

**Kultivierung von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut zur *ex vivo*
Expansion von Stamm- und Vorläuferzellen und Untersuchungen
zu deren *Homing*-Fähigkeiten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Tanja Roßmanith
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2001

DF1

vom Fachbereich 14, Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. J. Engels

Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig
Prof. Dr. D. Hoelzer

Datum der Disputation: 18. Oktober 2001

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	7
2	EINLEITUNG	9
2.1	Die Hämatopoese	9
2.2	Die Stammzelle.....	9
2.3	Assays zur Detektion der Stammzelle.....	11
2.4	Hämatopoetische Wachstumsfaktoren	12
2.5	Stammzellquellen.....	14
2.6	Allogene Stammzelltransplantationen aus Nabelschnurbluttransplantaten	15
2.7	Kultivierungsmethoden.....	16
2.8	Allogene Transplantationen mit expandiertem Nabelschnurblut.....	17
2.9	Homing und Engraftment von hämatopoetischen Zellen	17
2.10	Adhäsionsmoleküle.....	18
2.11	Chemokine.....	19
2.12	Die kleinen GTPasen der Rho-Proteinfamilie.....	20
2.13	Zielsetzung.....	22
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Material	23
3.2	Antikörper, Enzyme, Zytokine und Chemokine.....	24
3.3	Chemokine und Zytokine.....	25
3.4	Zelllinien	26

3.5	Lösungen.....	26
3.6	Medien	27
3.7	Angesetzte Puffer oder Medien	28
3.7.1	Auftaupuffer mit DNase I.....	28
3.7.2	Einfriermedium 1.....	28
3.7.3	Einfriermedium 2.....	28
3.7.4	FACS-Puffer.....	28
3.7.5	FACS-Fixierung.....	28
3.7.6	1 % Gelatine-Stocklösung.....	28
3.7.7	HBMEC-Medium.....	29
3.7.8	HL-60 Medium.....	29
3.7.9	MACS-Puffer.....	29
3.7.10	Medium für primäre Fibroblasten.....	29
3.7.11	Methylcellulose.....	29
3.7.12	M2-10B4-Selektionsmedium.....	30
3.7.13	Reaktormedium.....	30
3.7.14	Serumfreies Kulturmedium.....	30
3.7.15	SI/SI-Selektionsmedium.....	30
3.7.16	Sphäroidmedium.....	30
3.7.17	TF-1 Medium.....	31
3.8	Methoden.....	31
3.8.1	Zellzahlbestimmung.....	31
3.8.2	Kultivierung von Zellen.....	31
3.8.3	Einfrieren von Zellen.....	32
3.8.4	Sequentielles Auftauen von CD34+ Zellen.....	32
3.8.5	FICOLL-Aufreinigung.....	33
3.8.6	Positivselektion von CD34+-Zellen über die MACS-Säule.....	34
3.8.7	Suspensionskultur.....	35
3.8.8	Auflösen von Kollagenträgern nach Kultivierung im Spinner.....	35
3.8.9	Durchflußzytometrie (FACS-Markierung).....	36
3.8.10	Methylzellulose-Assay (<i>colony-forming units</i> (CFU)-Assay).....	37
3.8.11	Langzeitkultur (LTC-IC) - <i>Limiting Dilution Assay</i> (LDA).....	38
3.8.12	Darstellung der Expansionsdaten als relative Werte.....	39

3.8.13	Das NOD/SCID-Mausmodell.....	39
3.8.14	7-AAD-Analyse zur Apoptose-Messung.....	40
3.8.15	Erythrozyten-Lyse	41
3.8.16	Transwell-Assay nach Aiuti et al., [51].....	41
3.8.17	Sphäroid-Protokoll.....	42
3.8.18	Zytokin-ELISA (von R&D Systems GmbH, Deutschland)	45
4	ERGEBNISSE	46
4.1	Optimierung der Expansion von Stammzellen aus Nabelschnurblut.....	46
4.1.1	Zytokinaustestung.....	46
4.1.2	Zytokinkonzentrationen.....	48
4.1.3	Untersuchung des Einflusses der Reinheit auf Expansion von Stamm- und Progenitorzellen.....	49
4.1.4	Kulturdauer	51
4.1.5	Kultursysteme	52
4.1.6	Zellkonzentration.....	55
4.1.7	Austestung von Medien	56
4.1.8	Zusammensetzung der expandierten Zellen	58
4.2	<i>In vitro</i> Untersuchung der <i>Homing</i>- und Migrationseigenschaften primärer Zellen und Zelllinien.....	59
4.2.1	Charakterisierung des Sphäroidsystems – ein System zur Messung der Fähigkeit der Zellen, sich durch Fibroblastenschichten zu bewegen	60
4.2.2	Einfluß der Kultivierung auf das Migrationsverhalten.....	73
5	DISKUSSION	76
5.1	Die Zytokinkombination SCF, FL, TPO und IL-3 erweist sich als geeignet zur <i>ex vivo</i> Expansion.....	76
5.2	Die CD34- Selektion ist notwendig für eine optimale Expansion.....	78
5.3	Während der Kultivierung nimmt die Konzentration der Zytokine im unterschiedlichen Maße ab	79

5.4	Kultur dauern von mehr als 4 Tagen vermehren die Zellen ausreichend ohne Verlust der Repopulierungsfähigkeit.....	80
5.5	Das statische Kultursystem Teflonbeutel erweist sich anderen System gegenüber als überlegen.....	80
5.6	Die <i>ex vivo</i> Expansion gelingt unter Erhalt der Repopulierungsfähigkeit	82
5.7	Nicht alle Zellen zeigen die Fähigkeit zur Migration in das Sphäroid	83
5.8	Verschiedene Adhäsionsmarker haben unterschiedlichen Einfluß auf die Migration in das Sphäroid	84
5.9	Die Migration in das Sphäroid läßt sich Pertussis Toxin, aber nicht durch anderen Inhibitoren verschiedener Signalwege hemmen	87
5.10	Die Inhibition der kleinen GTPasen hemmt die Migration	89
5.11	Expandierte Zellen zeigen unterschiedliches Verhalten in den verschiedenen Migrations- und <i>Homing</i>-Assays	90
6	ABKÜRZUNGEN.....	93
7	LITERATUR	95
8	DANKSAGUNGEN.....	107

1 Zusammenfassung

Die Hämatopoese stellt den blutbildenden Prozeß dar, der den Menschen ein Leben lang mit Blutzellen versorgt und deren Ausgangspunkt eine kleine Zahl hämatopoetischer Stammzellen ist. Diese Stammzellen besitzen einerseits die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind andererseits in der Lage, durch Proliferation und terminale Differenzierung Zellen verschiedener Linien hervorzubringen. Das biologische Hauptmerkmal der Stammzelle ist die Fähigkeit die Hämatopoese zu rekonstituieren, was klinisch bei der Stammzelltransplantation genutzt wird. Überwiegend werden dabei Knochenmark und peripheres Blut als Quelle für Stammzellen genutzt, die abhängig von der Zahl der transplantierten Zellen zur völligen Rekonstitution der Blutbildung führen. Für Patienten ohne passende Spender wurde das Nabelschnurblut als Alternative in Betracht gezogen. Trotz verschiedener Vorteile der Stammzellen aus Nabelschnurblut besteht der Hauptnachteil in der sehr limitierten Zahl der Zellen mit dem erhöhten Risiko eines Transplantatversagens. Aus diesem Grund wird die *ex vivo* Vermehrung dieser Stammzellen derzeit zunehmend untersucht. Erforderlich sind Bedingungen zur ausreichenden Vermehrung der Zellen unter Erhalt der Stammzeleigenschaften, die die klinische Anwendung möglich machen. Diese Bedingungen waren bisher nicht erfüllt. Hauptziel dieser Arbeit war es demnach Kulturbedingungen für die Expansion von Stammzellen aus Nabelschnurblut zu etablieren, die den klinischen Anforderungen einer Transplantation genügen. Dafür wurden sowohl die determinierten Vorläuferzellen untersucht, als auch die Fähigkeit der Stammzelle *in vitro* Langzeithämatopoese aufrecht zu erhalten und zur Repopulierung der NOD/SCID-Maus. Die Repopulierung ist ein spezifischer Prozeß (*Homing*), bei dem die Migration der Zellen aus der Blutbahn durch die Endothelzellschicht der Gefäße in die spezialisierten Nischen des Knochenmarks erfolgt. Da für die Amplifikation äußere Stimuli erforderlich sind, welche die biologischen Eigenschaften der Zellen modulieren, wurden die Eigenschaften der expandierten Zellen in verschiedenen *in vitro* Assays wie CFU und LTC-IC untersucht, die derzeit als die besten Verfahren gelten, die hämatopoetische Stammzelle zu detektieren. Zur Untersuchung der Repopulierungsfähigkeit wurde das NOD/SCID-Mausmodell etabliert, in dem der Aufbau einer humanen Hämatopoese im murinen Knochenmark gemessen wird, sowie ein neues *in vitro* Modell entwickelt, das Stromazellsphäroid, mit dessen Hilfe die Migrationsfähigkeit untersucht wurde.

Mit der Kombination der auf primitive Stammzellen wirkenden Zytokine SCF, FL, TPO und IL-3 gelang eine gute und ausreichende Vermehrung der ontogenetisch unreifen und der determinierten Progenitorzellen nach Kultivierung der Zellen über 7 Tage. Das beim Einsatz

in der *ex vivo* Expansion umstrittene Zytokin IL-3 führte hierbei nicht zum befürchteten Verlust der Repopulierungsfähigkeit der expandierten Zellen. Es sorgte vielmehr durch eine starke Vermehrung der Zellen für ein Engraftment der NOD/SCID-Maus, das dem durch frische unmanipulierte Nabelschnurblutzellen vergleichbar war. Von den getesteten Kultursystemen erwies sich die statische Kultivierung im Teflonbeutel als geeignet zur Vermehrung der primitiven Progenitoren, ohne die Repopulierungsfähigkeit der expandierten Zellen zu vermindern. Durch die Wahl eines serumfreien, klinisch anwendbaren Mediums gelang somit die Etablierung eines Kultursystems zur optimierten *ex vivo* Expansion früher Progenitor- und Stammzellen aus Nabelschnurblut ohne Verlust der Repopulierungsfähigkeit für die klinische Anwendung.

Das *Homing* in das Knochenmark ist ein selektiver aus mehreren Einzelschritten bestehender Prozeß unter Interaktion der Zellen mit Endothelzellen und dem Knochenmarkstroma, der durch eine Vielzahl verschiedener zusammenwirkender Adhäsionsmoleküle reguliert wird. Weitere Faktoren, die das *Homing* beeinflussen sind Zytokine oder Chemokine. Diese Stimuli wirken über verschiedene intrazelluläre Signalwege, von denen die Rho-Proteinfamilie der kleinen GTPasen eine bestimmende Rolle in der Migration zugeordnet wird, sowie andere Bestandteile der intrazellulären Signaltransduktion, wie Kinasen und G-Proteine. Die Migration in das Sphäroidmodell ist ebenso ein selektiver und gerichteter Prozeß, bei dem neben den primären CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut auch andere humane hämatopoetische Zelllinien eine gerichtete Einwanderung zeigen. Durch Zugabe eines Inhibitors von G-Proteinen, Pertussis Toxin (PT), und Hemmung der kleinen GTPasen durch spezifische Toxine aus *Clostridien* konnte eine reproduzierbare und deutliche Verringerung der Migration in das Sphäroid erreicht werden. Die Migration hämatopoetischer Zellen in das Sphäroid erfolgt also unter Beteiligung der kleinen GTPasen, sowie PT sensitiver G-Proteine. Blockierungsversuche zeigten unerwarteterweise keine funktionelle Beteiligung des Chemokin-Rezeptorpaars SDF-1/CXCR4 und des Adhäsionsmoleküls VLA-4 bei der Migration in das Sphäroid. Welche weiteren Mechanismen für diese Migration bedingend sind erfordert weitergehende Untersuchungen.

Durch die Kultivierung von hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut mit den Zytokinen SCF, FL, TPO und IL-3 gelang eine ausreichende Vermehrung von frühen und determinierten Progenitorzellen unter Erhalt ihrer Stammzellfähigkeiten, so daß ein klinischer Einsatz möglich wird. Dabei ergab sich durch Untersuchung der Migrationsfähigkeit im Sphäroidmodell, daß beim *Homing* der Zellen die Aktivierung der kleinen GTPasen und eines Pertussis Toxin-sensitiven G-Proteins beteiligt sind.

2 Einleitung

2.1 Die Hämatopoese

Die Hämatopoese ist ein lebenslanger Prozeß, der über die Bildung hämatopoetischer Vorläuferzellen reife Blutzellen aus einem Pool pluripotenter, langzeitrepopulierender Stammzellen bereitstellt. Die Kurzlebigkeit vieler reifer Zellen erfordert einen Umsatz von täglich 10^{12} Blutzellen beim erwachsenen Menschen, was eine strenge Regulation durch stimulatorische und inhibitorische Wachstumsfaktoren (Zytokine) erfordert.

Die Hämatopoese findet beim Erwachsenen hauptsächlich im roten Knochenmark statt, also im Schädel, in den Rippen, im Becken und in den Epiphysen der Ober- und Unterschenkelknochen und in der Wirbelsäule. Das Knochenmark zeichnet sich durch für Ansiedlung, Proliferation und Ausreifung hämatopoetischer Zellen speziell geeignete Mikronischen, das Knochenmarkstroma, aus. Das Knochenmarkstroma besteht aus sieben verschiedenen Typen stromaler Zellen: Osteoblasten und Osteoklasten (knochenauf- und abbauende Zellen), Fettzellen, Bindegewebszellen (Fibroblasten), Knochenmarksmakrophagen, glatte Muskelzellen, sowie Gefäßendothelien [1, 2] und extrazelluläre Matrix. Die hämatopoetischen Zellen vermehren sich extravaskulär im Stroma und passieren erst nach Ausreifung die Wand der Knochenmarksgefäße (siehe Abb. 2.3.).

2.2 Die Stammzelle

Ausgang der Hämatopoese ist die pluripotente, undifferenzierte hämatopoetische Stammzelle. Aus einer relativ kleinen Zahl dieser sich nur langsam in den Zellzyklus begebenden Stammzellen gehen alle blutbildenden Zellen hervor [2]. Durch Proliferation und gleichzeitige Differenzierung der Stammzellen entstehen determinierte Vorläuferzellen der lymphoiden oder myeloiden Reihe (Abb. 2.1.). Je weiter Proliferation und Ausreifung voranschreiten, desto stärker ist die Zelle auf einen bestimmten Zelltyp festgelegt, zu dem sie ab einer gewissen Stufe endgültig ausdifferenziert. Zellen der lymphoiden Reihe reifen dabei zu T- und B-Lymphozyten sowie natürlichen Killer (NK-) Zellen heran, während aus myeloiden Vorläuferzellen, sowohl Erythrozyten als auch Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten werden können (Abb. 2.1.).

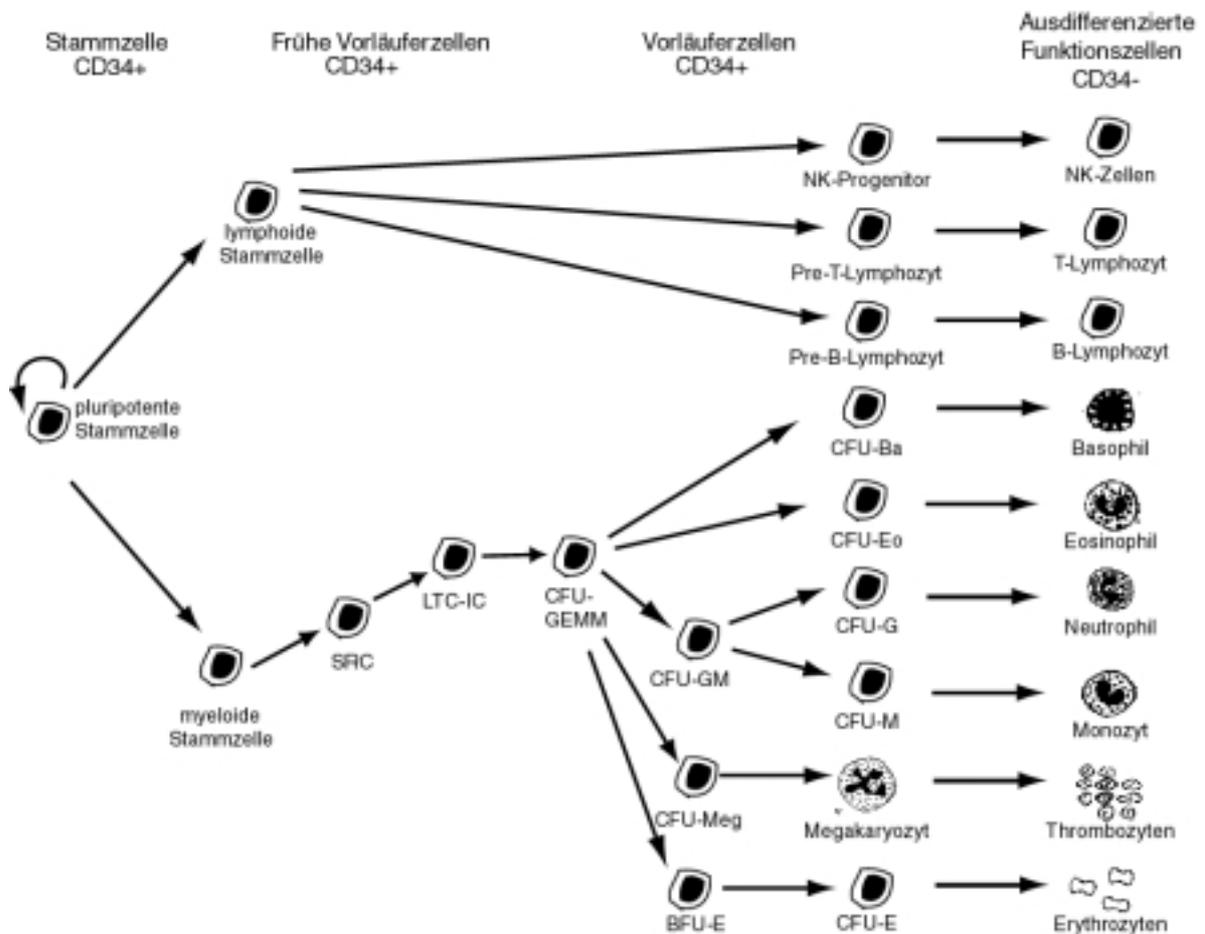


Abbildung 2.1. Die Hämatopoese. Durch Ausdifferenzierung der pluripotenten Stammzellen entstehen myeloide und lymphoide Vorläuferzellen, die zu Funktionszellen ausreifen. SRC = *scid repopulating cell*, LTC-IC = *longterm culture-initiating cells*, CFU = *colony-forming units*, BFU = *burst-forming units*, nach (Schmidt, 2000) [39]

Die hämatopoetischen Stammzellen besitzen drei wichtige Eigenschaften: sie haben extensive Selbsterneuerungskapazitäten, ein breites Differenzierungspotential und bleiben lange Zeit im ruhenden Zustand. Diese Fähigkeiten verlieren sich allmählich im Zuge der Differenzierung zur hämatopoetischen Vorläuferzelle. Die Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzelle geschieht im Normalfall durch asymmetrische Teilung, d.h. ein Teil der Tochterzellen behält die Eigenschaften der Stammzelle, während andere in den Differenzierungsprozess eintreten [3], der schließlich zur Bildung spezialisierter, nicht mehr teilungsfähiger Funktionszellen führt. Sowohl zufällige intrinsische molekulare Ereignisse als auch induzierende exogene Ereignisse, wie zum Beispiel der Stimulus durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren, sichern das Überleben, stimulieren die Proliferation und bestimmen die Prägung der Zellen [4].

Die hämatopoetische Stammzelle scheint zudem eine hohe Plastizität zu besitzen, die sie dazu befähigt, reprogrammiert zu werden und so in nicht-hämatologische Linien, wie z. B. Muskelzellen auszdifferenzieren [5-7].

2.3 Assays zur Detektion der Stammzelle

Während sich ausgereifte Zellen schon anhand ihres optischen Erscheinungsbildes identifizieren lassen, unterscheiden sich Stamm- und Vorläuferzellen morphologisch nicht deutlich von Lymphozyten. Die Analyse bestimmter Glykoproteine auf der Oberfläche bietet eine Möglichkeit Vorläuferzellen zu phänotypisieren. So tragen die frühen und reiferen Vorläuferzellen den Oberflächenmarker CD34. Mit der Ausreifung und –differenzierung zu determinierten Zellen verlieren die Progenitorzellen diesen Marker. Durch die Analyse der Oberflächenmoleküle läßt sich jedoch keine Aussage über die biologische Funktionalität der Progenitoren machen. Zu diesem Zwecke werden biologische Assays herangezogen (Abb.2.2.).

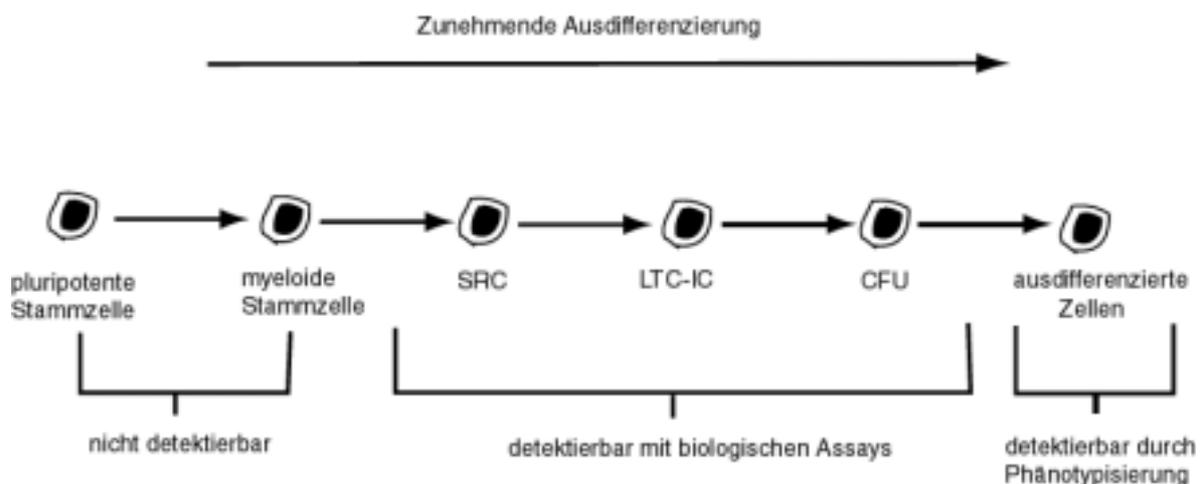


Abbildung 2.2. Die nicht detektierbaren Stammzellen lassen sich mit zunehmender Ausreifung anhand biologischer Assays, wie der NOD/SCID-Maus, der *in vitro* Langzeitkultur und den CFU-Assay detektieren. Die ausgereifte Zelle ist über ihre Oberflächenmarker detektierbar, nach (Schmidt, 2000) [39]

Die determinierten Vorläuferzellen verschiedener Differenzierungsgrade können durch Zellkultur in semisoliden Medien (z.B. Methylcellulose) nachgewiesen werden: Unter Einfluß spezifischer physiologischer Wachstumsfaktoren bildet eine Vorläuferzelle eine mikroskopisch sichtbare Kolonie von Tochterzellen, die soweit ausreifen, daß ihre Zugehörigkeit zu bestimmten Abschnitten des myeloiden Systems auch mikroskopisch erkennbar wird. Diese Kolonien werden als CFU (*colony-forming units*) bezeichnet.

Dagegen ist die frühe Vorläuferzelle oder Stammzelle funktionell definiert durch ihre Fähigkeit in das Knochenmark zu finden und dort lebenslang myeloide als auch lymphoide Zellen hervorzubringen (= Repopulation). Die Auswirkung von Wachstumsfaktoren und Kulturbedingungen auf die hämatopoetische Stammzelle wird mittels verschiedener Assays bestimmt, die auf der Fähigkeit der Stammzelle basieren, in der Langzeitkultur oder im

Transplantationsversuch Hämatopoese aufrecht zu erhalten. Dabei unterscheidet man die *in vitro* Hämatopoese der Stammzelle auf einer Schicht aus bestrahlten Stromazellen (*longterm culture* = LTC) und die *in vivo* Repopulation von sublethal bestrahlten NOD/SCID-Mäusen [4]. Die Xenotransplantation, d.h. Transplantation humaner Zellen, ist nur durch Verwendung immundefizienter NOD/SCID-Mäuse ohne spezifische Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten möglich, die das humane Transplantat nicht abstoßen können. Darüber hinaus werden die Mäuse bestrahlt, um auch unspezifische Abwehrzellen wie Makrophagen abzutöten.

Die Auswertung der LTC und Quantifizierung der LTC-IC (*longterm culture-initiating cells* = LTC-IC) genannten Zellen, erfolgt dabei nach 6 bzw. 8 Wochen [8-10]. Die Detektion der repopulierungsfähigen Zellen (*scid repopulating cells* = SRC) durch die Quantifizierung des Anteils humaner hämatopoetischer Zellen in NOD/SCID-Mäusen geschieht 6 Wochen nach Injektion der humanen Zellen durch Tötung der Mäuse. Dabei wird die Fähigkeit der SRC zur Etablierung einer vollständigen humanen Hämatopoese durch Bestimmung sowohl humaner lymphoider als auch myeloider Vorläuferzellen in der Maus verifiziert [11-14].

2.4 Hämatopoetische Wachstumsfaktoren

Die Hämatopoese ist reguliert durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine, die von stromalen Zellen des Knochenmarks oder anderen akzessorischen Zellen sezerniert werden. Die Regulation involviert eine komplexe Interaktion zwischen löslichen als auch membrangebundenen stimulatorischen und inhibitorischen Zytokinen.

In den letzten 30 Jahren wurden eine Reihe dieser Wachstumsfaktoren entdeckt, kloniert und rekombinant hergestellt. Viele der gefundenen Zytokine sind für die linienspezifische Ausdifferenzierung der Zellen (kolonienstimulierenden Faktoren (-CSF)) verantwortlich, wie Erythropoetin (EPO), das entscheidend bei der Ausreifung der myeloiden Zellen zu Erythrozyten beteiligt ist, sowie G-CSF oder GM-CSF, die für die Bildung der Granulozyten notwendig sind (Abb. 2.3.). Diese Faktoren wirken auf die determinierten hämatopoetischen Zellen. Anderen wird eine frühe Wirkung auf die primitiven Progenitorzellen zugeschrieben. Es besteht somit eine Hierarchie der Faktoren, die auf hämatopoetische Zellen unterschiedlicher Reifungsstufen wirken. Da in dieser Arbeit die Expansion primitiver Progenitoren und Stammzellen untersucht wird, werden vorwiegend frühwirkende Faktoren beschrieben.

Einer der ersten für die primitiven hämatopoetischen Zellen wichtigen entdeckten Faktoren ist der *stem cell factor*, das SCF. SCF ist für die normale Hämatopoese unentbehrlich, da Mäuse,

Bildung funktioneller Blutplättchen. Aber TPO hat außerdem eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und übt weitreichende Effekte auf die primitiven hämatopoetischen Zellen aus. Sowohl murine als auch humane hämatopoetische Zellen engraften das Knochenmark deutlich besser, wenn sie den Rezeptor für TPO tragen. TPO veranlasst hämatopoetischen Zellen beschleunigt in den Zellzyklus einzutreten, unterstützt das Überleben und die Proliferation der Zellen [21, 22].

Weitere Faktoren der Hämatopoese sind IL-3 und IL-6. Beide gehören zur Familie der Interleukine. IL-3 wirkt ebenfalls direkt auf die frühen Progenitoren, während IL-6 besonders auf die determinierten Vorläuferzellen (CFU) wirkt [23, 24].

Neben den löslichen und membrangebundenen Faktoren wurde in der letzten Dekade besonders auch die Rolle der Interaktion hämatopoetischer Stammzellen mit dem Knochenmarkstroma über Adhäsionsrezeptoren hervorgehoben. Diese Rezeptoren sind verantwortlich für die Residenz der Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark und für das *Homing*, d.h. das Finden und Einwandern dorthin. Adhäsionsmolekülen wird dabei eine Rolle in der Regulation des Zellverhaltens zugedacht: entweder durch Aktivierung intrazellulärer Signalwege oder durch die Modulation der Reaktion auf Wachstumsfaktoren [25].

2.5 Stammzellquellen

Als Stammzellquelle für fremdgespendete, also nicht eigene (= allogene) Stammzelltransplantate diente bisher das Knochenmark (KM) von verwandten oder nicht-verwandten Spendern. Durch Mobilisierung der Stammzellen, d.h. Ausschwemmen der Zellen aus dem Knochenmark in das Blut des Spenders, können seit einiger Zeit Stammzellen aus dem peripheren Blut (PB) von Spendern gewonnen werden. Im Falle beider Quellen müssen immunologisch passende Spender gefunden werden, deren Transplantationsantigene (HLA-Proteine) zu denen des Empfängers passen, da es sonst zu schweren Abstoßungsreaktionen kommt. Dabei wird entweder das Transplantat vom Empfänger nicht angenommen, man spricht von Transplantatversagen, oder die transplantierten Zellen wenden sich gegen das Empfängergewebe (*graft-versus-host-disease* = GVHD). Die Limitation für Stammzelltransplantation aus Knochenmark oder peripherem Blut liegt in der mangelnden Verfügbarkeit eines geeigneten Spenders. Bei nicht-verwandten Spendern ist dafür zum einen die Zeitdauer relevant, die benötigt wird, um einen geeigneten Spender zu finden (von einem Monat bis zu 6 Jahren [26]), zum anderen die begrenzte Verfügbarkeit von Spendern in bestimmten ethnischen Populationen. Obwohl weltweit mehr als 5 Millionen Freiwillige in Knochenmarkspender-Dateien registriert sind, haben auch Patienten mit einem der häufigsten

HLA-Merkmale nur eine ca. 80%ige Chance, einen HLA-identen Fremdspender zu finden [27]. Nur 40 % der Patienten, für die ein Spender gefunden wurde, erhalten tatsächlich ein Transplantat [28].

So wurde in den letzten 10 Jahren Nabelschnurblut (*cord blood* = CB) als eine alternative Quelle für allogene Stammzelltransplantationen bei Patienten mit fehlenden HLA-kompatiblen Spendern untersucht [29]. Die erste Transplantation mit Zellen aus Nabelschnurblut wurde 1988 von Gluckman *et al.* an einem Kind durchgeführt [30].

Die Vorteile der alternativen Stammzellquelle Nabelschnurblut liegen in der einfachen Gewinnung der Zellen und der höheren Verfügbarkeit an ethnischen Gruppen, die in den Knochenmarkspenderdateien unterrepräsentiert sind. Das Transplantat aus CB ist in der Regel virus- und tumorfrei, beinhaltet somit für den Empfänger weniger Risiko. Außerdem wird postuliert, daß Nabelschnurblut eine geringere Zahl an T-Zellen besitzt oder/und, daß diese unreifer sind [31]. Aus diesem Grund kann eine Transplantation über HLA-Schranken durchgeführt werden, ohne daß die GVHD-Rate wesentlich zunimmt [31, 32]. Die Zellzahl im Nabelschnurblut ist gering im Vergleich zu Transplantaten aus dem peripheren Blut oder Knochenmark. Da CB jedoch eine größere Zahl primitiver Zellen aufweist [11, 33], die eine höhere Proliferationsfähigkeit besitzen, [34, 35] bleiben Stammzellen aus CB eine Alternative zu Knochenmark- oder PB-Stammzellen. Rosler *et al.* haben die verschiedenen Stammzellquellen aufgrund ihres Repopulierungspotential direkt verglichen. Dabei zeigte sich, daß bei gleichzeitiger Injektion von CB und KM das Engraftment von CB dem von KM deutlich überlegen war [36].

2.6 Allogene Stammzelltransplantationen aus Nabelschnurbluttransplantaten

Da die Anzahl von Zellen im Nabelschnurblut gering ist, waren der Hauptteil der mit Nabelschnurblut transplantierten Patienten Kinder mit einem durchschnittlichen Gewicht von 20 kg. Vorteile im Vergleich zur Knochenmarktransplantation (KMT) waren eine geringere GVHD-Rate, Nachteil die verlängerte Zeit bis zum Wiedereinsetzen der Neutrophilen- und Plättchenbildung im Vergleich zur allogenen KMT. [28, 31].

Es wurde berichtet, daß eine höhere Dosis an kernhaltigen Zellen einen positiven Einfluß auf das Wiedereinsetzen der Blutbildung hat [37]. So ist einer der prädiktiven Faktoren für das Überleben eine Dosis von mehr als $3,7 \times 10^7$ kernhaltiger Zellen (MNC) pro kg Körpergewicht. Daraus ergibt sich eine Limitierung für erwachsene Patienten, für die ein hinreichend großes Transplantat mit ausreichenden Zellzahlen oft nicht zur Verfügung steht. Ein Ansatz zur

Überwindung dieser Limitierung ist die Vermehrung der Zellen aus Nabelschnurtransplantaten. Durch die *ex vivo* Expansion von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurbluttransplantaten sollen ausreichend Zellen generiert werden, um einen erwachsenen Patienten nach einer Hochdosis-Chemotherapie zu rekonstituieren.

2.7 Kultivierungsmethoden

Die Kultivierung hämatopoetischer Zellen muß in jedem Fall an die speziellen Ziele und die verwendeten Zelltypen angepasst werden. Die Stamm- und Vorläuferzellen wachsen *in vivo* in einem gewebsartigen Verbund mit stromalen Zellen und Extrazellulärmatrix. Bei den Kultivierungstechniken für frühe Zellen sind daher zwei Strategien auszumachen, die stromahaltigen und die stromafreien Kulturen. In stromahaltigen Kulturen versucht man, durch eine Kokultivierung der hämatopoetischen Zellen mit primären stromalen Zellen oder stromalen Zelllinien die Situation im Knochenmark nachzuahmen. In stromafreien Kultursystemen entfällt die Regulation durch das Stroma. Die Kultur muß daher durch Zugabe von löslichen Zytokinen reguliert werden. Die Zusammensetzung der Zytokinmischung spielt dabei eine Schlüsselrolle für den Verlauf der Kultur.

Der Einsatz von stromahaltigen Kulturen bei der klinischen Anwendung ist kritisch zu beurteilen, da bei CB keine stromalen Zellen des Spenders zur Verfügung stehen. Man muß daher auf das Stroma eines Fremdspenders oder eine stromale Zelllinie ausweichen.

Im technisch einfacheren stromafreien Kultursystem entfällt dieses Problem, weswegen dieses System zur klinischen Anwendung vorzuziehen ist.

Seit den 70er Jahren wird die Kultivierung hämatopoetischer Zellen beschrieben [38]. Die meisten Kulturen fanden in statischen, also ungerührten Systemen statt, in herkömmlichen Gewebekulturschalen oder -platten. In diesem System ist jedoch keine Kultivierung im klinischen Maßstab durchführbar, weswegen in den letzten 10 Jahren komplexere Systeme für hämatopoetische Zellen entwickelt wurden. Mit Ausnahme von Suspensionsspinnern konnte keines der Systeme einen Vorteil gegenüber den statischen Kulturen aufweisen [39]. Von den statischen Systemen zeigte sich die Beutelkultur als gut anwendbar [40]. Diese Teflonbeutel sind ein einfaches Kultursystem auch für größere Maßstäbe. Die Wände des Beutels sind für eine Sauerstoffversorgung der Zellen gaspermeabel, sonst ist das System komplett abgeschlossen.

2.8 Allogene Transplantationen mit expandiertem Nabelschnurblut

Bisher gab es nur einige wenige klinische Studien mit verschiedenen Kulturbedingungen zur *ex vivo* Expansion von CB-Zellen und anschließender Transplantation von Patienten. Shpall *et al.* transplantierten Krebspatienten mit einer Kombination von unmanipuliertem und expandiertem Nabelschnurblut [41]. Die Expansion erfolgte über 10 Tage mit SCF, G-CSF und TPO. Alle Patienten zeigten nach einer medianen Zeit von 25 Tagen (von 15 bis 35 Tage) ein Anwachsen (= Engraftment) der Neutrophilen. Das bedeutet ein schnelleres Engraftment im Vergleich zur Transplantation von unexpandierten CB-Zellen in Patienten mit einem Gewicht über 45 kg. Eine signifikante Zahl von Patienten, die eine geringe Anzahl von Zellen pro kg bekommen haben, erleben eine extensive Neutropenie, d.h. ein Fehlen von Neutrophilen, und daraus resultierende Komplikationen, wie Infekte. Der Einsatz expandierter Zellen könnte die potentiellen Risiken einer ausgedehnten Neutropenie reduzieren [28].

2.9 Homing und Engraftment von hämatopoetischen Zellen

Obwohl seit mehr als 30 Jahren Stammzellen erfolgreich transplantiert werden, bleibt unklar wie die intravenös infundierten Stammzellen in das Mikroenvironment des Knochenmarks finden und dort einwandern (*Homing*). In Mausversuchen repopulieren nur etwa 10 % der infundierten Stammzellen das Knochenmark [42], der Rest verliert sich im Gefäßsystem. Das macht das *Homing* der Stammzellen zu einem höchst selektiven Prozess, der vermutlich durch spezielle *Homing*-Rezeptoren (wie zum Beispiel CXCR4) oder durch die Methode des selektiven Einfangens, der Zurückhaltung oder eines Überlebensvorteil der Stammzelle durch das Knochenmark vermittelt wird. *Homing* von hämatopoetischen Stammzellen kann definiert werden als die Fähigkeit der Zellen das Knochenmark selektiv zu suchen, mit ihm zu interagieren, um anschließend in ihm eine Nische zu finden und dort Hämatopoese zu initiieren [43].

Das *Homing* umfasst dabei mehrere Phasen. So entwirft Springer *et al.* [44] ein Modell mit mindestens 4 Schritten, die in Abb. 2.4. dargestellt sind: Zu Beginn verlassen die Zellen den Blutstrom durch leichte Adhäsion an den Endothelzellen der Knochenmarksgefäße (Abb. 2.4. **A**). Sie werden dadurch verlangsamt und es kommt zu einem Abrollen der hämatopoetischen Zellen an der Gefäßwand, *rolling* genannt. Anschließend heftet sich die hämatopoetische Zelle fest (Arrest) an die Endothelzellen der Gefäßwand (Abb. 2.4. **B**). Sie verlässt das Gefäß durch Migration durch die Endothelschicht (Abb. 2.4. **C**). Zum Schluß bewegt sich die Zellen durch die Stromazellen des Knochenmarks bis zum Erreichen der Stammzellnische (*lodgement* (Abb. 2.4. **D**)).

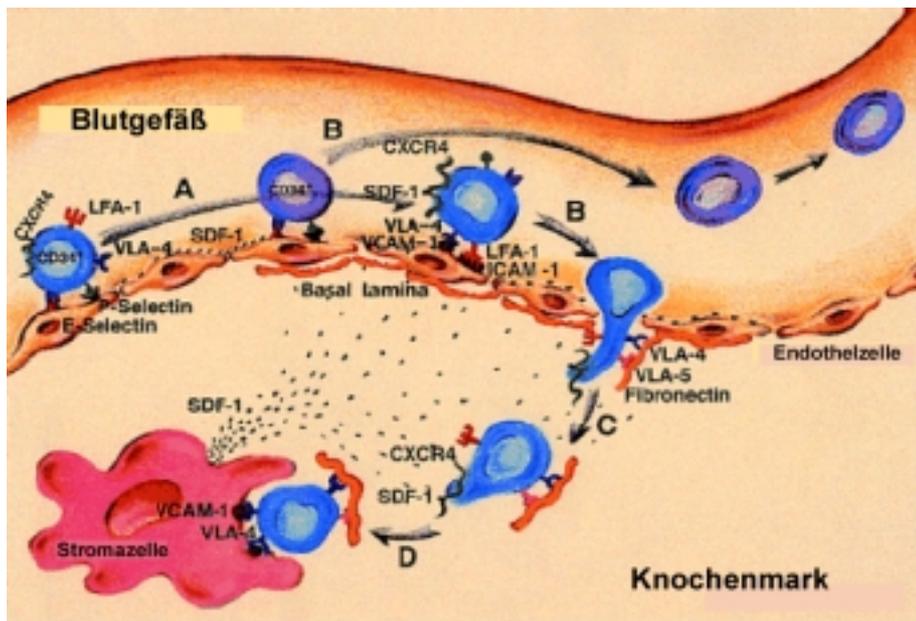


Abbildung 2.4. Modell des selektiven Einwanderns von hämatopoetischen Stammzellen in das Knochenmark (*Homing*). Die Zellen werden durch Adhäsionsmoleküle an der Gefäßwand verlangsamt (A), heften sich an (B) und verlassen das Gefäß (C). Abschließend bewegen sie sich durch das Knochenmark, um eine passende Nische zu suchen (D). Der Stimulus zum Einwandern ins Knochenmark sind Chemokine, die von stromalen Knochenmarkszellen gebildet werden. Nach (Peled *et al.*, 2000) [47]

2.10 Adhäsionsmoleküle

An jedem einzelnen der in Abbildung 2.4. gezeigten Schritte sind verschiedene Adhäsionsmoleküle beteiligt, deren Rolle beim *Homing* von Stamm- und Progenitorzellen als essentiell beurteilt wird [25] und Ziel vieler Untersuchungen ist. Man unterscheidet dabei verschiedene Familien von Adhäsionsmolekülen, die auf den Stamm- und Vorläuferzellen und den stromalen Zellen der Nischen exprimiert werden: die Integrinfamilie, die Immunglobulinfamilie, die Selektine, die Sialomucine sowie andere [2].

Rezeptorfamilie	Rezeptor	Ligand
Integrine	VLA-4	Fibronectin, VCAM-1
	VLA-5	Fibronectin
	VLA-6	Laminin
	LFA-1	ICAM-1
Selektine	L-Selektin	CD34
Sialomucine	CD34	L-Selektin
	CD164	nicht bekannt
andere	CD44	Hyaluronsäure, Kollagen, Fibronectin

Tabelle 2.1. Adhäsionsrezeptoren, die von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert werden, geordnet nach Familien, und ihre Liganden

Dabei kommt den Integrinen eine besonders dominante Rolle zu, wie *in vivo* Versuche gezeigt haben: Die Blockierung des α_4 -Integrins VLA-4 und seines Liganden VCAM-1 durch Antikörper verhindert *in vivo* das *Homing* sowohl von murinen [45] als auch humanen [46, 47] Progenitoren in das Knochenmark der Maus. VLA-4 ist sowohl an Zell-Zell- als auch an Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt und benutzt dazu seine wichtigsten Liganden VCAM-1 und Fibronectin. LFA-1 gehört ebenfalls zur Familie der Integrine, zu den β_2 -Integrinen und wird von unreifen humanen CD34⁺-Zellen exprimiert [47]. LFA-1 tritt in Wechselwirkung mit ICAM-1, das auf der Oberfläche von Endothelien und stromalen Knochenmarkszellen exprimiert wird, und ist notwendig für die transendotheliale Migration hämatopoetischer Progenitorzellen [48].

Einige weitere wichtige Integrine, die von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert werden und ihre Liganden sind in Tabelle 2.1. aufgeführt. Integrinen fehlt, wie allen Adhäsionsrezeptoren, eine intrinsische Kinase-Aktivität, sie müssen somit andere Nichtrezeptor-Kinasen rekrutieren. Über diese kommt es zur Vernetzung mit verschiedenen Signalwegen, so auch mit dem Ras/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg, der die kleinen GTPasen mit einbezieht [25].

Der Marker für die Stamm- und Progenitorzellen, CD34, gehört zu der Familie der Sialomucine, die eine Rolle als Adhäsionsrezeptor und Korezeptor während des *Homings* der hämatopoetischen Zellen spielen [2]. CD34 wirkt *in vivo* hauptsächlich als negativer Regulator der Differenzierung und Proliferation von hämatopoetischen Progenitoren und dirigiert Leukozyten in lymphoide und nicht-lymphoide Gewebe. Die Bedeutung von CD34 bei der Adhäsion von hämatopoetischen Vorläuferzellen an das Knochenmarkstroma ist unklar, wobei die Möglichkeit als Regulator der Adhäsion diskutiert wird [2]. Andere Mitglieder der Familie der Sialomucine sind CD164, dem eine Schlüsselrolle in der Hämatopoese durch Erleichterung der Bindung von CD34⁺-Zellen an Knochenmarksstroma zugesprochen wird, CD45 und CD162, der Ligand von P-Selektin [2].

2.11 Chemokine

Die beschriebenen Rezeptor/Liganden Interaktionen sind trotz allem noch nicht ausreichend, um im Detail die Migration, das *Homing* und das *Lodgement* während der Hämatopoese zu beschreiben. Viele dieser Prozesse beruhen sicher auf der Koexpression oder Aktivierung von Adhäsionsrezeptoren und ihrer Liganden durch Zytokine, Chemokine und deren Rezeptoren. Chemokine sind Moleküle, die selektiv Leukozytenpopulationen anziehen und aktivieren können. Einige Chemokine werden konstitutiv exprimiert und haben eine Funktion in dem

physiologischen Durchstreifen und *Homing* der Leukozyten als auch der Stamm- und Vorläuferzellen [25]. Besonders beachtet ist dabei das Chemokin SDF-1 mit seinem Rezeptor CXCR4 (Abb. 2.4.).

SDF-1 (*stroma-derived factor-1*) gehört zur CXC-Subfamilie von Chemokinen und wird unter anderem von stromalen Fibroblasten exprimiert [49]. Es ist ein potenter chemotaktischer Faktor für reife Leukozyten, wie T-Zellen, aber auch für CD34⁺-Progenitorzellen [50, 51]. Sein Rezeptor CXCR4 oder Fusin, ein G-proteingekoppelter Rezeptor, ist bekannt als Korezeptor bei der Infektion der Zellen mit dem HIV und ist in den Geweben weit verbreitet [52, 53]. Bei den hämatopoetischen Progenitorzellen ist seine Expression besonders hoch auf den primitiveren CD34⁺CD38⁻ Zellen [54]. Die Bedeutung dieses Liganden/Rezeptorpaars im *Homing* und Engraftment von hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde deutlich, nachdem gezeigt wurde, daß das Engraftment von CD34⁺-CB-Zellen in der NOD/SCID-Maus abhängig ist von der Expression von CXCR4 und der Fähigkeit *in vitro* auf den Stimulus von SDF-1 zu wandern [55].

Besonders auf lymphatischen Zellen [56, 57] aber auch auf CD34⁺-Progenitorzellen ist der Chemokinrezeptor CXCR3 exprimiert [58]. Seine chemotaktische Aktivität wird vermittelt durch seine Liganden MIP und IP-10 [59], die bevorzugt durch Interferon- γ induziert werden. Die Bedeutung von CXCR3 in der Chemotaxis von T- und B-Lymphozyten ist unbestritten [57, 60, 61], doch seine Rolle bei der Migration von hämatopoetischen Zellen ist kontrovers. So beobachten Jinquan *et al.* eine von IP-10 und MIG induzierte Chemotaxis von CD34⁺-CFU [58], während andere keine chemotaktische Wirkung auf CD34⁺-Zellen sehen [62].

2.12 Die kleinen GTPasen der Rho-Proteinfamilie

Bisher ist wenig bekannt über die Signalwege, welche die Zelle benötigt, um sich durch dreidimensionale Strukturen zu bewegen. Neben der Signalvermittlung in die Zelle und innerhalb der Zellen spielen die kleinen GTPasen der Rho-Familie eine wichtige Rolle bei der Mobilität von Zellen. Diese Proteine sind ubiquitär in allen Spezies exprimiert [63]. Wie alle GTPasen oszillieren sie zwischen einem inaktiven, GDP-bindenden und einem aktiven, GTP-bindenden Zustand (Abb. 2.5.). Ihre Regulation wird durch den gegensätzlichen Effekt von *guanin nucleotide exchange factors* (GEFs) und *GTPase-activating proteins* (GAPs) erreicht. Prototyp der Familie der kleinen GTPasen ist das Ras-Molekül [63, 64].

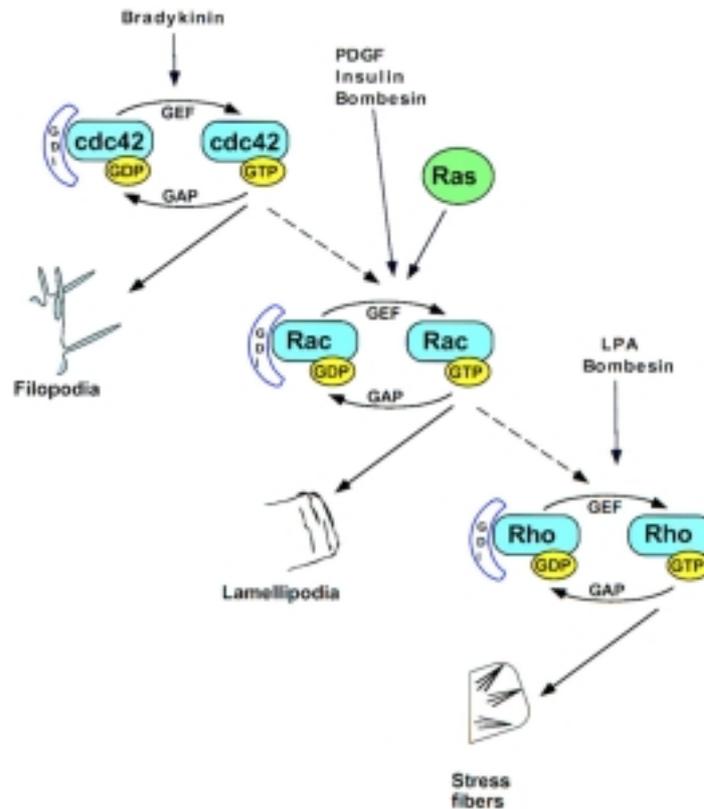


Abbildung 2.5. Einfluß der kleinen GTPasen Cdc42, Rac und Rho auf die Zellmotilität. Die Aktivierung erfolgt durch extrinsische Signale vermittelt durch G-proteingekoppelte Rezeptoren oder intrinsisch durch verschiedene Signalwege. Die GTPasen interagieren miteinander. Die Regulation erfolgt über Austauschfaktoren (GEFs und GAPs). Nach (Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997) [63]

Die Rho-Familie besteht aus den kleinen GTPasen Cdc42, Rac und Rho, die als Schlüsselfiguren der Regulation des Aktinzytoskelett und von adhäsiven Strukturen in Antwort auf extrinsische Signale gelten. So läßt sich durch die Aktivierung G-proteingekoppelter Rezeptoren, wie für Bradikinin oder Bombesin, je nach Aktivierung einer bestimmten kleinen GTPase spezifische zelluläre Strukturen ausbilden (Abb. 2.5.): Aktivierung des Rho-Proteins induziert die Bildung von Stressfasern, die Aktivierung von Rac die Formation von Lamellipodien und von Cdc42 die Ausbildung von Filopodien [65]. Zellmotilität ist ein dynamischer Prozeß, der die zeitliche und räumliche Koordination des Zytoskeletts erfordert. Die Balance und Koordination der Aktivität von Rho, Rac und Cdc42 machen den endgültigen Effekt auf die Reorganisation des Zytoskeletts aus [66]. Wechselwirkungen zwischen den Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Zelle und den Signalwegen, in die kleine GTPasen involviert sind, sind möglich. So aktivieren Integrine die *focal adhesion kinase* (FAK) oder verwandte Kinasen, die auch den Ras/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg aktivieren [25]. Proteaseaktivität könnte ein zusätzlicher Mechanismus sein, durch den GTPasen die extrazelluläre Matrixdegradation und Invasion modulieren [66].

2.13 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Kulturbedingung zu entwickeln, die die *ex vivo* Expansion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut ermöglicht. Um die Zellen dabei nicht auszudifferenzieren, also um ihr Stammzellpotential zu erhalten, müssen geeignete Zytokinkombinationen identifiziert werden. Dabei werden die differenziellen Effekte der Expansion auf unterschiedliche Progenitor- und Zellpopulationen untersucht. Unter Berücksichtigung biotechnologischer und verfahrenstechnischer Aspekte soll ein Kultursystem entwickelt werden, das den GMP-Richtlinien folgt. Die Etablierung erfordert dabei die Identifikation klinisch einsetzbarer Medien, geeigneter Zellkonzentrationen sowie Kulturdauern.

Da über den Prozeß des *Homings* bisher wenig bekannt ist, Kenntnisse über die inter- und intrazellulären Mechanismen aber eine gezielte Manipulation der transplantierten Zellen erlauben würden, sollen die Mechanismen des *Homings* näher untersucht werden. Mit Hilfe eines dreidimensionalen *in vitro* Modells aus stromalen Fibroblasten sollen dazu die Migrationseigenschaften der humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen untersucht werden. Die Untersuchungen umfassen dabei neben den primären Zellen auch hämatopoetische Zelllinien. Um eine Erhöhung des Anteils repopulierter Zellen im Knochenmark des Empfängers zu erreichen und somit eine verbesserte Rekonstitution der Hämatopoese im Patienten, sollen die Moleküle identifiziert werden, die die Migration der hämatopoetischen Zellen im stromalen Umfeld ermöglichen. Des Weiteren sollen die intrazellulären Signalwege, die in diesen Migrationsprozeß involviert sind, ermittelt werden

3 Material und Methoden

3.1 Material

Brutschränke:

BBD 6220

Heraeus, BRD

CO₂-Auto-Zero

Heraeus, BRD

Einfrierboxen

Nalgene

FACScan

BD Becton Dickinson, USA

FACScalibur

BD Becton Dickinson, USA

Software für FACS-Analyse

PC Lysis, Win MDI, Cellquest

Laminarflow HeraSafe

Heraeus, BRD

Mikroskope:

Axiovert 25

Zeiss, BRD

CH2

Olympus, Japan

Labovert

Leitz, BRD

Pipettierhilfe

Hirschmann Laborgeräte, BRD

Spinner-Rührgerät Biosystem 4B

H+P Labortechnik GmbH, BRD

Vortexer

IKA Labortechnik, BRD

37° C-Wasserbad GFL 1083

Zentrifugen:

Rotina 46R

Hettich, BRD

Megafuge 1.0R

Heraeus, BRD

Varifuge K

Heraeus, BRD

FACS-Cellwash

BD Becton Dickinson, USA

FACS-Röhrchen

Falcon, Becton Dickinson Labware, USA

FACS-Lysing Solution

BD Becton Dickinson, USA

Filteraufsatz, 0,22 µm Millex-GV

Millipore, Frankreich

Gewebekulturschalen (35/10 mm) Cellstar

Greiner Labortechnik, BRD

Kanüle 15Gx1,5'' Neoject

Dispomed Witt oHG, BRD

Kollagenträger-unweighted collagen microspheres

Cellex Biosciences Inc., USA

Kryoröhrchen

Nalge Nunc International, Dänemark

12-Lochplatte, Costar, flat bottom

Corning Incorporated, USA

24-Lochplatte	Corning Incorporated, USA
96-Lochplatte, Cellstar, flat bottom	Greiner Labortechnik, BRD
Neubauer Kammer	Superior Marienfeld, BRD
1 und 2 ml Einmalpipetten	Falcon, Becton Dickinson Labware, USA
5, 10 und 25 ml Einmalpipetten	Greiner Labortechnik, BRD
15 und 50 ml Röhrchen	Falcon, Becton Dickinson Labware, USA
1 ml Luer Spritzen	Dahlhausen, BRD
5, 10, 20 ml-Spritzen	B.Braun Melsungen AG, BRD
FEP Teflonbag VueLife, 7ml	Afc, USA bezogen durch: Cellgenix, BRD
6,5 mm Transwell, 5 µm Porengröße	Corning Incorporated, USA
Zellsieb 70µm	Falcon, Becton Dickinson Labware, USA
Zellkulturflaschen: 25, 75, 150 cm ²	IBS, Integra Biosciences,
MACS-Säulen:	
MS ⁺ und VS ⁺ Separation Columns	Miltenyi Biotec, BRD
CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, BRD
Filterchen, Steri-Dual	Miltenyi Biotec, BRD

3.2 Antikörper, Enzyme, Zytokine und Chemokine

Humane Antikörper:

Anti-CD3	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD4	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD7 FITC-konjugiert	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD8	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD11a FITC-konjugiert	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD13	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD14 (MΦP9) FITC-konjugiert	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD15	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD19 (4G7) FITC-, PE- konjugiert	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD29 (MAR4) PE-konjugiert	BD Pharmingen, USA
Anti-CD33(WM53) Pe-konjugiert	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD34 (8G12) FITC-, PE-, PerCP-konjug.	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD38 (AT13/5) FITC-konjugiert	DAKO, Dänemark
Anti-CD45 FITC-konjugiert	BD Becton Dickinson, USA

Anti-CD45 PE-konjugiert	BD Pharmingen, USA
Anti-CD45 PerCP-konjugiert	BD Becton Dickinson, USA
Anti-CD49d (9F10) PE-konjugiert	BD Pharmingen, USA
Anti-CD49e (IIA) PE-konjugiert	BD Pharmingen, USA
Anti-CD106 FITC-konjugiert	Cymbus Biotechnology
Anti-CXCR3 (49801.111) FITC-konjugiert	R&D Systems GmbH, BRD
Anti-CXCR3 (1C6) monoklonal	BD Bioscience, USA
Anti-CXCR4 (Fusin, 12G5) PE-konjugiert	BD Pharmingen, USA
Anti-CXCR4 (12G5) monoklonal	R&D Systems GmbH, BRD
Anti-IgG ₁ FITC- oder PE-konjugiert	BD Becton Dickinson, USA
Anti-IgG ₁ , monoklonal	Immunotech S.A., Frankreich
Anti-VLA4 (2B4) monoklonal	R&D Systems GmbH, BRD
Anti-VLA5 (JBS5) monoklonal	Serotec, UK
Anti-LFA1	Serotec, UK
Anti- β_1 -Integrin (3S3)	Serotec, UK

Murine Antikörper:

Anti-CD45 (30-F11) PE-konjugiert	BD Pharmingen, USA
Anti-CD45Ro/B220 (RA3-6B2) FITC-konjugiert	BD Pharmingen, USA

ELISA-Kits:

Quantikine-ELISA Kits von FL, IL-3, SCF, TPO	R&D Systems GmbH, BRD
---	-----------------------

3.3 Chemokine und Zytokine

Hum. EPO	Boehringer Mannheim, BRD
Hum. b-FGF	Cell Concepts GmbH, BRD
Hum. FL	R&D Systems GmbH, BRD
Hum. GM-CSF	Essex Pharma GmbH, BRD
Hum. IP-10	Cell Concepts GmbH, BRD
Hum. IL-3	Sandoz AG, BRD oder R&D Systems GmbH, BRD
Hum. IL-6	R&D Systems GmbH, BRD
Hum. MIG	Cell Concepts GmbH, BRD

Hum. SCF	R&D Systems GmbH, BRD
Hum. SDF- β	R&D Systems GmbH, BRD
Hum. TPO	R&D Systems GmbH, BRD
Hum. Anti-TGF- β	R&D Systems GmbH, BRD
Hum. VEGF	Cell Concepts GmbH, BRD

Enzyme:

DNase I	Boehringer Mannheim, BRD
Kollagenase	GibCo BRL Lifetechnologies

3.4 Zelllinien

BA/F3	murine B-Vorläuferzelllinie, IL-3 abh.
BV-173	hum. B-Zelleukämie (CML, Ph+)
32D	murine Knochenmarkzelllinie, Faktorabh.
HBMEC-60	humane Knochenmarksendothelzelllinie
HL-60	humane AML Zelllinie
K-562	humane CML Zelllinie (Ph+)
M2 10B4	murine Stromazelllinie
NK-92	humane natürliche Killerzelllinie
Nalm-6	hum. B-Zelleukämie (ALL, Ph-)
SL/SL	murine Stromazelllinie, exprimiert humanes IL-3 und SCF
Sup-B15	hum. B-Zelleukämie (ALL, Ph+)
TF-1	humane Erythroleukämie
Tom-1	hum. B-Zelleukämie (ALL, Ph+)
U-937	humane Monozyten-Zelllinie

3.5 Lösungen

7-AAD (200 μ g/ml)	Sigma-Aldrich, BRD
Agarose „High Grade“	Eurogentec
Dextran 40 (Longasteril 40)	Fresenius AG, Deutschland
DMSO	Fluka Chemie GmbH, Schweiz
EDTA (Titriplex)	Merck KG, BRD
Ethanol	J.T. Baker, Niederlande

Ficoll (Biocoll Separation Solution)	Biochrom AG, BRD
Formaldehyd	Riedel de Haen GmbH, BRD
Gelatine	BioRad, USA
Glutamin 200 MM	GibCo BRL Lifetechnologies
Genistein	Sigma-Aldrich, BRD
Geneticin 50 mg/ml	GibCo BRL Lifetechnologies
Heparin-Natrium (Liquemin)	Hoffmann-La Roche AG, Schweiz
Hepes 1 M	GibCo BRL Lifetechnologies
Hydrocortison (Solu-Decortin)	Merck, BRD
Hygromycin B	Calbiochem, USA
Isopropanol	J.T. Baker, Niederlande
LY 294002	Sigma-Aldrich, BRD
β -Mercaptoethanol 50 mM	GibCo BRL Lifetechnologies
Natriumazid	Riedel de Haen GmbH, BRD
Pertussis Toxin	Calbiochem, USA
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml bzw. 10000 μ g/ml)	GibCo BRL Lifetechnologies
STI 571	Novartis, Schweiz
Trypanblau 0,4 %	GibCo BRL Lifetechnologies
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, BRD
Türksche Lösung	Merck, BRD
Tyrphostin AG 490	Sigma-Aldrich, BRD

Die im Abschnitt 4.2.1.10 verwendeten Toxine wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Klaus Aktories, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg zur Verfügung gestellt.

3.6 Medien

BSA (Fraktion V)	Sigma-Aldrich, BRD
Cellgro SCGM	Cellgenix, BRD
FCS	Hyclone, Greiner Labortechnik, BRD
Humanes Frischplasma (Quarantäne AB)	Blutspendedienst Hessen gGmbH
HS	Serva, Greiner Labortechnik, BRD
IMDM	Biochrom, BRD

M 199 (Earle's Salze, Glutamin, 25 MM Hepes)	GibCo BRL Lifetechnologies
Methocult GF H4434	StemCell Techn. Inc., Canada
PBS (Dulbecco's)	BioWhittaker, USA
RPMI	GibCo BRL Lifetechnologies
StemSpan SF Expansionmedium	StemCell Techn. Inc., Canada
StemAlpha α	StemAlpha SARL, Frankreich
X-vivo 10 (mit Gentamycin und Phenolrot)	BioWhittaker, USA

3.7 Angesetzte Puffer oder Medien

3.7.1 Auftaupuffer mit DNase I

100ml RPMI 1640

200 U/ml DNase I (sterilfiltrieren)

3 mM MgCl₂ (20 mM) => 150 μ l

10 % Hyclone FCS

3.7.2 Einfriermedium 1

RPMI 1640

20 % FCS

3.7.3 Einfriermedium 2

RPMI 1640

20 % DMSO

3.7.4 FACS-Puffer

PBS (unsteril)

0,1% Natriumazid

1% FCS

3.7.5 FACS-Fixierung

PBS (unsteril)

2% Formaldehyd

3.7.6 1 % Gelatine-Stocklösung

5 g Gelatine auf 500 ml aqua dest., dann autoklavieren.

Einzusetzen als 0,1 %ige Lösung, 50 ml 1:10 mit aqua dest. verdünnen, dann autoklavieren

3.7.7 HBMEC-Medium

M 199

10 % humanes Frischplasma

10 % FCS

1 ng/ml bFGF

5 U/ml Heparin

1 % Glutamin

1 % Pen/Strep

100 µg/ml Geneticin (G418)

3.7.8 HL-60 Medium

RPMI 1640

10 % Hyclone FCS

auch einzusetzen bei der Kultivierung von:

Nalm-6, BV-173, Sup-B15, Tom-1

3.7.9 MACS-Puffer

PBS

0,5 % BSA

0,93 g EDTA (Triplex, in etwas PBS lösen, sterilfiltrieren)

1 % Pen/Strep

3.7.10 Medium für primäre Fibroblasten

RPMI 1640

15% Hyclone FCS

1% Glutamin

1% Pen/Strep

3.7.11 Methylcellulose

20 ml Methylcellulose (2,5 %)

12 ml FCS

1,5 µl EPO

400 µl G-CSF (300 µg/ml)

400 µl IL-3 (250 ng/µl)

400 µl GM-CSF (500 µg/ml)

400 µl Glutamin

400 µl β-Mercaptoethanol (5mM)

400 µl Pen/Strep

3 ml IMDM

3.7.12 M2-10B4-Selektionsmedium

500 ml RPMI 1640

10 % FCS

4 ml Geneticin

77,9 µl Hygromycin B

4 ml 1 M HEPES (filtriert)

3.7.13 Reaktormedium

IMDM

12,5 % FCS

12,5 % HS

1 % Glutamin

1 % Pen/Strep

3.7.14 Serumfreies Kulturmedium

X-vivo 10

1 % BSA

1 % Glutamin

2×10^{-6} mmol/ml Hydrocortison (Solu-Decortin)

3.7.15 SI/SI-Selektionsmedium

500 ml RPMI 1640

10 % FCS

8 ml Geneticin

162 µl Hygromycin B

8 ml 1 M HEPES (filtriert)

3.7.16 Sphäroidmedium

IMDM

10 % Hyclone FCS

3.7.17 TF-1 Medium

RPMI 1640

10 % Hyclone FCS

10 ng/ml GM-CSF

10 ng/ml IL-3

3.8 Methoden

3.8.1 Zellzahlbestimmung

20 µl Zellsuspension werden mit 20 µl Färbelösung gemischt. Dabei werden Mononukleäre Zellen (MNC) 1:5 mit PBS verdünnt und aufgereinigte CD34+ Zellen unverdünnt eingesetzt. Zur Bestimmung der Zellzahl und Viabilität werden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Diese Lösung kann nur durch die Zellmembran toter Zellen eindringen und färbt das Zytoplasma blau. Lebende Zellen bleiben durchsichtig weiß und lassen sich so von den toten Zellen unterscheiden.

Um den Anteil kernhaltiger Zellen zu bestimmen, wird die Zellsuspension mit Türk'scher Lösung angefärbt. Diese Lösung färbt Kerne schwarz, unterscheidet aber nicht zwischen lebendigen und toten Zellen.

Die Auszählung der Zellen erfolgt in der Neubauer-Kammer. Die Zellzahl pro ml ergibt sich wie folgt:

Gezählte Zellen : Anzahl der gezählten Kästchen * Verdünnungsfaktor * 1×10^4 = Zellen pro ml

3.8.2 Kultivierung von Zellen

3.8.2.1 Adhärente Zellen

Für die Anzucht adhärenter stromaler Zellen wird der Inhalt einer kryokonservierten Probe in einer Gewebekulturflasche inokuliert. Am folgenden Tag folgt ein Mediumwechsel, um die Zellen von dem restlichen DMSO zu befreien. Die Anzucht erfolgt mit IMDM/10% FCS, während die normale Stammhaltung unter Selektionsdruck mit Hygromycin B und Geneticin erfolgt. Die Kultivierung mit dem jeweiligen Selektionsmedium wird nach jedem dritten Splitten der Zellen durch Kultivierung in IMDM/10% FCS unterbrochen. Das Splitten (Verdünnen) erfolgt, sobald die Zellen einen konfluenten *Layer* bilden, da sie nicht

kontaktinhibiert sind, sondern sich gegenseitig überwachsen würden. Dazu erfolgt eine enzymatische Loslösung der Zellen mit Hilfe von 1 ml Trypsin für 5-10 min bei RT. Vor der Zugabe des Trypsins wird das Medium abgenommen und der Layer mit 10 ml PBS gewaschen. Haben die Zellen ihre Adhärenz verloren, werden sie in serumhaltigen Medium aufgenommen, um die Wirkung des Trypsins zu blockieren und in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 in der alten oder in einer neuen Flasche verdünnt.

Die HBMEC-60 Zelllinie braucht zur Adhärenz gelatinebeschichtete Zellkulturflaschen. Vor dem Splitten wird eine neue Zellkulturflasche für 30 Minuten mit 10 ml einer 0,1%igen sterilen Gelatinelösung beschichtet. Vor dem Inokulieren der beschichteten Flasche mit den trypsinierten Zellen wird die Gelatinelösung abgenommen und einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Da die HBMEC-60 noch in einem gewissen Grade kontaktinhibiert sind, erfolgt das Splitten dieser Zellen bereits im subkonfluenten Zustand.

3.8.2.2 Suspensionszellen

Suspensionszellen werden je nach ihrer Verdopplungszeit alle 2 bis 3 Tage mit Medium verdünnt. Dazu wird entweder ein Teil der Zellen verworfen und mit frischem Medium aufgefüllt oder das Volumen durch Zugabe von frischem Medium erhöht. Die Konzentration von Suspensionszellen sollte je nach Zelllinie zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen pro ml liegen.

3.8.3 Einfrieren von Zellen

Pro 5×10^6 Zellen wird unter sterilen Bedingungen 0,5 ml kaltes Einfriermedium 1 und direkt vor dem Einfrieren 0,5 ml Einfriermedium 2 zugegeben. Die Zellen werden in Kryotubes gefüllt. Diese werden in Einfrierboxen über Nacht in die -80°C -Truhe gegeben. Die mit Isopropanol gefüllten Boxen ermöglichen ein schonendes Einfrieren um 1°C pro Minute. Am nächsten Tag werden die Kryotubes in Tanks mit flüssigem Stickstoff geräumt und gelagert.

3.8.4 Sequentielles Auftauen von CD34+ Zellen

Die empfindlichen Stamm- und Progenitorzellen bedürfen eines behutsamen Auftauvorganges, bei dem sich die schädlichen Einflüsse von DMSO zum einen und die Änderung der Osmolarität im umgebenden Medium zum anderen die Waage halten. Deshalb wird den Zellen in minütlichen Abständen ein genau definiertes Volumen Medium zugesetzt,

so daß sich das DMSO möglichst schnell verdünnt, ohne die Zellen durch die Änderung der Osmolarität zu zerstören.

Das Röhrchen mit den kryokonservierten Zellen wird im 37° C-Wasserbad schnell aufgetaut bis nur noch ein kleines Eisbröckchen übrig ist. Die Zellen werden in ein 15-ml Röhrchen überführt und exakt minütlich folgende Volumina RPMI/10% FCS zugegeben:

Minuten	Medium pro 1 ml Zellen
0	100 µl
1	120 µl
2	150 µl
3	190 µl
4	260 µl
5	360 µl
6	520 µl
7	860 µl
8	1,69 ml
9	4,75 ml

Sind die Zellen in mehr als 1 ml eingefroren erhöhen sich die Volumina entsprechend dem Einfriervolumen.

3.8.5 FICOLL-Aufreinigung

Zur Isolierung der mononukleären Zellen aus Nabelschnurvenenblut wird das Vollblut über einen Dichtegradienten geschichtet. Dabei werden die Erythrozyten pelletiert und Granulozyten abgetrennt.

Es werden 15 ml Ficollsg. in 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt und 20-25 ml mit PBS verdünntes Nabelschnurblut vorsichtig darübergeschichtet. Das Nabelschnurblut sollte mind. 1:1 mit PBS verdünnt werden, damit der Gradient nicht überladen wird. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation über 20 min bei 1670 rpm (Varifuge K, Heraeus) ohne Bremsen. Der dünne mittlere Ring wird vorsichtig abpipettiert (MNC-Fraktion) und in ein neues Falcon-Röhrchen gegeben. Dabei können je zwei MNC-Fractionen von einem Spender vereinigt werden. Zum Waschen werden die MNC auf 40 ml mit PBS aufgefüllt und für 10 min bei

2000 rpm (Varifuge K, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Alle Pellets unabhängig vom Spender werden vereinigt und in insgesamt 40-45 ml RPMI resuspendiert. Während die Zellen erneut für 10 min bei 1200 rpm (Varifuge K, Heraeus) zentrifugiert werden, wird die Zellzahl der MNC durch Anfärbung der Kerne mit Türk'sche Lösung bestimmt.

Bei einer Zellzahl $>10^8$ Zellen wird der Überstand abgenommen, und die Zellen durch eine CD34-Positivselektion mittels MACS-Säulen aufgereinigt.

3.8.6 Positivselektion von CD34+-Zellen über die MACS-Säule

Die Isolation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen erfolgt durch Positivselektion von CD34-exprimierenden Zellen. Dazu werden die CD34-positiven Zellen indirekt magnetisch markiert: die durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten gewonnenen MNC werden mit einem haptenkonjugierten monoklonalen Antikörper gemischt, der die CD34-tragenden Zellen erkennt. Anschließend wird ein Anti-hapten Antikörper zugegeben, der mit magnetischen Kügelchen gekoppelt ist. Die Anreicherung der magnetisch markierten CD34+ Zellen erfolgt in dem magnetischen Feld der MACS-Säulen. Die Eluation der angereicherten Zellen wird durch Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld erreicht. Das Protokoll wird für max. 2×10^9 Ausgangszellen (MNC) angewendet.

Die ficollisierten Zellen werden in 300 μ l MACS-Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen und gut resuspendiert. Der Suspension werden 50 μ l pro 10^8 Zellen Reagenz A1 (Blockierungs-Lsg.) hinzugefügt, gemischt und direkt 50 μ l pro 10^8 Zellen Reagenz A2 (Antikörper-Lsg.) zugegeben. Das Zell-Antikörpergemisch wird 15 min bei 4° C inkubiert, anschließend mit MACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und 10 min mit 1200 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus) bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird komplett abgenommen. Das Pellet wird in 400 μ l MACS-Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert und 50 μ l pro 10^8 Zellen Reagenz B1 zugegeben. Die Probe wird erneut für 15 min bei 4° C inkubiert. Die Zellen werden mit MACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und anschließend 10 min mit 1200 rpm bei RT zentrifugiert. Das Pellet wird in 500 μ l MACS-Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen und sehr gut resuspendiert. Die Zellen werden durch einen 30 μ m Nylonfilter auf 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben, um Zellbrocken abzusondern, welche die Säulen verstopfen könnten. Der Filter wird solange mit MACS-Puffer gespült, bis der Durchfluß klar ist. Währenddessen wird die Säule in den Adapter am Magneten gesetzt und mit 4 x 2 ml MACS-Puffer gespült. Das Eluat kann verworfen werden. Die gefilterte Zellsuspension wird in 2 ml-Portionen auf die Säule gegeben. Anschließend

wird die Säule 3 mal mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen. Das Eluat wird verworfen oder als Negativfraktion aufbewahrt. Zur Eluation wird die Säule aus dem Magneten genommen, auf neues 15 ml Falcon-Röhrchen gesetzt und die selektionierten Zellen mit 3 x 2 ml MACS-Puffer ausgespült, indem sie mit dem Stempel durch die Säule gepresst werden.

Zur Erhöhung der Reinheit werden die Zellen über eine zweite kleinere MACS-Säule gegeben. Dann wird jedoch nur mit je 500 µl MACS-Puffer gewaschen und mit 4 mal 500 µl MACS-Puffer eluiert.

Zum Abschluß werden die Zellen gezählt und die Reinheit der CD34⁺-Zellenpopulation im FACS überprüft. Die Reinheit der Population liegt im Durchschnitt bei über 90% CD34⁺-Zellen.

3.8.7 Suspensionskultur

Die Expansion der Zellen erfolgt in der Regel in 12-Lochplatten mit 2 ml pro Vertiefung oder in 7 ml-Teflonbeuteln. Die Konzentration der Zellen beträgt, wenn nicht anders beschrieben 1×10^4 Zellen pro Vertiefung (in der 12-Lochplatte) oder 1×10^4 Zellen pro ml (im Beutel oder anderen Kultursystemen).

Für das Standardprotokoll wird zu einem bestimmten Volumen X-vivo 10 Medium, wenn nicht anders beschrieben, 1% BSA, 1% Glutamin und Zytokine in den folgenden Konzentrationen zugegeben: SCF, FL je 50 ng/ml, TPO 20 ng/ml und IL-3 10 ng/ml. Nach der Zugabe der Zytokine wird das Medium mit einem Spritzenvorsatzfilter filtriert. Die Expansion erfolgt im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂. Sowohl die frischen unkultivierten Zellen als auch die expandierten Zellen werden in verschiedenen Assays untersucht. Die Auswertung der expandierten Zellen wird in Verhältnis gesetzt zu den Werten der frischen Zellen, und so die Vermehrung der verschiedenen detektierten Zellpopulationen berechnet.

3.8.8 Auflösen von Kollagenträgern nach Kultivierung im Spinner

Um die Zellen, die auf den Kollagenträgern im Spinner kultiviert wurden, quantifizieren und analysieren zu können, müssen die Träger mit Kollagenase verdaut werden.

Die Träger werden mit einer Pipette aus dem Spinner gesaugt, in ein Falcon-Röhrchen überführt und anschließend mit PBS gespült, um das FCS auszuwaschen. Nachdem die Träger im Falcon-Röhrchen abgesunken sind, werden 500 µl der in PBS-gelösten Kollagenase (2mg/ml) und 500 µl PBS zugegeben, um eine Kollagenase-Konzentration von 1mg/ml zu

erhalten. Die Träger werden für 15 min bei 37° C mit dem Enzym inkubiert, um eine optimale enzymatische Verdauung zu erreichen. Anschließend wird die Probe auf Eis gestellt und bei 4° C für 5 min bei 1200 rpm (Rotina 46R, Hettich) zentrifugiert. Zum Einsatz der Zellen in die verschiedenen biologischen Assays, zur Quantifizierung und Analyse in der Durchflußzytometrie, wird das Pellet anschließend in PBS aufgenommen.

3.8.9 Durchflußzytometrie (FACS-Markierung)

Die Durchflußzytometrie wurde in dieser Arbeit zur Oberflächentypisierung von Zellen eingesetzt. Dabei binden Farbstoff-markierte Antikörper selektiv an bestimmte Moleküle auf der Oberfläche der Zellen. Weitere Anwendung findet die Durchflußzytometrie in der Bestimmung der Zellvitalität und des Anteils apoptotischer Zellen mittels 7-AAD, beschrieben unter Abschnitt 3.8.14.

Im Durchflußzytometer werden die zu untersuchenden Zellen einzeln in die Meßküvette gesaugt. Dort werden sie von einem Laserstrahl getroffen, der den Farbstoff an den Antikörpern anregt. Das Licht, das die Zelle wieder verläßt, wird von Lichtdetektoren erfasst. Die Qualität des Lichtes hängt dabei einerseits von der Streuung des Lichtes durch die Zelle ab, andererseits von der Emission unterschiedlicher Farben, die von den angeregten Farbstoffen an den gebundenen Antikörpern ausgesendet werden. Um zwischen für ein Oberflächenmolekül positiven und negativen Zellen zu unterscheiden, werden die Zellen zur Kontrolle mit einem unspezifischen Antikörper des gleichen Isotyps markiert, der kein bekanntes Oberflächen-Antigen erkennt (Isotypenkontrolle).

Die FACS-Analyse ermöglicht nicht nur die Unterscheidung zwischen dem Vorliegen und der Abwesenheit eines Oberflächenmarkers, sondern macht auch das Abschätzen des Expressionsgrades auf der Zelle möglich, da die Intensität der emittierten Fluoreszenz der Zahl der durch markierten Antikörper gebundenen Moleküle direkt proportional ist.

Für jede Markierung werden mindestens $2,5 \times 10^4$ Zellen eingesetzt. Die Zellen werden auf FACS-Röhrchen verteilt und mit 1 – 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Das Serum im Puffer verhindert zum einen die Bindung der Antikörper an der Plastikwand des Gefäßes, zum anderen die unspezifische Bindung an die Zellen und vermindert deren Autofluoreszenz.

Die Zellen werden 5 min bei 1500 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus) pelletiert, der Überstand abgegossen und das Röhrchen auf einem Tuch trockengetupft. Pro Markierung werden 5 µl markierter Antikörper zugegeben und gut durchmischt. Es folgt die Inkubation für mind. 15 min bei 4° C im Dunkeln. Um überschüssigen Antikörper auszuwaschen, werden die Proben

mit 2 ml FACS-Puffer aufgefüllt, gut durchmischt und für 5 min bei 1500 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und die Probe entsprechend ihrer Zellzahl in 250 bis 500 µl FACS-Fixierung aufgenommen.

Die fixierten Zellen sind bis maximal 2 Wochen im Kühlschrank lagerbar. Die Messung der Probe erfolgt am FACScan von Becton-Dickinson.

3.8.10 Methylzellulose-Assay (*colony-forming units* (CFU)-Assay)

Die determinierten Vorläuferzellen verschiedener Differenzierungsgrade können durch Zellkultur in semisoliden Medien (z.B. Methylzellulose) nachgewiesen werden: Unter Einfluß spezifischer physiologischer Stimulatorproteine bildet eine Vorläuferzelle eine mikroskopisch sichtbare Kolonie von Tochterzellen, die soweit ausreifen, daß ihre Zugehörigkeit zu bestimmten Abschnitten des myeloiden Systems auch mikroskopisch erkennbar wird. Das semisoliden Methylzellulosemedium enthält die Zytokine EPO, SCF, GM-CSF und IL-3, welche die Proliferation und das Ausdifferenzieren der Zellen bewirken. Die Nachkommen einer einzelnen Vorläuferzelle bilden in dem Zeitraum von zwei Wochen eine Kolonie, da das Wandern der Zellen durch die hohe Viskosität der Methylzellulose verhindert wird. Die Kolonien sind optisch unter einem Invertmikroskop auszählbar und lassen sich anhand der Form und Farbe und der Morphologie der Einzelzellen typisieren.

Die Methylzellulose wird, wie unter 3.7.11. beschrieben, angesetzt und in 4 ml in kleine Falcon-Röhrchen portioniert. Kommerziell erworbene Methylzellulose wird ebenfalls in 4 ml Portionen verwendet. Frische und bis zu 6 Tage kultivierte Zellen werden in einer Konzentration von 50 Zellen/ml (200 Zellen/4ml) zur Methylzellulose zugegeben, während Zellen, die 7 Tage und mehr kultiviert wurden und damit teilweise ausdifferenziert sind, in höheren Konzentrationen (200 Zellen/ml) eingesetzt werden. Die Röhrchen mit den Zellen werden gründlich gemischt. Nach dem Entweichen der entstandenen Luftblasen wird je 1 ml des Methylzellulose-Zellgemisches mit einer Kanüle auf kleine Zellkultur-Schälchen verteilen. Um zu verhindern, daß die Methylzellulose austrocknet, werden zu je zwei ausplattierten Schälchen ein mit Wasser gefülltes Schälchen in eine Bakterienschale gestellt. Die Inkubation erfolgt für 12 bis 14 Tage im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂. Nach der Inkubation erfolgt die Auszählung der Kolonien pro Schälchen unter dem Invertmikroskop. Als Kolonien gelten Zellanhäufungen von 50 und mehr Zellen. Man unterscheidet weiß erscheinende Kolonien bestehend aus Granulozyten und Monozyten (CFU-GM), durch das enthaltene Hämoglobin rot erscheinende Kolonien aus Erythrozyten (*burst forming units-*

erythroid = BFU-E) und Kolonien, die Zellen beider Gruppen enthalten (CFU-GEMM oder CFU-Mix).

3.8.11 Langzeitkultur (LTC-IC) - *Limiting Dilution Assay* (LDA)

Das LTC-IC-Assay ist eine genormte Kultivierungsbedingung, unter der sehr frühe Progenitoren überleben, weiter ausdifferenzierte jedoch absterben. Als LTC-IC (*long-term culture-initiating cells*) werden die frühen Progenitoren bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen, nach mindestens 5 Wochen Kokultur auf einer Schicht aus Stromazellen klonogene Zellen (CFU) zu generieren [8]. Die detektierten LTC-IC sind nah verwandt, wenn nicht sogar überlappend mit der repopulierenden Stammzelle, die mit dem NOD/SCID-Mausmodell detektiert wird [67]. Das LTC-IC-Assay ist somit die Methode, mit der man die frühen Stammzellen *in vitro* funktionell am besten erfassen kann [9, 10].

Für die Langzeitkultur werden je 6000 Zellen der murinen Stromazelllinie SL/SL und M2-10B4 pro Vertiefung in eine 96-Lochplatte ausplattiert jeweils in 50 µl Reaktormedium. Dabei wird die äußere Reihe der 96-Lochplatte freigelassen und später mit Wasser befüllt. Es ergeben sich also 6 übereinanderliegende Reihen mit je 10 Vertiefungen. Pro Zelllinie werden pro Platte 6 ml Reaktormedium mit 36.000 Zellen benötigt. Die Stromazellen werden vor dem Ausplattieren mit 80 Gray bestrahlt, um sie im Wachstum zu arretieren. Die Platte wird für mindestens 1 Stunde und maximal 7 Tage im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert, so daß die Zellen adhären werden können.

Für den Assay werden die zu untersuchenden Zellen in Rörchen in 6 verschiedene Konzentrationen verdünnt. Mit frischen Zellen und bis zu 6 Tagen kultivierten Zellen werden die folgenden Verdünnungen mit Reaktormedium hergestellt: 1, 3, 9, 27, 81 und 243 Zellen pro Vertiefung. Je 100 µl der so verdünnten Zellen werden in eine Vertiefung mit adhären Stromazellen ausplattiert. Jede Reihe enthält so 10 Vertiefungen einer bestimmten Verdünnung. Zellen, die 7 Tage oder mehr kultiviert wurden, werden in je 10fach höheren Konzentrationen eingesetzt (10, 30, 90, 270, 810 und 2430 Zellen pro Vertiefung).

Die Platte wird nun im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Wöchentlich einmal erfolgt ein halber Mediumwechsel, bei dem 100 µl des überstehenden Mediums vorsichtig entnommen werden, und dasselbe Volumen frischen Mediums zugefügt wird.

Nach 6 Wochen wird das Medium vollständig entnommen. Dazu wird die Platte 10 min bei 1000 rpm (Rotina 46R, Hettich) zentrifugiert. Durch Schräghalten der Platte kann das Medium vollständig entfernt werden, ohne Zellen mit abzunehmen. Die Vertiefungen mit

Zellen werden nun mit 200 µl Methylzellulose überschichtet und für 2 Wochen im Brutschrank inkubiert.

Nach 12 bis 14 Tagen erfolgt die Auswertung. Jede Vertiefung, in der mindestens eine Kolonie zu identifizieren ist, wie sie im CFU-Assay beschrieben ist, wird als positiv gewertet, andernfalls wird sie als negativ angesehen. Aufgrund der unterschiedlichen Zelldichten kann so eine quantitative Aussage über die Zahl der LTC-IC gemacht werden [9, 10].

3.8.12 Darstellung der Expansionsdaten als relative Werte

In jedem einzelnen Versuch erhält die Bedingung mit der höchste Zell-, CFU-, LTC-IC- oder CD34⁺-Zellvermehrung den Wert 1. Andere in dem Versuch getesteten Bedingungen werden relativ zu dieser besten Bedingung Werte zugeordnet. So sollen spenderabhängige Variationen der Expansionsdaten ausgeglichen werden.

3.8.13 Das NOD/SCID-Mausmodell

Die hämatopoetische Stammzelle ist funktionell definiert durch ihre Fähigkeit in das Knochenmark zu finden und dort dauerhaft transplantierte Rezipienten sowohl mit myeloiden als auch lymphoiden Zellen zu repopulieren. So wurde ein *in vivo* Repopulierungsassay entwickelt, bei dem humane Stammzellen in sublethal bestrahlte *non-obese diabetic* (NOD)/*severe combined immunodeficient* (SCID) Mäuse transplantiert werden und damit vermutlich noch unreifere Zellen, als die im LTC-IC beschriebenen, detektiert werden können [12-14]. Die transplantierten humanen Zellen wandern in das Knochenmark dieser immundefizienten Mäuse, wo durch Proliferation und Differenzierung eine große Menge humaner Zellen generiert werden, die 6 Wochen nach Transplantation im murinen Knochenmark mittels Durchflußzytometrie quantifiziert werden. Die primitiven humanen Zellen, die in der Lage sind die NOD/SCID-Maus in dieser Weise zu repopulieren, werden SRC (= *scid repopulating cells*) genannt [11].

Die immundefiziente Mäuse müssen unter sterilen Bedingungen (sterile Nahrung und Wasser) gehalten werden. Durch sublethale Bestrahlung wird Raum geschaffen für die Xenotransplantation der humanen hämatopoetischen Zellen. Nach 6 Wochen werden die Oberschenkelknochen und Blut der Maus entnommen, darin der Anteil humaner Zellen im FACS bestimmt, und so die Repopulierungsfähigkeit der transplantierten Zellen analysiert.

Die Versuche mit NOD/SCID-Mäusen fanden im Tierstall der Asta Medica statt unter Mithilfe von Andreas Westhoff. Die Mäuse werden 3 Stunden vor Transplantation mit 1 Gray

sublethal bestrahlt. Durch die Bestrahlung wird die Zahl der Makrophagen verringert, welche die Maus trotz ihrer genetischen Immundefizienz noch besitzt. Vor Infusion der Zielzellen in die Schwanzvene werden der Maus 5×10^6 Rattenfibroblasten transplantiert. Diese produzieren humanes IL-3, das ein besseres Engraftment der humanen Zellen im murinen Knochenmark ermöglicht, ohne die murine Hämatopoese zu beeinträchtigen [68].

Sechs Wochen nach Transplantation werden die Oberschenkelknochen der Maus entnommen und gespült. Ebenso wird der Maus aus der Schwanzvene Blut entnommen und als peripheres Blut ausgewertet. Die Auswertung des KM und PB der Maus erfolgt immer noch am gleichen Tag. Mit Hilfe der FACS-Markierung soll der Anteil humaner Zellen im KM und PB bestimmt werden. Als Negativkontrolle dient eine Maus, der keine humanen Zellen transplantiert wurden. Um den Anteil humaner Zellen zu bestimmen, werden die Proben zum einen mit einem murinen Anti-CD45-Antikörper-FITC markiert, zum anderen mit humanen Anti-CD45-Antikörper-PE. Das Oberflächenmolekül CD45 ist auf allen Leukozyten exprimiert. Zur Bestimmung der unterschiedlichen hämatopoetischen Linien wird die Probe in einer Dreifarbenanalyse mit Anti-human CD33-PE, Anti-human CD19-FITC und Anti-human CD45-PerCP auf Anwesenheit von myeloiden (CD33-tragende) und lymphoiden (CD19-tragende) Vorläuferzellen untersucht. Außerdem wird der Anteil humaner primitiver CD34⁺-Vorläuferzellen bestimmt. Eine Maus gilt als von humanen Zellen repopuliert, wenn sich mindestens 0,1% humane Zellen im KM befinden und das Vorhandensein lymphoider und myeloider Progenitoren nachgewiesen wurde.

Zu 200 bis 300 μ l Probe werden 10 μ l Antikörper pipettiert. Es folgt eine Inkubation für 30 min im Dunkeln bei RT. Durch Zugabe von 2 ml Lysis-Lösung und einer weiteren Inkubation von maximal 10 min im Dunkeln bei RT werden die vorhandenen Erythrozyten lysiert (Abschnitt 3.8.15.). Anschließend werden die Proben für 5 Minuten bei RT mit 1300 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus) zentrifugiert und mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1300 rpm für 5 Minuten werden die Zellen in 200-400 μ l FACS-Puffer aufgenommen und sofort gemessen.

Die Messung erfolgt am FACScalibur der Firma Maingen. Es werden mindestens 20.000 Ereignisse gemessen. Die Auswertung erfolgt mit der CellQuest-Software.

3.8.14 7-AAD-Analyse zur Apoptose-Messung

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen werden 2,5 bis 5×10^5 Zellen in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und bei 1500 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das FACS-Röhrchen auf einem Tuch trockengetupft. Das

Pellet wird in 180 µl FACS-Puffer aufgenommen und 7-AAD-Stocklösung im Verhältnis 1:10 zugegeben. Die Zellen inkubieren 20 min bei RT im Dunkeln und werden anschließend sofort am FACS-Gerät gemessen. Dabei wird 7-AAD im dritten Fluoreszenzkanal (FL-3) detektiert.

3.8.15 Erythrozyten-Lyse

Erythrozyten sind in unselektionierten Proben in großer Zahl vorhanden. Sie stören die Messung der Probe im FACS-Gerät, da sie einerseits Antikörper unspezifisch binden können zum anderen bei der Messung die interessanten Zellen durch ihre große Zahl verdecken. Deshalb wird im Falle von MNC, KM und PBC eine spezifische Lyse der Zellen durchgeführt.

Anders als bei der FACS-Markierung ohne Lyse werden hier pro Probe je 20 µl Antikörper zugegeben und die Probe 15 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Anschließend wird 2 ml Lysis-Lösung zugeben und erneut 10 min lichtgeschützt inkubiert. Die Zellen werden für 5 min bei 1300 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus) pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert. Anschließend werden die Zellen in 2 ml FACS-Puffer gewaschen und für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Vor der Messung werden die Zellen entsprechend ihrer Zellzahl in 250 bis 500 µl FACS-Puffer oder –Fixierung aufgenommen

3.8.16 Transwell-Assay nach Aiuti et al., [51]

Mit dem Transwell-Assay kann die Migrationsfähigkeit von Zellen durch eine Endothelschicht bestimmt werden. Die Zellen durchqueren die Membran auf einen chemotaktischen Stimulus hin, vermittelt durch ein Protein, genannt Chemokin. Chemokine sind Zytokine, die bisher meist für ihre Fähigkeit bekannt waren, selektiv Lymphozyten an Entzündungsorte zu locken. Ihre Rolle im *Homing* und Repopulierung ist noch nicht vollständig verstanden. Man weiß von SDF-1, daß es *in vitro* Zellen anzieht, die seinen Rezeptor CXCR4 tragen [51, 54, 69]. *In vivo* wird es sowohl von Knochenmarksstroma- als auch Endothelzellen gebildet [49, 70]. Das Transwell besteht aus 2 Kompartimenten, die durch eine Membran mit Poren getrennt sind. Auf der Membran wird ein konfluenter *Layer* aus Endothelzellen kultiviert. Nach Zugabe eines Chemokins in die untere Kammer und eine definierte Anzahl von Zielzellen in die obere, kann durch Zählen der Zellen nach 3,5 Stunden

der Anteil bestimmt werden, der auf den Stimulus hin die Membran durchquert. Als Kontrolle dient ein Ansatz ohne Chemokin in der unteren Kammer.

In die untere Kammer des Transwell werden 0,6 ml HBMEC-Medium gegeben und das Transwell eingesetzt. Zur Etablierung des konfluenten Endothellayers werden 2×10^4 Endothelzellen in 100 μ l HBMEC-Medium auf den Transwellfilter (5 μ m Porengröße) gegeben und mindestens 2 und höchstens 3 Tage bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert.

Um den Einfluß des Serums auf die Transmigration zu reduzieren, wird direkt vor Beginn des Assays der Filter vorsichtig in eine neue Kammer überführt, der Überstand abgenommen, und 100 μ l serumfreies Medium zum Spülen auf den Filter gegeben. In eine neue Kammer werden 0,6 ml serumfreies Medium und Chemokin (125ng/ml SDF-1) gegeben. Das serumfreie Medium wird vom Filter abgenommen und dieser auf die neue Kammer gesetzt. In die obere Kammer auf den Filter werden $1,5 \times 10^5$ CD34⁺-Zellen in 100 μ l serumfreies Medium gegeben. Nach 3,5 Stunden wird die obere Kammer abgenommen und die Zellen in der unteren Kammer gezählt.

3.8.17 Sphäroid-Protokoll

Sphäroide sind dreidimensionale kugelige Zellaggregate (Abb. 4.15., Abschnitt 4.2.1.), die bisher hauptsächlich in der Untersuchung solider Tumoren zum Einsatz kamen [71, 72].

Damit die verwendeten Stromafibroblastenzellen sich zu diesen Aggregaten zusammenfinden, müssen die Vertiefungen der 96-Lochplatte mit Agarose ausgekleidet werden und die Zellen für mindestens 48 Stunden unberührt bleiben. Pro Vertiefung bildet sich ein Sphäroid.

3.8.17.1 Auskleiden mit Agarose

1%ige Agarose-Lösung wird in der Mikrowelle erhitzt und je 50 μ l in die Vertiefungen verteilt. Die Agarose wird durch Aufklopfen der Platten über den ganzen Boden verteilt und zieht sich auch die Wände hoch. Die Platten werden ohne Deckel zum Trocknen stehengelassen.

3.8.17.2 Fibroblasten (M2 10B4)

Die Stromazellen sollten in ihrer Wachstumsphase verwendet werden, d.h. sie sollten nicht ganz konfluent sein, bevor sie abgelöst werden, um Sphäroide zu bilden. Zu viele tote Zellen behindern die Kokultur mit den hämatopoetischen Zellen.

Die Zellen werden trypsiniert und gezählt. Pro Vertiefung und Sphäroid werden $2,5 \times 10^4$ Stromazellen in 200 μ l IMDM/10 % FCS eingesetzt. Pro 96-Lochplatte werden demnach $2,5 \times 10^6$ Zellen in 20 ml Medium benötigt. Die Zellsuspension wird vorsichtig in die Vertiefungen pipettiert und 4 Tage im Brutschrank inkubiert.

3.8.17.3 Zellenzugabe

Nach 4 Tagen haben sich mit dem Auge sichtbare Zellaggregate gebildet. Es werden nur solche Vertiefungen für Experimente verwendet, in denen sich ein einziges Sphäroid befindet. Vor der Zugabe der Zellen, die in die Sphäroide einwandern sollen, werden 100 μ l abgenommen. 1×10^4 der zu testenden Zellen werden pro Vertiefung und Sphäroid in 100 μ l IMDM/10% FCS aufgenommen und vorsichtig zu den Sphäroiden gegeben.

Die Sphäroide werden nach 6, 12, 24 oder 48 Stunden oder später aufgelöst und im FACS analysiert.

3.8.17.4 Ernten für FACS

Mit einer 1ml-Eppendorfpipette werden alle Sphäroide desselben Ansatzes abgenommen und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt. Die Sphäroide sinken sofort ab und sammeln sich am Boden des Röhrchens. Der Überstand wird abgenommen und in einem separaten Falcon-Röhrchen als Waschfraktion gesammelt. Die Sphäroide werden mit 10 ml PBS kräftig gespült. Nach Absinken der Sphäroide wird der Überstand zur Waschfraktion zugegeben. Dieses Waschen wird insgesamt 3 mal durchgeführt, um zu gewährleisten, daß keine Zellen mehr außen am Sphäroid kleben. Der Überstand, also die abgewaschenen Zellen, werden in der Waschfraktion vereinigt und gesondert markiert. Nach dem Waschen werden die Sphäroide in 1 ml PBS aufgenommen und mit 0,5 ml Trypsin für 5 min bei 37° C verdaut. Zum Stoppen der Trypsinierung werden 5 ml IMDM/10% FCS zugegeben und durch heftiges Resuspendieren mit einer Eppendorfpipette die noch nicht restlos verdauten Zellaggregate zerstört. Die Zellsuspension wird von nun an auf Eis gehalten. Die trypsinisierten Sphäroide und die Waschfraktion werden bei 4°C und 1200 rpm (Rotina 46R, Hettich) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 2-3 ml IMDM/10% FCS heftig resuspendiert. Ein Aliquot wird zum Bestimmen der Zellzahl abgenommen.

Vor der FACS-Markierung werden die Zellen über einen Filter (70 μm) gegeben, so daß eine Einzelzellsuspension entsteht und größere Zellaggregate zurückgehalten werden, die das FACS-Gerät verstopfen könnten.

Anschließend folgt eine FACS-Markierung (Abschnitt 3.8.9.) mit anti-IgG₁ (PE und FITC) als Kontrolle und einen zellspezifischen Antikörper. Wichtig für die Auswertung ist, daß die Zielzelle lediglich mit einer Farbe markiert wird, da andernfalls die Abgrenzung von Stromazellen, die eine starke Eigenfluoreszenz besitzen, schwerfällt.

3.8.17.5 Einbetten von Sphäroiden zum Einfrieren

Sphäroide werden, um Gefrierschnitte anzufertigen und sie anschließend immunhistologisch zu färben, in Einfriermedium eingebettet.

Dazu werden die Sphäroide mit einer 1000 μl -Pipette aus der Vertiefung gesaugt und in ein FACS-Röhrchen überführt. Nachdem sich die Sphäroide am Boden abgesetzt haben werden ca. 3-7 (je nach Größe) mit einer Pasteurpipette aufgenommen und auf einen Spatel gegeben. Durch leichtes Klopfen und Schräghalten des Spatels sammeln sich die Sphäroide in einer Ecke. Vorsichtig wird das Medium vollständig mit einem Tuch abgesaugt. Ein Tropfen Einbettmittel wird ohne Luftblasen auf ein kleines trockengewischtes Stück Alufolie gegeben. Nun wird der Spatel mitsamt den Sphäroiden in das Einbettmittel wiederholt eingetaucht bis sich die Sphäroide in der Mitte des Tropfens befinden. Durch das Gefrieren wird das Eindeckmittel weiß und undurchsichtig. Man kann die Sphäroide deshalb beim Schneiden nicht sehen. Aus diesem Grund ist es wichtig, in etwa zu wissen, wo sich die Sphäroide befinden. Die Alufolie wird über flüssigen Stickstoff gehalten, ohne daß die Folie in den flüssigen Stickstoff eintaucht, solange bis das klare Einbettmittel weißlich-trübe und undurchsichtig wird. Ein Eppendorf-Gefäß zur Aufbewahrung des Tropfens wird kurz in den Stickstoff gehalten, der gefrorene Tropfen anschließend mit einer Pinzette abgenommen und in das gekühlte Gefäß überführt. Das Gefäß wird zur Zwischenlagerung in ein Kühlfach gelegt, bis noch weitere Sphäroide des selben Ansatzes gefroren und in dem Gefäß gesammelt wurden. Die Lagerung erfolgt für mehrere Tage und Wochen bei -20°C , für eine längere Dauer bei -70°C .

3.8.18 Zytokin-ELISA (von R&D Systems GmbH, Deutschland)

Mit der ELISA-Methode soll die Konzentration von Zytokinen in Mediumüberständen verschiedener Versuche bestimmt werden.

Ein monoklonaler Antikörper, der das untersuchte Zytokin spezifisch bindet, ist auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und bindet die im Überstand vorhandenen Zytokinmoleküle. Diese werden durch einen spezifischen polyklonalen Antikörper gebunden, der mit einem Enzym verbunden ist. Nach Zugabe von Substrat wird durch das am Antikörper gebundene Enzym eine Farbreaktion vermittelt, die der Menge des initial gebundenen Zytokins entspricht. Die Farbentwicklung wird anschließend gestoppt und bei 450 nm im Photometer gemessen. Die Berechnung der Zytokinkonzentration erfolgt über den Vergleich mit einem Zytokinstandard der mitgeliefert, entsprechend der Anleitung verdünnt und auf der Mikrotiterplatte mitgeführt wird.

Die Überstände werden durch Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm von den Zellen getrennt und bis zur Verwendung im ELISA bei -80° C gelagert. Im ELISA wurden Verdünnungen (1:2 bis 1:20) für die Überstände von verschiedenen Kultur dauern hergestellt, da zu Beginn der Kultur die Zytokine sicherlich noch in höheren Konzentrationen vorliegen als zu einem späteren Zeitpunkt und durch Verdünnung eine Farbreaktion im meßbaren Bereich gewährleistet werden soll.

Die Durchführung der Quantikin-ELISAs erfolgt nach der Anleitung der Firma R&D Systems GmbH, Deutschland.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung der Expansion von Stammzellen aus Nabelschnurblut

Im ersten Teil der Arbeit sollten Bedingungen gefunden werden, mit denen es gelingt Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut zu vermehren. Ziel dieses Ansatz ist es, durch die Vermehrung der Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut (CB) ihren Einsatz als allogenes Stammzelltransplantat für den erwachsenen Patienten zu ermöglichen. Die Vorteile der Verwendung von Nabelschnurtransplantaten sind in der Einleitung unter Abschnitt 2.5. aufgeführt.

Die Bedingungen sollten die Anzahl der Gesamtzellen, sowie der determinierten (CFU) und frühen (CD34⁺- Zellen und LTC-IC) Progenitoren gleichmäßig vermehren, ohne daß diese die Fähigkeit verlieren, in das Knochenmark zu finden, dort anzuwachsen (Repopulierungsfähigkeit) und ein neues Blutsystem aufzubauen. Zur Auswertung standen *in vitro* und *in vivo* Assays zur Verfügung, die unterschiedliche Reifungsstufen der Zellen anhand ihrer biologischen Funktionen detektieren. Es sollte ein klinisches Prüfprotokoll entwickelt werden, daß der Gesetzgebung zur Arzneimittelherstellung (AMG) entspricht und somit in der Klinik anwendbar ist.

4.1.1 Zytokinaustestung

Im ersten Schritt sollte ein Cocktail aus verschiedenen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (Zytokinen) gefunden werden, der in der Lage ist, die in der Kultur vorhandenen Stammzellen zu erhalten und Progenitoren deutlich zu vermehren. Dazu wurden CD34⁺-CB-Zellen unter Zugabe verschiedener Zytokine in Suspensionskultur gehalten. Die Auswertung erfolgte immer nach einer Kulturdauer von 7 Tagen. Der Einfluß der Kulturdauer auf die Expansion CD34⁺-CB-Zellen wird in Abschnitt 4.1.4. untersucht. Die Auswertung der Kultur erfolgte *in vitro* anhand Zählung der Gesamtzellzahl, der Analyse der das CD34-Antigentragenden Stamm- und Progenitorzellen im Durchflußzytometer (FACS), sowie in funktionellen Assays. Dazu wurden die Zellen zur Erfassung der determinierten Vorläuferzellen im CFU (*colony-forming units*)-Assay und für die Detektion der frühen Vorläuferzellen in der Langzeitstromakultur (LTC-IC) eingesetzt.

In Abb. 4.1. sind Zytokinkombinationen dargestellt, die die besten Expansionsergebnisse hervorbrachten. Die Werte sind als relative Expansionswerte dargestellt. In jedem Experiment wird der Bedingung, die die höchsten Vermehrungen hervorbrachte die Eins zugeordnet und die Expansionsdaten der anderen Bedingungen in diesem Versuch relativ zu diesem Wert dargestellt. Damit lassen sich spenderabhängige Variationen ausgleichen.

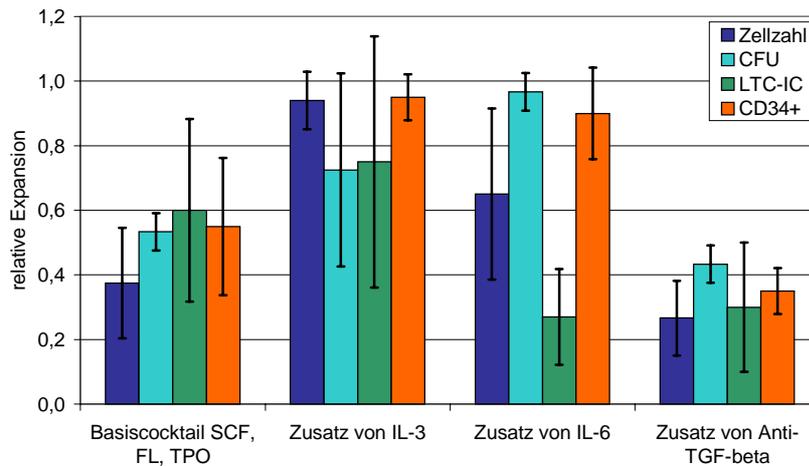


Abbildung 4.1 Expansion von CD34⁺CB-Zellen unter Zugabe von SCF, FL, TPO als Basiscocktail und Zugabe weiterer Zytokine nach 7 Tagen Suspensionskultur. n = 2-6

Als Basiscocktail wurde eine Kombination von Zytokinen, SCF, FL und TPO gewählt, deren Wirkung auf die primitiven Zellen bekannt ist. Mit dieser Kombination ließ sich eine Vermehrung der CD34⁺-Zellen um das 9,3fache erreichen. Der Expansionsfaktor für die determinierten Progenitoren (CFU) betrug 9,1 und für die primitiven Progenitoren (LTC-IC) 12,6. Es zeigte sich, daß die Zugabe des Antikörpers Anti-TGF β gegen das inhibitorische Zytokin TGF β zu einem Basiscocktail aus SCF, FL und TPO keinen positiven Einfluß auf die Expansion der Vorläufer- und Stammzellen hat. Mit Zugabe von IL-6 ließ sich eine verbesserte Expansion der Gesamtzellen, sowie der CFU und CD34⁺-Zellen beobachten. Doch die frühen Vorläuferzellen, die LTC-IC, wurden im Vergleich zum Basiscocktail weniger gut expandiert. Lediglich die Zugabe von IL-3 zu dem Zytokinmix aus SCF, FL und TPO ermöglichte ein verstärkte Vermehrung aller hier getesteten Zellpopulationen (CD34⁺-Zellen 20,9fach, CFU 18,1fach und LTC-IC 16,3fach).

Die besten Zytokinkombinationen (SCF, TPO, FL mit und ohne IL-3) wurden in NOD/SCID-Mausversuchen (Abb. 4.10.) gegeneinander verglichen. Es zeigte sich, daß nach Expansion der Zellen in Anwesenheit von IL-3 ein Engraftment ähnlich dem Engraftment frischer unmanipulierter Zellen erreicht wurde. Das heißt nicht nur, daß die *ex vivo* Expansion der CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut nicht zum Verlust der Repopulierungsfähigkeit dieser Zellen führt, sondern auch, daß die Zugabe von IL-3 ins Medium nicht zur Verringerung des Engraftment führt.

4.1.2 Zytokinkonzentrationen

Da die Konzentration von Zytokinen Einfluß auf die Expansion der hämatopoetischen Zellen hat, sollte festgestellt werden, ob die gewählten Zytokinkonzentrationen von 50 ng/ml für SCF und FL, 20 ng/ml für TPO und 10 ng/ml für IL-3 im Überschuß eingesetzt waren oder bereits nach kurzer Zeit von den Zellen verbraucht sind. Dazu wurden Zytokin-ELISA zur Bestimmung der Zytokinkonzentration im Medium durchgeführt. Der Überstand von Suspensionskulturen nach vier, sieben und vierzehn Tagen wurde gesammelt und die Konzentration der eingesetzten Zytokine im ELISA bestimmt. Als Kontrolle diente frisch angesetztes Medium.

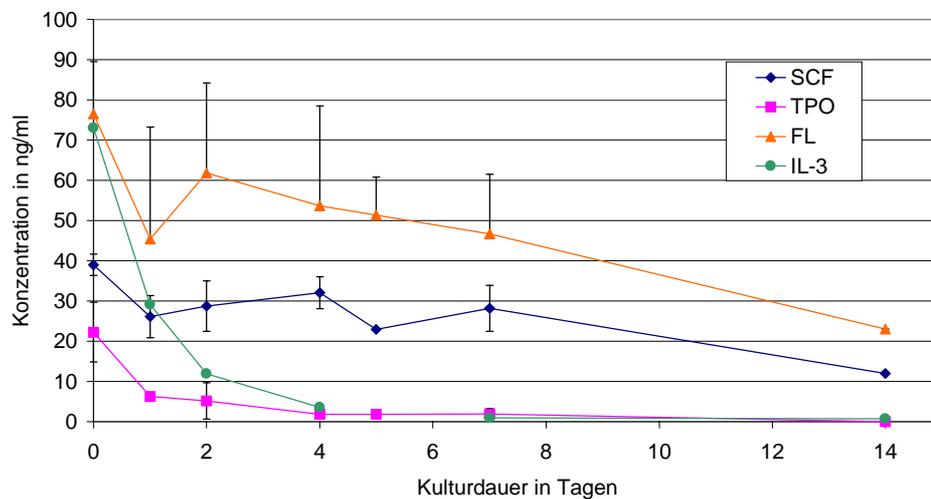


Abbildung 4.2. Zytokinkonzentrationen des Überstandes einer Suspensionskultur über 4, 7 und 14 Tage mit den Zytokinen SCF, FL, TPO und IL-3, n=3

Wie Abb. 4.2. zeigt, unterschied sich die Verbrauchskinetik der Zytokine SCF und FL zum einen und TPO und IL-3 zum anderen. Während TPO und IL-3 bereits nach 4 Tagen im Überstand fast nicht mehr detektierbar waren, ließen sich von SCF und FL nach 7 Tagen noch 60 % ihrer Ausgangskonzentration nachweisen. Um den Einfluß des Verbrauchs durch die Zellen auf die Konzentrationsabnahme zu bestimmen, wurde Kulturmedium über 7 Tage bei 37° C gehalten und anschließend die Konzentration der Zytokine bestimmt. Da FL nach 7 Tagen bei 37° C noch zu 90% vorhanden war, ist hier für die Abnahme des Zytokins während der Kultivierung der Verbrauch durch die Zellen die Ursache. SCF dagegen war nach 7 Tagen vollständig zerfallen und ließ sich im ELISA nicht mehr nachweisen. Hier scheinen die Zellen SCF in einem gewissen Maße zu produzieren. Sowohl IL-3 als auch TPO zerfielen in 7 Tagen bei 37°C vollständig. Die Konzentrationsabnahme der Zytokine in Kultur kann also neben dem Verbrauch durch Zellen zum Teil durch den Zerfall bei 37°C bedingt sein.

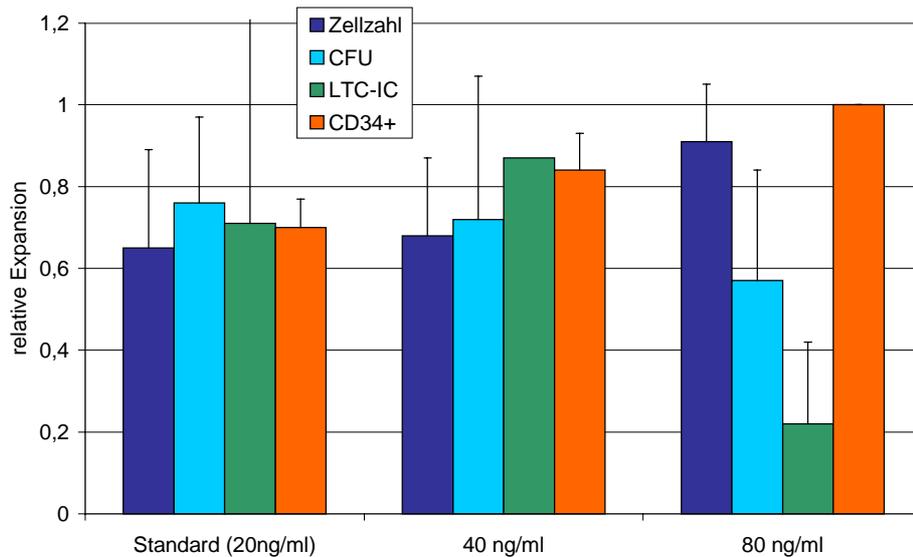


Abbildung 4.3. Expansion von CD34⁺CB-Zellen über 7 Tage mit den Zytokinen SCF, FL und IL-3. TPO wurde in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. n = 2-4

Da die Anwesenheit von TPO in Kultur für unabdingbar zum Erhalt der primitiven Zellen gehalten wird [24, 73] wurde überprüft, ob die Erhöhung der Ausgangskonzentration von 20 ng/ml auf 40 bzw. 80 ng/ml einen positiven Einfluß auf die Vermehrung der CD34⁺-Zellen hat.

Die relativen Expansionsdaten (Abb. 4.3.) zeigten, daß durch die Erhöhung der Ausgangskonzentration auf 40 bzw. 80 ng/ml sich die Expansion der Gesamtzellzahl und der CD34⁺-Zellen geringfügig erhöhen ließ, die Zahl der reifen und unreifen Progenitoren (CFU bzw. LTC-IC) sich aber eher verringerten. Die Konzentration von 20 ng/ml ist also für die verlässliche Vermehrung der Stamm- und Vorläuferzellen im getesteten Bereich ausreichend.

4.1.3 Untersuchung des Einflusses der Reinheit auf Expansion von Stamm- und Progenitorzellen

Wie bereits in einigen Veröffentlichungen beschrieben, hat die Reinheit der CD34-positiven Ausgangspopulation Einfluß auf eine erfolgreiche Expansion von Stamm- und Vorläuferzellen [74-76].

Um die geeignete Ausgangspopulation zur Expansion zu finden, wurden unaufgereinigte mononukleäre Zellen (MNC) aus Nabelschnurblut CD34⁺-selektierten Zellen gegenübergestellt. Die Auswertung erfolgte anhand der Bestimmung der Vermehrung der Gesamtzellzahl und der CFU. Hierbei zeigte sich, daß die Selektion unabdingbar war, sowohl für die Vermehrung der Gesamtzellen als auch der CFU (Abb. 4.4.).

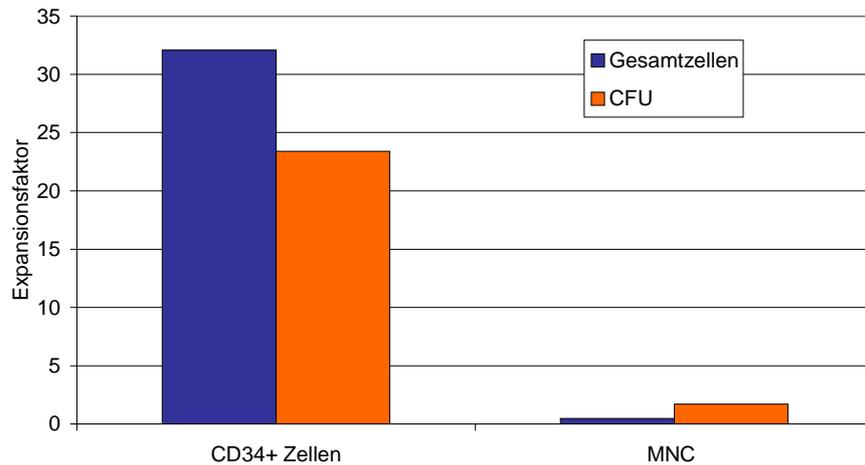


Abbildung 4.4. Vergleich der Expansion von Gesamtzellzahl und der CFU bei Verwendung von selektionierten CD34+CB-Zellen oder Mononukleäre Zellen (MNC)

Die Reinheit der selektionierten CD34⁺-Zellen schwankte je nach Einsatz von einer bzw. zwei Säulen zur Selektion zwischen 50 bzw. 90%. In Abb. 4.5. ist der Einfluß der Reinheit auf die Vermehrung der Gesamtzellen und der frühen und reiferen Vorläuferzellen dargestellt.

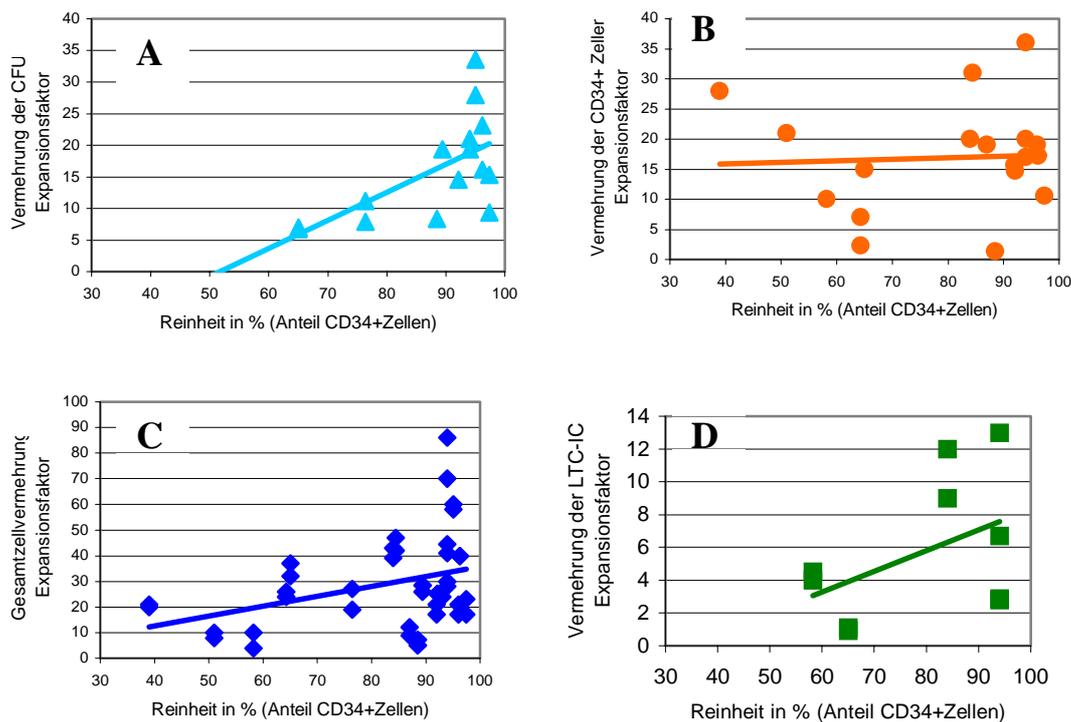


Abbildung 4.5. Korrelation zwischen der Reinheit der Ausgangszellpopulation und den Expansionen von CFU (Δ , A), CD34⁺-Zellen (\circ , B), Gesamtzellen (\diamond , C) und LTC-IC (\square , D)

Es zeigte sich, daß sowohl für die Vermehrung der Gesamtzellen, als auch der reiferen (CFU) und der unreiferen Vorläuferzellen (LTC-IC) unter den Standardbedingungen mit SCF, FL, TPO und IL-3 eine reinere Ausgangspopulation Vorteile brachte. Lediglich die Vermehrung der CD34⁺-Zellen war unabhängig von der Reinheit der Population vor der Kultur.

4.1.4 Kulturdauer

Die Dauer der Kultivierung von Stamm- und Vorläuferzellen sollte zum einen eine ausreichende Vermehrung der Progenitoren garantieren, ohne zum Verlust der Stammzelle zu führen, zum anderen für die klinische Anwendung praktikabel bleiben. Ziel war es, eine Kultivierungsdauer zu finden, die innerhalb kürzester Zeit die besten Expansionsdaten liefert. Daher wurden in den Experimenten Kultur dauern von 4 bis maximal 14 Tage getestet (Abb. 4.6.).

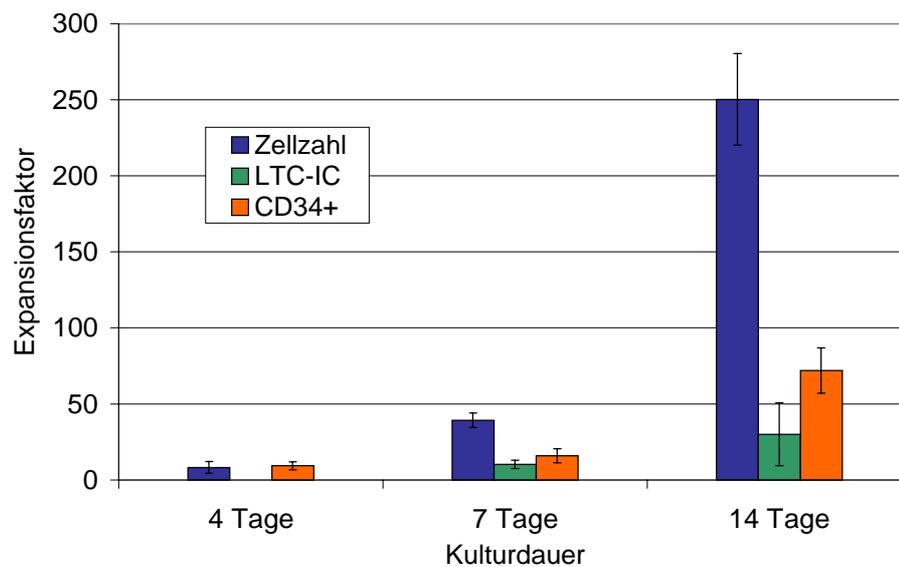


Abbildung 4.6. Effekt verschiedener Kultur dauern auf die Expansion CD34⁺ CB-Zellen. Kultivierung mit SCF, FL, TPO und IL-3, n = 3-6

Dabei zeigte sich, daß erst mit einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen eine ausreichende Vermehrung der CD34⁺-Vorläuferzellen und der LTC-IC (16fach bzw. 10fach) erlangt wurde. Aus einer Kultivierung über 4 Tagen resultierte lediglich eine 8fache Vermehrung der Gesamtzellzahl und eine 9fache Expansion der CD34⁺-Vorläuferzellen. Obwohl sich durch eine Verlängerung der Kultivierung auf 14 Tage eine weitere Steigerung der Gesamtzellzahl und der Expansion der CD34⁺- und der frühen Vorläuferzellen (LTC-IC) erreichen ließ (250fach, 72fach und 30fach), scheint eine Kultivierung über einen derart langen Zeitraum unpraktikabel und riskant. Der Anteil toter und apoptotischer Zellen nahm von Tag 7 auf Tag 10 deutlich zu. So waren im 7-AAD-Assay, mit dem im Durchflußzytometer lebende und apoptotische Zellen unterschieden werden können, nach 7 Tagen Kultur lediglich 6 % der Zellen apoptotisch oder tot, während nach 10 Tagen Kultur annähernd dreimal mehr Zellen (15,6 %) apoptotisch oder tot waren.

4.1.5 Kultursysteme

Nach Festlegung des Zytokincocktails und einer geeigneten Kulturdauer folgte die Austestung verschiedener Kultursysteme zur optimalen Vermehrung der Transplantate. Zur klinischen Anwendung der Expansion von Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut müssten die Zellen im großen Maßstab unter GMP-tauglichen, d.h. in sterilen und idealerweise geschlossenen Systemen kultiviert werden. Ziel war es demnach, ein Kultursystem zu finden, das unter diesen Bedingungen eine für die Anwendung ausreichende Vermehrung der frühen und determinierten Progenitorzellen möglich macht.

Getestet wurden gerührte Kultursysteme (Spinner), die eine gleichmäßige Versorgung der Zellen mit Medium, d.h. Nährstoffen gewährleisten sollten und handelsübliche Systeme, wie Zellkulturflaschen und Kulturbeutel. Die Experimente verglichen serumfreie und serumhaltigen Medien, wobei Kulturbedingungen ohne tierisches Serum bevorzugt wurden, da nur diese die Anwendung in der Klinik möglich machen. Es zeigte sich außerdem, daß die Kultivierung unter serumhaltigen Bedingungen zu einer Erhöhung der Gesamtzellzahl (110 zu 32fach) und der CFU (30 zu 20fach) führte, jedoch die Expansion der unreiferen Progenitoren (LTC-IC) stark reduziert war (5fach zu 1,5fach, siehe Abb. 4.7.).

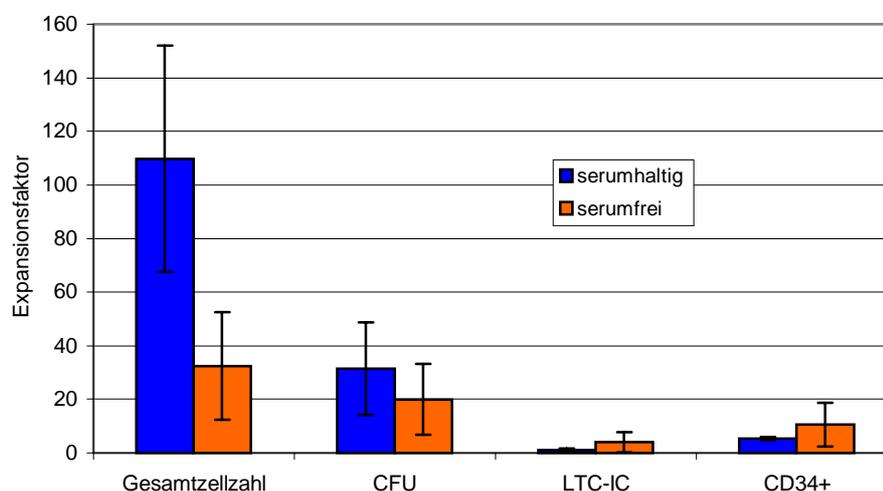


Abbildung 4.7. Vergleich der Expansion unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen. Kultivierung der Zellen für 7 Tage mit SCF, FL, TPO und IL-3. n = 5-11

Bei den zu Beginn verwendeten Spinnern aus Glas nahm im Laufe der serumfreien Kultivierung die Zellzahl ab. Da die Zerreißung der Zellen an der porösen Glaswand als Grund für den Zellverlust angenommen wurde, erfolgte die Entwicklung eines Spinners aus Teflon. In den folgenden Versuchen zeigte sich kein Zellverlust mehr während der Kultivierung.

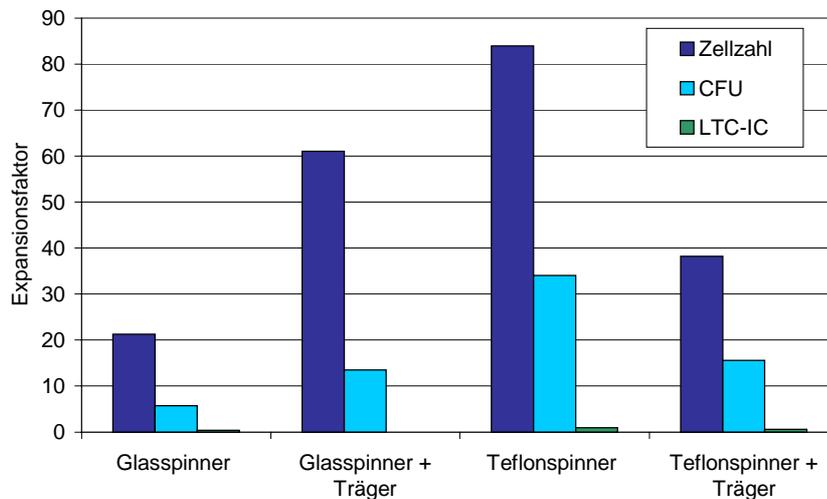


Abbildung 4.8. Vermehrung von Gesamtzellzahl, CFU und LTC-IC über 7 Tage mit den Zytokinen SCF, FL, TPO und IL-3. Die Kultivierung erfolgte unter serumhaltigen Bedingungen in gerührten Spinnersystemen aus Glas oder Teflon mit oder ohne Zugabe von Kollagenträgern.

Unter physiologischen Bedingungen bieten Nischen im Knochenmark Stamm- und Vorläuferzellen des Schutzes durch die Möglichkeit der Anheftung. Im gerührten System wurden deshalb poröse Kollagenträger getestet, die diese Nischen imitieren sollten (Abb. 4.8.). Die Anheftung an die Träger und die Vermehrung der Zellen gelang allerdings nur in Anwesenheit von FCS im Medium. Da Kälberserum zur Anwendung in der Klinik nicht geeignet ist, wurde die Kultivierung mit Kollagenträger nicht weiterverfolgt.

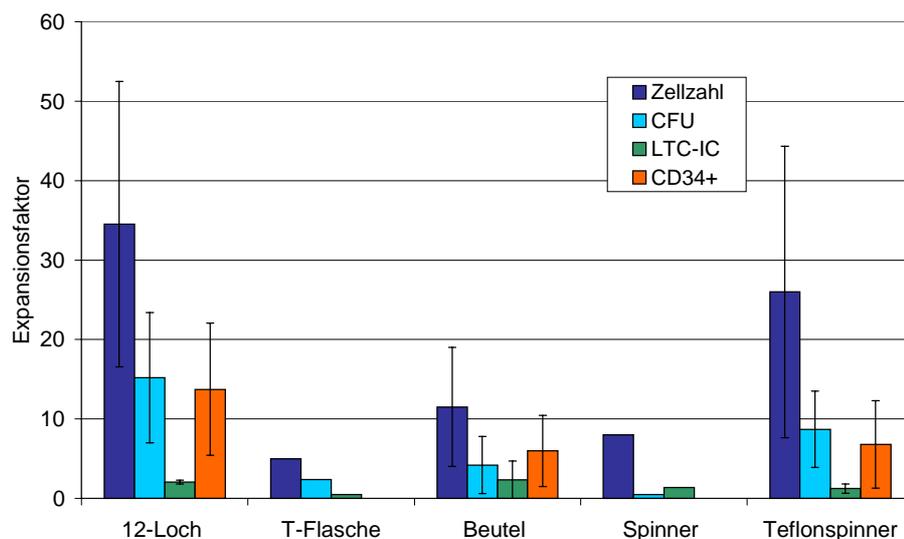


Abbildung 4.9. Vergleich der Expansion von CD34+CB-Zellen in verschiedenen Kultursystemen unter serumfreien Bedingungen unter Zugabe der Zytokine SCF, FL, TPO und IL-3, n = 1-7

Um Aussagen über die verschiedenen Kultursysteme zu machen, wurde die 12-Lochplatte als Vergleichssystem herangezogen, da von diesem System ausreichende und verlässliche Expansionsdaten vorlagen.

Beim Vergleich der verschiedenen Kultursysteme zeigte sich (Abb. 4.9.), daß sich neben der 12-Lochplatte, durch Kultivierung der Zellen im Teflonbeutel und Teflonspinner eine ausreichende Expansion der Stamm- und Vorläuferzellen erreichen ließen, während die T-Kulturflasche und der Glasspinner erheblich geringere Vermehrung der LTC-IC aufwiesen.

Die Kultursysteme Teflonbeutel und Teflonspinner wurden aufgrund ihrer guten Expansionsergebnisse im NOD/SCID-Mausmodell getestet (Abb. 4.10.).

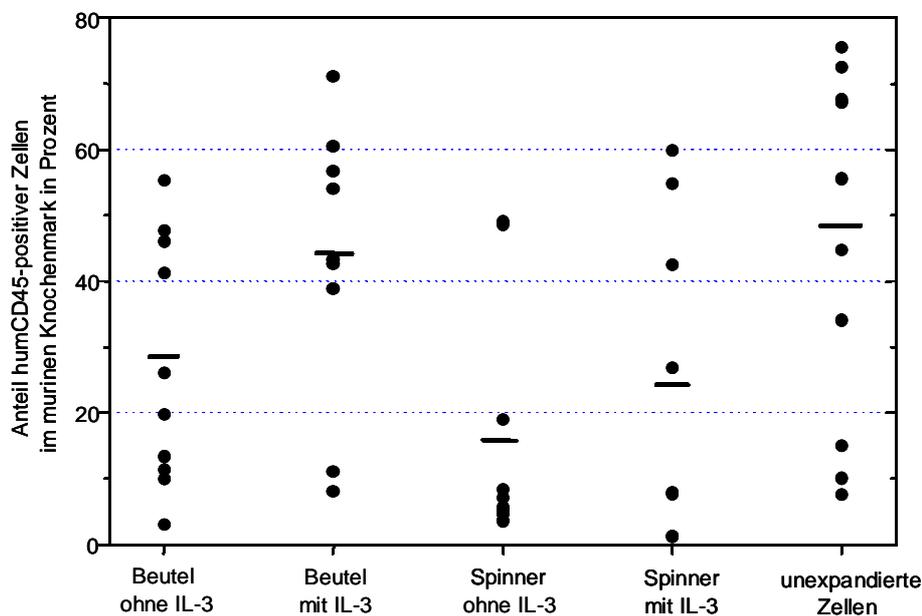


Abbildung 4.10. Anteil humaner CD45+Zellen im Knochenmark der Maus nach Transplantation von frischen, unexpandierten Zellen oder in verschiedenen Kultursystemen kultivierten Zellen aus CB. Die Kultivierung erfolgte über 7 Tage mit SCF, FL und TPO mit oder ohne IL-3. Es sind zwei verschiedene Experimente dargestellt, jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die Striche geben den Mittelwert des Anteils humaner Zellen im murinen KM an.

Es ließen sich mit den expandierten Zellen alle Mäuse engraftern. Es zeigte sich deutlich, daß das Engraftment der im Beutel kultivierten Zellen deutlich besser war als der im Teflonspinner kultivierten Zellen. Die im Beutel unter Zugabe von IL-3 expandierten Zellen erreichen mit 45 % einen Anteil im murinen Knochenmark, der dem Anteil nach der Transplantation unexpandierter Zellen (48%) vergleichbar war. Die im Spinner unter Zugabe von IL-3 expandierten Zellen erreichten 6 Wochen nach Transplantation nur einen Anteil von 23 % im murinen Knochenmark. Hier wurde der Unterschied im Engraftment der Zellen deutlich, ob sie mit dem Basiscocktail aus SCF, FL und TPO kultiviert wurden, oder ob die Expansion unter Zugabe von IL-3 erfolgte. Das Engraftment der Ersteren erreichte nur etwa 60% des Anteils humaner Zellen nach Transplantation der mit IL-3-kultivierten Zellen.

4.1.6 Zellkonzentration

Durch die Wahl des Beutels als Kultursystem im klinischen Einsatz musste für dieses System die Zellkonzentration festgelegt werden. Die Vorversuche in der 12-Lochplatte waren mit einer Konzentration von 1×10^4 Zellen pro Vertiefung in 2 ml durchgeführt worden. Dies diente als Richtwert für die folgenden Versuche im Beutel mit Zellkonzentrationen von 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 und 2×10^5 Zellen pro ml (Abb. 4.11.). Durch Erhöhung der Zellkonzentration pro ml Medium ließen sich die Zellen im Beutel weniger gut vermehren. So reduzierte sich die relative Zellvermehrung von 0,92 bei einer Konzentration von 5×10^3 auf 0,55 bei 1×10^5 oder 0,11 bei 2×10^5 Zellen pro ml. Ähnliches galt für die Vermehrung der CFU und der CD34⁺-Vorläuferzellen, wobei hier zwei Werte abweichen. So war die relative CFU-Vermehrung bei 5×10^3 Zellen/ml mit 0,28 deutlich geringer als bei den anderen Konzentrationen, so daß sich hier der Trend nur an den nachfolgenden höheren Konzentrationen ablesen ließ. Doch hier nahm die relative Vermehrung der CFU von 0,57 bei 1×10^4 Zellen/ml auf 0,06 bei 2×10^5 Zellen/ml ab. Ebenfalls deutlich abweichend war der hohe relative Expansionswert der CD34⁺-Zellen von 0,99 bei einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml. Dieser Wert wird jedoch außerachtgelassen da er in einem einzelnen Versuch ermittelt wurde und damit wenig Aussagekraft besitzt.

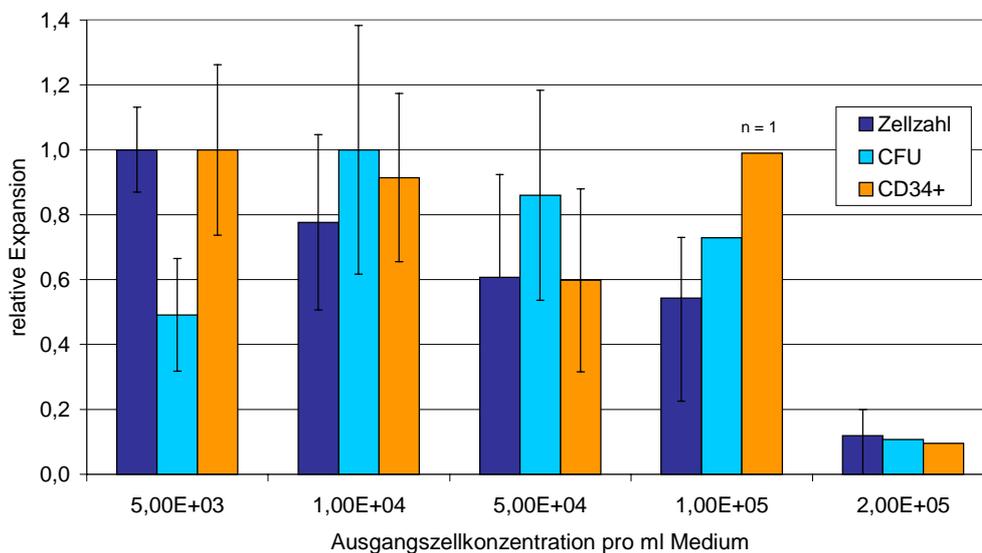


Abbildung 4.11. Relative Expansionsdaten der Suspensionskulturen über 7 Tage, die mit unterschiedlichen CB-CD34⁺-Zellkonzentrationen pro ml an Tag 0 inkubiert wurden. Die Kultivierung erfolgte unter serumfreien Bedingungen im Beutel mit SCF, FL, TPO und IL-3, n = 2-9

Ähnlich wie bei der Wahl des geeigneten Kultursystems spielen auch bei der Auswahl der Zellkonzentration nicht nur die besten Expansionsergebnisse eine Rolle, sondern auch die Praktikabilität in der klinischen Anwendbarkeit. Aus diesen Gründen wurde eine Konzentration von 5×10^4 Zellen pro ml für die Anwendung festgelegt. Mit dieser Konzentration liegen die relativen Ergebnisse durchschnittlich bei 0,56 (Zellvermehrung) bis 0,49 (Vermehrung der CFU- und CD34-positiven Zellen).

4.1.7 Austestung von Medien

Das in den Vorversuchen verwendete Medium X-vivo 10 kann für die klinische Anwendung nicht genutzt werden, da immer 1% BSA zugesetzt werden mußte. Vor der Expansion der Nabelschnurblutzellen zur nachfolgenden Transplantation im Menschen mußte deshalb ein Medium gefunden werden, das die klinische Anwendung zuläßt.

In den Versuchen wurden insgesamt vier kommerziell verfügbare Medien getestet und mit dem bisher eingesetzten X-vivo10/BSA als Referenz verglichen: X-vivo 10 ohne die Zugabe von BSA, StemSpan, Cellgro und StemAlpha.

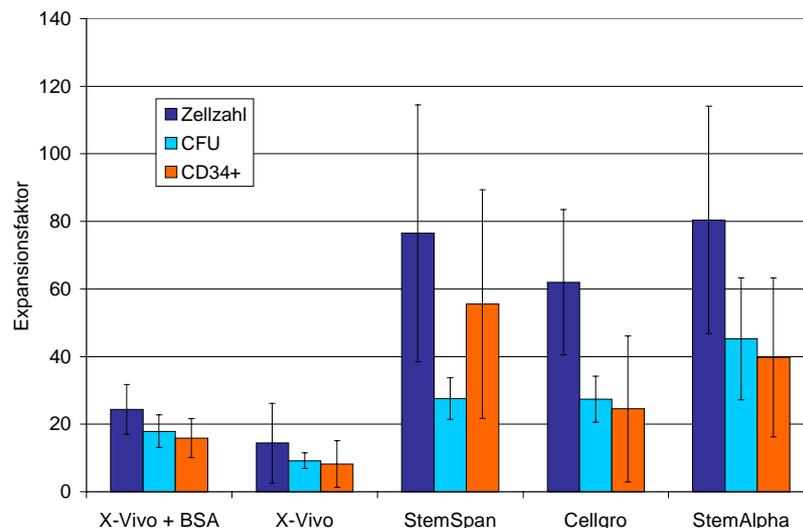


Abbildung 4.12. Vergleich verschiedener serumfreier Medien anhand der Expansionsdaten nach 7 Tagen Kultivierung mit den Zytokinen SCF, FL, TPO und IL-3, n = 3-9

Die in Abb. 4.12. dargestellten Ergebnisse zeigten zum einen, daß ohne die Zugabe von BSA mit X-vivo 10 alleine kaum eine Expansion der Zellen, sowie der CFU und CD34⁺-Vorläuferzellen zu erreichen war. Zum anderen ließen sich mit den anderen Medien die Zellen erheblich besser expandieren als mit dem Referenzmedium X-vivo 10/BSA. Die besten Ergebnisse zur Vermehrung der Gesamtzellen und CFU erzielte man mit StemAlpha, während StemSpan die besten Ergebnisse zur Vermehrung der CD34⁺-Zellen aufwies. Mit

Cellgro erreichte man eine deutlich bessere Expansion als mit X-vivo 10, doch schlechtere Ergebnisse als mit StemAlpha oder StemSpan. Trotzdem konnten diese Medien nicht als Kulturmedien herangezogen werden, da beide Medien bis zum Ende dieser Arbeit nicht über einen Nachweis zur Einsetzbarkeit beim Patienten verfügten. Aus diesem Grunde wurde Cellgro ausgewählt und im NOD/SCID-Mausmodell im Vergleich zu dem bereits im Mausversuch erfolgreichen X-vivo 10 getestet (Abb. 4.13.).

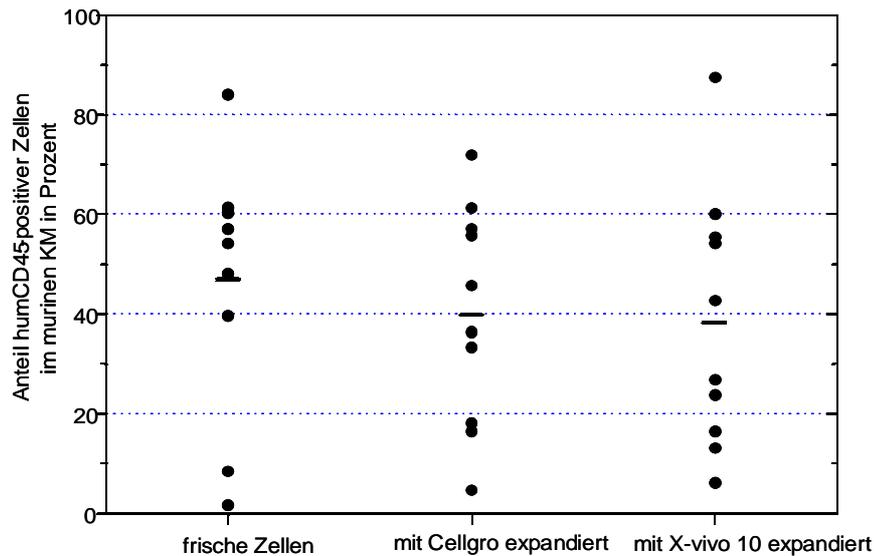


Abbildung 4.13. Vergleich expandierter Zellen nach Kultivierung mit den serumfreien Medien Cellgro und X-vivo 10. Die Kultivierung erfolgte für 7 Tage mit SCF, FL, TPO und IL-3. Im Vergleich ist der Anteil humaner Zellen nach Transplantation frische Zellen dargestellt, n = 2, jeder Punkt repräsentiert eine Maus, die Striche stellen den mittleren Anteil humaner Zellen im murinen KM dar.

Hierbei lieferten Zellen aus der Suspensionskultur mit Cellgro vergleichbare Ergebnisse zu denen mit X-vivo vermehrte Zellen. Mit den Zellen, die in diesen beiden Medien kultiviert wurden, ließ sich ein Engraftment erreichen, das dem Engraftment durch frische, unmanipulierte Zellen vergleichbar war. Die transplantierten expandierten Zellen waren zudem ebenso wie die unmanipulierten Zellen in der Lage, sowohl lymphoide (CD19-positive) als auch myeloide (CD33-positive) Vorläuferzellen im NOD/SCID-Mausmodell zu generieren (Abb. 4.14.). Die *ex vivo* Expansion der CD34⁺-Nabelschnurblutzellen in diesen beiden Medien verringerte nicht die Repopulierungsfähigkeit der kultivierten Zellen.

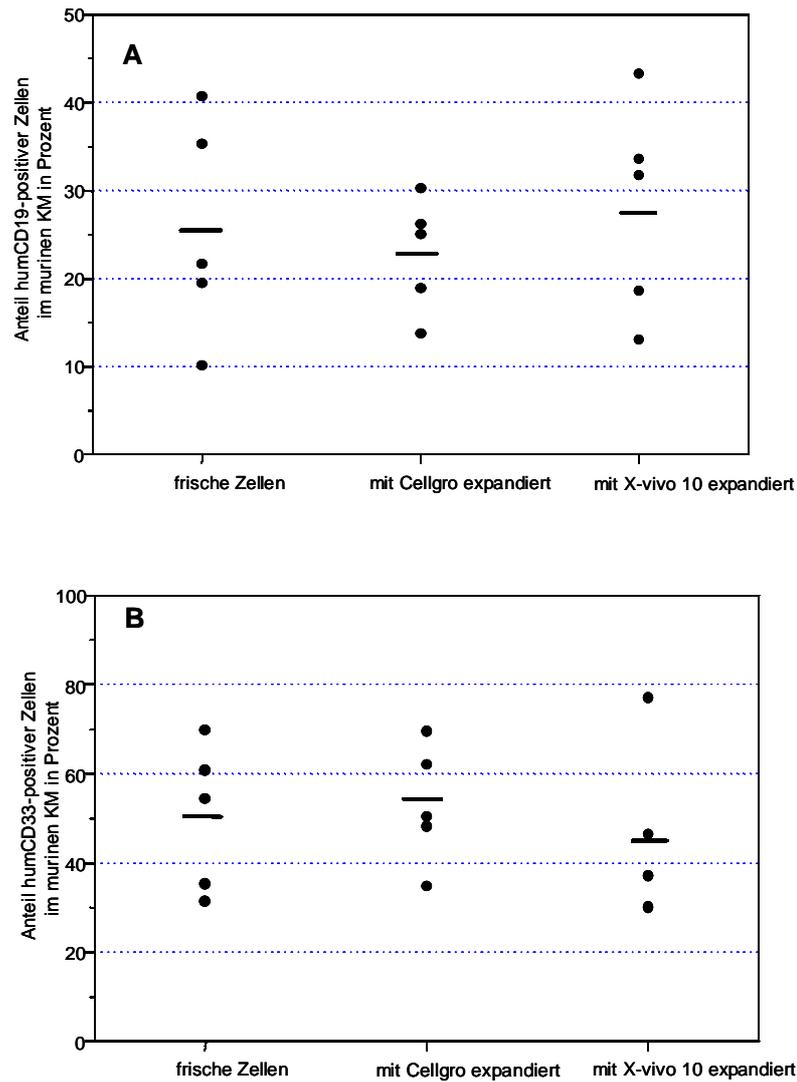


Abbildung 4.14. Vergleich der mit Cellgro SCGM oder X-vivo 10 kultivierten Zellen im NOD/SCID-Versuch. Dargestellt ist der Anteil humaner lymphoider CD19+ (A) und myeloider CD33+ (B) Vorläuferzellen nach Transplantation expandierter oder frischer Zellen. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus, die Striche stellen den mittleren Anteil humaner CD19+ Zellen im murinen KM dar, n = 1

4.1.8 Zusammensetzung der expandierten Zellen

Die Ausgangszellpopulation bestand im Durchschnitt aus über 90% CD34⁺-Zellen. Davon exprimierten 18,6 % nicht das CD38-Antigen und werden deswegen einer unreiferen Fraktion zugerechnet. Etwas mehr als ein Drittel der CD34⁺-Zellen war außerdem CXCR4-positiv, trug den Rezeptor für das Chemokin SDF-1, das für das Homing der Zellen ins Knochenmark wichtig ist [55].

Durch die Expansion der CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut veränderte sich die Zusammensetzung der Zellpopulation (Tab. 4.1.).

	CD34 ⁺ -ZELLEN	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	CD34 ⁺ /CXCR4 ⁺	CXCR4 ⁺
Tag 0	91,9 % ± 6,8	18,6 % ± 8,9	36,2 % ± 24,4	46,2 % ± 25,5
Tag 7	33,6 % ± 12,0	25,6 % ± 12,3	4,91 % ± 3,6	30,4 % ± 14,9

Tab. 4.1. Anteil markierter Zellen bei frischen unmanipulierten Zellen und nach 7 Tagen Expansion mit serumfreiem Medium unter Zugabe von SCF, FL, TPO und IL-3, n = 15-25

So war nach 7 Tagen Kultur nur noch ein Drittel der Zellen CD34-positiv. Durch die starke Vermehrung der Zellen hat die Gesamtzahl der CD34⁺-Zellen dennoch zugenommen. Von den CD34⁺-Zellen exprimierten ein geringfügig größerer Anteil als zuvor das CD38-Antigen nicht. Die Zahl der CD34⁺-Zellen, die gleichzeitig auch CXCR4-positiv sind, reduzierte sich auf 5%, während die Gesamtzahl der CXCR4-tragenden Zellen bei einem Drittel der Gesamtzellpopulation lag. Insgesamt kam es zur Vermehrung aller hier dargestellter Zellpopulationen durch die starke Vermehrung der Gesamtzellzahl.

4.2 *In vitro* Untersuchung der *Homing*- und Migrationseigenschaften primärer Zellen und Zelllinien

Wichtig für das Angehen des Transplantates im Patienten ist die Fähigkeit der transplantierten Zelle, das Knochenmark zu repopulieren. Diese Repopulierungsfähigkeit der frischen oder *ex vivo* expandierten Stamm- und Vorläuferzellen wurden im NOD/SCID-Mausmodell getestet. Sechs Wochen nach Infusion der humanen hämatopoetischen Zellen wurde das Knochenmark der Maus auf das Vorhandensein sowohl lymphoider als auch myeloider humaner Zellen untersucht. Das Engraftment umfasst dabei mehrere Schritte (Abschnitt 2.9., Abbildung 2.4.), die im Mausmodell 6 Wochen nach Transplantation nicht mehr im einzelnen untersucht werden können. An jedem einzelnen der Schritte sind verschiedenen Adhäsionsmoleküle beteiligt, deren genaue Funktion Ziel vieler Untersuchungen darstellt [45-47, 55].

Im zweiten Teil der Arbeit sollte unter Verwendung von *in vitro* Assays einzelne Schritte des *Homing*-Modells untersucht werden. Es standen dafür einerseits das Transwell-Assay zur Verfügung, ein Modell, das die Fähigkeit von Zellen bestimmen kann, durch eine Endothelschicht zu migrieren (Einleitung, Abb. 2.4. C). Andererseits sollte ein Modell, das

Sphäroid, charakterisiert werden, das Zellen auf ihre Fähigkeit zur Wanderung durch stromale Fibroblastenzellen untersucht.

4.2.1 Charakterisierung des Sphäroidsystems – ein System zur Messung der Fähigkeit der Zellen, sich durch Fibroblastenschichten zu bewegen

Das hier verwendete Sphäroid besteht aus murinen Stromazellen, die sich durch die Kultivierung in einer mit Agarose ausgekleideten Vertiefung (Abschnitt 3.17.) zu einer dreidimensionalen kugligen Struktur zusammenlagern (Abb. 4.16.). Das Sphäroid wurde bisher vor allem als Tumor- oder Metastasierungsmodell eingesetzt [71, 77]. Dabei erfolgte die Auswertung der Sphäroide durch enzymatische Auflösen der dreidimensionalen Struktur und Quantifizierung der gewanderten Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Abschnitt 3.17.).

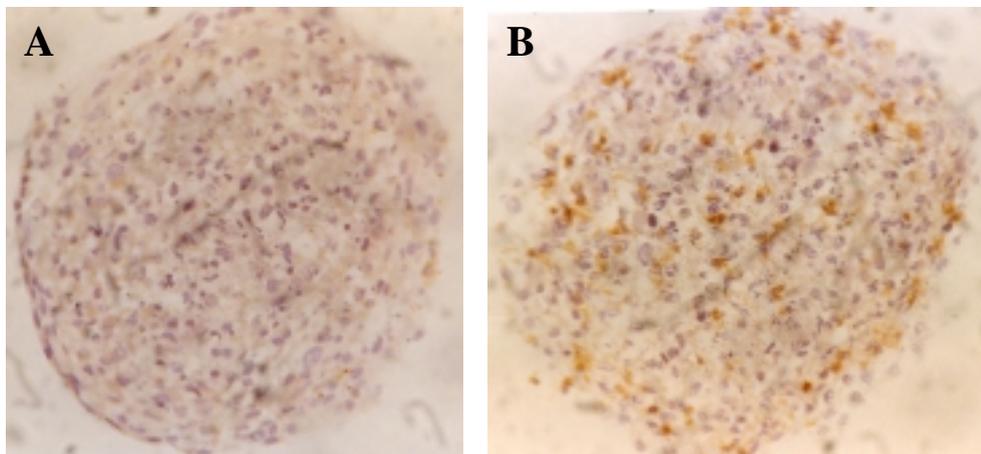


Abbildung 4.15. Foto eines immunhistologischen Schnittes durch Fibroblasten-Sphäroiden., angefertigt von der Arbeitsgruppe Dr. Kunz-Schughart, Pathologie, Uniklinikum Regensburg. **A** stellt die ungefärbte Kontrolle dar, in **B** sind humane CD45+ Zellen durch Peroxidase-Reaktion braun-orange gefärbt. Vergrößerung 200fach

Primäre CD34⁺-CB-Zellen zeigten die Fähigkeit in diese Struktur einzuwandern. Da diese Migrationsfähigkeit ähnlich dem *Lodgement* der hämatopoetischen Zellen in das Knochenmark scheint, sollte dieses Sphäroidsystem charakterisiert werden. Das Sphäroid wurde in dieser Form vorher noch nicht beschreiben und somit als Migrationsmodell etabliert werden. Es sollten also die Mechanismen aufgeklärt werden, die für die Fähigkeit der hämatopoetischen Vorläuferzellen zur Bewegung im Sphäroid, respektive Knochenmark, verantwortlich sind.

4.2.1.1 Migrationsfähigkeit der CD34⁺-Progenitorzelllinie TF-1

Primäre CB-Zellen haben die Fähigkeit, in das dreidimensionale Sphäroidsystem zu migrieren, aber auch andere humane Progenitorzelllinie, wie die TF-1 Zellen besitzen diese Fähigkeit. Die TF-1 Zellen sind ebenfalls CD34-positiv und müssen

wachstumsfaktorabhängig kultiviert werden. Sie gilt als Progenitorzelllinie da sie durch Zugabe von Faktoren in der Lage ist in verschiedene Linien auszdifferenzieren. Die TF-1 Zelllinie zeigte eine doppelt so große Fähigkeit, sich in das Sphäroid zu bewegen (Abb. 4.16.) und war damit ein gutes Modell für die Untersuchung zur Migrationsfähigkeit von Progenitorzellen ins Sphäroid, da nicht immer ausreichend primäre Zellen zur Verfügung standen.

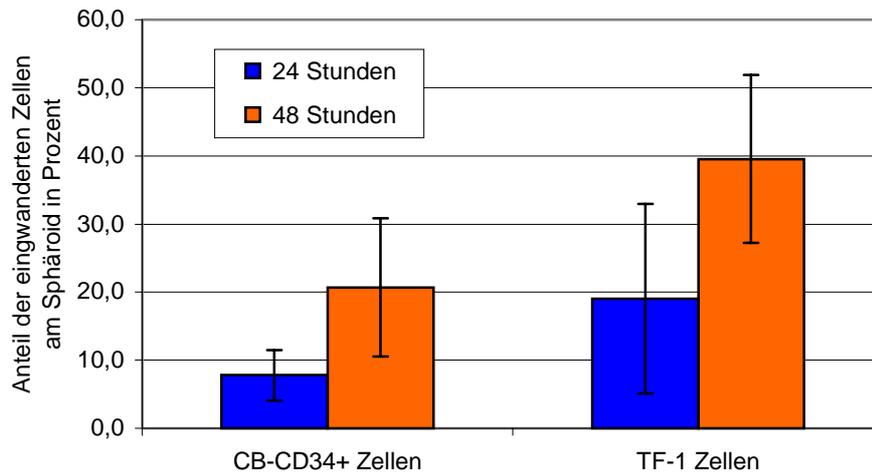


Abbildung 4.16. Vergleich der Migration in das Sphäroid nach 24 und 48 Stunden von primären CB-Zellen und der CD34⁺ Zelllinie TF-1. n = 14

4.2.1.2 Kinetik der Einwanderung

Durch das Bestimmen des Anteils der eingewanderten CD34⁺-CB-Zellen am Sphäroid zu verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 4.17.) konnte die Kinetik für die Einwanderung bestimmt werden.

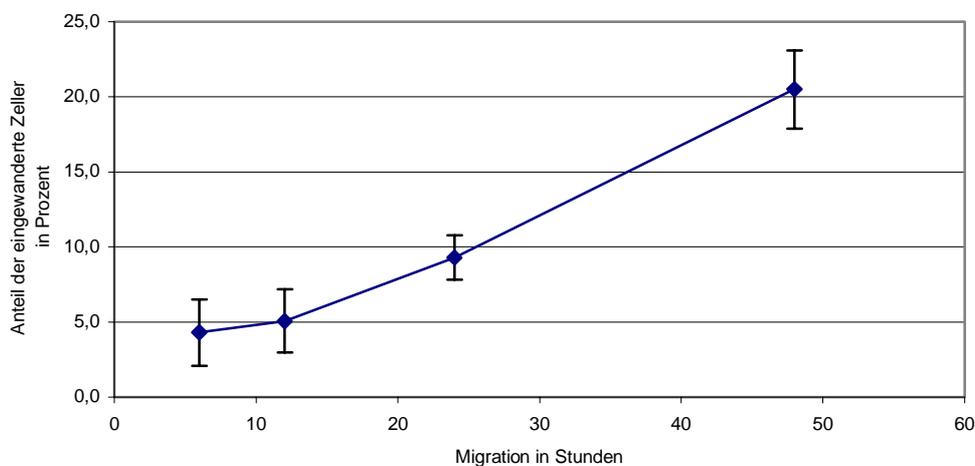


Abbildung 4.17. Bestimmung des Anteils gewanderter CD34⁺-CB-Zellen am Sphäroid nach sechs, 12, 24 und 48 Stunden. n = 3

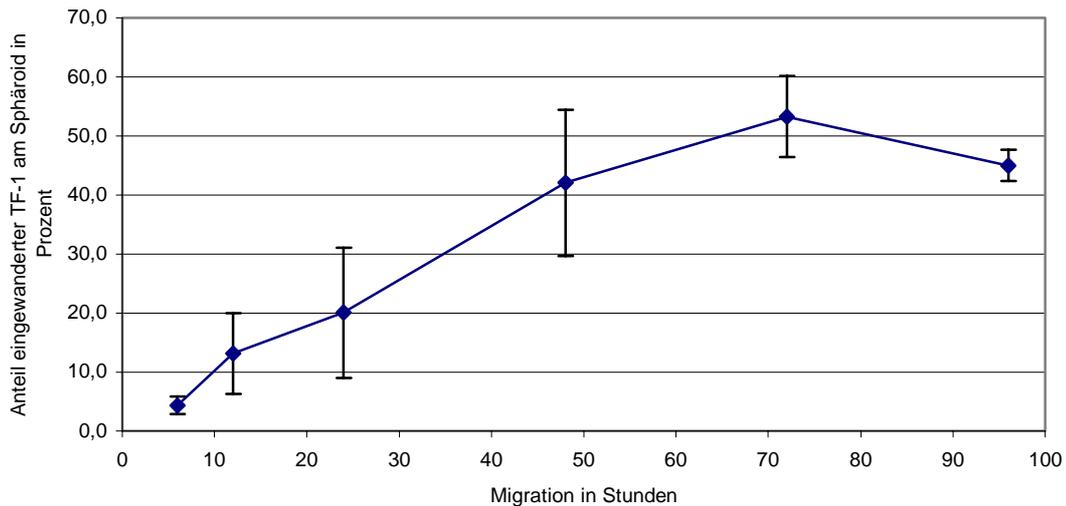


Abbildung 4.18. Vergleich des Anteils unter Standardbedingungen eingewanderter TF-1 Zellen am Sphäroid und dem Anteil eingewanderter TF-1 Zellen an Sphäroiden, die nach 24 Stunden in eine frische Vertiefung ohne TF-1 Zellen umgesetzt wurden. Bestimmung des Anteils gewanderter Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden, n = 2

Wie die Kinetik mit TF-1-Zellen über eine längere Zeitdauer ergab (Abb. 4.18.), wurde nach 72 Stunden eine Sättigung des Sphäroids mit über 50 % TF-1 Zellen erreicht. Nach 96 Stunden Migration nahm der Anteil der gewanderten Zellen etwas ab. Längere Migrationsdauern ließen sich nicht zuverlässig untersuchen, da die Zellen des Sphäroids nekrotisch wurden und sich damit die Bedingungen für die migrierenden Zellen stark änderten.

4.2.1.3 Untersuchung zur Proliferation der migrierten Zellen im Sphäroid

Um herauszufinden, ob die zeitabhängige Zunahme des Anteils an gewanderten Zellen im Sphäroid alleine mit dem stetigen Einwandern der Zellen zu erklären ist oder etwa durch Proliferation der Zellen im Sphäroid, wurden Versuche durchgeführt, bei denen das Sphäroid von nachwandernden Zellen getrennt wurde. Das Sphäroid beinhaltete zu diesem Zeitpunkt nur Zellen, die innerhalb von 24 Stunden eingewandert waren. Nach Waschen wurde ein Teil der Sphäroide in Platten überführt, die nur Medium und keine TF-1 Zellen enthielten. Als Kontrolle wurde ein anderer Teil der Sphäroide mit einwandernden Zellen standardmäßig kultiviert. Durch Analyse der Waschfraktion der umgesetzten Sphäroide konnte gleichzeitig die Frage untersucht werden, ob Zellen aus dem Sphäroid herauswandern.

Wie in Abb. 4.19. gezeigt, veränderte sich der Anteil der eingewanderten Zellen bei den umgesetzten Sphäroiden kaum, während er bei den standardmäßig kultivierten Sphäroiden sich fast vervierfachte. In der Waschfraktion der umgesetzten Zellen fanden sich zu keinem Zeitpunkt Zellen, d.h. die Zellen verließen das Sphäroid nicht wieder. Die Zellen im Sphäroid

teilen sich offenbar nicht. Die Einwanderung in das Sphäroid erfolgt über einen längeren Zeitraum und ist nicht durch die Proliferation der Zellen im Inneren erklärbar.

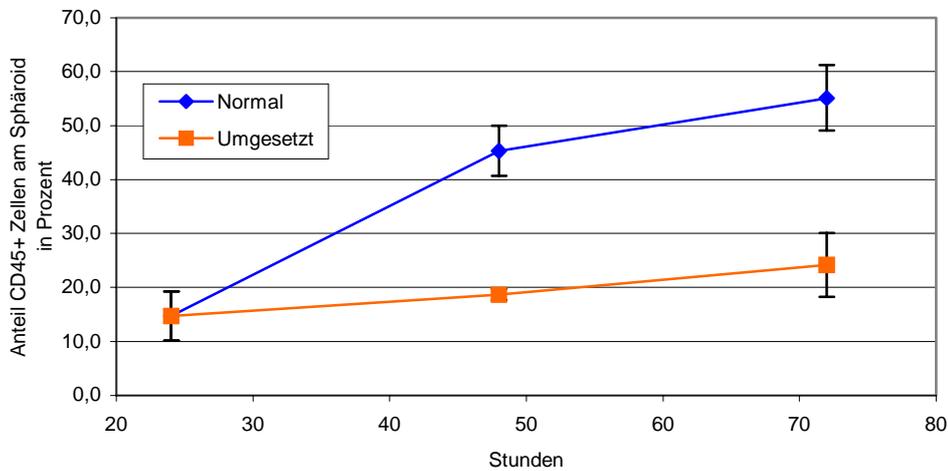


Abbildung 4.19. Bestimmung des Anteils eingewanderter TF-1 Zellen nach 6, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden, n = 2-15

4.2.1.4 Einfluß der Zellkonzentration auf das Einwandern

Um die Aufnahmekapazität des Sphäroids zu testen, wurden neben der üblichen Konzentration von 1×10^4 Zielzellen pro Sphäroid verschiedene andere Zellkonzentrationen getestet. Die Auflösung der Sphäroide erfolgte nach 48 Stunden.

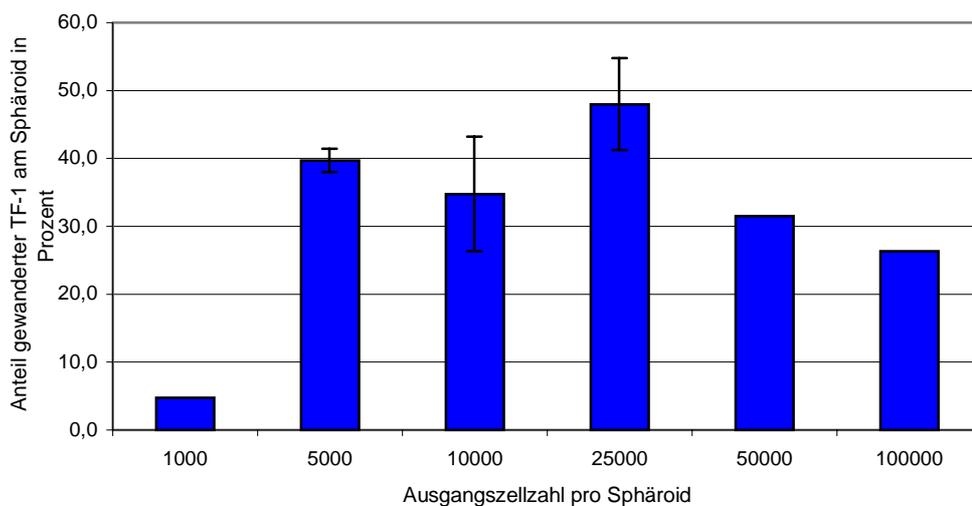


Abbildung 4.20. Einfluß verschiedener TF-1 Zellkonzentration auf die Migration gemessen nach 48 Stunden, n = 1-2

Wie Abb. 4.20. zeigt, wurde bei einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen ein maximaler Anteil von 48 % Zellen pro Sphäroid erreicht. Höhere Zellkonzentrationen erbrachten keinen größeren Anteil eingewanderter Zellen im Sphäroid, sondern eine Verringerung des Anteils eingewanderter Zellen am Sphäroid. Ab einer Konzentration von 5×10^3 Zellen war mit ca. 40% gewanderter Zellen die Kapazitätsgrenze des Sphäroids erreicht.

4.2.1.5 Abhängigkeit der Migration von einem Konzentrationsgradienten

Um auszuschließen, daß die wachstumsfaktorenabhängigen TF-1 Zellen lediglich dem Konzentrationsgradienten der humanen Zytokine IL-3 und GM-CSF folgen, die sie zur Proliferation benötigen und von der Stromazelle produziert werden, wurde die Bildung eines Gradienten durch Zugabe derselben Zytokine in das Medium verhindert.

Da sich keine Änderung im Migrationsverhalten der TF-1 in das Sphäroid durch Zugabe von Zytokinen ins Außenmedium ergab (Abb. 4.21.), konnte ein Einfluß ausgeschlossen werden.

Wie bereits beschrieben, vermitteln SDF-1 über seinen Rezeptor CXCR4 und IP-10 sowie MIG über ihren Rezeptor CXCR3 die Migration hämatopoetischer Zellen. Durch die Aufhebung eines möglichen Konzentrationsgradienten sollte der Einfluß dieser Chemokine auf die Migration der hämatopoetischer Zellen ins Sphäroid überprüft werden.

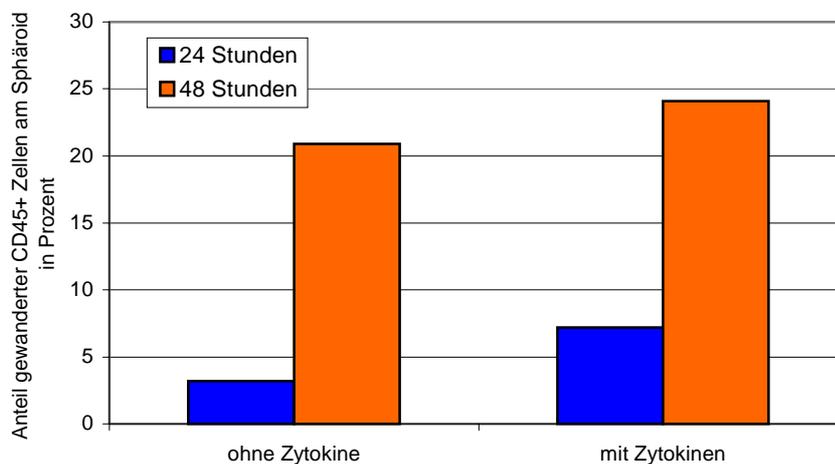


Abbildung 4.21. Effekt auf die Migration von TF-1 Zellen durch die Zugabe von IL-3 und GM-CSF in das Außenmedium der Sphäroide. Anteil der migrierten Zellen nach 24 bzw 48 Stunden Migration.

Wie Abb. 4.22. zeigt, war der Effekt auf die Migration von TF-1 ins Sphäroid durch die Zugabe der Chemokine ins Außenmedium sehr gering, so daß ein Konzentrationsgradient der Chemokine SDF-1, MIG und IP-10 keine große Rolle bei der Migration von hämatopoetischen Vorläuferzellen in das Sphäroid zu spielen scheint.

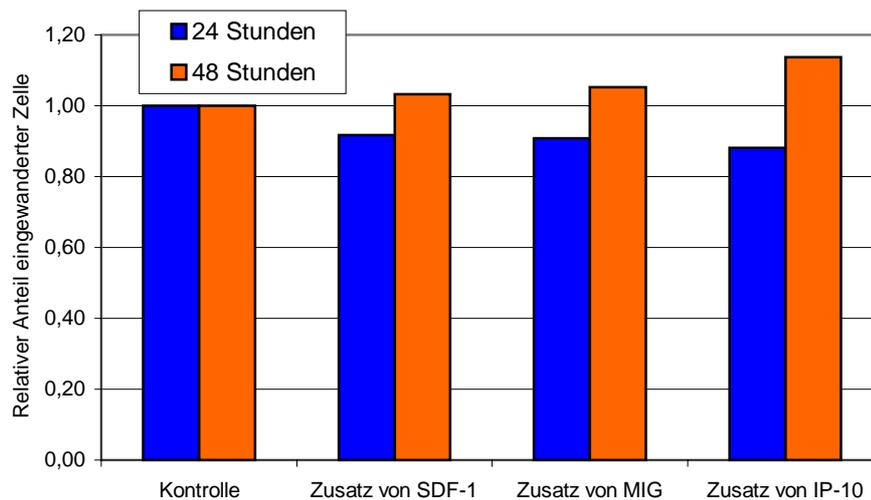


Abbildung 4.22. Einfluß der Zugabe der Chemokine SDF-1, MIG und IP-10 in das Außenmedium der Sphäroide auf die Migration von TF-1 Zellen. Migration relativ zur Kontrolle ohne Zugabe von Zytokinen. Bestimmung der Migration nach 24 und 48 Stunden.

Ein Nachweis der Chemokine im Medium nach 24 bzw. 48 Stunden erfolgte nicht, so daß ein Einfluß der Chemokindegradation nicht ausgeschlossen werden kann.

4.2.1.6 Austesten verschiedener Zelllinien

Um das Modell der Sphäroide weiter charakterisieren zu können, sollte untersucht werden, welche Zelleigenschaften für die Migration in das Sphäroid wichtig sind. Dazu sollte durch Austesten verschiedener Zelllinien ein Hinweis darauf erlangt werden, welche Eigenschaften zur Migration notwendig sind.

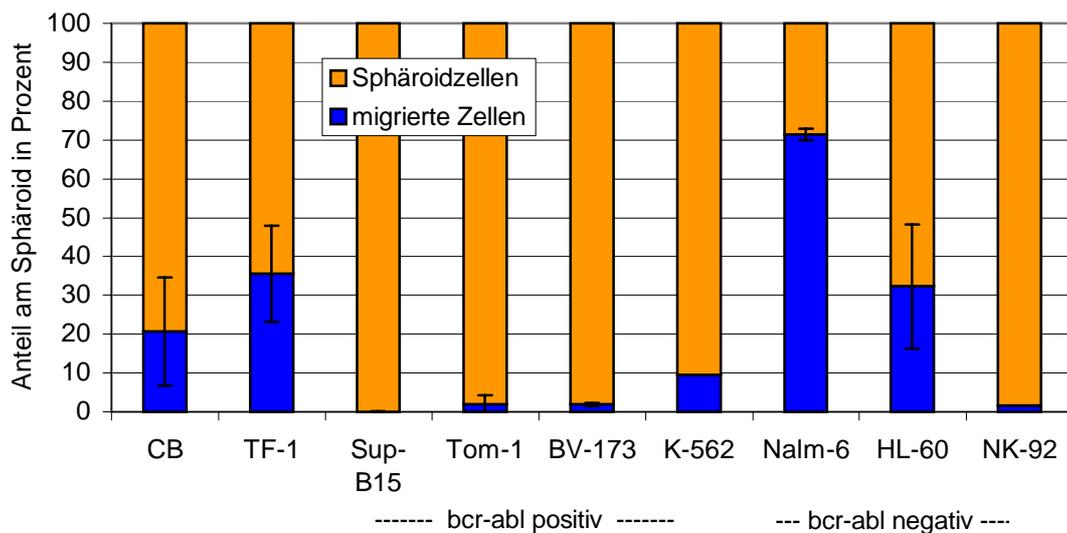


Abbildung 4.23. Migrationsverhalten verschiedener Zelllinien dargestellt als Anteil migrierter Zellen (blau) und Anteil Sphäroidzellen (orange). Zum Vergleich ist der Anteil migrierter primärer CB-Zellen und TF-1 Zellen gezeigt. n = 2-19

Sowohl die primären CB-CD34⁺-Zellen als auch die CD34⁺-Progenitorzelllinie TF-1 sind in der Lage, in das Sphäroid zu migrieren. Es wurden weiterhin Zelllinien getestet (Abb. 4.23.), die von Leukämien stammen, die das Bcr-abl Gen tragen (Philadelphia (Ph)+) und Zelllinien, die Bcr-abl negativ sind.

Hier zeigte sich, daß die Anwesenheit von Bcr-abl mit dem Fehlen der Fähigkeit zur Migration der Zellen in das Sphäroid korrelierte. So fanden sich die Bcr-abl-positiven Zelllinien Sup-B15, Tom-1, BV-173 und K-562 nur zu einem Anteil von weniger als 10 % in den Sphäroiden. Dagegen migrierten die Bcr-abl-negativen Zelllinien Nalm-6 und HL-60 im hohen Maße (71,4 % bzw. 32,3 %) und waren damit den Standardwerten von CB und TF-1 (20,7 % bzw. 35,6 %) vergleichbar.

Um den Einfluß des Bcr-abl-Gens auf die Migrationsfähigkeit der Zelle direkter untersuchen zu können, wurden Zellen eingesetzt, die mit dem Bcr-Abl-Gen transfiziert wurden. Die Transfektion wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Ruthard, Uniklinikum Frankfurt, durchgeführt. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen (Wildtyp) oder mit einem Leervektor transfizierte Zellen (pinco). In Abb. 4.24. ist die Wanderung der humanen Promonozytenlinie U-937, der murinen B-Lymphozytenvorläuferzelllinie BA/F3 und der murinen Vorläuferzelllinie 32D dargestellt.

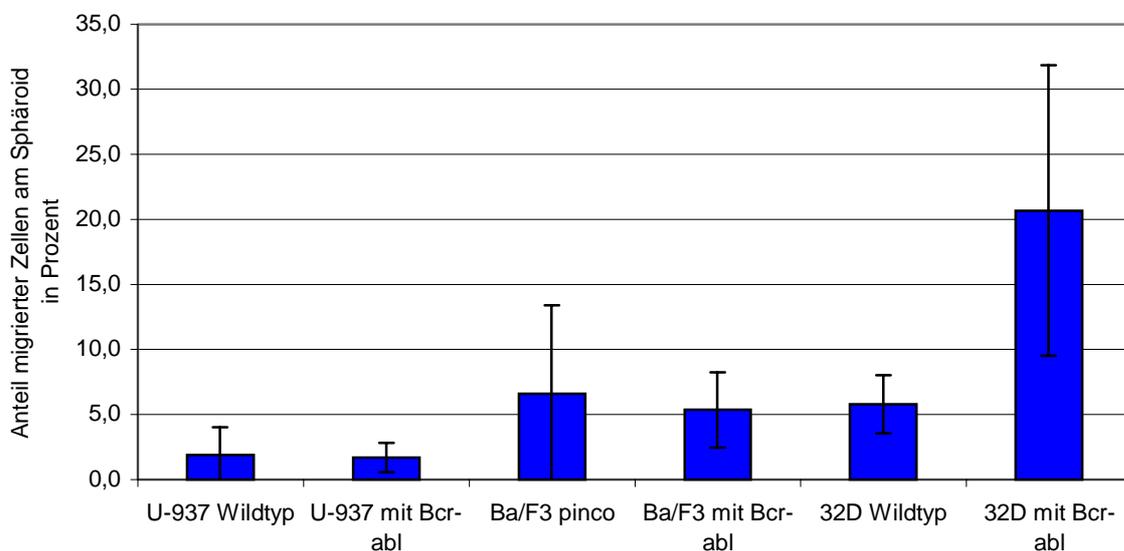


Abbildung 4.24. Vergleich des Migrationsverhalten von Wildtyp Zelllinien und Zelllinien, die mit bcr-abl transfiziert wurden. n = 2

Das Einbringen des Bcr-abl-Gens in die U-937 und in die BA/F3 brachte keine Veränderung im Migrationsverhalten der Linie. Lediglich bei der Vorläuferzelllinie 32D migrierten die

Zellen mit dem transfizierten Bcr-abl-Gen etwa viermal besser (20,7 %) als die Wildtypzellen (5,8 %). Dies zeigte, daß Bcr-abl die Migrationsfähigkeit der Zellen nicht inhibiert.

Die zur Verfügung stehenden primären MNC von AML-Patienten (Ph-) wanderten mit einem Anteil von 38,2 % (AML) in das Sphäroid. Die primären MNC von ALL-Patienten (Ph+) wanderten erst nach Kultivierung für 24 Stunden, dann aber zu einem Anteil von 16,3 % in das Sphäroid.

4.2.1.7 Charakterisierung der Zelllinien und primären Zellen nach Adhäsionsmarkern

Da das Bcr-abl-Gen sich nicht als der ausschlaggebende Faktor für die Migrationsfähigkeit von hämatopoetischen Zellen ins Sphäroid erwies, stellte sich die Frage nach anderen Zelleigenschaften, die für diese Fähigkeit eine Rolle spielen könnten. Dazu wurde die unterschiedliche Ausstattung an Zelloberflächenproteinen untersucht. Verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR3 sowie Integrine (VLA-4, VLA-5 und LFA-1), werden als wichtig für Homing und Migration beschrieben [25, 44]. Die Expressionsmuster der Zelllinien für diese Oberflächenproteine wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt (Tab. 4.2.)

	CB	TF1	NALM6	HL60	AML	ALL	BV173	K562	NK92
Bcr-abl	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Oberflächenproteine									
CD45	+	+	-	+	+	+	(+)	+	+
CD34	+	+	-	-		+	-	-	-
CD19	-		+		+		+		
CD117	+	+	(+)	-	+		-		
Chemokinrezeptoren									
CXCR3	+	(+)	-	-	+	+	(+)	(+)	+
CXCR4	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Adhäsionsproteine									
CD49d (VLA-4)	+	+	+	+		+	+	+	+
CD49e (VLA-5)	+	+							
CD11a (LFA-1)	+	-	-	(+)		+	-	-	+
CD29 (β -Integrin)	+	+	+	+			+		
CD54 (ICAM)	+	+	+	-		+	+	+	+
CD106 (VCAM-1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Migration in %	20,7	35,6	71,4	32,3	38,2	11,0	1,9	9,6	1,7

Tabelle 4.2. Analyse verschiedener primärer Zellen und Zelllinien in der Durchflußzytometrie auf die Expression von bestimmten Oberflächenmarkern, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle. + bedeutet Expression, - bedeutet keine messbare Expression des untersuchten Proteins. (+) = keine konsistente Expression.

Es ließ sich kein Expressionsmuster von Oberflächenmarkern erkennen, das mit der Migrationsfähigkeit der Zellen korrelierte.

So werden die Adhäsionsmoleküle, wie VLA-4 und andere β_1 -Integrine, von allen Zellen exprimiert, sowohl von den migrierenden als auch von den nichtmigrierenden. Dagegen wird der Rezeptor CXCR4 für das Chemokin SDF-1 von migrierenden Zellen zum Teil nicht exprimiert, wie z.B. von den TF-1-Zellen. Dafür wird er aber von nichtmigrierenden Zellen, wie BV-173, NK-92 und U-937, exprimiert.

Ähnliches zeigt sich auch für den Chemokinrezeptor CXCR3: So befindet sich der Rezeptor für IP-10 und MIG nicht auf migrierende Zellen, wie Nalm-6 und HL-60, aber nichtmigrierende Zellen, wie NK92, tragen ihn auf der Oberfläche.

4.2.1.8 Blockierung verschiedener Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle

Trotz Fehlen eines charakteristischen Expressionsmusters von Oberflächenproteinen bei migrierenden Zellen sollte die Rolle einiger Chemokinrezeptoren und ihrer Liganden im Sphäroidmodell durch Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen die Rezeptoren CXCR4 und CXCR3 sowie gegen das Integrin VLA-4 vor der Migration geprüft werden. CXCR4 ist Rezeptor für das Chemokin SDF-1, das für die Transmigration von hämatopoetischen Vorläuferzellen durch einen Endothellayer eine Rolle spielt [51, 69]. CXCR3 ist Rezeptor für MIG und IP-10. Die Beteiligung von CXCR3 ist bei der Migration von B-Lymphozyten von Bedeutung [57] und wird von primären CB-CD34⁺-Zellen nach Kultivierung mit GM-CSF verstärkt exprimiert [58], woraus sich für uns die Frage nach einer Beteiligung am Homing stellte. VLA-4 ist Ligand für VCAM-1 das von verschiedenen stromalen und endothelialen Zellen exprimiert wird. VLA-4 wird als wichtig für die Adhäsion an die und anschließende Migration durch die Endothelschicht des Gefäßes erachtet [45, 55]. Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 5 μg pro ml CD34⁺-CB- und TF-1 Zellen zugegeben. Die CD34⁺-CB-Zellen wurden vorher über Nacht bei 37° C mit SCF, FL, TPO und IL-3 stimuliert, da diese nach Stimulation im höheren Maße migrierten (siehe Abschnitt 4.2.2.3.) und dadurch ein deutlicherer Effekt bei der Migration zu sehen sein sollte. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem Antikörper gegen humanes IgG₁ blockiert wurden.

Die Blockierung der Oberflächenproteine bei stimulierten CD34⁺-Zellen aus CB ist in Abb. 4.25. gezeigt. Es war kein Effekt auf die Migration der Zellen durch Blockierung von CXCR4 zu sehen. Einen leicht stimulatorischer Effekt auf die Migration (Anteil von 30,6 % der Kontrollzellen im Sphäroid zu 37,7 % der VLA-4 blockierten Zellen) schien die Zugabe von Anti-VLA4 zu haben, während die Blockierung von CXCR3 nach 24 Stunden Migration

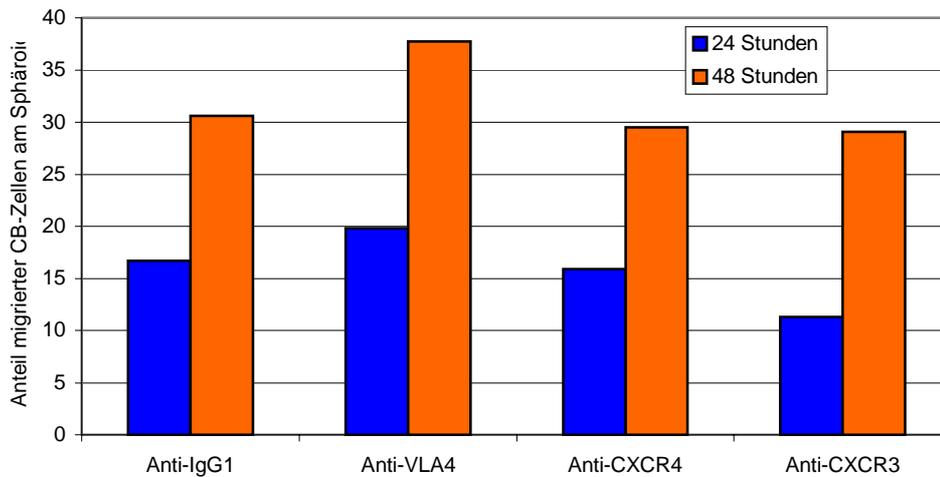


Abbildung 4.25. Migrationsverhalten von über Nacht stimulierten CD34+CB-Zellen nach Blockierung der Oberflächenmarker VLA-4, CXCR4 und CXCR3 mit 5 μ g/ml monoklonalem Antikörper. Als Kontrolle wurde Anti-IgG1 eingesetzt. Auswertung nach 24 und 48 Stunden.

einen leichten inhibitorischen Effekt hatte (Reduktion des Anteils migrierter Zellen im Sphäroid um ein Viertel), der nach 48 Stunden Migration nicht mehr erkennbar war. Ein ähnliches Bild (Abb.4.26.) zeigte sich bei der Blockierung der Oberflächenmoleküle von TF-1 Zellen.

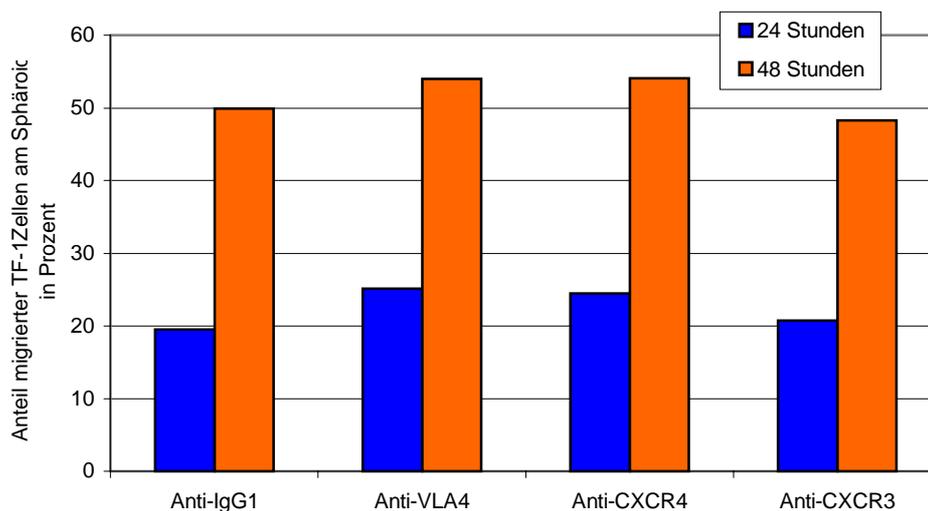


Abbildung 4.26. Migrationsverhalten von TF-1 Zellen nach Blockierung der Oberflächenmarker VLA-4, CXCR4 und CXCR3. Als Kontrolle dient die Blockierung mit unspezifischen IgG1. Auswertung nach 24 und 48 Stunden

Hier hatte die Blockierung sowohl des Integrins VLA-4 als auch der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 keine Auswirkung auf die Migrationsfähigkeit der Zellen. Mit

spezifischer Blockierung wanderten die Zellen im gleichen Maße wie die Kontrollzellen. Der Effekt nach 48 Stunden war dem nach 24 Stunden vergleichbar.

4.2.1.9 Inhibition verschiedener Signalwege der Zelle

Da kein direkter Zusammenhang zwischen Adhäsionsmolekülen und dem Wanderverhalten verschiedener Zelllinien gefunden wurde, wurden in TF-1 Zellen selektiv verschiedene Signalwege inhibiert und somit der Einfluß der inhibierten Wege auf das Migrationsverhalten untersucht. Die Inhibitoren wirken auf verschiedene Abschnitte in den Signaltransduktionswegen der hämatopoetischen Zelle. LY294002 wurde als selektiver Inhibitor der PI-3-Kinase eingesetzt. Zur Hemmung von Proteintyrosinkinasen wurde der unspezifische Inhibitor Genistein eingesetzt, sowie Tyrphostin AG 490, spezifischer Inhibitor von JAK-2 und STI571, ein selektiver Inhibitor der Abl-, c-kit- und PDGF-Kinase. Das Pertussis Toxin (PT) aus *Bordetella pertussis* dagegen hemmt die α -Untereinheit von G-Proteinen durch ADP-Ribosylierung.

Wie in Abb. 4.27. zu sehen ist, hatte LY294002 keinen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Migration in das Sphäroid, so daß man davon ausgehen kann, daß bei dem Einwandern die PI-3 Kinase keinen Einfluß hat. Auch die mehr oder minder spezifische Hemmung der Proteintyrosinkinasen im Signalweg der Zellen hatte nur geringe Auswirkungen auf die Migrationsfähigkeit der TF-1. So erreichte man durch Zugabe von Genistein oder Tyrphostin im Mitteln nur eine Hemmung um 20 %. Die Inhibition der abl-, c-kit und PDGF-Kinase durch STI571 verringerte die Migration der Zellen im Vergleich zur Kontrolle nicht.

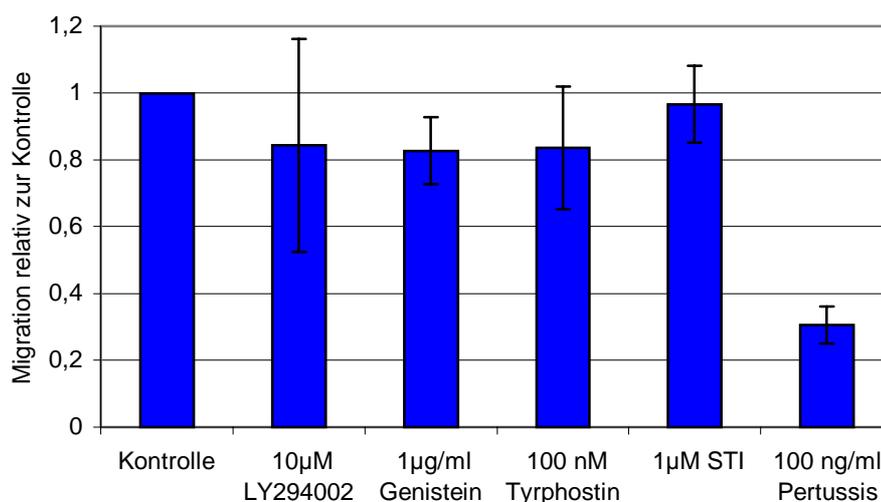


Abbildung 4.27. Einfluß verschiedener Inhibitoren der Signaltransduktion auf das Migrationsverhalten von TF-1 Zellen. Dargestellt ist die relative Migration im Vergleich zur Kontrolle, TF-1 Zellen ohne Inhibitoren, n = 4

Lediglich durch die Hemmung der G-Proteine durch das Pertussis Toxin wurde eine weitgehende Inhibition der Migration der Zellen erreicht. Der Prozeß der Migration von hämatopoetischen Zellen in das Sphäroid geschieht also unter Beteiligung eines trimeren G-Proteins.

4.2.1.10 Inhibition der kleinen GTPasen

Neben der Signalvermittlung in die Zelle und innerhalb der Zellen, die im oberen Abschnitt untersucht wurde, spielen die kleinen GTPasen der Rho-Familie eine wichtige Rolle bei der Motilität von Zellen (Abschnitt 2.12., Abb. 2.5.). Die Mitglieder der Familie, Rho, Rac und Cdc42 regulieren die Organisation von Actin-Filamenten [63, 66].

HEMMUNG DER GTPASE	RAC	RHO A	CDC 42
Toxin B	+	+	+
Fusionstoxin (FT)	-	+	-
Lethal Toxin (LT)	+	-	-

Tabelle 4.3. Spezifische Hemmung (+) der kleinen GTPasen durch Toxine von Clostridien.

Um den Einfluß der Rho-Familie auf die Migration von hämatopoetischen Zellen in das Sphäroid zu untersuchen, wurden verschiedene Toxine zur Inhibition der kleinen GTPasen eingesetzt. Das Toxin B aus *Clostridium difficile* inhibiert die GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 durch Glykosylierung des G-Proteins, während das Lethal toxin (LT) aus *Clostridium sordellii* durch Glykosylierung spezifisch Ras und Rac, jedoch nicht Rho hemmt. Das Fusionstoxin (FT) bestehend aus dem Toxin C3 des *Clostridium limosum* und der C2I-Einheit von *Clostridium botulinum* kann mit Hilfe eines Carriers C2II aus *Clostridium botulinum* die Zellmembran passieren und in den Zellen spezifisch die Rho-GTPase durch ADP-Ribosylierung hemmen [78].

Der Einsatz der Toxine hatte deutliche Effekte auf die Einwanderung der TF-1 in das Sphäroid (Abb. 4.28.). Die Hemmung der kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 durch Toxin B verhinderte die Migration der Zellen über 24 und 48 Stunden vollständig. Auch LT und FT hatten einen deutlichen, wenn auch nicht vollständigen inhibitorischen Effekt. Nach 24 Stunden war der Anteil der gewanderten Zellen am Sphäroid um zwei Drittel geringer als der Anteil der Kontrolle. Auch nach 48 Stunden Migration war der Anteil der gewanderten Zellen um 30 % (im Falle des FT) oder 55 % (LT) geringer als der Anteil der gewanderten Kontrollzellen. Bei der Migration von TF-1 in das Sphäroid handelt es sich also um einen

Prozeß unter Beteiligung der kleinen GTPasen der Rho-Familie. Da das Ausschalten von Teilen der Rho-Familie mit spezifischen Inhibitoren die Migration nur verringerte, jedoch nur die Hemmung aller Mitglieder die Migration verhinderte, sind sowohl Rho, als auch Rac und Cdc42 am Prozeß der Migration beteiligt.

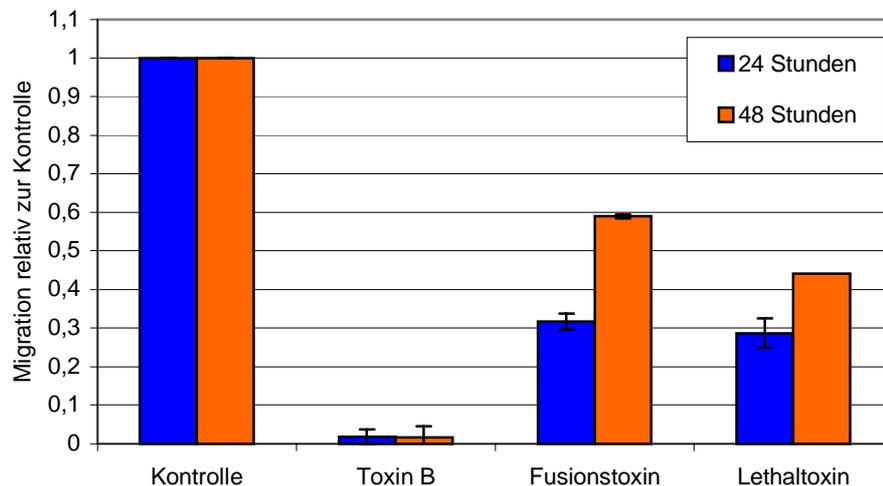


Abbildung 4.28. Einfluß der Inhibition der kleinen GTPasen auf die Migration von TF-1 Zellen über 24 bzw 48 Stunden. Toxin B und Lethalstoxin wurden mit 100 ng/ml eingesetzt, Fusionstoxin/Carrier mit 1000 ng/ml. Die Migration ist relativ zur Kontrolle dargestellt, n = 2-3

Eine Kombination von Pertussis Toxin und FT sollte Aufschluß darüber geben, ob sich durch die Inhibition von G-Proteinen im Signaltransduktionsweg und die Hemmung der kleinen GTPase Rho A die Migration der Zellen in das Sphäroid verstärkt verhindern läßt und so die Frage geklärt werden, ob die beiden Komponenten der Migration sich additiv oder synergistisch verhalten.

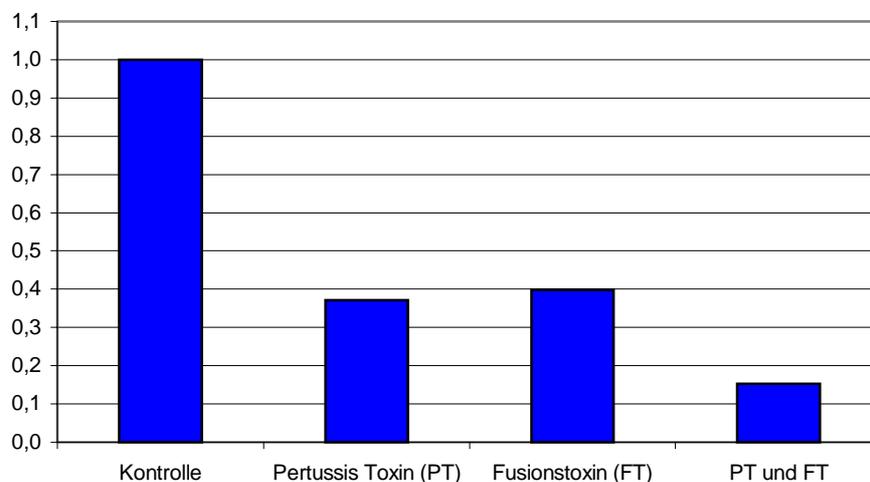


Abbildung 4.29. Einfluß der Kombination aus Pertussis Toxin und Fusionstoxin auf die Migration von TF-1 über 12 Stunden. Migration ist relativ zur Kontrolle dargestellt. PT wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt, Fusionstoxin/Carrier mit 1000 ng/ml.

Abb. 4.29. zeigt, daß sich die Hemmung der Migration durch eine Kombination aus der Inhibition der G-Proteine durch Pertussis Toxin und der Inhibition von Rho A (FT) noch zu 75 % verstärken ließ. Doch wurde keine vollständige Inhibition der Migration erreicht. Die beiden verschiedenen Komponenten der Migration wirken additiv zueinander jedoch nicht synergistisch.

4.2.2 Einfluß der Kultivierung auf das Migrationsverhalten

Durch Kultivierung werden die Zellen verschiedenen Stimuli von Wachstumsfaktoren und Zytokinen ausgesetzt. Die Eigenschaften der Zelle verändern sich, und auch die Migrationsfähigkeit kann sich ändern.

4.2.2.1 Wanderung von expandierten $CD34^+$ -Zellen im Transmigrationsassay

Auch bei primären Zellen ließ sich während der Kultivierung eine Veränderung in der Migrationsfähigkeit der Zellen erkennen. So wanderten frische $CD34^+$ -CB-Zellen im Transwell-Assay schlechter (Abb. 4.30.) als die über 7 Tage kultivierten $CD34^+$ -Zellen. Das Transwell-Assay imitiert die Funktion der Knochenmarkendothelzellen *in vivo*, indem es die selektive transendotheliale Migration von Progenitoren demonstriert [48], die beim *Homing* der Zellen notwendig ist (Einleitung 2.9., Abb. 2.4. A).

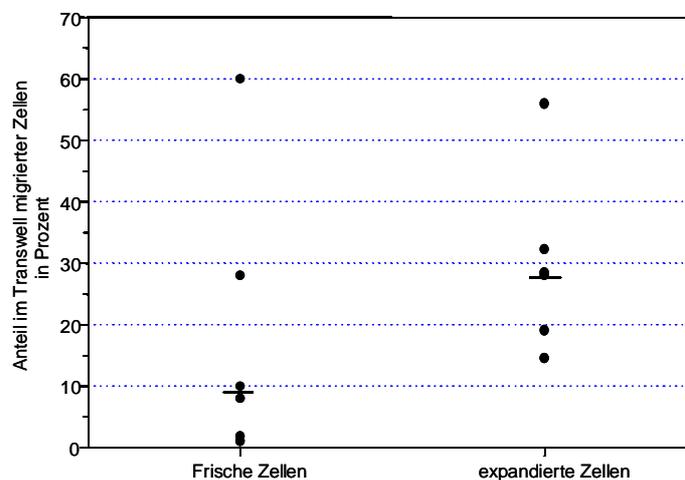


Abbildung 4.30. Anteil migrierter Zellen im Transwell-Assay von frischen Zellen oder 7 Tage expandierten Zellen mit SCF, FL, TPO und IL-3. Jeder Punkt steht für ein Experiment, angegeben ist der Median der Werte.

Für dieses Assay wird auf eine mikroporöse Membran ein konfluent Layer aus humanen Knochenmarkendothelzellen (HBMEC) aufgebracht. Die Membran unterteilt das System in eine untere und eine obere Kammer (Abschnitt 3.16.) Durch Zugabe von chemotaktischen Stimuli in die untere Kammer, kann die Migrationsfähigkeit von Zellen aus der oberen

Kammer durch die Endothelzellschicht in die untere Kammer bestimmt werden. Als chemotaktischer Stimulus wurde das Chemokin SDF-1 gewählt.

Die über 7 Tage expandierten Zellen migrierten zu einem Anteil von im Median 28 % durch das Transwell-Assay, während die frischen Zellen im Median nur zu 9 % im Transwell-Assay wanderten. Peled *et al.* konnten zeigen, daß Zellen, die CXCR4 tragen und in der Lage sind im Transwell-Assay auf SDF-1 hin zu migrieren, ein höheres Engraftmentpotential in der NOD/SCID-Maus haben [55]. Die Fähigkeit zum Engraftment in der NOD/SCID-Maus kann also mit der Fähigkeit, im Transwell-Assay zu migrieren, korreliert werden.

4.2.2.2 Vergleich der Migrationsfähigkeit expandierter CD34⁺-Nabelschnurblut-zellen in den verschiedenen Migrations- und Engraftment-Assays, Transwell, Sphäroid und NOD/SCID-Maus

Die Migration von hämatopoetischen Zellen in das Sphäroid, als Modell für das *Lodgement* im KM, sollte sich ebenfalls abhängig von der Kultivierung der Zellen verändern. Um eine Korrelation zwischen der Dauer der Kultivierung, den verschiedenen Modellen der Migration (Transwell-Assay und Sphäroid) und des Engraftments (NOD/SCID-Mausmodell) herzustellen, wurden frische CD34⁺-CB-Zellen und Zellen nach Kultivierung für ein, zwei, sieben und zehn Tage in den unterschiedlichen Assays ausgewertet.

Mit Dauer der Kultivierung die CD34⁺-Zellen gewannen diese im verstärkten Maße die Fähigkeit in das Sphäroid (Abb. 4.31.) und durch die Endothelschicht des Transwell-Assays zu migrieren. Nach zwei Tagen Kultivierung wurde ein Plateau von über 45 % migrierten Zellen im Sphäroid und über 25 % transmigrierten Zellen im Transwell-Assay erreicht. Im Transwell-Assay ließ sich durch Kultivierung der Zellen für 10 Tage noch mal eine Steigerung des Anteils migrierender Zellen um die Hälfte auf 45 % transmigrierter Zellen erreichen.

Anders stellte sich das Bild beim Engraftment in die NOD/SCID-Maus dar. Nach ein oder zwei Tagen Kultivierung der CD34⁺-CB-Zellen verringerte sich der Anteil humaner CD45⁺-Zellen im murinen KM um das Fünffache im Vergleich zum Anteil humaner Zellen nach Transplantation frischer Zellen (Abb. 4.31.). Erst nach 7 Tagen Expansion wurden mindestens 80 % der Menge nach Transplantation unkultivierter Zellen im murinen KM gefunden. Nach 10 Tagen Kultur wurden sogar fast doppelt so viele humane Zellen im KM der Maus detektiert. Die Zellen erlangten durch Kultivierung in den ersten beiden Tagen einen Engraftment-Defekt, der seinen Ursprung aber weder im Verlust der Fähigkeit zur Migration auf einen SDF-1-Stimulus durch einen Endothellayer noch der Fähigkeit zur Migration in das Stroma hinein hat.

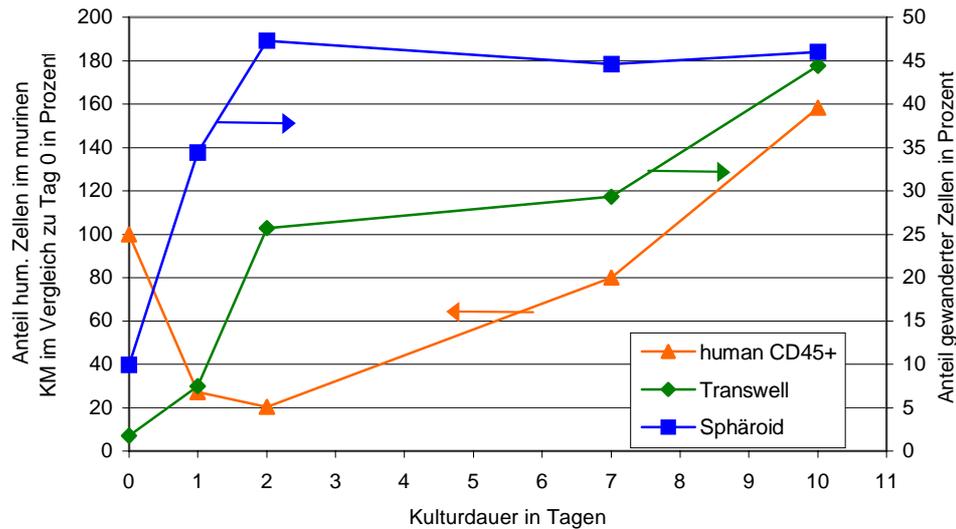


Abbildung 4.31. Abhängigkeit der Fähigkeit von CD34⁺CB-Zellen zur Migration in das Sphäroid (□), im Transwell-Assay (◇) und zum Engraftment in NOD/SCID-Mäusen (Δ) von der Expansionsdauer der CB-Zellen, Die Skala für den Anteil humaner Zellen befindet sich links, für den Anteil im Transwell-Assay oder Sphäroid migrierter Zellen rechts, n=2

Betrachtete man die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der CD34⁺-Zellen während der Kultivierung (Abb. 4.32.), zeigte sich, daß VLA-4 und VLA-5 über die gesamte Zeit der Kultivierung von den meisten Zellen (>90%) exprimiert wurden. Lediglich LFA-1 wurde im Laufe der Kultur von den CD34⁺-Zellen hochreguliert. So nahm die Zahl der LFA-1 exprimierenden Zellen im ähnlichen Maße zu, wie die Zellen eine größere Migrationsfähigkeit im Sphäroid oder Transwell-Assay zeigten.

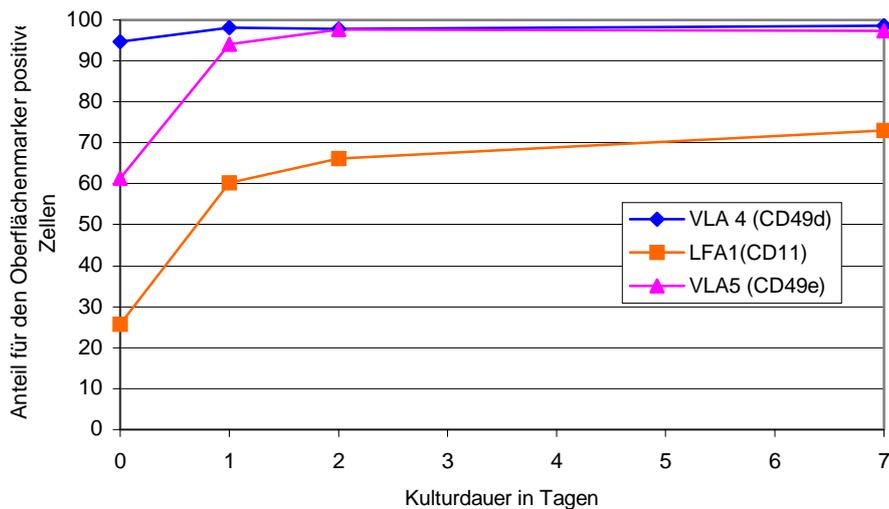


Abbildung 4.32. Veränderung der Expression der Adhäsionsmarker VLA-4, VLA-5 und LFA auf CB-Zellen im Verlaufe der Kultur über 7 Tage mit SCF, FL, TPO und IL-3. n = 1-4

5 Diskussion

5.1 Die Zytokinkombination SCF, FL, TPO und IL-3 erweist sich als geeignet zur *ex vivo* Expansion

Die Entwicklung des hämatopoetischen Systems ist reguliert durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine, die durch Knochenmarkstromazellen und andere akzessorische Zellen sezerniert oder von den Stromazellen membranständig präsentiert werden. In den letzten 30 Jahren wurden mehr als 20 dieser Wachstumsfaktoren entdeckt, kloniert und rekombinant hergestellt. Dabei lassen sie sich unterscheiden in solche, die auf die differenzierten Zellen und die, die auf die primitiven Progenitoren wirken. Eine Reihe von Zytokinen mit proliferationsfördernden Eigenschaften erwiesen sich als geeignet für die Kultivierung von hämatopoetischen Zellen und zeigten teilweise synergistische Effekte. Aus den bekannten Faktoren sollten nun diejenigen ausgewählt werden, die eine Vermehrung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zulassen, ohne sie zugleich auszudifferenzieren.

Es zeigte sich, daß sich mit einer Kombination von SCF, FL, TPO und IL-3 die frühen (CD34⁺-Zellen und LTC-IC) und determinierten Vorläuferzellen (CFU) ohne Verlust der Repopulierungsfähigkeit optimal expandieren lassen [79].

Da die Zytokine SCF, TPO und FL als unverzichtbar für die Kultivierung primitiver hämatopoetischer Zellen gelten [24, 80-83], wurde diese Kombination als Basiscocktail für die *ex vivo* Expansion gewählt. Durch den Zusatz weiterer Zytokine wurde eine Steigerung der Amplifikation vor allem der primitiven hämatopoetischen Zellen aus CB erhofft.

IL-6 wird im murinen System als stimulierend für die Produktion von CFU angesehen. In dem hier vorgestellten humanen System aus CD34⁺-CB-Zellen werden durch die Zugabe von IL-6 CFU ebenfalls stärker vermehrt als mit dem Basiscocktail aus SCF, FL und TPO. Ein positiver Effekt auf die Vermehrung der LTC-IC war jedoch nicht zu erkennen. Auch Petzer *et al.* beschreiben bei der Zugabe von IL-6 zu einem Cocktail aus SCF, FL und IL-3 eine verstärkte Amplifikation von CFU aus KM-Zellen, sehen aber keinen Einfluß auf die Expansion der LTC-IC [24]. Mit dem Einsatz von löslichem IL-6-Rezeptor zusätzlich zu IL-6 und der damit verbundenen Aktivierung des gp130 Rezeptors wurde ein Synergismus mit FL und SCF und darausfolgende Amplifikation der NOD/SCID-repopulierenden Zellen aus CD34⁺-Zellen aus CB beschrieben [84].

In der Hämatopoese resultiert die Proliferation und Differenzierung aus der Balance zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Wachstumssignalen. In diesem Zusammenhang wurde TGF- β als ein Inhibitor der Hämatopoese identifiziert [85].

Bei Zugabe von TGF- β zur Kultivierung von CD34⁺-CB-Zellen wurde die Produktion der Gesamtzellzahl und der CFU inhibiert [86]. Um diesen inhibitorischen Effekt durch endogenes TGF- β [34] zu verhindern, sollte durch Zugabe des blockierenden Antikörpers Anti-TGF- β eine verbesserte Expansion der hämatopoetischen Zellen erreicht werden. Doch zeigte sich durch Zugabe des Antikörpers zum Basiscocktail keinerlei Verbesserung in der Expansion der frühen und determinierten Progenitoren.

Es besteht Unklarheit, ob IL-3 *in vitro* einen vorteilhaften oder schädlichen Effekt auf die Stamm- oder Vorläuferzelle ausübt. In primitiven murinen hämatopoetischen Zellen mit lympho-myeloidem Potential beeinträchtigt IL-3 die Selbsterneuerungskapazität dieser Zellen und blockiert die Zytokin-stimulierte Generation von lymphoiden Vorläuferzellen [87, 88]. Andererseits gilt IL-3 als einziger Faktor, der alleine in der Lage ist, CFU zu vermehren [24], während weder FL noch TPO alleine die Expansion dieser Vorläuferzellen unterstützen können.

Die Daten dieser Arbeit zeigen nach 7 Tagen Kultur mit dem Basiscocktail aus SCF, FL und TPO einen proportionalen Anstieg der CD34⁺-Zellen sowie der primitiven (LTC-IC) und determinierten (CFU) Vorläuferzellen. Die Zugabe von IL-3 verstärkt die Proliferation aller analysierter Zellpopulationen. Wie für die Vermehrung der CD34⁺-Zellen zeigt sich auch für die primitiven CD34⁺CD38⁻ - und die CXCR4⁺-Zellpopulationen, daß deren prozentualer Anteil an den Gesamtzellen abnimmt. Durch die verstärkte Vermehrung aller Zellen resultiert mit IL-3 dennoch eine Nettoexpansion dieser Zellpopulationen [79].

Ob es sich dabei um eine Vermehrung der unreifen CD34⁺CD38⁻-Zellen handelt, oder ob wir nur eine Herunterregulierung des Oberflächenmarkers CD38 sehen, bleibt ungewiss. Es wird beschrieben, daß das CD38-Antigen von CD38⁺-Zellen bei serumfreier Kultivierung verloren geht, ohne daß diese Zellen als primitive Progenitoren angesehen werden sollten und es so zu Fehleinschätzungen zur Expansion der CD38⁻-Zellen kommt [89, 90].

Allerdings wird von einigen Arbeitsgruppen eine Verschlechterung [91, 92] oder das vollständige Verschwinden [84] der NOD/SCID-Repopulierungskapazität von expandierten CB-Zellen beschrieben, wenn IL-3 im Kulturmedium zur Expansion enthalten war. Im Gegensatz dazu haben andere Gruppen IL-3 in ihren Zytokincocktail zur Expansion von humanen CB-Zellen eingeschlossen und trotzdem eine Beibehaltung der Langzeitrepopulierungsfähigkeit in Schafen [93] oder NOD/SCID-Mäusen [94-98] gesehen.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte beim Vergleich der unmanipulierten und der mit den Zytokinen SCF, FL, TPO und IL-3 kultivierten Zellen keine Abnahme der *in vivo* Repopulierungsfähigkeit festgestellt werden. Dagegen finden sich nach Transplantation der Zellen, die ohne die Zugabe von IL-3 kultiviert wurden, etwas weniger humane Zellen im murinen Knochenmark.

Darüber hinaus waren trotz der Anwesenheit von IL-3 in der Kultur sowohl lymphoide als auch myeloide Vorläufer im Knochenmark der Maus nachweisbar. Folglich wird das Multilineage-Engraftment in der Maus durch Zugabe von IL-3 in das Kulturmedium der CD34⁺-CB-Zellen nicht verringert. Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit keinen schädlichen Effekt von IL-3 auf die *ex vivo* Expansion primitiver hämatopoetischer Vorläuferzellen. Die Vermehrung der CD34⁺-CB-Zellen in Anwesenheit von SCF, FL, TPO und IL-3 erfolgt ohne extensive Amplifikation der ausgereiften Progenitoren auf Kosten der früheren Vorläuferzellen und repopulierenden primitiven Stammzellen.

5.2 Die CD34- Selektion ist notwendig für eine optimale Expansion

Das Aufreinigen der Zellen aus Nabelschnurblut ist mit hohen Kosten, Zeitaufwand und extensiven Manipulationen verbunden. Deshalb stellt sich die Frage, ob die unselektionierten MNC eine geeignete Ausgangspopulation darstellen, vor allem, wenn, wie von Fietz *et al.* beschrieben, ein Anstieg des Anteils der klonogenen und der CD34⁺-Zellen nach Expansion von MNC festzustellen wäre [99]. Doch expandieren die in dieser Arbeit untersuchten MNC aus CB deutlich schlechter als die selektionierten CD34⁺-Zellen und bestätigen damit Ergebnisse, daß die Anreicherung von CD34⁺-CB-Zellen eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche *ex vivo* Expansion der CB-Zellen ist [74-76, 100, 101]. Durch die Selektion wird die zu expandierende Population von nichtklonogenen Zellen befreit, die vorhandene Nährstoffe verbrauchen und die pH-Bedingungen verändern würden [100]. Das klonogene Potential und die LTC-IC-Frequenz der CD34⁺-Population und der unaufgereinigte MNC-Fraktion des CB sind vergleichbar [102]. Außerdem stellt die CD34⁺-angereicherte Zellpopulation eine homogenere Gruppe dar als die Mischpopulation der MNC. Da die verschiedenen Zellpopulationen unterschiedliche Ansprüche an die Kulturbedingungen haben, ist es leichter, diese für Progenitoren zu optimieren als für MNC. Die verwendeten CD34⁺-Zellen sind zur Repopulierung der NOD/SCID-Maus in der Lage, auch wenn CD34^{neg}-Stammzellen beschrieben wurden [103], die allerdings nur eine winzige Population innerhalb der Stammzellen darstellen.

5.3 Während der Kultivierung nimmt die Konzentration der Zytokine im unterschiedlichen Maße ab

Zur Regulierung der Hämatopoese werden hämatopoetische Wachstumsfaktoren durch Zellen der Knochenmarknischen oder anderen akzessorischen Zellen sezerniert. Daneben produzieren hämatopoetische Zellen selbst einige Wachstumsfaktoren und Zytokine, und es kommt so zu intrazellulären Wechselwirkungen [104, 105]. Diese auto- und/oder parakrinen Schleifen dienen der Regulation der normalen Hämatopoese. CD34⁺-Zellen aus Knochenmark und peripherem Blut produzieren neben verschiedenen anderen Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowohl SCF, FL als auch TPO [104]. Die Zytokinkonzentrationen im Medium der untersuchten Zellen lagen im pg/ml-Bereich und das konditionierte Medium zeigte biologische Wirkung, wie z.B. die Verhinderung von Apoptose und leichte Stimulation der Proliferation. Auch CB-MNC exprimieren mRNA von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie unter anderem von SCF, FL, TPO und TGF- β , nicht aber von IL-3 [106].

Bei der Kultivierung von CD34⁺-Nabelschnurblutzellen werden demnach Zytokine ins Medium sezerniert. So erklärt sich, daß sich SCF trotz seines raschen Zerfalls bei 37° C bis zum Ende der Kultivierung im Medium nachweisen läßt. TPO dagegen läßt sich schon nach kürzester Zeit nicht mehr im Medium detektieren. Der Konzentrationsabfall des Zytokins wird also neben dem Zerfall bei 37° C noch im großen Maße durch den Verbrauch durch die proliferierenden Zellen bestimmt. Zandstra *et al.* schreiben dazu, daß genau der Zelltyp, dessen maximale Proliferation *in vitro* auf der Stimulation durch die höchste Konzentration bestimmter Zytokine beruht, auch die größte Kapazität besitzt, genau diese Zytokine aus dem Medium zu entfernen [107].

Von SCF, FL, TPO und IL-3 wird beschrieben, daß sie in der Lage sind, die Proliferation von humanen CD34⁺-KM-Zellen in der G₀-Phase zu initiieren. Aber nur IL-3 erhält die maximale Proliferation von CD34⁺-G₀-Phase Zellen, die mit SCF und FL vorstimuliert wurden [24, 81, 108]. IL-3 ist damit offenbar gerade in den ersten Tagen der Kultur notwendig für die optimale Amplifikation von Vorläuferzellen. In der Anwesenheit von fortdauernden hohen Konzentrationen an SCF und FL mag die niedrige Konzentration von IL-3 ab dem vierten Tag der Kultur einen vorstellbaren Verlust des Stammzellpotentials der primitiven Zellen verhindert haben. Diese geordnete Aktivierung von G₀-Phase CD34⁺-Zellen scheint geeignet für die Vermehrung primitiver hämatopoetischer Stammzellen zu sein. Das bestätigt die Hypothese, daß nicht nur der Typ der eingesetzten Zytokine, sondern auch die Dauer der Interaktion der Zytokine mit der hämatopoetischen Zelle und den Rezeptoren, die pro

Zeiteinheit gebunden werden, für die Expansion einer bestimmten Reifungsstufe der hämatopoetischen Zellen wichtig ist [107, 109].

5.4 Kultur dauern von mehr als 4 Tagen vermehren die Zellen ausreichend ohne Verlust der Repopulierungsfähigkeit

Die Dauer der Kultivierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen sollte Zeit für die Vermehrung der Zellen bieten, ohne sie auszudifferenzieren und ihr Stammzellpotential anzugreifen. Da bei einer Kultivierung der hämatopoetischen Zellen von mehr als vier Tagen ein vollständiger Verlust der NOD/SCID-repopulierenden Zellen [95] oder eine Verschlechterung der Repopulierungsfähigkeit gesehen wurde [91], sollten nur relativ kurze Kultur dauern ausgetestet werden. Die Kultivierung von CB-CD34⁺-Zellen über 4 Tage bewirkte nur eine geringe Vermehrung der frühen und determinierten Vorläuferzellen, weshalb in dieser Arbeit Kultur dauern von 7, 10 und 14 Tagen getestet wurden.

Eine längere Kulturdauer von 10 oder 14 Tagen erzielt eine stärkere Vermehrung der frühen Vorläuferzellen. Allerdings nimmt der Anteil apoptotischer Zellen vom siebten auf den zehnten Kulturtag deutlich zu. Obwohl die Apoptoserate als ein guter Marker für die Einschätzung der Qualität von Stammzelltransplantaten gilt [110], hat eine Kulturdauer von 10 Tagen keinen negativen Einfluß auf das Engraftment in der NOD/SCID-Maus. Für die Untersuchung unterschiedlicher Zytokinkombinationen, Medien und Kultursysteme wurde schließlich eine Kulturdauer von 7 Tagen festgelegt. In dieser Zeit gelang eine ausreichende Expansion der frühen und determinierten Progenitorzellen. Im NOD/SCID-Mausmodell wurde zudem gezeigt, daß die über 7 Tage expandierten Zellen ihre Engraftmentfähigkeit nicht verlieren.

Andere Gruppen expandieren inzwischen die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen über einen längeren Zeitraum ohne Verlust der repopulierenden Zellen [111]. Für die Anwendung der Zellen zur Transplantation in der Klinik ist eine Kulturdauer über 12 Wochen allerdings nicht praktikabel.

5.5 Das statische Kultursystem Teflonbeutel erweist sich anderen System gegenüber als überlegen

Bei der Wahl des Kultursystems standen statische Kultursysteme, wie Zellkulturflasche und Teflonbeutel, den gerührten Systemen, wie Spinner gegenüber. Dabei besitzt der Teflonspinner als gerührtes System einige Vorteile gegenüber den Limitierungen des statischen Systems. Durch das ständige Durchmischen sind die Zellen einer homogenen

Umgebung ausgesetzt. Es entstehen keine Gradienten und Limitierungen, wie im statischen System, in bezug auf Nährstoffe und Zytokine. Der Spinner stellt ein wohlkontrolliertes, abgeschlossenes System mit reproduzierbaren Eigenschaften dar.

Der Einsatz von Kollagenträgern zur Kultivierung von CB-CD34⁺-Zellen im Teflonspinner entsprang der Theorie, durch das Nachempfinden der Nischen im *in vivo* Mikroenvironment die Vermehrung der Zellen zu verbessern. So gelang es sogar ohne Zugabe von Zytokinen, hämatopoetische Progenitoren über einen langen Zeitraum zu kultivieren, wenn man ihnen dreidimensionale Tantalum-beschichtete poröse Partikel zur Verfügung stellte [112].

In unserem System hatte die Kultivierung unter Zugabe von Kollagenträgern jedoch keinen positiven Effekt auf die Vermehrung der Zellen. Außerdem gelang die Kokultivierung der Zellen mit Kollagenträgern nur in Anwesenheit von Serum. Von serumhaltigen Bedingungen ist allerdings bekannt, daß sie zur Ausdifferenzierung der Zellen durch das im Serum enthaltene TGF- β führen und somit zur Produktion von CFU auf Kosten der frühen Progenitoren (CD34⁺-Zellen und LTC-IC) [113]. Tierisches Serum ist zudem durch die Gefahr von Immunreaktionen gegen tierische Proteine und durch Transmission von Infekten bei der klinischen Anwendung unerwünscht. Auch ist seine Zusammensetzung durch die Variabilität der Quelle schlecht definierbar.

Collins *et al.* gelang die Kultivierung von CB-Zellen unter serumfreien Bedingungen in einem gerührten System. Die Gruppe sah eine gegenüber dem statischen System verbesserte Vermehrung der Gesamtzellen und der CFU [113, 114]. Auch unsere Ergebnisse zeigen sehr gute Daten des Teflonspinners in bezug auf die Vermehrung der genannten Zellpopulationen. Doch bereits bei der Vermehrung der CD34⁺-Zellen und der primitiven Zellen (LTC-IC) sind die Vorteile des gerührten Systems gegenüber dem statischen System des Teflonbeutels nicht mehr klar zu erkennen. Beim Vergleich der beiden Systeme im *in vivo* System, der NOD/SCID-Maus, zeigt sich dann eine klare Überlegenheit des Teflonbeutels gegenüber dem Spinner. Der Vorteil des gerührten Systems scheint sich damit auf die Vermehrung der determinierten Vorläuferzellen zu beschränken, während für die Expansion der repopulierenden Zellen das statische System im Vergleich die besseren Bedingungen liefert. So beschreibt Collins *et al.* eine hohe Sensitivität der hämatopoetischen Zellen gegenüber der Rührgeschwindigkeit und eine Anfälligkeit gegenüber Scherstreß [113]. Die hohe Sensitivität der hämatopoetischen Vorläuferzellen gegenüber Scherstreß zeigte sich in dieser Arbeit in der Verringerung des Zellverlustes und der verbesserten Vermehrung der Zellen nach Ersatz eines Glas- durch einen Teflonspinner. In der Kooperation mit der Forschungsanstalt Jülich wurden zudem Suspensions- und Festbettreaktoren getestet, mit denen sich die ebenfalls eine gute

Expansion von frühen und determinierten Vorläuferzellen erzielen ließ. Bei der Transplantation der im Reaktor kultivierten Zellen in die NOD/SCID-Maus war aber keine Repopulierung erreichbar [39, 115].

In statischen Kulturen, wie dem Zellkulturbeutel und der 12-Lochplatte, sind die Expansionsrate und ihre Kinetik stark von der Ausgangszellkonzentration abhängig [116], weshalb es wichtig war, zu dem ausgewählten Kultursystem die geeignete Zellkonzentration zu finden. Auch die Daten dieser Arbeit zeigen, daß sich mit steigender Zelldichte die Expansion der Gesamtzellen, aber auch der CFU und der CD34⁺-Zellen reduziert. Zudem sind ähnlich wie bei der Wahl des geeigneten Kultursystems auch bei der Auswahl der Zellkonzentration nicht nur die besten Expansionsergebnisse wichtig, sondern auch die Praktikabilität bei der klinischen Anwendung. Mit den niedrigsten Zellkonzentrationen gelingt die maximale Expansion. Für die klinische Anwendbarkeit bedeutet dies aber eine nichthandhabbare Medium- und unrentable Zytokinmenge.

So würde die Expansion eines normalen CB-Transplantates von 5×10^6 CD34⁺-Zellen im optimalen Konzentrationsbereich von 5×10^3 Zellen pro ml das Ansetzen von einem Liter Medium und den Einsatz von mehreren Milligramm Zytokinen bedeuten.

5.6 Die *ex vivo* Expansion gelingt unter Erhalt der Repopulierungsfähigkeit

Die optimalen Bedingungen zur Expansion von CD34⁺-Zellen unter Erhaltung der Stammzeleigenschaften wurden abschließend im Repopulierungsassay, dem NOD/SCID-Mausmodell, überprüft. Dabei erwies die *ex vivo* Expansion von CD34⁺-CB-Zellen mit einem Zytokincocktail aus 50 ng/ml SCF und FL sowie 20 ng/ml TPO und 10 ng/ml IL-3 in einer Suspensionskultur als geeignet, um diese Zellen ohne Verlust der Repopulierungsfähigkeit zu expandieren.

Die Kultivierung erfolgt mit einem GMP-tauglichen Medium, Cellgro SCGM in einem statischen Kultursystem, dem Teflonbeutel, über sieben Tage. Unter diesen Bedingungen lassen sich die Gesamtzellzahl, sowie die determinierten (CFU) und frühen (CD34⁺-Zellen und LTC-IC) Vorläuferzellen vermehren, ohne daß diese Zellen ihre Fähigkeit verlieren, das Knochenmark zu besiedeln, dort anzuwachsen, zu proliferieren und ein neues hämatopoetisches System zu etablieren, wie sich durch die Anwesenheit von lymphoiden und myeloiden humanen Zellen im murinen Knochenmark nachweisen ließ.

5.7 Nicht alle Zellen zeigen die Fähigkeit zur Migration in das Sphäroid

Die Stammzellforschung hat sich auf die Fähigkeit zum Langzeitengraftment als das die hämatopoetische Stammzelle beschreibende Charakteristikum fokussiert und das *Homing* ist der erste Schritt in diesem Engraftment-Prozeß [117]. Die Stammzellmotilität, die gerichtete Bewegung der Zellen und das *Homing* stellen deshalb wichtige neue Herausforderung an die Forschung über die Stammzelle. Die Untersuchungen der Migrationseigenschaften von hämatopoetischer Stammzellen finden derzeit *in vitro* in verschiedenen Adhäsionsmodellen oder Transmigrationsassays, wie dem Transwell-Assay statt. Die *in vivo* Situation wird durch Transplantation der Zellen in ein Tiermodell oder in Mäuse, die für bestimmte, für das *Homing* als wichtig angesehene Proteine (Rezeptoren oder Faktoren) defizient sind, nachempfunden. Dabei treten durch die Rarität der hämatopoetischen Stammzelle bedingte experimentelle Schwierigkeiten auf.

Mit dem dreidimensionalen Sphäroidmodell aus stromalen Fibroblasten sollte nun ein *in vitro* Modell geschaffen werden, mit dem die *Homing*- oder Migrationseigenschaften hämatopoetischer Progenitorzellen untersucht werden können. Die Sphäroidkokultivierung wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung der Biologie solider Tumoren eingesetzt und stellt ein Modell mit Eigenschaften zwischen *in vitro* Einzellschichten und *in vivo* Tumoren dar [71, 77]. Da das *Homing* der hämatopoetischen Zellen und das Finden der Nischen z. B. nach Stammzelltransplantationen im dreidimensionalen Knochenmarkstroma stattfindet, bietet die 3-Dimensionalität des Sphäroids Vorzüge im Vergleich zu anderen Systemen, wie dem Transwell-Assay oder Wandern auf beschichteten Platten, mit denen die Adhäsion und Migrationsfähigkeit von Zellen untersucht wird. Die Zellmigration in eine dreidimensionale Matrix ist ein komplexerer Vorgang als die Bewegung über ein planares Substrat, da es zum einen das Rearrangement des Aktinzytoskeletts in drei Dimensionen erfordert und auch die Wechselwirkung mit der Matrix im dreidimensionalen Raum erfolgt. Im Sphäroidmodell sind die verschiedenen Schritte des *Homings* und das Zusammenwirken der Zellen in allen drei Dimensionen vereinigt. Es wird also nicht nur eine einzelne Eigenschaft auf 2-D-Ebene gesondert betrachtet, die mit der *in vivo* Situation wenig zu tun hat.

Das vergleichbare *in vivo*-System, die Maus, ist dagegen sehr komplex. Die verschiedenen Mechanismen und Schritte des *Homingprozesses* lassen sich im Einzelnen nicht gut beobachten und voneinander trennen. Außerdem ist der Zeitraum bis zur Analyse mit 6 Wochen sehr lange, so daß nicht zwischen *Homing per se* und Proliferation und/oder Differenzierung unterschieden werden kann. Das Sphäroidmodell bietet sich weiter an zur Untersuchung der Migration, da man im Unterschied zum Mausmodell die zu untersuchende

Zellpopulation genau bestimmen kann und damit den Einfluß von akzessorischen Zellen ausschließen kann.

Die Migration in das Sphäroid stellt einen gerichteten Prozeß dar. Die untersuchten Zellen wandern zeitabhängig, sowie abhängig von der Anzahl der zugegebenen Zellen. Sie verteilen sich im gesamten Sphäroid, wie man in den immunhistologischen Schnitten sehen kann. Die Kapazität des Sphäroids ist erschöpft, wenn es zu 50 bis 60 % aus migrierten Zellen besteht. Die fehlende Proliferation der migrierten Zellen im Inneren der Sphäroide überrascht nicht, da bereits andere Gruppen in Anwesenheit von Serum und geringen Konzentrationen von Zytokinen bei Adhäsion von CD34⁺-Zellen über β_1 -Integrine eine Inhibition der Zellproliferation durch Inhibition der G₁/S-Progression beobachtet haben [118, 119].

Neben den primären CD34⁺-CB-Zellen wandern die Zelllinie TF-1 und weitere hämatopoetische Zelllinien. Leukämische Zelllinien allerdings, die das Onkogen Bcr-abl tragen, sind nicht in der Lage, in das Sphäroid zu migrieren.

Das legt den Gedanken einer Inhibition der Migration durch das Onkogen nahe. Die Rolle von Bcr-abl für die Motilität von Zellen ist unklar, doch verändert das Onkogen Migrations- und Adhäsionseigenschaften der transformierten Zellen [120-122]. Der Bcr-Teil des Fusionsproduktes trägt einen Abschnitt, der die kleine GTPase Rac binden kann [120], während der Abl-Teil eine Aktinbindungsstelle enthält. Die Aktivierung des Bcr-abl-Proteins könnte Einfluß nehmen auf die Motilität der transformierten Zellen und die Migrationsfähigkeit in das Sphäroid inhibieren [123].

Bei der Untersuchung von murinen 32D Zellen, die mit Bcr-abl transfiziert wurden, wiesen überraschenderweise die transformierten Zellen ein größeres Migrationspotential auf als die Wildtypzellen. Da die Zellen allerdings unter Wachstumsfaktorentzug kultiviert wurden, um die transformierten Zellen zu selektionieren, und der Einfluß von Zytokinen auf die Migration beträchtlich ist [124-127], muß der Einfluß dieses Entzuges auf die Wanderungsfähigkeit der Zellen erst noch untersucht werden. Die Stimulation von Bcr-abl-positiven Zellen, wie die primären MNC einer Ph⁺ ALL, mit Zytokinen kann die mangelnde Migrationsfähigkeit der Zellen ebenfalls überwinden.

5.8 Verschiedene Adhäsionsmarker haben unterschiedlichen Einfluß auf die Migration in das Sphäroid

Bisher ist wenig über die Mechanismen bekannt, welche die intravenös infundierten Stammzellen dazu anleitet, in das Knochenmark zu finden und dort anzuwachsen. Den Adhäsionsmolekülen wird eine wichtige Rolle bei der Zurückhaltung der Stamm- und

Progenitorzellen im Knochenmark zugeordnet. Sie gelten zudem als essentiell für das *Homing* der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in ihre Nischen [25]. Bisher wurde allerdings noch kein Adhäsionsrezeptor oder -ligand gefunden, der ausschließlich auf Progenitor- oder Stammzellen oder in Knochenmarknischen exprimiert wird [25]. Um die Mechanismen zu entschlüsseln, die für die Migration der Zellen in das Sphäroid nötig sind, wurden in erster Linie Adhäsionsmarker und Faktoren untersucht, die bereits als essentiell für das *Homing* beschrieben wurden.

Eine Schlüsselrolle im Prozeß des *Homings* wird einerseits den β_1 -Integrinen zugeordnet, darunter vor allem dem $\alpha_4\beta_1$ -Integrin VLA-4 mit seinen Liganden Fibronektin und VCAM-1 [45-47] zum anderen dem Chemokin SDF-1 mit seinem Rezeptor CXCR4 [55]. Ein weiterer Chemokinrezeptor, dessen Beteiligung beim *Homing* hämatopoetischer Zellen diskutiert wird, ist CXCR3 [57, 58].

TF-1 Zellen tragen nur den Chemokinrezeptor CXCR3. Dagegen werden beide Chemokinrezeptoren auf den primären CD34⁺-CB-Zellen exprimiert. Die Expression ist nicht konstant, so daß verschiedene CB-Proben verschieden starke Expressionen von CXCR4 und CXCR3 aufweisen. Zudem verringert sich die Zahl der exprimierenden Zellen im Laufe der Kultivierung der CD34⁺-Zellen.

Die Zugabe der CXCR3-Liganden MIG und IP-10, sowie des CXCR4-Liganden SDF-1 in das Außenmedium zeigte keine Inhibition der Migration der Zellen in das Sphäroid, wie es durch die Zerstörung eines eventuell vorhandenen Chemokingradienten zu erwarten gewesen wäre. Auch die Blockierung von CXCR3 und CXCR4 mittels blockierender Antikörper führte nicht zu Inhibition der Migration in das Sphäroid. Das verwundert im Fall von SDF-1, das für seine chemotaktische Wirkung im Transwell-Assay bekannt ist [51, 54, 128] und SDF-1 auch für das *in vivo* Engraftment Bedeutung hat [55]. Die fehlende Beteiligung von CXCR4 ist ebenfalls unerwartet, da die inhibitorische Wirkung durch Blockierung von CXCR4 durch einen Antikörper beim Engraftment ja bereits beschrieben ist [55]. Allerdings besitzen CXCR4-exprimierende Zellen, wie BV-173 und U-937, ebenfalls nicht die Fähigkeit in das Sphäroid zu wandern, was die mangelnde Beteiligung der CXCR4 an der Migration unterstreicht. Auch Rosu-Myles *et al.* sehen keine obligatorische Verknüpfung zwischen der CXCR4-Expression und der Repopulierungsfähigkeit von CD34⁺-CB-Zellen, sondern stellen fest, daß CXCR4-negative Zellen das gleiche Engraftmentpotential haben wie CXCR4-positive Zellen [129].

Die chemotaktische Wirkung der Liganden von CXCR3 wurde desgleichen bereits kontrovers diskutiert. So migrieren GM-CSF-stimulierte CD34⁺-CB-Zellen im Transwell-Assay auf den

Stimulus von IP-10 und MIG [58], während eine andere Gruppe keine chemotaktische Wirkung von IP-10 und MIG erkennen konnte [130]. Da es sich einerseits um stimulierte, andererseits um frisch isolierte CD34⁺-Zellen handelt, könnte der Zustand der Zellen ausschlaggebend für deren Migrationsfähigkeit sein. Da die verwendeten TF-1 Zellen durch Kultivierung GM-CSF stimuliert sind und CXCR3 exprimieren, sollte eine chemotaktische Wirkung von IP-10 und MIG zu sehen sein, wenn diese Liganden bei der Migration in das Sphäroid eine Rolle spielen sollten. Auch die verwendeten CD34⁺-CB-Zellen wurden mit Zytokinen stimuliert und exprimieren CXCR3.

Um weiteren Aufschluß über den Mechanismus der Migration in das Sphäroid zu erhalten, wurden CB- und TF-1 Zellen vor der Zugabe zum Sphäroid auch mit blockierendem Antikörper gegen VLA-4 inkubiert. Die Interaktion zwischen VLA-4 und seinem Liganden VCAM-1 wird als einer der entscheidenden Schritte im *Homing* und *Lodgement* hämatopoetischer Zellen im Knochenmark betrachtet, nachdem die Blockierung dieses Paares durch Antikörper das *in vivo Homing* sowohl von murinen [45] als auch humanen [46, 47] Progenitoren in das Knochenmark der Maus verhindert. VLA-4 bindet neben seinem Liganden VCAM-1 auch Fibronectin, das Bestandteil der Extrazellulärmatrix ist und auch von den Fibroblasten der Sphäroide gebildet wird [72]. Aus diesem Grund galt das Augenmerk neben den Chemokin-Rezeptorpaaren MIG oder IP10/CXCR3 und SDF-1/CXCR4, diesem Adhäsionsmolekül. Die Blockierung zeigte bei dem untersuchten Sphäroidmodell nach 12 Stunden Migration keine Wirkung; die Wanderung in das Sphäroid wurde nicht verhindert.

Um eine mangelnde Expression der verantwortlichen Adhäsionsmoleküle als Grund für die fehlende Inhibition auszuschließen, wurde deren Vorhandensein in der Durchflußzytometrie bestimmt und anders als Seoh *et al.*, die erst nach 4 Tagen Expansion eine Hochregulierung der Expression von VLA-4 auf den CD34⁺-CB-Zellen sehen [131], exprimieren mehr als 95% der in dieser Arbeit untersuchten CD34⁺-Zellen aus CB von Beginn an VLA-4. Auch die untersuchten TF-1 Zellen sind in hohem Maße VLA-4 positiv.

β_1 -Integrine können in unterschiedlichen Affinitätszuständen vorliegen [2], womit der mangelnde Einfluß von VLA-4 bei der Migration in das Sphäroid erklärt werden könnte. So ist beschrieben, daß β_1 -Integrine bei CD34⁺-TF-1 Zellen in einem Zustand geringer Affinität exprimiert sind und erst durch IL-3, SCF oder GM-CSF in einen Zustand hoher Affinität versetzt werden. [125]. Da TF-1 Zellen wachstumsfaktorabhängig mit IL-3 und GM-CSF kultiviert werden, sollten sich die β_1 -Integrine somit vor der Zugabe zum Sphäroid in einem Zustand hoher Affinität befinden.

Durch den fehlenden inhibitorischen Effekt von blockierenden Antikörpern gegen VLA-4 auf die Migration von CD34⁺-CB- und TF-1 Zellen erscheint die Beteiligung von VLA-4 an der Migration der Zellen in das Sphäroid unwahrscheinlich.

Allerdings wurde in anderen Experimenten gesehen, daß 14 Stunden nach Gabe von Anti-VCAM-Antikörpern in Wildtypmäusen kein Engraftmentdefekt zu finden war, während die Gabe in Selektin-defizienten Mäusen dramatische Folgen zeigte [117]. Somit sind an dem Prozeß der Migration in das Sphäroid vermutlich verschiedene Adhäsionsmoleküle beteiligt, die den Effekt der Antikörper gegen VLA-4 substituieren können. Weiterhin könnte durch die Blockade mit Antikörpern die Geschwindigkeit der Migration verändert werden, und der gewählte Zeitpunkt außerhalb der günstigen Detektionszeit liegt. Deshalb sollte eine engmaschigere Auswertung oder visuelle Aufzeichnung der Migration nach der Blockierung durch Antikörper erfolgen.

Für VLA-4 konnte also kein Einfluß auf die Migration in das Sphäroid nachgewiesen werden. Die Daten dieser Arbeit legen aber eine Korrelation zwischen der Zunahme der Expression von LFA-1 während der Kultivierung der CD34⁺-CB-Zellen und deren zunehmende Fähigkeit, im Transwell-Assay die Endothelschicht zu durchdringen, nahe. Dazu wurde bereits beschrieben, daß es nach Aktivierung von CD34⁺-Zellen mit SDF-1 zur festen Adhäsion und transendothelialen Migration der Zellen in Abhängigkeit von dem Liganden/Rezeptorpaar LFA-1/ICAM-1 kommt [47]. Diese Gruppe sieht allerdings keine Abhängigkeit von LFA-1 bei der SDF-1-induzierten transstromalen Migration von CD34⁺/CXCR4⁺-Zellen, sondern nur von VLA-4 [47], während im Falle der Migration in das Sphäroid sich die zunehmende Fähigkeit der kultivierten Zellen, ins Sphäroid zu wandern mit der Hochregulation von LFA-1 während der Kultur korrelieren läßt. Da die TF-1 Zellen kein LFA-1 exprimieren, kann LFA-1 allerdings nicht der alleinige Mechanismus bei der Migration von hämatopoetischen Zellen in das Sphäroid sein. All unsere Ergebnisse sprechen dafür, daß das *Homing* ein Prozeß ist, der durch die Kooperation verschiedener Adhäsionsrezeptoren funktioniert und in verschiedenen Phasen des Prozesses verschiedene Adhäsionsmoleküle eine Rolle spielen.

5.9 Die Migration in das Sphäroid läßt sich Pertussis Toxin, aber nicht durch anderen Inhibitoren verschiedener Signalwege hemmen

Um Aufschluß über die intrazellulären Signalwege zu erhalten, die für die Migration in das Sphäroid von Bedeutung sind, wurden Inhibitoren gegen Eckpunkte verschiedener Signalwege eingesetzt. Ausgehend von der relativ gut untersuchten Signalkette des

CXCR4/SDF-1-Paare wurden Inhibitoren gegen die PI-3K (LY294002) und gegen G-Proteine (Pertussis Toxin = PT) eingesetzt, da durch diese Inhibitoren eine Hemmung der SDF-1/CXCR4-vermittelten Migration beschrieben ist [51, 132, 133]. Zudem sollten mit Genistein bzw. Tyrphostin Tyrosinkinasen und durch Zugabe von STI571 (STI = Signaltransduktionsinhibitor 571) die c-kit-Kinase gehemmt werden.

Einzig durch die Zugabe von 100 ng/ml PT ließ sich eine deutliche und reproduzierbare Inhibition der Migration von TF-1 ins Sphäroid erreichen.

Da der Chemokinrezeptor CXCR4 zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehört, verhindert Pertussis Toxin *in vitro* die Migration von humanen CD34⁺-Zellen im Transwell-Assay auf den Stimulus des CXCR4-Liganden SDF-1 [51, 132]. Für die Migration der CD34⁺-Zellen in das Sphäroid gilt jedoch ein von CXCR4-unabhängiger Mechanismus, wie oben bereits diskutiert wurde. Es existiert also nicht ein einziger *Homing*-Rezeptor, sondern multiple Rezeptoren von multiplen Klassen von Adhäsionsmolekülen, die in diesen Prozeß involviert sind. Die Hemmung der Migration in das Sphäroid durch das Pertussis Toxin muß demnach durch die Inhibition der G α -Untereinheit eines anderen G-Proteins vermittelt werden. Ein Effektor der PI-3K, die Proteinkinase B (PKB) wird durch eine Reihe anderer G-proteingekoppelter Rezeptoren aktiviert, doch ist ihre Rolle in der Migration nicht geklärt [134]. *In vivo* spielt die Hemmung durch Pertussis Toxin keine Rolle, da die Inkubation von hämatopoetischen Zellen mit PT keine verringerte Engraftmentfähigkeit in Mäusen erkennen ließ [135]. Dies bedeutet, daß der Prozeß des Einwanderns in das Sphäroid nur einen kleinen Teil des Engraftmentprozesses darstellt.

LY294002 hat als Inhibitor der PI-3K unerwarteterweise keinen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Migration in das Sphäroid. Die PI-3K ist Bestandteil des Phosphatidylinositol-Signalweges und beteiligt an verschiedenen Migrationsmechanismen, z.B. an der SDF-1 vermittelten Migration, der Integrin-vermittelten Wanderung von Zellen und im Zusammenhang mit den kleinen GTPasen [25, 66, 132, 136]. Durch die fehlende Hemmung der Migration kann man also davon ausgehen, daß bei dem Einwandern in das Sphäroid die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K) im Unterschied zur SDF-1/CXCR4-vermittelten Migration im Transwell-Assay keinen Einfluß besitzt. Damit wird auch der Unterschied zwischen den beiden Assays deutlich gemacht, die offenbar verschiedene Abschnitte der Migration darstellen.

5.10 Die Inhibition der kleinen GTPasen hemmt die Migration

Bisher ist wenig bekannt über die Signalwege, welche die Zelle benötigt, um sich durch dreidimensionale Strukturen des Knochenmarkstromas zu bewegen. Die kleinen GTPasen Cdc42, Rac und Rho gelten als Schlüsselfiguren bei der Regulation des Aktinzytoskelett und adhäsiver Strukturen. Die zelluläre Invasion benötigt ein optimales Aktivierungsniveau von Cdc42, Rac und Rho und die Migration und Invasion von Zellen sind durch die GTPasen der Rho-Familie unterschiedlich moduliert. So kann durch die Inhibition von Rac die Invasion durch reduzierte Motilität erreicht werden, während Cdc42 und Rho die Invasion über einen anderen Mechanismus beeinflussen [66]. Zellmotilität ist ein dynamischer Prozeß, der die zeitliche und räumliche Koordination des Zytoskeletts erfordert. Die Balance und Koordination der Aktivität von Rho, Rac und Cdc42 machen den endgültigen Effekt auf die Reorganisation des Zytoskeletts aus. Für die Wechselwirkung der kleinen GTPasen untereinander wird eine Hierarchie beschrieben, bei der Cdc42 auf Rac wirkt, das wiederum auf Rho A wirkt [63].

Die Hemmung der Migration von CD34⁺-Zellen in das Sphäroid gelang vollständig durch die Inhibition von Rho A, Rac und Cdc42 durch Zugabe von Toxin B. Eine teilweise Hemmung der Migration ließ sich durch die spezifische Inhibition von Rho A durch Fusionstoxin und der Inhibition von Ras und Rac durch Lethaloxin erreichen. Diese Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle der kleinen GTPasen an der Zellmotilität und betonen insbesondere die Rolle von Rho A. Rho A ist in humanen Zellen in die Bildung von Stressfasern involviert [137]. Diese Strukturen sind in Regionen der Plasmamembran verankert, die sich *focal adhesion* nennen, an denen sich die Zelle am stärksten an das Substrat heftet. Die zytoplasmatischen Komponenten der *focal adhesion* sind unter anderem Zytoskelettproteine, wie Aktinin und Vinculin, sowie Moleküle der Signalwege, wie die *focal adhesion kinase* (FAK) [63], über die es zu einer Verknüpfung mit anderen Signalwegen kommen kann. So aktivieren Integrine die FAK oder verwandte Kinasen, die durch Bindung an SH-Domänen sowohl den Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3K)- als auch den Ras/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg aktivieren [25, 66]. Es sind demnach Wechselwirkungen zwischen den Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Zelle und den Signalwegen, in die kleine GTPasen involviert sind, möglich.

Bisherige Untersuchungen zum Signalweg der Rho-GTPasen beschreiben außerdem eine Verbindung dieser Proteine mit G-Proteingekoppelten Rezeptoren [63], was einen Zusammenhang mit dem inhibitorischen Effekt von Pertussis Toxin herstellt, bei dem eine Beteiligung von G-Proteinen an der Migration in das Sphäroid festgestellt wurde. So läßt sich

auch der additive Effekt der gleichzeitigen Gabe von Pertussis Toxin und Fusionstoxin erklären.

5.11 Expandierte Zellen zeigen unterschiedliches Verhalten in den verschiedenen Migrations- und *Homing*-Assays

Wie bereits durch die oben diskutierten Ergebnisse gezeigt, gelingt keine Korrelation des Sphäroidmodells mit dem Langzeitrepopulierungsassay NOD/SCID-Maus. Neben der unterschiedlichen Beteiligung von Adhäsionsmolekülen und Signalwegen, die bei dem einen Assay von Bedeutung sind, bei dem anderen nicht, lassen sich ebenfalls bei der Migrationsfähigkeit kultivierter CD34⁺-CB-Zellen Unterschiede feststellen. So sind die kultivierten Zellen mit Zunahme der Kulturdauer im zunehmenden Maße in der Lage, in das Sphäroid zu wandern. Das Engraftment im NOD/SCID-Mausmodell dagegen verringert sich durch die Kultivierung der Zellen für einen oder zwei Tage. Erst nach 7 Tagen Kultivierung findet sich nach 6 Wochen im murine Knochenmark ein Anteil humaner Zellen, der dem von unmanipulierten Zellen entspricht. Die Zellen verlieren durch die Kultivierung die Fähigkeit das Knochenmark der NOD/SCID-Maus zu repopulieren oder sie finden das Knochenmark, sind aber nicht in der Lage zu proliferieren und eine funktionierende humane Hämatopoese zu initiieren.

Im Falle der kultivierten Zellen gelingt dagegen die Korrelation mit dem Transwell-Assay, dem Transmigrationsmodell. Die Zellen erlangen durch anhaltende Kultivierung im selben Maße die Fähigkeit in das Sphäroid, wie durch die Endothelschicht des Transwell-Assays zu wandern. Trotz allem müssen für die Migration in den beiden Assays unterschiedliche Mechanismen zum Tragen kommen, da für die Migration in das Sphäroid das Liganden/Rezeptor-Paar von SDF-1/CXCR4 keine dominante Rolle spielt. Dadurch lässt sich ein weiterer Unterschied, die fehlende Beteiligung der PI-3 Kinase bei der Migration in das Sphäroid, zwischen Sphäroid und Transwell-Assay erklären. Für den Signalweg, der durch SDF-1 induziert wird, wurde eine Beteiligung der PI-3 Kinase festgestellt [136] und die Wanderung der Zellen im Transwell-Assay beruht einzig auf dem chemotaktischen Stimulus von SDF-1 [48, 51, 128]

Was kann für das mangelnde Engraftment der Zellen in die NOD/SCID-Maus nach Kultivierung der Zellen für 1 oder 2 Tage verantwortlich gemacht werden? Die Zellzahl ändert sich in den ersten beiden Tagen der Kultivierung kaum. Der Unterschied in der Engraftmentfähigkeit liegt also in den durch Kultivierung der Zellen veränderten Eigenschaften der Zellen.

Frisch isolierte CB-CD34⁺-Zellen sind zu 70-97 % im ruhenden Zustand [35, 138]. Durch Zytokinkontakt nimmt die Zellteilung zu. Nach 72 Stunden sind 40-50 % der Zellen in den Zellzyklus eingetreten [138] und nach 7 Tagen haben sich mehr als 95% der Zellen geteilt [35]. Bei Zellen, die sich in der späten S/G2-Phase befinden, wurde eine abnehmende Expression von Adhäsionsmolekülen gefunden [124]. Somit müssten die Zellen nach Expansionen eine geringere Fähigkeit zur Adhäsionsmolekül-abhängigen Migration haben. Das spielt in unserem Falle eigentlich keine Rolle, da die untersuchten Adhäsionsmoleküle VLA-4 und VLA-5 bereits von Beginn an und unabhängig von der Kultivierungsdauer im hohen Maße exprimiert werden. Die Daten zum Sphäroid zeigen eine VLA-4-unabhängige Migration, so daß bei zunehmender Kultivierung und möglicher Herunterregulierung von VLA-4 die Fähigkeit zur Migration der Zellen in das Sphäroid zumindest nicht abnehmen muß. Lediglich die Expression von LFA-1 nimmt im selben Maße zu wie die Migrationsfähigkeit im Transwell-Assay und in das Sphäroid steigt. So ergibt sich eine Korrelation der Migrationsfähigkeit im Transwell-Assay und in das Sphäroid mit dem Expressionsmuster von LFA-1 auf den kultivierten CD34⁺-Zellen, jedoch keine Korrelation mit der Langzeitrepopulierungsfähigkeit in der NOD/SCID-Maus.

Ein weiterer Faktor für die erhöhte Migrationsfähigkeit kann die Zusammensetzung und die Art der zugegebenen Zytokine sein. Für die Mobilisierung von hämatopoetischen Progenitorzellen durch die Gabe von Anti-VLA-4 oder Anti-VCAM-1 ist die Anwesenheit von funktionstüchtigem SCF und seinem Rezeptor, den c-kit-Rezeptor wichtig [127]. Dies kann als Hinweis für die Notwendigkeit des SCF-Signalweges in der Chemokinese der Zellen gesehen werden, da SCF die Aktivität von β_1 -Integrinen regulieren kann [126]. Zum anderen können hämatopoetische Progenitoren über die Bindung von IL-3 oder SCF an die Heparansulfatproteoglycanen der Extrazellulärmatrix gebunden werden [139].

Letztlich läßt sich nicht genau bestimmen, was die Zellen dazu veranlasst, nach Kultivierung für einen oder zwei Tage ihre Repopulierungskapazität zu verlieren.

Das Sphäroidmodell läßt eine VLA-4/VCAM-1 abhängige Migration von CD34⁺-hämatopoetischen Zellen zu, die durch Pertussis Toxin hemmbar ist. Wiesmann *et al.* beschreiben eine mangelnde Inhibition des Engraftment von CD34⁺-Zellen durch das Pertussis Toxin in das murine Knochenmark, sehen aber eine Verhinderung des Milzengraftment [135]. Andere Gruppen haben bereits gesehen, daß anders als das Engraftment von Knochenmark der Prozeß der Migration von hämatopoetischen Zellen in die

Milz unabhängig von VLA-4/VCAM-1 ist [45]. Demnach stellt das Sphäroidmodell eventuell ein *Homingmodell* für das Engraftment von hämatopoetischen Zellen in die Milz dar.

6 Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
BFU-E	Burst-forming unit erythroid
BSA	Bovine serum albumin
CB	Cord blood = Nabelschnurblut
CFU	Colony-forming units
CFU-GEMM	CFU-granulocyte erythroid megacaryocyte macrophage
CFU-GM	Colony-forming unit granulocyte-macrophage
CML	Chronisch-Myeloische Leukämie
CSF	Colony-stimulating factor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein
FL	Flt-3 receptor ligand
FT	Fusionstoxin
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GMP	Good manufacturing practice
GVHD	Graft versus host disease = Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion
HBMEC	Human bone marrow endothelial cells
ICAM-1	Intracellular cell adhesion molecule-1
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
IP-10	Interferon γ -inducible protein 10
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1
Lsg.	Lösung
LT	Lethal Toxin
LTC-IC	Longterm culture-initiating cells
MACS	Magnetic separation columns

max.	maximal
MIG	Monokine induced by interferon γ
min	Minuten
mind.	mindestens
MNC	Mononucleare cells = Mononukleäre Zellen
NK	Natürliche Killerzellen
NOD/SCID	Nonobese diabetic/severe combined immune deficiency
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PT	Pertussis Toxin
RT	Raumtemperatur
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal derived factor-1
STI	Signaltransduktionsinhibitor
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming growth factor- β
TPO	Thrombopoetin
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very late activation antigen-4
VLA-5	Very late activation antigen-5

7 Literatur

1. Mazo, I.B. and U.H. von Andrian, *Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(1): p. 25-32.
2. Chan, J.Y. and S.M. Watt, *Adhesion receptors on haematopoietic progenitor cells*. Br J Haematol, 2001. **112**(3): p. 541-57.
3. Huang, S., et al., *Symmetry of initial cell divisions among primitive hematopoietic progenitors is independent of ontogenic age and regulatory molecules*. Blood, 1999. **94**(8): p. 2595-604.
4. Ziegler, B.L. and L. Kanz, *Expansion of stem and progenitor cells*. Current opinion in hematology, 1998. **5**: p. 434-440.
5. Fuchs, E. and J.A. Segre, *Stem cells: a new lease on life*. Cell, 2000. **100**(1): p. 143-55.
6. Keller, G., G. Lacaud, and S. Robertson, *Development of the hematopoietic system in the mouse*. Exp Hematol, 1999. **27**(5): p. 777-87.
7. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
8. Sutherland, H.J., et al., *Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells*. Blood, 1991. **78**(3): p. 666-72.
9. Breems, D.A., et al., *Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay*. Leukemia, 1994. **8**(7): p. 1095-104.
10. Pettengell, R., et al., *Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells*. Blood, 1994. **84**(11): p. 3653-9.
11. Gan, O.I., et al., *Differential maintenance of primitive human SCID-repopulating cells, clonogenic progenitors, and long-term culture-initiating cells after incubation on human bone marrow stromal cells*. Blood, 1997. **90**(2): p. 641-50.
12. Lapidot, T., et al., *Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice*. Science, 1992. **255**(5048): p. 1137-41.
13. Vormoor, J., et al., *Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice*. Blood, 1994. **83**(9): p. 2489-97.
14. Vormoor, J., et al., *SCID mice as an in vivo model of human cord blood hematopoiesis*. Blood Cells, 1994. **20**(2-3): p. 316-20; discussion 320-2.

15. Broudy, V.C., *Stem Cell Factor and Hematopoiesis*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1345-1364.
16. Haylock, D.N., et al., *Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand*. Blood, 1997. **90**(6): p. 2260-72.
17. McKenna, H.J., et al., *Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1995. **86**(9): p. 3413-20.
18. Yonemura, Y., et al., *In vitro expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: Comparison between flt3/flk2 ligand and kit ligand*. Blood, 1997. **89**: p. 1915.
19. Lyman, S.D., *Biologic effects and potential clinical applications of Flt3 ligand*. Curr Opin Hematol, 1998. **5**(3): p. 192-6.
20. Dooley, D.C., et al., *Flt3 ligand enhances the yield of primitive cells after Ex vivo cultivation of CD34+ CD38dim cells and CD34+ CD38dim CD33dim HLA-DR+ cells*. Blood, 1997. **90**(10): p. 3903-13.
21. Kaushansky, K., *Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell*. Blood, 1998. **92**(1): p. 1-3.
22. Murray, L.J., et al., *Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34+ cells and recruit primitive CD34+ Thy-1+ cells into rapid division*. Exp Hematol, 1999. **27**(6): p. 1019-28.
23. Kobayashi, M., et al., *Synergistic effects of interleukin-1 beta and interleukin-3 on the expansion of human hematopoietic progenitor cells in liquid cultures*. Blood, 1991. **78**(8): p. 1947-53.
24. Petzer, A.L., et al., *Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2551-8.
25. Prosper, F. and C.M. Verfaillie, *Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(3): p. 307-16.
26. Williams, W., et al., *Hematology*. 4th ed. 1990, New York: McGraw-Hill Inc.
27. Oudshoorn, M., et al., *Problems and possible solutions in finding an unrelated bone marrow donor. Results of consecutive searches for 240 Dutch patients*. Bone Marrow Transplant, 1997. **20**(12): p. 1011-7.
28. McNiece, I. and R. Bridell, *Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells*. Experimental hematology, 2001. **29**: p. 3-11.

29. Cairo, M. and J. Wagner, *Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation*. Blood, 1997. **90**: p. 4665.
30. Gluckman, E., H. Broxmeyer, and A. Auerbach, *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling*. New English Journal of Medicine, 1989. **321**: p. 1174.
31. Gluckman, E., *Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation*. Exp Hematol, 2000. **28**(11): p. 1197-205.
32. De La Selle, V., E. Gluckman, and M. Bruley-Rosset, *Newborn blood can engraft adult mice without inducing graft versus host disease across non H-2 antigens*. Blood, 1996. **87**: p. 3977.
33. Broxmeyer, H., et al., *Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**: p. 4109.
34. Cardoso, A., et al., *Release from quiescence of CD34⁺CD38⁻ human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**: p. 8707.
35. Traycoff, C.M., et al., *Evaluation of ex vivo expansion potential of cord blood and bone marrow hematopoietic progenitor cells using cell tracking and limiting dilution analysis*. Blood, 1995. **85**(8): p. 2059-68.
36. Rosler, E.S., et al., *An in vivo competitive repopulation assay for various sources of human hematopoietic stem cells*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3414-21.
37. Gluckman, E., V. Rocha, and A. Boyer-Chammard, *Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors*. New English Journal of Medicine, 1997. **337**(6): p. 373.
38. Dexter, T.M., M.A. Moore, and A.P. Sheridan, *Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras in vitro*. J Exp Med, 1977. **145**(6): p. 1612-6.
39. Schmidt, S., *Verfahrenstechnik für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen*, in *Institut für Biotechnologie*. 2000, RWTH Aachen: Jülich. p. 250.
40. Lemoli, R.M., et al., *Proliferation of human hematopoietic progenitors in long-term bone marrow cultures in gas-permeable plastic bags is enhanced by colony-stimulating factors*. Exp Hematol, 1992. **20**(5): p. 569-75.

41. Shpall, E., R. Quinones, and L. Hami, *Transplantation of cancer patients receiving high dose chemotherapy with ex vivo expanded cord blood cells*. *Blood*, 1998. **92**(10 suppl. 1): p. 646a.
42. van Hennik, P.B., A.E. de Koning, and R.E. Ploemacher, *Seeding efficiency of primitive human hematopoietic cells in nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mice: implications for stem cell frequency assessment*. *Blood*, 1999. **94**(9): p. 3055-61.
43. Hardy, C.L. and G.C. Megason, *Specificity of hematopoietic stem cell homing*. *Hematol Oncol*, 1996. **14**(1): p. 17-27.
44. Springer, T., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm*. *Cell*, 1994. **76**: p. 301-314.
45. Papayannopoulou, T., et al., *The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(21): p. 9647-9651.
46. Kollet, O., et al., *Rapid and efficient homing of human CD34+CD38-/lowCXCR4+ stemand progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2mnull mice*. *Blood*, 2001. **97**(10): p. 3283-3291.
47. Peled, A., et al., *The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice*. *Blood*, 2000. **95**(11): p. 3289-3296.
48. Möhle, R., et al., *Transendothelial Migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an in vitro study using an human bone marrow endothelial cell line*. *Blood*, 1997. **89**(1): p. 72-80.
49. Tashiro, K., et al., *Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins*. *Science*, 1993. **261**(5121): p. 600-3.
50. Bleul, C.C., et al., *The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(5): p. 1925-30.
51. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood*. *J Exp Med*, 1997. **185**(1): p. 111-20.

52. Wang, J.F., Z.Y. Liu, and J.E. Groopman, *The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion*. *Blood*, 1998. **92**(3): p. 756-64.
53. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. *Nature*, 1996. **382**(6594): p. 829-33.
54. Möhle, R., et al., *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*, 1998. **91**(12): p. 4523-30.
55. Peled, A., et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*. *Science*, 1999. **283**(5403): p. 845-8.
56. Qin, S., et al., *The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(4): p. 746-54.
57. Trentin, L., et al., *The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(1): p. 115-21.
58. Jinqian, T., et al., *CXC chemokine receptor 3 expression on CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: chemotaxis and adhesion induced by its ligands, interferon γ -inducible protein 10 and monokine induced by interferon γ* . *Blood*, 2000. **96**(4): p. 1230-1238.
59. Farber, J.M., *Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes*. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(3): p. 246-57.
60. Agostini, C., et al., *CXCR3 and Its Ligand CXCL10 Are Expressed by Inflammatory Cells Infiltrating Lung Allografts and Mediate Chemotaxis of T Cells at Sites of Rejection*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(5): p. 1703-11.
61. Agostini, C., et al., *CXC chemokines IP-10 and mig expression and direct migration of pulmonary CD8⁺/CXCR3⁺ T cells in the lungs of patients with HIV infection and T-cell alveolitis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **162**(4 Pt 1): p. 1466-73.
62. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(1): p. 6-15.
63. Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey, *Rho GTPases and signaling networks*. *Genes Dev*, 1997. **11**(18): p. 2295-322.
64. Scita, G., et al., *Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs*. *Embo J*, 2000. **19**(11): p. 2393-8.

65. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. Cell, 1995. **81**(1): p. 53-62.
66. Banyard, J., et al., *Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases*. Oncogene, 2000. **19**: p. 580-591.
67. van der Sluijs, J.P., et al., *Loss of long-term repopulating ability in long-term bone marrow culture*. Leukemia, 1993. **7**(5): p. 725-32.
68. Brouard, N., et al., *Transplantation of stromal cells transduced with the human IL3 gene to stimulate hematopoiesis in human fetal bone grafts in non-obese, diabetic-severe combined immunodeficiency mice*. Leukemia, 1998. **12**(7): p. 1128-35.
69. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment*. Blood, 1998. **91**(1): p. 100-10.
70. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
71. Kunz-Schughart, L.A., K. Groebe, and W. Mueller-Klieser, *Three-dimensional cell culture induces novel proliferative and metabolic alterations associated with oncogenic transformation*. Int J Cancer, 1996. **66**(4): p. 578-86.
72. Kunz-Schughart, L.A., et al., *A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation*. Exp Cell Res, 2001. **266**(1): p. 74-86.
73. Gilmore, G.L., et al., *Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34(+) hematopoietic stem cells*. Exp Hematol, 2000. **28**(11): p. 1297-305.
74. Haylock, D., et al., *Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage*. Blood, 1992. **80**(6): p. 1405 (/1a).
75. Purdy, M.H., et al., *Large volume ex vivo expansion of CD34-positive hematopoietic progenitor cells for transplantation*. J Hematother, 1995. **4**(6): p. 515-25.
76. Briddell, R., et al., *Purification of CD34+ cells is essential for optimal ex vivo expansion of umbilical cord blood*. Exp Hematol, 1996. **24**(9): p. 1055.
77. Kunz-Schughart, L.A., *Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor*. Cell Biol Int, 1999. **23**(3): p. 157-61.
78. Barth, H., et al., *The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary Clostridium botulinum C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin*. Infection and Immunity, 1998. **66**(4): p. 1364-1369.

79. Roßmanith, T., et al., *Interleukin 3 improves the ex vivo expansion of primitive human cord blood progenitor cells and maintains the engraftment potential of scid repopulating cells*. Stem Cells, 2001. **19**(4): p. 313-20.
80. Ohmizono, Y., et al., *Thrombopoietin augments ex vivo expansion of human cord blood-derived hematopoietic progenitors in combination with stem cell factor and flt3 ligand*. Leukemia, 1997. **11**(4): p. 524-30.
81. Shah, A.J., et al., *Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34⁺CD38⁻ cells and maintains progenitor cells in vitro*. Blood, 1996. **87**(9): p. 3563-70.
82. Piacibello, W., et al., *Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood*. Blood, 1997. **89**(8): p. 2644-53.
83. Kobayashi, M., et al., *Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3*. Blood, 1996. **88**(2): p. 429-36.
84. Ueda, T., et al., *Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6 and soluble IL-6 receptor*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 1013-1021.
85. Keller, J., et al., *Transforming growth factor- β : A bidirectional regulator of hematopoietic cell growth*. Int J Cell Cloning, 1992. **10**: p. 2.
86. Mayani, H., et al., *Differential effects of the hematopoietic inhibitors MIP-1 α , TGF- β , and TNF- α on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34⁺ cells purified from cord blood and fetal liver*. Exp Hematol, 1995. **23**: p. 422-427.
87. Yonemura, Y., et al., *Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4040-4.
88. Matsunaga, T., et al., *Negative regulation by interleukin-3 (IL-3) of mouse early B-cell progenitors and stem cells in culture: transduction of the negative signals by betac and betaIL-3 proteins of IL-3 receptor and absence of negative regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 1998. **92**(3): p. 901-7.
89. Donaldson, C., et al., *The CD34(+)CD38(neg) population is significantly increased in hematopoietic cell expansion cultures in serum-free compared to serum-replete conditions: dissociation of phenotype and function*. Bone Marrow Transplant, 2001. **27**(4): p. 365-371.
90. Dorrell, C., et al., *Expansion of human cord blood CD34⁺CD38⁻ cells in ex vivo culture during retroviral transduction without corresponding increase in SRC*

- frequency: dissociation of SRC phenotype and function (Abstract)*. Exp Hematol, 1998. **2**: p. 688.
91. Guenechea, G., et al., *Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells*. Blood, 1999. **93**(3): p. 1097-105.
 92. Novelli, E.M., et al., *Ex vivo culture of cord blood CD34+ cells expands progenitor cell numbers, preserves engraftment capacity in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice, and enhances retroviral transduction efficiency*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(18): p. 2927-40.
 93. Shimizu, Y., et al., *Engraftment of cultured human hematopoietic cells in sheep*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3688-92.
 94. Conneally, E., et al., *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, 1997. **94**(18): p. 9836-41.
 95. Bhatia, M., et al., *Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture*. J Exp Med, 1997. **186**(4): p. 619-24.
 96. Kawada, H., et al., *Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system*. Exp Hematol, 1999. **27**(5): p. 904-15.
 97. Glimm, H. and C.J. Eaves, *Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture*. Blood, 1999. **94**(7): p. 2161-8.
 98. Hennemann, B., et al., *Optimization of retroviral-mediated gene transfer to human NOD/SCID mouse repopulating cord blood cells through a systematic analysis of protocol variables*. Exp Hematol, 1999. **27**(5): p. 817-25.
 99. Fietz, T., et al., *Culturing human umbilical cord blood: a comparison of mononuclear vs CD34+ selected cells*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(11): p. 1109-15.
 100. Köhler, T., et al., *Defining optimum conditions for the ex vivo expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor enrichment, interference with feeder layers, early-acting cytokines and agitation of culture vessels*. Stem Cells, 1999. **17**(1): p. 19-24.

101. Shieh, J.-H., et al., *High purity of blast cells in CD34 selected populations are essential for optimal ex vivo expansion of human GM-CFC*. Experimental hematology, 1994. **22**(8): p. 756a.
102. Denning-Kendall, P.A., et al., *Different behaviour of fresh and cultured CD34+ cells during immunomagnetic separation*. Br J Haematol, 1999. **105**(3): p. 780-5.
103. Bhatia, M., et al., *A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1038-45.
104. Majka, M., et al., *Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3075-3085.
105. Janowska-Wieczorek, A., et al., *Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis*. Stem Cells, 2001. **19**(2): p. 99-107.
106. Koller, M.R., et al., *Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system*. Bone Marrow Transplant, 1998. **21**(7): p. 653-63.
107. Zandstra, P.W., et al., *Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4698-703.
108. Ladd, A.C., et al., *Orderly process of sequential cytokine stimulation is required for activation and maximal proliferation of primitive human bone marrow CD34+ hematopoietic progenitor cells residing in G0*. Blood, 1997. **90**(2): p. 658-68.
109. Zandstra, P.W., D.A. Lauffenburger, and C.J. Eaves, *A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis*. Blood, 2000. **96**(4): p. 1215-22.
110. Anthony, R., et al., *Flow cytometry using annexin V can detect early apoptosis in peripheral blood stem cell harvests from patients with leukemia and lymphoma*. Bone Marrow Transplant, 1998. **21**: p. 441-446.
111. Piacibello, W., et al., *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, 1999. **93**(11): p. 3736-49.
112. Bagley, J., et al., *Extended culture of multipotent hematopoietic progenitors without cytokine augmentation in a novel three-dimensional device*. Exp Hematol, 1999. **27**(3): p. 496-504.

113. Collins, P.C., W.M. Miller, and E.T. Papoutsakis, *Stirred culture of peripheral and cord blood hematopoietic cells offers advantages over traditional static systems for clinically relevant applications*. Biotechnol Bioeng, 1998. **59**(5): p. 534-43.
114. Collins, P.C., et al., *Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system*. Biotechnol Prog, 1998. **14**(3): p. 466-72.
115. Jelinek, N., *Kultivierung hämatopoetischer Zellen-Kokultur im Festbettreaktor*, in *Institut für Biotechnologie*. 2001, RWTH Aachen: Jülich. p. 192.
116. Koller, M., et al., *Different measures of ex vivo human hematopoiesis culture performance optimized under vastly different conditions*. Biotechnol. Bioeng., 1996. **50**: p. 505-513.
117. Quesenberry, P.J. and P.S. Becker, *Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15155-7.
118. Hurley, R.W., J.B. McCarthy, and C.M. Verfaillie, *Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 511-9.
119. Hurley, R.W., et al., *Monoclonal antibody crosslinking of the alpha 4 or beta 1 integrin inhibits committed clonogenic hematopoietic progenitor proliferation*. Exp Hematol, 1997. **25**(4): p. 321-8.
120. Skorski, T., et al., *The SH3 domain contributes to BCR/ABL-dependent leukemogenesis in vivo: role in adhesion, invasion, and homing*. Blood, 1998. **91**(2): p. 406-18.
121. Skorski, T., et al., *BCR/ABL-mediated leukemogenesis requires the activity of the small GTP- binding protein Rac*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11858-62.
122. Salgia, R., et al., *The BCR/ABL oncogene alters the chemotactic response to stromal-derived factor-1alpha*. Blood, 1999. **94**(12): p. 4233-46.
123. Faderl, S., et al., *The biology of chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. **341**(3): p. 164-72.
124. Becker, P.S., et al., *Stimulatory cytokines modulate adhesion receptor expression by murine LINSCA⁺ cells and simultaneous blocking of $\alpha 1$, $\alpha 4$ and L-selectin inhibits hematopoietic progenitor stromal interactions (Abstract)*. Blood, 1997. **90**: p. 486a.

125. Levesque, J., et al., *Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins*. J Exp Med, 1995. **181**: p. 1805.
126. Kovach, N.L., et al., *Stem cell factor modulates avidity of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins expressed on hematopoietic cell lines*. Blood, 1995. **85**(1): p. 159-67.
127. Papayannopoulou, T., G.V. Priestley, and B. Nakamoto, *Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway*. Blood, 1998. **91**(7): p. 2231-9.
128. Jo, D.Y., et al., *Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1*. J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 101-11.
129. Rosu-Myles, M., et al., *The human hematopoietic stem cell compartment is heterogeneous for CXCR4 expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14626-31.
130. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *SLC/exodus2/6Ckine/TCA4 induces chemotaxis of hematopoietic progenitor cells: differential activity of ligands of CCR7, CXCR3, or CXCR4 in chemotaxis vs. suppression of progenitor proliferation*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(3): p. 455-61.
131. Seoh, J.Y., et al., *Cell cycling status of human cord blood CD34+ cells during ex vivo expansion is related to the level of very late antigen expression*. J Korean Med Sci, 2001. **16**(1): p. 20-4.
132. Ganju, R.K., et al., *The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23169-75.
133. Chernock, R.D., R.P. Cherla, and R.K. Ganju, *SHP2 and cbl participate in alpha-chemokine receptor CXCR4-mediated signaling pathways*. Blood, 2001. **97**(3): p. 608-15.
134. Sotsios, Y., et al., *The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 5954-63.
135. Wiesmann, A. and G.J. Spangrude, *Marrow engraftment of hematopoietic stem and progenitor cells is independent of Galphai-coupled chemokine receptors*. Exp Hematol, 1999. **27**(5): p. 946-55.
136. Wang, J.F., I.W. Park, and J.E. Grooman, *Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces*

- migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C.* Blood, 2000. **95**(8): p. 2505-13.
137. Ridley, A.J. and A. Hall, *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.* Cell, 1992. **70**(3): p. 389-99.
138. Engelhardt, M., et al., *Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells.* Blood, 1997. **90**(1): p. 182-93.
139. Bruno, E., et al., *Marrow-derived heparan sulfate proteoglycan mediates the adhesion of hematopoietic progenitor cells to cytokines.* Exp Hematol, 1995. **23**(11): p. 1212-7.

8 Danksagungen

Herrn Professor Dr. D. Hoelzer danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit und das stete Interesse.

Herrn Professor Dr. B. Ludwig danke ich für die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich und für die immer freundliche und hilfsbereite Unterstützung.

Herr Dr. O.G. Ottmann hat mich stets sehr gut angeleitet und mir viel Eigenständigkeit ermöglicht. Die kritische Durchsicht meiner Arbeit hat mir sehr geholfen und ich danke für die Zeit und Mühe damit.

Gesine Bug danke ich für ihre prompte und unermüdliche Hilfe und unzähligen fruchtbaren Diskussionen, Bernd Schröder für seine vielen motivierenden Ideen und Ratschläge. Beiden möchte ich für die schöne Zeit zusammen und die sehr angenehme Atmosphäre in unserer „Stammzellgruppe“ danken.

Vielen Dank an Manuela, die so rasch gelernt, mich tatkräftig unterstützt hat und nun das Labor der Stammzellgruppe aufrecht erhält.

Reinhard Henschler danke ich für das Teilen seine weitreichenden Kenntnisse in der Stammzellbiologie und seine begeisternden Ideen zu jedem Thema.

Der Firma Maingen GmbH danke ich für die Finanzierung meiner Arbeit und den Mitarbeitern für die immer freundschaftliche Aufnahme in den Laboren. Besonders möchte ich Andreas und Anke für die unermüdliche Hilfe bei den NOD/SCID-Mausversuchen danken und Jutta, die mir tatkräftig geholfen hat und durch ihre Freundschaft die Arbeit in der Maingen GmbH verschönert hat

Ich danke allen Mitarbeitern der Labore besonders i40 und i44, aber auch i33, i45 und i50 für die tolle Zusammenarbeit und Hilfe bei experimentellen Fragen. Mir hat die Arbeit mit euch, ebenso wie die Pausen im Aufenthaltsraum, immer viel Spaß gemacht.

Ich danke Silke für die kritische und schnelle Durchsicht meiner Arbeit und für die schöne Studienzeit mit ihr, die wir beide dieses Jahr nun beenden werden.

Daas Thomaschen hat mich immer liebevoll unterstützt und an mich geglaubt, auch wenn ich ihm das schlecht gedankt habe.

Meiner Familie danke ich für die langjährige motivierende Unterstützung, besonders meiner Schwester Eva, die immer für mich da ist und mich gerade in der letzten Phase immer angespornt hat.

Auch Matthias hat mich immer angespornt. Dir danke ich für wunderschöne endlose Pausen, sehr (zu) kritische aber sachkundige Anmerkungen und unentwegte Unterstützung. Vielen Dank für Deine Anwesenheit.

Lebenslauf

Name: Tanja Roßmanith
Geburtsdatum: 16. April 1970
Geburtsort: Frankfurt am Main
Familienstand: ledig
Anschrift: Adlerflychtstr. 5
60318 Frankfurt
Telefon: 069 – 4 69 18 57
E-Mail: Rossmanith@em.uni-frankfurt.de

Schulbildung:

1976-1980 Schwarzbürgerschule, Grundschule in Frankfurt am Main
1980-1989 Musterschule, Gymnasium in Frankfurt am Main
Abiturnote: 1,8

Hochschulstudium:

1990-1992 Grundstudium Biologie an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt
Vordiplom in Biologie
1992-1997 Studium der Biochemie und der Biophysikalischen Chemie an der
J.W. Goethe-Universität Frankfurt bei Prof. Dr. H. Fasold,
Nebenfach Pharmakologie
Abschluß als Diplom-Biochemikerin mit der Note sehr gut

Diplomarbeit: „Optimierung der Klonierung und Expression von F_v-Fragmenten“
am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main unter
Anleitung von Prof. Dr. H. Michel

Promotion:

Juli 1998 Beginn der Promotion im Universitätsklinikum Frankfurt,
Medizinischen Klinik III, Abteilung Hämatologie und Onkologie unter
Anleitung von Prof. Dr. D. Hoelzer

Thema: „Kultivierung von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut zur *ex vivo*
Expansion von Stamm- und Vorläuferzellen und Untersuchungen zu
deren *Homing*-Fähigkeiten“

Veröffentlichungen:

Carola Hunte, Jürgen Köpke, Christian Lange, **Tanja Roßmanith** und Hartmut Michel. *Structure at 2,3 Å resolution of the cytochrome bc_1 complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment.* Structure, 2000. **8**: p. 669-84.

Steffen Koschmieder, Gesine Bug, Bernd Schröder, **Tanja Roßmanith**, Wolf-Karsten Hofmann, Uwe Kalina, Dieter Hoelzer und Oliver Gerhard Ottmann. *Murine M2-10B4 and SL/SL cell lines differentially affect the balance between $CD34^+$ cell expansion and maturation.* Int J Hematol, 2001. **73**: p. 71-77.

Tanja Roßmanith, Bernd Schröder, Gesine Bug, Peter Müller, Thomas Klenner, Rainer Knaus, Dieter Hoelzer und Oliver Gerhard Ottmann. *Interleukin-3 improves the ex vivo expansion of primitive human cord blood cells and maintains the engraftment potential of SCID repopulating cells.* Stem Cells, 2001. **19**(4): p. 313-20.

Abstracts und Poster:

Ex vivo expansion of cord blood $CD34^+$ cells: comparison of a spinner system and teflon bag. **Tanja Roßmanith**, Gesine Bug, Bernd Schröder, Dieter Hoelzer, Oliver G. Ottmann, DGHO Jena 1999

Effect of recombinant IL-3 on ex vivo expansion of human cord blood analysed in the NOD/SCID mice model system. **Tanja Roßmanith**, Bernd Schröder, Gesine Bug, Dieter Hoelzer, Oliver G. Ottmann, ESH, Paris 2000

$CD34^+$ cell selection from frozen cord blood by clinimacs and expansion under GMP-suitable conditions. **Tanja Roßmanith**, Peter Müller, Gesine Bug, Dieter Hoelzer, Oliver G. Ottmann, Bernd Schröder, DGHO Graz 2000

IL-3 supports the repopulating function of ex vivo expanded human cord blood cells transplanted in NOD/SCID mice. Gesine Bug, **Tanja Roßmanith**, Bernd Schröder, Peter Müller, Dieter Hoelzer, Oliver G. Ottmann, EHA Birmingham 2000

Cytokines and Rho family small GTPases control migration of hematopoietic progenitor cells into bone marrow stromal cell spheroids: a novel 3-D homing model. Gesine Bug, **Tanja**

Roßmanith, Reinhard Henschler, Bernd Schröder, Leoni Kunz-Schughart, Manuela Kampfmann, Dieter Hoelzer, Oliver G. Ottmann, EHA Frankfurt 2001