocknet wurden. Durch diese Färbung werden CFU-F als mit bloßem Auge erkennbare Kolonien von Zellen sichtbar, wobei die Zellen fibroblastförmige Morphologie aufweisen. Dies lässt sich mikroskopisch kontrollieren (Abbildung M-2). Anhand der Anzahl der entstandenen Kolonien kann man die Frequenz der koloniebildenden Zellen in der Ausgangssuspension berechnen.

Stimulierung allogener T-Zellen durch Feederzellen ("mixed lymphocyte reaction")

Um zu testen, ob die Feederzellen in der Lage waren, allogene T-Zellen zu stimulieren, wurde eine von Nguyen X. D. *et al.*, 2003, entwickelte Methode in leicht abgewandelter Form eingesetzt. Diese liefert laut den Autoren ähnliche Ergebnisse wie herkömmliche zur Messung der T-Zell-Aktivierung verwendete Methoden, wie zum Beispiel die Messung der BrdU-Inkorporation.

Tabelle M-7: Zellzahlen Feederzellen für die Aussaat in T-Zell-Stimulationsexperimenten

Zellzahlverhältnis Feederzellen:PBMC	Zellzahl Feederzellen/Vertiefung
0:1 (Negativkontrolle)	0
0:1 (Positivkontrolle)	0
1:1	1×10^6
1:5	2×10^5
1:10	1×10^5
1:20	5×10^4
1:40	$2,5 \times 10^4$

Zunächst wurden die potentiellen Feederzellen in ihrem Standardkulturmedium auf einer 48-Well-Zellkulturplatte ausgesät (Zellzahlen s. Tabelle M-7). Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium von den adhären gewordenen

Zellen abgenommen, die Vertiefungen mit PBS gewaschen und eine Zellsuspension mit 1×10^6 aus peripherem Blut gewonnenen MNC (peripheral blood mononuclear cells = PBMC) in je 500 μL IMDM mit 10 % FCS pro Vertiefung ausgesät. Als Negativkontrolle wurde eine Vertiefung verwendet, in der keine Feederzellen ausgesät worden waren, die aber über Nacht mit demselben Medium inkubiert worden war wie die Vertiefungen mit Feederzellen. In diese Vertiefung wurde dieselbe Zellzahl PBMC gesät wie in die übrigen Vertiefungen. Als Positivkontrolle diente eine Vertiefung, die ebenso behandelt wurde wie die Negativkontrolle und in die zusätzlich zu den PBMC Phytohämagglutinin-Stammlösung (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in PBS) gegeben wurde, so dass eine Endkonzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Phytohämagglutinin im Medium erreicht wurde. Die Zellen wurden dann für 4 Tage im Brutschrank inkubiert.

Tabelle M-8: Antikörpercocktail für Färbung von T-Zellen nach Immunstimulationsexperiment

Probe	FITC-konjugierter Antikörper	PE-konjugierter Antikörper	PE-Cy5-konjugierter Antikörper	μL Antikörper je Ansatz	μL PBS je Ansatz
1	IgG1 κ	IgG1 κ	IgG1 κ	5	35
2	anti-CD8	anti-CD4	anti-CD3	5	35
3	anti-CD69	anti-CD25	anti-CD3	5	35
4	anti-CD69	anti-CD71	anti-CD3	5	35

Am fünften Tag wurde das Medium mit den in Suspension befindlichen Zellen aus der Platte abgenommen und gesammelt. Die Vertiefungen wurden einmal mit PBS gewaschen und die Waschlösung mit dem zuvor abgenommenen Medium vereinigt. Die Proben wurden abzentrifugiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur) und die Pellets in je 1 mL PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zu je 250 μL auf FACS-Röhrchen verteilt und erneut mit PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation (200 g, 10 min, Raumtemperatur) wurden die Zellpellets in einer zuvor vorbereiteten Antikörperlösung (in PBS + 5 % FCS; siehe Tabelle M-8) resuspendiert und für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL PBS gewaschen und die Pellets in jeweils 500 μL FACSfix

aufgenommen und somit fixiert. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen im FACSCalibur erfolgte innerhalb einer Woche nach der Färbung.

4 Ergebnisse

4.1 Verfügbarkeit der potenziellen Feederzellen

Für die klinische Anwendung eines Kokultursystems zur Expansion von HSC aus Nabelschnurblut sind zunächst die Eigenschaften der gewünschten Feederzellen entscheidend, wie bereits unter 2.8 ausgeführt wurde. In diesem Abschnitt werden Methoden zur Gewinnung der potenziellen Feederzellen im Bezug auf folgende Parameter analysiert:

- Verfügbarkeit ausreichender Zellzahlen von jedem Spender
- Möglichkeit des autologen Einsatzes (Feederzellen und HSC vom selben Spender)
- notwendiger Aufwand für die Gewinnung der Zellen (Prozedur, Arbeitszeit etc.)
- klinische Kompatibilität der verwendeten Medien und Lösungen
- Kontaminationsrisiko

Anhand dieser Analyse soll eine realistische Beurteilung hinsichtlich der klinischen Anwendbarkeit der entsprechenden Zellen abgegeben werden können.

4.1.1 Mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblut (CB-MSC)

Wenn man aus Nabelschnurblutproben CB-MSC gewinnen und als Feederzellen für HSC einsetzen kann, wäre eine autologe Kokultur von HSC und Feederzellen möglich. Damit müsste anstelle zweier nur noch ein zum Empfänger passender Spender gefunden werden, was als günstig für den klinischen Einsatz zu werten ist. Die Aufreinigung von HSC aus Nabelschnurblut erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender Separation der HSC anhand ihrer Oberflächenmarker. Die parallele Isolation von CB-MSC sollte dementsprechend als Erweiterung dieser Prozedur etabliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche unternommen, CB-MSC aus Nabelschnurblutproben zu isolieren, aus denen z.T. gleichzeitig HSC gewonnen wurden. Die Präparation von HSC erfolgte mit dem MACS-System, das Zellen anhand bestimmter Oberflächenmarker aus einer Suspension mehrerer verschiedener Zelltypen aussondern kann. Die gewünschten Oberflächenmarker werden hierzu durch spezifische Antikörper gebunden, an die paramagnetische Partikel gekoppelt sind. Im Falle der Aufreinigung von HSC sind die Antikörper gegen das Antigen CD34 gerichtet. Die an die Antikörper gebundenen Zellen werden in einer Säule mittels eines starken Magnetfeldes zurückgehalten, während die nicht gebundenen Zellen durch Spülen der Säule ausgesondert werden. Da MSC den Oberflächenmarker CD34 nicht exprimieren (Reyes M. *et al.*, 2001; Devine S. M., 2002), sollten sie sich in der Suspension befinden, die ungehindert durch die Säule hindurchläuft.

Tabelle E-1: Aussaatbedingungen für CD34-negative Zellen aus Nabelschnurblut

Fläche der Vertiefungen	3,9 cm ²
Aussaatdichte: Zellen/cm²	1x10 ⁵ ; 5x10 ⁵ ; 1x10 ⁶ ; 1x10 ⁷
verwendete Medien	DMEM + 10 % FCS; ECGM; X-Vivo 10

Die im Säulendurchlauf enthaltenen Zellen wurden daher in variierender Zelldichte auf Zellkulturgefäße in unterschiedlichen Medien ausgesät (s. Tabelle E-1). CB-MSC sollten sich hierbei auf dem Boden der Kulturgefäße als adhärente, fibroblastähnliche Zellen ansiedeln. Jedoch konnte in den durchgeführten Experimenten in keinem der verwendeten Medien Wachstum von Zellen dieses Typs erzielt werden, adhärente Zellen wurden nur selten beobachtet. Da vermutet wurde, dass die im Nabelschnurblut vorhandenen CB-MSC möglicherweise durch die Aufreinigungsprozedur beschädigt wurden, erfolgte die Aussaat in einem Experiment direkt aus den mononukleären Zellen, die noch nicht mit Antikörpern behandelt worden waren. Hier wurden zusätzlich zu dem für MSC üblicherweise eingesetzten DMEM + 10 % FCS weitere Medien verwendet (s. Tabelle E-2). Auch in diesen

Versuchen konnte trotz langer Inkubationszeiten (bis 4 Wochen bei wöchentlichem Mediumwechsel) kein Wachstum von Zellen der gewünschten Morphologie nachgewiesen werden. Auch weitere Experimente zur Aussaat von mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut, sowohl vor als auch nach der Depletion CD34-positiver Zellen, in DMEM + 10 % FCS verliefen erfolglos. Daher wurden die Versuche zur Gewinnung von CB-MSC eingestellt.

Tabelle E-2: Aussaatbedingungen für MNC aus Nabelschnurblut

Fläche der Vertiefungen	3,9 cm ²
Aussaatdichte: Zellen/cm²	5x10 ⁵
verwendete Medien	DMEM + 10 % FCS; ProCHO4; SCGM; Macrophage-SFM; Aim-V; TB-1; HL-1; StemPro-34 SFM; Stemline; X-Vivo 10; X-Vivo 15; X-Vivo 20

4.1.2 Mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark (MSC)

Da das Knochenmark die physiologische Umgebung für HSC darstellt, wurden MSC aus Knochenmark als mögliche Feederzellen in Betracht gezogen. Die Proben für die Gewinnung der Zellen stammen bei diesen potenziellen Feederzellen nicht vom selben Spender wie das Nabelschnurblut. Dies wäre zwar in Einzelfällen praktikabel, z.B. bei für autologe Transplantation kryokonservierten Nabelschnurblutspenden, jedoch nicht im Normalfall.

Die Isolation von MSC aus Knochenmark erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation und einen darauffolgenden Adhäsionsschritt. Die benötigte Zeit vom Erhalt der Probe bis zur Aussaat der Zellen lag unter 1 h, der anschließende Adhäsionsschritt erfolgte über 48 h. Eine Person konnte alleine alle notwendigen Arbeitsschritte ausführen.

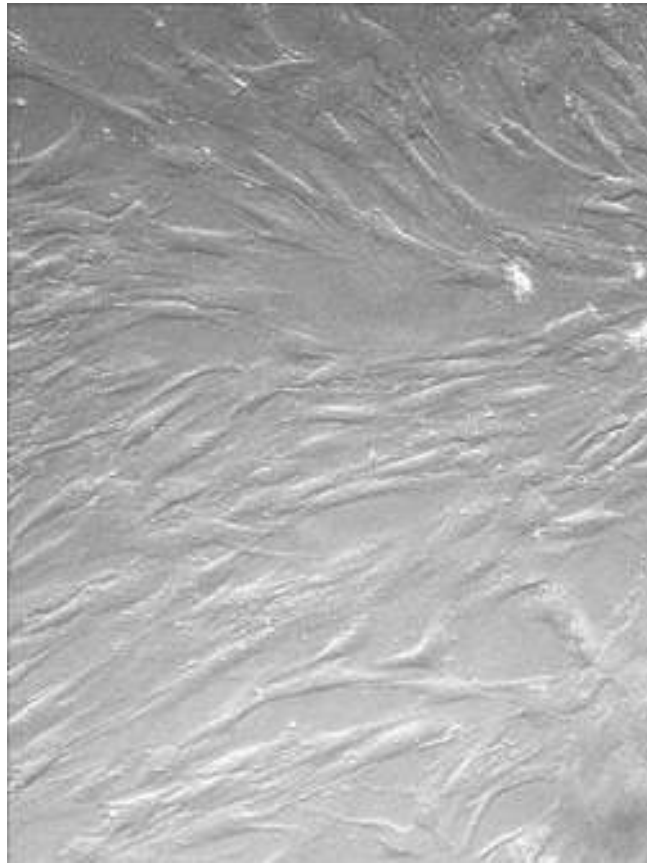


Abbildung E-1: Typische Morphologie von MSC – Originalvergrößerung 10fach

Das typische Erscheinungsbild von kultivierten MSC ist in Abbildung E-1 zu erkennen. Die Zellen weisen eine spindelförmige, fibroblastähnliche Morphologie auf. Zum aktuellen Zeitpunkt sind noch keine Möglichkeiten beschrieben worden, MSC in serumfreiem Medium zu kultivieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden MSC in DMEM + 10 % FCS kultiviert. Obwohl keine Antibiotika im Medium enthalten sind, konnten in keinem der bisher durchgeführten Experimente Kontaminationen beobachtet werden.

Exemplarisch sind in Abbildung E-2 die akkumulierten Zellzahlen für die aus einer Probe Knochenmark von 5 mL Volumen gewonnenen MSC aufgetragen. Bei Passage 2 wurde mit der Zellzählung begonnen, zu diesem Zeitpunkt betrug die Zellzahl 4×10^6 Zellen. Bis zu Passage 4 wurde die akkumulierte Zellzahl auf 1×10^9 Zellen gesteigert. Diese Zellzahl wurde innerhalb eines Kalendermonats vom Tag der Präparation an gerechnet erzielt. Somit

können bereits aus wenig Knochenmark in relativ kurzer Zeit für die Kokultur mit HSC ausreichende Zellzahlen gewonnen werden.

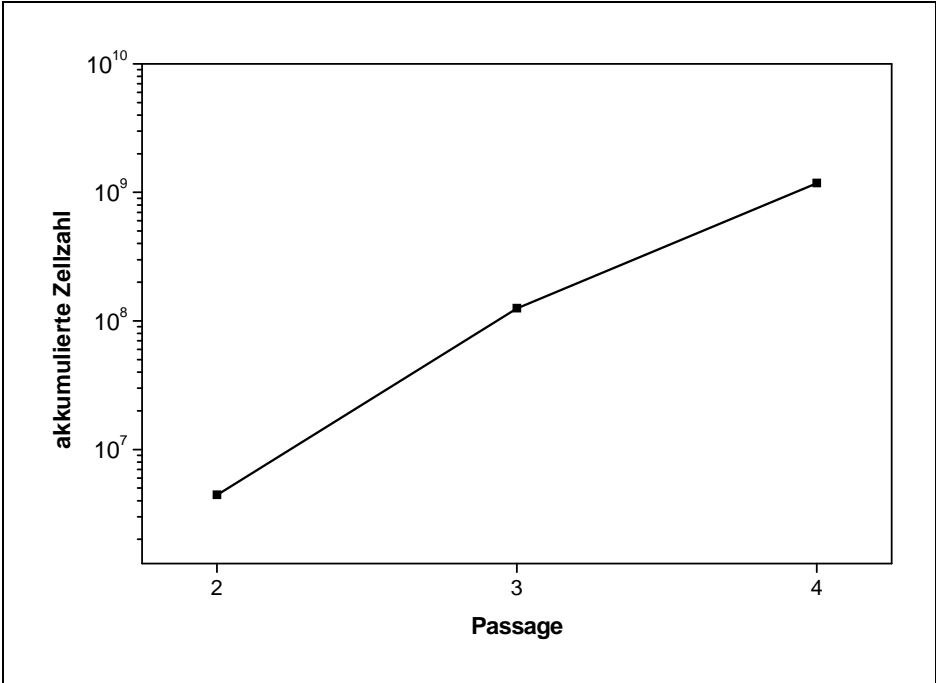


Abbildung E-2: Akkumulierte Zellzahl der aus der Knochenmarksprobe eines einzelnen Spenders gewonnenen MSC

4.1.3 Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) sind ein in verschiedenen Feldern der Zellbiologie sehr häufig für Experimente benutzter Zelltyp. Sie konnten aus derselben Nabelschnur gewonnen werden wie das Nabelschnurblut und wurden daher als potenzielle Feederzellen in die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen einbezogen. Hierfür wurde zunächst die Methodik zu ihrer Gewinnung im Labor etabliert und evaluiert.

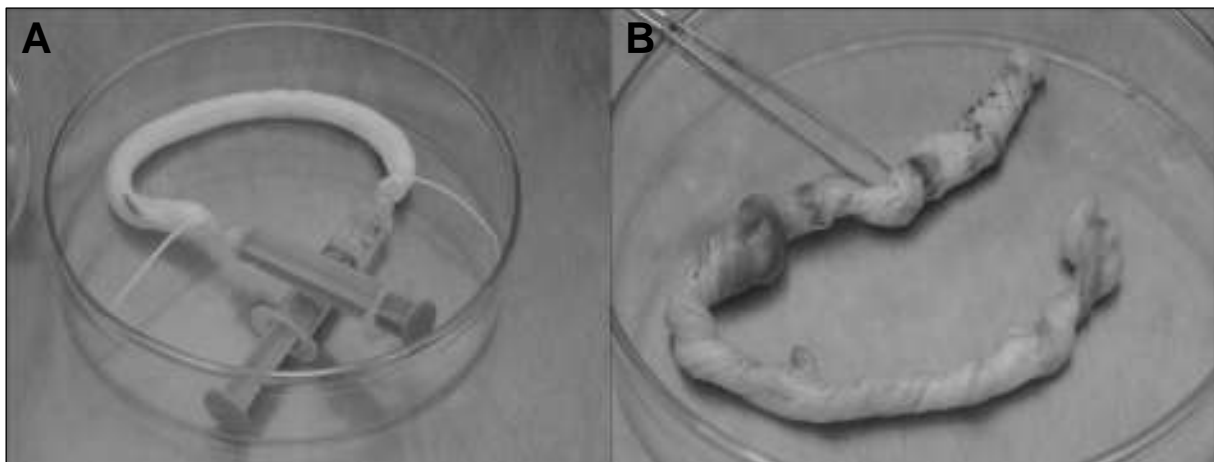


Abbildung E-3: Präparation von HUVEC – A: über Luer-Lock-Adapter in der Vene mit Trypsin befüllte Nabelschnur, B: Nabelschnur mit Thrombusbildung in der Vene

Die Isolation dieser Zellen erfolgte dabei über einen enzymatischen Verdau mit Trypsin, das die Zellen aus den Wänden der Vene herauslöst. Dazu musste die Vene mit Luer-Lock-Adaptoren versehen und die Enzymlösung hineingespritzt werden (Abbildung E-3 A). Um diese Prozedur durchführen zu können, war es wichtig, dass die Vene weder Blockaden durch Thrombusbildung noch Rupturen in den Wänden aufwies. Beides kam jedoch häufig vor (Abbildung E-3 B), so dass Teile der Nabelschnur abgetrennt werden mussten und nur die thrombenfreien, intakten Abschnitte verwendet werden konnten. Waren die Beschädigungen der Nabelschnur massiv, verblieben oft nur noch sehr kurze Stücke Nabelschnur für die Präparation. Wurde eine Minimallänge der Nabelschnur (ca. 10 cm) unterschritten, war die Zellausbeute so gering, dass in der anschließenden Kultur kein

ausreichendes Wachstum von HUVEC erzielt werden konnte. Die so präparierten Zellen besitzen eine kopfsteinpflasterähnliche Morphologie (Abbildung E-4).

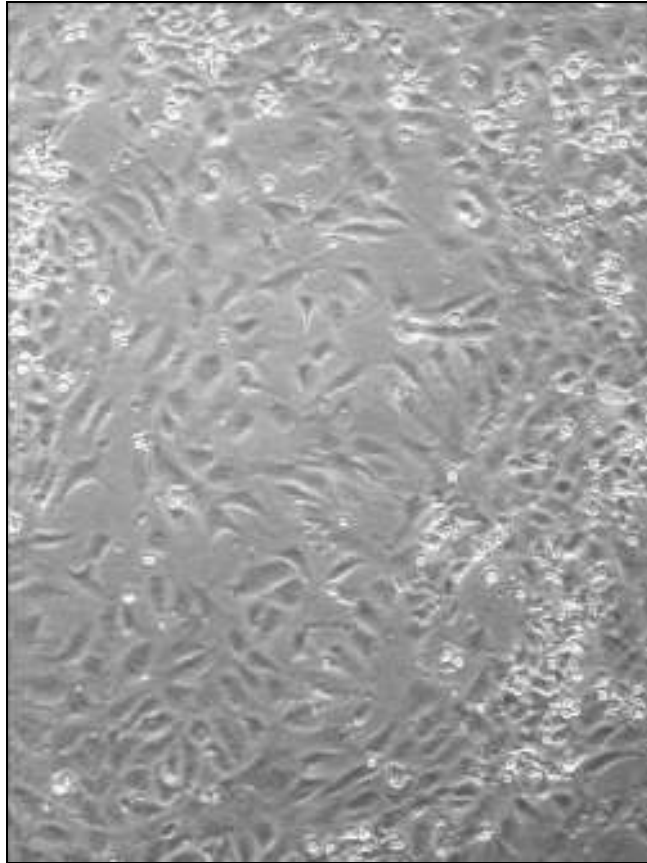


Abbildung E-4: Typische Morphologie von HUVEC – Originalvergrößerung 10fach

Insgesamt erforderte die Gewinnung von HUVEC aus Nabelschnüren eine relativ aufwändige Prozedur, die Präparation musste jeweils von zwei Personen durchgeführt werden und dauerte etwa 2 h. Das bisher für HUVEC verwendete Kulturmedium enthält tierische Bestandteile sowie Antibiotika. Trotz letzterer traten bei einzelnen Präparationen Kontaminationen auf. Auch für HUVEC ist die innerhalb eines Kalendermonats akkumulierte Zellzahl in Abbildung E-5 beispielhaft gezeigt. Aufgetragen sind die Zellzahlen aus Nabelschnüren zweier Spender von Passage 1 bis Passage 4. Bei Passage 2 waren die Zellen beider Spender kryokonserviert und nach ca. 2 Wochen je ein Aliquot pro Spender wieder in Kultur genommen worden. Damit beträgt die effektive Kulturdauer für 4 Passagen etwa 2 Wochen. In dieser Zeit wurde eine Expansion von 1×10^6 Zellen bei Passage 1 bis auf

5×10^7 Zellen bei Passage 4 (Spender 1) bzw. 3×10^8 Zellen auf 1×10^8 Zellen (Spender 2) erreicht. Damit konnte auch für HUVEC gezeigt werden, dass es möglich ist, aus einer Nabelschnur in sehr kurzer Kultivierungszeit ausreichende Zellzahlen für die Kokultur mit HSC zu gewinnen.

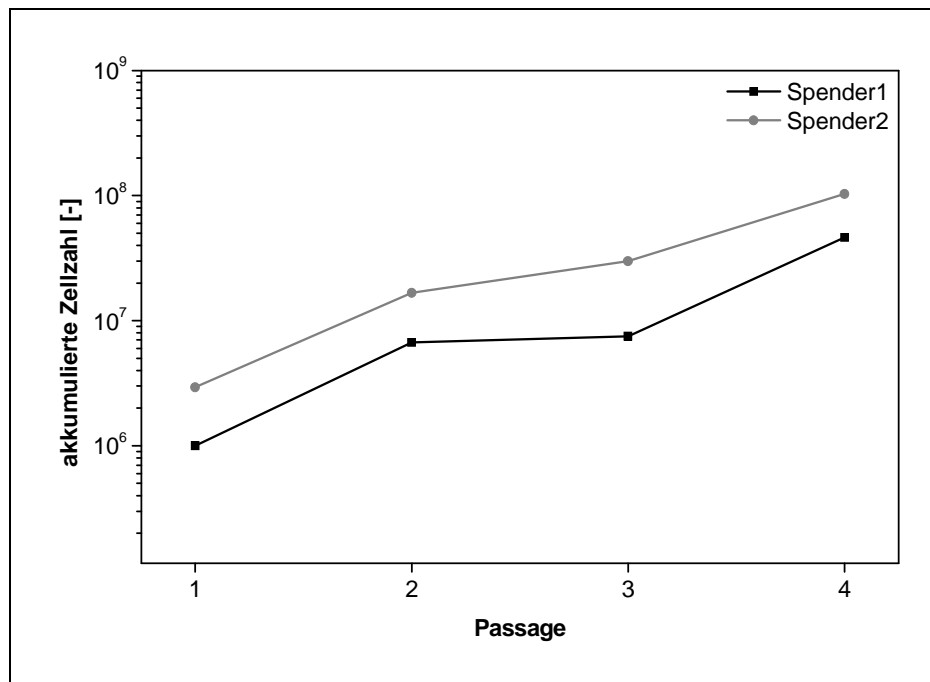


Abbildung E-5: Akkumulierte Zellzahl der aus den Nabelschnüren zweier Spender gewonnenen HUVEC

4.1.4 Zellen aus dem Bindegewebe der Nabelschnur (WJC)

Auch das Bindegewebe der Nabelschnur stellt eine potenzielle Quelle von zum Nabelschnurblut autologen Zellen dar. Daher wurde untersucht, ob sich daraus auch für die Unterstützung von HSC geeignete Feederzellen gewinnen lassen.

Für die Isolation dieser Zellen wurde hier das gesamte Nabelschnurgewebe in kleine Fragmente geschnitten, die anschließend in Zellkulturplatten verteilt und inkubiert wurden (Abbildung E-6), so dass sich Zellen auf dem Boden der Gefäße ansiedeln konnten (adaptiert nach Mitchell K. E. *et al.*, 2003). Die Präparation und Aussaat der Gewebestücke dauerte hierbei, je nach gewünschter Anzahl der ausgesäten Kulturgefäße, etwa 30 – 60 min

und konnte von einer einzelnen Person durchgeführt werden. Für die Ansiedlung der Zellen aus den Gewebestücken auf den Zellkulturgefäßen war eine einwöchige Inkubation im Brutschrank erforderlich.

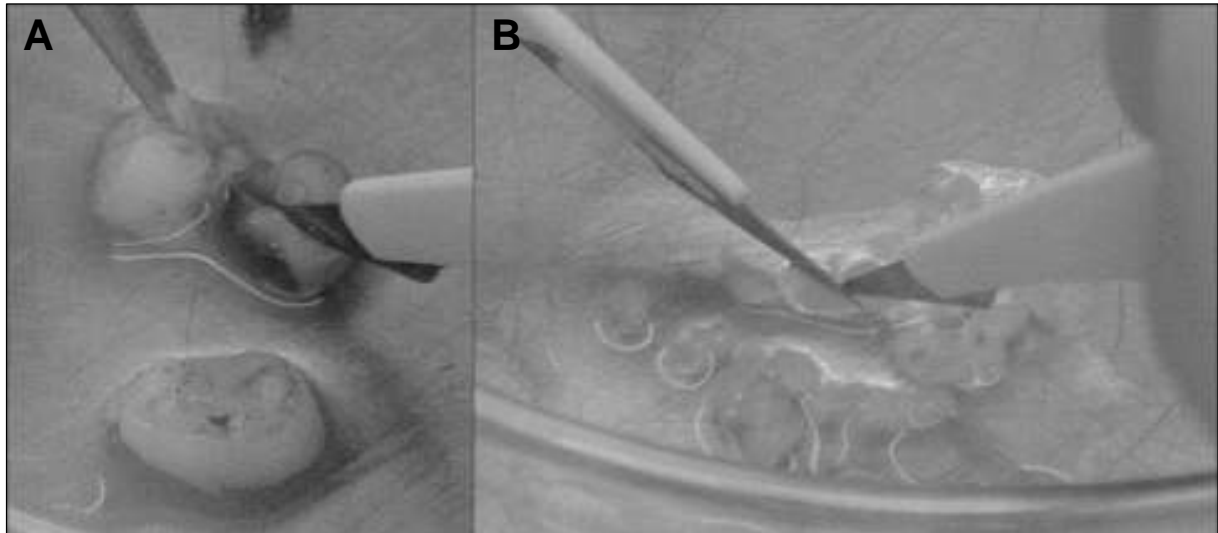


Abbildung E-6: Präparation von WJC – A: Zerkleinern der Nabelschnur, B: Schneiden der Fragmente für die Aussaat in Zellkulturplatten

Zellwachstum konnte mit dieser Methode für jede verwendete Nabelschnur erreicht werden. Bereits kleine Nabelschnurstücke genühten, um hohe Zellausbeuten daraus gewinnen zu können, was im Folgenden noch näher ausgeführt wird (s. 4.2.1). Auch Thrombenbildung in den Blutgefäßen oder Beschädigungen der Nabelschnur waren für die Effektivität der Präparation unerheblich.

Bisher wurde für die Kultivierung der Zellen nur Medium verwendet, das tierische Produkte und Antibiotika enthielt. Kontaminationen traten nur vereinzelt auf und betrafen meist nur einzelne Vertiefungen der Zellkulturplatten, so dass die Zellen aus den übrigen Vertiefungen trotzdem verwendet werden konnten.

In Tabelle E-3 sind die Ergebnisse der Analyse für die einzelnen Zelltypen zusammengefasst. Sowohl MSC als auch HUVEC und WJC kommen demnach als mögliche Feederzellen in Frage.

Tabelle E-3: Verfügbarkeitsanalyse für potenzielle Feederzelltypen

Zelltyp	CB-MSC	MSC	HUVEC	WJC
Verfügbarkeit in ausreichenden Zellzahlen	-	+	+	+
Zellen von jedem getesteten Spender verfügbar	-	+	-	+
Möglichkeit des autologen Einsatzes	X	-	+	+
Kontaminationsrisiko	X	gering	hoch	gering

4.2 Charakterisierung der potenziellen Feederzellen

4.2.1 Charakterisierung spezifischer Eigenschaften der Feederzellen

Untersuchungen zur Charakterisierung des Wachstums und Phänotyps von WJC

Isolation von WJC

Um das Potenzial von Zellen aus der Nabelschnurmatrix für die Kokultur und mögliche andere Anwendungen evaluieren zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zu Effektivität und den Zelltypen, die gewonnen werden konnten, durchgeführt. Dazu wurden Nabelschnüre dreier verschiedener Spender präpariert und die Gewebefragmente jeweils in 48-Well-Zellkulturplatten mit ECGM bzw. DMEM + 10 % FCS + 0,1 % Gentamicin (im Weiteren als "DMEM" bezeichnet) ausgesät. Nach 1, 2, 3 und 4 Wochen wurde das Zellwachstum in den Vertiefungen der Platten unter dem Mikroskop kontrolliert und, soweit möglich, die Zellen einem Zelltyp zugeordnet. Dabei wurde unterschieden nach

- "Kolonien" (= "colony"): Wachstum von Zellen, deren geringe Anzahl noch keine morphologische Einordnung zuließ,
- "fibroblast-ähnlichen Zellen" (= "fibroblast"): Zellen mit spindelförmiger Morphologie wie z.B. bei MSC (Abbildung E-7 A)

- "endothel-ähnlichen Zellen" (= "endothelial"): Zellen mit kopfsteinpflasterförmiger Morphologie wie z.B. bei HUVEC (Abbildung E-7 B)

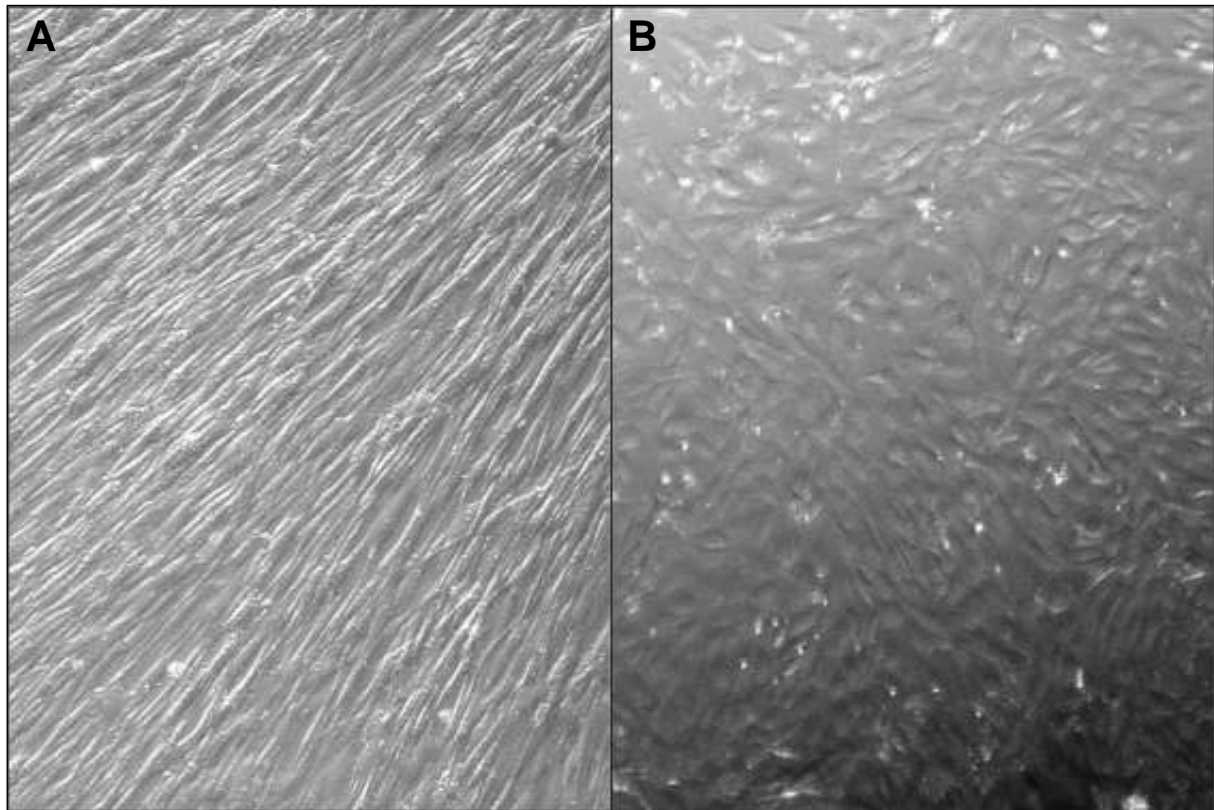


Abbildung E-7: Morphologie von aus Nabelschnurmatrixgewebe kultivierten Zellen – A: „fibroblastähnlich“, B: „endothelähnlich“

Bereits nach einer Woche konnte in ECGM Zellwachstum in 60 – 80 % der Vertiefungen nachgewiesen werden, wobei die Kolonien meist zu klein waren, um sie als "fibroblast-" oder "endothel-ähnliche" Zellen identifizieren zu können (Abbildung E-8). Nach 2 Wochen Kultur hatten sich die Zellen in einigen Vertiefungen jedoch soweit vermehrt, dass sie entweder dem "fibroblast-ähnlichen" oder dem "endothel-ähnlichen" Phänotyp zugeordnet werden konnten. Dabei konnten "fibroblast-ähnliche" Zellen bei allen untersuchten Spendern nachgewiesen werden, "endothel-ähnliche" Zellen bei 2 von 3 Spendern. Bei einem Spender war nach 2 Wochen eine größere, bei den beiden anderen Spendern eine niedrigere Gesamtzahl Vertiefungen mit Zellwachstum zu beobachten als nach 1 Woche. Nach 3 Wochen Kultur konnten die meisten Zellen anhand ihrer Morphologie eindeutig als einer der beiden Phänotypen "fibroblast-" oder "endothel-ähnlich" identifiziert werden. In 10 – 40 % der Vertiefungen hatten sich zu diesem Zeitpunkt bereits fast konfluente Zellschichten gebildet,

so dass die Zellen passagiert und auf 12-Well-Zellkulturplatten überführt werden konnten (Abbildung E-9). Eine weitere Woche Kultivierung der Zellen konnte weder den Anteil der Vertiefungen mit Zellwachstum insgesamt noch die Anzahl der Vertiefungen, aus denen fibroblastförmige Zellen auf 12-Well-Zellkulturplatten umgesetzt werden konnten, signifikant erhöhen (Abbildungen E-8 und E-9). Bei den beiden Spendern, aus deren Gewebe "endothel-ähnliche" Zellen gezüchtet werden konnten, vergrößerte sich der Anteil der Vertiefungen, aus denen diese passagiert werden konnten, von Woche 3 zu Woche 4 erheblich (Abbildung E-9).

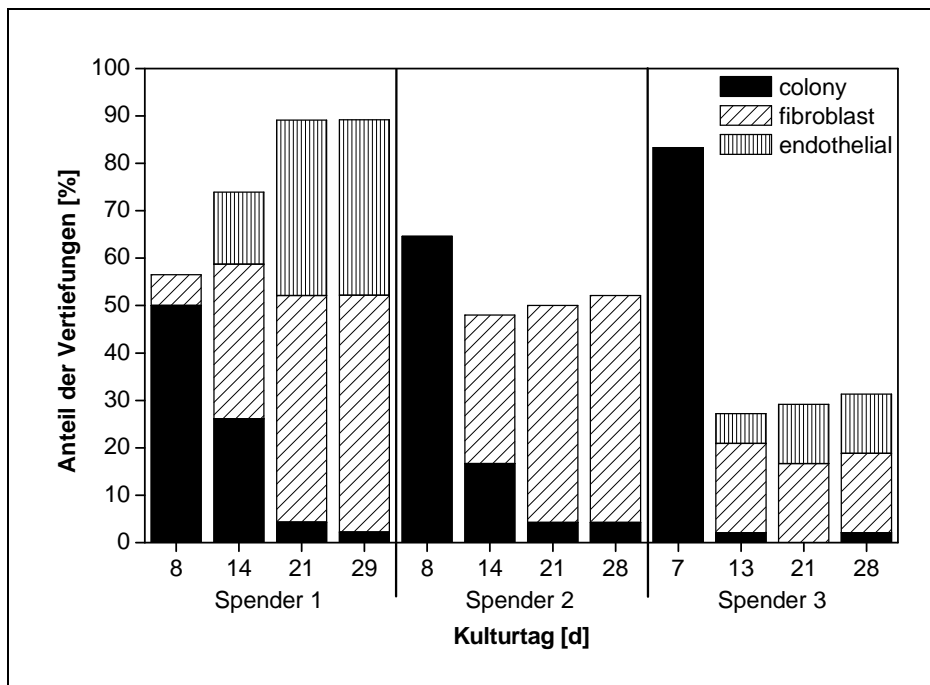


Abbildung E-8: Zellwachstum aus Nabelschnurgewebsfragmenten dreier verschiedener Spender nach 1, 2, 3 und 4 Wochen Kultivierung – Anteil der unterschiedlichen Phänotypen (colony = Wachstum kleiner Zellkolonien undefinierter Morphologie – schwarze Balken, fibroblast = „fibroblastähnlich“ – schräg schraffierte Balken, endothelial = „endothelähnlich“ – senkrecht schraffierte Balken)

Obwohl "endothel-ähnliche" Zellen passagiert werden konnten, stellten sie sehr häufig nach kurzer Zeit das Wachstum ein. "Fibroblast-ähnliche" Zellen konnten dagegen über lange Zeit in Kultur gehalten werden: Bis zu 15 Passagen wurden bisher erreicht, wobei das Umsetzen der Zellen im Abstand von jeweils ein bis zwei Wochen erfolgte (Daten nicht gezeigt).

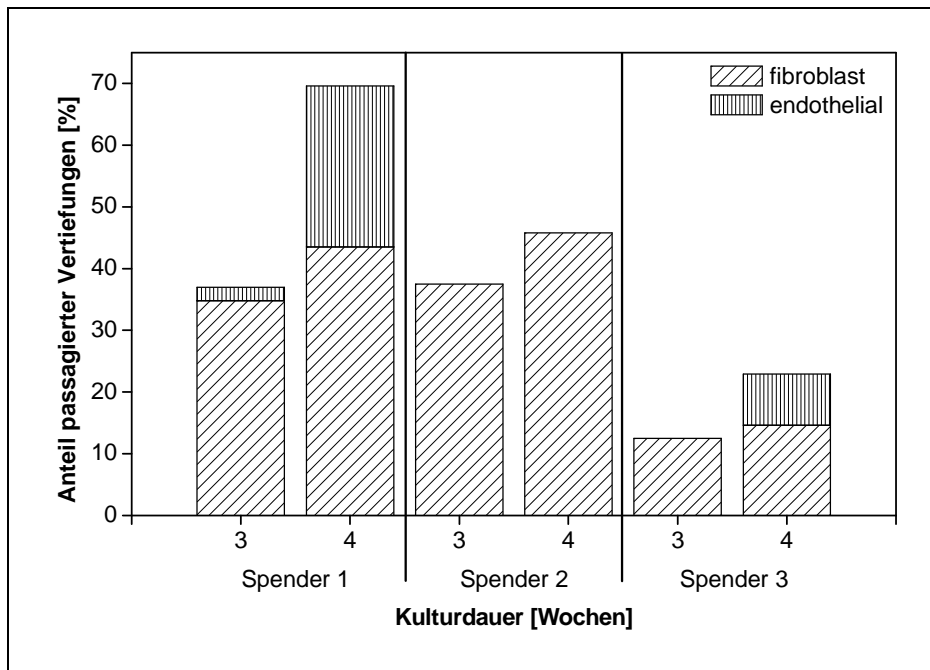


Abbildung E-9: Passagen von aus Nabelschnurfragmenten dreier verschiedener Spender kultivierten Zellen nach 3 bzw. 4 Wochen Kultivierung – Anteil der verschiedenen Phänotypen (fibroblast = „fibroblastähnlich“ – schräg schraffierte Balken bzw. endothelial = „endothelähnlich“ – senkrecht schraffierte Balken)

Der Anteil Vertiefungen mit nachweisbarem Zellwachstum auf den Zellkulturplatten, die DMEM enthielten, betrug nach einer Woche 6 – 20 % (Daten nicht gezeigt). In diesem Medium wurden keine "endothel-ähnlichen" Zellen beobachtet, die Zellen wiesen in allen Fällen eine "fibroblast-ähnliche" Morphologie auf. Das Wachstum der Zellen war insgesamt langsamer als in ECGM, so dass nach 3 Wochen noch keine Passagen möglich waren. Nach 4 Wochen konnten Zellen aus 4 % der Vertiefungen passagiert und auf 12-Well-Zellkulturplatten überführt werden. Das Wachstum dieser Zellen in der weiteren Kultur erwies sich als begrenzt, nach der ersten Passage waren häufig keine weiteren möglich (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Daten zu Effizienz und Wachstumsgeschwindigkeit wurden WJC für alle weiteren Experimente wie folgt definiert:

Definition:

Für die folgenden Versuche wurden aus dem Wharton's jelly der Nabelschnur nur "fibroblast-ähnliche" Zellen verwendet, die in ECGM kultiviert worden waren. Der Begriff "WJC" bezeichnet ausschließlich so präparierte und diese Morphologie aufweisende Zellen.

Für die klinische Anwendung von Zellen ist es wichtig, ob innerhalb eines kurzen Zeitintervalls für therapeutische Zwecke ausreichende Zellzahlen bereitgestellt werden können. Um zu untersuchen, ob dies möglich ist, wurden von zweien der Spender aus dem oben beschriebenen Versuch Zellen aus je 4 Vertiefungen der ursprünglichen Zellkulturplatte ausgewählt (Abbildung E-10, Spender 2 bzw. 3, jeweils Vertiefung A – D). Diese Zellen waren nach 3 Wochen Inkubation aus 48-Well-Zellkulturplatten (Fläche $1,1 \text{ cm}^2/\text{Vertiefung}$) auf eine 12-Well-Zellkulturplatte (Fläche $3,5 \text{ cm}^2/\text{Vertiefung}$) überführt worden und konnten nach 4 Wochen bereits auf jeweils eine Zellkulturflasche der Fläche 25 cm^2 ausgesät werden. Die Lebendzellzahl dieser Zellen wurde ab der 2. Passage bei jedem Trypsinieren bestimmt. Die Zellen wurden ab der 3. Passage jeweils mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ cm^2 auf Zellkulturflaschen der Fläche 25 cm^2 neu ausgesät. Die Lebendzellzahlen wurden akkumuliert, um auf die erreichbare Gesamtzellzahl hochzurechnen.

Innerhalb von 7 Wochen erreichten die aus einem einzelnen Gewebestück entstandenen Zellen Gesamtzahlen zwischen $4,8 \times 10^6$ und $5,8 \times 10^6$ Zellen (Abbildung E-10). Dabei war eine signifikante Variabilität des Zellwachstums zwischen den Proben der beiden getesteten Spender zu beobachten.

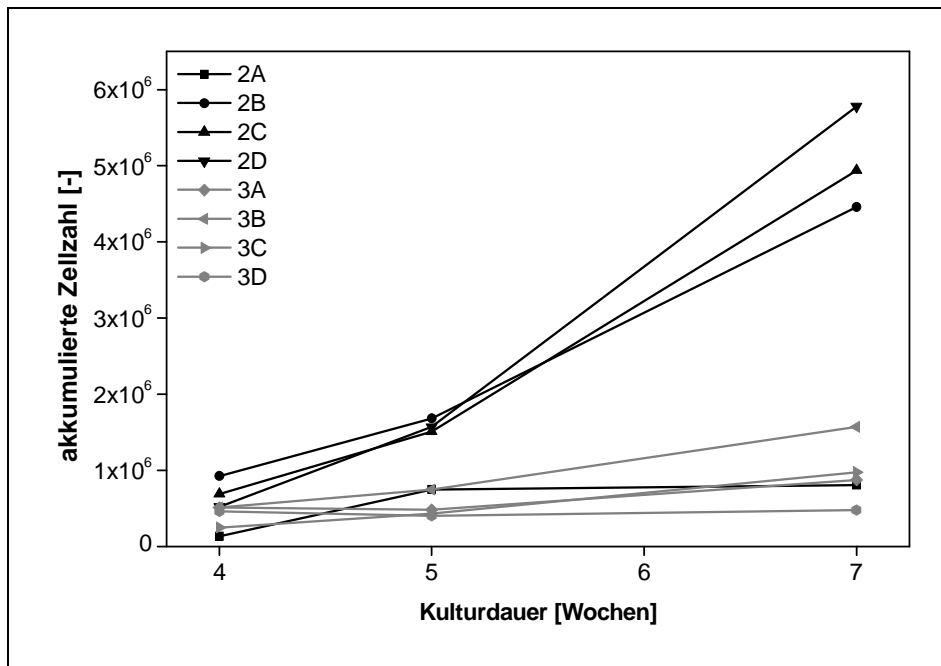


Abbildung E-10: Akkumulierte Zellzahlen der aus je einem Nabelschnurgewebsfragment kultivierten WJC innerhalb einer Kulturdauer von 4 bis 7 Wochen – Zellen aus jeweils 4 Einzelfragmenten (A, B, C und D) von zwei verschiedenen Spendern (2 – schwarze Linien bzw. 3 – dunkelgraue Linien)

Mit einer Hochrechnung wurde festgestellt, welche Gesamtzellzahl aus einem Zentimeter Nabelschnur (ausreichend für die Aussaat einer 48-Well-Zellkulturplatte) innerhalb von 7 Wochen potenziell herangezogen werden konnte. Dabei wurde der Anteil der Vertiefungen auf den ursprünglichen Zellkulturplatten, aus denen "fibroblast-ähnliche" Zellen passagiert werden konnten, und die akkumulierten Zellzahlen nach 7 Wochen Kultur zugrundegelegt. Es ergaben sich folgende Grenzwerte:

- Minimalwert: $2,3 \times 10^6$ (Wachstum in 12,5 % der Vertiefungen mit akkumulierter Zellzahl von $4,8 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung)
- Maximalwert: $9,7 \times 10^7$ (Wachstum in 37,5 % der Vertiefungen mit akkumulierter Zellzahl von $5,8 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung)

Die erreichbaren Zellzahlen waren somit nicht nur für die Kokultur mit HSC ausreichend, sondern könnten auch andere Nutzungsmöglichkeit von WJC wie z.B. im Tissue Engineering eröffnen.

Fibroblasten-Kolonien bildende Zellen (colony-forming units – fibroblast = CFU-F)

Ein Indiz für das Vorhandensein von MSC in Knochenmarkproben ist die Fähigkeit dieser Zellen, bei der Aussaat sehr geringer Zellzahlen fibroblastförmige Kolonien (CFU-F) zu bilden (Castro-Malaspina H. *et al.*, 1980). Um zu untersuchen, ob auch WJC diese Eigenschaft aufweisen, wurden aus zwei verschiedenen Gewebestücken der Nabelschnur des selben Spenders gewonnene WJC (Passage 3) mit Dichten zwischen 1×10^2 und 1×10^4 Zellen/cm² auf Zellkulturflaschen der Fläche 25 cm² in ECGM bzw. DMEM + 10 % FCS ausgesät und zwei Wochen im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt (Abbildung E-11).

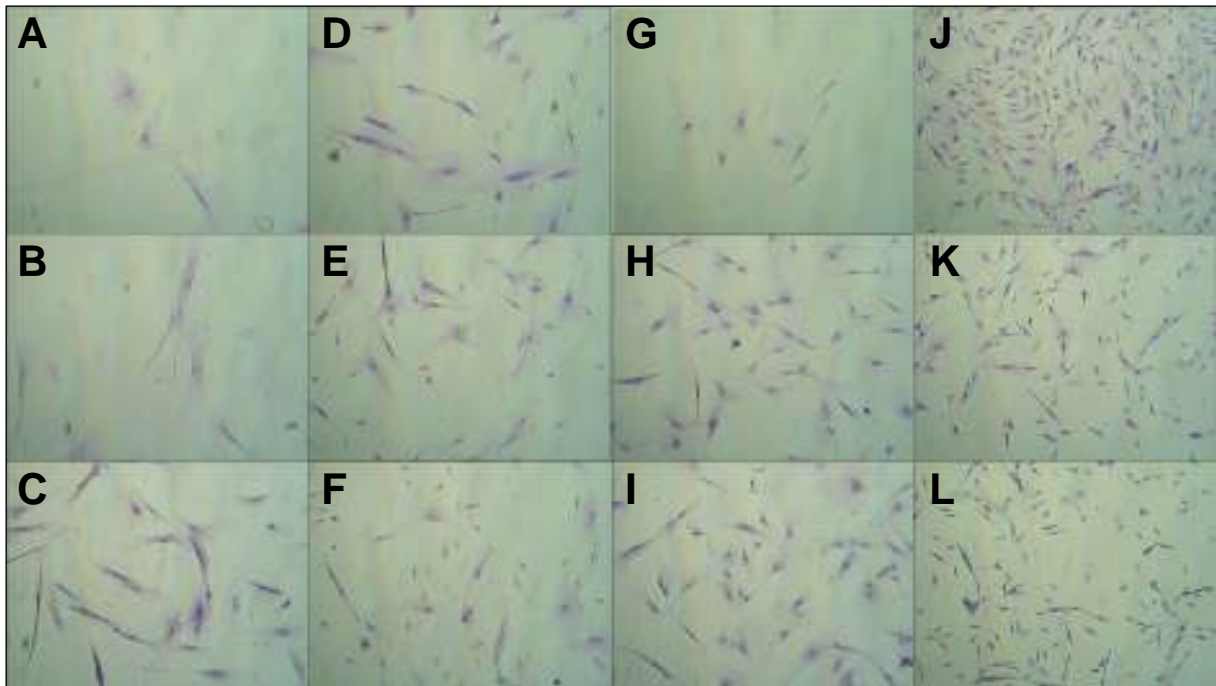


Abbildung E-11: CFU-F-Assay WJC – Fotos von Ausschnitten aus Kulturen der Aussaatdichten 100 (oberste Reihe), 500 (mittlere Reihe) und 1000 (untere Reihe) Zellen / cm², Charge 1 & 2 vom selben Spender, alle Passage 3; A – C: Zellen der Charge 1, Medium: DMEM; D – F: Charge 1, ECGM; G – I: Charge 2, DMEM; J – L: Charge 2, ECGM; alle Proben mit Methanol fixiert und Giemsa-gefärbt, Originalvergrößerung 10fach

CFU-F konnten in keiner der getesteten Zelldichten nachgewiesen werden, wenn auch sehr vereinzelt CFU-F-ähnliche Zellansammlungen beobachtet wurden (Abbildung E-11 J). Die Zellen hatten sich jedoch in beiden untersuchten Medien auf dem Boden der Zellkulturgefäße angesiedelt und zeigten trotz der niedrigen Aussaatdichte ihre typische

fibroblastähnliche Morphologie. WJC enthielten somit wahrscheinlich keine oder nur sehr wenige Zellen, die die Fähigkeit zum klonogenen Wachstum aufwiesen.

Differenzierungsfähigkeit von MSC

MSC weisen die Fähigkeit auf, zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren. Als charakteristisch sind die Differenzierung in osteogene, adipogene und chondrogene Richtung beschrieben worden (Pittenger M. F. *et al.*, 1999). Diese Differenzierungen dienen der Unterscheidung zwischen MSC und stromalen Zellen ähnlicher Morphologie und wurden in der vorliegenden Arbeit als Qualitätskontrolle verwendet, um festzustellen, ob die hier gewählten Kulturbedingungen die Vermehrung möglichst undifferenzierter MSC unterstützen.

MSC desselben Spenders, die drei-, fünf- und siebenmal passagiert worden waren, wurden mittels der Differenzierungsassays untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen aller getesteten Chargen, selbst der am längsten in Kultur gehaltenen Passage 7, sowohl in osteogene, adipogene als auch in chondrogene Richtung differenzieren konnten (Abbildung E-12).

Die Differenzierung in osteogene und adipogene Richtung konnte für Zellen dreier anderer Spender ebenfalls nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), die chondrogene Differenzierung wurde in diesem Experiment nicht untersucht.

Anhand dieser Daten konnten die gewählten Kulturbedingungen für MSC als ausreichend für die Unterstützung von deren Differenzierungsfähigkeit in die getesteten Richtungen betrachtet werden.

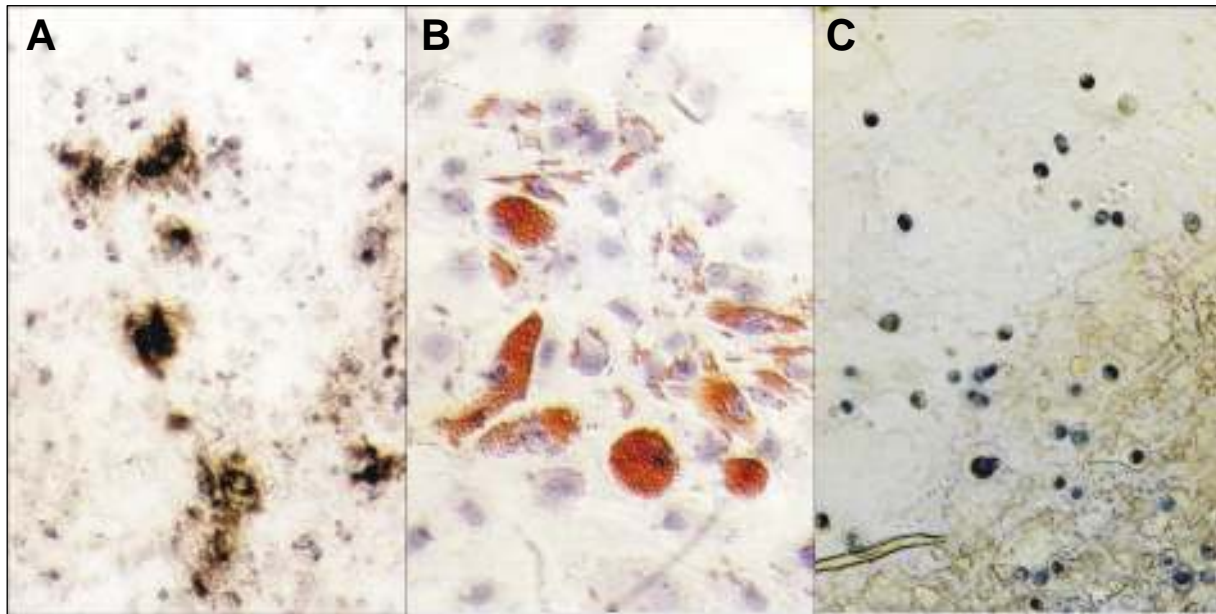


Abbildung E-12: Differenzierung von MSC – A: osteogen (Zellen der Passage 7, Originalvergrößerung 100fach), B: adipogen (Zellen der Passage 7, Originalvergrößerung 200fach), C: chondrogen (Zellen der Passage 7, Originalvergrößerung 100fach)

Oberflächenmarker-Profile der potenziellen Feederzellen

Alle potenziellen Feederzellen wurden im Bezug auf ihre Oberflächenmarker-Profile verglichen, um zu klären, ob sich Feederzellen und Blutzellen anhand ihrer Oberflächenmarker voneinander abtrennen lassen. Außerdem sollte festgestellt werden, ob auch zwischen den einzelnen potenziellen Feederzelltypen anhand der Antigenexpression unterschieden werden kann. Als zusätzlicher Zelltyp wurden glatte Muskelzellen aus der Koronararterie (smooth muscle cells = SMC) in die Untersuchung einbezogen, um zu klären, ob es sich bei WJC ebenfalls um glatte Muskelzellen handeln könnte. Diese Vermutung liegt nahe, weil die Nabelschnurmatrix aus Myofibroblasten verschiedener Differenzierungsstufen besteht (Nanaev A. K. *et al.*, 1997) und die in der Nabelschnur verlaufenden Blutgefäße voll ausdifferenzierte glatte Muskelzellen enthalten (Betz E. *et al.*, 1997).

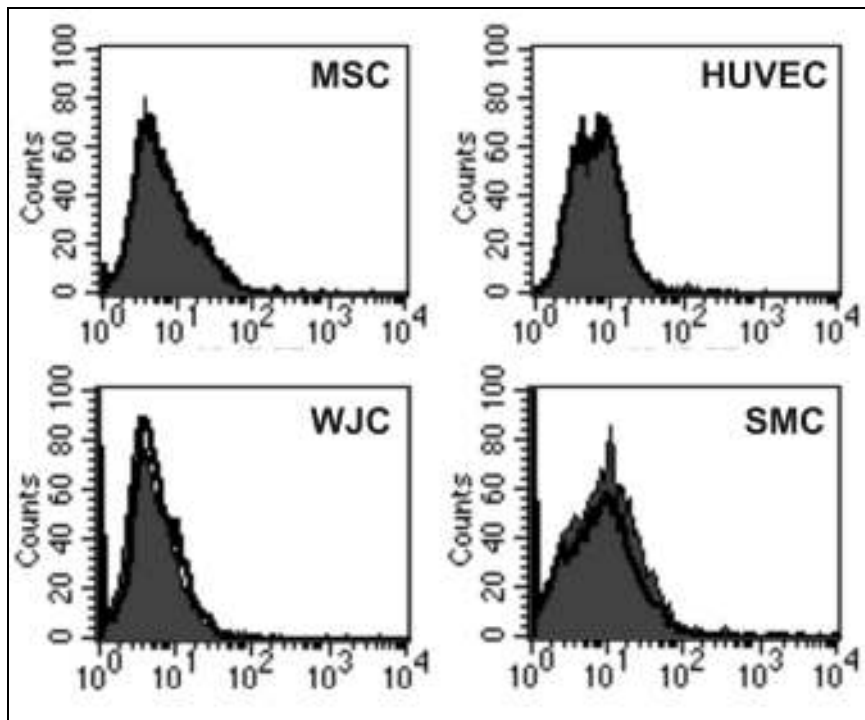


Abbildung E-13: Expression von CD45 auf den potenziellen Feederzellen und SMC – MSC, HUVEC, WJC und SMC wie gekennzeichnet; nicht ausgefüllte Histogramme: Isotypkontrolle, PE-konjugiert, ausgefüllte Histogramme: Antikörper gegen CD45, PE-konjugiert

Zunächst wurden alle Zelltypen auf die Expression von Markern unterschiedlicher Blutzellen getestet, um sicherzustellen, dass nach einer Kokultur zwischen Feederzellen und HSC und davon abgeleiteten Zellen unterschieden werden kann. Wichtig hierfür ist vor allem der generelle Leukocyten-Marker CD45, der auf den meisten Blutzellen exprimiert wird und anhand dem die aus HSC entwickelten Zellen möglicherweise von den Feederzellen abgetrennt werden könnten. CD45 war auf keinem der getesteten Feederzelltypen nachweisbar (Abbildung E-13), so dass die Möglichkeit zum Sortieren anhand der Expression dieses Markers besteht. Auch für die übrigen getesteten Blutzellmarker CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16, CD38, CD41a, CD69 und CD80 wurde keine Expression auf den untersuchten Zellen gefunden (Daten nicht gezeigt). Der MHC-I-Komplex wurde auf allen getesteten Zelltypen nachgewiesen, der MHC-II-Komplex dagegen auf keinem der Zelltypen (Abbildung E-14).

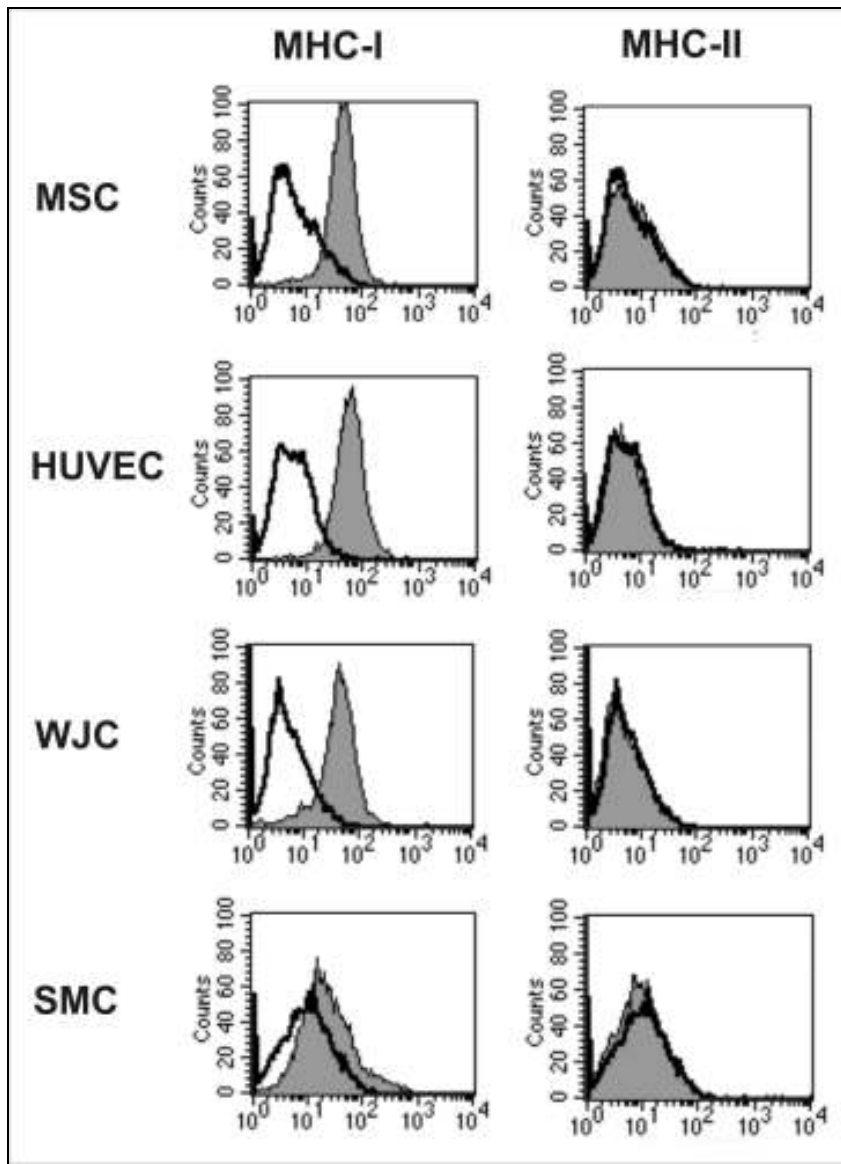


Abbildung E-14: Expression von MHC-I und MHC-II auf den potenziellen Feederzellen und SMC – MSC, HUVEC, WJC und SMC wie gekennzeichnet; nicht ausgefüllte Histogramme: Isotypkontrolle, FITC-konjugiert, ausgefüllte Histogramme: Antikörper gegen MHC-I bzw. MHC-II, FITC-konjugiert

Um zwischen den einzelnen Zelltypen unterscheiden und diese einordnen zu können, wurde ihre Bindung an Antikörper gegen verschiedene Marker von Endothelzellen, Stammzellen und/oder Fibroblasten untersucht (Abbildung E-15). Hierbei wiesen HUVEC ein deutlich von den restlichen Zelltypen abweichendes Antigenmuster auf. Im Gegensatz zu MSC, WJC und SMC waren sie positiv für die endothelzellspezifischen Antigene CD31 und CD144. Die Expression von CD90 war signifikant geringer und die Expression von CD105 signifikant stärker als die der restlichen Zelltypen. Außerdem war eine Subpopulation von HUVEC positiv für CD34, was bei keinem anderen Zelltyp zu beobachten war. MSC, WJC und SMC

wiesen für die Oberflächenantigene CD90, CD105 und CD166 weitgehend ähnliche Expressionsprofile auf. Die Färbung von SMC mit Antikörpern gegen CD54 war signifikant stärker als die der übrigen, ebenfalls im Bezug auf dieses Antigen positiven Zelltypen. MSC ließen sich als einziger Zelltyp mit Antikörpern gegen CD106 anfärben. Somit war es möglich, HUVEC anhand ihres Oberflächenmarkerprofils von den übrigen Feederzelltypen zu unterscheiden. Eine klare Trennung zwischen MSC, WJC und SMC war mittels der getesteten Antigene jedoch nicht möglich.

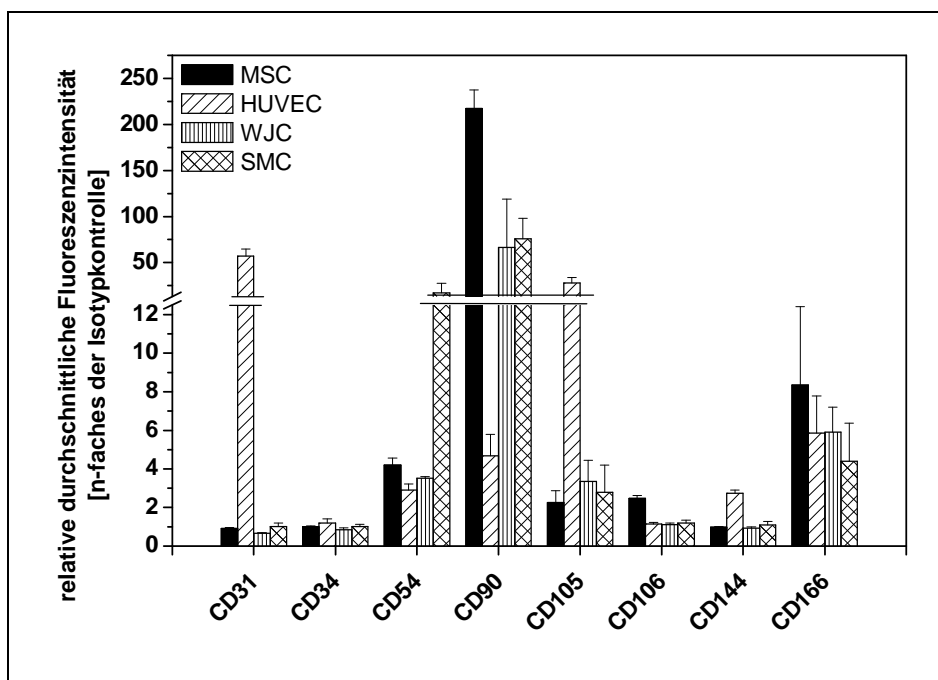


Abbildung E-15: Expression von Stammzell-, Fibroblast- und Endothelzellmarkern auf MSC (schwarze Balken), HUVEC (schräg schraffierte Balken), WJC (senkrecht schraffierte Balken) und SMC (Balken mit Karomuster) – durchschnittliche im FACS gemessene Fluoreszenzintensität relativ zur jeweiligen Isotypkontrolle

Eine wichtige Gruppe von Oberflächenmarkern, auch bezogen auf die Kokultur mit HSC, sind Rezeptormoleküle, da sie extrazelluläre Signale zu intrazellulären Signalkaskaden integrieren und somit auch die Interaktion von Zellen untereinander steuern können. Daher wurden alle untersuchten Zellen auf ihre Expression einer Auswahl von Rezeptoren getestet (Abbildung E-16). CD71 wurde vor allem von WJC stark exprimiert, in geringerem Maß aber auch von HUVEC und SMC. CD95 wurde auf WJC, MSC und SMC gefunden. Ausschließlich WJC waren leicht positiv für CD114. CD117 wurde von WJC und HUVEC stark und von

SMC schwach exprimiert, von MSC dagegen nicht. CD123-Expression wurde auf HUVEC vergleichsweise stark, auf MSC, WJC und SMC nicht oder nur sehr schwach gefunden. CD184 konnte nur auf einer HUVEC-Subpopulation nachgewiesen werden.

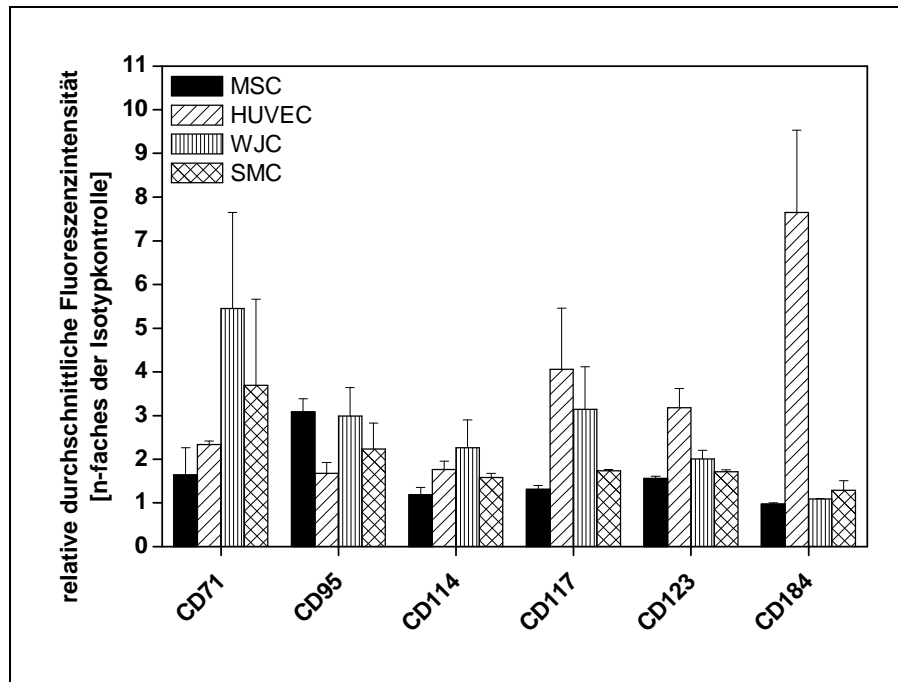


Abbildung E-16: Expression von Rezeptormolekülen auf MSC (schwarze Balken), HUVEC (schräg schraffierte Balken), WJC (senkrecht schraffierte Balken) und SMC (Balken mit Karomuster) – durchschnittliche im FACS gemessene Fluoreszenzintensität relativ zur jeweiligen Isotypkontrolle

Aus Nabelschnurmatrixgewebe waren neben den als WJC definierten "fibroblast-ähnlichen" Zellen auch "endothel-ähnliche" Zellen isoliert worden (s. 4.2.1). Letztere wurden mit einer Auswahl von Antikörpern getestet, um ihr Oberflächenmarkerprofil mit dem von HUVEC vergleichen zu können (Abbildung E-17). Wie diese waren auch "endothel-ähnliche" Zellen aus Wharton's jelly positiv für CD31, CD90, CD105, CD166 und leicht positiv für CD144. Subpopulationen der Zellen ließen sich mit Antikörpern gegen CD34 bzw. CD184 anfärben. Die Zellen waren negativ für die Antigene CD45 und CD106. Aufgrund der Übereinstimmung der Profile konnten "endothel-ähnliche" Zellen aus Wharton's jelly eindeutig als endotheliale Zellen identifiziert werden.

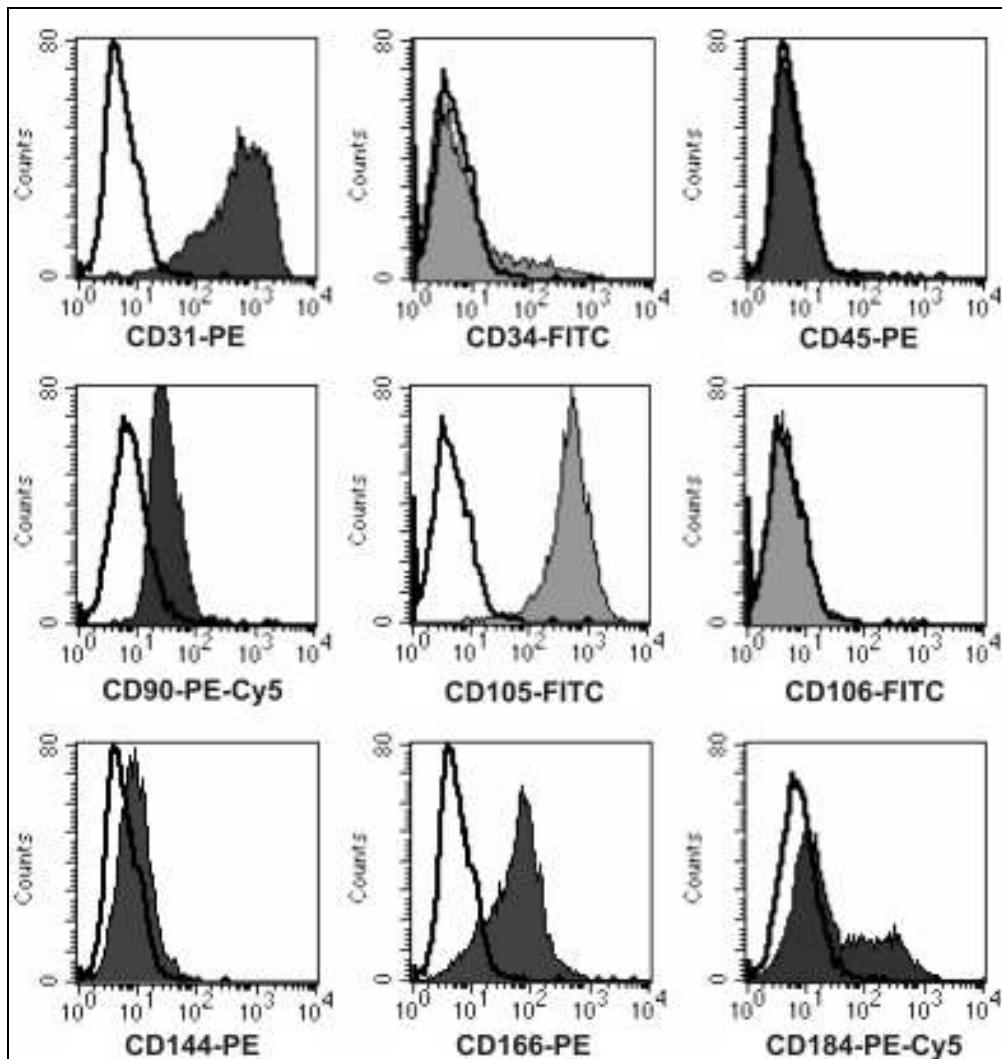


Abbildung E-17: Oberflächenmarkerprofil von „endothel-ähnlichen“ Zellen aus der Nabelschnurmatrix – nicht ausgefüllte Histogramme: Isotypkontrolle, konjugiert an FITC/PE/PE-Cy-5 (wie angegeben), ausgefüllte Histogramme: Antikörper gegen das jeweils angegebene Antigen, konjugiert an FITC/PE/PE-Cy-5 (wie angegeben)

4.2.2 Immunverträglichkeit der potenziellen Feederzellen

Nach einer Kokultur von Feederzellen und HSC kann es kaum vermieden werden, dass auch Feederzellen mit in den Empfänger transplantiert werden. Daher ist es wichtig zu evaluieren, ob die Feederzellen eine Wirkung auf das Immunsystem des Empfängers haben könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivierung allogener T-Zellen durch die potenziellen Feederzellen getestet. Dazu wurden zu den Feederzellen allogene mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (peripheral blood mononuclear cells = PBMC) mit Feederzellen in unterschiedlichen Zellzahlverhältnissen (1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 – Feederzellen:PBMC) stimuliert. Im Anschluss an eine viertägige Inkubation wurden die PBMC geerntet und mit

fluorochromkonjugierten Antikörpern gefärbt. Im FACS wurde die Fluoreszenz der gefärbten Zellen gemessen. Die T-Zellen konnten anhand ihrer Expression des Oberflächenmarkers CD3 erkannt und der Anteil aktivierter T-Zellen aufgrund des Vorhandenseins der Aktivierungsmarker CD25, CD71 sowie des frühen Aktivierungsmarkers CD69 bestimmt werden (Abbildung E-18).

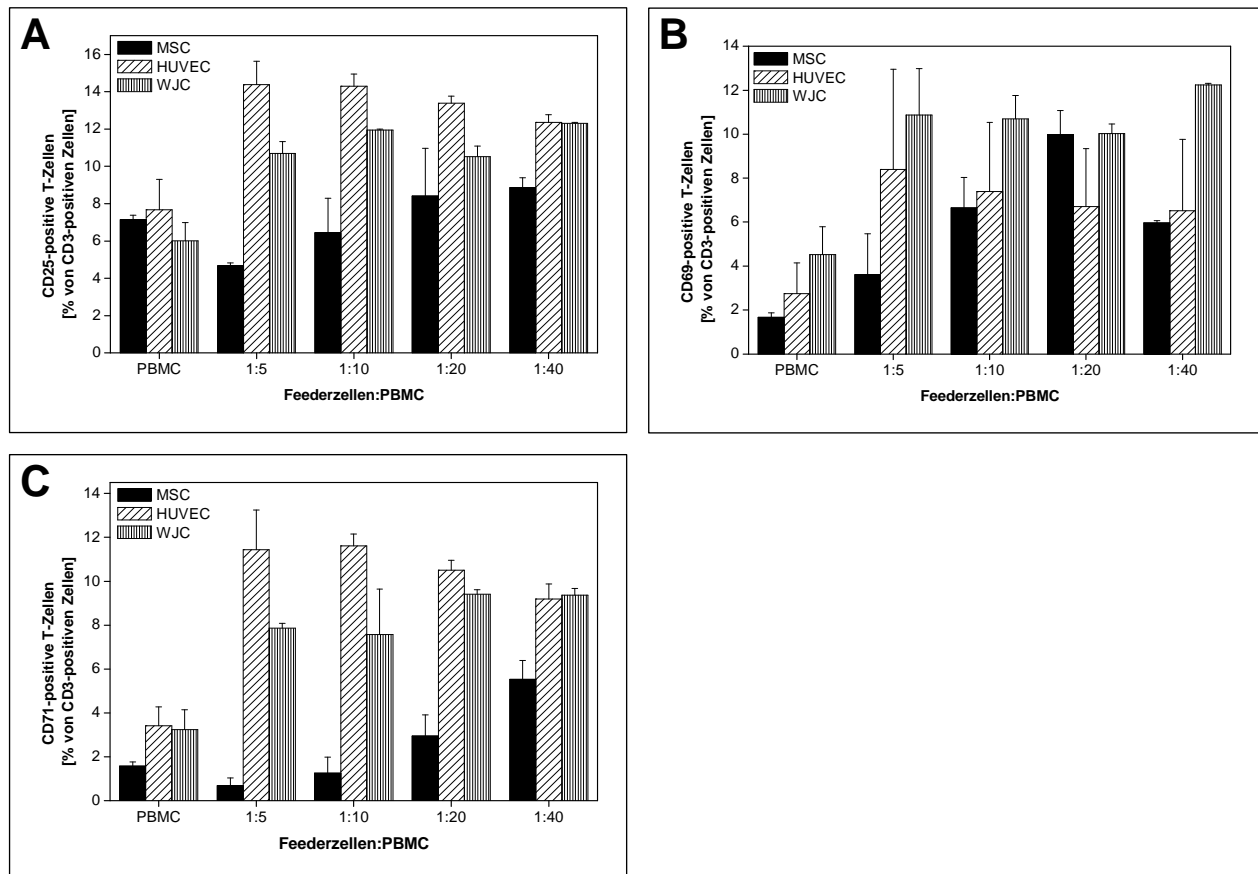


Abbildung E-18: Aktivierung allogener T-Zellen durch MSC (schwarze Balken), HUVEC (schräg schraffierte Balken) und WJC (senkrecht schraffierte Balken) – Anteil der aktivierten T-Zellen, bestimmt anhand der Expression der Oberflächenmarker CD25 (A), CD69 (B) und CD71 (C) auf CD3-positiven Zellen (FACS-Messung)

Wurden T-Zellen mit HUVEC oder WJC stimuliert, war der Prozentsatz CD25- und CD71-positiver T-Zellen selbst bei hohen Verdünnungen der Feederzellen deutlich gegenüber der Negativkontrolle erhöht. Der Anteil CD69-positiver T-Zellen war bei Stimulation mit WJC ebenfalls größer als in der Negativkontrolle, während er bei HUVEC stark variierte.

Bei der Stimulation allogener T-Zellen mit MSC ließ sich für hohe Konzentrationen Feederzellen keine signifikante Steigerung des Anteils CD25- oder CD71-positiver T-Zellen

nachweisen. Im Zellzahlverhältnis 1:5 war der Anteil aktivierter T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle etwas niedriger. Waren jedoch MSC in geringeren Konzentrationen in den Proben enthalten (ab 1:20), war der Anteil der T-Zellen, die CD25 oder CD71 exprimierten, gleich hoch bzw. höher als in der Negativkontrolle. Der Anteil CD69-positiver T-Zellen war bei allen mit MSC stimulierten T-Zellen bereits ab dem Verhältnis 1:10 signifikant höher als in der Negativkontrolle.

Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl WJC als auch HUVEC bereits in niedrigen Konzentrationen in der Lage waren, allogene T-Zellen zu aktivieren. Dies muss berücksichtigt werden, wenn diese Zellen in einen allogenen, nicht vollständig immunsupprimierten Empfänger transplantiert werden sollten. MSC in hohen Konzentrationen aktivierten allogene T-Zellen nicht. Wurden jedoch MSC in niedrigeren Konzentrationen eingesetzt, fand eine T-Zell-Aktivierung statt, so dass hier ein konzentrationsabhängiger Effekt vermutet werden kann, der wiederum relevant für Transplantationen sein könnte.

4.2.3 Kompatibilität der potenziellen Feederzellen zu HSC-Medium

Für die Kokultur von HSC mit Feederzellen in einem klinisch anwendbaren Ansatz ist es notwendig, letztere in einem kliniktauglichen Medium kultivieren zu können. Dabei sollen die Feederzellen überleben, ohne übermäßiges Wachstum zu zeigen. Ihr Nährstoffverbrauch soll die wichtigsten Nährstoffe wie Glukose und Glutamin nicht aus dem Medium depletieren, und die Akkumulation von Metaboliten im Medium soll keine inhibierenden Konzentrationsbereiche erreichen.

Um dies zu untersuchen, wurden Wachstumsanalysen mit jedem der potenziellen Feeder-Zelltypen durchgeführt. Die Zellen wurden dafür mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/cm² auf 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Die Aussaat erfolgte im normalen Kulturmedium der

Zellen, wie das auch vor einer Kokultur der Fall wäre. Am folgenden Tag wurde das Medium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit HSC-Medium (s. Tabelle M-1) versorgt. Täglich wurden pro Zelltyp und Spender die Zellen aus jeweils einer Vertiefung der Platten geerntet, der Kulturüberstand für die Medienanalytik eingesetzt und die Zellzahl bestimmt. Als Vergleich zu den Primärzellen dienten murine stromale Zellen der Linie SI/SI mod. Diese wurden vor der Aussaat mit 80 Gray bestrahlt, um ihr Wachstum zu inhibieren, wie es auch vor der Aussaat dieser Zellen als Feederzellen in Kokulturen mit HSC üblich ist.

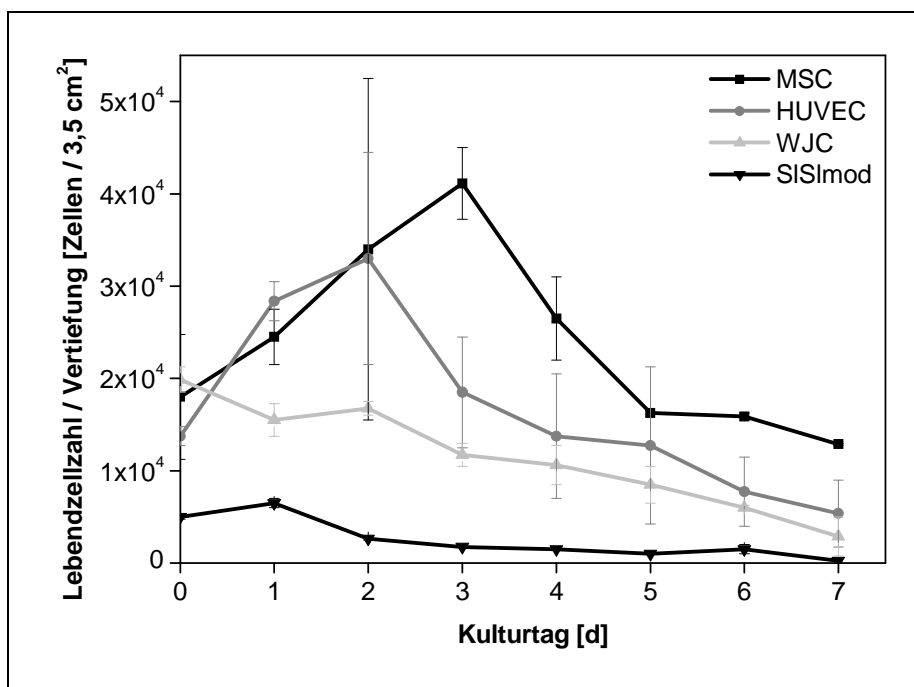


Abbildung E-19: Kompatibilität der potenziellen Feederzellen zu HSC-Medium – Lebendzellzahl von MSC (schwarze Linie mit großen Vierecken), HUVEC (dunkelgraue Linie mit kleinen Quadraten) und WJC (hellgraue Linie mit Dreiecken) im Vergleich zu bestrahlten SI/SI mod (schwarze Linie mit Dreiecken) über 7-tägige Kultur in HSC-Medium

Sowohl MSC als auch HUVEC zeigten zunächst ansteigende Lebendzellzahlen (Abbildung E-19), die jedoch ab Tag 2 (HUVEC) bzw. 3 (MSC) wieder abnahmen. Bei WJC sank die Zellzahl ab dem Zeitpunkt des Umsetzens auf HSC-Medium ab. An Kulturtag 7, an dem üblicherweise die Ernte der HSC stattfindet, waren bei den getesteten Primärzellen nur noch zwischen $1,3 \times 10^4$ (MSC) und $6,0 \times 10^3$ (WJC) lebende Zellen pro Vertiefung vorhanden. Die Lebendzellzahlen waren jedoch immer noch höher als bei bestrahlten SI/SI mod, bei denen nur noch rund 250 lebende Zellen pro Vertiefung nachzuweisen waren.

Im Kulturüberstand der Zellen wurden sowohl die Nährstoffe Glukose und Glutamin als auch deren Metabolite Laktat und Glutamat bestimmt. Die Glukosekonzentration, zu Beginn des Experiments zwischen 20 und 25 mM, sank nur geringfügig auf Werte um ca. 20 mM ab (Abbildung E-20 A). Dabei lag der Verbrauch der Primärzellen im selben Rahmen wie der Verbrauch von SI/SI mod. Glutamin war bereits zu Beginn der Kultur nur in relativ geringer Konzentration im Medium enthalten (ca. 0,5 mM bei MSC, HUVEC und SI/SI mod sowie ca. 2,5 mM bei WJC – s. Abbildung E-20 B – die Konzentrationsunterschiede beruhen auf Verwendung unterschiedlicher Mediumchargen). Am Ende des Kulturzeitraums war Glutamin nahezu komplett aus dem Medium depletiert, lediglich bei WJC, deren Startkonzentration höher gewesen war, waren noch ca. 1,3 mM Glutamin im Medium enthalten. Die Laktatkonzentration im Medium stieg von 0 (d. 0) auf Werte zwischen 3,5 mM (MSC) und 6,5 mM (SI/SI mod) an, wobei sie bei sämtlichen Primärzellen geringer blieb als bei SI/SI mod (Abbildung E-20 C). Die Glutamatkonzentration erhöhte sich bei allen getesteten Zellen von 0,6 – 0,9 mM auf 1,0 – 1,2 mM an (Abbildung E-20 D).

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass alle getesteten Primärzellen in der Lage waren, in HSC-Medium zu überleben, wobei ihre Eigenschaften bezüglich Lebendzellzahl und Wachstum für die Kokultur vermutlich geeignet sind. Ihr Glukoseverbrauch depletierte diesen Nährstoff nicht aus dem Medium, Glutamin dagegen wurde komplett (bzw. für WJC zu großem Anteil) verbraucht und sollte daher in Kokulturversuchen den Kulturen in höheren Konzentrationen zugesetzt werden. Beide getesteten Metabolite (Laktat und Glutamat) wiesen auch am Ende des Versuches keine kritisch hohen Konzentrationen auf.

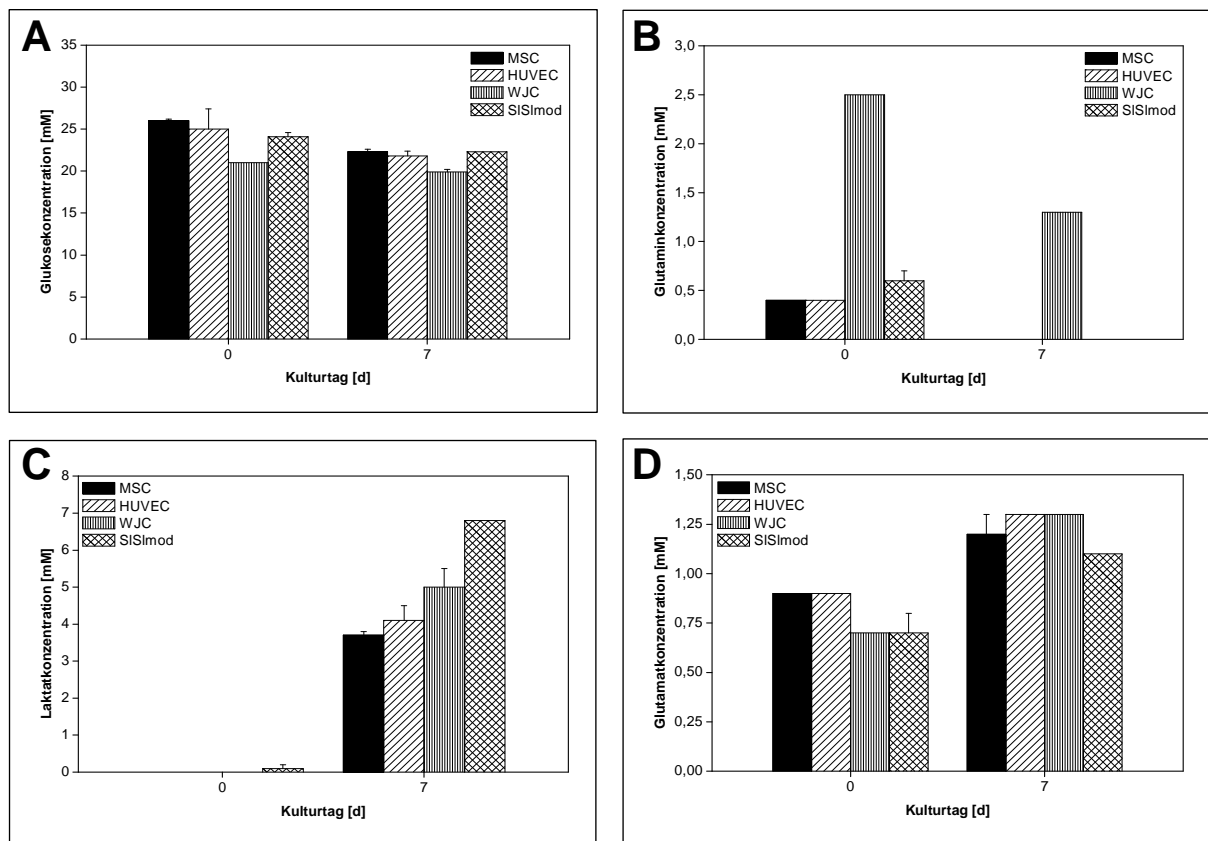


Abbildung E-20: Konzentrationen von Substraten und Metaboliten im Kulturüberstand von MSC (schwarze Balken HUVEC), (schräg schraffierte Balken) und WJC (senkrecht schraffierte Balken) im Vergleich zu Si/Si mod (Balken mit Karos) vor und nach 7-tägiger Kultur in HSC-Medium – A: Glukose, B: Glutamin, C: Laktat, D: Glutamat

4.3 Kokultur von HSC mit potenziellen Feederzellen

4.3.1 MSC als Feederzellen – Zellzahlverhältnis HSC:Feederzellen

Das Potenzial von MSC für die Unterstützung der *ex-vivo*-Expansion von HSC wurde in Kokulturrexperimenten in Zellkulturflaschen getestet. Hierbei wurde untersucht, ob sich das Zellzahlverhältnis Feederzellen:HSC auf die Expansion der HSC auswirkt.

Dazu wurden MSC auf Zellkulturflaschen mit 25 cm² Fläche ausgesät. Hierbei wurden im Unterschied zu den komparativen Kokulturversuchen (s. 4.3.2) Zellen verwendet, die sich bereits in Kultur befanden und nicht frisch aufgetaut worden waren. In einem Parallelansatz wurden dafür MSC zweier unterschiedlicher Spender eingesetzt. Die Aussaatdichten der

Zellen betragen 5×10^3 und 1×10^4 Zellen/cm². Die Zellen wurden in ihrem Standardkulturmedium ausgesät und darin über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen, die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und eine Zellsuspension von HSC in deren Standardmedium auf die Feederzellen ausgesät. Als Negativkontrolle wurde eine Suspensionskultur von HSC ohne Feederzellen verwendet. Dafür wurden HSC von 4 (Versuch 1) bzw. 3 Spendern (Versuch 2) vereinigt, um Spendervariabilitäten auszugleichen. Nach 7 Tagen Kokultur wurden die Zellen durch enzymatischen Verdau mit Trypsin geerntet und die Zellzahl der mononukleären Zellen bestimmt. MSC konnten anhand ihrer Zellgröße leicht von den HSC und den davon abgeleiteten Zellen unterschieden werden und wurden nicht mitgezählt. Die geernteten Zellen wurden im CFC-Assay auf ihren Gehalt an koloniebildenden Vorläuferzellen getestet.

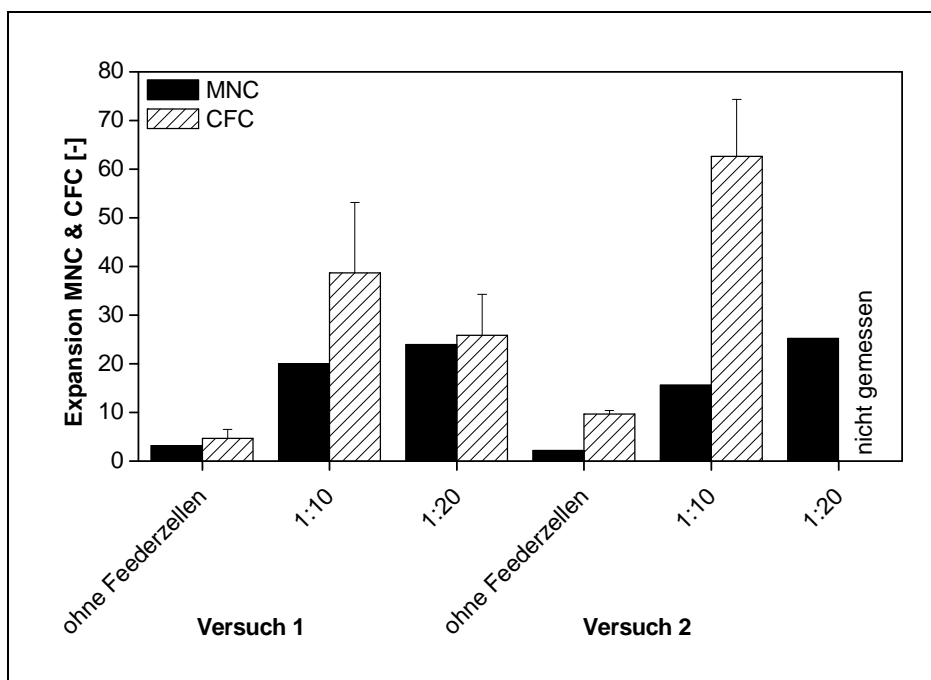


Abbildung E-21: Expansion von HSC mit MSC als Feederzellen, Vergleich der Zellzahlverhältnisse 1:10 und 1:20 HSC:MSC – Expansion von mononukleären Zellen (Bestimmung der Lebendzellzahl in Neubauer-Zählkammer; schwarze Balken) bzw. CFC (Bestimmung im CFC-Assay; schräg schraffierte Balken)

Beide Zellzahlverhältnisse (HSC:MSC im Verhältnis 1:10 und 1:20) zeigten eine signifikant höhere Expansion sowohl von mononukleären Zellen als auch von CFCs als die Negativkontrolle (Abbildung E-21). Die Unterschiede zwischen den Zellzahlverhältnissen

sind relativ gering. Während die Expansion der mononukleären Zellen bei der Aussaat von 1 HSC pro 20 Feederzellen höher war, war die Vermehrung der CFCs beim Zellzahlverhältnis 1:10 höher (hier konnte jedoch aufgrund experimenteller Probleme lediglich einer der beiden Versuchsansätze ausgewertet werden). Aufgrund dieser Daten erscheinen MSC als Feederzellen für HSC in beiden getesteten Zellzahlverhältnissen als geeignet.

4.3.2 Direkter Vergleich aller potenziellen Feederzellen

Um festzustellen, ob sich einer der potenziellen Feederzelltypen besser als die anderen zur Kokultur mit HSC eignet, wurden in zwei Kokulturversuchen alle Feederzelltypen parallel getestet. Dabei wurde auch die murine Stromazelllinie SI/SI mod als Positivkontrolle mitgeführt, um deren Unterstützung der HSC-Expansion mit der der Primärzelltypen vergleichen zu können. Für die Untersuchung der Fähigkeiten der potenziellen Feederzellen zur Unterstützung der Expansion von HSC wurde ein Versuchsaufbau gewählt, der in einem klinischen Umfeld einsetzbar erscheint. Hierbei wurden kryokonservierte Zellen (sowohl primäre Feederzellen als auch HSC) verwendet und sowohl Vor- als auch Hauptkulturzeiten möglichst kurz gehalten (1 Tag Vorkultur für Feederzellen und 7 Tage Hauptkultur mit HSC und Feederzellen).

Statt HSC eines einzelnen Spenders zu verwenden, wurden CD34-positive Zellen von 7 Spendern vereinigt. Die Zellen wurden dann aliquotiert und wieder kryokonserviert. Somit konnten in allen Kokulturexperimenten HSC der selben Herkunft und Zusammensetzung verwendet werden. Bei den Feederzellen wurden dagegen für jedes Kokulturexperiment immer nur Zellen eines einzelnen Spenders eingesetzt. Für die beiden durchgeführten vergleichenden Kokulturversuche wurden für jeden Feederzelltyp somit zwei Spender ausgewählt. Durch diese Vorgehensweise sollte die Spendervariabilität bei den HSC möglichst gering gehalten werden, um besser untersuchen zu können, ob möglicherweise

auftretende Unterschiede in der Expansion auf Variabilität bei den Feederzellen oder andere Einflüsse zurückzuführen sind.

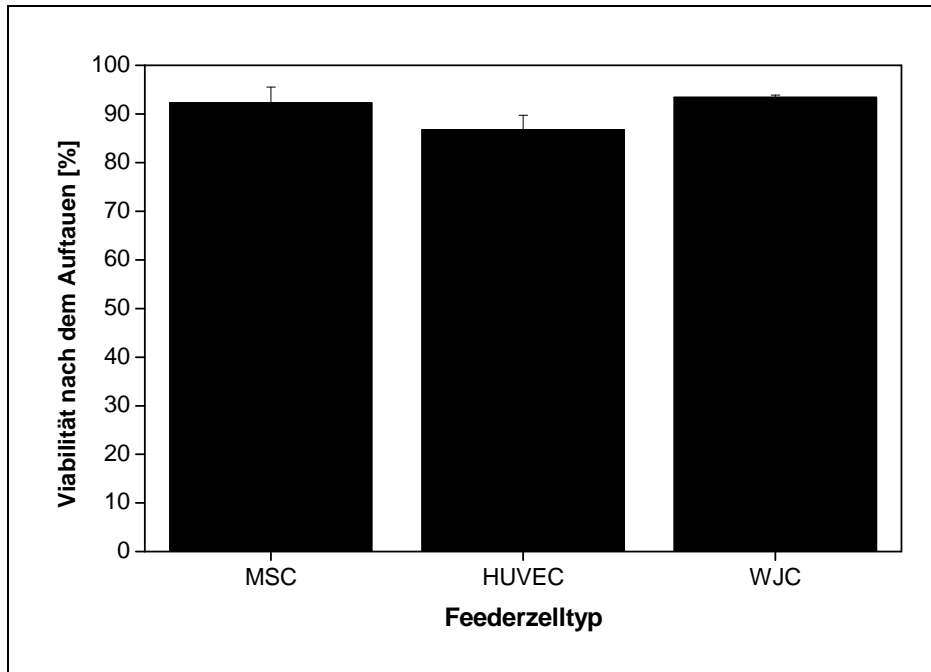


Abbildung E-22: Viabilität der potenziellen Feederzellen nach dem Auftauen – Vergleich von MSC (schwarze Balken), HUVEC (schräg schraffierte Balken) und WJC (senkrecht schraffierte Balken), Bestimmung mittels Trypanblaufärbung und Zählung in Neubauer-Zählkammer (Mittelwert aus beiden Kokulturrexperimenten)

Alle potenziellen Feederzellen wiesen nach dem Auftauen hohe Viabilität auf (Abbildung E-22) und adhärten in der gewählten Aussaatdichte von 1×10^4 Zellen/cm² problemlos über Nacht. Auch in HSC-Medium blieben sie auf dem Boden der Kulturgefäße haften. Nach siebentägiger Kokultur konnte beobachtet werden, dass die HSC und von diesen abgeleitete Zellen sich an die Feederzellen angeheftet hatten (Abbildung E-23). Die Ernte der Zellen erfolgte ohne Trypsin lediglich mittels Abspülen. Dadurch wurde vermieden, dass sich die Feederzellen ebenfalls ablösten und so die Zählung bzw. funktionellen Experimente (CFC- und CAFC-Assay) verfälschten. Tatsächlich waren in den für die Zellzählung der HSC und daraus abgeleiteten Zellen entnommenen Proben nur sehr wenige bis gar keine Feederzellen zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

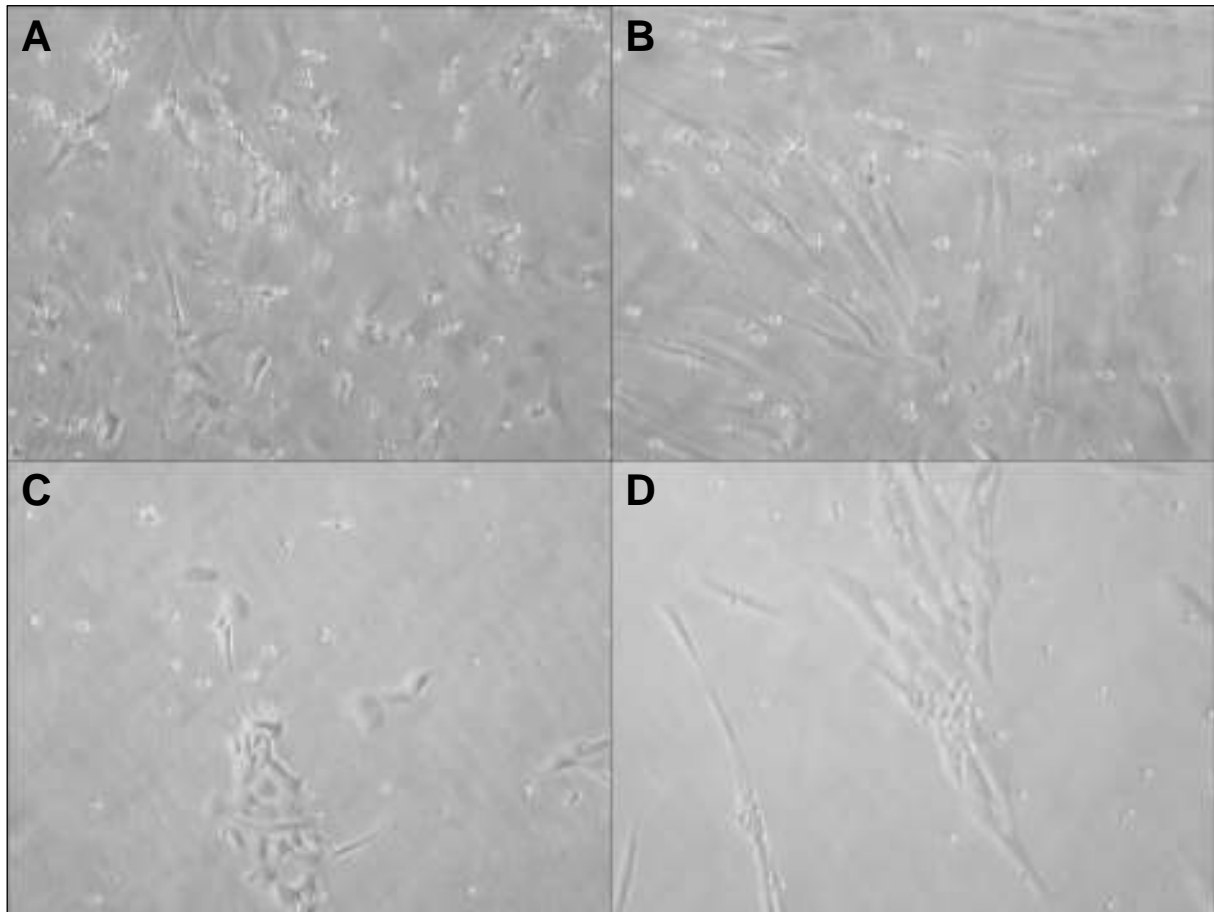


Abbildung E-23: Kokultur von HSC mit potenziellen Feederzellen – Mikroskop-Aufnahmen an d. 7 der Kokultur (Originalvergrößerung: 10fach); Feederzellen: SI/SI mod (A), MSC (B), HUVEC (C), WJC (D)

Da in Vorversuchen mit Feederzellen ohne HSC bereits eine Glutamindepletion des Mediums aufgetreten war (s. 4.2.3), wurde dem HSC-Medium für die Kokulturversuche direkt vor dem Kulturbeginn Glutamin in einer Konzentration von 4 mM zusätzlich zum bereits enthaltenen Glutamin hinzugefügt. An Tag 7 war beim ersten Kokulturrexperiment noch eine Glutaminkonzentration von 2,6 – 3,0 mM, beim zweiten Experiment zwischen 3,2 und 3,4 mM im Medium enthalten (Abbildung E-24). Die Glukosekonzentration nach der Kokultur lag zu diesem Zeitpunkt zwischen 17 – 21 bzw. 21 – 25 mM. Die Laktatkonzentration betrug bei primären Feederzellen 2,1 – 3,0 mM bzw. 1,2 – 3,4 mM, während in den mit SI/SI mod als Feederzellen kultivierten Proben 10,1 mM bzw. 5,4 mM Laktat enthalten waren. Die Glutamatkonzentration war bei Kulturende 0,8 – 0,9 mM bzw. 0,7 – 0,9 mM.

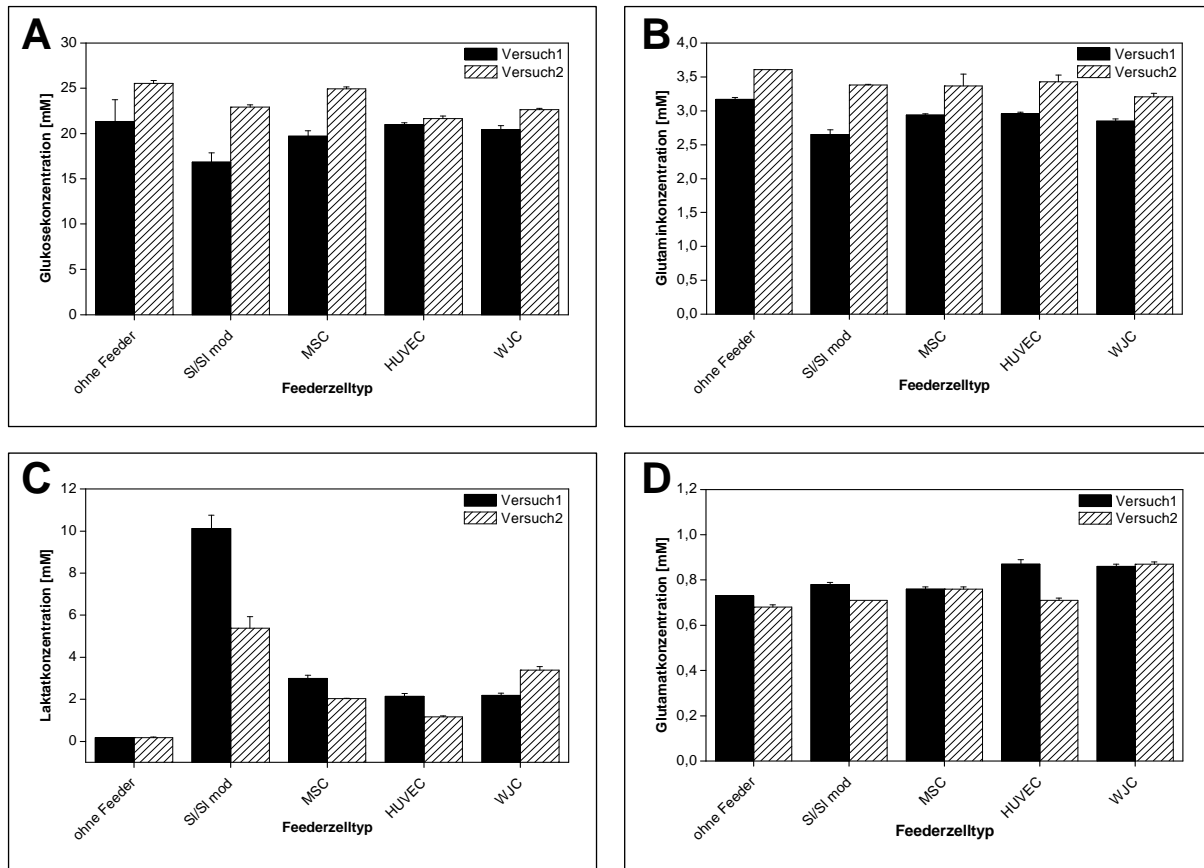


Abbildung E-24: Konzentrationen von Substraten und Metaboliten im Kulturüberstand der Kokulturversuche 1 (schwarze Balken) und 2 (schräg schraffierte Balken) ohne Feederzellen bzw. mit SI/SI mod, MSC, HUVEC und WJC als Feederzellen – A: Glukose, B: Glutamin, C: Laktat, D: Glutamat

Die Expansion von mononukleären Zellen aus HSC innerhalb von 7 Tagen Kokultur war in beiden durchgeführten Experimenten auch in den Kontrollansätzen ähnlich, wenn auch insgesamt im zweiten Experiment etwas höher (Abbildung E-25). Der absolute Expansionsfaktor der Zellen lag beim ersten Experiment für alle getesteten Primärzellen zwischen 28 und 33, beim zweiten Versuch zwischen 29 und 58. Diese Expansionsfaktoren waren vergleichbar hoch wie in der Positivkontrolle (SI/SI mod als Feederzellen: 27 bzw. 47) und signifikant höher als die in der als Negativkontrolle mitgeführten Suspensionskultur (ohne Feederzellen: 7 bzw. 9) erzielten. Beim ersten Kokulturversuch wiesen die mononukleären Zellen für alle Feederzelltypen in etwa gleiche Expansionsraten auf. Im zweiten Experiment dagegen zeigten die auf HUVEC als Feederzellen kultivierten HSC etwas geringere Expansion (29-fach) der mononukleären Zellen als die mit den anderen Primärzelltypen kokultivierten (MSC: 46-fach, WJC: 58-fach).

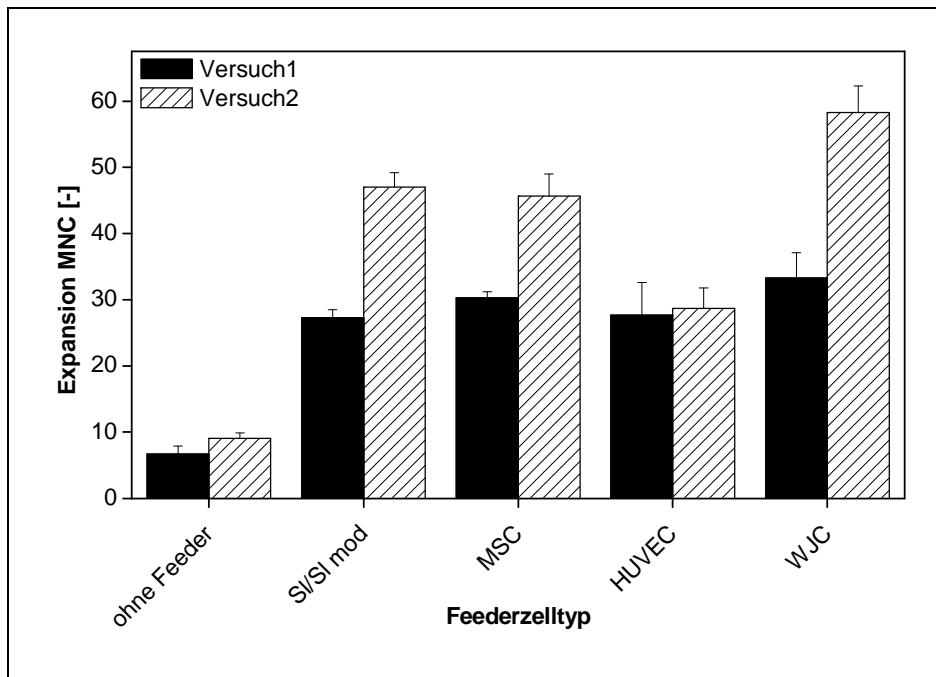


Abbildung E-25: Expansion der mononukleären Zellen (MNC) aus HSC nach 7-tägiger isolierter Suspensionskultur (ohne Feeder) bzw. Kokultur mit SI/SI mod, MSC, HUVEC oder WJC – Expansionsraten von Kokulturerprobung 1 (schwarze Balken) und 2 (schräg schraffierte Balken), ermittelt anhand Lebendzellzahlbestimmung in Neubauer-Zählkammer

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob auch die Anzahl der Vorläuferzellen durch die Kultur vergrößert werden konnte, wurde die Anzahl koloniebildender Zellen im CFC-Assay ermittelt. Hierbei zeigten die auf primären Feederzellen kultivierten HSC etwas geringere CFC-Expansion (24- bis 40-fach) als die auf SI/SI mod als Positivkontrolle kultivierten (40- bis 50-fach), jedoch war der Unterschied nicht signifikant (Abbildung E-26).

Die Verteilung der CFC (Abbildung E-27) war für alle als Feederzellen eingesetzten Primärzellen ähnlich. Im ersten der beiden Kokulturerperimente wurden bei WJC wenige CFU-GM detektiert, die außer in der Positivkontrolle bei keinem anderen Feederzelltyp nachgewiesen werden konnten. Beim zweiten Versuch traten im Unterschied zur Positivkontrolle in keinem der Ansätze mit Primärzellen als Feederzellen CFU-GM auf. Stattdessen wurden sowohl in der Positivkontrolle als auch bei MSC als Feederzellen einzelne CFU-GEMM gefunden. In beiden Experimenten war bei der Verwendung von WJC als Feederzellen die Anzahl der BFU-E etwas geringer als bei den übrigen Feederzellen, allerdings waren die Unterschiede vor allem im zweiten Kokulturerperiment nur geringfügig.

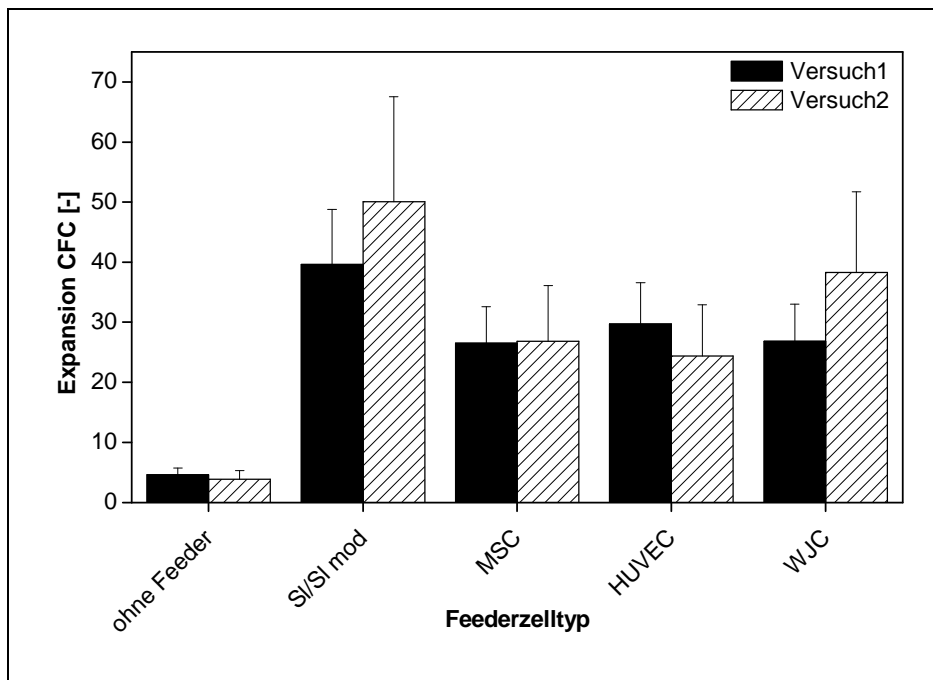


Abbildung E-26: Expansion von CFC aus HSC nach 7-tägiger isolierter Suspensionskultur (ohne Feeder) bzw. Kokultur mit SI/SI mod, MSC, HUVEC oder WJC – Expansionsraten von Kokulturversuch 1 (schwarze Balken) und 2 (schräg schraffierte Balken), ermittelt anhand CFC-Assay

Die Expansion der CAFC (Abbildung E-28) war mit allen primären Feederzellen ähnlich effizient wie mit SI/SI mod als Feederzellen oder besser als diese Positivkontrolle und lag signifikant über der in isolierter Suspensionskultur erzielten. In dieser konnte keine Expansion von CAFC erreicht werden. Beim ersten durchgeführten Experiment lag die CAFC-Expansion mit MSC als Feederzellen mit einem Expansionsfaktor von 24 über der der mit SI/SI mod, HUVEC oder WJC als Feederzellen kokultivierten HSC (Expansionsfaktor 13 – 16). Beim zweiten Versuch war dagegen die CAFC-Expansion mit SI/SI mod, MSC und HUVEC als Feederzellen vergleichbar hoch (Expansionsfaktor 35 – 38), während die CAFC-Expansion mit WJC als Feederzellen stärker war (Expansionsfaktor 54).

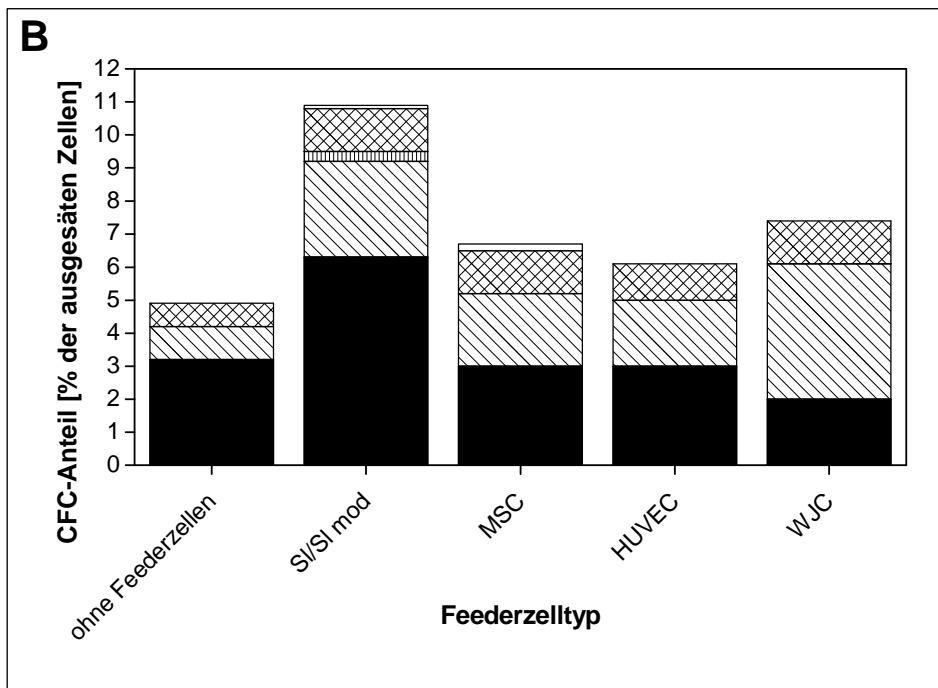
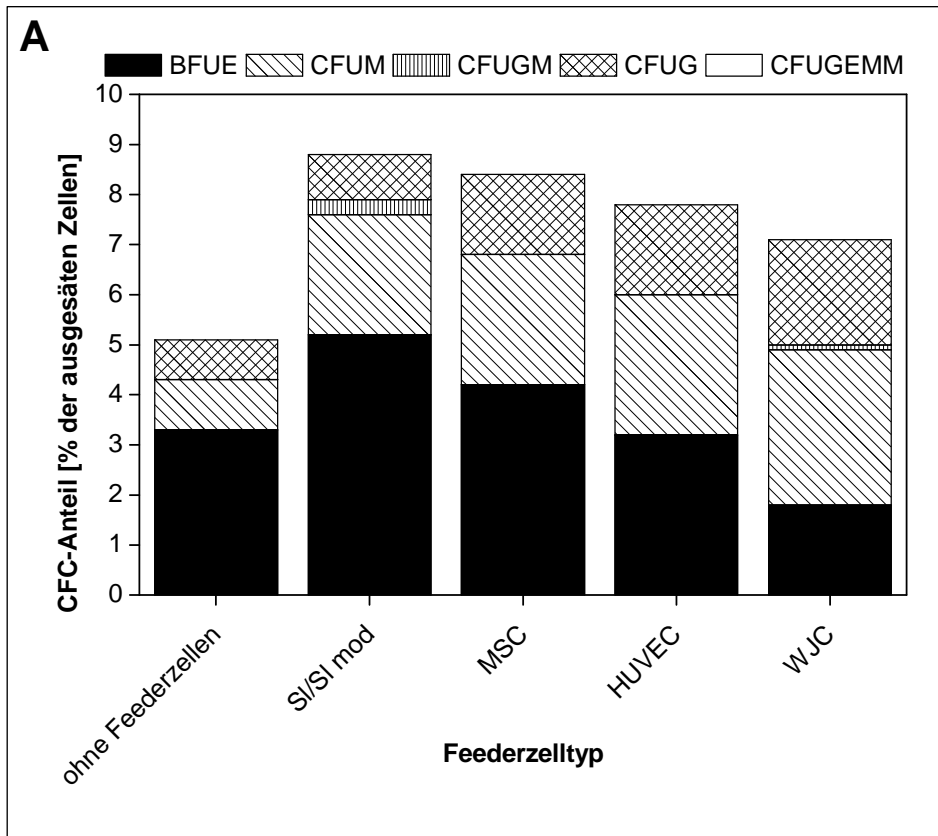


Abbildung E-27: CFC-Verteilung nach 7-tägiger Expansion von HSC in isolierter Suspensionskultur bzw. Kokultur mit SI/SI mod, MSC, HUVEC oder WJC – A: Kokulturversuch 1, B: Kokulturversuch 2; BFU-E: schwarze Balken, CFU-G: schräg schraffierte Balken, CFU-GM: senkrecht schraffierte Balken, CFU-M: Balken mit Karos, CFU-GEMM: weiße Balken

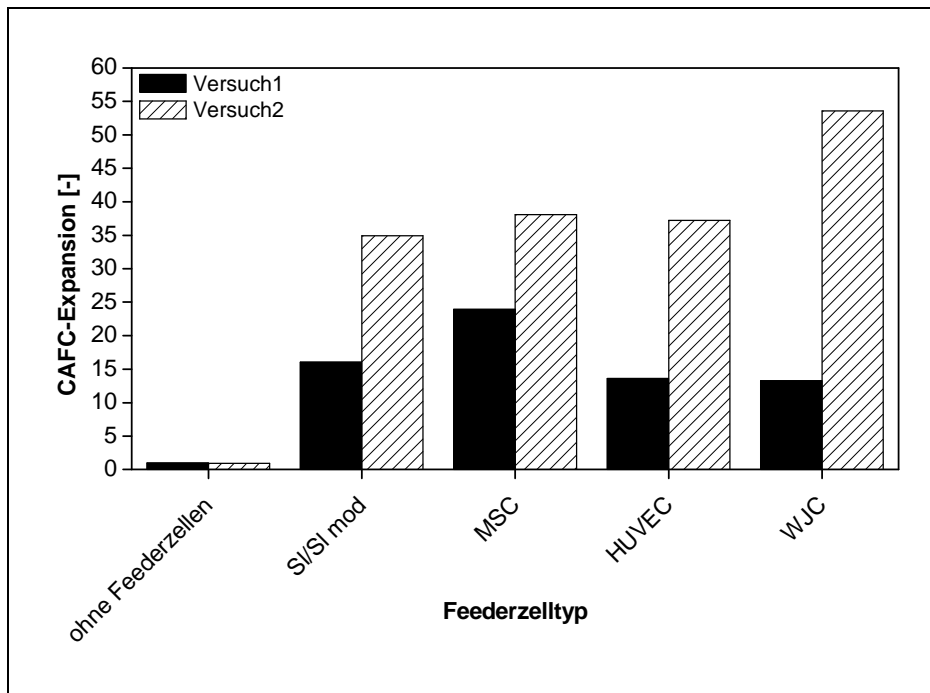


Abbildung E-28: Expansion von CAFC aus HSC nach 7-tägiger isolierter Suspensionskultur (ohne Feeder) bzw. Kokultur mit SI/SI mod, MSC, HUVEC oder WJC – Expansionsraten von Kokulturversuch 1 (schwarze Balken) und 2 (schräg schraffierte Balken), ermittelt anhand CAFC-Assay

Die Kokultur von HSC mit primären Feederzellen ließ sich auch unter den gewählten, an klinische Bedürfnisse angepassten Bedingungen gut durchführen. Alle Feederzellen zeigten nach dem Auftauen hohe Viabilität und adhärten auch in der hier verwendeten niedrigen Aussaatdichte gut an die Kulturgefäße. Bei Hinzufügen von 4 mM Glutamin zusätzlich zu dem bereits vom Hersteller aus im Medium enthaltenen trat keine Depletion dieses Nährstoffes mehr auf. Auch zum Kulturende war noch ausreichend Glukose in den Kulturüberständen vorhanden, und die Laktat- bzw. Glutamatkonzentrationen erreichten keine kritischen Werte. Die Expansion der mononukleären Zellen aus HSC war für alle als Feederzellen eingesetzte Primärzelltypen ähnlich hoch wie für die als Positivkontrolle verwendete Zelllinie SI/SI mod, die Expansion der CFC dagegen etwas geringer. Bei den CFC konnten die primitiveren CFU-GM und CFU-GEMM nur sehr vereinzelt nachgewiesen werden, auf HUVEC als Feederzellen konnte keiner dieser beiden Kolonietypen gezeigt werden. Die CAFC-Expansion war für alle primären Feederzellen vergleichbar hoch oder höher als bei SI/SI mod als Feederzellen, wobei für MSC und WJC eine leichte Spendervariabilität zu beobachten war. Je einer der beiden untersuchten Spender

unterstützte die CAFC-Expansion besser als die anderen parallel getesteten Zelltypen. Diese Ergebnisse zeigen, dass grundsätzlich alle potenziellen Feederzelltypen ähnlich geeignet für die Kokultur mit HSC sind.

5 Diskussion

Obwohl Nabelschnurblut eine viel versprechende Quelle von HSC darstellt und bereits zahlreiche Transplantationen damit durchgeführt wurden, bleibt sein klinischer Nutzen für die Transplantation umstritten. Trotz der Optimierung der Nabelschnurblutgewinnung und –lagerung kommen Hough R. E. *et al.*, 2004, zu dem Schluss, dass Nabelschnurbluttransplantationen für Personen mit mehr als 66 kg Körpergewicht nicht möglich sein werden. Der limitierende Faktor ist die Anzahl der HSC, die in Nabelschnurblutproben aufgrund deren Größe nicht ausreichend für die Transplantationen Erwachsener sind. Wäre es möglich, die HSC aus Nabelschnurblut *in vitro* zu expandieren, könnte dieses dadurch auch für Erwachsene als Stammzellquelle zugänglich gemacht werden. Verschiedene Möglichkeiten zur Expansion wurden bereits in klinischen Studien getestet, wobei gute Expansion der Progenitorzellen erreicht wurde, aber unklar bleibt, ob auch die primitiveren HSC expandiert werden, die für die Langzeitsiedlung der HSC verantwortlich sind (Hough R. E. *et al.*, 2004).

Durch die Kokultur mit Feederzellen können die Kulturbedingungen für HSC verbessert werden: auf diese Weise wird eine Umgebung geschaffen, die den natürlichen Bedingungen im Knochenmark ähnlicher ist als die häufig praktizierte Suspensionskultur. Dadurch behalten sie ihre Stammzellqualität bei (Breems D. A. *et al.*, 1998) Bis jetzt sind in den *in vitro*-Studien hierzu häufig murine Zelllinien als Feederzellen zum Einsatz gekommen. Diese taugen jedoch nur bedingt für die klinische Anwendung. Das wichtigste Problem hierbei ist die Herkunft der Zelllinien aus der Maus, wodurch das Problem entsteht, dass bei unvollständiger Trennung von Feederzellen und HSC nach der Kultur erstere in den Patienten mittransplantiert würden. Eine solche Xenotransplantation bringt jedoch hohe Risiken für den Patienten mit sich, neben der Gefahr von Abstoßungsreaktionen ist vor allem die Übertragung endogener Retroviren und anderer möglicher Krankheitserreger zu nennen

(Dorling A., 2002). Letztere könnte auch bereits während der Kokultivierung auf die später transplantierten HSC erfolgen. Daher sollten in dieser Arbeit Alternativen gefunden werden, die anstelle der murinen Zelllinien verwendet werden können. Hierfür wurden Primärzellen aus verschiedenen Quellen auf ihre Eigenschaften getestet, wobei vor allem die klinische Einsetzbarkeit des Systems im Mittelpunkt stand.

5.1 Verfügbarkeit der potenziellen Feederzellen

5.1.1 Kriterien

Um die Kokultur von HSC aus Nabelschnurblut mit primären Feederzellen klinisch verwenden zu können, ist es zunächst wichtig, dass die Verfügbarkeit ausreichender Zellzahlen von jedem Spender gewährleistet ist. Das Risiko der Kontamination mit Bakterien oder Pilzen, die z.B. während der Entnahme der benötigten Gewebe oder bei der Präparation entstehen können, sollte so gering wie möglich sein, um den Verlust des Materials einzelner Spender zu vermeiden. Sowohl Verfügbarkeit als auch geringes Kontaminationsrisiko sind vor allem dann entscheidend, wenn HSC und Feederzellen vom selben Spender stammen, d.h. "autolog" zueinander eingesetzt werden sollen. Wichtig sind sie aber auch beim allogenen Einsatz der Feederzellen, da ein passender allogener Spender schwierig zu finden ist. Soll also ein Kokultursystem in der klinischen Routine eingesetzt werden, muss gewährleistet sein, dass sowohl HSC als auch Feederzellen von jedem Spender zur Verfügung stehen. Die Verwendung zueinander autologer HSC und Feederzellen ist wünschenswert, weil dadurch nicht zwei zu einem Patienten passende Spender (je einer für HSC bzw. Feederzellen) gefunden werden müssen, sondern ein Spender für beide Zellarten ausreicht. Ein weiterer Parameter, der beim klinischen Einsatz eine Rolle spielt, ist der Aufwand, der nötig ist, um die Feederzellen aus den Proben zu gewinnen. Die Prozeduren sollten möglichst einfach gehalten sein und wenig Zeit in Anspruch nehmen, wünschenswert wäre eine Methode, die sich ohne Probleme in einem automatisierten, geschlossenen System realisieren lässt. Auch die Medien und Lösungen,

118

die für Präparation und Kultur der Zellen gebraucht werden, müssen bestimmte Qualitätsmerkmale aufweisen. Neben einer Herstellung unter kontrollierten Bedingungen (GMP-Zertifizierung) sollten sie nach Möglichkeit von tierischen Produkten wie beispielsweise bovinem Serum frei sein. Die Verwendung tierischer Seren schließt die klinische Anwendung der mit Hilfe dieses Materials kultivierter Zellen aber nicht aus, wenn bei der Gewinnung der entsprechenden Produkte Sicherheitsmaßnahmen eingehalten werden.

Alle in dieser Arbeit untersuchten potenziellen Feederzelltypen werden im Folgenden anhand dieser Kriterien bezüglich ihrer Tauglichkeit für den klinischen Einsatz in der Kokultur mit HSC analysiert.

5.1.2 Mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblut (CB-MS)

Bereits seit einiger Zeit gibt es Versuche, stromale Zellen aus Nabelschnurblut oder auch aus Blut von adulten Spendern zu gewinnen. Beispielsweise zeigten Ye Z. Q. *et al.*, 1994, dass aus Nabelschnurblut auf speziellen Glasoberflächen heterogene adhärenente Zellpopulationen generiert werden konnten. Nähere Analysen wiesen Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen in den Kulturen nach, die Zellpopulationen konnten das Langzeitwachstum von hämatopoetischen Vorläuferzellen unterstützen. Fibroblastförmige Zellen, deren Oberflächenmarkerexpression der von MSC ähnelt, wurden auch in Wachstumsfaktor-mobilisiertem peripherem Blut von Brustkrebspatientinnen gefunden, das wie Nabelschnurblut ebenfalls eine HSC-Quelle für Transplantationen darstellt (Fernandez M. *et al.*, 1997).

Die erste Beschreibung mesenchymaler Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut stammt von Erices A. *et al.*, 2000. Sie konnten neben osteoklastähnlichen Zellen auch fibroblastförmige Zellen aus Nabelschnurblut gewinnen. Letztere zeigten ein Oberflächenmarkerprofil, das

dem von MSC ähnelt, und konnten in vitro sowohl in adipogene als auch osteogene Richtung differenziert werden. Lee O. K. *et al.*, 2004, generierten aus Nabelschnurblut schnell wachsende Zellklone mit fibroblastähnlicher Morphologie, deren Oberflächenmarkerprofil vergleichbar mit dem von MSC war. Diese Zellen konnten in vitro nicht nur in die für MSC typischen Richtungen (osteogen, adipogen, chondrogen) differenziert werden, sondern auch zu Neuroglia- und Hepatozyten-ähnlichen Zellen, die nicht zu den mesodermalen, sondern zu den ekto- bzw. endodermalen Zelltypen gerechnet werden.

MSC sind als Feederzellen für die Kokultur mit HSC interessant, vor allem vor dem Hintergrund, die Feederzellen aus derselben Nabelschnurblutprobe wie die HSC gewinnen zu können. Daher wurde auch im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit zur Generierung von MSC aus Nabelschnurblutproben untersucht. Hierbei wurde trotz Verwendung unterschiedlicher Zelldichten, Zellkulturoberflächen und –medien kein Erfolg erzielt. Die gelegentlich erhaltenen adhärenen Zellen wiesen in keinem der durchgeführten Versuche eine fibroblastähnliche Morphologie auf.

Auch andere Autoren berichten von Schwierigkeiten bei dem Versuch, MSC aus Nabelschnurblut zu gewinnen. So konnten in einer Studie aus 58 Nabelschnurblutproben zwar adhärenente Zellen isoliert werden, diese wiesen aber Charakteristika hämatopoetischer Zellen auf und konnten nicht wie MSC in adipogene, osteogene oder chondrogene Richtung differenziert werden (Mareschi K. *et al.*, 2001). Gutierrez-Rodriguez M. *et al.*, 2000, konnten in Nabelschnurblut keine als Indiz für MSC angesehene CFU-F-Bildung nachweisen, die adhärenente Zellen, die sich aus dem kultivierten Nabelschnurblut entwickelten, trugen zum Großteil für Lymphozyten (Dendriten, Monozyten bzw. Makrophagen) spezifische Oberflächenmarker. Auch Wexler S. A. *et al.*, 2003 konnten aus Nabelschnurblut nur adhärenente Zellen kultivieren, die die Oberflächenmarker CD45 und CD14 exprimierten und somit vermutlich Monozyten sind. CFU-F-Bildung konnte aus Nabelschnurblut nicht gezeigt werden. Yu M. *et al.*, 2004, konnten aus fetalem Blut (Gestationswoche 16 – 26) sehr effektiv

fibroblastförmige Zellen isolieren, die sich über viele Passagen in Kultur halten ließen und in adipogene, osteogene sowie neurogene Richtung differenzierten. Aus Nabelschnurblut, das am normalen Geburtstermin (ca. 40. Schwangerschaftswoche) entnommen worden war, entwickelten sich fibroblastförmige Zellen nur bei 2 von 19 Proben. Aus weiteren 15 Proben konnten zwar adhärenente Zellen kultiviert werden, diese lebten jedoch nicht länger als 2 Passagen und exprimierten im Gegensatz zu den fibroblastförmigen Zellen hämatopoetische Oberflächenmarker.

Anhand dieser Literaturdaten und den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten kann davon ausgegangen werden, dass die Frequenz von MSC oder ähnlichen Zellen in Nabelschnurblut vermutlich sehr gering ist. Es wurde z.B. auch beschrieben, dass bei der Generierung von USSC – fibroblastähnlicher Zellen aus Nabelschnurblut, die ein hohes Differenzierungspotenzial in Zellen aller Keimblätter aufweisen – Zellwachstum fibroblastförmiger Kolonien nur in 40,3 % der Proben erreicht werden konnte (Kögler G. *et al.*, 2004). Pro Nabelschnurblutprobe detektierten die Autoren lediglich 1 – 11 Kolonien.

Bieback K. *et al.*, 2004, optimierten in einer Studie die Bedingungen für die Gewinnung von MSC aus Nabelschnurblut. Anhand ihrer Daten schlossen sie, dass für die Isolation von MSC aus Nabelschnurblut Proben mit einem Nettovolumen von mindestens 33 mL erforderlich waren, die mindestens 10^8 mononukleäre Zellen enthielten. Außerdem durften die Proben nicht länger als 15 Stunden bis zum Beginn der Präparation gelagert worden sein sowie keinerlei Anzeichen von Blutgerinnung oder Hämolyse zeigen. Um die Adhäsion von Monozyten zu verhindern, wurden die Zellkulturplatten mit FCS beschichtet. Selbst unter diesen optimierten Bedingungen wiesen die Autoren MSC-Wachstum lediglich in 63 % der Proben nach.

Die in dieser Arbeit verwendeten Nabelschnurblutproben enthielten nur relativ kleine Volumina (unter 50 mL, häufig zwischen 10 – 20 mL). Daher kann das fehlende Wachstum von MSC aus diesen Proben vermutlich auf deren geringe Frequenz zurückgeführt werden. Des Weiteren war die Aufbewahrungszeit bis zum Beginn der Präparation vermutlich in den meisten Fällen zu lang (bis zu 24 h nach der Geburt). Das Kulturmedium enthielt zwar in den meisten Fällen FCS, ein Beschichten der Zellkulturgefäße vor der Aussaat erfolgte jedoch nicht, so dass auch hier die Ursache für das fehlende Wachstum von MSC liegen könnte. Aufgrund der offensichtlichen Schwierigkeiten bei der Isolation von MSC aus Nabelschnurblut, die auch verschiedentlich in der Literatur belegt sind, wurden diese für die weiteren Arbeiten als potenzielle Feederzellen für HSC ausgeschlossen. Für den klinischen Einsatz der Zellen ist deren Gewinnung als zu unsicher und zu häufig nicht erfolgreich zu bewerten.

5.1.3 Mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark (MSC)

Im Gegensatz zu Nabelschnurblut ist Knochenmark seit langem als sichere Quelle mesenchymaler Stammzellen bekannt (Devine S. M., 2002). Die Gewinnung von MSC aus Knochenmark ist effektiv, und die erreichten Zellzahlen sind ausreichend für den klinischen Einsatz (Koc O. N. *et al.*, 2000). Für die Verwendung von MSC als Feederzellen für HSC aus Nabelschnurblut werden aber im Normalfall keine zu den HSC autolog gewonnenen MSC verfügbar sein. Somit müsste der Abgleich der Gewebemerkmale nicht nur zwischen einem Spender und einem Empfänger, sondern zwischen zwei Spendern und dem Empfänger durchgeführt werden. Aufgrund der Vielzahl der möglichen Kombinationen von HLA-Merkmalen kann das die Suche nach geeigneten Spendern erheblich erschweren.

Im Falle einer so genannten autologen Spende, bei der nach der Geburt eines Kindes dessen Nabelschnurblut kryokonserviert wird und für dieses Kind (oder möglicherweise dessen Verwandte) für den eventuellen späteren Einsatz zu therapeutischen Zwecken zur

Verfügung steht, wäre es denkbar, Knochenmark des Blutspenders zur Feederzellgewinnung einzusetzen. Allerdings wäre dieser Fall vermutlich sehr selten, weil bis jetzt nur ein geringer Anteil der Bevölkerung über für autologe Transplantation kryokonservierte Nabelschnurblutspenden verfügt. Außerdem wird vor allem bei Leukämien auf Nabelschnurblut als Stammzellquelle zurückgegriffen, um die Verwendung von möglicherweise Krebszellen enthaltendem Knochenmark zu vermeiden. Dann wären auch die aus Knochenmark gewonnenen MSC gefährdet, Tumorzellkontaminationen zu enthalten. Daher wäre diese Einsatzmöglichkeit vermutlich nur dann denkbar, wenn nicht der Nabelschnurblutspender selbst der Patient ist, der die Transplantation benötigt, sondern ein enger Verwandter.

Für die Entnahme von Knochenmark ist in jedem Fall ein operativer Eingriff erforderlich, der unter Vollnarkose durchgeführt wird und etwa eine Stunde dauert (ZKRD, 2003). Wie jede Operation ist auch diese mit den üblichen Risiken verbunden. Auch die Kosten für die Knochenmarksentnahme sind aufgrund dieser relativ aufwändigen Prozedur hoch, was bei einer Verwendung von MSC als Feederzellen für HSC entsprechend ebenso zu hohen Kosten führen würde.

Dagegen ist die anschließende Präparation von MSC aus dem so erhaltenen Knochenmark sehr einfach und schnell durchführbar. Nach dem Protokoll, das in dieser Arbeit verwendet wurde, dauerte sie lediglich etwa eine Stunde. Aufgrund der unkomplizierten Durchführung lässt sich die Gewinnung der Zellen vermutlich automatisieren und im geschlossenen System durchführen. Mit den Proben, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, konnte bereits direkt bei der Präparation antibiotikafrei gearbeitet werden, ohne dass Kontaminationen auftraten. Auch die Zellzahl, die innerhalb eines Monats schon aus einer kleinen Knochenmarkprobe erzielt wurde (1×10^9 Zellen), liegt deutlich über der für eine Kokultur im klinischen Maßstab benötigten Zahl ($2,8 \times 10^7$, s. 2.8). Alle diese Aspekte sind für die klinische Anwendung der Zellen sehr vorteilhaft.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind erfolgreiche Versuche, MSC ohne die Verwendung von FCS zu kultivieren, selten. In dieser Arbeit wurde Medium verwendet, das 10 % FCS enthielt. Ein Ansatz zur Kultivierung von MSC ohne tierische Seren ersetzt FCS durch Humanserum, das autolog zum Knochenmark vom entsprechenden Spender gewonnen wird (Stute N. *et al.*, 2004). Die mit 10 % Humanserum kultivierten MSC proliferierten ähnlich gut wie Zellen desselben Spenders, die sich stattdessen in Medium mit 10 % FCS befanden. Sowohl osteogene als auch adipogene Differenzierung konnten bei in Medium mit 10 % Humanserum kultivierten MSC nachgewiesen werden, das Differenzierungspotenzial der Zellen blieb bei dieser Art der Kultivierung also erhalten.

Ein anderes serumfreies Medium wurde für MSC der Ratte von Lennon D. P. *et al.*, 1995, entwickelt. Das optimierte Medium bestand aus einer Mischung von 60 % DMEM-HG und 40 % MCDB-201, die zusätzlich Insulin, PDGF-BB, bFGF und Linolensäure-BSA enthielt. Da Letzteres mit dem aus Rinderserum gewonnenen BSA einen tierischen Bestandteil enthält, ist das Medium noch nicht komplett frei von tierischen Produkten. Die Differenzierungsfähigkeit der so kultivierten Zellen wurde untersucht, indem die Zellen auf Keramikträgern syngenen Ratten in den Bauchraum implantiert wurden. Dabei zeigten sich zu Knochen und Knorpel differenzierte Zellen. Somit behielten die Zellen auch hier ihr Differenzierungspotenzial zumindest teilweise bei.

Pochampally R. R. *et al.*, 2004, konnten sogar belegen, dass bei zeitweiser Selektion von MSC in serumfreiem Medium (α -MEM) eine Subpopulation überlebte, die nach dem erneuten Umsetzen in serumhaltiges Medium wieder proliferierte. Die entsprechenden Zellen zeigten im Vergleich zu kontinuierlich in serumhaltigem Medium kultivierten Kontrollen eine erhöhte Expression von Genen, die charakteristisch für embryonale Zellen sind (Oct-4, hTERT, ODC-Antizym).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnten MSC eine siebentägige Kultur in einem für HSC-Wachstum optimierten Medium ohne jegliche tierische Bestandteile überleben (s. 4.2.3). Für die Vermehrung der Zellen wurden jedoch keine Versuche mit serumfreiem Medium unternommen. Aufgrund der Literaturdaten scheint es möglich, MSC auch in Medium ohne tierische Bestandteile zu präparieren und kultivieren, sofern zuvor eine gründliche Optimierung durchgeführt wurde. Dadurch ließe sich die klinische Verwendbarkeit der Zellen, auch für den Einsatz in der Kokultur mit HSC, verbessern.

5.1.4 Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

Die Nabelschnur selbst ist eine weitere mögliche Quelle von zum Nabelschnurblut autologen Feederzellen für die Kokultur. Sie wird üblicherweise nach dem Abgang der Plazenta zusammen mit dieser verworfen. Es ist somit unproblematisch, mit Einwilligung der Eltern die Nabelschnur zu entnehmen und weiter zu verarbeiten. Ein Risiko für den Spender entsteht hierbei nicht. Auch der organisatorische Aufwand ist gering: Die abgeschnittene Nabelschnur kann in einem Gefäß mit sterilem PBS (+ Heparin) auf Raumtemperatur gelagert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nabelschnüre wurden bis zu 24 h nach der Geburt aufbewahrt, ohne dass bei den hier verwendeten Präparationsmethoden dadurch Probleme entstanden.

Im Gegensatz zur einfachen Entnahme und Aufbewahrung der Nabelschnüre ist die HUVEC-Präparation mit relativ hohem Aufwand verbunden. Für die Durchführung der in dieser Arbeit verwendeten Methode sind zwei Personen notwendig, da sonst verschiedene Schritte des Präparationsvorganges wie etwa das Einführen des Luer-Lock-Adapters in die Nabelschnurvene nicht möglich sind. In der Literatur werden für die HUVEC-Präparation üblicherweise keine Luer-Lock-Adapter, sondern Kanülen verwendet (Jaffe E. A. *et al.*, 1973). Diese erlauben zwar die Durchführung der Präparation durch eine einzelne Person,

jedoch hat es sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit als schwierig erwiesen, die Kanülen so zu fixieren, dass sich in der Vene genügend Druck aufbauen lässt. Außerdem können durch die Kanten der Kanülen, selbst wenn diese stumpfe Enden haben, die Gefäßwände verletzt werden und damit neue Rupturen in der Vene entstehen, die wiederum dazu führen, dass Teile der Nabelschnur nicht mehr zur HUVEC-Präparation verwendet werden können. Zusätzlich stellt diese Methode auch ein Verletzungsrisiko für die Personen dar, die die Präparation durchführen. Bei Verwendung von Luer-Lock-Adapter anstelle der Kanülen entstehen diese Probleme nicht. Die Dehnung der Vene, die notwendig ist, um den Adapter einzuführen, erfolgt nur auf einem kleinen Bereich, und die dafür aufgewendete Kraft ist gering. Auch sind die Kanten des Adapters glatt, so dass Verletzungen der Venenwände bei diesem Vorgang unwahrscheinlich sind.

Die Gesamtdauer der Präparation ist mit ca. 2 h relativ lang für den Einsatz in der klinischen Routine. Eventuell könnte die Präparationsdauer durch die Verwendung eines anderen Enzyms zur Gewinnung der HUVEC verkürzt werden. So gaben Marin V. *et al.*, 2001, für die Isolation von HUVEC mit Hilfe von Kollagenase (statt des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Trypsins) einen Zeitaufwand von 35 min an. Dabei wurden für die enzymatische Ablösung der HUVEC von den Venenwänden 7 min benötigt. Trypsin ist allerdings im Vergleich zu Kollagenase für den allgemeinen Gebrauch in der Zellkultur weiter verbreitet, so dass hier in Kliniklabors vorhandene Bestände verwendet werden können. Außerdem existieren diverse Typen von Kollagenase mit großen Chargenunterschieden, so dass hier möglicherweise erst aufwändige Screening-Prozeduren nötig wären, um den am besten geeigneten Typ und Hersteller festzustellen.

Trotz des insgesamt hohen personellen und experimentellen Aufwands könnte die Präparation z. B. von spezialisierten Firmen oder Blutbanken übernommen werden. Allerdings ist aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Proben und auftretender Schäden wie Thromben oder Rupturen eine Automatisierung der Präparation vermutlich

unmöglich. Die Präparation von HUVEC im geschlossenen System, wie es für die klinische Anwendung erwünscht ist, ist erst ab dem Zeitpunkt möglich, wenn die Adapter in der Vene fixiert sind. Ab diesem Vorgang können Gewinnung und Kultur der Zellen im geschlossenen System weitergeführt werden.

Ein weiteres Problem für den klinischen Einsatz von HUVEC, vor allem im autologen System (Feederzellen und HSC vom selben Spender), stellt das relativ hohe Risiko der Kontamination mit Bakterien/Pilzen sowie die Ausfallquote bei der Präparation dar. Diese könnten jedoch durch geeignete Maßnahmen verringert werden, so könnte etwa dem Transportpuffer ein Antibiotikum zugesetzt werden, um bakteriellen Kontaminationen vorzubeugen. Durch Optimierung der Gewebeentnahme und des Transports könnte auch die Beschädigung der Nabelschnüre durch Rupturen und Thrombenbildung verringert werden. Konnte die Präparation nach den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Protokollen durchgeführt werden, lag die in 4 Passagen der Zellen erzielte Gesamtzellzahl zwischen 5×10^7 und 1×10^8 Zellen. Diese Zellzahlen sind ausreichend für eine Kokultur mit HSC im klinischen Maßstab, wo etwa $2,8 \times 10^7$ Feederzellen benötigt würden (s. 2.8).

In den hier durchgeführten Experimenten wurden HUVEC ausschließlich in ECGM kultiviert, das FCS und andere tierische Produkte enthielt. Die Zellen wiesen in diesem Medium schnelles Wachstum und eine klar endotheliale Morphologie auf, ihre Markerexpression war typisch für endotheliale Zellen (s. 4.2.1). Vereinzelt wurden Versuche beschrieben, endotheliale Zellen serumfrei zu kultivieren. So kultivierten Gupta K. *et al.*, 1997, dermale mikrovaskuläre Endothelzellen in serumfreiem Medium und konnten zeigen, dass die Zellen beim Zusatz von VEGF gute Viabilität und eine endotheliale Morphologie hatten. Allerdings wurde dem Medium ein so genanntes endothelial cell growth supplement zugefügt, das nicht näher definiert wurde. Daher ist unklar, ob hier wirklich nur mit definierten Wachstumsfaktoren oder zwar serumfrei, aber nicht ohne tierische Produkte im Medium gearbeitet wurde. Zudem wurden mit Gelatine beschichtete Zellkulturgefäße verwendet, also

ein weiteres tierisches Produkt in die Kultur eingebracht. Battista P. J. und Soderland C., 1998, beschrieben dagegen eine Methode zur serumfreien Kultivierung von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen und -arterien in mit humanem Fibronektin beschichteten Zellkulturgefäßen. Dem Medium wurden lediglich bFGF und EGF sowie Antibiotika zugesetzt. Die so kultivierten Zellen zeigten endotheliale Morphologie und exprimierten den endothelialen Marker vWF. Somit ist vermutlich auch die serumfreie Kultur von HUVEC möglich, was von Vorteil für die klinische Anwendung ist. Allerdings müsste zuvor geklärt werden, ob die so kultivierten HUVEC in ihren Eigenschaften bezüglich der Unterstützung von HSC mit den in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen übereinstimmen.

5.1.5 Zellen aus dem Bindegewebe der Nabelschnur (WJC)

Für die Gewebeentnahme zur Präparation gelten bei WJC die selben Maßstäbe wie bereits für HUVEC beschrieben. Auch hier besteht für den Spender kein Risiko, und organisatorische Parameter wie Aufbewahrung etc. sind unkompliziert. Die Präparationsmethode für die Gewinnung von WJC wurde von Mitchell K. E. *et al.*, 2003, beschrieben. Für die vorliegende Arbeit wurde die Methode vereinfacht, indem die Blutgefäße vor dem Zerschneiden der Nabelschnur nicht aus dieser entfernt wurden. Stattdessen wurde lediglich am Ende der Nabelschnur etwas Gewebe entfernt, um Kontaminationen zu verhindern, und anschließend das komplette Nabelschnurgewebe in kleine Fragmente geschnitten. Diese Methodik eröffnet die Möglichkeit, den Präparationsprozess zu automatisieren. Nach dem Kürzen der Nabelschnurenden könnte die Nabelschnur maschinell in kleine Stücke geschnitten werden, deren Aussaat und weitere Versorgung im geschlossenen System durch einen Roboter erfolgen könnten. Für den klinischen Einsatz wäre diese Vorgehensweise günstig, da sie reproduzierbar und mit wenig Personal- und Zeitaufwand durchzuführen ist.

Allerdings ist mit dieser Präparationsmethode keine eindeutige Aussage möglich, welchem Gewebe der Nabelschnur die so gewonnenen Zellen zuzuordnen sind. Das Wharton's jelly enthält Myofibroblasten verschiedener Differenzierungsstufen vom unreifen Fibroblasten bis zur glatten Muskelzelle (Nanaev A. K. *et al.*, 1997). In dieses Matrixgewebe eingebettet sind zwei Arterien und eine Vene, deren Wände glatte Muskelzellen enthalten und die mit Endothelzellen ausgekleidet sind (Betz E. *et al.*, 1997). Setzt man die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Präparationsmethode ein, könnten die so gewonnenen Zellen theoretisch aus jedem dieser Gewebe stammen. Tatsächlich wurden bei den kultivierten Zellen zwei Morphologien beobachtet: "fibroblastähnliche" und "endothelähnliche" Zellen (s. 4.2.1). Auf letztere soll erst später genauer eingegangen werden, da für weiterführende Experimente grundsätzlich nur die "fibroblastähnlichen" Zellen eingesetzt wurden.

Die Gewinnung von Zellen mit fibroblastähnlicher Morphologie wurde nicht nur für Wharton's jelly beschrieben (Mitchell K. E. *et al.*, 2003), sondern auch für die subendotheliale Schicht der Nabelschnurvene, präpariert durch einen vom Lumen der Vene ausgehenden enzymatischen Verdau (Romanov Y. A. *et al.*, 2003, Covas D. T. *et al.*, 2003). Auch durch einen enzymatischen Verdau der Außenseite aller Nabelschnurgefäße wurden ähnliche Zellen präpariert (Sarugaser R. *et al.*, 2005). Aus der Plazenta konnten ebenfalls Zellen dieses Phänotyps präpariert werden (Miyamoto K. *et al.*, 2004, Zhang Y. *et al.*, 2004). Alle diese Zellen hatten Eigenschaften ähnlich denen mesenchymaler Stamm- oder Vorläuferzellen. Ihre Morphologie ist ähnlich wie bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten WJC. Es kann weder ausgeschlossen noch belegt werden, dass auch diese Autoren WJC verwendeten, die aus dem selben Gewebe stammten wie die in der vorliegenden Arbeit präparierten. Aufgrund der Beschaffenheit der Nabelschnur- und Plazentagewebe, die insgesamt sehr weich und elastisch sind, ist es allerdings ohnehin schwierig, diese Gewebe so sauber zu trennen, dass keine Verunreinigungen mit anderen Geweben auftreten. Am interessantesten sind in dieser Hinsicht die Veröffentlichungen von Romanov Y. A. *et al.*, 2003 und Covas D. T. *et al.*, 2003, da diese Autoren die Zellen durch

enzymatischen Verdau der Nabelschnurvene von deren Lumen ausgehend gewonnen. Dabei sollten keine Kontaminationen mit anderen Geweben auftreten. Dies kann ein Hinweis auf die Herkunft der in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen sein, die sich in den Wänden der Nabelschnurgefäße befinden könnten. Allerdings müssten dann in allen zur Kultivierung eingesetzten Gewebefragmenten auch Stücke der Blutgefäßwände enthalten sein, um die hohe Frequenz des Auftretens von WJC zu erklären (s. 4.2.1). Da die Blutgefäße aber einen relativ geringen Anteil am Gesamtvolumen der Nabelschnur ausmachen, ist dies unwahrscheinlich. Eine Identifizierung des Herkunftsgewebes der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten WJC ist somit nicht möglich, sie könnten vergleichbar mit allen in der Literatur beschriebenen Zellen sein. Für die klinische Anwendung der Zellen ist es jedoch unerheblich, aus welchem Gewebe der Nabelschnur sie stammen, hier ist vielmehr ihre Funktionalität für den gewünschten Einsatz entscheidend, die in späteren Experimenten untersucht wurde (s. 4.3.2).

Das Risiko für Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen ist bei WJC relativ gering. Durch die Verwendung von Zellkulturplatten mit voneinander getrennten Vertiefungen konnten einzelne kontaminierte Proben von der Weiterverarbeitung ausgeschlossen werden. Kontaminationen waren insgesamt jedoch sehr selten. Daher und weil Zellwachstum der gewünschten "fibroblastähnlichen" Zellen aus jeder der präparierten Nabelschnüre erreicht werden konnte (s. 4.2.1), ist die Effektivität dieser Methode als sehr hoch zu bewerten. Dies ist ein großer Vorteil für den Einsatz in der Klinik, da mit hoher Sicherheit von jedem Spender auch die gewünschten Zellen gewonnen werden können. So könnten zu jeder Nabelschnurblutprobe die passenden Feederzellen vom selben Spender präpariert werden. Die erzielten Zellzahlen werden unter 5.2.1 diskutiert.

Statt des von Mitchell K. E. *et al.*, 2003, verwendeten Mediums (DMEM + 20 % FCS) wurde in dieser Arbeit für die Kultur von WJC ECGM eingesetzt. Dieses Medium enthält neben FCS noch weitere tierische Komponenten, was ungünstig für den klinischen Einsatz ist, ihn jedoch

nicht ausschließt. Bis jetzt wurden noch keine Versuche unternommen, die Kultur von WJC komplett auf serumfreies Medium umzustellen. Da die Zellen jedoch eine Kurzzeitkultur in HSC-Medium überleben (s. 4.2.3), ist es durchaus denkbar, dass mittels eines gezielten Optimierungsprozesses Möglichkeiten zum serumfreien Arbeiten mit WJC gefunden werden könnten. Zumindest könnten evtl. die tierischen Komponenten des Mediums durch humane Produkte (z.B. Humanserum) und/oder rekombinante Proteine ersetzt werden.

5.2 Charakterisierung der potenziellen Feederzellen

5.2.1 Charakterisierung spezifischer Eigenschaften der Feederzellen

Untersuchungen zur Charakterisierung des Wachstums und Phänotyps von WJC

Isolation von WJC

Für die klinische Anwendung ist es generell entscheidend, in möglichst kurzer Zeit möglichst große Zellzahlen der benötigten Zellen zu generieren. Dadurch wird nicht nur das Risiko gering gehalten, dass bei den Zellteilungen während der Kultur Mutationen entstehen, die dazu führen könnten, dass die Zellen entarten, sondern auch der Aufwand bei der Gewinnung der Zellen. Der Zeitbedarf und der methodische Aufwand zur Präparation von WJC sind bereits unter 5.1.5 diskutiert worden. In diesem Teil der Arbeit wurden die Bedingungen für die Gewinnung von WJC optimiert und die auftretenden Phänotypen bezüglich ihrer Frequenz und Wachstumsgeschwindigkeit untersucht.

Für die Kultivierung von WJC aus Nabelschnurmatrixfragmenten wurden zwei verschiedene Medien getestet. Das erste untersuchte Medium war DMEM mit FCS, das häufig für die Kultur von MSC eingesetzt wird und auch von den Autoren, die WJC zuerst beschrieben, verwendet wurde (Mitchell K. E. *et al.*, 2003). Allerdings konnte bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen mit diesem Medium nur aus einem geringen Anteil der präparierten Gewebestücke überhaupt Zellwachstum erzielt werden. Das Wachstum der

Zellen war sehr langsam, so dass nur aus 4 % der Gewebestücke ausreichend Zellen gewonnen wurden, um diese nach vierwöchiger Kultur in 48-Well-Zellkulturplatten zu passagieren. Auch danach blieb das Wachstum sehr langsam (Daten nicht gezeigt), weitere Passagen waren nur sehr selten möglich. Mitchell K. E. *et al.*, 2003, gaben keine Kulturdauer an, die bis zur Konfluenz der Zellen nötig war, daher ist ein Vergleich nicht möglich. Allerdings enthält das in der genannten Veröffentlichung verwendete DMEM 20 % FCS, in der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur 10 % FCS eingesetzt, um gleiche Bedingungen zu schaffen wie für die ebenfalls untersuchten MSC aus Knochenmark. Auch das verwendete Antibiotikum – Gentamicin – war ein anderes als in der Literatur angegeben (Penicillin, Streptomycin und Amphotericin). Der Grund für das langsame Wachstum ist jedoch eher in der niedrigeren FCS-Konzentration und damit der schlechteren Versorgung mit Wachstumsfaktoren zu suchen. Außerdem könnte auch die verwendete Charge FCS Eigenschaften haben, die nicht mit der von Mitchell K. E. *et al.*, 2003, eingesetzten Charge übereinstimmen. Aufgrund des schlechten Wachstums der Zellen in DMEM wurde dieses für die weiteren Versuche nicht mehr verwendet.

Stattdessen wurde das ebenfalls in den Wachstumsversuchen getestete ECGM eingesetzt. In diesem Medium war bereits nach einer Woche Inkubation bei 60 – 80 % der Gewebestücke Zellwachstum sichtbar. Die Zellen zeigten auch weiterhin schnelles Wachstum, wobei sichtbar wurde, dass sie zwei unterschiedlichen Morphologien zuzuordnen waren: während ein Teil der Zellen "fibroblastähnlich", also spindelförmig, war, ähnelte der andere Teil eher endothelialen Zellen. Da die hier entwickelte Präparationsmethode die komplette Nabelschnur als Gewebequelle verwendet, ist es durchaus möglich, dass diese Zellen unterschiedlichen Quellen haben: Die "fibroblastähnlichen" Zellen könnten z.B. dem Bindegewebe, die "endothelähnlichen" Zellen dagegen den Blutgefäßen der Nabelschnur entstammen. Mitchell K. E. *et al.*, 2003, entfernten sämtliche Blutgefäße vor dem Fragmentieren der Nabelschnurmatrix aus dieser, und konnten aus dem Gewebe spindelförmige Zellen kultivieren. Das spricht für das Bindegewebe als Quelle der in der

vorliegenden Arbeit verwendeten "fibroblastähnlichen" Zellen. "Endothelähnliche" Zellen dagegen wurden bei Mitchell K. E. *et al.*, 2003, nicht gefunden. Da das in der hier vorliegenden Arbeit für die Präparation verwendete ECGM ursprünglich für Endothelzellen entwickelt wurde, bietet es anscheinend den vermutlich relativ wenigen endothelialen Zellen, die in den Gewebefragmenten enthalten sind, optimale Bedingungen für ihr Wachstum, was für DMEM/FCS (wie bei Mitchell K. E. *et al.*, 2003) nicht der Fall ist. "Endothelähnliche" Zellen kamen jedoch in geringeren Frequenzen vor als "fibroblastähnliche" Zellen, bei einem der drei untersuchten Spender konnten sie sogar überhaupt nicht gefunden werden. Nimmt man an, dass die "endothelähnlichen" Zellen aus den Blutgefäßen stammen, ist ihr selteneres Auftreten damit zu erklären: Blutgefäße machen den geringeren Teil des Nabelschnurgewebes aus und dürften daher wahrscheinlich in einer geringeren Anzahl der Gewebefragmente vertreten gewesen sein. Bindegewebe dagegen war in allen ausgesäten Gewebsstücken vorhanden. Zusätzlich könnten die "endothelähnlichen" Zellen stärker differenziert sein als die "fibroblastähnlichen" Zellen und daher ein geringeres Teilungspotenzial besitzen, so dass sie seltener in den Kulturen erscheinen.

Die "fibroblastähnlichen" Zellen dagegen ähneln nicht nur den von Mitchell K. E. *et al.*, 2003, beschriebenen Zellen, wie bereits diskutiert wurde (s. 5.1.5). Mit ECGM konnte ein geeignetes Medium für ihre Gewinnung und optimale Expansion festgelegt werden. Da "fibroblastähnliche" Zellen das schnellere Wachstum zeigten, sich früher passagieren ließen und über längere Zeit und viele Passagen in Kultur zu halten waren wurde entschieden, diese Zellen für die weiteren Versuche zu verwenden. Somit wurde, wie bereits unter 4.2.1 erwähnt, definiert:

Definition:

Für die folgenden Versuche wurden aus dem Wharton's jelly der Nabelschnur nur "fibroblastähnliche" Zellen verwendet, die in ECGM kultiviert worden waren. Der Begriff "WJC" bezeichnet ausschließlich so präparierte und diese Morphologie aufweisende Zellen.

Die frühestmögliche Passage von WJC aus den Zellkulturplatten konnte nach dreiwöchiger Inkubation durchgeführt werden. Zu diesem Zeitpunkt konnte bereits deutlich zwischen "fibroblastähnlichen" und "endothelähnlichen" Zellen unterschieden werden und damit die gewünschten WJC ausgewählt werden. 10 – 40 % der ausgesäten Gewebefragmente wiesen dabei die erwünschte Morphologie und Wachstumsgeschwindigkeit auf. Hochrechnungen der Zellzahlen über einen Kulturzeitraum von insgesamt 7 Wochen ergaben, dass in dieser Zeit bei Aussaat einer 48-Well-Zellkulturplatte minimal $2,3 \times 10^6$ und maximal $9,7 \times 10^7$ Zellen gewonnen werden können. Die große Differenz zwischen diesen Zahlen beruht dabei sowohl auf der Spendervariabilität als auch auf dem für die einzelnen Gewebestücke sehr unterschiedlichen Wachstum. Bei ausreichend hoher Anzahl der ausgesäten Gewebestücke könnten diese Effekte jedoch kompensiert werden. Für eine Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen genügt ca. 1 cm Nabelschnur, eventuell weniger. Die Nabelschnur erreicht jedoch eine Länge von 50 – 60 cm (Sadler T. W., 1998), weswegen es unproblematisch wäre, eine deutlich höhere Anzahl Gewebefragmente auf Zellkulturplatten auszusäen. Dadurch könnte problemlos die für die Kokultur mit HSC im klinischen Maßstab benötigte Feederzellzahl von $2,8 \times 10^7$ aus jeder Nabelschnur erreicht werden.

Außerdem ist es möglich, die Präparationsprozedur so zu modifizieren, dass sich die Inkubationsdauer verringert. Eine optische Kontrolle nach der initialen dreiwöchigen Inkubation der Gewebestücke könnte zeigen, welche Proben die gewünschte Morphologie und Zelldichte aufweisen. "Endothelähnliche" Zellen und auch die selten vorkommenden Kontaminationen lassen sich dabei sehr einfach aussortieren. Die ausgewählten Zellen könnten dann von den Zellkulturplatten abgelöst und vereinigt werden. Bei einer ausreichenden Anzahl ausgesäter Gewebefragmente sollte die erreichte Gesamtzellzahl dann bereits genügen, um die Zellen zu kryokonservieren. Der Zeitraum von der Präparation bis zur Kryokonservierung der Zellen für die spätere therapeutische Anwendung ließe sich damit auf 3 Wochen verkürzen, der Arbeitsaufwand für weitere Passagen entfiel. Eine weiterführende Kultur der Zellen über 1 – 2 Passagen (Zeitraum: 1 – 4 Wochen) wäre jedoch

auch denkbar, um noch höhere Zellzahlen zu erzielen. Der Aufwand dafür wäre relativ gering, da nicht mehr separat mit einzelnen Vertiefungen auf Zellkulturplatten gearbeitet werden müsste. Stattdessen könnten die gesamten vereinigten Zellen in großen Zellkulturgefäßen, etwa Wannenstapeln, weiter kultiviert werden. Eventuell könnte auch ein Reaktorsystem verwendet werden, um so die Wachstumsbedingungen besser kontrollieren und optimieren zu können.

Ein weiterer Vorteil dieser Präparationsmethode ist ihre Automatisierbarkeit. Das Fragmentieren der Nabelschnur sollte sich problemlos maschinell im geschlossenen System durchführen lassen, da keine Sortierung des Gewebes notwendig ist (Matrixgewebe / Blutgefäße). Die Aussaat der Gewebestücke, deren weitere Versorgung auf Zellkulturplatten und auch das enzymatische Ablösen von den Platten könnte von einem Roboter übernommen werden. Damit ließen sich auch die für die Kultivierung der Zellen nötigen Vorgänge an klinische Vorgaben anpassen und der Arbeitsaufwand minimieren. Lediglich für die optische Auswahl der Proben, die weiterverwendet werden sollen, wäre ein gewisser Zeitaufwand erforderlich.

Fibroblasten-Kolonien bildende Zellen (colony-forming units – fibroblast = CFU-F)

Der so genannte CFU-F-Assay wurde für Knochenmark entwickelt und gibt Informationen über das Vorkommen fibroblastförmiger adhärenter Zellen im Ausgangsmaterial (Castro-Malaspina H. *et al.*, 1980). Koloniebildende Zellen wurden von diesen Autoren sowohl in unsepariertem Knochenmark als auch in der Fraktion der Zellen mit niedriger Dichte ($1,070 \text{ g/cm}^3$, die Fraktion der mononukleären Zellen) gefunden.

Das Prinzip des Tests beruht auf dem hohen Proliferationspotenzial undifferenzierter MSC: Bei der Aussaat mit sehr geringer Zelldichte bilden sich von einzelnen Zellen abgeleitete Klone, die innerhalb einer Inkubationszeit von 14 Tagen so stark proliferieren, dass die

entstehenden Kolonien eine mit bloßem Auge sichtbare Größe erreichen. Die einzelnen Zellen in diesen Kolonien besitzen eine fibroblastförmige Morphologie. Um die Anzahl der Klone, also der CFU-F, zu bestimmen, werden die Zellen fixiert und mit Giemsa-Lösung, einem DNA-Farbstoff, angefärbt.

Heute wird der CFU-F-Assay häufig dafür verwendet, die Frequenz von MSC in Knochenmark und kultivierten Zellen zu untersuchen. Auch wenn nicht alle koloniebildenden Zellen tatsächlich dazu fähig sind, in die für MSC typischen Richtungen zu differenzieren (Pittenger M. F. und Marshak D. R., 2001), erzielt man mit dieser Methode doch eine gute Schätzung des MSC-Gehaltes von Gewebematerial. Während MSC aus Knochenmark noch CFU-F bilden, solange sie erst wenige Male passagiert worden sind, verlieren sie diese Fähigkeit mit der Zeit (Digirolamo C. M. *et al.*, 1999).

Für die in dieser Arbeit verwendeten WJC konnte keine CFU-F-Bildung gezeigt werden. Die Zellen hatten zwar auch bei sehr niedrigen Aussaatdichten ihre normale fibroblastähnliche Morphologie, jedoch waren die typischen fibroblastförmigen Kolonien nicht zu detektieren. Nur sehr selten traten Strukturen auf, die CFU-F ähnelten. Aus diesen Daten ergibt sich, dass WJC, die unter den hier verwendeten Präparations- und Kulturbedingungen gewonnen werden, vermutlich keine Fähigkeit zum klonogenen Wachstum besitzen oder zumindest sehr heterogen im Bezug auf diese Eigenschaft sind. Allerdings waren die für diesen Versuch verwendeten Zellen bereits zum 3. Mal passagiert worden. Eventuell könnten sie daher über den Kulturzeitraum die Fähigkeit zur Koloniebildung verloren haben.

Differenzierungsfähigkeit von MSC

Es gilt als typisch für MSC, dass diese Zellen in drei Hauptrichtungen differenzieren können: osteogen, adipogen und chondrogen (Pittenger M. F. *et al.*, 1999). Diese Differenzierungsfähigkeit gilt auch als Beweis, dass es sich bei den Zellen tatsächlich um

MSC handelt und nicht nur Morphologie und Oberflächenmarker mit der üblichen Definition übereinstimmen. Über längere Kulturdauer verlieren MSC jedoch ihr Differenzierungspotenzial (Phinney D. G., 2002). Daher kann die Überprüfung der Differenzierungsfähigkeit von MSC als Qualitätskriterium für die Zellen dienen: Zeigen sie noch das Potenzial, in alle 3 Richtungen zu differenzieren, hat sich ihre Qualität unter den gewählten Kulturbedingungen nicht verschlechtert. Indirekt wird damit auch die Qualität der Kulturbedingungen überwacht.

In dieser Arbeit wurden MSC eines Spenders auf ihre Differenzierungsfähigkeit zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur untersucht. Dafür wurden Zellen verschiedener Passagen (3, 5 und 7) eingesetzt, um zu testen, ob sich ihr Differenzierungspotenzial geändert hatte. Dies war nicht der Fall, MSC aller untersuchten Chargen differenzierten sowohl in osteogene als auch adipogene und chondrogene Richtung. Daher ist davon auszugehen, dass die für MSC gewählten Kulturbedingungen die Zellen in ihren Eigenschaften ausreichend unterstützen. Für Zellen anderer Spender wurde vereinfachend lediglich die osteogene und adipogene Differenzierung untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Differenzierungsfähigkeit der MSC unter den hier eingesetzten Kulturbedingungen erhalten blieb. Die Identität der verwendeten Zellen als MSC ist damit gesichert, gleiches gilt für die Qualität der Kulturbedingungen.

Oberflächenmarker-Profil der potenziellen Feederzellen

Sowohl anhand der Morphologie als auch des Oberflächenmarker-Profiles ist es meist möglich, Zellen einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen, vor allem, wenn diese beiden Kriterien kombiniert werden. Außerdem gibt die Expression bestimmter Oberflächenmarker, wie etwa Zytokinrezeptoren, Hinweise darauf, wie die Zellen auf bestimmte Stimuli reagieren könnten – wenn auch alleine anhand der Expression dieser Moleküle keine funktionelle Aussage möglich ist. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde eine ausführliche Untersuchung

der Oberflächenmarker auf allen potenziellen Feederzellen durchgeführt. Diese Experimente sollten zunächst die Frage beantworten, ob nach der Kokultur zwischen Feederzellen und den von HSC abgeleiteten, eventuell gereiften, hämatopoetischen Zellen unterschieden werden kann. Könnten die Feederzellen von den HSC-abgeleiteten Zellen anhand bestimmter Oberflächenmarker abgetrennt werden, böte dies einen Vorteil für die klinische Anwendung: Es ließe sich dann vermeiden, die Feederzellen zusammen mit den Stammzellen zu transplantieren. Ein weiterer Grund für die Untersuchung der Oberflächenmarkerprofile der potenziellen Feederzellen war die Identifizierung von WJC. Diese Zellen können anhand ihres Phänotyps nicht eindeutig einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden. Daher sollte ihr Oberflächenmarkerprofil mit dem von MSC verglichen werden, um Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen beiden Zelltypen zu untersuchen. Als weitere Referenz in dieser Hinsicht wurden glatte Muskelzellen aus der Koronararterie herangezogen, da sich in der Nabelschnurmatrix Myofibroblasten verschiedener Differenzierungsstadien bis hin zur reifen glatten Muskelzelle befinden (Nanaev A. K. *et al.*, 1997). Zusätzlich sind in den Gefäßwänden von Arterien und Venen glatte Muskelzellen vorhanden (Betz E. *et al.*, 1997), so dass sich WJC eventuell auch von Zellen aus den Gefäßwänden der Nabelschnurgefäße herleiten könnten.

Die Oberflächenmarker, deren Expression auf den potenziellen Feederzellen untersucht wurde, wurden in vier Gruppen eingeteilt. Zunächst wurden Moleküle untersucht, die auf *Zellen des blutbildenden Systems* vorhanden sind (CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16, CD38, CD41a, CD45, CD69 und CD80), um festzustellen, ob anhand dieser Marker eine Sortierung der Zellen möglich ist. Auch die Expression des *MHC-I- und MHC-II-Komplexes* auf den potenziellen Feederzellen wurde untersucht. Um die Feederzellen zu identifizieren, wurde getestet, ob die Zellen spezifische Oberflächenmarker von *Fibroblasten, Endothelzellen und/oder verschiedener Stammzellen* exprimierten (CD31, CD34, CD54, CD90, CD105, CD106, CD144, CD166). Zuletzt wurde die Expression einer Auswahl von *Rezeptormolekülen* (CD71, CD95, CD114, CD117, CD123, CD184) auf den potenziellen

Feederzellen evaluiert, u.a. um Hinweise etwa auf ihre Reaktion auf die in HSC-Medium enthaltenen Zytokine und andere funktionelle Aspekte der Zellen zu erhalten.

Im Folgenden werden die einzelnen Gruppen der untersuchten Oberflächenmarker und die entsprechenden Daten getrennt voneinander diskutiert, bevor ein umfassendes Fazit hinsichtlich der Relevanz der Ergebnisse für die klinische Anwendung gezogen wird. Eine vollständige Liste der untersuchten Oberflächenmarker, deren Alternativnamen und hauptsächlich zellulärer Expression findet sich im Anhang.

Oberflächenmarker von Zellen des blutbildenden Systems

Keiner der untersuchten Oberflächenmarker von Zellen des blutbildenden Systems (s.o.) konnte auf den potenziellen Feederzellen nachgewiesen werden. Besonders wichtig ist im klinischen Zusammenhang die Abwesenheit von CD45, da dieses Molekül von fast allen Zellen des blutbildenden Systems exprimiert wird und daher gut zur Trennung der HSC und aus diesen entstandenen reiferen Blutzellen von den Feederzellen verwendet werden könnte.

Für MSC ist die Abwesenheit von Blutzellmarkern vielfach beschrieben worden. MSC, die "klassisch" aus Knochenmark gewonnen wurden, zeigten keine Expression von CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD45 und CD80 (Deans R. J. und Moseley A. B., 2000, Devine S. M., 2002). Auf herkömmliche Weise aus Knochenmark gewonnene stromale Zellen dagegen exprimierten sowohl CD14 als auch CD45, was vermutlich auf Kontaminationen mit hämatopoetischen Zellen zurückzuführen war (Majumdar M. K. *et al.*, 1998). Auf aus verschiedenen Mausstämmen gewonnenen MSC war, vergleichbar mit humanen MSC, keine Expression von CD11b und CD45 nachzuweisen (Peister A. *et al.*, 2004). In einem Vergleich zeigten sowohl aus aspiriertem Knochenmark als auch per Kollagenaseverdau aus Bälkchenknochen präparierte MSC ein ähnliches Expressionsmuster (Sakaguchi Y. *et al.*,

2004): MSC aus beiden Quellen waren CD45-negativ. Die Abwesenheit von CD45 im Besonderen und anderen Blutzellmarkern im Allgemeinen wurde auch für MSC aus Fettgewebe (Zuk P. A. *et al.*, 2002, De Ugarte D. A. *et al.*, 2003), embryonalem/fetalem Blut und Nabelschnurblut (Campagnoli C. *et al.*, 2001, Goodwin H. S. *et al.*, 2001) sowie der Nabelschnurvene (Covas D. T. *et al.*, 2003) beschrieben.

Das Oberflächenmarkerprofil von HUVEC, das in der Literatur beschrieben ist, zeigt ebenfalls die Abwesenheit von Markermolekülen für Blutzellen. So demonstrierten Schwachula A. *et al.*, 1994, dass HUVEC unter anderem die Oberflächenmarker CD11b, CD14, CD16, CD38, CD41a, CD45 und CD69 nicht exprimierten. In einer anderen Studie wurde ebenfalls das Fehlen von CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14 und CD69 (Vermot-Desroches C. *et al.*, 1995) auf HUVEC festgestellt. Allerdings exprimierten hier z. T. erhebliche Subpopulationen von HUVEC CD16 bzw. CD45. Diese Antigene konnten dagegen, in Übereinstimmung mit Schwachula A. *et al.*, 1994, auf den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten HUVEC nicht nachgewiesen werden. Auch endotheliale Vorläuferzellen, die aus adultem sowie Nabelschnurblut isoliert wurden, wiesen keine Expression von CD14 und CD45 auf (Ingram D. A. *et al.*, 2004).

Für WJC liegen zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Literaturdaten über die Expression hämatopoetischer Oberflächenmarker vor. Aufgrund der Zusammensetzung der Nabelschnur aus Myofibroblasten (Nanaev A. K. *et al.*, 1997) kann hier eine Veröffentlichung zu Hautfibroblasten (Schwachula A. *et al.*, 1994) als Referenz dienen, um zumindest einen Teilvergleich zu erhalten. Ähnlich wie auf HUVEC wurden in dieser Studie auch auf Fibroblasten die Oberflächenmarker CD11b, CD14, CD16, CD38, CD41a, CD45 und CD69 nicht gefunden (Schwachula A. *et al.*, 1994). Auch andere, als MSC charakterisierte Zellen aus der subendothelialen Schicht der Nabelschnurvene (Covas D. T. *et al.*, 2003, Romanov Y. A. *et al.*, 2003), exprimierten CD14 und CD45 nicht. In dem Vergleich mit SMC, der in der vorliegenden Arbeit gezogen wurde, war das Profil beider Zelltypen bezüglich der

Oberflächenmarker für hämatopoetische Zellen gleich: Beide exprimierten keines der untersuchten Markermoleküle.

Somit befinden sich die Daten für alle potenziellen Feederzellen in breiter Übereinstimmung mit der Literatur für die untersuchten und ähnliche Zelltypen, da keine Expression von Blutzellmarkern gefunden werden konnte. Dies wurde nicht nur anhand der häufig in der Literatur verwendeten Markermoleküle wie CD14 und CD45 gezeigt, sondern für ein breiteres Spektrum von Oberflächenmarkern von Zellen des hämatopoetischen Systems.

MHC-I und MHC-II

Die beiden MHC-Komplex-Typen MHC-I und MHC-II sind wichtig für die Abwehr von Krankheitserregern und Fremdorganismen, wie z.B. auch körperfremden Zellen. Der MHC-I-Komplex präsentiert im Zuge der Fremderkennung Peptide von Pathogenen, wie etwa Viren, die dann von CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen erkannt werden können (Janeway C. A. *et al.*, 2001). Der MHC-II-Komplex dagegen ist dafür zuständig, über CD4-positive T-Zellen andere Immunzellen zu aktivieren. Dementsprechend ist auch die Expression der beiden MHC-Komplexe auf den Zellen des Körpers unterschiedlich. Während MHC-I auf nahezu allen Körperzellen exprimiert wird (mit Ausnahme von Erythrozyten), findet man MHC-II lediglich auf B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen. Für die α -Kette des MHC-I kodieren die Gene HLA-A, HLA-B und HLA-C. Die α - und β -Ketten des MHC-II werden kodiert von HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ. In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein der von HLA-A,B,C sowie von HLA-DR kodierten Proteine auf der Oberfläche der potenziellen Feederzellen untersucht. Vereinfachend wird im Folgenden HLA-A,B,C als "MHC-I" und HLA-DR als "MHC-II" bezeichnet.

Auf allen getesteten potenziellen Feederzellen wie auch auf SMC wurde die Expression von MHC-I nachgewiesen. Da es sich bei allen diesen Zellen um normale somatische

Körperzellen handelt, entspricht dies der Erwartung. MHC-II konnte dagegen auf keinem der untersuchten Zelltypen detektiert werden.

Auch in der Literatur wurden ähnliche Expressionsmuster für MHC-I und –II auf den entsprechenden Zelltypen gefunden. So exprimieren aus Knochenmark gewonnene MSC MHC-I, nicht aber MHC-II (Majumdar M. K. *et al.*, 2003). Ähnliche Befunde traten auch sowohl bei undifferenzierten als auch zu Osteozyten und Chondrozyten differenzierten MSC auf (Le Blanc K. *et al.*, 2003-1), während die Differenzierung zu Adipozyten zu einer verringerten Expression von MHC-I führte. Stimulation der MSC mit IFN- γ rief aber auch Expression von MHC-II hervor. Wurden MSC dagegen in niedrigen Zelldichten und serumarmem Medium kultiviert, konnte sowohl für MHC-II als auch für MHC-I keine Expression nachgewiesen werden (Reyes M. *et al.*, 2001). Wenn jedoch Zelldichte oder Serumkonzentration erhöht wurden, trat wiederum Expression von MHC-I auf. Auch auf MSC aus anderen Quellen wie Fettgewebe (Gimble J. und Guilak F., 2003) oder der Nabelschnurvene (Covas D. T. *et al.*, 2003) war MHC-I nachweisbar, MHC-II dagegen nicht.

Sowohl auf HUVEC als auch auf Fibroblasten aus der Haut trat ebenfalls keine Expression von HLA-DR auf (Schwachula A. *et al.*, 1994). Das Fehlen der Expression von MHC-II auf HUVEC sowie die Expression von MHC-I auf diesen Zellen ist auch durch andere Quellen belegt (Vermot-Desroches C. *et al.*, 1995, Mutin M. *et al.*, 1997, Lidington E. A. *et al.*, 1999). Durch Stimulation mit IFN- γ kann jedoch die Expression von MHC-II auf HUVEC induziert werden (Marelli-Berg F. M. *et al.*, 1996). Da die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten HUVEC unstimuliert waren, entspricht ihr Expressionsprofil bezüglich MHC-I und –II genau den Literaturdaten. Dem in der Literatur für Fibroblasten, aber auch MSC beschriebenen Muster (MHC-I-positiv, MHC-II-negativ) entsprechen auch die hier untersuchten WJC. Für diese Zellen liegen in der Literatur bislang noch keine Daten bezüglich MHC-Expression vor. Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren jedoch das für somatische Zellen erwartete Profil, das im Gegensatz etwa zu den WJC nahe benachbarten

Trophoblastzellen steht (Weetman A. P., 1999). Diese exprimieren weder MHC-I noch MHC-II. Stattdessen findet man aber in Zytotrophoblastzellen Expression von HLA-G, einem nichtklassischen MHC-Gen, das vermutlich bei der Herunterregulation der NK-Zell-Aktivität beteiligt ist.

Oberflächenmarker von Fibroblasten, Endothelzellen und Stammzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Expression verschiedener, in der Literatur als spezifisch für Fibroblasten, Endothel- und / oder Stammzellen geltender Oberflächenmarker auf allen potenziellen Feederzellen untersucht. Diese Moleküle und ihre Expression werden im Folgenden einzeln besprochen, da sie anders als die zuvor diskutierten Marker als spezifisch für einen oder mehrere der potenziellen Feederzelltypen gelten.

CD31 ist ein häufig für endotheliale Zellen verwendeter Marker. Funktionell ist er in die endothelialen Zell-Zell-Verbindungen integriert, wo er die homophile Adhäsion fördert (Dejana E., 2004). In Gewebeschnitten konnte CD31-Expression in allen Blutgefäßen nachgewiesen werden, zudem auch auf kultivierten HUVEC (Müller A. M. *et al.*, 2002). Die hohe Expression von CD31 auf HUVEC ist in der Literatur mehrfach belegt (Lidington E. A. *et al.*, 1999, Mutin M. *et al.*, 1997). Auf mesenchymalen Progenitorzellen (Reyes M. *et al.*, 2001) und MSC (Deans R. J. und Moseley A. B., 2000, Peister A. *et al.*, 2004) konnte CD31 dagegen nicht detektiert werden, auch wenn einzelne Quellen von variabler CD31-Expression auf MSC sprechen (Devine S. M., 2002). Hautfibroblasten exprimieren im Gegensatz zu HUVEC kein CD31 (Schwachula A. *et al.*, 1994). In der vorliegenden Arbeit konnte CD31 ebenfalls lediglich auf HUVEC detektiert werden, alle anderen getesteten Zelltypen zeigten keine Expression dieses Markers. Auf diese Weise ist demnach eine Unterscheidung zwischen HUVEC und den übrigen potenziellen Feederzelltypen möglich.

CD34 wird sehr oft als Marker für HSC verwendet. Auch die in dieser Arbeit für die Kokulturrexperimente eingesetzten HSC waren anhand ihrer CD34-Expression isoliert worden. Im Gegensatz zu HSC sind mesenchymale Progenitoren und MSC CD34-negativ (Reyes M. *et al.*, 2001, Devine S. M., 2002), auch wenn in früheren Arbeiten die als Indiz für MSC geltenden CFU-F hauptsächlich in der CD34-positiven Fraktion von Knochenmark gefunden worden waren (Simmons P. J. und Torok-Storb B., 1991). Endotheliale Zellen exprimieren zum Teil CD34, so wurde in Gewebeschnitten die stärkste Expression dieses Markers in Kapillarblutgefäßen, schwächere Expression auch in Venen gefunden (Müller A. M. *et al.*, 2002). In der selben Studie wurde gezeigt, dass HUVEC zu ca. 20 % CD34-positiv sind. Eine schwache Expression von CD34 wurde mehrfach auf ruhenden HUVEC nachgewiesen (Mutin M. *et al.*, 1997, Vermot-Desroches C. *et al.*, 1995). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte für HUVEC eine CD34-positive Subpopulation gezeigt werden. Ebenfalls übereinstimmend mit der Literatur waren MSC CD34-negativ, aber auch WJC (für die noch keine entsprechenden Daten in der Literatur vorliegen) und SMC exprimierten diesen Oberflächenmarker nicht.

CD54 ist ein Adhäsionsmolekül, das z.B. von Fibroblasten aus der Haut exprimiert wird (Schwachula A. *et al.*, 1994). Auch auf ruhenden HUVEC wurde schwache (Mutin M. *et al.*, 1997) bis mittelstarke (Vermot-Desroches C. *et al.*, 1995) Expression von CD54 gefunden. Die konstitutive Expression kann dabei durch Glukose- (Takami S. *et al.*, 1998) oder TNF α -Stimulation (Lidington E. A. *et al.*, 1999) gesteigert werden. In einer Studie an MSC wurde zwar keine konstitutive Expression von CD54 auf diesen Zellen gefunden, jedoch ließ sie sich durch IL-1 α , TNF α und IFN- γ induzieren (Majumdar M. K. *et al.*, 2003). Andere Studien wiesen dagegen auch auf unstimulierten MSC die Expression von CD54 nach (Conget P. A. und Minguell J. J., 1999, Deans R. J. und Moseley A. B., 2000, Devine S. M., 2002). Auch MSC, die aus der Nabelschnurvene präpariert worden waren, exprimierten CD54 (Covas D. T. *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte CD54 auf allen potenziellen Feederzellen nachgewiesen werden. Die Expression von CD54 war dabei bei MSC, HUVEC und WJC

vergleichbar hoch. SMC dagegen exprimierten CD54 deutlich stärker als die übrigen Zelltypen. Im Bezug auf die Expression dieses Moleküls ähneln WJC daher eher MSC als SMC.

Die Expression von CD90 auf MSC wurde bereits in vielen Veröffentlichungen untersucht. Die Ergebnisse sind hierbei allerdings unterschiedlich, was sich vermutlich auf unterschiedliche Präparations- und Kulturbedingungen sowie möglicherweise die Verwendung verschiedener Antikörper für die Expressionsanalyse zurückführen lässt. So wird etwa in einem Übersichtsartikel angegeben, die Expression von CD90 auf MSC sei variabel (Devine S. M., 2002). Laut einem anderen Übersichtsartikel dagegen sind MSC grundsätzlich CD90-positiv (Deans R. J. und Moseley A. B., 2000). Reyes M. *et al.*, 2001 fanden lediglich niedrige Expression von CDw90 auf mesenchymalen Progenitorzellen. In einer anderen Studie wurde CD90 auf humanen MSC sehr stark exprimiert (Peister A. *et al.*, 2004), was mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen gut übereinstimmt: Alle getesteten Zellen zeigten CD90-Expression, wobei diese auf HUVEC am niedrigsten war, auf WJC und SMC vergleichbar hoch und auf MSC nochmals stärker als auf diesen beiden Zelltypen. In dieser Hinsicht zeigten WJC mehr Ähnlichkeit zu SMC als zu MSC. Jedoch wurde auch auf MSC aus der Nabelschnurvene und damit einer ähnlichen Zellquelle wie bei WJC CD90-Expression nachgewiesen (Covas D. T. *et al.*, 2003), so dass sich eine Ähnlichkeit mit den in dieser Referenz verwendeten Zellen nicht ausschließen lässt.

CD105 ist eines der ersten als MSC-Marker beschriebenen Moleküle. Ein Antikörper – SH2 – der gegen MSC entwickelt wurde, bindet spezifisch an CD105 (Barry F. P. *et al.*, 1999). MSC wurden in vielen Quellen als CD105-positiv beschrieben (Deans R. J. und Moseley A. B., 2000, Devine S. M., 2002). Allerdings wird CD105 nicht ausschließlich auf MSC exprimiert, sondern auch auf endothelialen Zellen. So wurde CD105-Expression auf ruhenden und auch auf durch Bestrahlung aktivierten HUVEC gezeigt (Wang J. M. *et al.*, 1995). In einer anderen Studie (Mutin M. *et al.*, 1997) wurde auf ruhenden HUVEC starke Expression von CD105

gefunden. Auch auf den in der vorliegenden Arbeit verwendeten HUVEC konnte hohe Expression von CD105 nachgewiesen werden. Auf den übrigen untersuchten Zelltypen dagegen war CD105 signifikant schwächer exprimiert, jedoch zeigten sie eine untereinander vergleichbar starke CD105-Expression. Daher ist dieser Marker zwar eventuell geeignet, zwischen HUVEC und den übrigen Feederzelltypen zu unterscheiden, jedoch ergeben sich keine Unterschiede zwischen MSC, WJC und SMC.

CD106 wird üblicherweise als Aktivierungsmarker für Endothelzellen verwendet. So lässt sich CD106-Expression auf HUVEC etwa durch TNF α -Stimulation induzieren (Lidington E. A. *et al.*, 1999). Auf ruhenden HUVEC dagegen wurde CD106 nicht detektiert (Vermot-Desroches C. *et al.*, 1995, Mutin M. *et al.*, 1997). Auch auf den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten HUVEC konnte CD106 nicht nachgewiesen werden, ebenso wenig auf WJC und SMC. Demnach können die hier verwendeten HUVEC wegen der fehlenden CD106-Expression als nicht aktiviert gelten. MSC dagegen zeigten eine geringe CD106-Expression. Die Angaben zu CD106 auf MSC sind in der Literatur widersprüchlich, so wurde etwa auf mesenchymalen Progenitorzellen keine Expression von CD106 festgestellt (Reyes M. *et al.*, 2001). Eine größere Anzahl Quellen gibt jedoch an, CD106 werde auf MSC konstitutiv exprimiert (Deans R. J. und Moseley A. B., 2000, Devine S. M., 2002, Majumdar M. K. *et al.*, 2003, Peister A. *et al.*, 2004), womit die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten übereinstimmen. MSC als einziger der hier getesteten Zelltypen zeigten schwache Expression von CD106, wohingegen sich WJC in diesem Punkt von MSC unterscheiden und höhere Ähnlichkeit zu SMC zeigen.

CD144 ist ein Hauptprotein der endothelialen "adherens junctions" (Dejana E., 2004). Es wird auf ruhenden HUVEC exprimiert (Mutin M. *et al.*, 1997), jedoch nicht auf MSC (Deans R. J. und Moseley A. B., 2000). In dieser Arbeit konnte eine schwache Expression von CD144 auf HUVEC nachgewiesen werden. Alle übrigen Zelltypen dagegen exprimierten diesen Marker nicht, wie für MSC nach den Literaturdaten auch zu erwarten war. Der

Phänotyp von MSC, WJC und SMC bezüglich dieses Oberflächenmarkers ist gleich und deutlich von HUVEC unterscheidbar.

CD166 ist ein weiterer seit langem bekannter Marker für MSC. Er wird auf undifferenzierten MSC exprimiert und spielt eine Rolle bei der osteogenen Differenzierung dieser Zellen (Bruder S. P. *et al.*, 1997, Bruder S. P. *et al.*, 1998). Auch in weiteren Veröffentlichungen wird CD166 als auf MSC exprimiert beschrieben (Deans R. J. und Moseley A. B., 2000, Devine S. M., 2002, Sakaguchi Y. *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde CD166 auf allen getesteten potenziellen Feederzellen detektiert, eine Unterscheidung anhand dieses Moleküls ist somit nicht möglich.

Während HUVEC im Bezug auf die in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenmarker ein eindeutig von den übrigen potenziellen Feederzellen unterscheidbares Profil aufweisen (schwache Expression von CD144, starke Expression von CD31 und CD105, CD34-positive Subpopulation), sind sich MSC, WJC und SMC in ihren Profilen ähnlich. Einzelne Marker werden zwar von einem dieser drei Zelltypen spezifisch exprimiert – wie CD106 ausschließlich von MSC oder CD54 vergleichsweise viel stärker von SMC als den restlichen Zelltypen – aber anhand der Oberflächenmarker ist weder eine genaue Unterscheidung zwischen diesen Zelltypen noch eine Einordnung von WJC als einer dieser Zelltypen möglich. WJC zeigen ein zwischen den Profilen von MSC und SMC liegendes eigenständiges Expressionsmuster.

Rezeptormoleküle

Auch für die untersuchten Rezeptormoleküle werden jeweils einzeln die in der Literatur beschriebenen Befunde mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen verglichen.

CD71 ist beteiligt an der Eisenaufnahme in die Zelle (Aisen P., 2004) und daher ein Marker für proliferierende Zellen. Laut verschiedener Berichte wird CD71 auf MSC exprimiert (Bruder S. P. *et al.*, 1997, Deans R. J. und Moseley A. B., 2000, Devine S. M., 2002). Auch auf Fibroblasten der Haut ist CD71 detektierbar (Schwachula A. *et al.*, 1994). In dieser Arbeit konnte CD71-Expression auf MSC nicht eindeutig nachgewiesen werden, dabei war die Spendervariabilität jedoch sehr hoch. Auf allen anderen untersuchten Zelltypen wurde CD71 exprimiert. Die Expression von CD71 könnte mit der Teilungsrate der Zellen zusammenhängen, aber vor allem bei SMC auch ein Indiz für die Bildung von Myoglobin, für das die Zelle Eisen benötigt, sein. Eventuell könnte dies auch bei WJC der Fall sein, falls diese tatsächlich Myofibroblasten in ihrer Differenzierung zu glatten Muskelzellen sind.

CD95 spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Durch Bindung des Fas-Ligand findet eine Trimerisierung des Rezeptors statt, die zur Caspase-Aktivierung und dadurch zur Auslösung von Apoptose der betroffenen Zelle führt (Waring P. und Müllbacher A., 1999). CD95-Expression wurde z.B. in unstimulierten HUVEC nachgewiesen und war durch IFN γ dosisabhängig hochregulierbar (Li J. H. *et al.*, 2002). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten HUVEC exprimierten jedoch, im Unterschied zur Literatur, CD95 nicht, was eine Folge der Präparationsmethode oder der Kulturbedingungen sein kann. Expression von CD95 wurde dagegen auf MSC, WJC und SMC gefunden. Somit ist anzunehmen, dass diese Zellen in Anwesenheit von Fas-Ligand exprimierenden Zellen wie z.B. cytotoxischer T-Zellen, die sie als fremd erkennen, nach der Transplantation im Körper des Empfängers sensitiv für Apoptose sind.

CD114 ist der Rezeptor für G-CSF, ein Zytokin, das die Mobilisierung von HSC ins periphere Blut zur Folge hat (Lapidot T. und Petit I., 2002). Auf MSC konnte keine Expression von CD114 nachgewiesen werden (Devine S. M., 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde CD114 auf MSC nicht detektiert, ebenso wenig auf HUVEC oder SMC. WJC zeigten dagegen eine schwache CD114-Expression und könnten daher sensitiv auf diesen Faktor

reagieren, sollte er dem Medium zugesetzt werden oder auch von HSC und daraus abgeleiteten Zellen während der Kokultur sekretiert werden. Eine Funktionalität ist jedoch allein anhand der Expression des Rezeptors nicht nachweisbar.

CD117, der Rezeptor für SCF, wird von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in deren Regulation (Smith M. A. *et al.*, 2001). Für HUVEC wurde die Expression von CD117 mittels RT-PCR nachgewiesen (Yamaguchi H. *et al.*, 1996). Auf mesenchymalen Progenitorzellen (Reyes M. *et al.*, 2001) sowie auf MSC aus Knochenmark oder Bälkchenknochen (Sakaguchi Y. *et al.*, 2004) wurde dagegen CD117 nicht detektiert. Auch eine Studie an murinen und humanen MSC (Peister A. *et al.*, 2004) fand keine CD117-Expression auf diesen Zellen. Dagegen wurde gezeigt, dass CD117 auf WJC exprimiert wird (Mitchell K. E. *et al.*, 2003). Auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten WJC und HUVEC konnte CD117 nachgewiesen werden. MSC zeigten keine, SMC nur sehr schwache Expression dieses Oberflächenmarkers. Da SCF ein Bestandteil des für HSC verwendeten Mediums ist, könnte daher bei HUVEC oder WJC möglicherweise eine Reaktion auf diesen Faktor auftreten.

CD123, ein Teil des Rezeptorkomplexes für IL-3, wurde bereits auf MSC nachgewiesen (Deans R. J. und Moseley A. B., 2000, Devine S. M., 2002). Auf den in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSC konnte dagegen keine Expression von CD123 gezeigt werden, eventuell liegen hier Unterschiede zu den in anderen Studien verwendeten Kulturbedingungen vor, die dies verursachen könnten. Auch WJC und SMC exprimieren CD123 nicht oder nur sehr schwach. Auf HUVEC wird CD123 exprimiert, hier könnte also eine Reaktion der Zellen auf einen Bestandteil des HSC-Mediums eintreten.

CD184, der Rezeptor für SDF-1, wird auf CD34-positiven HSC exprimiert und spielt eine Rolle bei deren transendothelialer Migration (Mohle R. *et al.*, 1998), also die Interaktion der HSC mit endothelialen Zellen. Expression von CD184 auf einer kleinen Subpopulation MSC

(< 1 %) wurde gezeigt, stärker war jedoch die intrazelluläre Expression mit 83 – 98 % der Zellen (Wynn R. F. *et al.*, 2004). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen konnte keine CD184-Expression auf MSC, WJC und SMC nachgewiesen werden. Da jedoch nur Oberflächenmarkerfärbungen und keine Intrazellulärfärbungen durchgeführt wurden, ist es nicht auszuschließen, dass intrazellulär CD184 vorliegt. Wynn R. F. *et al.*, 2004, konnten CD184 auch lediglich auf der Oberfläche von sehr geringen Subpopulationen der getesteten MSC detektieren, so dass diese Werte nahe an der Nachweisgrenze liegen. Auf den in der vorliegenden Arbeit verwendeten HUVEC dagegen wurde starke CD184-Expression gefunden. Melchionna R. *et al.*, 2005, konnten ebenfalls die Expression von CD184 auf HUVEC zeigen, die sich verringerte, wenn die Zellen laminarem Scherstress ausgesetzt waren. Auch die Fähigkeit der HUVEC zur Chemotaxis wurde dadurch gestört. Bei den Methoden, die für Gewinnung und Kultur von HUVEC sowie für die Kokultur von HUVEC mit HSC im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet wurden, spielte Scherstress keine Rolle. Die Expression von CD184 konnte daher von diesem Einfluss ungestört stattfinden. Allerdings könnte bei Versuchen zur Kokultur in Reaktorsystemen, die mit Durchfluss von Medium betrieben werden, Scherstress auf die als Feederzellen verwendeten HUVEC entstehen. Dadurch könnte deren CD184-Expression, eventuell auch eine mögliche Interaktion mit HSC über CD184, beeinträchtigt werden.

Die Expressionsprofile der potenziellen Feederzellen für Rezeptormoleküle unterscheiden sich erheblich. Reaktionen der Feederzellen auf die im für die Kokultur verwendeten HSC-Medium enthaltenen Zytokine sind möglich, z.B. könnten WJC und HUVEC auf SCF oder HUVEC auf IL-3 reagieren. Wie diese Reaktionen im Einzelnen ablaufen könnten, ist nicht vorherzusagen. Weiterführende Experimente könnten hier Klarheit bringen, so könnte etwa untersucht werden, ob als Reaktion auf die genannten Zytokine Proliferation oder Apoptose bei den Feederzellen eintreten. Die Expression von CD184 auf HUVEC könnte einen Einfluss auf die Interaktion mit HSC haben, vor allem, was deren Adhäsion an die Feederzellen betrifft. Dies müsste ebenfalls in weiteren Versuchen geklärt werden.

Fazit

Alle untersuchten Feederzellen wiesen keine Expression von Markern für Blutzellen auf. Besonders CD45 ist aufgrund seines breiten Expressionsspektrums auf reifen Zellen und Vorläuferzellen aus dem Blut in diesem Zusammenhang wichtig. Dieser Marker könnte zur Isolierung von HSC und von diesen abgeleiteten reiferen Blutzellen aus dem Zellgemisch mit Feederzellen, das nach einer Kokultur entsteht, dienen. Auch für die übrigen untersuchten Blutzellmarker konnte keine Expression auf den potenziellen Feederzellen nachgewiesen werden. Somit wäre es auch möglich, eine anhand dieser Marker erkennbare Subpopulation der aus HSC entstandenen Zellen zu separieren, wenn man speziell diese Zellen für therapeutische Zwecke benötigt. Bei der Verwendung von HUVEC als Feederzellen ist jedoch für die Aufreinigung von HSC anhand von CD34 nach der Kokultur Vorsicht geboten, da eine Subpopulation von HUVEC CD34-positiv ist. Hier müsste statt CD34 allein zusätzlich CD45 als Marker für HSC herangezogen werden. Dieses Problem tritt jedoch bei den anderen Feederzellen nicht auf, diese sind generell CD34-negativ.

Die Expression von MHC-I auf den potenziellen Feederzellen ermöglicht deren Erkennung durch das Immunsystem eines Transplantatempfängers. Somit ist eine sorgfältige Überprüfung der HLA-Eigenschaften von Spender und Empfänger vor der geplanten Transplantation erforderlich, vor allem, wenn sowohl HSC und davon abgeleitete Zellen als auch Feederzellen nach der Kokultur transplantiert werden sollten.

Generell sind die Expressionsprofile von MSC, WJC und SMC bezüglich der zelltypspezifischen Oberflächenmarker sehr ähnlich, WJC lassen sich aber keinem der beiden anderen Zelltypen zuordnen. Möglicherweise kann man sie jedoch in die Differenzierungsreihe von mesenchymalen Vorläufern zu glatten Muskelzellen integrieren. Dies ist jedoch anhand der gezeigten Daten nicht nachweisbar. Das Expressionsprofil von

HUVEC ist anhand weniger zelltypspezifischer Oberflächenmarker (CD31, CD34, CD105) von allen anderen untersuchten Zelltypen eindeutig unterscheidbar.

Auch im Profil der Expression von Rezeptormolekülen unterscheiden sich die Feederzellen voneinander. Zum Teil werden Rezeptoren für Zytokine exprimiert, die im HSC-Medium enthalten sind, so dass sich bezüglich der dadurch möglicherweise hervorgerufenen Reaktionen bei den Feederzellen über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehende Fragen stellen.

Oberflächenmarkerprofil von "endothelähnlichen" Zellen aus WJC

Bei den Präparationen von WJC trat neben den "fibroblastähnlichen" Zellen noch ein weiterer Zelltyp auf, dessen Morphologie der von Endothelzellen ähnelte. Diese Zellen wurden auf eine Auswahl der o.g. Oberflächenmarker getestet, um ihr Profil mit dem der übrigen Zelltypen zu vergleichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Morphologie, sondern auch die Oberflächenmarkerexpression dieser Zellen der von HUVEC glich. Vor allem die starke Expression CD31 und CD105 sowie das Vorhandensein einer CD34-positiven und einer CD184-positiven Subpopulation gleichen exakt den spezifischen Eigenschaften von HUVEC. Dagegen unterschied sich das Profil von "fibroblastähnlichen" Zellen deutlich von dem der "endothelähnlichen" Zellen. Somit lassen sich "endothelähnliche" Zellen aus der Nabelschnurmatrix eindeutig als Endothelzellen identifizieren.

Ihr Auftreten ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei der Präparation, wie sie hier durchgeführt wurde, die Blutgefäße nicht aus der Nabelschnurmatrix entfernt wurden. Die Zellen könnten aus dem Endothel sowohl der Vene als auch der Arterien stammen. Vielleicht leiten sie sich auch aus endothelialen Progenitorzellen, die sich in den Gefäßwänden befinden könnten, ab. Obwohl der "fibroblastähnliche", als WJC definierte Phänotyp deutlich

häufiger auftrat (s. 4.2.1), ist offensichtlich auch die Gewinnung von Endothelzellen mit der entwickelten Methodik möglich. Durch Optimierungsschritte, wie etwa das Heraussortieren der Blutgefäße und deren gezielte Verwendung für die Aussaat, könnte man die Ausbeute an endothelialen Zellen steigern, wenn deren Einsatz gewünscht wird. Dabei könnte auch problemlos zwischen Arterien und Vene unterschieden werden. Vor allem für die Präparation von Endothelzellen aus den sehr dünnen und starren Arterien könnte diese Methode eine Alternative zu herkömmlichen Vorgehensweisen darstellen.

5.2.2 Immunverträglichkeit der potenziellen Feederzellen

Die Transplantation von HSC erfolgt in vielen Fällen allogenen. Da in dieser Konstellation Abstoßungsreaktionen auftreten können, ist die so genannte HLA-Typisierung von Spender und Empfänger erforderlich. Hierbei wird überprüft, ob Gewebemerkmale (HLA-1 und HLA-2) von Spender und Empfänger weitgehend übereinstimmen. Ist kein Spender vorhanden, dessen Gewebemerkmale vollständig mit dem Empfänger übereinstimmen, werden in geringem Umfang so genannte "Mismatches" (= Nichtübereinstimmungen) akzeptiert (Kaufman R. L. *et al.*, 2004). Dies führt allerdings dazu, dass Komplikationen auftreten können, wie etwa verzögerte oder fehlende Ansiedlung der HSC oder GVHD. Ein Vorteil der Nutzung von Nabelschnurblut für Stammzelltransplantationen ist die höhere Toleranz zwischen Empfänger und Spender auch bei Transplantaten, die nicht in allen HLA-Merkmalen übereinstimmen (Kaufman R. L. *et al.*, 2004).

Um diesen Vorteil bei *ex vivo* expandierten HSC aus Nabelschnurblut zu erhalten, sollten auch die Feederzellen möglichst immunverträglich sein, denn selbst bei aufwändigem Abtrennen der Feederzellen von den aus HSC expandierten Zellen nach der Kokultur (z.B. mittels FACS) kann noch eine geringe Anzahl Feederzellen im gereinigten Transplantat enthalten sein. Ist die Immunverträglichkeit der Feederzellen sehr gut, könnte auf das

Sortieren der Zellen nach der Kokultur verzichtet werden und die Feederzellen mit den HSC und daraus abgeleiteten Zellen in den Empfänger transplantiert werden.

Eine solche Kotransplantation könnte sogar die Ansiedlung der HSC im Körper des Empfängers positiv beeinflussen. Für MSC wird die Möglichkeit der Kotransplantation dieser Zellen zusammen mit HSC zur Erleichterung von deren Ansiedlung bereits intensiv untersucht. Im Rahmen einer klinischen Studie (Phase I) wurden Brustkrebspatientinnen nach einer Hochdosischemotherapie zusammen mit autologen HSC auch autologe MSC infundiert (Koc O. N. *et al.*, 2000). Der Großteil der Patientinnen zeigte danach eine schnelle Erholung des hämatopoetischen Systems, wobei die rasche Wiederherstellung der Blutplättchenbildung besonders hervorgehoben wurde. Im Zusammenhang mit der Transplantation von HSC aus Nabelschnurblut wird diskutiert, diese Stammzellquelle für erwachsene Empfänger dadurch zugänglich zu machen, dass Nabelschnurblutspenden von zwei verschiedenen Spendern transplantiert werden, um die Stammzelldosis zu erhöhen. In einer Studie an NOD/SCID-Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch Kotransplantation von MSC eines dritten Spenders nicht nur die Dominanz der Zellen eines HSC-Spenders über die des zweiten Spenders verringert wurde, sondern sich auch die Gesamtrate der HSC-Ansiedlung deutlich verbesserte (Kim D. W. *et al.*, 2004).

Trotz dieser positiven Ergebnisse für die Kotransplantation von MSC müssen auch die Risiken einer Kotransplantation von Feederzellen mit HSC bedacht werden, vor allem, da als Feederzellen in dieser Arbeit nicht nur MSC, sondern auch HUVEC und WJC in Betracht gezogen wurden. Gelangen die als Feederzellen verwendeten Zellen im Rahmen einer Kotransplantation in den Körper des Empfängers, können sie von den T-Zellen des Empfängers als allogene erkannt und bekämpft werden. Unter Umständen könnte daraus eine erhöhte Gefahr der Abstoßung des HSC-Transplantates resultieren, da das Immunsystem des Empfängers so für die Erkennung der Spenderzellen sensibilisiert werden könnte. Diese Möglichkeit besteht vor allem dann, wenn HSC und damit auch die Feederzellen nach der

Kokultur in einen nicht oder nur teilweise immunsupprimierten Empfänger transplantiert werden sollen. Bei einer Nutzung der HSC zur Transplantation nach einer Hochdosis-Chemotherapie ist dieser Aspekt nicht relevant, da durch die Chemotherapeutika das komplette blutbildende System des Empfängers zerstört wird und somit keine T-Zellen vorhanden sind.

Die ersten Schritte, die notwendig sind, damit T-Zellen Fremdzellen attackieren können, sind die Fremderkennung und darauf folgend die T-Zell-Aktivierung. Letztere kann anhand der Änderung der Oberflächenmarkerexpression auf T-Zellen untersucht werden (Nguyen X. D. *et al.*, 2003). Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression der späten Aktivierungsmarker CD25 und CD71 sowie des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf mit den potenziellen Feederzellen kokultivierten T-Zellen untersucht. Als T-Zell-Quelle wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) eines allogenen Spenders verwendet. Die darin enthaltenen T-Zellen wurden anhand ihrer Expression von CD3 definiert. Alle potenziellen Feederzellen wurden in den durchgeführten Experimenten in unterschiedlichen Konzentrationen relativ zu PBMC eingesetzt. Die Zellzahlverhältnisse umfassten dabei 5 bis 40 PBMC pro Feederzelle. Dadurch sollte untersucht werden, ob die Aktivierung allogener T-Zellen abhängig von der Konzentration der eingesetzten Feederzellen unterschiedlich stark erfolgt. Im Folgenden werden die Daten für die verschiedenen potenziellen Feederzelltypen für jeden Zelltyp einzeln diskutiert, um dann eine abschließende Bewertung abgeben zu können.

MSC

Wurden MSC zur Stimulation allogener T-Zellen verwendet, war in den hier durchgeführten Versuchen bei den Zellzahlverhältnissen 1:5 und 1:10 (MSC:PBMC) bezogen auf CD25 und CD71 keine Aktivierung allogener T-Zellen zu beobachten. Für das Zellzahlverhältnis 1:5 sank der Prozentsatz CD25-positiver, also aktivierter, T-Zellen im Vergleich zur

Negativkontrolle sogar ab, was auf eine Suppression hindeutet. Waren die eingesetzten Konzentrationen MSC jedoch geringer (ab 1:20), stieg der Anteil aktivierter T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle an, was vor allem für CD71 deutlich zu beobachten war. Eine Suppression der T-Zell-Aktivierung war anhand von CD69 selbst bei hohen Konzentrationen MSC nicht zu beobachten. Bereits ab einem Verhältnis von 1:10 lag der Anteil CD69-positiver T-Zellen signifikant höher als in der unstimulierten Negativkontrolle. Demnach sind MSC zwar in hohen Konzentrationen in der Lage, die volle Aktivierung allogener T-Zellen zu verhindern oder sogar zu supprimieren, wird ihr Anteil jedoch geringer, findet stattdessen eine T-Zell-Aktivierung statt.

In der Literatur wurde vielfach ein immunsuppressiver Effekt von MSC sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben. So wurde z.B. gezeigt, dass MSC aus Pavianen nicht nur selbst keine Proliferation allogener T-Zellen hervorriefen, sondern auch die durch Lymphozyten des MSC-Spenders hervorgerufene Proliferation allogener T-Zellen verhindern konnten (Bartholomew A. *et al.*, 2002). Eine Konzentrationsabhängigkeit der Immunsuppression war hierbei in den Zellzahlverhältnissen 1:1, 1:10 und 1:100 MSC:PBMC nicht zu erkennen. In derselben Studie konnte die intravenöse Transplantation von MSC auch die Überlebenszeit von zeitgleich transplantierten Hautstücken allogener Spender signifikant verlängern.

Eine Suppression der mittels verschiedener Stimuli (allogene Lymphozyten bzw. dendritische Zellen, Phytohämagglutinin oder IL-2) hervorgerufenen T-Zell-Aktivierung durch humane MSC wurde auch von Di Nicola M. *et al.*, 2002, gezeigt. Auch das Vorhandensein eines konzentrationsabhängigen Effekts wurde von diesen Autoren untersucht. Dafür wurden MSC in Zellzahlverhältnissen von 1:5 bis 10:1 MSC:T-Zellen verwendet und gemischten Kulturen von bestrahlten dendritischen Zellen mit T-Zellen hinzugefügt. Eine Inhibierung der T-Zell-Proliferation konnte bereits ab dem Zellzahlverhältnis 1:5 festgestellt werden, wurde jedoch stärker, je mehr MSC in den Proben enthalten waren.

MSC in verschiedenen Konzentrationen wurden auch auf ihre Fähigkeit, die Proliferation von durch allogene Lymphozyten aktivierten T-Zellen zu verhindern, getestet (Le Blanc K. *et al.*, 2003-2). Die Autoren konnten zeigen, dass hohe Konzentrationen MSC (ab 1:10 MSC:Responder-Lymphozyten) die Proliferation der Lymphozyten inhibierten, dieser Effekt verschwand jedoch ab einem Zellzahlverhältnis von 1:100. Bei den Proben, in denen nur niedrige Konzentrationen MSC enthalten waren (1:100 – 1:10⁴), fand gelegentlich eine Steigerung der Lymphozyten-Proliferation statt, die jedoch nicht in allen Experimenten belegt werden konnte.

Der Großteil der Literaturdaten stehen im Kontrast zu der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen T-Zell-Aktivierung durch MSC. In der zuletzt genannten Studie (Le Blanc K. *et al.*, 2003-2) konnte jedoch zumindest in manchen Experimenten eine leichte Steigerung der T-Zell-Aktivierung durch MSC in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden. In den meisten Veröffentlichungen wurde aber eine Suppression der T-Zell-Aktivierung gezeigt. Allerdings wurden in diesen Studien für die T-Zell-Proliferationsversuche 96-Well-Zellkulturplatten mit Spitzbodenvertiefungen verwendet. In diesen Gefäßen kommt es zur Akkumulation aller Zellen auf sehr kleinem Raum, was zu einem lokal sehr hohen Anstieg löslicher Faktoren führen könnte. Dadurch kommt möglicherweise die in den hier dargestellten Versuchen (48-Well-Zellkulturplatten mit flachem Boden, Fläche 1 cm²/Vertiefung) sichtbare Aktivierung der T-Zellen nicht zustande: Auf diese Weise könnten auch eine geringe Anzahl MSC ausreichend inhibierende Faktoren produzieren, die nicht durch größere Mediumvolumina verdünnt werden, so dass die T-Zell-Aktivierung verhindert wird. Diese These klärt jedoch nicht, warum in den Körper injizierte MSC in der Lage sind, eine Immunsuppression hervorzurufen, obwohl die Verdünnung auf diese Weise erheblich stärker ist als im Experiment.

Eine weitere Erklärung für die von den Literaturdaten abweichenden Ergebnisse ist die Möglichkeit, dass MSC zwar allogene T-Zellen aktivieren, ihre Proliferation dagegen

verhindern. In den meisten Studien wurde bisher nicht direkt die Aktivierung, sondern nur die Proliferation von T-Zellen untersucht. Eine aktuelle Veröffentlichung (Glennie S. *et al.*, 2005) zeigte jedoch, dass MSC zwar durchaus T-Zell-Aktivierung hervorrufen, was anhand erhöhter Expression von CD25 und CD69 belegt wird. Die Produktion von IFN γ durch die T-Zellen wird aber durch MSC verhindert. Auch treten mit MSC kokultivierte T-Zellen nicht in die G2-Phase des Zellzyklus ein, sondern bleiben in G0/G1 arretiert. Diese Daten stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. In einer anderen Veröffentlichung (Le Blanc K. *et al.*, 2004) konnte allerdings keine erhöhte Expression von CD25 und CD69 auf mit allogenen MSC stimulierten T-Zellen gefunden werden.

Für die Verwendung von MSC in der Kokultur mit folgender Transplantation lässt sich aus den vorliegenden Daten kein eindeutiger Schluss ziehen. Zwar findet T-Zell-Aktivierung durch MSC statt, jedoch ist anhand der durchgeführten Experimente nicht zu beurteilen, ob diese Aktivierung auch zu einer Proliferation der T-Zellen führt. Eingehendere Untersuchungen hierzu wären vor einem Einsatz der Zellen in einer Transplantation notwendig. Allerdings weisen bereits veröffentlichte *in vivo*-Studien darauf hin, dass selbst allogene MSC möglicherweise unproblematisch bei Transplantationen sind (McIntosh K. und Bartholomew A., 2000, Devine S. M., 2002).

Ein immunsuppressiver Effekt muss jedoch auch bei einer Transplantation nicht unbedingt nur von Vorteil sein. In einem Mausmodell wurde Tumorwachstum aus injizierten Melanomzellen nur dann nachgewiesen, wenn die gleiche Anzahl allogener MSC gleichzeitig injiziert wurde (Djouad F. *et al.*, 2003). Weder MSC noch Melanomzellen alleine führten zu Tumorwachstum. Der immunsuppressive Effekt von MSC könnte somit bei einer Kotransplantation von MSC mit HSC in der Krebstherapie möglicherweise dazu führen, dass der erwünschte "Graft-versus-Leukemia"-Effekt nicht auftritt, weil die im Transplantat enthaltenen Immunzellen durch die MSC inhibiert werden.

HUVEC

Endothelzellen als Immunstimulatoren spielen bei Entzündungsreaktionen und bei der Abstoßung von Organtransplantaten eine zentrale Rolle. Sie werden im Gegensatz zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie z.B. dendritischen Zellen den nicht-professionellen Antigen-präsentierenden Zellen zugeordnet. Mehrfach wurde gezeigt, dass Endothelzellen ohne weitere Stimulation durch Mitogene oder andere Zellen zwar keine naiven T-Zellen (CD4-positiv) aktivieren können, Memory-T-Zellen (CD8-positiv) dagegen durch Endothelzellen aktiviert werden können (Page C. S. *et al.*, 1994, Marelli-Berg F. M. *et al.*, 1996, Dengler T. J. *et al.*, 2001, Kunitomi A. *et al.*, 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten PBMC-Proben enthielten sowohl CD4- als auch CD8-positive Zellen, die nicht getrennt untersucht wurden. Daher befindet sich die gezeigte Aktivierung von T-Zellen bereits ab einem Zellzahlverhältnis von 1:40 HUVEC:PBMC in Übereinstimmung mit der Literatur. Die Aktivierung konnte anhand eines höheren Anteils CD25- und CD71-positiver T-Zellen nachgewiesen werden. Für CD25 zeigten auch Dengler T. J. *et al.*, 2001, auf CD8-positiven T-Zellen eine hohe Expression nach 14tägiger Kokultur von HUVEC. In deren Versuchen war die Expression von CD69 auf T-Zellen ebenfalls stark erhöht. Aus den hier vorliegenden Daten lässt sich auf keine signifikante Erhöhung des Anteils CD69-positiver T-Zellen nach Stimulation mit HUVEC schließen, allerdings war im Bezug auf diesen Marker die Spendervariabilität sehr hoch, was eine Aussage erschwert.

Bevor HUVEC als Feederzellen für HSC für die Transplantation verwendet werden können, sind auch hier weitere Studien über den Effekt transplantierte HUVEC *in vivo* notwendig. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass eine T-Zell-Aktivierung durch HUVEC stattfindet. Welchen Effekt diese Aktivierung im Körper hat, lässt sich daraus noch nicht schließen. Die Verwendung von HUVEC für die Kokultur ist dadurch nicht ausgeschlossen, da ohnehin vor einer Transplantation eine sorgfältige HLA-Typisierung von Spender und Empfänger und die Suche nach entsprechend übereinstimmenden Merkmalen durchgeführt werden müsste.

Dadurch, sowie mittels ergänzender immunsuppressiver Therapien, könnte eine zu starke Aktivierung von Empfänger-T-Zellen durch möglicherweise mit HSC zusammen transplantierte HUVEC verhindert werden. Des Weiteren könnte die Anzahl von HUVEC in den Transplantaten durch gezieltes Aussortieren z.B. anhand von CD45 (s. 4.2.1) minimiert werden, um das Risiko der T-Zell-Aktivierung gering zu halten.

WJC

Sowohl Plazenta als auch Nabelschnur gehören zu den embryonalen bzw. fetalen Geweben. Da an der Plazentaschranke mütterliches und embryonales/fetales Gewebe miteinander direkt in Kontakt treten, hat die Plazenta auch die Aufgabe, das mütterliche Immunsystem lokal so zu unterdrücken, dass der semiallogene Embryo/Fetus nicht als körperfremd erkannt und abgestoßen wird. Dies geschieht aufgrund mehrerer Mechanismen (Weetman A. P., 1999). Unter anderem exprimieren die Trophoblastzellen der Plazenta weder MHC-I noch MHC-II, so dass sie von mütterlichen Immunzellen nicht erkannt werden können. Außerdem produzieren sie das Molekül Fas-Ligand, das an den DEATH-Rezeptor CD95 (Fas) auf T-Zellen bindet und dadurch deren Apoptose auslöst. CD95-positive mütterliche Immunzellen werden auf diese Weise abgetötet. Des Weiteren sekretieren sowohl fetale Plazentazellen als auch mütterliche Zellen der Dezidua diverse Zytokine, die dazu führen, dass die Immunantwort hier nicht mehr auf Th1-Basis erfolgt.

Im Gegensatz zur Plazenta, die aus dem Trophoblasten hervorgeht, entsteht die Nabelschnur aus extraembryonalem Mesoderm, das vom Embryoblasten stammt (Sadler T. W., 1998). Die Nabelschnur steht auch nicht in direktem Kontakt zu mütterlichem Gewebe. Daher ist nicht zu erwarten, dass aus der Nabelschnurmatrix stammende Zellen immunsuppressive Eigenschaften aufweisen. In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass WJC in allen getesteten Konzentrationen allogene T-Zellen aktivieren. Die Aktivierung wurde anhand aller untersuchten Aktivierungsmarker (CD25, CD69 und

CD71) nachgewiesen. Der Anteil aktivierter T-Zellen blieb dabei für jedes Zellzahlverhältnis WJC:PBMC ähnlich. Daher ist anzunehmen, dass bereits wenige WJC ausreichen, um beim Empfänger eines Transplantates eine T-Zell-Aktivierung hervorzurufen.

Für die Verwendung von WJC als Feederzellen in der Kokultur mit HSC lassen sich die gleichen Schlüsse ziehen wie für HUVEC. Es bleibt zunächst zu klären, wie stark der *in vivo*-Effekt von WJC auf allogene T-Zellen ist, außerdem müsste bei einer Transplantation durch geeignete Maßnahmen (s.o.) sichergestellt werden, dass eine möglichst geringe Aktivierung erfolgt.

Fazit

Bei Stimulation mit allen potenziellen Feederzelltypen konnte eine Aktivierung allogener T-Zellen nachgewiesen werden. Dies erfordert, wie oben diskutiert, vor der klinischen Anwendung weitere sorgfältige Untersuchungen, die vor allem im Mausmodell durchgeführt werden sollten. Dadurch könnte die spätere Transplantationssituation am besten simuliert werden. Auch die Evaluierung therapeutischer Maßnahmen gegen die T-Zell-Aktivierung könnte auf diese Weise erfolgen. Bei sorgfältiger Prüfung der Übereinstimmung der Gewebemerkmale von Spender und Empfänger sollten jedoch alle getesteten Feederzellen in der Kokultur verwendbar sein. Durch ein Aussortieren der Feederzellen nach der Kokultur können zusätzlich Risiken vermieden werden.

Ein weiteres, hier im Einzelnen nicht näher untersuchtes, immunologisches Risiko bei der Transplantation allogener Zellen ist die GVHD. Diese wird dadurch hervorgerufen, dass im Transplantat enthaltene und somit vom allogenen Spender stammende T-Zellen körpereigene Zellen des Empfängers attackieren (Gluckman E. und Rocha V., 2004). Bei der Untersuchung der potenziellen Feederzellen auf ihre Oberflächenmarkerexpression konnte nachgewiesen werden, dass in den kultivierten Zellen keine CD3-positiven Zellen, also T-

Zellen, enthalten sind (s. 4.2.1). Auch die wichtigsten Marker für Subpopulationen von T-Zellen (CD4 und CD8) konnten nicht detektiert werden. Daher ist anzunehmen, dass keine Verunreinigung der Feederzellen mit T-Zellen vorliegt und eine Transplantation der Feederzellen somit keine GVHD hervorrufen kann. Der letztgültige Beweis hierfür sollte jedoch vor einem möglichen klinischen Einsatz noch in einer tierexperimentellen Studie erbracht werden.

5.2.3 Kompatibilität der potenziellen Feederzellen zu HSC-Medium

Wie bereits zuvor erwähnt ist es für die klinische Anwendung von Zelltherapeutika von Vorteil, wenn die Zellen in serumfreiem, optimalerweise komplett von tierischen Bestandteilen freiem, Medium kultiviert werden. Zwar sind die Feederzellen vor der Kokultur in serumhaltigem Medium kultiviert worden, aber die Kokulturversuche sollten trotzdem in serumfreiem kliniktauglichem Medium durchgeführt werden, um die Bedingungen bei der Anwendung möglichst genau zu simulieren. Darum wurde vor den eigentlichen Kokulturversuchen getestet, ob die potenziellen Feederzellen auch in serumfreiem Medium, das die für HSC benötigten Zytokine enthält, überleben können. Dabei sollten die Zellen weder zu schnelles Wachstum zeigen noch zu viele Nährstoffe aus dem Medium verbrauchen. Auch die Akkumulation hoher Konzentrationen potenziell toxischer Metabolite im Medium sollte vermieden werden. Als Referenz für tolerierbare Werte wurde die murine stromale Zelllinie SI/SI mod mitgeführt, die in früheren Kokultorexperimenten die Expansion von HSC gut unterstützt hatte (Jelinek N., 2001, Kokerbeck D., 2002, Fischbach T., 2003). Wie vor Kokulturversuchen wurden diese Zellen auch vor der Wachstums- und Verbrauchsanalyse in HSC-Medium mit 80 Gray bestrahlt, um ihr Wachstum zu inhibieren. Die Primärzellen dagegen wurden unbestrahlt eingesetzt, um zu testen, ob ihre mögliche Proliferation in HSC-Medium die Expansion der HSC gefährden würde.

Die Lebendzellzahl in HSC-Medium sank bei allen Primärzellen gegen Ende der Kulturperiode (7 Tage) stark ab, nachdem bei MSC und HUVEC anfangs sogar Proliferation aufgetreten war. Erwartungsgemäß war bei den bestrahlten SI/SI mod keine Vermehrung der Zellen zu beobachten. Die Lebendzellzahl zum Kulturende war bei SI/SI mod am geringsten, bei HUVEC und WJC unwesentlich und bei MSC deutlich höher als bei SI/SI mod. Über die gesamte Kulturdauer nimmt die Lebendzellzahl der potenziellen primären Feederzellen ab. Daher lässt sich ausschließen, dass die relativ langsam proliferierenden und zu Kulturbeginn nur in geringen Zellzahlen vorhandenen HSC von den Feederzellen überwachsen werden. Daher ist für die Verwendung der untersuchten Primärzellen als Feederzellen in der Kokultur mit HSC keine Wachstumsinhibierung durch Bestrahlen notwendig. Das vereinfacht den Einsatz in der Klinik, die Vorgehensweise für die Kokultur wird dadurch weniger aufwändig. Bereits die niedrige Lebendzellzahl der bestrahlten SI/SI mod genügt offenbar zur Unterstützung der HSC-Expansion. Daher sollte auch die bis zum Kulturende verbleibende Lebendzellzahl der Primärzellen zur Unterstützung der HSC ausreichen, sofern deren sonstige Eigenschaften sich günstig auf die HSC-Expansion auswirken.

Zwei wichtige Nährstoffe für proliferierende Zellen sind Glukose und Glutamin. Glukose wird, um daraus Energie in Form von ATP zu gewinnen, von der Zelle über die Glykolyse zu Pyruvat umgesetzt und dieses über Coenzym A in den Citratzyklus eingeschleust oder, falls Sauerstoffknappheit vorliegt, zu Laktat umgewandelt (Stryer L., 1999). Bei hohem Glukoseüberschuß wird sie ebenfalls zu Laktat umgesetzt (Crabtree-Effekt, Ibsen K. H., 1961) Im durchgeführten Versuch hatte die Glukosekonzentration im Kulturüberstand der potenziellen Feederzellen beim Kulturende gegenüber der Konzentration bei Versuchsstart nur wenig abgenommen, der Glukoseverbrauch durch die Feederzellen war demnach sehr gering. Die verbleibende Konzentration lag im Überstand aller Zellen um 20 mM. Dies ist ausreichend, um die Glukoseversorgung der HSC in der Kokultur sicherzustellen.

Glutamin gelangt über den Umbau zu α -Ketoglutarat ebenfalls in den Citratzyklus (Stryer L., 1999) und dient damit auch der Energiegewinnung der Zelle. Im Gegensatz zu Glukose wurde Glutamin bei der für MSC, HUVEC und SI/SI mod eingesetzten Startkonzentration von 0,5 mM vollständig aus dem Medium depletiert. Bei der für WJC verwendeten Konzentration von 2,5 mM Glutamin verblieben am Ende der Kultur 1,3 mM Glutamin im Medium. Dies würde zwar vermutlich ausreichen, um die Versorgung der HSC zu gewährleisten, trotzdem wurden dem HSC-Medium für die Kokulturversuche weitere 4 mM Glutamin beigelegt, um Engpässe auszuschließen. Die Konzentrationen beider Nährstoffe im Medium sollte dennoch auch nach der Kokultur der Feederzellen mit HSC kontrolliert werden, um auszuschließen, dass eine Depletion stattgefunden hat, die das Wachstum der HSC möglicherweise stören könnte.

Das aus der Glukose in der Milchsäuregärung entstehende Laktat kann, wenn seine Konzentration im Medium zu hoch ist, die Proliferation der Zellen behindern. So wurde z.B. bei der Expansion von PBMC gezeigt, dass selbst bei täglichem Mediumwechsel die Proliferation der Zellen um ca. 25 % verringert war, wenn nach dem Mediumwechsel die Laktatkonzentration, die das verbrauchte Medium enthalten hatte, wieder eingestellt wurde, auch wenn der pH-Wert konstant gehalten wurde (Patel S. D. *et al.*, 2000). Die nach 14 Tagen im Medium akkumulierte Laktatkonzentration betrug dabei 34,3 mM. In Vergleichskulturen, denen nicht nur Laktat beigelegt wurde, sondern deren pH-Wert auch auf den Wert zum Zeitpunkt vor dem Mediumwechsel eingestellt wurde, war die Proliferation sogar um 60 % verringert, obwohl hier nach 14 Tagen nur 23,2 mM Laktat im Medium enthalten war. Demnach scheint der Inhibitionseffekt auf dem Zusammenwirken von Laktatakkumulation und dadurch verursachter pH-Wert-Erniedrigung zu beruhen. Nach einem Zeitraum von 7 Tagen lag die Laktatkonzentration in allen von Patel S. D. *et al.*, 2000, untersuchten Kulturen zwischen 10 und 15 mM, und bis zu diesem Zeitpunkt unterschied sich das Wachstum der Zellen in den einzelnen Ansätzen nicht. Daher ist auch die in den in

der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten erreichte Laktatkonzentration, die zwischen 3,5 und 6,5 mM lag, als unkritisch zu betrachten.

Glutamat ist im Zellstoffwechsel eine Zwischenstufe, über die verschiedene Aminosäuren in den Citratzyklus eingeschleust werden (Stryer L., 1999). Es ist außerdem ein bekannter Neurotransmitter im Zentralnervensystem, eventuell könnte es auch auf andere Zellen wirken. In einer Studie (Lombardi G. *et al.*, 2004) wurde der Effekt von steigenden Konzentrationen Glutamat auf die Proliferation von mit Phytohämagglutinin stimulierten PBMC untersucht. Dabei zeigte sich, dass bereits eine Konzentration von etwa 2 mM Glutamat im Medium die Proliferation der Zellen um die Hälfte verminderte. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 10 mM war die Proliferation nicht stärker als die von unstimulierten PBMC. Auf unstimulierte PBMC hatten steigende Glutamatkonzentrationen dagegen keinen Effekt. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Primärzellen sowie den als Vergleich verwendeten SI/SI mod lag die Konzentration des Glutamats im Kulturüberstand nach 7 Tagen Kultur bei 1,0 – 1,2 mM. Dies ist ein Wert, bei dem Lombardi G. *et al.*, 2004, für stimulierte PBMC bereits eine leichte Verringerung der Proliferation feststellten. Allerdings ist keine starke Wachstumsinhibition in diesem Konzentrationsbereich zu befürchten, vor allem, wenn die Konzentration wie bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen erst langsam ansteigt.

Aus den Tests zum Wachstum im klinisch verwendbaren HSC-Medium lässt sich schließen, dass alle in Frage kommenden Feederzellen für die Kokultur mit HSC in diesem Medium eingesetzt werden können. Ihre Proliferation ist nicht so stark, dass befürchtet werden muss, dass sie die relativ langsam expandierenden HSC überwachsen. Dennoch sind vermutlich für die Unterstützung von HSC ausreichende Lebendzellzahlen auch nach 7 Tagen Kultur vorhanden. Es ist nicht notwendig, dem Medium weitere Glukose hinzuzufügen, da der Verbrauch durch die potenziellen Feederzellen gering ist. Dagegen ist die Glutaminkonzentration schon im unverbrauchten Medium chargenabhängig sehr gering,

weshalb sicherheitshalber bei den Kokulturversuchen weiteres Glutamin dem Medium frisch zugesetzt wurde, um eine Depletion zu verhindern. Die durch die Feederzellen hervorgerufene Laktatakkumulation ist als unkritisch zu betrachten. Durch das im Medium akkumulierte Glutamat könnte eventuell eine geringe Inhibition der HSC-Proliferation hervorgerufen werden, eine starke Wachstumsinhibierung ist aber nicht zu befürchten. Um weitere inhibitorische Effekte zu verhindern, könnte es sinnvoll sein, zusätzlich auch die Konzentration von Ammonium zu überprüfen, das beim Verbrauch von Glutamin entsteht (Schneider M. *et al.*, 1996).

5.3 Kokultur von HSC mit potenziellen Feederzellen

5.3.1 MSC als Feederzellen – Zellzahlverhältnis HSC:Feederzellen

MSC wurden bereits mehrfach in der Literatur als Feederzellen für die Kokultur mit HSC verwendet, wofür jedoch meistens in einer Vorkultur bereits konfluent gewachsene MSC eingesetzt wurden (Cheng L. *et al.*, 2000, Yamaguchi M. *et al.*, 2001, Kadereit S. *et al.*, 2002). Dafür war frühzeitiges Aussäen der MSC nötig. Für eine klinische Anwendung ist das ungünstig, weil dadurch der Zeitpunkt der Transplantation der expandierten HSC nicht genau im Voraus planbar ist. Daher wurde in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten mit Feederzellen gearbeitet, die erst einen Tag vor dem Start der Kokultur ausgesät wurden. Dies verkürzt die Abläufe und vereinfacht den klinischen Einsatz der Methode.

Mit MSC als Feederzellen wurde untersucht, welches Zellzahlverhältnis für die Kokultur mit HSC günstiger ist. Dafür wurden mit 1:10 und 1:20 HSC:MSC zwei relativ niedrige Zelldichten der Feederzellen gewählt, wodurch die Gesamtzahl der notwendigen Feederzellen verringert wird. Auch dies ist ein Vorteil für den klinischen Einsatz. Die Expansion der MNC und CFC aus den ausgesäten CD34-positiven Zellen war bei beiden Zellzahlverhältnissen signifikant höher als in einer parallel durchgeführten isolierten

Suspensionskultur. Die Expansionsfaktoren lagen bei 18- bis 28-fach für MNC und 26- bis 63-fach für CFC. Das ist höher als in der Literatur für die Expansion von MNC aus Nabelschnurblut beschriebene Werte: so zeigten etwa Kadereit S. *et al.*, 2002, eine 4,6-fache MNC-Expansion nach 12tägiger Kokultur mit MSC in FCS-haltigem Medium. Allerdings belegten die Autoren dieser Studie auch, dass bei geringerer Gesamtexpansion der MNC die Expansion der LTC-IC höher war, d.h. der frühere Vorläuferzellstatus der Zellen besser erhalten wurde, wenn die Gesamtexpansionsrate niedriger war. Daher ist es wichtig, in Folgeversuchen abzuklären, ob durch die Kultur der Vorläuferstatus wenigstens eines Teils der verwendeten CD34-positiven Zellen so erhalten wird, dass sie zur Rekonstituierung des hämatopoetischen Systems in einem Transplantatempfänger ausreichen. Die gute Expansion der CFC ist zwar bereits ein Hinweis, dass auch die Vorläuferzellen von MSC unterstützt werden, beweist jedoch nicht die Expansion wirklicher Stammzellen. Eine andere Studie (Yamaguchi M. *et al.*, 2001) konnte dagegen nach 14tägiger Kokultur von HSC mit stromalen Zellen aus dem Knochenmark in serumfreiem Medium 224-fache Expansion der MNC und 140-fache Expansion der CFC erreichen. Die im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit erzielten höheren Expansionsfaktoren lassen sich dabei vermutlich auf die deutlich längere Kulturdauer zurückführen, die Zeit für mehr Zellteilungen lässt. Eventuell könnte sich also durch eine verlängerte Kokulturdauer die Expansion verbessern lassen, allerdings bringt dies wiederum eine erhöhte Gefährdung sowohl im Bezug auf den Verlust des Stammzellstatus als auch auf die mögliche Entartung der Zellen mit sich.

Zwischen den beiden hier untersuchten Zellzahlverhältnissen 1:10 und 1:20 waren keine großen Unterschiede zu beobachten. Daher können beide Zellzahlverhältnisse als geeignet für die Kokultur angesehen werden. In den anschließenden komparativen Kokultorexperimenten wurde deswegen ein Zellzahlverhältnis von 1:20 eingesetzt.

5.3.2 Direkter Vergleich aller potenziellen Feederzellen

In den komparativen Kokulturrexperimenten sollte ermittelt werden, welche der potenziellen Feederzellen die Expansion von HSC am besten unterstützt. Hierbei wurde im Hinblick auf den klinischen Einsatz der Methode noch mehr auf Planbarkeit der Kokultur geachtet und daher auch die Feederzellen erst direkt vor der Kokultur aufgetaut, wie mit HSC auch in den früheren Versuchen bereits praktiziert. Alle potenziellen Feederzellen zeigten beim Auftauen eine hohe Viabilität. Die Vorkulturdauer (Feederzellen ohne HSC) betrug auch hier einen Tag, damit die Feederzellen Zeit hatten, an den Boden der Kulturgefäße zu adhären. Dafür wurden sie in ihrem normalen Kulturmedium ausgesät, um gute Anheftung zu gewährleisten. Trotz der geringen Aussaatdichte wuchsen alle potenziellen Feederzellen gut auf den Zellkulturgefäßen an und blieben auch nach dem Wechsel auf serumfreies zytokinsupplementiertes HSC-Medium dort haften. Diese Ergebnisse zeigen, dass es ohne Probleme möglich ist, jeden der getesteten Feederzelltypen für die Kokultur mit HSC kryokonserviert bereitzuhalten und den Beginn der Kokulturexpansion abgestimmt auf die Therapie des Patienten zu wählen. Da in den Vorexperimenten mit MSC beide untersuchten Zellzahlverhältnisse (1:10 und 1:20) ähnliche Ergebnisse erbrachten, wurde für die komparativen Kokulturrexperimente das Zellzahlverhältnis 1:20 (HSC:Feederzellen) ausgewählt. Dies erfordert zwar eine höhere Anzahl Feederzellen, diese wurden aber anders als in den Vorexperimenten frisch aufgetaut eingesetzt. Durch die höhere Aussaatdichte soll eine größere Sicherheit für das Anwachsen der Zellen erzielt werden, um zu vermeiden, dass beim klinischen Einsatz die Kultivierung misslingt.

Problematisch bleibt die Tatsache, dass für die Vorkulturen noch immer serumhaltiges Kulturmedium verwendet werden musste. Stellt man jedoch ausreichend für die Adhäsion der Feederzellen benötigte Faktoren zur Verfügung, wäre es eventuell möglich, auf das serumhaltige Medium zu verzichten. Beispielsweise könnte die Beschichtung der Zellkulturgefäße hilfreich sein. Um die geeigneten Beschichtungsmaterialien auszuwählen, muss zunächst untersucht werden, welche Faktoren die verschiedenen Feederzellen für ihre

Anheftung benötigen. Bis jetzt wurde noch keine Möglichkeit zur komplett serumfreien Kultur von HSC mit Feederzellen publiziert. Selbst wenn die Kokultur selbst serumfrei durchgeführt wurde, war dem eine Vorkultur der Feederzellen in serumhaltigem Medium vorangegangen (Yamaguchi M. *et al.*, 2001).

Da in Vorversuchen gezeigt worden war, dass bei der im Medium enthaltenen Glutaminkonzentration eine Depletion dieses Nährstoffes auftritt (s. 4.2.3), wurden dem HSC-Medium für die komparativen Kokulturversuche weitere 4 mM Glutamin hinzugefügt. Bei diesem Glutamingehalt war auch am Ende der Kultur noch ausreichend Glutamin im Kulturüberstand enthalten, um eine ausreichende Versorgung aller enthaltenen Zellen über den gesamten Kulturzeitraum zu garantieren. Auch der Glukosegehalt des Mediums war zum Ende der Kultur noch sehr hoch, so dass auch hier keine Unterversorgung auftreten kann. Die Laktatkonzentration im Kulturüberstand war nach 7 Tagen bei allen primären Feederzellen niedriger als bei SI/SI mod, lag jedoch selbst bei diesen noch unter den bei Patel S. D. *et al.*, 2000, als kritisch für das Wachstum von PBMC beschriebenen Werten ab ca. 20 mM (s. 5.2.3). Auch die Glutamatkonzentration lag mit Werten zwischen 0,7 und 0,9 mM zu Kulturende deutlich unter der von Lombardi G. *et al.*, 2004, als wachstumshemmend definierten Konzentration von 2 mM.

Die Expansion von MNC lag mit einem Faktor zwischen 20 und 60 bei allen untersuchten Feederzelltypen innerhalb eines Experimentes jeweils ähnlich hoch, ebenso die Expansion von CFC (Faktor 20 – 40). Für MNC konnte auch mit den als Positivkontrolle verwendeten SI/SI mod keine höhere Expansion erzielt werden, für CFC war die Expansion bei den auf SI/SI mod als Feeder kultivierten Zellen etwas höher als bei den HSC, die auf primären Feederzellen ausgesät worden waren. Auch für die Expansion von CAFC zeigten alle potenziellen primären Feederzellen mindestens ähnlich gute Unterstützung wie SI/SI mod. Die Expansionsfaktoren liegen hier zwischen 13 und 54. Hervorzuheben ist hierbei die besonders gute Unterstützung der CAFC-Expansion durch MSC bzw. WJC je eines

Spenders. Die Variabilität zwischen Feederzellen von verschiedenen Spendern könnte also bei der Unterstützung der HSC-Expansion eine Rolle spielen. Die molekularen Ursachen hierfür könnten in weitergehenden Versuchen untersucht werden, um das System weiter zu optimieren. Da aber trotzdem alle eingesetzten Feederzellen der unterschiedlichen Spender die Expansion aus CD34-positiven Zellen so gut unterstützten wie die als Positivkontrolle verwendeten SI/SI mod, ist diese Klärung für die klinische Anwendung nicht zwingend erforderlich. Die Expansionsfaktoren sowohl der CFC als auch der CAFC übertreffen die für CD34-positive Zellen im klinischen Maßstab gewünschte 12- bis 18-fache Expansion. Da CFC und CAFC in geringeren Prozentsätzen auftreten als CD34-positive Zellen (s. 2.4), sollte die im in der vorliegenden Arbeit getesteten System erzielte Expansion ausreichen.

Die Expansionsraten sind höher als in Literaturdaten angegeben, so konnten Kadereit S. *et al.*, 2002, mit MSC als Feederzellen in 12 Tagen Kokultur lediglich eine Expansion der MNC um Faktor 4,6 erreichen, wie bereits oben diskutiert wurde. LTC-IC wurden im derselben Studie um Faktor 7,7 vermehrt. Die geringere Expansion der LTC-IC im Vergleich zur in der vorliegenden Arbeit für CAFC erreichte Expansionsfaktoren könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, dass CAFC nicht gleichwertig zu LTC-IC sind, sondern eine etwas weniger primitive Population darstellen (Denning-Kendall P. *et al.*, 2003-1).

In einer anderen Studie (Jazwiec B. *et al.*, 1998) wurden mit HUVEC als Feederzellen in direkter, siebentägiger Kokultur Expansionsraten von ca. 10-fach sowohl für MNC als auch für CFU-GM erzielt. Wurden zuvor immortalisierte HUVEC mit retroviralen Vektoren, die die kodierenden Sequenzen für die Zytokine TPO, Flt3Ligand und SCF enthielten, transfiziert und dann für die Kokultur mit HSC (CD34-positive Zellen aus mobilisiertem peripherem Blut) verwendet, expandierten die MNC in 2 – 3 Wochen mehr als 100-fach, CFU-GM 25-fach und CAFC 2,2 – 5,5-fach (Feugier P. *et al.*, 2002). Damit konnten die Autoren zwar für MNC eine stärkere Expansion erreichen als die im in der vorliegenden Arbeit verwendeten System erzielten. Die Expansion der CAFC war dagegen niedriger.

Das in den zitierten Studien für die Expansion von HSC eingesetzte Medium enthielt allerdings neben FCS auch andere Zytokinkombinationen und -konzentrationen als das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete HSC-Medium. Zieht man das Medium und die längere Kulturdauer in Betracht, ist das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Kokultursystem überlegen: Obwohl das Medium kein Serum enthält und die Kulturdauer kürzer ist, sind die Expansionsraten höher bzw. auch bei deutlich kürzerer Kulturdauer nur geringfügig niedriger.

Eine Untersuchung der Kokulturexpansion von HSC auf mesenchymalen Progenitorzellen aus der Plazenta verwendete serumfreies Medium (MyeloCult H5 1000, Stem Cell Technologies), dem die drei Zytokine SCF, Flt3Ligand und TPO zugesetzt wurden (Zhang Y. *et al.*, 2004). In diesem System wurde in 12-tägiger Kokultur eine Expansion der MNC um Faktor 106, der CFC um Faktor 37 und der LTC-IC um Faktor 7,4 erreicht. Von den Autoren als Vergleich im selben Medium als Feederzellen eingesetzte mesenchymale Vorläuferzellen aus Knochenmark erzielten Expansionsfaktoren aus HSC von 65 (MNC), 22 (CFC) und 4,6 (LTC-IC) und waren damit den Zellen aus der Plazenta unterlegen. In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kokultursystem waren zwar die Expansionsfaktoren der MNC etwas geringer als in der Studie von Zhang Y. *et al.*, 2004, die Expansion der CFC jedoch trotz der geringeren Kulturdauer ähnlich hoch und die der CAFC sogar höher als die der LTC-IC in dieser Untersuchung.

Somit weisen alle verwendeten Primärzelltypen ähnlich hohes Potenzial für die Unterstützung der HSC-Expansion auf, und ihr Einsatz in einem für klinische Bedürfnisse angepassten System ist möglich. Die so erzielten Expansionsfaktoren der CFC und CAFC sind ausreichend für den klinischen Maßstab und übertreffen die für frühere *in vitro*-Untersuchungen anderer Autoren publizierten Werte.

5.4 Abschließende Beurteilung und Ausblick

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Kokultur von HSC mit den drei potenziellen Feederzelltypen kann jeder dieser Zelltypen als geeignet für die *ex-vivo*-Expansion von HSC angesehen werden. Alle zeigen ähnlich gute Unterstützung der HSC, wobei die besonders gute Unterstützung der CAFC-Expansion durch je einen Spender von MSC und WJC hervorzuheben ist. Trotzdem ist die Möglichkeit ihres Einsatzes in der Klinik unterschiedlich zu beurteilen. Beispielsweise trat bei HUVEC das Problem auf, dass diese Zellen nicht aus jeder Nabelschnurspende gewonnen werden konnten. Dies stellt ein Hindernis für die klinische Verwendung dieser Zellen als zu HSC aus Nabelschnurblut autologen Feederzellen dar, denn HUVEC würden vermutlich nicht zu jeder HSC-Spende autolog zur Verfügung stehen. Ähnliche Schwierigkeiten ergeben sich für MSC: Auch diese wären vermutlich nur in Ausnahmefällen autolog zu den HSC verfügbar, aber möglicherweise aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften sogar dann verwendbar, wenn HLA-Typ von Spender und Empfänger nicht oder nicht genau übereinstimmen. WJC dagegen könnten von jedem Nabelschnurblutspender autolog zum Blut gewonnen werden. Ihre Präparation ist weniger aufwändig und besser automatisierbar als die von HUVEC. In ihren sonstigen Eigenschaften zeigen die potenziellen Feederzellen wenige Unterschiede und sind gut unter den für die Kokultur in der Klinik notwendigen Bedingungen einzusetzen. Für die weitere Entwicklung des Kokultursystems sollten daher zunächst WJC herangezogen werden, da diese aufgrund ihrer einfachen und zuverlässigen Gewinnung autolog zum Nabelschnurblut als die am besten geeigneten Feederzellen erscheinen. Sowohl MSC als auch HUVEC stellen jedoch gute Alternativen dar, so dass im Einzelfall der jeweils verfügbare Feederzelltyp eingesetzt werden könnte.

Vor dem Einsatz des hier getesteten Kokultursystems in der Klinik müssten noch einige Entwicklungsschritte erfolgen, z.B. sollte eine Möglichkeit zur Aussaat der Feederzellen in einem Medium gefunden werden, das frei von tierischen Bestandteilen ist. Dies könnte

vielleicht auch durch die Beschichtung der Kulturgefäße erreicht werden. Weitere Experimente könnten klären, ob sich die Expansion der HSC verbessert, wenn nicht nur einer der untersuchten Feederzelltypen eingesetzt wird, sondern eine Mischung aus den verschiedenen Feederzellen. Im Knochenmark, wo die HSC im Körper lokalisiert sind, befinden sich auch unterschiedliche Zelltypen in ihrer Umgebung, die durch ihre Produktion von Wachstumsfaktoren und Molekülen der extrazellulären Matrix zur Erhaltung und Regulation der HSC beitragen (Dorshkind K., 1990). Bei einer simultanen Verwendung mehrerer Feederzelltypen könnten sich somit Synergieeffekte ergeben, da die natürliche Umgebung der HSC präziser nachgebildet würde. Allerdings würde ein solch komplexer Aufbau Schwierigkeiten beim klinischen Einsatz mit sich bringen. Er könnte jedoch ein nützliches Modell für die Erforschung der Wechselwirkungen zwischen HSC und den sie umgebenden Zellen in der Stammzellnische bieten, eventuell auch im Hinblick auf die Evaluierung neuer Pharmazeutika.

Da für WJC gezeigt werden konnte, dass sich auf einfache Weise in kurzer Zeit hohe Zellzahlen generieren lassen, sollte überlegt werden, diese Zellen nicht nur für die Kokultur mit HSC, sondern auch für andere Ansätze der Zelltherapie nutzbar zu machen. Möglich wäre etwa ihr Einsatz im Tissue Engineering für die Reparatur von Herzscheidewanddefekten, wie sie häufig bei Neugeborenen vorkommen. Da solche Defekte schon pränatal diagnostiziert werden können, könnten die Zellen nach der Geburt des Kindes gewonnen und nach kurzer Kultivierungsdauer autolog eingesetzt werden. Eine andere Verwendung könnte die Regenerierung von Muskelgewebe z.B. im Herzmuskel nach Infarkten sein: Da WJC aufgrund ihrer Herkunft Myofibroblasten sein könnten, die sich auf dem Differenzierungsweg zu glatten Muskelzellen befinden, läge diese Möglichkeit nahe. Nicht nur in der klinischen Anwendung, sondern auch in der Grundlagenforschung könnten diese Zellen nützlich sein, da sie aufgrund ihres Ursprungsgewebes vermutlich einen recht primitiven Zelltyp darstellen. Hierfür müsste jedoch zunächst die Klärung der genauen Herkunft sowie die Zuordnung der WJC zu einem definierten Zelltyp erfolgen.

Genexpressionsanalysen könnten Aufschluss darüber geben, sowohl anhand der gefundenen, möglicherweise zelltypspezifischen Expressionsmuster als auch im Vergleich mit der Genexpression in den als Ursprung in Frage kommenden Geweben der Nabelschnur.

6 Danke ...

... an alle, die diese Arbeit ermöglicht und mir auf vielerlei Weise geholfen haben:

- ☺ Prof. Dr. Wandrey für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des guten Arbeitsklimas am IBT-2
- ☺ Prof. Dr. Herzog für die Übernahme des Erstreferates und das große Interesse an meiner Arbeit
- ☺ Prof. Dr. Jahnen-Dechent für die Übernahme des Koreferates
- ☺ Prof. Dr. Schnabl für ihre Bereitschaft, als Prüferin zur Verfügung zu stehen

- ☺ allen Zellys am IBT-2, besonders ...
 - ✦ Dr. Thomas Noll für die spannende Aufgabenstellung und die tolle Betreuung
 - ✦ Nadine Körfer für 10^x passagierte Zellen, FACS-Färbungen, gemeinsame Nabelschnurpräps und vor allem die vielen Last-Minute-Experimente
 - ✦ Heike Partenheimer für den unermüdlichen Einsatz im Rahmen ihres Praxissemesters und ihrer Diplomarbeit
 - ✦ Bianca Klein für Bestzeiten beim Nabelschnurblut-Aufreinigen und sonstige Hilfe im Labor
 - ✦ Ralf Herbold für die Unterstützung bei der Etablierung der HUVEC-Präparation
 - ✦ Dr. Hermann Bohnenkamp für die Beratung bei den Immunstimulationsexperimenten
 - ✦ meinem persönlichen Satzbau-Coach Christiane Wiendahl und meinen anderen fleißigen Korrekturlesern Lars, Thomas, Nadine & Bianca
 - ✦ allen aktuellen und ehemaligen Kollegen (ohne Namensnennung, damit ich niemanden vergessen kann!) für das nette Arbeitsklima, jegliche Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors und viele, viele unterhaltsame und hilfreiche Gespräche über mehr und weniger arbeitsassoziierte Themen!

- ☺ den Teams der Entbindungsstationen der Krankenhäuser Jülich, Frechen, Mönchengladbach und Aachen für die Versorgung mit Nabelschnüren und Nabelschnurblutproben
- ☺ Dr. Claudia Lange und Prof. Dr. Zander (Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf) für das Zurverfügungstellen des Knochenmarks, die Differenzierungsassays und sonstige Tipps zu MSC
- ☺ Dr. Bernd Denecke und Beate Kratz (RWTH Aachen) für Know-How zur MSC-Differenzierung und die aktuell noch laufenden Chip-Experimente
- ☺ Dr. Michael Lietz (RWTH Aachen) für die SMC
- ☺ allen anderen Kooperationspartnern: Hans-Peter Bochem (ISG, FZ Jülich), Dr. Bodo Borm und Nils Hersch (ISG-4, FZ Jülich), Dr. Markus Eblenkamp, Stephanie Potthoff und Josef Hintermair (ZIMT München), Dr. Ellen van Leeuwen (Academic Ziekenhuis Maastricht)

- ... und nicht zu vergessen:
 - ☺ meinem „Zoo“ (Goldstück, Tardé, Baghira & Paula) für den Stressabbau, die Aufheiterung – und viele Gesprächsthemen
 - ☺ last, but not least meiner Familie – Lars Steinmüller, Edith & Wolfgang, Melanie, Elisabeth und Nikolas Magin: weil ihr alles mit mir teilt und immer für mich da seid

7 Anhänge

7.1 Publikationen

Aus der vorliegenden Arbeit sind bisher folgende Publikationen entstanden:

Posterbeiträge auf Konferenzen

- Magin A., Partenheimer H., Lange C., Lietz M. & Noll T. (2004): Surface Marker Profiling of WJC, MSC, SMC & HUVEC; Poster auf der Herbsttagung der GBM, Münster, 19. – 22. September 2004
- Magin A. & Noll T. (2004): Feasibility of the Use of HUVEC for Autologous Co-Culture Expansion of HSC from Umbilical Cord Blood; Poster auf der Herbsttagung der GBM, Münster, 19. – 22. September 2004
- Magin A., Partenheimer H., Lange C., Zander A. & Noll T. (2004): Primary Cells or Murine Stromal Cell Lines: Searching for Suitable Feeder Cells for Co-Culture with Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells; Poster auf dem 33. Annual Scientific Meeting der International Society for Experimental Hematology, New Orleans, 17. – 20. Juli 2004
- Magin A., Partenheimer H., Lange C. & Noll T. (2004): MSC, HUVEC or Murine Stromal Cell Lines? – Searching for Suitable Feeder Cells for Co-Culture with Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells; Poster auf dem 2. International Meeting of the Stem Cell Network NRW, Bonn, 1. – 2. April 2004

Vorträge auf Konferenzen

- Magin A., Partenheimer H., Lange C., Lietz M., Zander A. & Noll T. (2004): Primary Cells as Feeder Cells for HSC; Vortrag auf der Klausurtagung des Stammzellnetzwerks NRW, 19. – 20. November 2004
- Magin A., Partenheimer H., Lange C. & Noll T. (2004): MSC from Bone Marrow as Feeder Cells for Co-Culture with HSC – Evaluation of Parameters and First Co-Culture Results; Vortrag auf dem Cell Systems® MSC-Symposium, Köln, 28. Juni 2004
- Magin A., Fischbach T. & Noll T. (2002): Characterisation of Mesenchymal Progenitor Cells in Umbilical Cord Blood; Vortrag & Poster auf der 4. Nachwuchswissenschaftlertagung der DGZ, Jena, 26. – 28. September 2002

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften (in Vorbereitung):

- Magin A., Denecke B., Jahnen-Dechent W., Lange C., Zander A., Lietz M., Partenheimer H., van Leeuwen E., Noll T.: Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord for Cell Therapy
- Magin A., Körfer N., Partenheimer H., Lange C., Zander A., Noll T.: Primary Cells as Feeder Cells for Co-Culture with Human Hematopoietic Stem Cells from Umbilical Cord Blood – a Comparative Study

7.2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AB-Serum	humanes Blutserum von Spendern der Blutgruppe AB
ASC	adult stem cells
ATCC	American Type Culture Collection (Zellbank)
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
bFGF	basic fibroblast growth factor
BFU-E	burst-forming unit-erythrocyte
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CAFC	cobblestone-area forming cells
CB	Nabelschnurblut (umbilical cord blood)
CB-MSC	MSC aus Nabelschnurblut
CD	cluster of differentiation
CFC	colony-forming cells
CFU-F	colony-forming unit fibroblast
CFU-G	colony-forming unit-granulocyte
CFU-GEMM	colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, monocyte & macrophage
CFU-GM	colony-forming unit-granulocyte & macrophage
CFU-M	colony-forming unit-macrophage
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CRU	competitive repopulating units
d. 0 bzw. 7	Kulturtag 0 (Starttag) bzw. 7 (Erntetag)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMEM-HG	Dulbecco's modified Eagle medium, high glucose
DMSO	Dimethylsulfoxid
e ⁻	Elektron
ECGM	endothelial cell growth medium
EGF	epidermal growth factor
ESC	embryonic stem cells
FACS	fluorescence activated cell sorting/scanning
FcR-Blocking-Reagenz	Fc-Rezeptor-blockendes Reagenz
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Flt3L	fms-like tyrosine kinase-3 ligand
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G418	Geneticin (Antibiotikum, Selektionsmarker)
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
GVHD	graft-versus-host disease
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HLA	human leukocyte antigen
HS	horse serum
HSA	humanes Serumalbumin
HSC	hematopoietic stem cell
HUVEC	human umbilical cord vein endothelial cells
IFN _γ	Interferon γ

IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
LTC (-IC)	long-term culture (initiating cells)
M2-10B4 mod	murine stromale Zelllinie, s. 3.3.2
MACS	magnetic activated cell sorting
MCDB-201	chick fibroblast basal medium
MGDF	megakaryocyte-growth & differentiation factor
MHC-I bzw. II	major histocompatibility complex I bzw. II
min	Minute
mL	Milliliter
MNC	mononuclear cells
MSC	mesenchymal stem cell
NETCORD	Dachorganisation US-amerikanischer öffentlicher Nabelschnurblutbanken
NH ₃	Ammoniak
NOD/SCID	non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency
O ₂	Sauerstoff
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PDGF-BB	Homodimer der b-Kette des platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cy5 (bei BD Biosciences früher als CyChrome bezeichnet)
SCF	stem cell factor
SCT	Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Kanada
SDF-1	stromal cell derived factor 1
SI/SI mod	murine stromale Zelllinie, s. 3.3.2
SV40	simian virus-40
TNF α	tumor necrosis factor α
TPO	Thrombopoietin
U	Unit (Enzym- bzw. Zytokinaktivität)
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrandt-Faktor
WJC	Wharton's jelly cells
ZKRD	Zentrales Knochenmarkspender-Register Deutschland
α -MEM	α -minimal essential medium

7.3 CD-Antigene: Alternativnamen, Funktion & zelluläre Expression

Name	alternativer Name	Funktion	Expression auf
CD3	T3	T-Zell-Rezeptor-assoziertes Molekül	T-Zellen
CD4	MHC-II-receptor	Korezeptormolekül	T-Zellen, Makrophagen, Monozyten
CD8	MHC-I-receptor	Korezeptormolekül	T-Zellen, NK-Zellen
CD11b	Integrin α M	Adhäsionsmolekül	u.a. Granulozyten
CD14	LPS-receptor	Endotoxin-Rezeptor	Makrophagen, Monozyten, Granulozyten
CD16	Fc γ RIIIa	IgG-Rezeptor (niedrige Affinität)	u.a. NK-Zellen, Granulozyten
CD25	IL2R α	IL2-Rezeptor (α -Kette)	B-Zellen, NK-Zellen, aktivierte T-Zellen
CD31	PECAM-1	Adhäsionsmolekül (Rolle bei der Adhäsion von Blutplättchen an Endothelzellen)	u.a. Endothelzellen, Blutplättchen
CD34	gp105-120	vermutlich Adhäsionsmolekül	HSC
CD38	ADP-ribosyl-cyclase	Rolle bei der Regulation von Aktivierung und Proliferation	T- und B- und NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen
CD41a	α IIb integrin chain	Rolle bei der Aggregation von Blutplättchen	Blutplättchen
CD45	leucocyte-common antigen	Tyrosinphosphatase	breites Spektrum von Leukozyten
CD54	intercellular adhesion molecule 1	Adhäsionsmolekül	Fibroblasten, Endothelzellen
CD69	activation inducer molecule	an T-Zell-Aktivierung beteiligt	u.a. aktivierte T-Zellen
CD71	transferrin receptor	Rolle bei der Eisenaufnahme in die Zelle	alle proliferierenden Zellen, Erythrozyten

Name	alternativer Name	Funktion	Expression auf
CD80	B7	Koregulator der T-Zell-Aktivierung	Dendriten, aktivierte T- und B-Zellen
CD90	Thy-1	bislang ungeklärt	Fibroblasten, MSC, Endothelzellen
CD95	Fas	Mediator von apoptose-induzierenden Signalen	T-, B- und NK-Zellen, Granulozyten
CD105	endoglin	regulatorische Komponente des TGFβ-Rezeptorkomplexes	Endothelzellen, MSC
CD106	vascular cell adhesion molecule 1	Leukozytenadhäsion	aktivierte Endothelzellen
CD114	G-CSF receptor	Rezeptor für G-CSF	Granulozyten, Endothelzellen, Zellen aus Trophoblast & Plazenta
CD117	SCF receptor	Rezeptor für SCF	HSC
CD123	IL3-Rα	Rezeptor für IL-3	HSC, Dendriten, Endothelzellen
CD144	vascular endothelial cadherin	Adhäsionsmolekül für endotheliale Zell-Zell-Verbindungen	Endothelzellen
CD166	activated leukocyte cell adhesion molecule	Adhäsionsmolekül	MSC, Endothel- und Epithelzellen, aktivierte Makrophagen
CD184	SDF-1 receptor, CXCR4	Rezeptor für SDF-1, beteiligt am HSC-Homing	Endothelzellen, breites Spektrum von Leukozyten
MHC-I	class 1 histocompatibility antigen	Rolle bei der Erkennung körpereigener/ körperfremder Zellen bzw. Moleküle	alle somatischen Zellen
MHC-II	class 2 histocompatibility antigen	Rolle bei der Erkennung körpereigener/ körperfremder Zellen bzw. Moleküle	u.a. Dendriten, Monozyten

(Informationen z.T. entnommen aus: Official Poster of the 7th International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, BD Biosciences)

7.4 Geräte, Materialien und Lösungen

7.4.1 Geräte

Gerät	Firma, Ort
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
CASY	Schärfe Systems, Reutlingen
Cyber-Shot 4,1 Megapixel Digitalkamera	Sony, Köln
EBIO compact (Glukosemeßgerät)	Eppendorf, Hamburg
Einfrierhilfe	Nalge Nunc, Wiesbaden
FACSCalibur mit Programm CellQuest	BD Biosciences, Heidelberg
Gammacell 40 Bestrahlungsanlage	Gammaster B. V., Ede, NL
Glutamin-/Glutamat-Analysator	YSI, Yellow Springs, USA
Laktat-Analysator	YSI, Yellow Springs, USA
Magnetic Cell Separator, VarioMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop DMIL	Leica, Solms
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wiesbaden
Petrischalen (Durchmesser 15 cm)	VWR, Darmstadt
Stereolupe SMZ-2T	Nikon, Düsseldorf
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Tischzentrifugen	Heraeus Instruments, Hanau bzw. Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
ViCell XR	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld

7.4.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma, Ort
Einwegpipetten (5, 10, 20 und 50 mL Volumen)	Nalge Nunc, Wiesbaden
Einwegspritzen mit Luer-Lock-Gewinde (Volumen 10 mL)	B Braun, Melsungen
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Kabelbinder	Haupa, Remscheid
Kryoröhrchen	Nalge Nunc, Wiesbaden
LeucoSep-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Luer-Lock-Adapter (w/w) und -Stopper	B Braun, Melsungen
MACS-Säulen (MSplus und LSplus) und – auffangröhrchen	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Nabelschnurblutbeutel	MacoPharma, Langen
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (15 mL, 50 mL)	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Siebe für MACS-Säulen	3 M, Neuss über Miltenyi, Bergisch Gladbach
Skalpelle mit gerader Klinge	B Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen (Fläche 25, 75 oder 175 cm ²)	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur-Multiwellplatten mit 12 Vertiefungen	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkultur-Multiwellplatten mit 24 bzw. 96 Vertiefungen	Nalge Nunc, Wiesbaden
Zellkultur-Multiwellplatten mit 6 bzw. 48 Vertiefungen	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur-Petrischalen (Durchmesser 3,5 bzw. 9,7 cm)	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur-Schrägröhrchen (Fläche 10 cm ²)	TPP, Trasadingen, CH, über Biochrom, Berlin

7.4.3 Laborchemikalien, Medien etc.

Chemikalie/Lösung	Hersteller, Ort
Aim-V	Life Technologies, Karlsruhe
Biseko	Biotest Pharma, Dreieich
CASYton	Schärfe Systems, Reutlingen
Cytofix/Cytoperm, PermWash	BD Biosciences, Heidelberg
Zytokine (SCF, IL-3, TPO, Flt3Ligand)	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
DMEM low glucose	Cambrex, Verviers, B bzw. Biochrom, Berlin
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ECGM und Supplements	PromoCell, Heidelberg
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
FACSflow	BD Biosciences, Heidelberg
FCS	Cambrex, Verviers, B, bzw. Life Technologies, Karlsruhe, bzw. Biochrom, Berlin
Ficoll	Biochrom, Berlin
G 418 (Geneticin)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Giensa Gebrauchslösung	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
HL-1	Cambrex, Verviers, B
HS	Life Technologies, Karlsruhe
HSA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Hygromycin B	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
IMDM	Life Technologies, Karlsruhe, bzw. Biochrom, Berlin
Isopropanol	Merck, Darmstadt, über KMF Laborchemikalien, Sankt Augustin
KCl	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Liquemin® N 5000 (Heparin)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Macrophage-SFM	Life Technologies, Karlsruhe
MACS-Reagenzien (FcR-Blocking Reagenz, CD34-Microbeads)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MethoCult GF H4434	Stem Cell Technologies, Vancouver, CAN, über Cell Systems, St. Katharinen
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Phytohämagglutinin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ProCHO4	Cambrex, Verviers, B
Reagent Pack für ViCell XR	Beckman Coulter, Krefeld
SCGM	CellGenix, Freiburg
StemLine	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
StemPro-34 SFM	Life Technologies, Karlsruhe
TB-1	PromoCell, Heidelberg
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Trypsin	Life Technologies, Karlsruhe, bzw. Biochrom, Berlin
X-Vivo 10, 15 & 20	Cambrex, Verviers, B

7.4.4 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
FACSfix-Gebrauchslösung	1 Teil FACSfix-Stammlösung 3 Teile PBS
FACSfix-Stammlösung	2 % Paraformaldehyd in PBS
HSA-MACS-Puffer	PBS 10 % HSA (0,5 %ige Lösung in PBS) 1 % EDTA (200 mM Lösung in PBS)
PBS	10fach-Konzentrat: 80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ in 800 mL H ₂ O dest. lösen, pH-Wert auf 7,2 bis 7,4 einstellen, auf 1 L auffüllen 1fach-Gebrauchslösung: 1 Teil 10fach-Konzentrat 9 Teile H ₂ O dest.
Staining Buffer	PBS 1 % FCS 0,09 % w/v Natriumazid

7.4.5 Antikörper

Antigen	Firma	Klon	Fluorochrom
Isotypkontrollen			
IgG1κ	BD Biosciences	MOPC-21	ohne
IgG1κ	BD Biosciences	MOPC-21	FITC
IgG1κ	BD Biosciences	MOPC-21	PE
IgG1κ	BD Biosciences	MOPC-21	PE-Cy5
Antikörper gegen Oberflächenantigene			
CD3	BD Biosciences	UCHT-1	PE-Cy5
CD4	BD Biosciences	RPA-T4	FITC
CD8	BD Biosciences	RPA-T8	PE
CD11b	BD Biosciences	ICRF44	PE
CD14	BD Biosciences	M5E2	PE
CD16	BD Biosciences	3G8	PE-Cy5
CD31	BD Biosciences	WM59	PE
CD34	BD Biosciences	581	FITC
CD34	BD Biosciences	581	PE
CD38	BD Biosciences	HIT2	PE-Cy5
CD40	BD Biosciences	5C3	FITC
CD41a	BD Biosciences	HIP8	PE
CD45	BD Biosciences	HI30	PE
CD54	BD Biosciences	HA58	PE
CD69	BD Biosciences	FN50	PE
CD71	BD Biosciences	M-A712	FITC
CD80	BD Biosciences	BB1	FITC
CD90	BD Biosciences	5E10	PE-Cy5
CD95	BD Biosciences	DX2	FITC
CD105	Alexis	SN6/N1-3A1	FITC
CD106	BD Biosciences	51-10C9	FITC
CD114	BD Biosciences	LMM741	PE
CD117	BD Biosciences	YB5.B8	PE
CD123	BD Biosciences	9F5	PE
CD144	Beckman Coulter	TEA 1/31	PE
CD166	BD Biosciences	3A6	PE
CCR7	BD Biosciences	3D12	PE
CXCR4 = CD184	BD Biosciences	12G5	PE-Cy5
HLA-A,B,C	BD Biosciences	G46-2.6	FITC
HLA-A2	BD Biosciences	BB7.2	FITC
HLA-DR	BD Biosciences	G46-6 (L243)	FITC

7.4.6 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

In diesem Verzeichnis sind alle in der vorliegenden Arbeit enthaltene Abbildungen und Tabellen aufgeführt. Aus den Buchstaben in den Namen der Abbildungen/Tabellen ist ersichtlich, in welchem Abschnitt der Arbeit sie sich jeweils befinden. Dabei steht T für „Einleitung und Theorie“, M für „Material und Methoden“ und E für „Ergebnisse“. Die Nummerierung der Abbildungen/Tabellen erfolgt für jeden Abschnitt der Arbeit separat.

Abbildungen

Abbildung T-1: Hierarchie der Stamm- und Vorläuferzellen im adulten Säuger.....	19
Abbildung T-2: Einstufung von HSC und deren Vorläuferzellen anhand verschiedener experimenteller Systeme – fett gedruckt: im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Kriterien	24
Abbildung T-3: Strategien zur in vitro-Expansion von HSC – grau unterlegt: in der vorliegenden Arbeit verwendete Techniken.....	30
Abbildung T-4: Mögliche Interaktionen von HSC mit Feederzellen	31
Abbildung T-5: Schematische Darstellung der im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Arbeiten.....	48
Abbildung M-1: Typische Morphologie hämatopoetischer Kolonien in semisolidem Medium (Bilder aus Eaves A. C. und Lambie K., 1995) – A: BFU-E, B: CFU-G, C: CFU-M, D: CFU-GM, E: CFU-GEMM; Vergrößerung jeweils im Bild angegeben.....	72
Abbildung M-2: CFU-F (Bild aus SCT, 2002) – Originalvergrößerung 25fach	75
Abbildung E-1: Typische Morphologie von MSC – Originalvergrößerung 10fach	82
Abbildung E-2: Akkumulierte Zellzahl der aus der Knochenmarksprobe eines einzelnen Spenders gewonnenen MSC.....	83
Abbildung E-3: Präparation von HUVEC – A: über Luer-Lock-Adapter in der Vene mit Trypsin befüllte Nabelschnur, B: Nabelschnur mit Thrombusbildung in der Vene.....	84
Abbildung E-4: Typische Morphologie von HUVEC – Originalvergrößerung 10fach	85
Abbildung E-5: Akkumulierte Zellzahl der aus den Nabelschnüren zweier Spender gewonnenen HUVEC	86
Abbildung E-6: Präparation von WJC – A: Zerkleinern der Nabelschnur, B: Schneiden der Fragmente für die Aussaat in Zellkulturplatten.....	87
Abbildung E-7: Morphologie von aus Nabelschnurmatrixgewebe kultivierten Zellen – A: „fibroblastähnlich“, B: „endothelähnlich“.....	89
Abbildung E-8: Zellwachstum aus Nabelschnurgewebsfragmenten dreier verschiedener Spender nach 1, 2, 3 und 4 Wochen Kultivierung – Anteil der unterschiedlichen Phänotypen (colony = Wachstum kleiner Zellkolonien undefinierter Morphologie – schwarze Balken, fibroblast = „fibroblastähnlich“ – schräg schraffierte Balken, endothelial = „endothelähnlich“ – senkrecht schraffierte Balken)	90
Abbildung E-9: Passagen von aus Nabelschnurfragmenten dreier verschiedener Spender kultivierten Zellen nach 3 bzw. 4 Wochen Kultivierung – Anteil der verschiedenen Phänotypen (fibroblast = „fibroblastähnlich“ – schräg schraffierte Balken bzw. endothelial = „endothelähnlich“ – senkrecht schraffierte Balken)	91
Abbildung E-10: Akkumulierte Zellzahlen der aus je einem Nabelschnurgewebsfragment kultivierten WJC innerhalb einer Kulturdauer von 4 bis 7 Wochen – Zellen aus jeweils 4	

Einzelfragmenten (A, B, C und D) von zwei verschiedenen Spendern (2 – schwarze Linien bzw. 3 – dunkelgraue Linien)	93
Abbildung E-11: CFU-F-Assay WJC – Fotos von Ausschnitten aus Kulturen der Aussaatdichten 100 (oberste Reihe), 500 (mittlere Reihe) und 1000 (untere Reihe) Zellen / cm ² , Charge 1 & 2 vom selben Spender, alle Passage 3; A – C: Zellen der Charge 1, Medium: DMEM; D – F: Charge 1, ECGM; G – I: Charge 2, DMEM; J – L: Charge 2, ECGM; alle Proben mit Methanol fixiert und Giemsa-gefärbt, Originalvergrößerung 10fach	94
Abbildung E-12: Differenzierung von MSC – A: osteogen (Zellen der Passage 7, Originalvergrößerung 100fach), B: adipogen (Zellen der Passage 7, Originalvergrößerung 200fach), C: chondrogen (Zellen der Passage 7, Originalvergrößerung 100fach)	96
Abbildung E-13: Expression von CD45 auf den potenziellen Feederzellen und SMC – MSC, HUVEC, WJC und SMC wie gekennzeichnet; nicht ausgefüllte Histogramme: Isotypkontrolle, PE-konjugiert, ausgefüllte Histogramme: Antikörper gegen CD45, PE-konjugiert	97
Abbildung E-14: Expression von MHC-I und MHC-II auf den potenziellen Feederzellen und SMC – MSC, HUVEC, WJC und SMC wie gekennzeichnet; nicht ausgefüllte Histogramme: Isotypkontrolle, FITC-konjugiert, ausgefüllte Histogramme: Antikörper gegen MHC-I bzw. MHC-II, FITC-konjugiert	98
Abbildung E-15: Expression von Stammzell-, Fibroblast- und Endothelzellmarkern auf MSC (schwarze Balken), HUVEC (schräg schraffierte Balken), WJC (senkrecht schraffierte Balken) und SMC (Balken mit Karomuster) – durchschnittliche im FACS gemessene Fluoreszenzintensität relativ zur jeweiligen Isotypkontrolle	99
Abbildung E-16: Expression von Rezeptormolekülen auf MSC (schwarze Balken), HUVEC (schräg schraffierte Balken), WJC (senkrecht schraffierte Balken) und SMC (Balken mit Karomuster) – durchschnittliche im FACS gemessene Fluoreszenzintensität relativ zur jeweiligen Isotypkontrolle	100
Abbildung E-17: Oberflächenmarkerprofil von „endothel-ähnlichen“ Zellen aus der Nabelschnurmatrix – nicht ausgefüllte Histogramme: Isotypkontrolle, konjugiert an FITC/PE/PE-Cy-5 (wie angegeben), ausgefüllte Histogramme: Antikörper gegen das jeweils angegebene Antigen, konjugiert an FITC/PE/PE-Cy-5 (wie angegeben)	101
Abbildung E-18: Aktivierung allogener T-Zellen durch MSC (schwarze Balken), HUVEC (schräg schraffierte Balken) und WJC (senkrecht schraffierte Balken) – Anteil der aktivierten T-Zellen, bestimmt anhand der Expression der Oberflächenmarker CD25 (A), CD69 (B) und CD71 (C) auf CD3-positiven Zellen (FACS-Messung)	102
Abbildung E-19: Kompatibilität der potenziellen Feederzellen zu HSC-Medium – Lebendzellzahl von MSC (schwarze Linie mit großen Vierecken), HUVEC (dunkelgraue Linie mit kleinen Quadraten) und WJC (hellgraue Linie mit Dreiecken) im Vergleich zu bestrahlten SI/SI mod (schwarze Linie mit Dreiecken) über 7-tägige Kultur in HSC-Medium	104
Abbildung E-20: Konzentrationen von Substraten und Metaboliten im Kulturüberstand von MSC (schwarze Balken HUVEC), (schräg schraffierte Balken) und WJC (senkrecht schraffierte Balken) im Vergleich zu SI/SI mod (Balken mit Karos) vor und nach 7-tägiger Kultur in HSC-Medium – A: Glukose, B: Glutamin, C: Laktat, D: Glutamat	106
Abbildung E-21: Expansion von HSC mit MSC als Feederzellen, Vergleich der Zellzahlverhältnisse 1:10 und 1:20 HSC:MSC – Expansion von mononukleären Zellen (Bestimmung der Lebendzellzahl in Neubauer-Zählkammer; schwarze Balken) bzw. CFC (Bestimmung im CFC-Assay; schräg schraffierte Balken)	107
Abbildung E-22: Viabilität der potenziellen Feederzellen nach dem Auftauen – Vergleich von MSC (schwarze Balken), HUVEC (schräg schraffierte Balken) und WJC (senkrecht schraffierte Balken), Bestimmung mittels Trypanblaufärbung und Zählung in Neubauer-Zählkammer (Mittelwert aus beiden Kokultorexperimenten)	109
Abbildung E-23: Kokultur von HSC mit potenziellen Feederzellen – Mikroskop-Aufnahmen an d. 7 der Kokultur (Originalvergrößerung: 10fach); Feederzellen: SI/SI mod (A), MSC (B), HUVEC (C), WJC (D)	110

Abbildung E-24: Konzentrationen von Substraten und Metaboliten im Kulturüberstand der Kokulturversuche 1 (schwarze Balken) und 2 (schräg schraffierte Balken) ohne Feederzellen bzw. mit SI/SI mod, MSC, HUVEC und WJC als Feederzellen – A: Glukose, B: Glutamin, C: Laktat, D: Glutamat.....	111
Abbildung E-25: Expansion der mononukleären Zellen (MNC) aus HSC nach 7-tägiger isolierter Suspensionskultur (ohne Feeder) bzw. Kokultur mit SI/SI mod, MSC, HUVEC oder WJC – Expansionsraten von Kokulturversuch 1 (schwarze Balken) und 2 (schräg schraffierte Balken), ermittelt anhand Lebendzellzahlbestimmung in Neubauer-Zählkammer	112
Abbildung E-26: Expansion von CFC aus HSC nach 7-tägiger isolierter Suspensionskultur (ohne Feeder) bzw. Kokultur mit SI/SI mod, MSC, HUVEC oder WJC – Expansionsraten von Kokulturversuch 1 (schwarze Balken) und 2 (schräg schraffierte Balken), ermittelt anhand CFC-Assay	113
Abbildung E-27: CFC-Verteilung nach 7-tägiger Expansion von HSC in isolierter Suspensionskultur bzw. Kokultur mit SI/SI mod, MSC, HUVEC oder WJC – A: Kokulturversuch 1, B: Kokulturversuch 2; BFU-E: schwarze Balken, CFU-G: schräg schraffierte Balken, CFU-GM: senkrecht schraffierte Balken, CFU-M: Balken mit Karos, CFU-GEMM: weiße Balken	114
Abbildung E-28: Expansion von CAFC aus HSC nach 7-tägiger isolierter Suspensionskultur (ohne Feeder) bzw. Kokultur mit SI/SI mod, MSC, HUVEC oder WJC – Expansionsraten von Kokulturversuch 1 (schwarze Balken) und 2 (schräg schraffierte Balken), ermittelt anhand CAFC-Assay.....	115

Tabellen

Tabelle T-1: Vergleich unterschiedlicher HSC-Quellen für Transplantationen (adaptiert aus Kaufman R. L. <i>et al.</i> , 2004).....	27
Tabelle T-2: Für Kokultur in klinischem Maßstab benötigte Feederzellzahlen und gewünschte Expansionsparameter – Quellenangabe in Klammern: H = Hough R. E. <i>et al.</i> , 2004, K = Kaufman R. L. <i>et al.</i> , 2004, Y = Yamada T. <i>et al.</i> , 2000	42
Tabelle M-1: Zellkulturmedien und Mediumzusätze	52
Tabelle M-2: Für Passagen verwendete Trypsinmengen.....	55
Tabelle M-3: Standardaussaatdichten für Primärzellkultur (Zellen/cm ²)	55
Tabelle M-4: Eingesetzte Volumina für MACS-Isolation von CD34-positiven Zellen	60
Tabelle M-5: Zellzahlen für Aussaat von CFC-Assays	71
Tabelle M-6: Zellzahlen und Plattenanzahl für CAFC-Assay.....	73
Tabelle M-7: Zellzahlen Feederzellen für die Aussaat in T-Zell-Stimulationsexperimenten ...	76
Tabelle M-8: Antikörpercocktail für Färbung von T-Zellen nach Immunstimulationsexperiment	77
Tabelle E-1: Aussaatbedingungen für CD34-negative Zellen aus Nabelschnurblut	80
Tabelle E-2: Aussaatbedingungen für MNC aus Nabelschnurblut	81
Tabelle E-3: Verfügbarkeitsanalyse für potenzielle Feederzelltypen	88

7.5 Literatur

- Aisen P. (2004): Transferrin receptor 1; *Int J Biochem Cell Biol*, 36 (11): 2137-43
- Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J. und Clarke M. F. (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (7): 3983-8
- Ballen K. K. (2005): New trends in umbilical cord blood transplantation; *Blood*, Online-Publikation vor Abdruck
- Barry F. P., Boynton R. E., Haynesworth S., Murphy J. M. und Zaia J. (1999): The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105); *Biochem Biophys Res Commun*, 265 (1): 134-9.
- Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., Hardy W., Devine S., Ucker D., Deans R., Moseley A. und Hoffman R. (2002): Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo; *Exp Hematol*, 30 (1): 42-8.
- Battista P. J. und Soderland C. (1998): Serum-free culture of human venous and arterial endothelial cells, *Cell biology: a laboratory handbook* (2. Auflage), Academic Press
- Betz E., Reutter K., Mecke D. und Ritter H. (1997): Mörike / Betz / Mergenthaler: *Biologie des Menschen* (14. Auflage), Quelle und Meyer Verlag GmbH & Co. Wiesbaden
- Bieback K., Kern S., Kluter H. und Eichler H. (2004): Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood; *Stem Cells*, 22 (4): 625-34
- Blau H. M., Brazelton T. R. und Weimann J. M. (2001): The evolving concept of a stem cell: entity or function?; *Cell*, 105 (7): 829-41.
- Bonnet D. und Dick J. E. (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell; *Nat Med*, 3 (7): 730-7
- Breems D. A., Blokland E. A., Siebel K. E., Mayen A. E., Engels L. J. und Ploemacher R. E. (1998): Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells; *Blood*, 91 (1): 111-7.
- Bruder S. P., Horowitz M. C., Mosca J. D. und Haynesworth S. E. (1997): Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens; *Bone*, 21 (3): 225-35.
- Bruder S. P., Ricalton N. S., Boynton R. E., Connolly T. J., Jaiswal N., Zaia J. und Barry F. P. (1998): Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation; *J Bone Miner Res*, 13 (4): 655-63.
- Burdon T., Smith A. und Savatier P. (2002): Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells; *Trends Cell Biol*, 12 (9): 432-8
- Calvi L. M., Adams G. B., Weibrecht K. W., Weber J. M., Olson D. P., Knight M. C., Martin R. P., Schipani E., Divieti P., Bringham F. R., Milner L. A., Kronenberg H. M. und Scadden D. T. (2003): Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche; *Nature*, 425 (6960): 841-6

Campagnoli C., Roberts I. A., Kumar S., Bennett P. R., Bellantuono I. und Fisk N. M. (2001): Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first- trimester fetal blood, liver, and bone marrow; *Blood*, 98 (8): 2396-402.

Campbell N. A. und Reece J. B. (2003): *Biologie* (6. Auflage), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg / Berlin

Castro-Malaspina H., Gay R. E., Resnick G., Kapoor N., Meyers P., Chiarieri D., McKenzie S., Broxmeyer H. E. und Moore M. A. (1980): Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny; *Blood*, 56 (2): 289-301.

Cheng L., Hammond H., Ye Z., Zhan X. und Dravid G. (2003): Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture; *Stem Cells*, 21 (2): 131-42

Cheng L., Qasba P., Vanguri P. und Thiede M. A. (2000): Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells; *J Cell Physiol*, 184 (1): 58-69.

Chute J. P., Muramoto G. G., Fung J. und Oxford C. (2005): Soluble factors elaborated by human brain endothelial cells induce the concomitant expansion of purified human BM CD34+CD38- cells and SCID-repopulating cells; *Blood*, 105 (2): 576-83

Cicuttini F. M., Martin M., Salvaris E., Ashman L., Begley C. G., Novotny J., Maher D. und Boyd A. W. (1992): Support of human cord blood progenitor cells on human stromal cell lines transformed by SV40 large T antigen under the influence of an inducible (metallothionein) promoter; *Blood*, 80 (1): 102-12.

Conget P. A. und Minguell J. J. (1999): Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells; *J Cell Physiol*, 181 (1): 67-73.

Conneally E., Cashman J., Petzer A. und Eaves C. (1997): Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (18): 9836-41.

Covas D. T., Siufi J. L., Silva A. R. und Orellana M. D. (2003): Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells; *Braz J Med Biol Res*, 36 (9): 1179-83

Dao M. A., Hashino K., Kato I. und Nolte J. A. (1998): Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells; *Blood*, 92 (12): 4612-21.

De Angeli S., Di Liddo R., Buoro S., Toniolo L., Conconi M. T., Belloni A. S., Parnigotto P. P. und Nussdorfer G. G. (2004): New immortalized human stromal cell lines enhancing in vitro expansion of cord blood hematopoietic stem cells; *Int J Mol Med*, 13 (3): 363-71

De Ugarte D. A., Alfonso Z., Zuk P. A., Elbarbary A., Zhu M., Ashjian P., Benhaim P., Hedrick M. H. und Fraser J. K. (2003): Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow; *Immunol Lett*, 89 (2-3): 267-70

Deans R. J. und Moseley A. B. (2000): Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses; *Exp Hematol*, 28 (8): 875-84.

Dejana E. (2004): Endothelial cell-cell junctions: happy together; *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5 (4): 261-70

Dengler T. J., Johnson D. R. und Pober J. S. (2001): Human vascular endothelial cells stimulate a lower frequency of alloreactive CD8+ pre-CTL and induce less clonal expansion than matching B lymphoblastoid cells: development of a novel limiting dilution analysis method based on CFSE labeling of lymphocytes; *J Immunol*, 166 (6): 3846-54

Denning-Kendall P., Singha S., Bradley B. und Hows J. (2003-1): Cobblestone area-forming cells in human cord blood are heterogeneous and differ from long-term culture-initiating cells; *Stem Cells*, 21 (6): 694-701

Denning-Kendall P., Singha S., Bradley B. und Hows J. (2003-2): Cytokine Expansion Culture of Cord Blood CD34(+) Cells Induces Marked and Sustained Changes in Adhesion Receptor and CXCR4 Expressions; *Stem Cells*, 21 (1): 61-70

Devine S. M. (2002): Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic?; *J Cell Biochem Suppl, Suppl (38)*: 73-9.

Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P. D., Matteucci P., Grisanti S. und Gianni A. M. (2002): Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli; *Blood*, 99 (10): 3838-43

Digirolamo C. M., Stokes D., Colter D., Phinney D. G., Class R. und Prockop D. J. (1999): Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate; *Br J Haematol*, 107 (2): 275-81.

Djouad F., Ponce P., Bony C., Tropel P., Apparailly F., Sany J., Noel D. und Jorgensen C. (2003): Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals; *Blood*, 102 (10): 3837-44

Dooley D. C., Oppenlander B. K. und Xiao M. (2004): Analysis of primitive CD34- and CD34+ hematopoietic cells from adults: gain and loss of CD34 antigen by undifferentiated cells are closely linked to proliferative status in culture; *Stem Cells*, 22 (4): 556-69

Dorling A. (2002): Clinical xenotransplantation: pigs might fly?; *Am J Transplant*, 2 (8): 695-700

Dorshkind K. (1990): Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products; *Annu Rev Immunol*, 8 111-37

Drexler H. G. und Quentmeier H. (2004): FLT3: receptor and ligand; *Growth Factors*, 22 (2): 71-3

Eaves A. C. und Lambie K. (1995): *Atlas of human hematopoietic colonies*, Vancouver

Ehring B., Biber K., Upton T., Plosky D., Pykett M. und Rosenzweig M. (2003): Expansion of HPCs from cord blood in a novel 3D matrix; *Cytotherapy*, 5 (6): 490-9

Erices A., Conget P. und Minguell J. J. (2000): Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood; *Br J Haematol*, 109 (1): 235-42.

Fernandez M., Simon V., Herrera G., Cao C., Del Favero H. und Minguell J. J. (1997): Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients; *Bone Marrow Transplant*, 20 (4): 265-71.

Feugier P., Jo D. Y., Shieh J. H., MacKenzie K. L., Rafii S., Crystal R. G. und Moore M. A. (2002): Ex vivo Expansion of Stem and Progenitor Cells in Co-culture of Mobilized Peripheral Blood CD34+ Cells on Human Endothelium Transfected with Adenovectors Expressing Thrombopoietin, c-kit Ligand, and Flt-3 Ligand; *J Hematother Stem Cell Res*, 11 (1): 127-38.

Fischbach T. (2003): Innovative Strategien zur Expansion hematopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen im klinisch relevanten Maßstab, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gimble J. und Guilak F. (2003): Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential; *Cytotherapy*, 5 (5): 362-9

Glennie S., Soeiro I., Dyson P. J., Lam E. W. und Dazzi F. (2005): Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells; *Blood*, 105 (7): 2821-7

Gluckman E., Broxmeyer H. A., Auerbach A. D., Friedman H. S., Douglas G. W., Devergie A., Esperou H., Thierry D., Socie G., Lehn P. und et al. (1989): Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling; *N Engl J Med*, 321 (17): 1174-8.

Gluckman E. und Rocha V. (2004): Cord blood transplantation in Europe: strategy of alternative donor transplant search, Broxmeyer H. E., *Cord Blood: Biology, Immunology, Banking, and Clinical Transplantation* (1. Auflage), AABB Press (Bethesda)

Goodwin H. S., Bicknese A. R., Chien S. N., Bogucki B. D., Quinn C. O. und Wall D. A. (2001): Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers; *Biol Blood Marrow Transplant*, 7 (11): 581-8

Guo Y., Lubbert M. und Engelhardt M. (2003): CD34(-) Hematopoietic Stem Cells: Current Concepts and Controversies; *Stem Cells*, 21 (1): 15-20

Gupta K., Ramakrishnan S., Browne P. V., Solovey A. und Hebbel R. P. (1997): A novel technique for culture of human dermal microvascular endothelial cells under either serum-free or serum-supplemented conditions: isolation by panning and stimulation with vascular endothelial growth factor; *Exp Cell Res*, 230 (2): 244-51

Gutierrez-Rodriguez M., Reyes-Maldonado E. und Mayani H. (2000): Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood; *Stem Cells*, 18 (1): 46-52

Hennig W. (1998): *Genetik* (2. Auflage), Springer Verlag Berlin / Heidelberg

Herzog E. L., Chai L. und Krause D. S. (2003): Plasticity of marrow-derived stem cells; *Blood*, 102 (10): 3483-93

Hogge D. E., Lansdorp P. M., Reid D., Gerhard B. und Eaves C. J. (1996): Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor; *Blood*, 88 (10): 3765-73

Horwitz E. M., Gordon P. L., Koo W. K., Marx J. C., Neel M. D., McNall R. Y., Muul L. und Hofmann T. (2002): Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (13): 8932-7.

- Hough R. E., Barker J. N. und Wagner J. E. (2004): Innovation in Umbilical Cord Blood Transplantation, Broxmeyer H. E., Cord Blood: Biology, Immunology, Banking, and Clinical Transplantation Auflage), AABB Press (Bethesda)
- Ibsen K. H. (1961): The Crabtree effect: a review; *Cancer Res*, 21 829-41
- Ingram D. A., Mead L. E., Tanaka H., Meade V., Fenoglio A., Mortell K., Pollok K., Ferkowicz M. J., Gilley D. und Yoder M. C. (2004): Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood; *Blood*, 104 (9): 2752-60
- Ivanovic Z. (2004): Interleukin-3 and ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells: facts and controversies; *Eur Cytokine Netw*, 15 (1): 6-13
- Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G. und Minick C. R. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria; *J Clin Invest*, 52 (11): 2745-56.
- Jaiswal N., Haynesworth S. E., Caplan A. I. und Bruder S. P. (1997): Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro; *J Cell Biochem*, 64 (2): 295-312.
- Janeway C. A., Travers P., Walport M. und Shlomchik M. J. (2001): *Immunobiology* 5 (5. Auflage), Garland Publishing New York
- Jazwiec B., Solanilla A., Grosset C., Mahon F. X., Dupouy M., Pigeonnier-Lagarde V., Belloc F., Schweitzer K., Reiffers J. und Ripoche J. (1998): Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids; *Leukemia*, 12 (8): 1210-20.
- Jelinek N. (2001): Kultivierung hämatopoetischer Zellen - Kokultur im Festbettreaktor, Dissertation, RWTH Aachen
- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A. und Verfaillie C. M. (2002): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow; *Nature*, 20 20
- Kadereit S., Deeds L. S., Haynesworth S. E., Koc O. N., Kozik M. M., Szekely E., Daum-Woods K., Goetchius G. W., Fu P., Welniak L. A., Murphy W. J. und Laughlin M. J. (2002): Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer; *Stem Cells*, 20 (6): 573-82
- Kaufman R. L., Gunter K. C. und Visser J. W. M. (2004): Related and autologous cord blood banking and transplantation, Broxmeyer H. E., Cord Blood: Biology, Immunology, Banking, and Clinical Transplantation (1. Auflage), AABB Press (Bethesda)
- Kim D. W., Chung Y. J., Kim T. G., Kim Y. L. und Oh I. H. (2004): Cotransplantation of third-party mesenchymal stromal cells can alleviate single-donor predominance and increase engraftment from double cord transplantation; *Blood*, 103 (5): 1941-8
- Klingemann H. G., Wong E. und Maki G. (1996): A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood; *Biol Blood Marrow Transplant*, 2 (2): 68-75
- Kobari L., Giarratana M. C., Pflumio F., Izac B., Coulombel L. und Douay L. (2001): CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells; *J Hematother Stem Cell Res*, 10 (2): 273-81.

Kobayashi K., Kubota T. und Aso T. (1998): Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of alpha-smooth muscle actin; *Early Hum Dev*, 51 (3): 223-33

Koc O. N., Gerson S. L., Cooper B. W., Dyhouse S. M., Haynesworth S. E., Caplan A. I. und Lazarus H. M. (2000): Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy; *J Clin Oncol*, 18 (2): 307-16.

Kögler G., Sensken S., Airey J. A., Trapp T., Muschen M., Feldhahn N., Liedtke S., Sorg R. V., Fischer J., Rosenbaum C., Greschat S., Knipper A., Bender J., Degistirici O., Gao J., Caplan A. I., Colletti E. J., Almeida-Porada G., Muller H. W., Zanjani E. und Wernet P. (2004): A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential; *J Exp Med*, 200 (2): 123-35

Kokerbeck D. (2002): Untersuchungen zum Einfluss stroma-sekretierter Faktoren auf die Proliferation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen - Konditionierungsparameter und Identifizierung von Proteinen, Diplomarbeit, Fachhochschule Aachen / Jülich

Kondo M., Wagers A. J., Manz M. G., Prohaska S. S., Scherer D. C., Beilhack G. F., Shizuru J. A. und Weissman I. L. (2003): Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application; *Annu Rev Immunol*, 21 759-806

Kunitomi A., Hori T., Imura A. und Uchiyama T. (2000): Vascular endothelial cells provide T cells with costimulatory signals via the OX40/gp34 system; *J Leukoc Biol*, 68 (1): 111-8.

Kuter D. J. und Begley C. G. (2002): Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies; *Blood*, 100 (10): 3457-69

Lapidot T. und Petit I. (2002): Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells; *Exp Hematol*, 30 (9): 973-81

Le Blanc K., Rasmusson I., Gotherstrom C., Seidel C., Sundberg B., Sundin M., Rosendahl K., Tammik C. und Ringden O. (2004): Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes; *Scand J Immunol*, 60 (3): 307-15

Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E. und Ringden O. (2003-1): HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells; *Exp Hematol*, 31 (10): 890-6

Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S. E. und Ringden O. (2003-2): Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex; *Scand J Immunol*, 57 (1): 11-20

Lee O. K., Kuo T. K., Chen W. M., Lee K. D., Hsieh S. L. und Chen T. H. (2004): Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood; *Blood*, 103 (5): 1669-75

Lemoine F. M., Humphries R. K., Abraham S. D., Krystal G. und Eaves C. J. (1988): Partial characterization of a novel stromal cell-derived pre-B-cell growth factor active on normal and immortalized pre-B cells; *Exp Hematol*, 16 (8): 718-26

- Lennon D. P., Haynesworth S. E., Young R. G., Dennis J. E. und Caplan A. I. (1995): A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells; *Exp Cell Res*, 219 (1): 211-22.
- Lewis I. D., Almeida-Porada G., Du J., Lemischka I. R., Moore K. A., Zanjani E. D. und Verfaillie C. M. (2001): Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system; *Blood*, 97 (11): 3441-9.
- Li J. H., Kluger M. S., Madge L. A., Zheng L., Bothwell A. L. und Pober J. S. (2002): Interferon-gamma augments CD95(APO-1/Fas) and pro-caspase-8 expression and sensitizes human vascular endothelial cells to CD95-mediated apoptosis; *Am J Pathol*, 161 (4): 1485-95
- Lidington E. A., Moyes D. L., McCormack A. M. und Rose M. L. (1999): A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions; *Transp Immunol*, 7 (4): 239-46
- Loeuillet C., Bernard G., Remy-Martin J., Saas P., Herve P., Douay L. und Chalmers D. (2001): Distinct hematopoietic support by two human stromal cell lines; *Exp Hematol*, 29 (6): 736-45
- Lombardi G., Miglio G., Dianzani C., Mesturini R., Varsaldi F., Chiocchetti A., Dianzani U. und Fantozzi R. (2004): Glutamate modulation of human lymphocyte growth: in vitro studies; *Biochem Biophys Res Commun*, 318 (2): 496-502
- Majumdar M. K., Keane-Moore M., Buyaner D., Hardy W. B., Moorman M. A., McIntosh K. R. und Mosca J. D. (2003): Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells; *J Biomed Sci*, 10 (2): 228-41.
- Majumdar M. K., Thiede M. A., Haynesworth S. E., Bruder S. P. und Gerson S. L. (2000): Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages; *J Hematother Stem Cell Res*, 9 (6): 841-8.
- Majumdar M. K., Thiede M. A., Mosca J. D., Moorman M. und Gerson S. L. (1998): Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells; *J Cell Physiol*, 176 (1): 57-66.
- Marelli-Berg F. M., Hargreaves R. E., Carmichael P., Dorling A., Lombardi G. und Lechler R. I. (1996): Major histocompatibility complex class II-expressing endothelial cells induce allospecific nonresponsiveness in naive T cells; *J Exp Med*, 183 (4): 1603-12
- Mareschi K., Biasin E., Piacibello W., Aglietta M., Madon E. und Fagioli F. (2001): Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood; *Haematologica*, 86 (10): 1099-100.
- Marin V., Kaplanski G., Gres S., Farnarier C. und Bongrand P. (2001): Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells; *J Immunol Methods*, 254 (1-2): 183-90.
- Mayani H., Guilbert L. J. und Janowska-Wieczorek A. (1992): Biology of the hemopoietic microenvironment; *Eur J Haematol*, 49 (5): 225-33.
- McIntosh K. und Bartholomew A. (2000): Stromal cell modulation of the immune system; *Graft Rev*, 3 (6): 324 - 328

- Melchionna R., Porcelli D., Mangoni A., Carlini D., Liuzzo G., Spinetti G., Antonini A., Capogrossi M. C. und Napolitano M. (2005): Laminar shear stress inhibits CXCR4 expression on endothelial cells: functional consequences for atherogenesis; *Faseb J*, 19 (6): 629-31
- Mitchell K. E., Weiss M. L., Mitchell B. M., Martin P., Davis D., Morales L., Helwig B., Beerensrauch M., Abou-Easa K., Hildreth T. und Troyer D. (2003): Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia; *Stem Cells*, 21 (1): 50-60
- Miyamoto K., Hayashi K., Suzuki T., Ichihara S., Yamada T., Kano Y., Yamabe T. und Ito Y. (2004): Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells; *Stem Cells*, 22 (4): 433-40
- Mohle R., Bautz F., Rafii S., Moore M. A., Brugger W. und Kanz L. (1998): The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1; *Blood*, 91 (12): 4523-30.
- Moreadith R. W. und Radford N. B. (1997): Gene targeting in embryonic stem cells: the new physiology and metabolism; *J Mol Med*, 75 (3): 208-16
- Morrison S. J. und Weissman I. L. (1994): The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype; *Immunity*, 1 (8): 661-73
- Müller A. M., Hermanns M. I., Skrzynski C., Nesslinger M., Müller K. M. und Kirkpatrick C. J. (2002): Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro; *Exp Mol Pathol*, 72 (3): 221-9.
- Mulloy J. C., Cammenga J., Berguido F. J., Wu K., Zhou P., Comenzo R. L., Jhanwar S., Moore M. A. und Nimer S. D. (2003): Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34+ hematopoietic cells using a single genetic element; *Blood*, 102 (13): 4369-4376
- Mutin M., Dignat-George F. und Sampol J. (1997): Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules; *Tissue Antigens*, 50 (5): 449-58.
- Nanaev A. K., Kohnen G., Milovanov A. P., Domogatsky S. P. und Kaufmann P. (1997): Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord; *Placenta*, 18 (1): 53-64
- Nguyen X. D., Eichler H., Dugrillon A., Piechaczek C., Braun M. und Kluter H. (2003): Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells; *J Immunol Methods*, 275 (1-2): 57-68.
- Noort W., Krusselbrink A., in't Anker P., Kruger M., van Bezooijen R., de Paus R., Heemskerk M., Lowik C., Falkenburg J., Willemze R. und Fibbe W. (2002): Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice; *Exp Hematol*, 30 (8): 870.
- Ohneda O., Fennie C., Zheng Z., Donahue C., La H., Villacorta R., Cairns B. und Lasky L. A. (1998): Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad-mesonephros region-derived endothelium; *Blood*, 92 (3): 908-19.

- Page C. S., Holloway N., Smith H., Yacoub M. und Rose M. L. (1994): Alloproliferative responses of purified CD4+ and CD8+ T cells to endothelial cells in the absence of contaminating accessory cells; *Transplantation*, 57 (11): 1628-37
- Patel S. D., Papoutsakis E. T., Winter J. N. und Miller W. M. (2000): The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures; *Biotechnol Prog*, 16 (5): 885-92
- Peister A., Mellad J. A., Larson B. L., Hall B. M., Gibson L. F. und Prockop D. J. (2004): Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential; *Blood*, 103 (5): 1662-8
- Phinney D. G. (2002): Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells; *J Cell Biochem Suppl*, Suppl (38): 7-12.
- Piacibello W., Sanavio F., Severino A., Dane A., Gammaitoni L., Fagioli F., Perissinotto E., Cavalloni G., Kollet O., Lapidot T. und Aglietta M. (1999): Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells; *Blood*, 93 (11): 3736-49.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S. und Marshak D. R. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells; *Science*, 284 (5411): 143-7.
- Pittenger M. F. und Marshak D. R. (2001): *Mesenchymal Stem Cells of Human Adult Bone Marrow*, Press C. S. H. L., *Stem Cell Biology* (1. Auflage), (Cold Spring Harbor)
- Ploemacher R. E. (1997): Stem cells: characterization and measurement; *Baillieres Clin Haematol*, 10 (3): 429-44.
- Ploemacher R. E., van der Sluijs J. P., Voerman J. S. und Brons N. H. (1989): An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse; *Blood*, 74 (8): 2755-63
- Pochampally R. R., Smith J. R., Ylostalo J. und Prockop D. J. (2004): Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes; *Blood*, 103 (5): 1647-52
- Presnell S. C., Petersen B. und Heidaran M. (2002): Stem cells in adult tissues; *Semin Cell Dev Biol*, 13 (5): 369-76
- Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F. und Weissman I. L. (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells; *Nature*, 414 (6859): 105-11
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L. und Verfaillie C. M. (2001): Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells; *Blood*, 98 (9): 2615-25.
- Rollini P., Kaiser S., Faes-van't Hull E., Kapp U. und Leyvraz S. (2004): Long-term expansion of transplantable human fetal liver hematopoietic stem cells; *Blood*, 103 (3): 1166-70
- Romanov Y. A., Svintsitskaya V. A. und Smirnov V. N. (2003): Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord; *Stem Cells*, 21 (1): 105-10

Rosler E., Brandt J., Chute J. und Hoffman R. (2000): Cocultivation of umbilical cord blood cells with endothelial cells leads to extensive amplification of competent CD34+CD38- cells; *Exp Hematol*, 28 (7): 841-52.

Ross R. (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease; *N Engl J Med*, 340 (2): 115-26
Sadler T. W. (1998): *Medizinische Embryologie* (9. Auflage), Georg Thieme Verlag Stuttgart / New York

Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Ichinose S., Shinomiya K. und Muneta T. (2004): Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates; *Blood*, 104 (9): 2728-35

Sarugaser R., Lickorish D., Baksh D., Hosseini M. M. und Davies J. E. (2005): Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors; *Stem Cells*, 23 (2): 220-9

Schneider M., Marison I. W. und von Stockar U. (1996): The importance of ammonia in mammalian cell culture; *J Biotechnol*, 46 (3): 161-85

Schwachula A., Riemann D., Kehlen A. und Langner J. (1994): Characterization of the immunophenotype and functional properties of fibroblast-like synoviocytes in comparison to skin fibroblasts and umbilical vein endothelial cells; *Immunobiology*, 190 (1-2): 67-92.

SCT (2002): *Human mesenchymal related products and protocols*, Vancouver

Shakibaei M. und De Souza P. (1997): Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads; *Cell Biol Int*, 21 (2): 75-86.

Shamblott M. J., Axelman J., Wang S., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggins G. R. und Gearhart J. D. (1998): Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (23): 13726-31.

Shen Q., Goderie S. K., Jin L., Karanth N., Sun Y., Abramova N., Vincent P., Pumiglia K. und Temple S. (2004): Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells; *Science*, 304 (5675): 1338-40

Simmons P. J. und Torok-Storb B. (1991): CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow; *Blood*, 78 (11): 2848-53.

Singh S. K., Clarke I. D., Terasaki M., Bonn V. E., Hawkins C., Squire J. und Dirks P. B. (2003): Identification of a cancer stem cell in human brain tumors; *Cancer Res*, 63 (18): 5821-8

Smith F. O., Srour E. F. und Broxmeyer H. A. (2004): *Ex-vivo expansion and gene transduction of cord blood stem cells*, Broxmeyer H. A., *Cord Blood: Biology, Immunology, Banking, and Clinical Transplantation* (1. Auflage), AABB Press (Bethesda)

Smith M. A., Pallister C. J. und Smith J. G. (2001): Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice; *Acta Haematol*, 105 (3): 143-50

Springer T. A. (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm; *Cell*, 76 (2): 301-14

Stocum D. L. (2001): Stem cells in regenerative biology and medicine; *Wound Repair Regen*, 9 (6): 429-42

- Stryer L. (1999): Biochemie (4. Auflage), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Stute N., Holtz K., Bubenheim M., Lange C., Blake F. und Zander A. R. (2004): Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use; *Exp Hematol*, 32 (12): 1212-25
- Sutherland H. J. und Eaves C. (1994): Long-term culture of human myeloid cells, Freshney M. G. und Pragnell I. B., *Culture of Hematopoietic Cells* Auflage), Wiley-Liss (Hoboken)
- Sutherland H. J., Eaves C. J., Lansdorp P. M., Thacker J. D. und Hogge D. E. (1991): Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells; *Blood*, 78 (3): 666-72
- Sutherland H. J., Hogge D. E., Cook D. und Eaves C. J. (1993): Alternative mechanisms with and without steel factor support primitive human hematopoiesis; *Blood*, 81 (6): 1465-70
- Taichmann R. S. (2005): Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche; *Blood*, 105 (7): 2631-9
- Takami S., Yamashita S., Kihara S., Kameda-Takemura K. und Matsuzawa Y. (1998): High concentration of glucose induces the expression of intercellular adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells; *Atherosclerosis*, 138 (1): 35-41
- Tanaka E. M. (2003): Regeneration: if they can do it, why can't we?; *Cell*, 113 (5): 559-62
- Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D. M., Nakano Y., Meyer E. M., Morel L., Petersen B. E. und Scott E. W. (2002): Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion; *Nature*, 416 (6880): 542-5
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S. und Jones J. M. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts; *Science*, 282 (5391): 1145-7.
- Tuli R., Tuli S., Nandi S., Wang M. L., Alexander P. G., Haleem-Smith H., Hozack W. J., Manner P. A., Danielson K. G. und Tuan R. S. (2003): Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone; *Stem Cells*, 21 (6): 681-93
- Vercauteren S. M. und Sutherland H. J. (2004): Constitutively active Notch4 promotes early human hematopoietic progenitor cell maintenance while inhibiting differentiation and causes lymphoid abnormalities in vivo; *Blood*, 104 (8): 2315-22
- Verfaillie C. M. (1992): Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis; *Blood*, 79 (11): 2821-6.
- Verfaillie C. M. (2002-2): Hematopoietic stem cells for transplantation; *Nat Immunol*, 3 (4): 314-7.
- Verfaillie C. M., Pera M. F. und Lansdorp P. M. (2002-1): Stem cells: hype and reality; *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 369-91
- Vermot-Desroches C., Marchand D., Roy C. und Wijdenes J. (1995): Heterogeneity of antigen expression among human umbilical cord vascular endothelial cells: identification of cell subsets by co-expression of haemopoietic antigens; *Immunol Lett*, 48 (1): 1-9.

- Visnjic D., Kalajzic Z., Rowe D. W., Katavic V., Lorenzo J. und Aguila H. L. (2004): Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency; *Blood*, 103 (9): 3258-64
- Wang J. C., Lapidot T., Cashman J. D., Doedens M., Addy L., Sutherland D. R., Nayar R., Laraya P., Minden M., Keating A., Eaves A. C., Eaves C. J. und Dick J. E. (1998): High level engraftment of NOD/SCID mice by primitive normal and leukemic hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase; *Blood*, 91 (7): 2406-14
- Wang J. M., Kumar S., van Agthoven A., Kumar P., Pye D. und Hunter R. D. (1995): Irradiation induces up-regulation of E9 protein (CD105) in human vascular endothelial cells; *Int J Cancer*, 62 (6): 791-6.
- Waring P. und Müllbacher A. (1999): Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology; *Immunol Cell Biol*, 77 (4): 312-7
- Weetman A. P. (1999): The immunology of pregnancy; *Thyroid*, 9 (7): 643-6
- Weiss M. L., Mitchell K. E., Hix J. E., Medicetty S., El-Zarkouny S. Z., Grieger D. und Troyer D. L. (2003): Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain; *Exp Neurol*, 182 (2): 288-99
- Wexler S. A., Donaldson C., Denning-Kendall P., Rice C., Bradley B. und Hows J. M. (2003): Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not; *Br J Haematol*, 121 (2): 368-74
- Wynn R. F., Hart C. A., Corradi-Perini C., O'Neill L., Evans C. A., Wraith J. E., Fairbairn L. J. und Bellantuono I. (2004): A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow; *Blood*, 104 (9): 2643-5
- Yamada T., Okamoto Y., Kasamatsu H., Horie Y., Yamashita N. und Matsumoto K. (2000): Factors affecting the volume of umbilical cord blood collections; *Acta Obstet Gynecol Scand*, 79 (10): 830-3
- Yamaguchi H., Ishii E., Saito S., Tashiro K., Fujita I., Yoshidomi S., Ohtubo M., Akazawa K. und Miyazaki S. (1996): Umbilical vein endothelial cells are an important source of c-kit and stem cell factor which regulate the proliferation of haemopoietic progenitor cells; *Br J Haematol*, 94 (4): 606-11.
- Yamaguchi M., Hirayama F., Kanai M., Sato N., Fukazawa K., Yamashita K., Sawada K., Koike T., Kuwabara M., Ikeda H. und Ikebuchi K. (2001): Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells; *Exp Hematol*, 29 (2): 174-82
- Ye Z. Q., Burkholder J. K., Qiu P., Schultz J. C., Shahidi N. T. und Yang N. S. (1994): Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (25): 12140-4.
- Ying Q. L., Nichols J., Evans E. P. und Smith A. G. (2002): Changing potency by spontaneous fusion; *Nature*, 416 (6880): 545-8
- Yu M., Xiao Z., Shen L. und Li L. (2004): Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not; *Br J Haematol*, 124 (5): 666-75

Zhang Y., Li C., Jiang X., Zhang S., Wu Y., Liu B., Tang P. und Mao N. (2004): Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells; *Exp Hematol*, 32 (7): 657-64

ZKRD (2003): Transplantation von Blutstammzellen aus Knochenmark und peripherem Blut, Ulm

Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P. und Hedrick M. H. (2002): Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells; *Mol Biol Cell*, 13 (12): 4279-95.

Zvaifler N. J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G., Edwards C. J., Moss J., Burger J. A. und Maini R. N. (2000): Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals; *Arthritis Res*, 2 (6): 477-88