

**Hämatopoiese-unterstützende Eigenschaften
neonataler Stromazellen aus Nabelschnurblut *in vitro*
und *in vivo***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Teja Falk Radke
aus Berlin

Düsseldorf, April 2012

aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. G. Kögler
Korreferent: Prof. Dr. J. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 31.5.2012

Zusammenfassung

Nabelschnurblut kann als Quelle hämatopoietischer Stammzellen (HSC) zur Verwendung als Alternative zu Knochenmark für Transplantationszwecke herangezogen werden. Neben blutbildenden Stammzellen können aus Nabelschnurblut auch stromal wachsende Zellen, ähnlich den aus Knochenmark gewonnenen mesenchymalem Stromazellen (BM-MS), generiert werden. Diese Zellen zeigen ein ausgeprägtes Wachstum *in vitro* und können osteogen (Knochen) und chondrogen (Knorpel) differenziert werden, für die Fähigkeit zur adipogenen (Fett) Differenzierung hingegen erwiesen sie sich als heterogen.

Durch Untersuchungen zum Immunphänotyp, zur Zytokinproduktion und zur hämatopoieseunterstützenden Kapazität konnte eine Unterscheidung in unrestringierte somatische Stromazellen (USSC) mit multipotenten und Stromazellen mit mesenchymalem Eigenschaften (CB-MS) vorgenommen werden. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass USSC sich in durchflusszytometrischen Messungen durch eine geringere Expression des Oberflächenmarker CD146 auszeichneten und im Vergleich zu MS, sowohl aus Nabelschnurblut als auch aus Knochenmark, zu einer stärkeren Expansion kokultivierter hämatopoietischer Stammzellen führten.

Weitere Analysen zeigten, dass USSC und CB-MS annähernd gleichstark höhere Mengen des Wachstumsfaktors *Stem cell factor (SCF)* als BM-MS exprimierten. Das bei Zell-Zell-Kontakt in hämatopoietischen Zellen den Ruhezustand („*Quiescence*“) induzierende Zytokin *Stromal-derived factor 1 (SDF-1)* ließ sich hingegen in CB-MS und BM-MS auf Transkriptebe in höherer Expressionsstärke als in USSC nachweisen.

Zum Vergleich wurden auch direkt aus dem Gewebe der Nabelschnur gewonnene Stromazellen, die in der Literatur als UC-MS beschrieben werden, untersucht. Diese Zellen führten ebenfalls zu einer starken Expansion hämatopoietischer Zellen, zeigten aber im Immunphänotyp sowie in den analysierten Zytokinen ein von USSC, CB-MS und BM-MS unterschiedliches Profil.

In vivo wurden Zellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark auf ihre Fähigkeit zum *Homing*, ihre Hämatopoiese-Unterstützung bei Kotransplantation mit hämatopoietischen Zellen und auf ihre Tumorigenität untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Kotransplantation von USSC in immundefizienten Mäusen zu einer verbesserten hämatopoietischen Rekonstitution führt, ohne dass hierbei das Risiko einer induzierten Tumorformation oder eines unerwünschten *Engraftments* der applizierten Stromazellen besteht und daher diese Zellen auch den Ansprüchen einer potentiellen klinischen Anwendung entsprechen.

Abstract

Cord blood can be used as source for hematopoietic stem cells (HSC), offering an alternative to bone marrow for transplantation. Apart from cells which can rebuild the blood system, stromal cells can be generated from cord blood, similar to those isolated from bone marrow (BM-MSC). These cells show a strong proliferative capacity *in vitro* and can be differentiated into the chondrogenic (cartilage) and osteogenic (bone) lineage, although heterogeneity regarding their adipogenic (fat) differentiation was observed.

By assessment of immunophenotype, cytokine production and haematopoiesis-supporting capacity it was possible to distinguish between unrestricted somatic stem cells (USSC) with multipotent and stromal cells with mesenchymal properties (CB-MSC). Hereby it was shown that USSC had a lower surface expression of CD146 in flow cytometric analysis and, in comparison to CB-MSC as well as to BM-MSC, resulted in higher expansion rates of hematopoietic stem cells in coculture experiments.

Further analysis revealed that USSC and CB-MSC expressed higher levels of the growth factor SCF (stem cell factor) than BM-MSC. *Stromal-derived factor 1* (SDF-1), which induces quiescence in hematopoietic cells via cell-cell-contact, was shown to be stronger expressed in CB-MSC and BM-MSC on transcript level than in USSC.

As reference, cells isolated directly from the umbilical cord and which are referred to as UC-MSC in literature, were analyzed. These cells also lead to a strong expansion of hematopoietic cells, though they showed different profiles than USSC, CB-MSC or BM-MSC regarding immunophenotype and cytokine expression.

In vivo, cells derived from cord blood and bone marrow were tested for their capability to home, their support of hematopoiesis when cotransplanted with hematopoietic cells and for their tumorigenicity. It could be shown that cotransplantation of USSC into immune efficient mice resulted in an improved hematopoietic reconstitution without induction of tumor formation or unwanted engraftment of the applied cells and therefore these cells meet the requirements of a potential clinical use.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	2
ABSTRACT	3
INHALTSVERZEICHNIS	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
TABELLENVERZEICHNIS	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	13
1.1 STAMMZELLTRANSPLANTATIONEN: ANWENDUNGEN, ANFORDERUNGEN UND EINSCHRÄNKUNGEN	13
1.2 STAMMZELLEN: DEFINITION UND TYPEN	15
1.2.1 Stammzellen	15
1.2.2 Embryonale Stammzellen	15
1.2.3 Hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen	16
1.2.4 Mesenchymale und multipotente Stromazellen	17
1.2.5 Stromazellen aus Nabelschnurblut	19
1.2.6 Induzierte pluripotente Stammzellen	19
1.3 HÄMATOPOIESE	20
1.3.1 Definition und hämatopoietische Entwicklung	20
1.3.2 Zytokine in der Hämatopoiese	22
1.3.3 Die hämatopoietische Nische	23
1.4 ZIEL DER ARBEIT	26
2 MATERIAL UND METHODEN	27
VERWENDETE MATERIALIEN, REAGENZIEN, ANTIKÖRPER, ZYTOKINE, KITS, GERÄTE UND SOFTWARE	27
2.1 GENERIERUNG UND KULTIVIERUNG VON STROMAZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT UND NABELSCHNUR	32
2.1.1 Generierung und Kultivierung von Unrestringierten somatischen Stromazellen sowie Multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut, Nabelschnur und Knochenmark	32
2.1.2 Passagieren von USSC / CB-MSC / UC-MSC / BM-MSC	34
2.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Neubauerkammer	35
2.1.4 Kryokonservierung der Zellen	36
2.1.5 Auftauen der Zellen	37
2.2 CHARAKTERISIERUNG DER STROMAZELLEN	37
2.2.1 Phänotypisierung per Durchflusszytometrie	37
2.3 ZYTOKINBESTIMMUNG	39
2.3.1 RayBiotec Human Cytokine Array	40
2.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	41
2.3.3 Luminex Multiplex bead system	42
2.4 ISOLIERUNG CD34-POSITIVER HÄMATOPOIETISCHER STAMMZELLEN	42
2.5 BESTIMMUNG DER COLONY-FORMING UNITS (CFU-ASSAY)	43
2.6 KOKULTUREN (DIREKTE ODER TRANSWELL-SEPARIERTE)	44
2.7 TIERVERSUCHE MIT NOD/SCID- UND NACKTMÄUSEN	46
2.8 ANFERTIGUNG VON GEFRIERSCHNITTEN UND HISTOCHEMISCHE FÄRBUNG	47
2.8.1 Schneiden mittels Cryomikrotom	47
2.8.2 Immunohistochemische Färbung	48
2.9 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG AUF RNA-EBENE	50
2.9.1 RNA-Isolation	50
2.9.2 Reverse Transkriptase	50
2.9.3 Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR und qPCR)	50
2.10 GRAFISCHE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	53

3	ERGEBNISSE	54
3.1	VERGLEICH STROMALER ZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT (CB-DSC) UND KNOCHENMARK (BM-MSC).....	55
3.1.1	<i>Vergleich des Immunphänotyps von Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-DSC) und Knochenmark (BM-MSC)</i>	<i>55</i>
3.1.2	<i>Zytokinexpressionsprofile von Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-DSC) und Knochenmark (BM-MSC)</i>	<i>58</i>
3.1.3	<i>Kokulturen von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut mit Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-DSC) und Knochenmark (BM-MSC)</i>	<i>60</i>
3.1.4	<i>In vivo-Experimente mit Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-DSC) in NOD/SCID-Mäusen</i>	<i>70</i>
3.1.5	<i>Zusammenfassung</i>	<i>77</i>
3.2	VERGLEICH UNRESTRINGIERTE SOMATISCHE STAMMZELLEN (USSC) UND MULTIPOTENTE STROMAZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT (CB-MSC).....	79
3.2.1	<i>Erweiterter Immunphänotyp von Unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) und Multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-MSC).....</i>	<i>79</i>
3.2.2	<i>Zytokinprofile von Unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) und Multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-MSC).....</i>	<i>85</i>
3.2.3	<i>Kokulturen von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut mit Unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) und Multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-MSC)</i>	<i>86</i>
3.2.4	<i>In vivo-Experimente mit Unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) in NOD/SCID- und Nacktmäusen</i>	<i>90</i>
3.2.5	<i>Zusammenfassung</i>	<i>97</i>
3.3	VERGLEICH UNRESTRINGIERTE SOMATISCHE STAMMZELLEN (USSC) MIT INDUZIERTEN PLURIPOTENTEN STAMMZELLEN (iPS), ENDODERMAL DIFFERENZIIERTEN IPS (ENDO-iPS) UND STROMAZELLEN AUS DER NABELSCHNUR (UC-MSC)	98
3.3.1	<i>Immunphänotypisierung Induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) und Stromazellen aus der Nabelschnur (UC-MSC).....</i>	<i>99</i>
3.3.2	<i>Zytokinexpression in Induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), Endodermal differenzierten iPS (Endo-iPS) und verschiedenen Stromazellen auf Transkript-Ebene.....</i>	<i>102</i>
3.3.3	<i>Kokulturen von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut auf Stromazellen aus der Nabelschnur (UC-MSC)</i>	<i>106</i>
3.3.4	<i>Zusammenfassung:</i>	<i>110</i>
4	DISKUSSION	112
4.1	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON UNRESTRINGIERTEN SOMATISCHEN STROMAZELLEN IM VERGLEICH ZU WEITEREN STROMAZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT, NABELSCHNUR UND KNOCHENMARK.....	112
4.2	ZYTKINPRODUKTION DURCH UNRESTRINGIERTE SOMATISCHE STROMAZELLEN IM VERGLEICH ZU STROMAZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT, NABELSCHNUR UND KNOCHENMARK.....	117
4.3	HÄMATOPOIESE-UNTERSTÜTZUNG DURCH UNRESTRINGIERTE SOMATISCHE STAMMZELLEN IM VERGLEICH ZU MULTIPOTENTEN STROMAZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT, NABELSCHNUR UND KNOCHENMARK <i>IN VITRO</i> ...	118
4.4	HOMING UND HÄMATOPOIESE-UNTERSTÜTZUNG VON UNRESTRINGIERTEN SOMATISCHEN STAMMZELLEN UND MULTIPOTENTEN STROMAZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT UND KNOCHENMARK <i>IN VIVO</i>.....	121
4.5	EINORDNUNG VON UNRESTRINGIERTEN SOMATISCHEN STROMAZELLEN UND MULTIPOTENTEN STROMAZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT IN DAS MODELL DER FÖTALEN HÄMATOPOIETISCHEN NISCHE	124
4.6	AUSBlick AUf WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN UND POTENTIELLE KLINISCHE ANWENDUNG DER AUS NABELSCHNURBLUT GEWONNENEN STROMAZELLEN	126
5	REFERENZEN	128
	ANHANG	128
	DANKSAGUNG.....	149
	ERKLÄRUNG	150

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich Knochenmarks- und Nabelschnurbluttransplantation.	14
Abbildung 2: Zeitschema der embryonalen/juvenilen Hämatopoiese.	20
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Hierarchie und Bildungsorte der Blutzellen.	22
Abbildung 4: Vereinfachtes Schema der adulten hämatopoietischen Nische.	25
Abbildung 5: Repräsentative Abbildung der Morphologie aus Nabelschnurblut generierter Stromazellen.	35
Abbildung 6: Schema der Neubauer-Zählkammer.	36
Abbildung 7: Vergleich Prinzip RayBiotec-Array, ELISA und Luminex.	39
Abbildung 8: Ergebnisbeispiel RayBiotec Human Cytokine Array.	40
Abbildung 9: Colony-forming unit assay.	44
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Transwell-separierten Kokultur.	46
Abbildung 11: Schema Kokulturversuche und Colony-forming unit-Assay.	45
Abbildung 12: Intrafemorale/Intravenöse Injektion in NOD/SCID-Mäuse.	47
Abbildung 13: Streuung in der Expressionsstärke von CD90 auf CB-DSC.	58
Abbildung 14: Repräsentative Darstellung des „MSC-Immunophänotyps“ von CB-DSC und BM-MSC nach durchflusszytometrischer Analyse.	57
Abbildung 15: Expression von SCF und LIF in CB-DSC und BM-MSC.	60
Abbildung 16: Entwicklung Gesamtzellzahlen in der Kokultivierungen CD34-positiver Zellen auf CB-DSC / BM-MSC in Versuch B und C.	62
Abbildung 17: Entwicklung CD34-positiven Zellen in der Kokultivierungen auf CB-DSC / BM-MSC in Versuch B und C.	63
Abbildung 18: Entwicklung koloniebildender Einheiten in der Kokultivierung CD34-positiver Zellen auf CB-DSC / BM-MSC in Versuch B und C.	64
Abbildung 19: Entwicklung weißer (CFU-GM) und roter (CFU-E) Progenitoren in der Kokultivierung CD34-positiver Zellen auf CB-DSC / BM-MSC in Versuch B und C.	65
Abbildung 20: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34+-Zellen und CFU während der Expansion mittels konditioniertem Medium in Versuch D.	67
Abbildung 21: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34+-Zellen und CFU bei direkter (DC) und indirekter (TW) Kokultur in Versuch E.	69
Abbildung 22: Schema intrafemorale/Intravenöse Injektion humaner Zellen in NOD/SCID-Mäuse.	71
Abbildung 23: Milz und Femur nach intrafemorale Injektion humaner Zellen in NOD/SCID-Mäuse.	72
Abbildung 24: Schema intravenöse Injektion humaner Zellen in NOD/SCID-Mäuse.	73
Abbildung 25: Humane Zellen im murinen Knochenmark 5 Wochen nach Injektion humaner Zellen.	74
Abbildung 26: Muriner Femur 5 Wochen nach intravenöser Injektion CD34-positiver humaner Zellen.	74
Abbildung 27: Murine Milz und Leber 5 Wochen nach intravenöser Injektion humaner Zellen.	75
Abbildung 28: Murine Lunge nach intravenöser Injektion humaner Zellen.	76
Abbildung 29: Weitere untersuchte murine Organe/Gewebe nach intravenöser Injektion humaner Zellen.	77
Abbildung 30: Erweiterter Immunophänotyp von USSC, CB-MSC und BM-MSC.	80
Abbildung 31: Expression von CD56 auf der Oberfläche verschiedener Stromazellen.	81
Abbildung 32: Oberflächen- und intrazelluläre Expression von CD184 auf USSC, CB-MSC und BM-MSC.	82
Abbildung 33: Expression von CD271 auf der Oberfläche von USSC, CB-MSC und BM-MSC.	83
Abbildung 34: Ausgewählte Beispiele der variablen Intensität in der Oberflächenexpression von CD146 auf USSC, CB-MSC und BM-MSC.	84
Abbildung 35: Reduktion der Expression von CD106 auf BM-MSC während der Kultivierung.	84
Abbildung 36: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34+-Zellen und CFU auf USSC/CB-MSC Feederzellen in Vorversuch F.	87

Abbildung 37: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34+-Zellen und CFU während der Kokultur auf USSC, CB- MSC und AFT024 in Versuch G.....	88
Abbildung 38: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34+-Zellen und CFU während der Kokultur auf USSC, CB- MSC , DLK-1-überexprimierenden CB-MSC und AFT024 in Versuch H.	89
Abbildung 39: Schema der Versuchsanordnung zur intravenösen Injektion von USSC und BM-MSC in NOD/SCID-Mäusen.....	91
Abbildung 40: Verschiedene murine Organe nach Applikation von USSC/BM-MSC.	92
Abbildung 41: Cluster humaner Zellen in der murinen Lunge Applikation von USSC/BM-MSC.	93
Abbildung 42: Schema der Versuchsanordnung zur Koinjektion von USSC und CD34+-Zellen in NOD/SCID-Mäuse.....	93
Abbildung 43: Anteil humaner Zellen in murinem Knochenmark, Blut und Milz nach Koinjektion von USSC und CD34+-Zellen.....	94
Abbildung 44: Anteil humaner CD34-positiver Zellen in murinem Knochenmark, Blut und Milz nach Koinjektion von USSC und CD34+-Zellen.	94
Abbildung 45: Lokal konzentriertes Engraftment humaner Zellen in der murinen Milz.....	95
Abbildung 46: Tumorigenitätstest USSC/BM-MSC nach subkutaner Applikation in Nacktmäusen.....	96
Abbildung 47: Kolonie induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) aus USSC.	98
Abbildung 48: Ausgewählte Oberflächenmarker der iPS-Immunophänotypisierung.....	100
Abbildung 49: Phänotyp Oberflächenmarker auf UC-MSC.	101
Abbildung 50: Unterschiede in der Oberflächenexpression von CD146 (MCAM) auf verschiedenen Zelltypen.....	102
Abbildung 51: RNA-Expression Hepatozyten, USSC, CB-MSC und iPS.	103
Abbildung 52: RNA-Expression in fötaler Leber, endodermal differenzierten iPS, USSC, CB-MSC, BM-MSC und UC-MSC.	104
Abbildung 53: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34+-Zellen und CFU in Kokulturen auf USSC, CB-MSC und UC-MSC in Versuch I.....	106
Abbildung 54: Subpopulationen identifiziert anhand der CD45-Oberflächenexpression nach Kokultur/Expansion auf verschiedenen Feeder-Linien.	107
Abbildung 55: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34+-Zellen und CFU in Kokulturen auf UC-MSC gegen BM- MSC in Versuch J.	108
Abbildung 56: Unspezifische Färbung bei auf BM-MSC expandierten Zellen im Vergleich zu auf UC-MSC expandierten Zellen in Versuch J.	109
Abbildung 57: Unterschiedliche CD146-Expression auf USSC und BM-MSC.....	113
Abbildung 58: Identifizierung von UC-MSC anhand CD56-Expression.....	114
Abbildung 59: CD56- und CD184-Expression als qualitative Marker für CB-MSC und BM-MSC.....	115
Abbildung 60: Modell einer Hierarchie der untersuchten stromalen Zelltypen.	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Protokoll des RayBiotec Human Cytokine Array.....	40
Tabelle 2: Protokoll ELISA-Zytokinbestimmung.	41
Tabelle 3: Protokoll Luminex-Zytokinbestimmung.	42
Tabelle 4: Protokoll der CD34-Isolation via magnetic activated cell sorting (MACS).	43
Tabelle 5: Färbeprotokoll für histologische Schnitte gegen humane Nuklei.	49
Tabelle 6: Zusammensetzung der für die reverse Transkription verwendeten Ansätze.	50
Tabelle 7: Pipettierschema und Amplifikationsprogramm der RT-PCR.	51
Tabelle 8: Pipettierschema und Amplifikationsprogramm der qPCR.....	52
Tabelle 9: Ergebnisse und Sensitivitäten ELISA/Luminex.....	59
Tabelle 10: Übersicht maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen auf CB-DSC gegenüber BM-MSC in Versuch B und C.	66
Tabelle 11: Übersicht maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen mit durch CB-DSC bzw. BM-MSC konditioniertem Medium in Versuch D.....	68
Tabelle 12: Übersicht maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen in direkter gegenüber indirekter Kokultur in Versuch E.	70
Tabelle 13: Übersicht maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen auf USSC gegenüber CB-MSC in Vorversuch F.....	87
Tabelle 14: Übersicht zeitkinetische und maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen auf USSC gegenüber CB-MSC in Versuch G.	89
Tabelle 15: Übersicht zeitkinetische und maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen auf USSC gegenüber CB-MSC mit DLK-1-Überexpression in Versuch H.	90
Tabelle 16: Übersicht über den Nachweis humaner Zellen in NOD/SCID-Mäusen nach Injektion CD34- positiver Zellen alleine oder in Kombination mit USSC nach 4 und 8 Wochen in Knochenmark, Blut und Milz.	95
Tabelle 17: Übersicht Immunophänotypisierung von induzierten pluripotenten Stammzellen aus USSC.	99
Tabelle 18: RNA-Expressionswerte ausgewählter Zytokine in verschiedenen Zelltypen.....	105
Tabelle 19: Übersicht Expansionswerte auf UC-MSC gegen BM-MSC in Versuch J.	108
Tabelle 20: Übersicht über die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf hämatopoietischen Zellen nach Expansion auf UC-MSC oder BM-MSC in Versuch J.	110
Tabelle 21: Übersicht zur Identifizierung der verschiedenen Stromazellen anhand des relativen Expressionsprofiles selektierter Marker.	118
Tabelle 22: Vergleich verschiedener Publikationen zu Koinjektionen hämatopoietischer Stammzellen mit stromalen Zellen.....	123

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
° C	Grad Celsius
α-MEM	Alpha-Minimum essential medium
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AA	Anti-Asialo
AFP	Alpha-Fetoprotein
AGM	Aorta-Gonaden-Mesonephros
AK	Antikörper
ALCAM	<i>Activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
ANGPT	Angiopoetin
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
ARG	Arginase
AT	<i>Adipose tissue</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillatum</i>
Axl	<i>Adhesion-related kinase</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BFU-E	<i>Burst-forming unit – Erythrocyte</i>
BLC	<i>B lymphocyte chemoattractant</i>
BM	<i>Bone marrow</i>
BM-MSC	<i>Bone marrow-derived mesenchymal/multipotent stromal cell</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
Ck beta 8-1	<i>Chemokine beta 8-1</i>
c-kit	<i>V-Kit Hardy Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
c-Myc	<i>Cellular myelocytomatosis oncogene</i>
CFC	<i>Colony forming cell</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CFU-E	<i>Colony forming unit – erythrocytes</i>
CFU-GM	<i>Colony forming unit – granulocytes/monocytes</i>
CFU-GEMM	<i>Colony forming unit – granulocytes/ erythrocytes /monocytes /macropages</i>
CB	<i>Cord blood</i>
CB-DSC	<i>Cord blood-derived stromal cell</i>
CB-MSC	<i>Cord blood-derived multipotent stromal cell</i>
CCR	<i>C-C motif chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CM	<i>Conditioned medium</i>
CMV	Cytomegalivirus
cm ²	Quadratzenimeter
CPD	<i>Cumulative population doublings</i>
CPS1	Carbamoylphosphat-Synthetase I
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
C _t	<i>Cycle treshold</i>
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DLK-1	<i>Delta-like homologue 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>

Abkürzung	Bedeutung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E-Cad/ E-Cadherin	<i>Epithelial cadherin</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENA-78	<i>Epithelial neutrophil-activating protein 78</i>
Endo-iPS	<i>Endodermally differentiated induced pluripotent stem cell</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
Ep-CAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ESC	<i>Embryonic stem cell</i>
et al.	<i>et alia</i>
FA1	<i>Fetal antigen 1</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBP1	Fruktose-1,6-bisphosphatase
FCM	<i>Flow cytometry</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
Flt-3L	<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
FOX	<i>Forkhead box protein</i>
g	Gramm
G6PC	Glucose-6-Phosphatase
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GAM	<i>Goat-anti-mouse</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCP-2	<i>Granulocyte chemotactic peptide-2, granulocyte chemoattractant protein-2</i>
GDNF	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	<i>Good manufacturing practise</i>
GRO	<i>Growth related oncogene</i>
GvHD	<i>Graft-versus-host disease</i>
GvL(E)	<i>Graft-versus-leukaemia (effect)</i>
GvM(E)	<i>Graft-versus-malignancy (effect)</i>
Gy	Gray
h	Stunden
HEX	<i>Hematopoietically expressed homeobox gene</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HNF	<i>Hepatocyte nuclear factor</i>
HOX	Homeobox
HPC	<i>Hematopoietic progenitor cell</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSA	Humanes Serum-Albumin
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
i.f.	intrafemural
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>

Abkürzung	Bedeutung
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor-binding protein</i>
IL	Interleukin
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
iPS	<i>Induced pluripotent stem cell</i>
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
KDR	<i>Kinase insert domain receptor</i>
Kf	Kammerfaktor
KLF	<i>Krüppel-like factor</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LIGHT	<i>Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with herpes simplex virus glycoprotein D for herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T-lymphocytes</i>
LNGFR	<i>Low affinity nerve growth factor receptor</i>
LTC-IC	<i>Long-term culture initiating cell</i>
LT-HSC	<i>Long-term hematopoietic stem cells</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MAC	<i>Myoablative conditioning</i>
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MCAM	<i>Melanoma cell adhesion molecule</i>
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MDC	<i>Macrophage-derived chemoattractant</i>
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIF	<i>Migration inhibitory factor</i>
MIG	<i>Monokine induced by gamma-Interferon</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MNC	<i>Mononuclear cells</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
min	Minute
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i> <i>Multipotent Mesenchymal stromal cell</i> <i>Multipotent stromal cell</i>
n	Anzahl
N/A	<i>Not applicable</i>
NAP-2	<i>Neutrophil-activating protein-2</i>
NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
NG2	<i>Neural/glial antigen 2</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NOD/SCID	<i>Non-obese diabetic / Severe combined immunodeficiency</i>
NT	<i>Neurotrophic factor</i>
Oct-4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
OSM	<i>Oncostatin M</i>
p	<i>Probability-value</i>
PARC	<i>Pulmonary and activation-regulated chemokine</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS-H	<i>Phosphate-buffered saline mit 0,5% humanem Serumalbumin</i>
PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline mit 0,5% Tween 20</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin 5

Abkürzung	Bedeutung
PFA	Paraformaldehyd
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
pg	Picogramm
Pref-1	<i>Preadipocyte factor 1</i>
PROX1	<i>Prospero homeobox protein 1</i>
PSG	Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted</i>
rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
RIC	<i>Reduced intensity conditioning</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	a) Raumtemperatur b) Reverse Transkriptase
s.c.	<i>subcutan</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDF	<i>Stromal-derived factor</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
SSEA	<i>Stage specific antigen</i>
SOX 2	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
SRC	<i>SCID repopulating cells</i>
ST-HSC /ST-HPC	<i>Short-term hematopoietic stem/progenitor cells</i>
s IL-6 R	<i>Soluble IL-6-receptor</i>
s TNF RI	<i>Soluble TNF-receptor I</i>
s uPAR	<i>Soluble urokinase receptor</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TARC	<i>Thymus and activation regulated chemokine</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNC	<i>Total nucleated cells</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
THPO	Thrombopoetin
TRA	<i>Tumor rejection antigen</i>
TW	Transwell
u	<i>Unit</i>
UC	<i>Umbilical cord</i>
UC-MSC	<i>Umbilical cord-derived multipotent stromal cell</i>
USSC	<i>Unrestricted somatic stromal/stem cell</i>
V	Volumen
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vf	Verdünnungsfaktor
VLA-4	<i>Very late antigen 4</i>
vs.	<i>versus</i>

1 Einleitung

1.1 **Hämatopoietische Stammzelltransplantationen: Anwendungen, Anforderungen und Einschränkungen**

Der Begriff der hämatopoietischen Stammzelltransplantation bezeichnet die Transplantation blutbildender Stammzellen direkt aus dem Knochenmark („Knochenmarkstransplantation“), aus peripherem Blut nach Mobilisierung („Stammzellapherese“) oder aus Nabelschnurblut („Nabelschnurbluttransplantation“) eines Spenders in Patienten. Die häufigste Anwendung finden hämatopoietische Stammzellen dabei in der Behandlung von Leukämien, Anämien und Polyzythämie, welche als Sammelbegriffe die bekanntesten Erkrankungen des blutbildenden Systems bezeichnen (siehe Anhang 1a).

Während die Knochenmarkstransplantation bereits Ende der 1960er Jahre etabliert wurde, erfolgte die erste erfolgreiche Transplantation von Nabelschnurblutzellen erst 1988 in einem Patienten mit Fanconi-Anämie [1]. Unabhängig von der Quelle wird primär zwischen autologer (Spender und Empfänger identisch) und allogener (Spender und Empfänger verschiedene Individuen) Transplantation unterschieden. Voraussetzung einer erfolgreichen Transplantation ist zudem, abhängig von der zu behandelnden Erkrankung, eine komplett myeloablative Vorbehandlung (*Myoablative Conditioning*; MAC) oder eine Vorbehandlung mit reduzierter Intensität (*Reduced Intensity Conditioning*; RIC [2]) des Empfängers durch Chemo- oder Strahlentherapie. Während bei der MAC sämtliche Stammzellen des Knochenmarks zerstört werden („Myeloablation“, beispielsweise durch intensive Ganzkörperbestrahlung), basiert die erst innerhalb der letzten Jahre etablierte RIC auf einer Reduktion der Patienten-Stammzellen in Verbindung mit der Bekämpfung eventuell verbliebener entarteter Zellen durch das Fremdtransplantat. Vorteil der RIC ist dabei eine schnellere Rekonstitution („Wiederherstellung“) des Immunsystems, da dieses im Patienten nur soweit unterdrückt wird, wie es für ein erfolgreiches Anwachsen des Transplantates nötig ist und durch die geringere Schädigung des Knochenmarks eine beschleunigte Regeneration erreicht wird.

Die primäre Einschränkung bei der Transplantation von hämatopoietischen Stammzellen liegt in der benötigten Kompatibilität von Spender und Empfänger. So ist eine hohe Übereinstimmung („*Matching*“) der HLA-Klassifizierung („*Human leukocyte antigen*“) erforderlich. Je ausgeprägter der Unterschied („*Mismatch*“), desto höher auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer *Graft-versus-host-disease* (GvHD), also einer immunologischen Abwehrreaktion des Transplantates

(„Graft“) gegen den Empfängerorganismus („Host“) [3, 4]. Bei der Behandlung maligner Erkrankungen kann jedoch ein moderater Effekt durchaus erwünscht sein, da eventuell nach Therapie verbliebene Tumorzellen so eliminiert werden können (*Graft-versus-leukemia-effect*, GvL oder auch *Graft-versus-malignancy-effect*, GvM) [5-7].

Nabelschnurblut-Transplantate weisen, neben deutlich geringerer Inzidenz von viralen Belastungen, aufgrund des immunologisch unreiferen Status der Zellen zwar eine höhere Toleranz gegenüber eventuellen *Mismatches* auf [8], jedoch besteht neben einem im Vergleich langsameren *Engraftment*, also dem Anwachsen der applizierten Zellen, eine zusätzliche Limitierung in der begrenzten Menge an Zellen pro Transplantat [9] (siehe auch Abbildung 1).

Knochenmarks- transplantation

- + große Zellmengen
- + jahrelange Erfahrung
- + schnelle Rekonstitution
- Gefahr von GvHD bei ungenügendem HLA-match
- potentielle Übertragung von Viren (CMV/EBV)



Nabelschnurblut- transplantation

- + schnell verfügbar
- + kaum/keine Gefahr von Virenübertragung
- + große Toleranz gegenüber HLA-mismatch
- Zellmenge limitiert
- längerer Zeitraum bis Rekonstitution

Abbildung 1: Vergleich Knochenmarks- und Nabelschnurbluttransplantation. In diesem Schema werden die wichtigsten Vor- und Nachteile beider Verfahren gegenübergestellt. CMV = Cytomegalivirus; EBV = Epstein-Barr-Virus.

In Kombination mit einer erforderlichen Mindestmenge an Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers [10] waren daher anfänglich nur Transplantationen bei Kindern und Jugendlichen möglich. Seit einigen Jahren wird diese Problematik teilweise durch Kombination zweier Transplantate umgangen [11], zudem wird intensiv nach weiteren Alternativen, beispielsweise Optimierung des *Engraftments* durch Kotransplantation supportiver stromaler Zellen [12, 13] oder der vorherigen Expansion der hämatopoietischen Zellen *in vitro* [14, 15], geforscht. Bei letzterem werden die aus Knochenmark oder Nabelschnurblut gewonnenen Zellen unter GMP („*Good manufacturing practise*“)-konformen Zellkulturbedingungen durch Kokultivierung auf unterstützenden Stromazellen („*Feeder*“) oder unter Verwendung von entsprechenden wachstumsfördernden Botenstoffen (Zytokinen) vermehrt. Zwar führen bisher beschriebene Protokolle zu einer teilweise starken Expansion der Gesamtzellzahl, jedoch fällt die Fähigkeit zur *Migration/Homing* stark ab [16]. Ebenso wird die Ausreifung in Richtung Progenitorzellen ohne Fähigkeit der Langzeit-Selbsterhaltung forciert [17].

Das vorrangige Ziel der Forschung in diesem Bereich ist, die Verzögerung zwischen Transplantation und Etablierung eines aktiven Immunsystems im Empfänger zu verringern, speziell die der so genannten „neutrophile recovery“, also der Neubildung neutrophiler Granulozyten [18]. Dies ist von Bedeutung, da der Empfänger zwischen Myeloablation und Rekonstitution („Wiederherstellung“) immunologisch schutzlos und somit die Gefahr einer Infektion entsprechend hoch ist.

1.2 Stammzellen: Definition und Typen

1.2.1 Stammzellen

Der Begriff „Stammzelle“ bezeichnet Zellen, welche in der Lage sind, sich sowohl selbst zu erneuern als auch Progenitorzellen als Vorläufer spezialisierter Zellen hervorzubringen. Primär werden diese in embryonale, fötale/neonatale und adulte Stammzellen unterschieden. Während embryonale Stammzellen ausschließlich aus der Blastozyste gewonnen werden können, kommen fötale und neonatale Stammzellen (auch als „postembryonale Stammzellen“ zusammengefasst) im kompletten Organismus des sich entwickelnden Fötus bzw. des Neugeborenen vor. Adulte Stammzellen kommen, in geringerem Anteil, ebenfalls in fast sämtlichen Geweben erwachsener Individuen vor. Sie dienen als Reserve zum Ersatz abgestorbener Zellen und werden je nach ihrer Fähigkeit, in verschiedene Zelltypen differenzieren zu können, klassifiziert:

Multipotent bezeichnet dabei eine Zelle mit der Fähigkeit, in verschiedene Zelltypen eines oder mehrerer der drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) ausreifen zu können. Analog hierzu bezeichnet man Zellen mit umfassenderen Differenzierungs-Möglichkeiten als pluripotent (fähig, in Zelltypen aller drei Keimblätter sowie Keimbahnzellen zu differenzieren) oder totipotent (fähig, komplette lebensfähige Organismen zu bilden).

Hierbei ist anzumerken, dass die Definitionen der Begriffe Multipotent und Pluripotent aktuell in der Literatur inkonsistent genutzt werden, wobei Pluripotenz auch als Beschreibung Keimblatt-übergreifenden Differenzierungspotentials ohne Fähigkeit zur Differenzierung in Keimzellen und multipotent bezogen auf mehrere Derivate einer einzelnen Keimblattlinie verwendet werden kann.

1.2.2 Embryonale Stammzellen

Die 1998 von James Thomson entdeckten embryonalen Stammzellen (ESC) sind die potentesten bekannten Zellen in der Forschung. Diese können nur innerhalb der ersten Tage nach Befruchtung einer Eizelle gewonnen werden, indem aus der Blastozyste die so genannte innere Zellmasse

entnommen wird [19]. ESC weisen ein pluripotentes Differenzierungspotential auf, welches am deutlichsten *in vivo* durch das Auftreten von Teratomen nach Injektion undifferenzierter Zellen in immundefiziente Tiere nachzuweisen ist, aber auch *in vitro* durch Umwandlung in so genannte „*embryoid bodies*“ und gezielte Differenzierung in Richtung aller drei Keimblätter mittels bestimmter Faktoren. Aufgrund der Tatsache, dass sie aus potentiell voll lebensfähigen Embryonen stammen (zumeist aus Aborten oder überzähligen Embryonen bei künstlicher Befruchtung), sind sie ethisch äußerst umstritten und Gewinnung, Kultivierung als auch Forschung in vielen Ländern rechtlich eingeschränkt.

1.2.3 Hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen

Die klinisch relevantesten sind die in den 1960er Jahren erstmals (ursprünglich als „*spleen colony – forming cells*“) beschriebenen hämatopoietischen Stammzellen (HSC; [20-22]) und deren Nachfolger (HPC; hämatopoietische Progenitorzellen), da nach aktuellem Kenntnisstand davon ausgegangen wird, dass alle Zellen des Blutes allein aus diesen Zellen hervorgehen. Aufgrund dieser Fähigkeit werden HSC bereits seit Jahren als Transplantat bei schweren Erkrankungen des blutbildenden Systems eingesetzt, da sowohl die hämatopoietischen Stamm- als auch Progenitorzellen in der Lage sind, nach Applikation gezielt in das Knochenmark des Empfängers einzuwandern („*Homing*“), anzuwachsen („*Engraftment*“) und ein voll funktionsfähiges Immunsystem zu etablieren (Rekonstitution). Die Gewinnung dieser Zellen erfolgt dabei direkt aus entnommenem Knochenmark [23], aus dem peripheren Blut nach Mobilisierung [24] (z.B. durch Apherese) oder aus dem Blut der Nabelschnur [25]. Vom klinischen Aspekt macht dabei die Verwendung von rotem Knochenmark durch Punktion des Beckenkamms oder die Proliferation/Ausschwemmung der hämatopoietischen Stammzellen in das periphere Blut durch mehrtägige Verabreichung des Zytokines G-CSF („*Granulocyte-colony stimulating factor*“) mit anschließender Stammzellapherese keinen Unterschied aus [26]. Die biologisch unreiferen Zellen aus Nabelschnurblut hingegen zeigen eine deutlich bessere Verträglichkeit bzw. geringer ausfallende *Graft-versus-host-disease* [27], benötigen jedoch eine längere Zeit zur Rekonstitution des Patienten [28].

Der Oberflächenmarker CD34 (CD: „*cluster of differentiation*“), in Verbindung mit dem Pan-Leukozytenmarker CD45, galt und gilt bisher als „das“ Erkennungsmerkmal der hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen. Der Anteil der HSC-Zellpopulation ist relativ gering (im Knochenmark um ca. 1 %, im Nabelschnurblut um ca. 0,5 %, im peripheren Blut um 0,05 % der Leukozyten).

Selbst im Idealfall eines vom HLA-Typ her passenden Transplantates ist bei der Behandlung einer hämatopoietischen Erkrankung die Mortalität, u.a. aufgrund von Infektionen, innerhalb der ersten

Wochen nach Transplantation, noch ausgesprochen hoch und korreliert stark mit der Dosis der verabreichten hämatopoietischen Stammzellen (frühen HSC als auch bereits weiter ausdifferenzierten HPC).

Eine mögliche Herangehensweise zur Überwindung dieser Limitierung bei Nabelschnurblut-Präparaten ist die Expansion der Zellen bereits vor Transplantation. Doch auch wenn eine rein zahlenmäßige Vermehrung der gesamten nukleären Zellen („*total nucleated cells*“, TNC) durch mehrtägige Zugabe ausgewählter Zytokine (hauptsächlich Kombinationen von Flt-3L, G-CSF, IL-3, SCF und THPO) erreicht werden kann, so ist dies mit einer deutlichen Erschöpfung des Pools an hämatopoietischen Stammzellen verbunden. Proliferation findet hier nur parallel zu Differenzierung und somit auf Kosten des Selbsterhalts im undifferenzierten Zustand statt.

Alternativ hierzu können auch stromal wachsende Zellen als so genannte „*Feeder*“ verwendet werden, wobei diese als Zellrasen sowohl durch Zell-Zell-Kontakt als auch durch die Sekretion von zahlreichen hämatopoietisch wirksamen Zytokinen quasi eine Nische für die HSC bereitstellen [29], so wie es bereits *in vivo* postuliert wurde [30]. Hierbei soll der Erhalt des undifferenzierten Zustandes der HSC trotz Expansion gefördert werden.

Eine weitere Option ist die Beschleunigung/Verbesserung des *Engraftments* während bzw. direkt nach Transplantation. Die Kotransplantation anderer Zellen, welche durch die von ihnen produzierten Zytokine die applizierten HSC unterstützen, ist zumindest in der Theorie eine denkbare Alternative, wobei eindeutige Nachweise eines positiven Effektes noch ausstehen.

1.2.4 Mesenchymale und multipotente Stromazellen

Die Abkürzung MSC bezeichnet prinzipiell adhärent wachsende Zellen, meist mesenchymaler Herkunft, mit Stammzellcharakter (Fähigkeit zu permanenter Regeneration/Expansion und Differenzierung). Das Mesenchym selbst wird auch als embryonales Bindegewebe beschrieben und geht aus losgelösten Zellen aller drei Keimblätter des Embryos, hauptsächlich dem Mesoderm, hervor. Aufgrund dessen wurde in der Literatur MSC bislang zumeist stellvertretend für „mesenchymale Stammzelle“ [31] oder der 2005 von der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) empfohlene, umfassendere Begriff „multipotente mesenchymale Stromazelle“ verwendet [32]. Im Allgemeinen wird, wie auch in der vorliegenden Arbeit, aktuell MSC allerdings als Abkürzung für den noch weiter gefassten Begriff „multipotente Stromazelle“ zur Bezeichnung dieser Zelltypen verwendet. Auch wenn diese Begriffe oftmals synonym benutzt werden [33], so sind „mesenchymale Stammzellen“ (keimblatt-übergreifendes Differenzierungspotential) als auch „mesenchymale Stromazellen“ (mesenchymales Differenzierungspotential) als spezielle Unterarten der

verschiedenen multipotenten Stromazellen (Differenzierungsfähigkeit in mehrere Gewebetypen) zu betrachten.

Bis heute können MSC aus Knochenmark (*bone marrow*; BM [34]), Nabelschnurblut (*cord blood*; CB [35]) und Fettgewebe (*adipose tissue*; AT [36]) isoliert werden, wobei jene aus Knochenmark (BM-MS) am besten charakterisiert sind.

BM-MS produzieren *in vivo* als auch *in vitro* eine Vielzahl an, teilweise auch an der Hämatopoiese beteiligten, Zytokinen [37] und sind damit potentiell ein Schlüsselement in der Bereitstellung der Knochenmarks-Nische für die blutbildenden hämatopoietischen Stammzellen [38], welche im Folgenden weiter erörtert werden.

In vitro lassen sich diese morphologisch und immunophänotypisch leicht zu identifizierenden Zellen durch Adhärenz auf Plastik-Zellkulturflaschen isolieren und begrenzt expandieren [39, 40]. Das multipotente Potential der MS konnte anhand unterschiedlicher Differenzierungen in mesodermale Richtung von Knochen (osteogen [41]), Knorpel (chondrogen [42]) und Fettzellen (adipogen [43]) nachgewiesen werden. Auch von weiteren Differenzierungen in Neuronen/Glia-, Muskel-, und Hepatozyten-ähnliche Zellen etc. wurde berichtet [44-47], diese sind aber im Gegensatz weniger deutlich belegt.

BM-MS finden derzeit bereits klinische Anwendung in der Verbesserung der Kontraktilität des Herzmuskels nach Infarkt [48] sowie in der Therapie/Reduktion einer *Graft-versus-host-disease* (GvHD) nach allogener Transplantation [49, 50]. In weiteren klinischen Studien konnten Kang *et al.* 2005 [51] sowie Moviglia *et al.* 2006 [52] eine Verbesserung der sensorischen und motorischen Leistung in Patienten mit Rückenmarksverletzung nach Applikation von aus Nabelschnurblut bzw. Knochenmark gewonnenen Zellen zeigen. Perspektiven sind ebenfalls die Anwendung bei Osteogenesis imperfecta [53] sowie als supportive Zellen bei der Transplantation hämatopoietischer Stammzellen [54, 55].

Stromazellen aus Nabelschnurblut bieten potentiell dieselben Anwendungsmöglichkeiten wie BM-MS, da inzwischen die GMP-konforme Generierung und Expansion etabliert ist [56].

Die ebenfalls diskutierte Verwendung von je nach Indikation differenzierten embryonalen Stammzellen oder induzierten pluripotenten Stammzellen würde neben der benötigten HLA-Übereinstimmung zudem ein hohes Risiko in eventuell verbliebenen undifferenzierten Zellen bergen, da bereits eine einzelne zur Bildung von Teratomen führen könnte [57].

1.2.5 Stromazellen aus Nabelschnurblut

Trotz Hinweisen auf MSC bzw. MSC-ähnlichen Zellen auch aus anderen Geweben, wie bereits ab 1994 für Nabelschnurblut [58-60], war bis 2003 Knochenmark als einzige Quelle der MSC [61] etabliert. 2004 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. G. Kögler an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf den Nachweis einer Stammzellpopulation aus der Fraktion der mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes, die sowohl in Morphologie und Immunophänotyp BM-MSCs ähneln, allerdings ein deutlich höheres Proliferations- und Differenzierungspotential zeigen, welches sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erfolgreich nachgewiesen werden konnte [35, 62-65]. Während ursprünglich alle aus Nabelschnurblut generierten Linien als USSC (*unrestricted somatic stem/stromal cells*) bezeichnet wurden, zeigten weitere Untersuchungen deutliche Unterschiede: Einige Zelllinien, die sich durch eine erhöhte Expression des Markers DLK-1 (*Delta-like homologue 1*; auch: Pref-1) auszeichneten, erwiesen sich als nicht adipogen differenzierbar, wohingegen in Linien mit marginaler DLK-1-Expression, analog zu BM-MSCs, die Bildung von Fettvakuolen nachgewiesen werden konnte [66]. Zusätzlich unterscheiden sich diese beiden Gruppen auch in der Expression der HOX (*homeobox*)-Gene [67], welche als Regulatoren vor allem während der Embryonalentwicklung für die Achsendefinition des sich entwickelnden Organismus von Bedeutung sind. Daher wird aktuell bei aus Nabelschnurblut generierten Zelllinien zwischen USSC (Expression von DLK-1; keine adipogene Differenzierung; keine Expression der HOX-Gene) und CB-MSCs (*cord blood-derived MSC*; keine Expression von DLK-1; adipogene Differenzierbarkeit; positives Expressionsprofil der HOX-Gene) unterschieden.

1.2.6 Induzierte pluripotente Stammzellen

2008 veröffentlichte die Gruppe um S. Yamanaka die erste Publikation, in der von einer erfolgreichen Reprogrammierung adulter muriner Fibroblasten in Zellen mit ähnlichen Eigenschaften wie embryonale Stammzellen berichtet wurde [68]. Allein durch Einschleusung der Gene für die Transkriptionsfaktoren Oct4, c-Myc, KLF-4 und SOX2 konnten erfolgreich Hautzell-Fibroblasten umgewandelt und anschließend in neuronale und Herzmuskelzellen differenziert werden. Innerhalb kürzester Zeit erschienen weitere Publikationen, nach denen diese induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) auch mit variierten Protokollen (z.B. durch retrovirale Transfektion allein mit Oct4 und KLF-4 von murinen neuronalen Stammzellen, welche SOX2 und c-Myc bereits an sich in erhöhtem Maße exprimieren [69, 70], oder unter Umgehung der Problematik retroviraler Vektoren durch Verwendung von Plasmiden [71]) gewonnen werden konnten.

Auch wenn eine klinische Anwendung aktuell noch nicht in Aussicht ist, so bieten diese Zellen im Bereich der Grundlagenforschung doch eine ethisch unbedenkliche Alternative zu ESC.

1.3 Hämatopoiese

1.3.1 Definition und hämatopoietische Entwicklung

Hämatopoiese (auch Hämatopoese, Hämopoiese oder Hämopoese) bezeichnet allgemein die Bildung und Entwicklung der verschiedenen Blutzellen, hergeleitet aus dem griechischem Haima („Blut“) und Poiein („machen“). Die hämatopoietische Entwicklung wird grundsätzlich in die embryonale und die adulte Hämatopoiese unterteilt. Während die adulte Hämatopoiese (beim Menschen ab dem 6.-7. Schwangerschaftsmonat, vereinfacht auch „ab Geburt“ definiert) sich nicht weiter verändert und die Bildung neuer Blutzellen fast ausschließlich im Knochenmark (bedingt auch in der Milz) stattfindet, so sind während der embryonalen und pränatalen Entwicklung bei Säugetieren je nach Zeitpunkt verschiedene Organe beteiligt, wobei die hämatopoietischen Stammzellen vorab zu den entsprechenden Organe wandern („migrieren“) [72], siehe auch Abbildung 2.

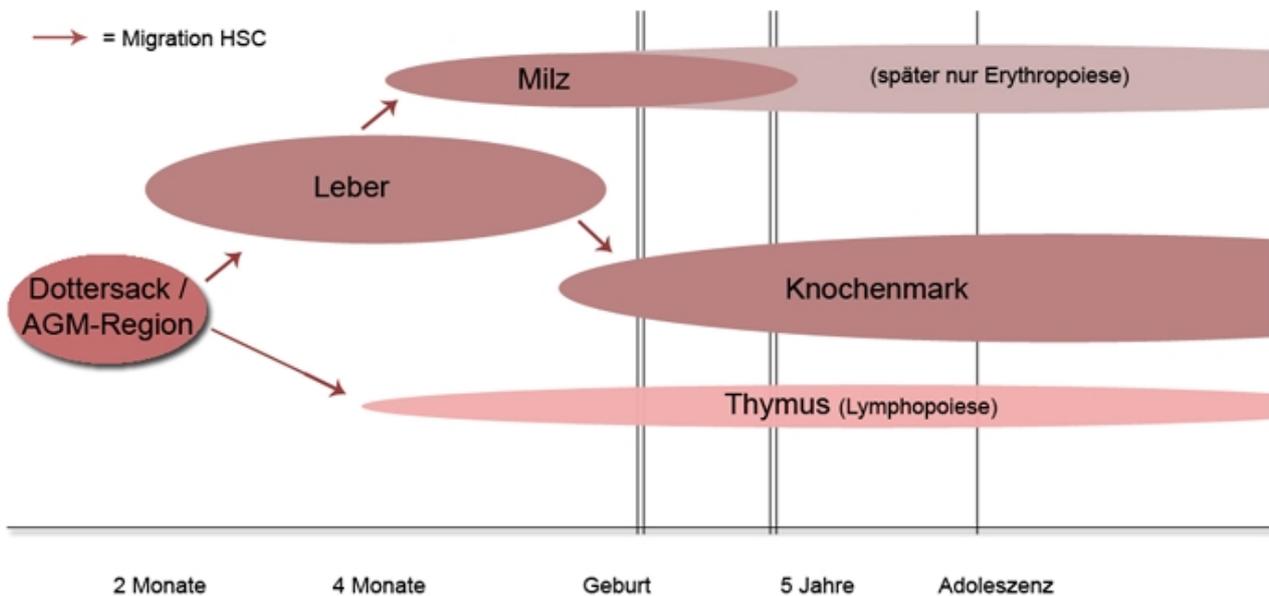


Abbildung 2: Zeitschema der embryonalen/juvenilen Hämatopoiese. Während im adulten Organismus das Knochenmark das wichtigste hämatopoietische Organ ist, übernehmen vor der Geburt diese Funktion hauptsächlich sowohl die Leber als auch die Milz. Im adulten Organismus kann die Milz auch später noch zur Erythropoiese beitragen, beispielsweise nach akutem Blutverlust.

Die embryonale Hämatopoiese selbst lässt sich zeitlich in drei Hauptabschnitte unterteilen:

14. Tag -2. Monat : Mesoblastische, megaloblastische oder extraembryonale Phase

Als erste Zellen der humanen Hämatopoese entstehen ab etwa der zweiten Gestationswoche im mesenchymalen Gewebe des Dottersacks, den so genannten Blutinseln, erste primitive Erythrozyten, welche als Besonderheit im Vergleich zu den Erythrozyten im adulten (Säugetier-) Organismus noch einen Zellkern aufweisen. Anschließend proliferieren sehr unreife hämatopoietische Stammzellen, ohne eine weitere hämatopoietische Entwicklung zu durchlaufen [73]. Erst die in der AGM (Aorta-Gonaden-Mesonephros)-Region und der Plazenta auftretenden Progenitoren zeigen ein lymphomyeloides Potential [74].

2. -6. Monat : Hepatolineale Phase

In der 5. Gestationswoche verlagert sich die Hämatopoese durch Wanderung der Stammzellen hauptsächlich in die Leber, in der Erythrozyten (Erythropoese), aber auch Megakaryozyten, Granulozyten und vereinzelt Lymphozyten gebildet werden. Ab dem 4. Monat ist ebenfalls die Milz an der Bildung der Erythrozyten beteiligt, während Lymphozyten ab dem 6. Monat im Thymus und den Lymphknoten aus migrierenden HSC gebildet werden (Lymphopoese).

Ab 6. Monat : Myelopoietische Phase

Als Übergang in die adulte Hämatopoese wird die Blutzellbildung ab dem 6. Monat fast ausschließlich vom Knochenmark übernommen, wobei Thymus, Lymphknoten und Milz weiterhin an der Ausreifung und Proliferation der Lymphozyten beteiligt sind.

Die Zellen, aus welchen die verschiedenen Blutzelltypen (siehe Anhang 1b) hervorgehen, werden unterschieden in die beiden Subpopulationen der *short-term hematopoietic stem / progenitor cells* (ST-HSC bzw. ST-HPC) und der *long-term hematopoietic stem cells* (LT-HSC) [75, 76].

Während erstere als Vorläuferzellen zwar in der Lage sind, schnell in spezifische Blutzellen/-vorläufer zu differenzieren und daher für die schnellstmögliche Rekonstituierung des Blutsystems des Empfängers von Bedeutung sind, fehlt ihnen die Fähigkeit, sich auch dauerhaft selbst zu erneuern. Für eine permanente Neubildung der Blutzellen sind daher die LT-HSC ausschlaggebend, bei denen es sich quasi um „die“ hämatopoietischen Stammzellen handelt, welche sich dauerhaft sowohl selbst erneuern als auch reifere Vorläuferzellen (lymphoide bzw. myeloide Progenitorzellen) hervorbringen können (siehe Abbildung 3).

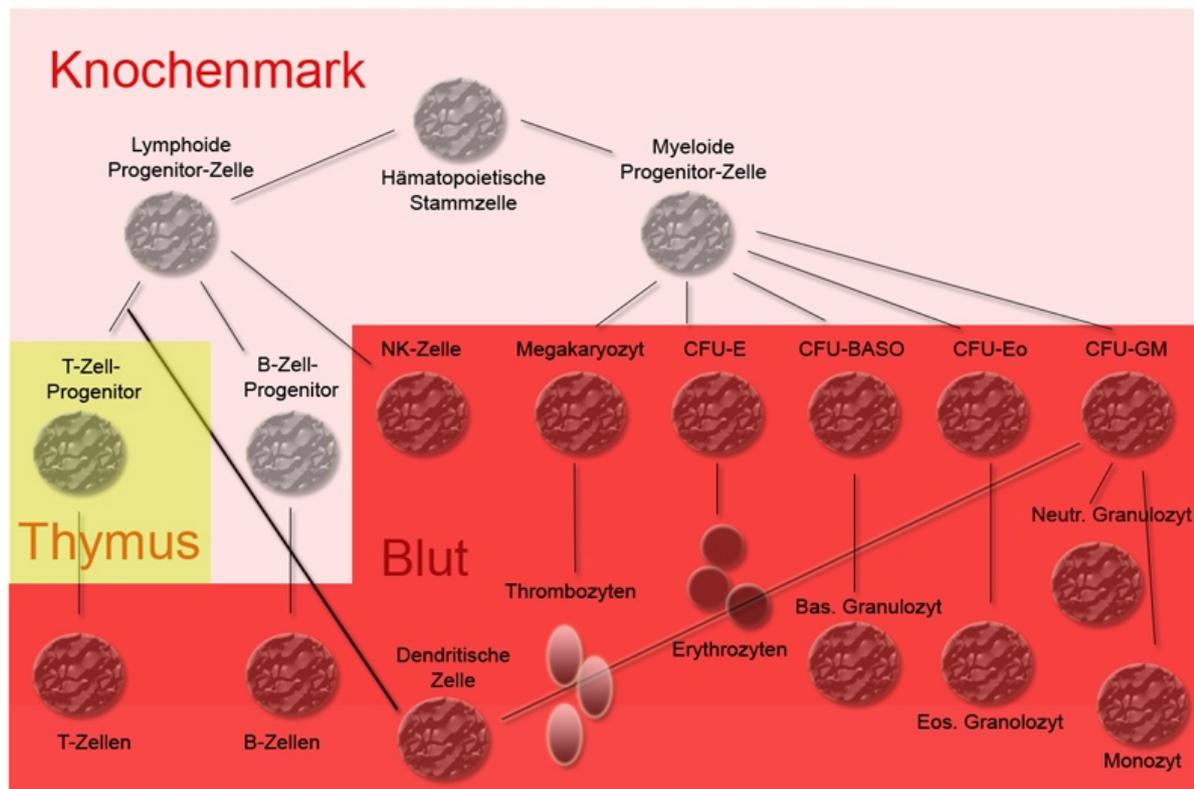


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Hierarchie und Bildungsorte der Blutzellen. Ausgehend von der (in der Regel im Knochenmark residierenden) hämatopoietischen Stammzelle können sich aus dieser über die entsprechenden Vorläufer (Progenitoren) alle Zellen des Blutsystems entwickeln.

1.3.2 Zytokine in der Hämatopoese

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Hämatopoese spielen Zytokine (auch: Cytokine). Dies bezeichnet kleine Polypeptide, die als Botenstoffe (sowohl in sekretierter als auch in der auf der Zellmembran gebundenen Form) die Kommunikation der Zellen untereinander ermöglichen. Nach ihrer Wirkung lassen diese sich in Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation und Differenzierung der Zellen stimulieren, sowie in Mediatoren, welche die Immunabwehr beeinflussen, unterscheiden. Ähnlich wie Hormone ermöglichen sie eine mittelschnelle Reaktion, sind jedoch in ihrer Reichweite stärker begrenzt, was eine lokal beschränkte Wirkung ermöglicht. Sie binden hochspezifisch an ihre entsprechenden Rezeptoren, wodurch sie bereits in sehr geringer Konzentration wirksam sind. Im Detail werden 5 Untergruppen unterschieden:

Chemokine sind Zytokine, die nach der von ihnen ausgelösten Chemotaxis benannt sind. Damit sind sie die Grundlage der Migration von Zellen und somit der Funktionsweise des Immunsystems. Die so genannten konstitutiven Chemokine werden permanent im Körper exprimiert und regulieren die normale Migration der Immunzellen, z.B. innerhalb des lymphatischen Systems, wohingegen die

inflammatorischen Chemokine als Reaktion auf eine Verletzung oder Infektion gebildet werden und Immunzellen an die entsprechende Stelle rekrutieren.

Interferone, abgeleitet vom englischen „to interfere“, sind (meist von Leukozyten nach Kontakt mit Bakterien oder Viren gebildete) Zytokine, die in Zellen die Proteinproduktion beeinflussen.

Interleukine dienen der Kommunikation der Leukozyten (und anderer am Immunsystem beteiligter Zellen) untereinander. Die bislang über 30 entdeckten Interleukine unterscheiden sich dabei in ihrer Wirkung beträchtlich voneinander: So wirken einige stimulierend und andere wiederum hemmend, auch kann der Effekt autokrin, parakrin oder endokrin sein.

Koloniestimulierende Faktoren (*Colony stimulating factors*, CSF) fördern als Wachstumsfaktoren die Proliferation und Differenzierung der HSC in weiße oder, im Falle von Erythropoietin, rote Blutkörperchen. Namensgebend ist hierbei, dass die Zugabe dieser Stoffe zu HSC in semi-solidem Medium zur Bildung von kolonieartigen Clustern führt, was bei der qualitativen Untersuchung der HSC im so genannten CFU-Assay ausgenutzt wird (siehe auch Abschnitt 2.5).

Die verschiedenen Formen des Tumornekrosefaktor (TNF α und TNF β), hauptsächlich von Makrophagen als Reaktion auf Lipopolysaccharide produziert, dienen der Regulierung der Aktivität der Immunzellen. Neben der Auslösung des programmierten Zelltods (Apoptose) können sie auch Proliferation, Differenzierung oder die Ausschüttung anderer Zytokine bewirken.

1.3.3 Die hämatopoietische Nische

Um eine konstante Neubildung der verschiedenen Blutzellen über die gesamte Lebenszeit zu gewährleisten, müssen hämatopoietische Stammzellen eine ausgeglichene Balance zwischen Differenzierung und Selbsterhalt aufweisen. Hierfür liegen zwei Mechanismen zugrunde, die symmetrische und die asymmetrische Zellteilung [77]. Bei symmetrischer Zellteilung entstehen zur Ausgangszelle identische Tochterzellen (zwei HSC), bei asymmetrischer Zellteilung unterschiedliche Tochterzellen (eine HSC und eine HPC). Somit können Vermehrung (symmetrische Teilung, beispielsweise während der Neubesiedelung des Knochenmarks nach Transplantation) und Erhalt (asymmetrische Teilung, während der regulären Hämatopoese) der HSC reguliert werden. Eine symmetrische Teilung in 2 HPC, welche auf Dauer zu einer Depletion der HSC führt [78], kann *in vivo* (mit Ausnahme spezifischer Erkrankungen) nicht beobachtet werden, stellt aber bei Protokollen zur *ex vivo*-Expansion hämatopoietischer Stammzellen bislang das generell größte Hindernis zur Erreichung effektiver Vermehrung dar [79, 80].

Das Modell einer speziellen Umgebung für die Regulation dieser Vorgänge, die so genannte hämatopoietische Nische, wurde erstmals 1978 von R. Schofield postuliert [81]. Seitdem wurde dieses Modell erweitert und durch eine Vielzahl an Experimenten bestätigt, wobei nach aktuellem Kenntnisstand im adulten Knochenmark insbesondere Osteoblasten, Endothelzellen und mesenchymale Stromazellen an der Regulation der hämatopoietischen Homeostase (Balance zwischen Vermehrung, Erhalt und Ausdifferenzierung) beteiligt sind. Während der hepato-linealen Phase in der Fötalentwicklung hingegen wird die Nische für die Erythropoiese durch Hepatoblasten in der sich entwickelnden Leber gebildet [82, 83].

Der allgemeine Begriff der hämatopoietischen Nische wiederum wird unterschieden in zwei definitive Regionen: Die osteoblastische und die vaskuläre Nische [84, 85], wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Gleichzeitig werden die Bewegungsrichtungen der HSC unterschieden in das Einwandern in das Knochenmark („*Homing*“) bzw. als Gegenrichtung in das Auswandern in den Blutkreislauf („*Migration*“).

In der osteoblastischen Nische befinden sich die HSC im endostealen Bereich (Übergangszone Knochen zu Mark, daher auch oft als endosteale Nische bezeichnet) in unmittelbarer Nähe zu Osteoblasten, welche wiederum eine große Anzahl an hämatopoietisch aktiven Zytokinen produzieren [86, 87]. Hauptsächlichste Funktion dieser Nische ist nach aktuellem Kenntnisstand der Erhalt eines Pools an ruhenden („*quiescent*“) hämatopoietischen Stammzellen, welche den in Abschnitt 1.3.1 erwähnten LT-HSC entsprechen. Insbesondere der direkte Zell-Zell-Kontakt zu Osteoblasten [88] und Osteoprogenitoren [89] ist hierbei von Bedeutung; so konnte von Visnjic et. al. im Mausmodell gezeigt werden, dass Tiere mit verringerter Anzahl an Osteoblasten deutlich weniger HSC aufwiesen [90]. Knochenabbauende Osteoklasten haben hingegen den gegenteiligen Effekt und führen zu verstärkter Migration von HSC [91, 92].

Während der Migration wandern HSC bei Bedarf aus dem Endosteum in Richtung Sinusoiden (spezielle Blutgefäße im Knochenmark) und lagern sich dort an bzw. gehen in den Blutkreislauf über. Diese Umgebung, welche Proliferation und Ausdifferenzierung der HSC in definitive Blutzellen forciert, als auch den kontrollierten Übergang der hämatopoietischen Zellen in den Blutkreislauf ermöglicht, wird als vaskuläre Nische bezeichnet [93-95]. Nach Übergang in den Blutkreislauf werden diese Zellen üblicherweise als periphere Blutstammzellen („*Peripheral blood stem cells*“; PBSC) bezeichnet und können mittels Apherese (nach gezielter Steigerung des Anteils zirkulierender Zellen durch Vorbehandlung des Spenders mit beispielsweise *Granulocyte-colony stimulating factor*; G-CSF) zu Transplantationszwecken isoliert werden.

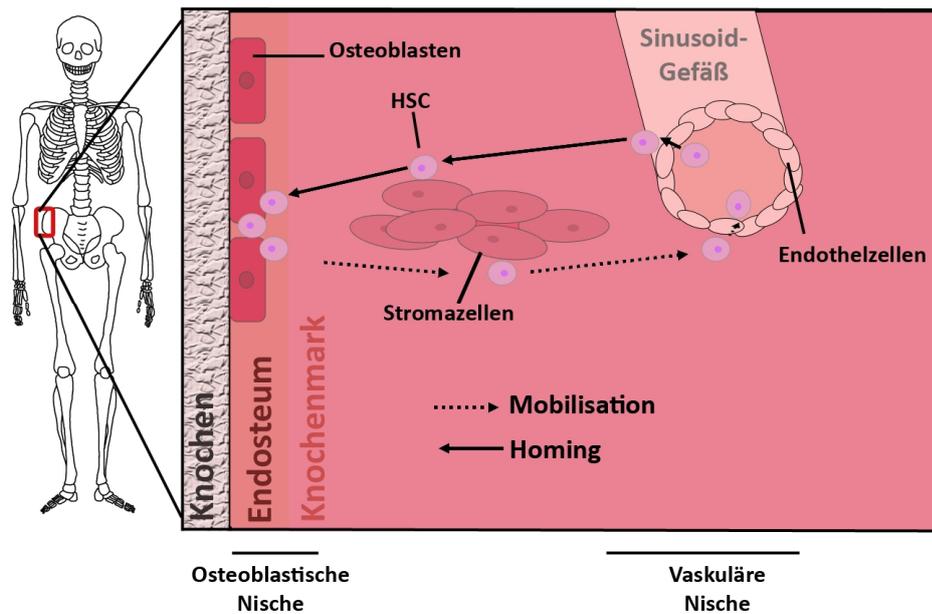


Abbildung 4: Vereinfachtes Schema der adulten hämatopoietischen Nische. Hämatopoietische Stammzellen (HSC) befinden sich im Ruhezustand (G_0 -Phase; „Quiescence“) angelagert an Osteoblasten im Endosteum (Osteoblastische Nische). Bei Mobilisierung wandern die Zellen in die vaskuläre Nische zu sinusoidalen Endothelzellen, um von dort in den Blutkreislauf einzutreten (Migration). Umgekehrt wandern HSC während des *Homing*-Prozesses von dort aus zurück zu den endostelialen Osteoblasten.

Auch physiologische Stresssituationen des Körpers, wie z.B. nach Leberschädigung oder myokardialen Infarkt, können zu einer verstärkten Rekrutierung hämatopoietischer Stammzellen führen [96, 97].

Für die Regulation des Gleichgewichtes zwischen Migration und Homing sind bereits mehrere, größtenteils zytokinvermittelte Signalwege aufgezeigt worden. So führt SCF (*Stem cell factor*; auch: *Steel factor*) in löslicher Form bei Bindung an den auf HSC exprimierten Rezeptor CD117 (*c-kit*) zu verstärkter Proliferation, während SDF-1 (*Stromal derived factor 1*; auch: CXCL12) über den Rezeptor CD184 (auch: CXCR4) sowohl Migration als auch Homing induzieren kann. Hierbei fungiert in löslicher Form sekretiertes SDF-1 als Chemoattraktor auf HSC und bewirkt deren Migration [98] (z.B. nach Gewebeerletzung), während es als Transmembranprotein auf der Oberfläche von Stromazellen bzw. Osteoblasten zum Homing in die endostale Nische führt [99, 100] und die hämatopoietischen Stammzellen in ruhenden Zustand hält [101, 102]. An dieser Interaktion setzt unter anderem auch die Wirkung des bereits erwähnten Zytokins G-CSF ein [103]: Es aktiviert die mit CD184 assoziierte Protease CD26, welche das an CD184 gebundene SDF-1 spaltet [104] und somit zur Mobilisierung der hämatopoietischen Stammzellen führt.

Weitere wichtige bekannte Mechanismen mit Einfluss auf Migration und Homing sind *Bone morphogenetic proteins* (BMP) [87, 105] und Adhäsionsmoleküle wie z.B. die Interaktion zwischen *Very late antigen 4* (VLA-4) und *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) [106, 107]. Es wird davon

ausgegangen, dass es zudem noch eine große Anzahl weiterer Faktoren gibt, deren genaue Rollen bislang noch nicht entdeckt bzw. aufgeklärt wurden und dass, neben Osteoblasten bzw. Endothelzellen, auch mesenchymale Stammzellen und multipotente Stromazellen [89, 108, 109] auf verschiedene Weise Einfluss auf die Hämatopoieseregulation nehmen.

1.4 Ziel der Arbeit

Die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente verfolgten die Ziele,

- a) die potentielle klinische Verwendung von aus Nabelschnurblut generierten Stromazellen zur Verbesserung der Rekonstitution nach hämatopoietischer Stammzelltransplantation zu evaluieren und
- b) zu untersuchen, inwiefern die Fähigkeit zur Hämatopoiese-Unterstützung *in vitro* als Unterscheidungsmerkmal zwischen USSC, CB-MSc und BM-MSc herangezogen werden kann sowie
- c) die mögliche Herkunft der USSC aus der hämatopoietische Nische der fötalen Leber zu analysieren.

Hierzu wurden im Rahmen der Untersuchungen sowohl in *in vitro*-Kokulturen als auch im *in vivo*-Tiermodell der NOD/SCID-Maus Versuche zur supportiven Eigenschaft der verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Ergänzend wurden immunophänotypische Analysen durchgeführt sowie die Expression verschiedener hämatopoiese-relevanter Zytokine untersucht, um potentielle Marker zur weiteren Identifizierung und Klassifizierung der unterschiedlichen Stromazellen zu etablieren. Schwerpunkte lagen hierbei in der Ermöglichung einer Unterscheidung der Zelltypen nach Herkunft (Knochenmark oder Nabelschnurblut) sowie innerhalb der Stromazellen aus Nabelschnurblut in USSC und CB-MSc.

Abschließend wurden Experimente zum Vergleich mit induzierten pluripotenten Stammzellen (nativ und nach endodermaler Differenzierung) sowie der *in vitro*-Hämatopoiese-Unterstützung von direkt aus der Nabelschnur gewonnenen Stromazellen (UC-MSc) im Vergleich zu USSC durchgeführt, um Rückschlüsse auf die potentielle Einordnung der USSC in die fötale Nische zu ziehen.

2 Material und Methoden

Verwendete Materialien, Reagenzien, Antikörper, Zytokine, Kits, Geräte und Software

Materialien	Hersteller/Bezogen von:
Einweg-Pipetten Costar Stripette; 5, 10 und 25 ml	Corning Incorporated; Corning, New York, USA
Einweg-Spritzen Omnifix; 1, 2, 5 und 10 ml	B.Braun Melsungen; Melsungen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1,5 ml	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
FCM-Röhrchen; Polypropylen, Rundboden, 5 ml	BD Falcon; Bedford, Massachusetts, USA
Kanülen; Microlance 3 für CFU-Assay 20 Gauge, für Injektion 27 Gauge	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
Kryoröhrchen; 2 ml, N ₂ -geeignet	Greiner Bio-One; Essen, Deutschland
LS columns; MACS-Separations-Säulen	Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach, Deutschland
Multiwell-Platten; 6 oder 24 Wells, für Zellkultur behandelt	Corning Incorporated; Corning, New York, USA
Multiwell-Platten; Rundboden, 96 Wells für RT-PCR	StarLab; Ahrensburg, Deutschland
Multiwell-Platten; Rundboden, 96 Wells für qPCR + optical cap- strips	Applied Biosystems; Carlsbad, Kalifornien, USA
Neubauer-Cytometer; improved	Laboroptik; Friedrichsdorf, Deutschland
Objekträger; Polylysin-beschichtet	Menzel-Gläser; Braunschweig, Deutschland
Pappboxen; für 100 Kryoröhrchen	NeoLab; Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen; 1, 10, 100 und 1000 µl	StarLab; Ahrensburg, Deutschland
Transwell-Inserts für 24-Well-Multiwellplatten; 1 µm Porengröße	Corning Incorporated; Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen; T25 / T75 / T225; vented cap	Corning Incorporated; Corning, New York, USA
Zentrifugationsröhrchen; konisch, 15 ml	Greiner Bio-One; Essen, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen; konisch, 50 ml	BD Falcon; Bedford, Massachusetts, USA

Reagenzien	Hersteller/Bezogen von:
100 bp Leiter	Peqlab Biotechnologie; Erlangen, Deutschland
α-MEM	Biochrom; Berlin, Deutschland
β-Mercaptoethanol (98 %)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Aceton	Merck; Darmstadt, Deutschland
Agarose	Eurogentec; Liegé, Belgien
Ammoniumchlorid-Lösung	Apotheke der Universitätsklinik Düsseldorf
Aqua dest.	B.Braun Melsungen; Melsungen, Deutschland
Biocoll Ficoll-Lösung (1.077 g/ml)	Biochrom; Berlin, Deutschland
BSA; Bovine Serum Albumin Fraction V	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
DMEM; low glucose (1 g/ml)	Lonza/Cambrex; Vervier, Belgien
DMSO	CryoSure WAK-Chemie; Steinbach, Deutschland
dNTP-Mix	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Iscove's MEM	Biochrom; Berlin, Deutschland
JUNG Einbettmedium	Leica Biosystems; Nussloch, Deutschland
Ethanol	Merck; Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl-Roth; Karlsruhe, Deutschland

FCS	Gibco; Karlsruhe, Deutschland Perbio; Bonn, Deutschland Thermo-Scientific-Hyclone; Logan, Utah, USA
Glutamin	Cambrex; Vervier, Belgien Lonza/Cambrex; Vervier, Belgien
Hämalaun-Lösung	Carl-Roth; Karlsruhe, Deutschland
Humanes Serumalbumin	Octapharma; Langenfeld, Deutschland
Methocult H4434-Medium	STEMCELL Technologies, Köln, Deutschland
Myelocult H5100-Medium	STEMCELL Technologies, Köln, Deutschland
Oligo(dT)-Primer	Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA
Paraformaldehyd	Fischar; Saarbrücken, Deutschland
PBS (Phosphatgepufferte Saline)	Serag-Wiessner; Naila, Deutschland
Penicillin	Cambrex; Vervier, Belgien Lonza; Köln, Deutschland
Prolong Gold Antifade- Eindeckelmedium	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
RNAse H	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde Gas, Düsseldorf, Deutschland
Streptomycin	Cambrex; Vervier, Belgien Lonza; Köln, Deutschland
SYBR Green	Applied Biosystems; Carlsbad, Kalifornien, USA
Taq-Polymerase	Qiagen; Hilden, Deutschland
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Trypsinlösung; 0,25 %	Cambrex; Vervier, Belgien
Trypsin / EDTA-Lösung; 0,25 %	PAA Laboratories; Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Ziegenserum (10 %)	Jackson ImmunoResearch; West Grove, Pennsylvania, USA

Antikörper (Klon; Isotyp)	Alternativer Name	Hersteller/Bezogen von:
Isotypkontrollen		
IgG1 (679.1Mc7; IgG1)	-	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
IgG1-PE (679.1Mc7; IgG1)	-	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
IgG1-PE (679.1Mc7; IgG1)	-	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
IgG3 (B10; IgG3)	-	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
IgM (NIP/M-2; IgM; Ratte)	-	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
direktkonjugiert		
CD3-FITC (UCHT1; IgG1)	T-Zell-Rezeptor Korezeptor	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD4-FITC (12B8.2; IgG1)	T-Zell-Rezeptor Korezeptor	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD7-FITC (8H8.1; IgG2a)	TP41	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD8-PE (HIT8a; IgG1)	T-Zell-Rezeptor Korezeptor	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD10-PE (HI10a; IgG1)	CALLA	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD13-PE (L138; IgG1)	Aminopeptidase N	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD18-FITC (7E4; IgG1)	Integrin Beta 2	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD19 (J4.119; IgG1)	B-Zell-Rezeptor Korezeptor	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD24-FITC (ML5; IgG2a)	Heat stable antigen	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD29-FITC (K20; IgG2a)	Integrin Beta 1	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD31-FITC (5.6E; IgG1)	PECAM-1	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD33-FITC (D3HL60.251; IgG1)	Siglec-3	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich

CD34-FITC (581; IgG1)	HPCA-1	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD34-PE (8G12; IgG1)	HPCA-1	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD36-FITC (FA6.152; IgG1)	Fatty acid translocase	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD41-PE (P2; IgG1)	Integrin Alpha 2B	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD44-FITC (J.173; IgG1)	H-CAM	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD45-FITC (2D1; IgG1)	LCA	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD45-PE-Cy5 (J33; IgG1)	LCA	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD56-PE (NKH-1; IgG1)	N-CAM	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD71-FITC (YDJ1.2.2; IgG1)	Transferrin-Rezeptor	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD73-PE (AD2; IgG1)	Ekto-5'-Nukleotidase	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD90-FITC (F15-42-1-5; IgG1)	Thy-1	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD105-PE (166707; IgG1)	Endoglin	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
CD106-FITC (51-10C9; IgG1)	VCAM-1	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD117-PE (47233; IgG1)	c-kit	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
CD133/1-PE (AC133/1; IgG1)	Prominin-1	Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach, Deutschland
CD166-PE (3A6; IgG1)	ALCAM	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD184-PE (12G5; IgG1)	CXCR4	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD197-PE (150503; IgG1)	CCR7	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
CD235a-PE (11E4B-7-6; IgG1)	Glycophorin A	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
CD271-PE (ME20.4-1.H4; IgG1)	LNGFR	Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach, Deutschland
CD326-FITC (HEA125; IgG1)	Ep-CAM	Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach, Deutschland
HLA-ABC-FITC (B9.12.1; IgG1)	HLA Klasse 1	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
HLA-DR-PE (G46-6; IgG1)	HLA Klasse 2	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
KDR-PE (ES8-20E6; IgG1)	Flk-1 / VEGFr 2	Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach, Deutschland
NG2-PE (7.1; IgG1)	Neural/gliale Antigen 2	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
unkonjugiert		
CD26 (M-A261; IgG1)	Dipeptidylpeptidase 4	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
CD146 (128018; IgG1)	MCAM	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
CD324 (2Q663; IgG1)	E-Cadherin	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Kalifornien, USA
DLK-1 (PF299-1; IgG1)	Delta-like homologue 1	Enzo Life Sciences; Farmingdale, New York, USA
MAB1281 (235-1; IgG1)	Anti human nuclei	Chemicon/Millipore; Schwalbach, Deutschland
SSEA-4 (MC-813-70; IgG3)	Stage specific antigen 4	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
TRA-1-60 (TRA-1-60; IgM; Ratte)	Tumor rejection antigen 1-60	Cell Signalling Technology; Beverly, Massachusetts, USA
TRA-1-81 (TRA-1-81; IgM; Ratte)	Tumor rejection antigen 1-81	Cell Signalling Technology; Beverly, Massachusetts, USA
konjugierte Zweitantikörper		
Goat-anti-mouse FITC	GAM	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
Goat-anti-mouse PE	GAM	Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich
Goat-anti-rat Rhodamin	GARat	Jackson ImmunoResearch; West Grove, Pennsylvania, USA

* Alle Antikörper sind, sofern nicht anders angegeben, murinen Ursprungs und ausschließlich gegen humane Epitope gerichtet.

Zytokine (rekombinant)	Hersteller/Bezogen von:
Granocyte G-CSF	Chugai Pharmaceutical; Tokio, Japan
Flt-3L	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
IL-3	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
IL-6	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
SCF	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
THPO	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA

Kits	Hersteller/Bezogen von:
CD34 indirect MicroBead kit	Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach, Deutschland
Cytofix/Cytoperm Permeabilisierungs-kit	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
EnVision+ -kit	Dako; Glostrup, Dänemark
Human Cytokine Array V Human Cytokine Array C Series 2000	RayBiotec; Norcross, Georgia, USA
Luminex/Multiplex cytokine kits	BioSource International; Camarillo, Kalifornien, USA
Quantikine ELISA-kits	R&D Systems; Minneapolis, Minnesota, USA
RNeasy kit	Qiagen; Hilden, Deutschland
SuperscriptIII- First strand synthesis system	Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland

Geräte	Hersteller/Bezogen von:
Cell-Dyn 3500 Hämatologiegerät	Abbott Laboratories; Abbott Park, Illinois, USA
CM 1850 Gefriermikrotom	Leica Biosystems; Nussloch, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe; Pipetboy acu	Integra Biosciences; Fernwald, Deutschland
EPICS XL Durchflusszytometer	Beckman Coulter; Fullerton, Kalifornien, USA
FACSCanto Durchflusszytometer	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
Inkubatoren mit CO ₂ -Regulation	Binder; Tuttlingen, Deutschland Thermo Fisher Electro/Forma; Waltham, Massachusetts, USA
Kühlschrank, 2-4 °C	Kryotec-Kryosafe; Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr; Biberach a.d. Riss, Deutschland
Gefriertruhe, - 80 °C; REVCO Ultima II	Thermo Fisher Electro; Waltham, Massachusetts, USA
Kolbenhub-Pipetten „ErgoOne“ (0,1-10; 10-100; 20-200; 100-1000 µl)	StarLab; Ahrensburg, Deutschland
Laminar flow Sicherheitswerkbank Für PCR: Für Zellkultur:	Telstar/PMV; Barcelona, Spanien Thermo Scientific/ Holten; Waltham, Massachusetts, USA
LX 100 IS Luminex/Multiplex-Analyzer	Luminex Corporation; Austin, Texas, USA
LAS-3000 Transilluminator/Imaging System	FujiFilm, Tokio, Japan
MasterCycler proS (PCR)	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Microplatten-Reader ; Model 680	Bio-Rad Laboratories; Hercules, Kalifornien, USA
Mikroskop CKX41	Olympus, Tokio, Japan
MidiMacs MACS-Seperator Magnet	Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach, Deutschland
Multikanal-Kolbenhub-Pipette	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Nanodrop ND-100	Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA
StepOne Plus (qPCR)	Applied Biosystems; Carlsbad, Kalifornien, USA
Stickstofftank	Messer Cryotherm; Kirchen, Deutschland
UVT-28M Transilluminator	Herolab; Wiesbach, Deutschland
Wasserbad SW20	Julabo; Seelbach, Deutschland
Zentrifuge Rotaxia 50 RS	Hettich Lab Technology; Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge eppendorf 5810R	Eppendorf; Hamburg, Deutschland

Software	Hersteller/Bezogen von:
Adobe Photoshop 8.01 CS	Adobe, San Jose, Kalifornien, USA
CellQuest	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
FACSDiva	BD Biosciences; San Jose, Kalifornien, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software; San Diego, Kalifornien, USA
ImageQuant TL	GE Healthcare; Buckinghamshire, UK
Microsoft Excel 2003 Microsoft Powerpoint 2003	Microsoft Corporation; Redmond, Washington, USA
Mikroskop-Imaging Cell^D	Olympus; Tokio, Japan
WinMDI 2.8	Joe Trotter (freeware)

<u>Versuchstiere</u>	<u>Hersteller/Bezogen von:</u>
NOD/SCID-Mäuse	Charles River Laboratories; Wilmington, Massachusetts, USA
Nacktmäuse (nu/nu)	Charles River Laboratories; Wilmington, Massachusetts, USA

<u>Zelllinien und Zelllysate</u>	<u>Hersteller/Bezogen von:</u>
AFT024 - Murine fötale Leberzellen	LGC standards; London, UK
pMEF – Primäre murine embryonale Fibroblasten (Stamm CF-1)	Merck/Millipore, Darmstadt, Deutschland
RNA (Gesamt)- Humane fötale Leber	Stratagene/ Agilent Technologies; Santa Clara, Kalifornien, USA

2.1 Generierung und Kultivierung von Stromazellen aus Nabelschnurblut und Nabelschnur

2.1.1 Generierung und Kultivierung von Unrestrictierten somatischen Stromazellen sowie Multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut, Nabelschnur und Knochenmark.

USSC und CB-MSC:

Das verwendete Nabelschnurblut stammte aus den kooperierenden Frauenkliniken der Region, welche nach Einweisung in der Lage sind, Nabelschnur entsprechend den gestellten Anforderungen abzunehmen. Nach schriftlicher Einverständniserklärung der Mutter wird das Blut der Nabelschnur fachgerecht von geschulten Hebammen entnommen und GMP-gerecht in spezielle Lagerbeutel zum Transport überführt. Für die Verwendung von Nabelschnurblut als allogenes Transplantat liegen sehr strenge Richtlinien der Bundesärztekammer vor und viele Faktoren, wie zum Beispiel Krankheitsgeschichte der Mutter, eventuelle Erbkrankheiten in der Familie, Einnahme von Medikamenten vor der Geburt, aber auch Gesamtvolumen der Spende, Zellzahl oder Zeitraum zwischen Abnahme des Blutes bis zum Eingang in der Nabelschnurblutbank, spielen eine Rolle bei der Entscheidung, ob ein potentiell Transplantat geeignet ist [110]. Spenden, die aufgrund von Nichterfüllung dieser Kriterien verworfen werden, können (außer bei besonderen Fällen, wie der Kontamination mit Krankheitserregern) für die Forschung verwendet werden.

Bislang ist kein spezifisches Antigen bekannt, mit Hilfe dessen Stromazellen (CB-MSC als auch USSC) direkt aus dem Blut isoliert werden können. Mit dem im Folgenden beschriebenen Verfahren können jedoch aus circa 45 % der aufgearbeiteten Blute erfolgreich USSC bzw. CB-MSC generiert werden.

Für die Generierung unter Laborbedingungen wurden in einem ersten Schritt die Mononukleären Zellen (MNC) des CB isoliert. Hierzu wurden 15 ml Ficoll (Biochrom, Berlin, Deutschland) in 50 ml-Zentrifugationsröhrchen (BD Falcon; Bedford, Massachusetts, USA) vorgelegt, mit dem Nabelschnurblut (min. 20 bis max. 35 ml/ Röhrchen) überschichtet und anschließend zentrifugiert (20 min./850 rcf/ 20 °C/ Keine Bremse). Durch diese Zentrifugation erfolgte eine Auftrennung in Plasma (Oben), Ficoll (Mitte) und Erythrozyten (Unten). Die MNC selbst befanden sich als dünne, weiße Schicht zwischen Plasma und Ficoll. Mittels Pipette wurde diese Schicht vorsichtig abgenommen und in neue 50-ml-Röhrchen überführt. Zur Entfernung des restlichen Ficolls wurden die MNC mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS: *Phosphate-buffered saline*; Serag-Wiessner; Naila, Deutschland) gewaschen, zentrifugiert und resuspendiert. Um verbliebene Erythrozyten zu lysieren, wurden die Pellets in 15-25 ml Ammoniumchlorid-Lösung (8,3 g NH₄Cl + 1,0 g KHCO₃ + 0,0375 g EDTA-Na₂ in 1 Liter Aqua dest.; hergestellt und sterilisiert in der Apotheke der Universitätsklinik

Düsseldorf) aufgenommen und für 10 min. bei 4 °C inkubiert. Direkt im Anschluss an die Lyse wurden die Zellen zentrifugiert (10 min./ 750 rfc/ 10 °C) und zweimal mit PBS gewaschen bzw. erneut zentrifugiert (7 min./ 550 rcf/ 4 °C). Nach dem zweitem Waschschrift wurden die Zellen in 50 ml PBS + 0,5 % Humanem Serumalbumin (HSA, Octapharma; Langenfeld, Deutschland) aufgenommen und ein Aliquot von 200 µl im vollautomatischem „CellDyn-3500“-Hämatologiegerät (Abbott Laboratories; Abbott Park, Illinois, USA) gemessen. Anhand des vom Cell-Dyn erfassten Differentialblutbildes konnte ermittelt werden, wie hoch der Anteil an verbliebenen Granulozyten bzw. Erythrozyten war (in der Regel unter 10 % bei ursprünglich über 60 % im Vollblut), ebenfalls lies sich so die Konzentration der MNC in der entsprechenden Probe berechnen. Letzteres war eine benötigte Information, um die für die Ansätze benötigte Anzahl Zellkulturflaschen (Corning Incorporated; Corning, New York, USA) zu bestimmen (Soll-Konzentration der ausplattierten Zellen zwischen $5 \cdot 10^6$ und $1 \cdot 10^7$ MNC/ml Medium). Je nach Bedarf wurden die Zellen in entsprechender Menge Kulturmedium aufgenommen, welches aus *low glucose* (1 g/ml) *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Cambrex; Vervier, Belgien) mit Zusatz von 30 % fötalem Kälberserum (FCS; Perbio; Bonn, Deutschland oder Gibco; Karlsruhe, Deutschland) sowie 100 units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM/l L-Glutamin (kurz PSG, jeweils Cambrex) bestand. Zusätzlich wurde zur Generierung dem Medium Dexamethason (Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland) in einer Endkonzentration von 10^{-7} Mol/ml zugesetzt. Die Zugabe von Dexamethason zu dem Kulturmedium wurde auch bei Mediumwechsel (alle 7 Tage) solange beibehalten, bis erste Kolonien beobachtet werden konnten (in der Regel frühestens nach 10 Tagen); die Kontrolle auf entstehende Kolonien wurde dabei nach Möglichkeit täglich durchgeführt.

Konnte eine Koloniebildung beobachtet werden, so wurde das Medium gegen Dexamethason-freies Kulturmedium ausgetauscht, um eine eventuelle Vor-Differenzierung der Zellen (speziell in osteogene Richtung) zu verhindern. Waren auch nach 4 Wochen noch keine Kolonien in einem Ansatz zu entdecken, so wurde dieser verworfen.

UC-MSC:

Umbilical cord multipotent stromal cells (UC-MSC) wurden direkt aus gespendeten Nabelschnüren der Frauenklinik des Uniklinikums Düsseldorf gewonnen. Hierzu wurde die Nabelschnüre innerhalb von maximal 24 Stunden nach Geburt wie beschrieben [111] mit PBS gespült und mittels Skalpell zerkleinert. Stücke mit einer Größe von ca. 2*2 mm wurden auf Zellkultur-geeignete Petrischalen überführt und nach 30 min. mit Kulturmedium aus Alpha-MEM (Biochrom) mit 20 % FCS (Perbio, Gibco oder Thermo-Scientific-Hyclone; Logan, Utah, USA) und PSG (Lonza; Köln, Deutschland) überschichtet. Ein Mediumwechsel erfolgte frühestens nach 6 Tagen, bei Detektion auswachsender

Zellen wurden die Gewebestücke manuell entfernt und die adhärennten Stromazellen weiterhin expandiert.

BM-MSK:

Frisches Knochenmark-Aspirat aus dem Beckenkamm von freiwilligen Spendern wurde über die Apherese-Einrichtung des Universitätsklinikums Düsseldorf bezogen. Die mononukleäre Zellfraktion wurde entsprechend dem für Nabelschnurblutzellen beschriebenen Protokoll [62] über Ficoll-Gradienten isoliert und die Zellen ausplattiert, wobei hier als Unterschied ausschließlich Medium aus DMEM mit 20 % FCS + PSG und ohne Zusatz von Dexamethason verwendet wurde. Aufgrund der hohen Frequenz an koloniebildenden Zellen trat hier im Gegensatz das Wachstum nicht in Kolonien sondern flächendeckend auf.

Sowohl Generierung als auch weitere Kultivierung erfolgte für alle Zelltypen unter Standard-Inkubationsbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre, das Passagieren erfolgte entsprechend dem in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Protokoll.

2.1.2 Passagieren von USSC / CB-MSK / UC-MSK / BM-MSK

Die adhärennt wachsenden Zellen teilten sich im Durchschnitt alle 2-3 Tage. Bei einer Dichte (Konfluenz) von über 80 % wurden die Zellen in neue Kulturflaschen überführt.

Hierzu wurden der Mediumüberstand entfernt, die Zellen für kurze Zeit (1-5 min.) mit PBS bei Raumtemperatur vorinkubiert, der PBS-Überstand ebenfalls entfernt und die Zellen mit Trypsinlösung (0,25 % in PBS, Cambrex) dünn überschichtet. Nach Inkubation bei 37 °C im Inkubator für circa 5 min. wurden die Zellen durch Erschütterung (leichte Schläge mit der flachen Hand gegen die Flasche) vollständig abgelöst. Durch sofortige Zugabe von proteinhaltiger Lösung (z.B. DMEM/FCS oder PBS/HSA) wurde das Trypsin abgesättigt, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern. Direkt im Anschluss wurde die Suspension in 50 ml-Röhrchen überführt, gegebenenfalls mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (7 min./550 rcf/4 °C). Nach diesem Waschschrift konnten die Zellen nach Zellzahlbestimmung (siehe Abschnitt 2.1.3) entweder in frischem Kulturmedium aufgenommen und (in der Regel mit einer Dichte von $0,5-1,0 \cdot 10^5$ Zellen/ml bei $0,25-0,30$ ml/cm²) auf neue Flaschen ausplattiert (siehe Abbildung 5), für Experimente eingesetzt oder in speziellem Medium zur späteren Verwendung bei -196 °C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden (siehe Abschnitt 2.1.4).

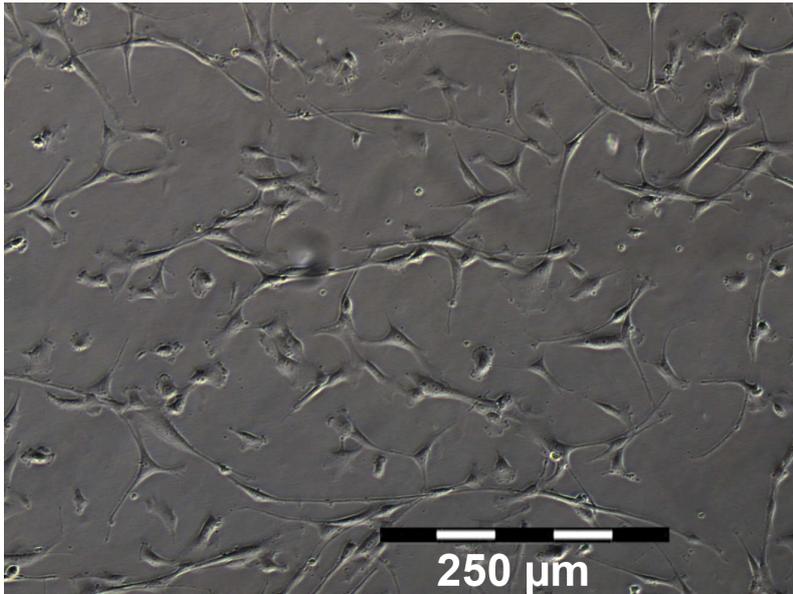


Abbildung 5: Repräsentative Abbildung der Morphologie aus Nabelschnurblut generierter Stromazellen. (12 Stunden nach Passagieren). Alle aus Nabelschnurblut gewonnen Zelllinien wiesen, ebenso wie aus Knochenmark isolierte MSC, eine fibroblastoide Morphologie auf. Als abgelöste, runde Zellen nach Trypsinierung betrug der Durchmesser einzelner Zellen ca. 25 µm; im adhärenen Zustand konnten Längen von über 150 µm gemessen werden

Für UC-MSC und BM-MSC wurde für das Passagieren Trypsin mit einem zusätzlichem Anteil EDTA verwendet (PAA Laboratories; Pasching, Österreich), da diese mit reinem Trypsin teilweise gar nicht oder nur unvollständig abgelöst werden konnten. Umgekehrt erwies sich Trypsin-EDTA für USSC/CB-MSC generell als zu aggressiv und wurde nur in Ausnahmefällen bei stark adhärenen Linien (zumeist in höheren Passagen) verwendet.

2.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Neubauerkammer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer in Verbindung mit einer Trypan-Blau-Färbung zur Bestimmung der Vitalität (tote Zellen werden hierdurch intensiv blau gefärbt). Hierzu wurden 10 µl Probe mit der gleichen Menge Trypan-Blau (Sigma-Aldrich) gemischt und auf die Neubauerkammer gegeben. Nach Auszählung der je 16 Einzelquadrate aller 4 Gruppenfelder (siehe Abbildung 6) konnte die Zellkonzentration bzw. Viabilität mittels der allgemeinen Formel für Zählkammern ermittelt werden:

$$\text{Zellen/ml} = (X/Y) \cdot K_f \cdot V_f$$

Hierbei steht X für die Anzahl der ausgezählten lebenden, respektive toten, Zellen, Y für die Anzahl der ausgezählten Gruppenfelder, V_f für den Verdünnungsfaktor der Probe und K_f für den Kammerfaktor.

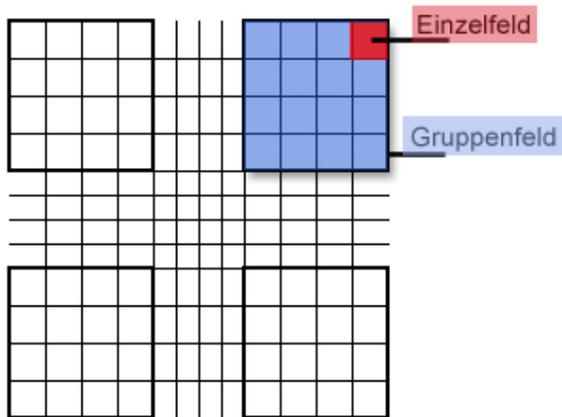


Abbildung 6: Schema der Neubauer-Zählkammer. Für verlässliche Berechnungen sollte die Konzentration zwischen 20 und 200 Zellen pro Gruppenfeld liegen und in allen 4 Gruppenfeldern jeweils vergleichbare Ergebnisse ausgezählt werden.

Mit 4 ausgezählten Bereichen, einem Verdünnungsfaktor von 2 (durch die Trypan-Blau-Färbung) und einem Kammerfaktor von $1 \cdot 10^4$ für Neubauerkammern (das Volumen eines Gruppenfeldes entspricht 1/10.000 Milliliter) ergibt sich für diese Bestimmung die Formel:

$$\text{Zellen/ml} = (X/4) \cdot 2 \cdot 10^4$$

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl musste diese Formel noch mit dem Gesamtvolumen (in Millilitern) erweitert werden:

$$\text{Zellen} = (X/4) \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot \text{Volumen [ml]}$$

2.1.4 Kryokonservierung der Zellen

Für eine dauerhafte Lagerung müssen die Zellen bei einer Temperatur von -196 °C direkt in oder in der Gasphase von flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Hierzu wurden die Zellen nach erfolgter Zählung in speziellem Medium aus DMEM mit 40 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, CryoSure WAK-Chemie; Steinbach, Deutschland) und in für Tiefsttemperaturen geeigneten, sterilen 2 ml-Kryoröhrchen (Greiner Bio-One; Essen, Deutschland) eingefroren. Da DMSO bei Raumtemperatur toxisch auf Zellen wirkt, ist es unbedingt nötig, die Zellen schnellstmöglich nach Zugabe des auf 4 °C vorgekühlten Mediums in die Kryoröhrchen zu aliquotieren und einzufrieren, dabei jedoch wiederum ein Schockgefrieren zu vermeiden. Die ideale Abkühlgeschwindigkeit von -1 °C/min konnte durch Verwendung einer einfachen Pappbox annähernd erreicht werden, in der die Röhrchen in einen -80 °C -Gefrierschrank gestellt werden. Nach 24 Stunden wurden die Proben zur endgültigen Lagerung in den Stickstofftank überführt, in dessen Tiefsttemperatur sämtliche Zellprozesse zum Stillstand kommen und die Zellen theoretisch unbegrenzt haltbar sind.

Obwohl Zellmengen von bis zu $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml auf diese Weise eingefroren werden können, war es für die weitere Verwendung im Labormaßstab praktikabler, Mengen zwischen $1 \cdot 10^6$ bis $3 \cdot 10^6$ pro ml und Aliquot einzusetzen. Für eine potentielle klinische Anwendung hingegen besteht die Möglichkeit, die Zellen in Mengen bis zu $1 \cdot 10^9$ GMP-konform in speziellen Einfrierbeuteln mittels einer rechnergesteuerten, vollautomatischen Einfrieranlage kryokonservieren zu lassen.

2.1.5 Auftauen der Zellen

Beim Auftauen der Zellen ist ebenfalls ein zügiges Arbeiten unabdingbar. Nach Entnahme des aufzutauenden Kryoröhrchens aus der Stickstoff-Lagerung wurde dieses in einem auf 37 °C erwärmten Wasserbad unter Schwenken aufgetaut, bis noch einer kleiner Anteil im gefrorenem Zustand übrig war. Der Inhalt von 1 ml wurde unverzüglich in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen (Greiner) mit vorgelegten 2 ml DMEM + 50 % FCS überführt, nach einer 30-sekündigen Inkubationsphase mit DMEM + 15 % FCS auf 15 ml aufgefüllt und zentrifugiert (7 min./ 550 rcf/ 4 °C). Nach Entfernung des DMSO-haltigen Überstandes konnte das Zellpellet rückgelöst und in dem gewünschten Medium aufgenommen werden.

2.2 Charakterisierung der Stromazellen

2.2.1 Phänotypisierung per Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie („*Flow cytometry*“, FCM) wurde anfänglich an einem „Epics XL“ der Firma Beckman Coulter (Fullerton, Kalifornien, USA) oder einem „Calibur“ der Firma BD Biosciences (Erembodegem, Belgien) mit der installierten Mess/Analyse-Software „CellQuest“ oder später an einem „FACSCanto“ mit der Software „FACSDiva“ durchgeführt (jeweils BD).

Die grafische Darstellung der Ergebnisse in Form von überlagerten Histogrammen („Overlays“) erfolgte mittels der frei verfügbaren Software „WinMDI 2.8“.

Färbung von Oberflächenmarkern mit direkt konjugierten Antikörpern:

Für die Färbung von Oberflächenmarkern der Zellen mit direkt konjugierten Antikörpern (AK) wurden generell nur maximal drei AK gleichzeitig, und zwar markiert mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Phycoerythrin-Cyanin (PE-Cy5), verwendet. Die vom Hersteller angegebene bzw. vorher austitrierte Menge an AK (in der Regel 4-20 μ l) wurde dabei zu der im FCM-Röhrchen (BD

Falcon) vorgelegten Probe ($0,5-2 \cdot 10^5$ Zellen in 50-200 μ l PBS mit 0,5 % HSA) gegeben und bei 4 °C für 30 min. inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen mit 2-3 ml PBS/HSA gewaschen, zentrifugiert (7 min./ 550 rcf/ 4°C) und ungebundener AK zusammen mit dem Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit wenigen Tropfen PBS rückgelöst und am Durchflusszytometer gemessen. Gegebenenfalls konnte das Pellet auch in 200 μ l PBS mit 0,5-2,0 % Paraformaldehyd (PFA; Fischer; Saarbrücken, Deutschland) aufgenommen werden, wodurch die Antikörper-Markierung fixiert wurde und die Zellen bei 4 °C auch für theoretisch mehrere Tage bis zur Messung aufbewahrt werden konnten (praktisch erfolgten alle Messungen innerhalb von maximal 24 Stunden).

Färbung von Oberflächenmarkern mit indirekt konjugierten Antikörpern:

Für AK, die nicht als Konjugat mit dem gewünschten Farbstoff erhältlich waren, war eine indirekte Färbung über einen zweiten, gegen den ersten AK gerichteten und mit einem Farbstoff konjugierten AK nötig. Da in der Regel alle verwendeten primären AK monoklonale Maus-AK waren, wurde hier ein FITC- oder PE-konjugierter F(ab')₂ goat-anti-mouse-(GAM-)AK (Beckman Coulter Immunotech; Marseille, Frankreich) benutzt. Die Färbung mittels des ersten Antikörpers erfolgte wie bereits für direkt-konjugierten AK beschrieben, jedoch wurde im Anschluss eine weitere Färbung mit 1 μ l des GAM-AK durchgeführt. Nach erneutem Inkubieren, Waschen, Zentrifugieren und Resuspendieren konnten auch diese Proben am FCM analysiert bzw. mit PFA fixiert werden.

Intrazytoplasmatische Färbung:

Die zuvor beschriebenen Vorgehensweisen für direkt- bzw. indirekt-konjugierte AK waren nur bei der Untersuchung von Oberflächenmarkern der Zellen anwendbar. Sollten Marker im Zellinneren nachgewiesen werden, so war eine Permeabilisierung der Zellmembran nötig. Dies erfolgte vorab mittels des Permeabilisierungs-kits „Cytifix/Cytoperm“ von BD Biosciences nach Angaben des Herstellers durch eine 15-minütige Inkubation der Zellen in 2 ml der CytoPerm-Lösung, wobei für alle folgenden Waschschrte bis zum Abschluss der letzten Inkubation ein spezieller, saponinhaltiger Puffer („PermWash“) verwendet werden musste, um die Zellen in permeabilisiertem Zustand zu halten.

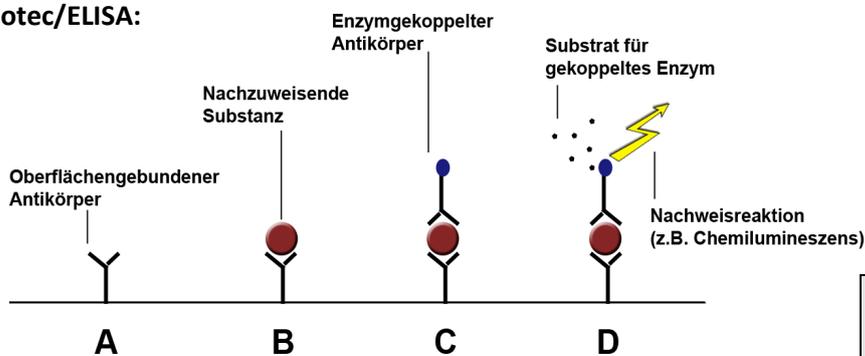
Für jede Bedingung (intra-/extrazellulär sowie jeweils direkt-/indirektkonjugiert) wurden entsprechende Isotypkontrollen angesetzt. Sofern bekannt, wurden für Mehrfachfärbungen zusätzlich stark-positive Marker zur Einstellung der Kompensation mitgeführt, für Stromazellen beispielsweise CD29-FITC und CD13-PE.

In der Regel lagen die (geräte- und probenabhängigen) Kompensationswerte für FITC bei ca. 0,5-1,0 % der Stärke des PE-Signales, während umgekehrt das Signal für PE um 25-35 % der Intensität des FITC-Signals reduziert werden musste.

2.3 Zytokinbestimmung

Zur Bestimmung der exprimierten bzw. sezernierten Zytokine wurde konditioniertes, zellfreies Medium (in der Regel nach einer Kulturzeit von 3-7 Tagen) von verschiedenen Zelllinien und Passagen gesammelt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Analyse erfolgte mittels des RayBiotec *Human Cytokine Arrays* (ermöglichte die Untersuchung von 79 bzw. 174 verschiedenen Zytokinen pro Probe) sowie Bestimmung ausgewählter Zytokine durch *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA; bis zu 80 verschiedene Proben pro ausgewähltem Zytokin) bzw. Luminex-Analysen (bis zu 100 verschiedene Zytokinen pro Probe). Sowohl das RayBiotec-Assay als auch das ELISA basieren auf membrangekoppelter Retention der nachzuweisenden Substanzen und anschließender Markierung durch einen enzymgekoppelten Antikörper, während das Luminex-System auf Prinzipien ähnlich der Durchflusszytometrie fundiert (siehe Abbildung 7).

RayBiotec/ELISA:



Luminex:

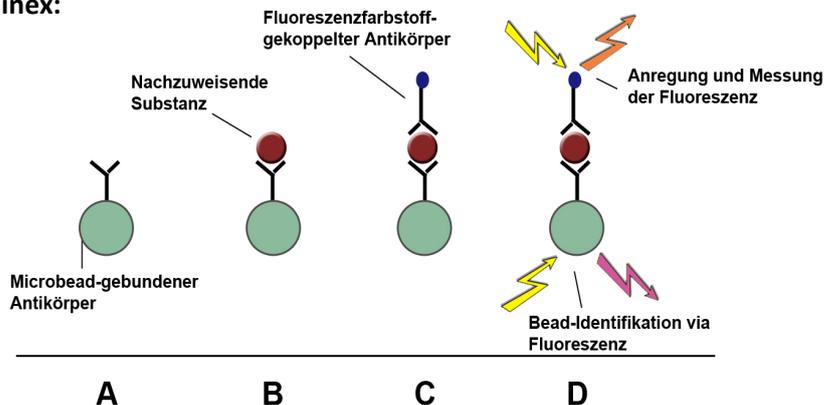


Abbildung 7: Vergleich Prinzip RayBiotec-Array, ELISA und Luminex. Alle drei Methoden basieren auf Antikörperbindungen zur nachzuweisenden Substanz. Bei RayBiotec- als auch ELISA-Assay erfolgt dies an einer Oberfläche gebunden durch Nachweis einer enzymatischen Reaktion. Beim Luminex-System erfolgt dies gebunden an spezifisch markierte Microbeads und über Fluoreszenzmessung, wobei bis zu 100 verschiedene Beads in einer Probe kombiniert werden können.

2.3.1 RayBiotec Human Cytokine Array

Das RayBiotec „Human Cytokine Array V“ (RayBiotec Inc, Norcross, USA) diente für ein erstes Screening der von verschiedenen Stromazellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark in den Überstand sekretierten Zytokine. Hierbei konnten bei einem benötigten Probenvolumen von 1 ml auf einer einzelnen Membran 79 Zytokine gleichzeitig getestet werden. Die zu untersuchenden Proben wurden dabei zuvor während des normalen Mediumwechsels der Zellkultur nach je 5-7 Tagen entnommen und bis zur Analyse bei –80 °C gelagert. Zur Analyse wurden die Überstände aufgetaut, nach dem Protokoll in Tabelle 1 analysiert und mittels Erfassung der Chemilumineszenz durch fotoempfindlichem Film detektiert (siehe Abbildung 8). Aufgrund der teilweise sehr unterschiedlichen Detektionsgrenzen (von 1 bis 100.000 pg/ml) und der rein visuellen Auswertung war nur eine semi-quantitative Aussage über die Konzentrationen der jeweiligen Zytokine möglich.

Tabelle 1: Protokoll des RayBiotec Human Cytokine Array.	
Schritt	Zeitdauer
Überschichtung der Membran mit 2 ml <i>blocking buffer</i>	30 min
Entfernung <i>blocking buffers</i> und Überschichtung mit 1 ml Probe	1-2 h
Dreimaliges waschen mit 2ml <i>wash buffer</i> I	3 * 5 min
Dreimaliges waschen mit 2ml <i>wash buffer</i> II	3 * 5 min
Zugabe 1 ml Bioting-konjugierter Antikörper	1-2 h
Dreimaliges waschen mit 2ml <i>wash buffer</i> I	3 * 5 min
Dreimaliges waschen mit 2ml <i>wash buffer</i> II	3 * 5 min
Zugabe 2 ml HRP-konjugiertes Streptavidin	30-60 min
Dreimaliges waschen mit 2ml <i>wash buffer</i> I	3 * 5 min
Dreimaliges waschen mit 2ml <i>wash buffer</i> II	3 * 5 min
Start der Nachweisreaktion durch Inkubation mit Detektionslösung (500 µl <i>detection buffer</i> C und 500 µl <i>detection buffer</i> D)	5 min
Platzieren der feuchten Membran in a) Fotokammer mit lichtempfindlichem Film, anschließend Entwicklung des Filmes (Durchführung ausschließlich in Dunkelkammer) b) Chemilumineszenz-Detektor	1-20 min

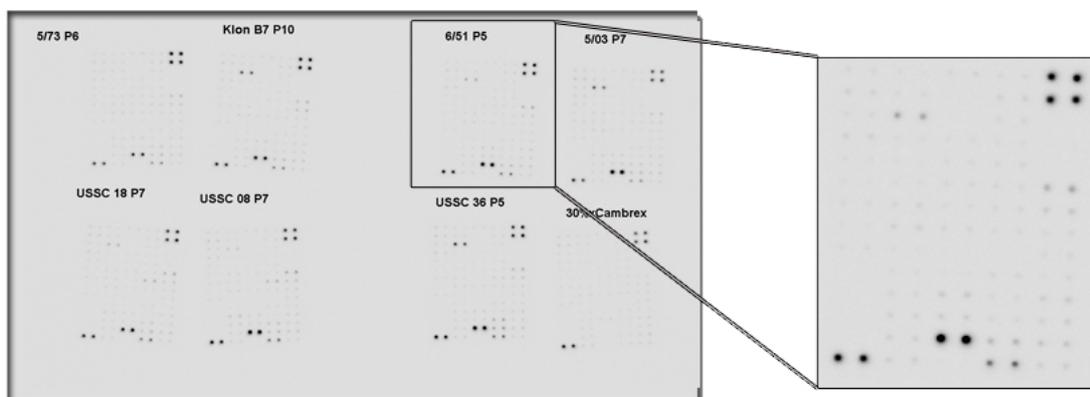


Abbildung 8: Ergebnisbeispiel RayBiotec Human Cytokine Array. Nach Start der Nachweisreaktion konnte emittierte Chemilumineszenz durch fotoempfindlichen Film mit angepasster Belichtungszeit von wenigen Sekunden bis hin zu einigen Minuten detektiert werden. Mehrfache interne Positiv- und Negativkontrollen auf den Membranen (oben rechts, unten links) dienten als Referenz.

In späteren Versuchsreihen wurden Überstände 7 verschiedener USSC bzw. CB-MSK nach 3 Tagen sowie eine entsprechende DMEM/FCS-Kontrollen mittels des „Human Cytokine Array C Series 2000“ untersucht, welches 3 Membranen und ein Spektrum von insgesamt 174 Zytokine umfasste. Auch hier wurde analog dem Protokoll in Tabelle 1 gearbeitet, die Detektion erfolgte hingegen elektronisch mittels eines Chemilumineszenz-Detektors (LAS-3000 Transiluminator/Imaging System; FujiFilm, Tokio, Japan). Die digital gespeicherten Bilder wurden bei dieser Auswertungsmethode im Anschluss für jeden einzelnen Messpunkt („dot“) mit Hilfe der ImageQuant TL-Software (GE Healthcare; Buckinghamshire, UK) densitometrisch analysiert und so eine verfeinerte, semi-quantitative Aussage getroffen.

2.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration im Überstand per ELISA wurden ausschließlich vorgefertigte kits der „Quantikine“-Serie von R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers, wobei die zu verwendenden Probenmengen und/oder Inkubationszeiten teilweise zwischen den verschiedenen zu testenden Zytokinen variierten; Tabelle 2 zeigt das generelle Protokoll hierzu.

Gemessen wurden alle Ansätze als Doppelbestimmung an einem Microplatten-Reader (Model 680; Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) bei 450 nm gegen 570 nm als Referenzwellenlänge.

Tabelle 2: Protokoll ELISA-Zytokinbestimmung.	
Schritt	Details
Vorbereitungen	Herstellung der Verdünnungsreihe des Eichstandards (i.d.R. in 1:2-Schritten). Herstellung des Waschpuffers aus entsprechendem Konzentrat mit Aqua dest.
Erster Inkubationsschritt	200 µl Standard bzw. Probe pro Well. 2h Inkubation bei Raumtemperatur.
Waschen	4x mit je 400 µl Waschpuffer pro Well spülen.
Zweiter Inkubationsschritt	200 µl Konjugat (Emzymgebundener polyklonaler Antikörper) pro Well.
Waschen	4x mit je 400 µl Waschpuffer pro Well spülen.
Vorbereiten Detektionspuffer	Herstellen des Detektionssubstrates aus gleichen Anteilen der Lösung A und B.
Start der Chemilumineszenz-Reaktion	Inkubation mit 200 µl Detektionspuffer pro Well für 20 min. bei Raumtemperatur. (Vor Licht geschützt).
Stop der Chemilumineszenz-Reaktion	Zugabe von 50 µl Stop-Lösung pro Well, Mischen durch leichtes Schütteln.
Erfassen / Auswerten	Messung innerhalb von 30 min. bei 450 nm (Referenzwerte bei 540 oder 570 nm) mittels Microplate reader.

2.3.3 Luminex Multiplex bead system

Ausgewählte Zytokine wurden in bei der normalen Zellkultur anfallenden Überständen während des Passagierens der Zellen mittels Luminex LX 100 IS mit Softwareversion 2.2 bestimmt (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA). Alle verwendeten Kits stammten von BioSource International (Camarillo, Kalifornien, USA) und wurden entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet; die Messung erfolgte durch einen eigens angereisten Vertreter der deutschen Niederlassung analog dem Protokoll in Tabelle 3.

Tabelle 3: Protokoll Luminex-Zytokinbestimmung.	
Schritt	Details
Vorbereitungen	Herstellung der Verdünnungsreihe des Eichstandards (in 1:2-Schritten) Ansetzen der <i>capture-beads</i> , spülen der 96-Well-Platten mit Waschpuffer Zugabe von 50 µl <i>capture beads</i> und 200 µl Waschpuffer pro Well. Spülen und erneute Zugabe von 200 µl Waschpuffer.
Erster Inkubationsschritt	50 µl Inkubations-Puffer mit 100 µl Standard bzw. 50 µl Probe+ 50 µl Verdünnungspuffer pro Well. 2h Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln unter Bewegung.
Waschen	2x mit je 200 µl Waschpuffer pro Well spülen.
Zweiter Inkubationsschritt	Zugabe von 100 µl biotiniertem Zweitantikörper pro Well. 1h Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln unter Bewegung.
Waschen	2x mit je 200 µl Waschpuffer pro well spülen.
Markieren mit Fluoreszenzfarbstoff	Inkubation mit 100 µl PE-konjugiertem Streptavidin pro Well für 30 min. bei Raumtemperatur unter Bewegung.
Waschen	3x mit je 200 µl Waschpuffer pro Well spülen. 1x mit 100 µl Waschpuffer pro Well 2-3 min. schütteln.
Erfassen/ Auswerten	Messung via Luminex-Plattform.

2.4 Isolierung CD34-positiver hämatopoietischer Stammzellen

Die Isolierung der hämatopoietischen Stammzellen aus CB erfolgte mittels *magnetic activated cell sorting* (MACS). Hierzu wurden analog zur Generierung der USSC im ersten Schritt die mononukleäre Zellfraktion via Ficoll-Gradient isoliert und residuelle Erythrozyten durch Ammoniumchlorid-Lyse entfernt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels des CellDyn, anschließend wurden CD34-positive Zellen unter Verwendung des „CD34 MicroBead kit“ (Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach, Deutschland) über positive Selektion (LS-Säulen/MidiMACS-Magneten; Miltenyi Biotech) nach Protokoll des Herstellers isoliert (siehe Tabelle 4).

Nach Ermittlung der Gesamtzellzahl an isolierten Zellen in der Neubauerkammer und durchflusszytometrischer Untersuchung der Reinheit durch Färbung gegen CD45 und CD34 ergaben

sich in der Regeln Mengen von $0,5 - 3 \cdot 10^6$ CD34⁺-Zellen pro aufgearbeitetem Blut bei einer Reinheit von 80-95 %.

Tabelle 4: Protokoll der CD34-Isolation via magnetic activated cell sorting (MACS).

Schritt	Details
Inkubation Erstantikörper (30 min.)	Je 1×10^8 MNC: 100 µl Fc-Rezeptor-Block 100 µl anti-CD34-Hapten-Antikörper 300 µl PBS + 0,5 % HSA (PBS-H)
Waschen	10-20 ml PBS-H Zentrifugation 7 min / 550 rcf / 4 °C Resuspension
Inkubation Zweitantikörper (30min.)	Je 1×10^8 MNC: 100 µl anti-Hapten-konjugierte MicroBeads 400 µl PBS-H
Waschen	10-20 ml PBS-H Zentrifugation 7 min / 550 rcf / 4°C Resuspension
MACS-Isolation	Spülen der LS-Säule im Magnethalter mit 3 ml PBS-H Aufnehmen der Zellen in 1 ml PBS-H und Überführung auf die Säule Nach kompletten Durchlaufen der Probe 3x mit je 3 ml PBS-H spülen Elution nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld mit 5 ml PBS-H unter Verwendung des Druckkolbens Das komplette Eluat wird auf eine zweite, ebenfalls direkt zuvor gespülte, Säule überführt und analog der ersten Säule 3x gewaschen. Elution von der zweiten Säule mit 2,5 ml PBS-H
Zellzahlbestimmung	Zählung mittels Neubauer-Kammer / Trypanblau
Reinheitsbestimmung	Analyse im Durchflusszytometer nach Färbung gegen CD45 / CD34

2.5 Bestimmung der Colony-forming units (CFU-assay)

Eine wichtige Aussage über die Qualität eines potentiellen Transplantates bzw. isolierter hämatopoietischer Stammzellen kann anhand des *colony-forming unit* (CFU) assays (auch: „*colony-forming cell assay*“) getroffen werden. Hierzu werden entsprechende Aliquots an Blut oder aufgereinigten Zellen in viskosem, mit Wachstumsfaktoren angereichertem Medium („Methocult H4434“; STEMCELL Technologies, Köln, Deutschland) ausplattiert und nach 2-wöchiger Inkubation die Formation von Kolonien begutachtet.

Die entsprechenden Probenmengen wurden in 160 µl Iscove-Medium (Biochrom) aufgenommen, zu 840 µl Methocult-Medium gegeben und vorsichtig durch zweimaliges, langsames Aufziehen in einer 1-ml Spritze mit 20-Gauge-Kanüle durchmischt. Jeweils 250 µl dieses Ansatzes wurden in 3 wells einer 24-well-Platte gegeben. Die oberste Zeile sowie die beiden äußeren Spalten der Platte wurden, um ein Austrocknen zu vermeiden, mit Aqua dest. befüllt, sodass maximal 4 Probenreihen aufgetragen werden können (siehe auch Abbildung 10).

In diesem Assay wird primär zwischen den roten, Erythrozyten-bildenden CFU-E (bzw. BFU-E; „*Burst-forming unit – Erythrocyte*“, welche morphologisch uneinheitlichere Kolonien bilden und welche im

Rahmen der vorliegenden Arbeit mit CFU-E zusammengefasst wurden) und den weißen Granulozyten- / Monozyten-bildenden CFU-GM unterschieden, seltener (ca. 1:100) sind auch primitivere CFU-GEMM (Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Makrophagen) zu beobachten (siehe Abbildung 9). Da letztere optisch stark einer CFU-E ähneln, zusätzlich aber einen leichten Randbereich mit weißen Zellen aufweisen, ist eine eindeutige Identifizierung, gerade bei hoher Koloniedichte mit teilweiser Überlagerung, oftmals schwierig.



Abbildung 9: Colony-forming unit assay. Nach 10 bis 14 Tagen zeigen sich in CFU-assays hämatopoietische Stammzellen und Progenitoren anhand der von ihnen gebildeten roten (BFU-E/CFU-E; Links), weißen (CFU-GM; Mitte) oder gemischten (CFU-GEMM; Rechts) Kolonien.

2.6 Kokulturen (Direkte oder Transwell-separierte)

USSC bzw. BM-MSC wurden in speziellen, für adhärenz Zellen geeigneten 24- bzw. 6-Well-Platten (Corning Incorporated) angezogen und unter normalen Kulturbedingungen (DMEM + 30 % FCS + PSG; 5 % CO₂, 37 °C) bis zu einer Konfluenz von circa 70-80 % kultiviert. Bei Erreichen dieser Konfluenz wurden die Zellen mit 30 Gy (Gamma-Strahlung, Cobalt-Quelle; Strahlentherapie-Einrichtung der Unikliniken Düsseldorf) bestrahlt. Aufgrund der stark unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der unterschiedlichen Linien musste dies zumeist auf mehrere Tage verteilt werden. Die murine fetale Leberzelllinie AFT024, welche als Vergleich ebenfalls in einigen Versuchen verwendet wurde, wurde unter leicht variierten Bedingungen (20 % anstatt 30 % FCS; 33 °C anstatt 37 °C) herangezogen, speziell die Temperatur war hier zu berücksichtigen, da diese Zellen bei 37 °C bereits in Wachstumsarrest gehen. Frühestens einen Tag und spätestens vier Tage nach Bestrahlung der Feederzellen wurden CD34-positive Zellen aus frischem Nabelschnurblut (nicht älter als 36 Stunden) isoliert, in H5100-Medium („Myelocult“, STEMCELL Technologies) oder DMEM + 30 % FCS + PSG aufgenommen und auf den Wells (nach entfernen des alten Mediums) ausplattiert. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden Analysen zu Zellzahl, Anteil CD34-positiver Zellen und zum Koloniewachstum durchgeführt (siehe Abbildung 10).

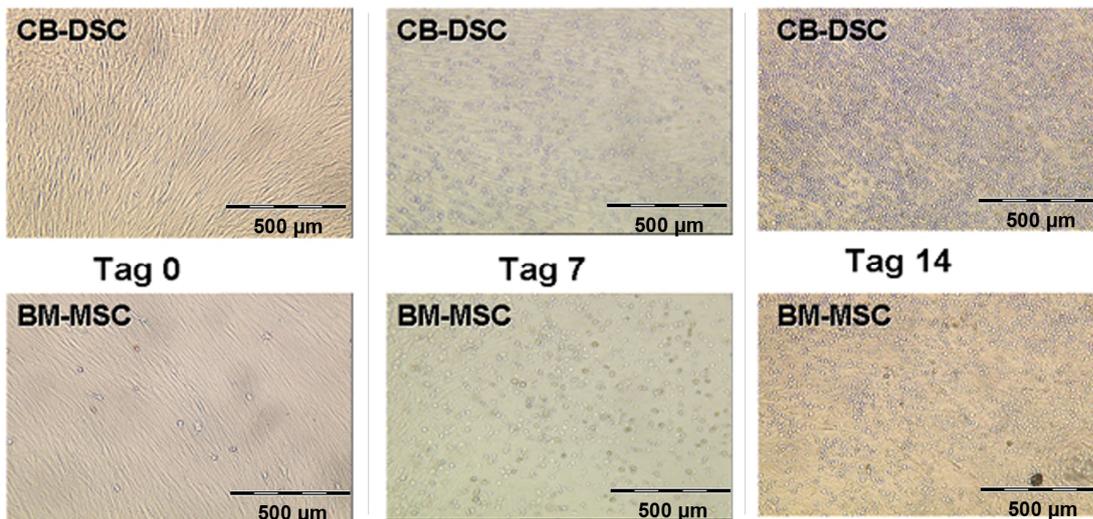
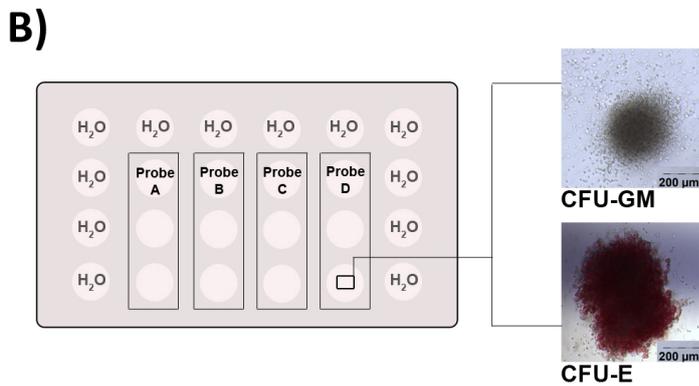
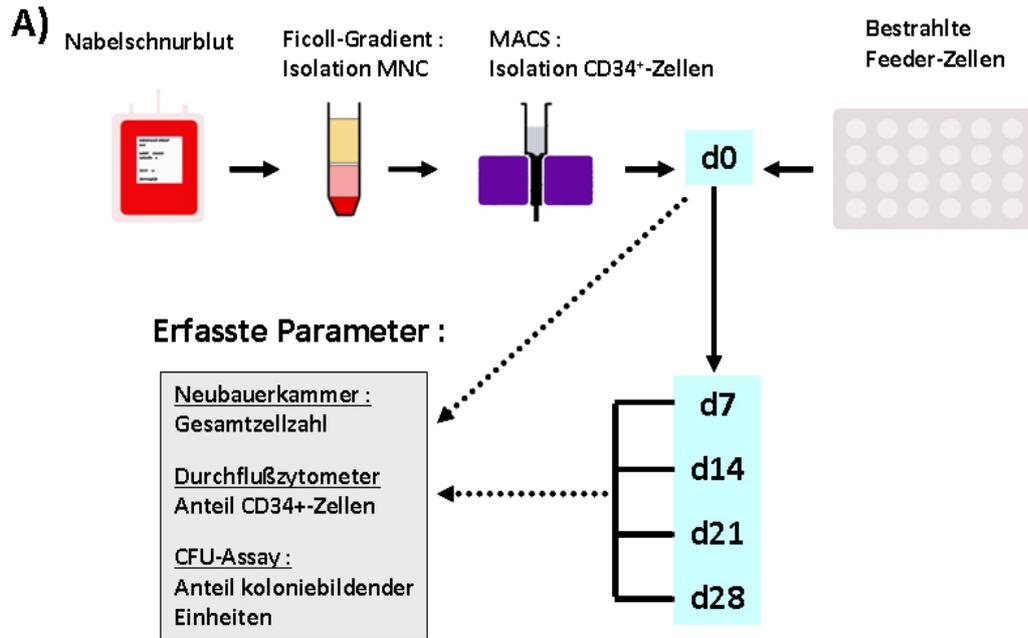


Abbildung 10: Schema Kokulturergebnisse und Colony-forming unit-Assay. A) CD34-positive Zellen aus Nabelschnurblut wurden via MACS aus der MNC-Fraktion nach Ficoll-Dichtegradient isoliert und auf zuvor bestrahlte Feederzellen ausplattiert. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden Gesamtzellzahl, Anteil CD34⁺-Zellen und Anteil koloniebildende Einheiten (CFU) bestimmt. B) Für die Untersuchung koloniebildender Einheiten wurden bis zu 4 Ansätze (verschiedene Proben und/oder verschiedene Konzentrationen) in Reihen zu je 3*250 µl ausplattiert (links). Nach 14 Tagen wurden weiße (CFU-GM, rechts oben) und rote Kolonien (CFU-E, rechts unten) gezählt und entsprechende der ausgesäten Zellzahl für die Proben rückgerechnet. C) Die Expansion der ausplattierten Zellen konnte bereits mikroskopisch deutlich verfolgt werden.

Je nach Versuch und Größe der Wells wurden dabei 5.000-50.000 Zellen pro vorbereitetes Well entweder direkt auf die bestrahlten *Feeder*-Zellen oder, bei indirekter Kokultur, in das zuvor eingehängte Transwell-Insert (1 μm Porengröße; Corning, Incorporated, siehe Abbildung 11) gegeben.

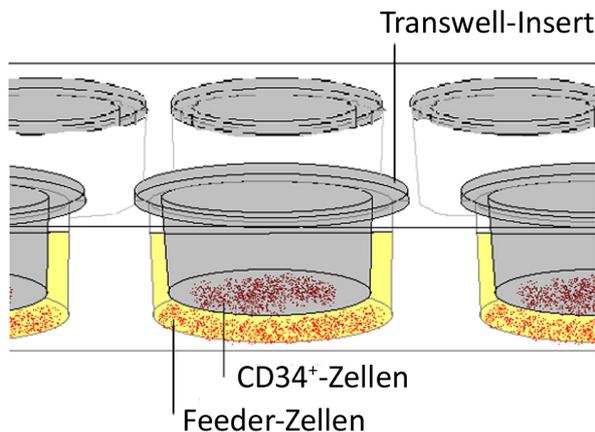


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Transwell-separierten Kokultur. Nach Vorbereitung des Feeders durch Bestrahlung wurden Transwell-Inserts mit einer Porengröße von 1 μm eingesetzt und die frisch isolierten hämatopoietischen Progenitorzellen im Inneren des Inserts ausgesät

2.7 Tierversuche mit NOD/SCID- und Nacktmäusen

Non-obese diabetic / severe combined immuno-deficiency (NOD/SCID)-Mäuse (Charles River Laboratories; Wilmington, Massachusetts, USA) sind das aktuell am besten geeignete Modell zur Untersuchung der hämatopoietischen Rekonstitution *in vivo* [113]. Bis auf wenige, größtenteils verkümmerte NK-Zellen verfügen diese Tiere über keine Lymphozyten, wodurch zum einen transplantiertes Material nicht abgestoßen wird, zum anderen auch das Engraftment der HSC sehr gut verfolgt werden kann. In Kooperation mit externen Partnern wurden für die Versuche zur Hämatopoiese-Unterstützung Stromazellen und CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut entweder allein oder in Kombination injiziert. Hierzu wurden die Stromazellen nach Protokoll mittels Trypsin von der Oberfläche der Kulturflaschen gelöst, gewaschen, gegebenenfalls mit CD34⁺-Zellen vereint und in möglichst geringem Volumen (50-200 μl pro Tier) in einer Spritze aufgenommen. Die Applikation erfolgte im Anschluss, je nach experimentellem Ansatz, intravenös (i.v.) über die Schwanzvene oder intrafemorale (i.f.) in den rechten Femur der anästhesierten, zuvor sublethal (3,25-3,50 Gy) bestrahlten Tiere (siehe auch Abbildung 12).

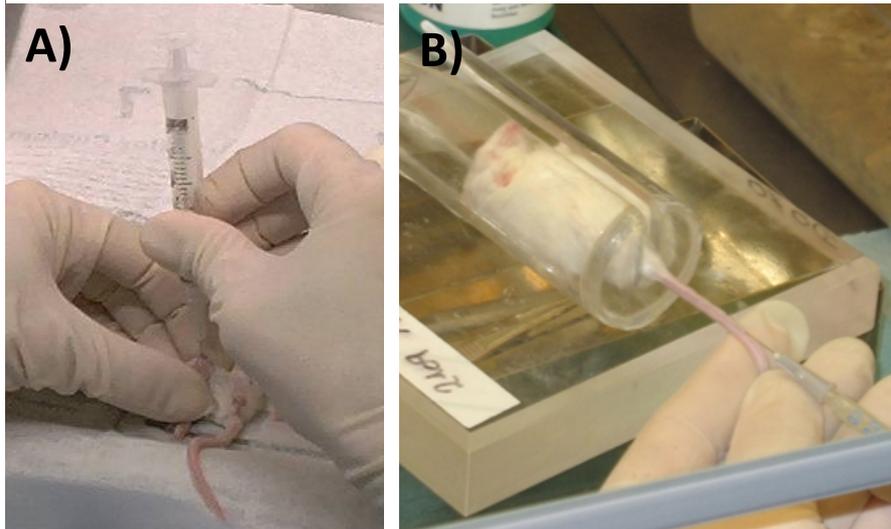


Abbildung 12: Intrafemorale/Intravenöse Injektion in NOD/SCID-Mäuse. (A) Nachdem der Femur bei angewinkeltem Bein mit einer leeren Kanüle angestochen worden war, konnten die Zellen, in maximal 50 μl aufgenommen, über eine frische Kanüle langsam intrafemoral (i.f.) appliziert werden. (B) Die intravenöse (i.v.) Applikation der Zellen (maximal 250 μl Volumen) erfolgte über die Schwanzvene. Nach dem Erwärmen des Schwanzes unter einer Infrarot-Lampe (ca. 0,5-1 min.) wurde die Maus in einer speziellen Vorrichtung fixiert, der Schwanz leicht gespannt und die benötigte Zellmenge (ebenfalls maximal 250 μl) langsam über die Schwanzvene injiziert.

Bis zu 8 Wochen nach Applikation der Zellen wurden die Tiere getötet und Milz, Hirn, Leber, Lunge, Nieren, Herz, Femuren (einer für histologische Untersuchungen, der andere zur Isolation des Knochenmarks) sowie teilweise auch Muskel (Oberschenkel) und gegebenenfalls Stücke vom Injektionsbereich am Schwanz entnommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Für die Tumorigenitätsversuche wurden Nacktmäusen (nu/nu; ebenfalls Charles River Laboratories) Stromazellen (bis zu $5 \cdot 10^7$ Zellen/Tier) subkutan unter die Haut in die Flanke appliziert. Die Tiere wurden anschließend täglich kontrolliert; bei auffälligem Gewichtsverlust bzw. deutlicher Tumorbildung wurden die Tiere getötet und die Organe entnommen. Durch immunohistochemische Analysen wurde diese auf eine eventuelle Beteiligung der applizierten humanen Zellen in der Tumorentstehung untersucht.

2.8 Anfertigung von Gefrierschnitten und Histochemische Färbung

2.8.1 Schneiden mittels Cryomikrotom

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonservierten Organe und Gewebeproben wurden mit einem Gefriermikrotom (Leica CM 1850, Leica Biosystems; Nussloch, Deutschland) zu Schnitten von 8-10 μm Schichtdicke aufgearbeitet. Hierzu wurde das gefrorene, unbehandelte Material nach Angleichen der Temperatur

von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lagertemperatur) auf $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Schneidetemperatur) mittels Einbettmedium (Jung Einbettmedium; Leica Biosystems) auf die dafür vorgesehenen Halter aufgebracht und geschnitten.

Die angefertigten Präparate wurden vorsichtig auf Polylysin-beschichtete Objektträger überführt (Menzel-Gläser; Braunschweig, Deutschland) und auf einer $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Wärmeplatte für circa 10 Minuten getrocknet. Je nach Größe der angefertigten Schnitte wurden dabei 2-8 Einzelschnitte pro Objektträger aufgebracht, aufgeteilt auf den linken und rechten Bereich der Fläche. Die räumliche Trennung in zwei Bereiche ermöglicht es später, bei der histochemischen Färbung sowohl die eigentliche Färbung als auch eine Kontrolle auf einem einzelnen Objektträger durchzuführen. Im Anschluss wurden die Objektträger erneut bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

2.8.2 Immunohistochemische Färbung

Die Färbung zum Nachweis humaner Zellen erfolgte nach einem eigens etabliertem Protokoll unter Verwendung eines Maus-Antikörpers gegen humane Nuklei (MAB1281 anti-human nuclei, Chemicon/Millipore; Schwalbach, Deutschland), des EnVision+-kits auf DAB-Basis (Dako; Glostrup, Dänemark) sowie einer Hämalaun-Gegenfärbung (Carl-Roth; Karlsruhe, Deutschland). Die Färbung erfolgte entsprechend dem selbst etablierten Protokoll in Tabelle 5, wobei sämtliche mit * indizierten Schritte jeweils in geringen Volumen (ca. $50\text{-}100\text{ }\mu\text{l}$) in der Feuchtkammer durchgeführt wurden; alle anderen (Wasch-) Schritte erfolgten im Tauchbad.

Im ersten Schritt wurde eine Fixierung der Schnitte durchgeführt. Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Objektträger wurden hierzu auf einer Wärmeplatte bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5-10 min. getrocknet, anschließend für 5-10 min. in eiskaltem Aceton/Ethanolgemisch (1:1) gebadet und erneut getrocknet. Um unspezifische Färbung durch (speziell bei Milz und Leber) eventuell vorhandene endogene Peroxidase zu verhindern, erfolgte nach kurzem (5 min.) Bad in PBS mit 0,2-0,3 % Tween 20 (PBS-T, Sigma-Aldrich) zur Permeabilisierung der Zellen eine 10-20minütige Inkubation mit „Peroxidase Block“ aus dem EnVision+-kit.

Auf einen anfänglich verwendeten Protein-Block wurde in späteren Analysen bewusst verzichtet, da sowohl bei Verwendung eines kommerziellen Blocks („Protein-Block“, Dako), von 5 % Ziegen-Serum in PBS als auch von 5 % BSA in PBS jeweils der unspezifische Hintergrund annähernd unbeeinflusst blieb, die erwünschte Kernfärbung jedoch teilweise drastisch verringert wurde. Nach Waschen in PBS-T (20 min.) wurde für 1 Stunde mit dem Erstantikörper gegen humane Nuklei (MAB1281; Chemicon/Millipore) 1:100 - 1:200 in PBS + 1 % BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V; Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Mit zwei weiteren Waschsritten zu je 20 Minuten in PBS-T und Inkubation mit dem im EnVision+-kit enthaltenem „Goat-anti-mouse“ Meerrettich-Peroxidase („*Horseradish peroxidase*“, HRP)-konjugiertem Polymer (30 min.) war die Markierung vorhandener

humaner Zellen abgeschlossen. Nach Entfernen des Polymers durch zweifaches Waschen in PBS-T (je 20 min.) konnte diese durch Zugabe des ebenfalls im EnVision+-kit enthaltenen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat der Peroxidase sichtbar gemacht werden, was in einer dunkelbraunen bis schwarzen Färbung der entsprechenden Zellen resultierte.

Tabelle 5: Färbeprotokoll für histologische Schnitte gegen humane Nuklei.

Schritt	Zeitdauer
Trocknen bei Raumtemperatur	30 min.
Fixieren in Aceton/Ethanol (1:1) bei -20 °C	5 min.
Trocknen bei Raumtemperatur	30 min.
Waschen in PBS + 0,3% Tween 20 (PBS-T)	5 min.
Inkubation mit Peroxidase-Block	20 min. *
Waschen in PBS-T	20 min.
<i>Inkubation mit Protein-Block</i>	<i>20 min. *</i>
Inkubation mit Antikörper (MAB 1281) in PBS + 1 % BSA (1:200) bzw. mit PBS + 1 % BSA als Kontrolle	60 min. *
Waschen in PBS-T	2x20 min.
Inkubation mit Peroxidase (HRP)-konjugiertem <i>goat-anti-mouse</i> -Polymer	30 min. *
Waschen in PBS-T	2x20 min.
Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	3-5 min. *
Spülen in Aqua dest.	0,5 min.
Inkubation in Hämalau-Lösung	10-15 min.
Waschen / Bläuen in Leitungswasser	-
Spülen in Aqua dest.	5 min.
<i>Mounting</i>	-

* = Inkubation erfolgte mit geringen Volumen (~ 50-100 µl) in der Feuchtekammer.

Die Farbreaktion verlief äußerst schnell (3-7 min.) und wurde unter dem Mikroskop anhand einer Positiv-Kontrolle (humanem Gewebe) verfolgt, da etwaige makroskopisch sichtbare Braunfärbung unspezifisch sein und somit zu einem vorzeitigem Reaktions-Abbruch durch Abspülen des DAB mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) führen konnte.

Als Gegenfärbung zur Erkennung nicht-humaner Zellen wurden die Schnitte zusätzlich für 15 Minuten in Hämalau (Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland) getaucht und anschließend mit fließendem Leitungswasser gespült („gebläut“). Nach Reinigung der Schnitte durch kurzes Spülen in destilliertem Wasser konnten diese entweder direkt mikroskopisch untersucht und/oder bei Verwendung eines entsprechenden wasserbasierenden Eindeckelmediums (Prolong Gold Antifade; Invitrogen) für längerfristige Zeit gelagert werden („Mounting“).

2.9 Molekularbiologische Untersuchung auf RNA-Ebene

2.9.1 RNA-Isolation

Vor Präparation wurden die Zellen zu Mengen von je $1 \cdot 10^6$ aliquotiert, zweimal mit PBS gewaschen und pelletiert, gegebenenfalls bei -80°C eingelagert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels des RNeasy-Mini-Kits (Qiagen; Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Nach DNA-Verdau und spektroskopischer Konzentrationsbestimmung (Nanodrop ND-1000; Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA) wurde direkt komplementäre DNA (cDNA) via reverser Transkriptase (siehe Abschnitt 2.9.2) hergestellt oder die RNA bei -80°C bis zur Verwendung eingelagert.

2.9.2 Reverse Transkriptase

Die cDNA-Synthese erfolgte durch das SuperScript III-Kit (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) in zwei Schritten in einem „MasterCycler proS“-Thermocycler (Eppendorf). Im ersten Schritt wurde mit Mix 1 (siehe Tabelle 6) für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis für mindestens 1 min. abgekühlt. Nach Zugabe von frisch angesetzttem Mix 2 (20 μl Endvolumen) wurde der Ansatz für 50 Minuten bei 55°C , gefolgt von 15 Minuten bei 70°C , erneut inkubiert und abschließend auf 10°C abgekühlt.

Optional wurde verbliebene RNA durch Zugabe von RNase H (1 μl pro Ansatz; Invitrogen) und Inkubation für 20 min. bei 37°C verdaut. Die hergestellte komplementäre cDNA wurde bis zur Verwendung in der qualitativen RT-(Reverse Transkriptase)-PCR bzw. der quantitativen qPCR (siehe Abschnitt 2.9.3) entweder kurzzeitig bei 4°C oder dauerhaft bei -20°C gelagert.

Tabelle 6: Zusammensetzung der für die reverse Transkription verwendeten Ansätze.

Mix 1:		Mix 2:	
RNA	1 μg	RT-Puffer (5x)	4 μg
dNTP Mix (10 mM)	1 μl	DTT Mix (0,1 M)	1 μl
Oligo(dT)-Primer (50 μM)	1 μl	RNase Out (40 U/ μl)	1 μl
Aqua dest.	10 μl	SuperscriptIII (200 U/ μl)	1 μl

2.9.3 Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR und qPCR)

Für die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Zytokine (ANGPT1, SDF-1, FGF1, IGF2, IGF1BP1 und SCF) wurden entsprechend Primer entworfen (Thermo Scientific, Sequenzen siehe Anhang 2).

Entsprechend dem in Tabelle 7 angegebenem Protokoll wurden in RT-PCR-Ansätzen („Reverse Transkriptase-PCR“) Testreihen zur Bestimmung der idealen *Annealing*-Temperaturen bzw. Magnesiumchlorid-Konzentrationen („9-Punkt-PCR) durchgeführt. Für SDF-1, FGF1, IGF2, IGFBP1 und THPO ergab sich eine optimale *Annealing*-Temperatur von 60 °C, für ANGPT1 und SCF von 55 °C, die optimale Magnesiumkonzentration lag jeweils bei 50 mM. Als Kontrolle wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPH*) als konstitutiv exprimiertes *housekeeping*-Gen verwendet.

Tabelle 7: Pipettierschema und Amplifikationsprogramm der RT-PCR.

Ansatz:

Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
cDNA	1 µl
5'-Primer (10 pM)	1 µl
3'-Primer (10 pM)	1 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Aqua dest.	17,3 µl
Total:	25 µl

Amplifikationsprogramm:

<u>Schritt:</u>		<u>Temperatur:</u>	<u>Zeitdauer:</u>
Initiation		94 °C	120 s
Amplifikation (35 Zyklen)	Denaturierung	94 °C	30 s
	Annealing	55 bzw. 60 °C	30 s
	Elongation	72°C	30s
Finalisierung		72 °C	600 s

Die durch die Amplifikation erhaltenen Produkte wurde im Anschluß mit Ethidiumbromid markiert, bei 170 Volt für 30 min. auf einem 2 %igem Agarose-Gel aufgetrennt und mittels UV-Belichtung dokumentiert (Transilluminator UVT-28M; Herolab; Wiesbach, Deutschland).

Für quantitative Analysen wurden die Proben mittels qPCR („Quantitative PCR“; siehe Tabelle 8) untersucht. Verwendet wurde hierzu SYBR-Green-Mastermix, die Amplifikation/Detektion erfolgte in einem StepOne Plus-Thermocycler (beides Applied Biosystems; Carlsbad, USA)

Tabelle 8: Pipettierschema und Amplifikationsprogramm der qPCR

Ansatz:

SYBR Green-Mastermix	12,5 µl
cDNA	1 µl
5'-Primer (10 pM)	1 µl
3'-Primer (10 pM)	1 µl
Aqua dest.	9,5 µl
Total:	25 µl

Amplifikationsprogramm:

Schritt:		Temperatur:	Zeitdauer:
Initiation		95 °C	60 s
Amplifikation (40 Zyklen)	Denaturierung	95 °C	15 s
	Annealing	55 bzw. 60 °C*	30 s

* Verwendete Annealing-Temperatur siehe Anhang 2

Nach Erfassung der C_t („cycle threshold“)-Werte erfolgte die Berechnung der Expressionsverhältnisse in Relation zu GAPDH als *housekeeping*/Referenz-Gen und in Vergleich zur Expression in fötalen Leberzellen als Positivkontrolle nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode über die allgemeinen Formeln:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ Referenzgen}}, \text{ eingesetzt in}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Probe}} - \Delta C_{t \text{ Kontrolle}}, \text{ wiederum eingesetzt in}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Bzw. umgestellt für diese Versuche:

$$\text{Ratio} = \frac{2^{-(C_t \text{ Gen}_{\text{fötale Leber}} - C_t \text{ Gen}_{\text{Probe}})}}{2^{-(C_t \text{ GAPDH}_{\text{fötale Leber}} - C_t \text{ GAPDH}_{\text{Probe}})}}$$

2.10 Grafische und statistische Auswertung

Die elektronische Verarbeitung und Verwaltung der erfassten Daten erfolgte mittels „Microsoft Excel 2003“.

Für statistische Auswertung und grafische Darstellung wurde „GraphPad Prism 5.01“ verwendet.

Sofern nicht anders angegeben wurde zur Bestimmung einer eventuellen statistischen Signifikanz (p -Wert > 0.005) der two-tailed Student's t-test verwendet.

Zum Beschneiden, zum Überarbeiten und für das Layout-Design erfasster Bilder und Grafiken wurden „Adobe Photoshop 8.01 CS“ und „Microsoft Powerpoint 2003“ genutzt.

3 Ergebnisse

In Folgendem werden die Ergebnisse der verschiedenen Experimente und Untersuchungen, in drei Abschnitte unterteilt, zusammengefasst:

1) Die Beobachtungen zu Unterschieden zwischen stromalen Zelllinien aus Nabelschnurblut (Cord blood-derived stromal cells, CB-DSC) und Knochenmark (Bone marrow multipotent stromal cells, BM-MSC) werden im ersten Abschnitt „Vergleich stromaler Zellen aus Nabelschnurblut (CB-DSC) und Knochenmark (BM-MSC)“ dargestellt. Dies umfasst sowohl die Immunophänotypisierung, Zytokinexpressionsprofile, *in vitro* Kokulturen als auch *in vivo* Versuche in NOD-SCID-Mäusen.

2) Der zweite Abschnitt, „Vergleich Unrestringierte somatische Stammzellen (USSC) und Multipotente Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-MSC)“, behandelt die Ergebnisse zur weiterführende Unterscheidung der CB-DSC in Subpopulationen: a) Unrestringierte somatische Stammzellen (Unrestricted somatic stem cells, USSC) und b) Multipotente Stromazellen aus Nabelschnurblut (Cord blood-derived multipotent stromal cells, CB-MSC). Hierzu wird neben den bereits von unserer Gruppe beschriebenen Diskriminatoren DLK-1- bzw. HOX-Expression auf die Bedeutung des Oberflächenmarkers CD146 eingegangen. Neben Analysen zur Zytokinexpression lag der Schwerpunkt in weiteren *in vitro* und *in vivo* Versuchen zum hämatopoietischen Support bzw. Engraftment als auch zur Tumorigenität dieser Subpopulationen.

3) Im dritten Abschnitt „Vergleich Unrestringierte somatische Stammzellen (USSC) mit Induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), Endodermal differenzierten iPS (Endo-iPS) und Stromazellen aus der Nabelschnur (UC-MSC)“ werden ausgewählte ergänzende Experimente dargestellt, in denen Induced pluripotent stem cells nach endodermaler Differenzierung (Endo-iPS) und direkt aus der Nabelschnur generierte Umbilical cord-derived multipotent stromal cells (UC-MSC) als mögliche Modelle für Zellen der fötalen hämatopoietischen Nische betreffend einer Unterstützung der Hämatopoese untersucht und USSC gegenübergestellt wurden.

3.1 Vergleich stromaler Zellen aus Nabelschnurblut (CB-DSC) und Knochenmark (BM- MSC)

Mit der Etablierung eines Protokolls zur Gewinnung adhärent wachsender, stromaler Zellen mit fibroblastoider Morphologie aus der Fraktion der mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes durch unsere Gruppe im Jahre 2004 [35] stand die generelle Definition dieses neuen, als USSC („*Unrestricted somatic stem/stromal cells*“) bezeichneten, Zelltyps im Vordergrund.

Um Definitionsprobleme mit der später verwendeten Klassifizierung zu vermeiden, wird im Folgenden der Begriff Cord blood-derived stromal cells (CB-DSC) als Sammelbegriff für alle aus Nabelschnurblut generierten, adhärent wachsenden Zelllinien eingeführt. Die primären Analysen der CB-DSC bezogen sich auf die Fragestellung, inwiefern diese den aus Knochenmark gewonnenen multipotenten Stromazellen ähneln bzw. sich von diesen unterscheiden.

3.1.1 Vergleich des Immunphänotyps von Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-DSC) und Knochenmark (BM-MSC)

Die Expression einzelner Oberflächenmarker durch multipotente bzw. mesenchymale Zellen wird in der Literatur kontrovers beschrieben. So konnte bislang kein einzelnes, für MSC spezifisches Antigen auf der Oberfläche identifiziert werden. Allein zum Expressions-Profil (positiver als auch negativer Expression) etablierter Oberflächen-Antigene, kurz als „MSC-Phänotyp“ beschrieben, gibt eine offizielle Stellungnahme der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT; Stand 2006) [114]. Diese definiert MSC durch adhärentes Wachstum auf Plastikoberflächen unter Standard-Kulturbedingungen (37 °C, 21 % O₂, 5 % CO₂, serumhaltiges Medium) und der Fähigkeit zu osteogener, adipogener und chondrogener Differenzierung *in vitro* sowie anhand der positiven Expression der Oberflächenantigene CD73, CD90, CD105 und des Fehlens von CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79b sowie HLA-DR. Die im Folgenden an CB-DSC und BM-MSC durchgeführten Untersuchungen verwendeten ein modifiziertes Profil, bei dem der Nachweis von CD71, CD73, CD90, CD105, CD166 und HLA-ABC sowie der Ausschlusses der Expression von CD31, CD34, CD45 und HLA-DR als Kriterien herangezogen wurden (für eine ausführliche Beschreibung dieser Oberflächenmarker siehe Anhang 3).

CD11b, CD14, CD19 und CD79b im ISCT-Protokoll dienen der zusätzlichen Definition bei einer Verunreinigung mit Leukozyten, welche generell bereits anhand von CD45 festzustellen ist. Diese Aufschlüsselung war für die an unserem Institut durchgeführten Untersuchungen, bei denen der Fokus allein auf der Reinheit der Stromazellen per se lag, irrelevant und somit wurden diese Marker

im modifizierten Protokoll nicht verwendet. Da Endothelzellen im ISCT-Protokoll allein über die Expression von CD34 (auf der Oberfläche von weniger als 20 % aller Endothelzellen nachweisbar) erfasst werden können, wurde zusätzlich der Oberflächenmarker CD31 hinzugefügt, welcher von allen Endothelzellen stark exprimiert wird.

Aufgrund der Korrelation mit Proliferation bzw. Multipotenz/Differenzierung wurden ebenfalls die Oberflächenmarker CD71 und CD166 in die modifizierte Standardanalyse einbezogen.

Generell wiesen, wie in Abbildung 13 beispielhaft dargestellt, alle aus Nabelschnurblut gewonnenen und in der vorliegenden Arbeit verwendeten Linien ($n > 30$) in Bezug auf alle weiteren hier untersuchten Marker ein zu BM-MSC ($n > 20$) identisches Profil auf.

Allgemeiner Immunphänotyp CB-DSC / BM-MSC

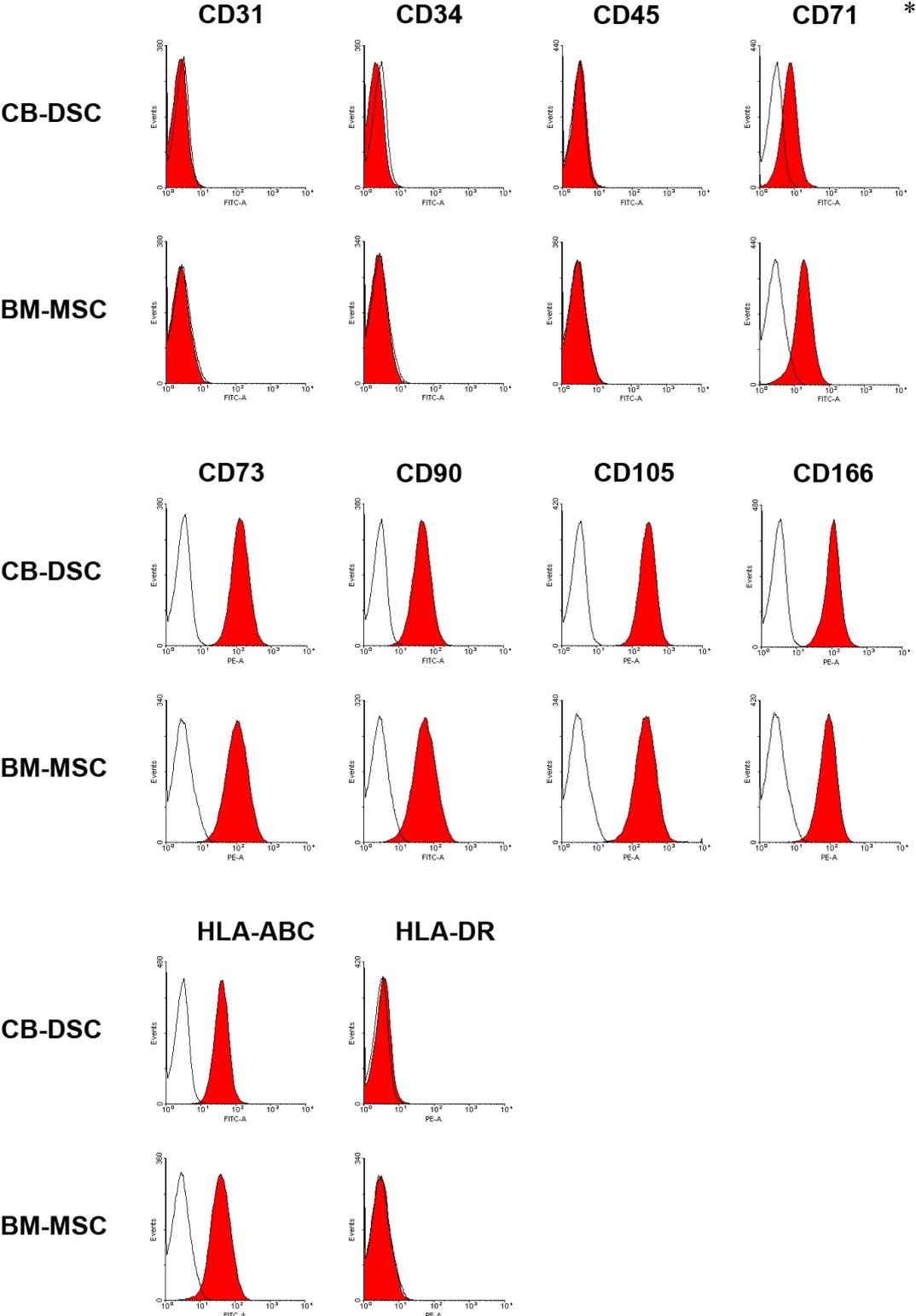


Abbildung 13: Repräsentative Darstellung des „MSC-Immunphänotyps“ von CB-DSC und BM-MSC nach durchflusszytometrischer Analyse. Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression, dargestellt als Overlays (rot gefüllt) gegen entsprechende Isotyp-Kontrolle (keine Farbe). *Sowohl in CB-DSC als auch BM-MSC schwankte die Intensität der Expression des Proliferationsmarkers CD71 zwischen schwach positiv (wie am Beispiel der gezeigten CB-DSC) und deutlich positiv ohne eine Korrelation zu Linie, Passage, Konfluenz oder genereller qualitativer Einschätzung der Zellen.

Nur für die Expression von CD90 (Thymus cell antigen 1, Thy-1) zeigte sich sowohl zwischen verschiedenen untersuchten CB-DSC und BM-MSC als auch innerhalb einzelner Linien zwischen verschiedenen Passagen eine variable Intensität der Oberflächenexpression (siehe Abbildung 14). Die Bedeutung dieser in verschiedenen MSC bestätigten [115] Expressionsschwankungen konnte noch nicht vollständig geklärt werden, gleichwohl diese mit verschiedenen Stimuli, beispielsweise mechanischen Einflüsse [116, 117], in Zusammenhang gebracht wurden.

CD90 (Thy-1)

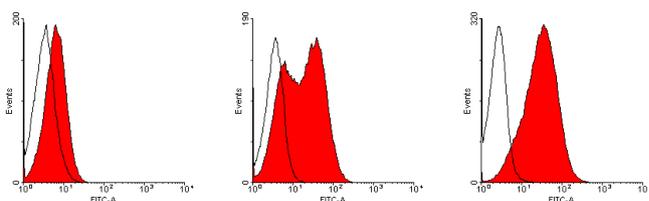


Abbildung 14: Streuung in der Expressionsstärke von CD90 auf CB-DSC. Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression, dargestellt als Overlays (rot gefüllte) gegen entsprechende Isotyp-Kontrolle (keine Farbe). Exemplarische Beispiele einer schwachen (links), in Subpopulationen aufgeteilten (mittig) oder breit gestreuten (rechts) Expression von CD90 in der Durchflusszytometrie.

3.1.2 Zytokinexpressionsprofile von Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-DSC) und Knochenmark (BM-MSC)

Um Unterschiede zwischen CB-DSC und BM-MSC anhand sezernierter Faktoren zu erfassen, wurden in einem ersten qualitativen Screening Überstände auf das Vorhandensein von 79 Zytokinen untersucht (RayBiotech *Human Cytokine Array V*). Die zu untersuchenden Überstände wurden nach 5 (CB-DSC) und 7 (BM-MSC) Tagen Konditionierung gewonnen und die Untersuchungen wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Erfassung der resultierenden Lumineszenz erfolgte mittels photoempfindlichen Filmes bei variierten Belichtungszeiten, um eine rein qualitative Aussage über positiven, schwachen oder negativen Nachweis des entsprechenden Zytokines unter Berücksichtigung der angegebenen Nachweisgrenze zu treffen. Obwohl bei diesem Screening kein qualitativer Unterschied in der Zytokinexpression ausgemacht werden konnte, so bestätigte sich, dass CB-DSC analog zu BM-MSC eine große Anzahl an verschiedenen Zytokinen, speziell Wachstumsfaktoren, beispielsweise *Epidermal growth factor* (EGF), *Hepatocyte growth factor* (HGF) oder *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) in das Medium sezernieren (siehe Anhang 4).

Anhand der beobachteten Expressionen wurde eine Auswahl an vorwiegend für die Hämatopoiese relevanten Zytokinen getroffen, welche mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bzw. Luminex quantitativ ausgewertet wurden. Insgesamt wurden Proben von 19 CB-DSC-Linien und 5

BM-MSC-Linien zwischen Passage 3 (*Cumulative population doublings* CPD < 25) und 10 (CPD > 38) getestet. Während für die meisten der untersuchten Zytokine trotz teilweise höherer Mittelwerte für CB-DSC kein statistisch bedeutender Unterschied zu BM-MSC erkennbar war, konnte für SCF („*Stem cell factor*“; „*kit-ligand*“) und LIF („*Leukemia inhibitory factor*“) jeweils eine signifikant höhere Produktion in CB-DSC aufgezeigt werden (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse und Sensitivitäten ELISA/Luminex.

Zytokin (Methode; Detektionslimit)	CB-DSC [pg/ml] (range)	BM-MSC [pg/ml] (range)	p-Wert
SCF (ELISA; 9 pg/ml)	119.58 ± 20.14 (99.46 - 139.74)	0.43 ± 0.43 (0.00 - 0.86)	0.0104
LIF (ELISA; 8 pg/ml)	113.71 ± 19.35 (94.36 - 133.06)	23.28 ± 20.73 (2.55 - 44.01)	0.0466
GM-CSF (Luminex; 15 pg/ml)	87.41 ± 7.58 (79.83 - 94.99)	112.50 ± 17.49 (95.01 - 129.99)	0.2517
IL-1b (Luminex; 15 pg/ml)	33.69 ± 13.87 (19.82 - 47.56)	13.68 ± 1.26 (12.42 - 14.94)	0.5885
IL-6 (Luminex ; 3 pg/ml)	8617.17 ± 990.00 (7627.17- 9607.17)	12529.50 ± 1842.59 (10687.91 – 14372.09)	0.1679
IL-8 (Luminex ; 3 pg/ml)	1491.62 ± 431.78 (1059.84 - 1923.40)	1692.25 ± 895.52 (796.77 - 2587.77)	0.8700
IL-11 (ELISA ; 8 pg/ml)	457.11 ± 75.57 (381.53 – 532.67)	167.49 ± 136.61 (30.90 - 304.10)	0.1085
IL-12 (Luminex ; 10 pg/ml)	16.28 ± 1.29 (14.99 - 17.57)	15.50 ± 1.50 (14.00 - 17.00)	0.8284
IL-15 (Luminex ; 10 pg/ml)	18.52 ± 0.45 (18.07 - 18.97)	17.75 ± 0.48 (17.27 - 18.23)	0.5387
M-CSF (ELISA; 9 pg/ml)	310.30 ± 54.71 (255.59 – 365.01)	199.74 ± 51.51 (148.23 - 251.25)	0.3774
SDF-1a (ELISA ; 18 pg/ml)	1051.27 ± 237.64 (813.43 – 1288.91)	873.37 ± 148.76 (724.61 - 1022.13)	0.5968
TGF-1b (ELISA; 7 pg/ml)	797.43 ± 78.05 (719.38 – 875.48)	489.49 ± 188.46 (301.03 - 678.05)	0.1164
VEGF (Luminex; 10 pg/ml)	5988.10 ± 1464.74 (4523.36 - 7452.84)	7937.25 ± 2284.12 (5653.13 - 10221.37)	0.6353
G-CSF, THPO, Flt3-L, INFα, TNFα, IL-3, IL-7	< Detektionslimit	< Detektionslimit	

In der quantitativen Analyse ausgewählter Zytokine zeigte sich erneut eine starke Ähnlichkeit zwischen CB-DSC und BM-MSC. Für Stem Cell Factor (SCF) und Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) konnte ein signifikanter ($p < 0.05$) Unterschied nachgewiesen werden.

SCF ist einer der wichtigsten und am längsten bekannten Faktoren zur Regulation des Selbsterhaltes hämatopoietischer Stammzellen [118, 119] und in annähernd jedem Protokoll zur *ex vivo*-Expansion CD34-positiver Zellen vertreten [120]. Dieses Zytokin tritt durch alternatives *splicing* in einer löslichen sowie in einer membranassoziierten Form auf und bindet an die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit (CD117), wodurch eine Vielzahl verschiedener Signalwege (Chemotaxis, Proliferation, Differenzierung und Erhalt) beeinflusst wird [121].

Analog fördert LIF ebenso sowohl den Erhalt [122] als auch, speziell in Kombination mit SCF, die Proliferation muriner bzw. humaner hämatopoietischer Stammzellen [123, 124]. Bei differenzierter Betrachtung der Werte wird deutlich, dass die Werte dieser beiden Zytokine innerhalb der Gruppe der CB-DSC nicht homogen waren (siehe Abbildung 15). Während einige CB-DSC-Linien erhöhte Mengen produzierten, zeigten andere, analog zu BM-MSC, keine oder nur geringe Sekretion des entsprechenden Zytokines.

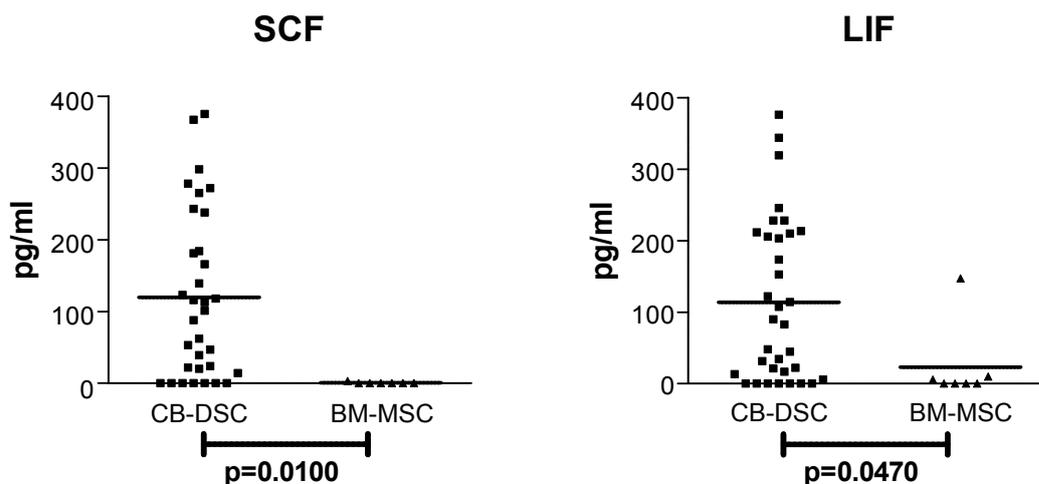


Abbildung 15: Expression von SCF und LIF in CB-DSC und BM-MSC. Während BM-MSC weder SCF noch LIF in detektierbarer Menge produzierten, konnten beide Zytokine teilweise in CB-DSC in höherer Konzentration nachgewiesen werden.

3.1.3 Kokulturen von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut mit Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-DSC) und Knochenmark (BM-MSC)

Speziell die nachgewiesene Produktion von SCF wurde als Hinweis auf eine potentielle Nähe der CB-DSC zur hämatopoietischen Nische und somit der Fähigkeit zur Unterstützung hämatopoietischer Stammzellen gewertet. Um dies zu untersuchen, wurden als Modellsystem Kokulturen [125, 126] von aus Nabelschnurblut isolierten CD34-positiven Zellen auf stromalen Zellen aus Nabelschnurblut bzw. Knochenmark als supportive Feederzellen durchgeführt und die Zellen nach erfolgter Expansion in Bezug auf Gesamtzellzahl, Anteil CD34-positiver Progenitoren und koloniebildende Einheiten analysiert.

Versuch A:

Versuch A	Laufzeit: 35 Tage	Analysierte Wells pro Zeitpunkt: 1	Eingesetzte Zellen d0: $5 \cdot 10^3$ / 24-Well
-----------	-------------------	------------------------------------	---

Für einen Vorversuch wurden als Feeder BM-MSC (n=2 Linien), CB-DSC (n=2 Linien) sowie AFT024 verwendet. Letztere, eine murine fötale Leberzelllinie, wird in der Literatur vielfach in Kokulturen als besonders effektiv in der Unterstützung der Hämatopoese beschrieben [127] und diente daher als Referenzmodell für die fötale hämatopoietische Nische. Als Kontrolle dienten CD34⁺-Zellen in H5100-Medium ohne Feederzellen.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, dass Kokulturen mit CB-DSC für die Gesamtzellzahl, den Anteil CD34-positiver Zellen sowie für die koloniebildenden Einheiten speziell innerhalb der ersten 3 Wochen teilweise deutlich höhere Expansionsraten als BM-MSC erbrachten (siehe Anhang 5a). Die Verwendung von AFT024 als Feederzellen führte zu einem vergleichsweise geringen Expansionseffekt, obwohl diese Zelllinie als Referenz für die *in vitro*-Kokultur hämatopoietischer Stammzellen etabliert ist. Da diese Zellen eine deutlich geringere Größe als CB-DSC/BM-MSC aufweisen, ergab sich bei gleicher Zellzahl eine in Relation geringere Konfluenz der Feederzellen. Um dies als Ursache für die vergleichsweise niedrigere Expansion auszuschließen wurde in weiteren Experimenten mit entsprechend angepassten Zellzahlen gearbeitet. In Ansätzen mit reinem H5100-Medium konnte keine Expansion erzielt werden. Die Gesamtmenge an koloniebildenden Zellen nahm hier konstant ab, ebenso war die durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Anteils CD34-positiver Zellen aufgrund der geringen Zellmengen nicht zu allen Zeitpunkten durchführbar.

Eine statistische Signifikanz zwischen CB-DSC und BM-MSC ergab sich bei der Analyse der zeitkinetischen Expansionswerte (siehe Anhang 5b) ausschließlich für die Expansion der CFU-GM an Tag 14 (CB-DSC 7.99 ± 0.97 -fach gegen BM-MSC 2.65 ± 0.11 -fach; $p = 0,0316$). Für die Gesamtzellzahl war trotz der bis zu 6,5-fach (d21) höheren Mittelwerte aufgrund der Varianz zwischen den beiden verwendeten CB-DSC-Linien zu keinem erfassten Zeitpunkt ein statistisch relevanter Unterschied gegeben. Analog konnte für die je Zelllinie erreichten Maximalwerte ebenfalls nur für die Expansion der CFU-GM ein signifikanter Unterschied (CB-DSC 8.13 ± 0.82 -fach, BM-MSC 4.19 ± 0.25 -fach; $p = 0,0442$) festgestellt werden. Dennoch bestätigte dieser Versuch eindeutig eine Unterstützung der hämatopoietischen Zellen durch stromale Zelllinien aus Nabelschnurblut und ergab einen ersten Hinweis auf unterschiedliche Qualitäten innerhalb der CB-DSC in Bezug auf die Hämatopoese-Unterstützung.

In den darauf folgenden Versuchen (B und C) wurde der experimentelle Aufbau um weitere CB-DSC-Linien sowie Ansätze mit 3 („3Zyt“; Flt3-L, SCF, THPO) bzw. 6 („6Zyt“; Flt3-L, IL-3, IL-6, SCF, THPO, G-CSF) hämatopoietisch aktiven Zytokinen (je 100 µg/ml; R&D Systems) erweitert. Diese Zytokine

wurden ausgewählt, da sie in der Literatur in verschiedenster Kombination bzw. Konzentration zur *ex vivo*-Expansion von HSC beschrieben sind.

Versuche B und C:

Versuch B	Laufzeit: 28 Tage	Analysierte Wells pro Zeitpunkt: 2	Eingesetzte Zellen d0: $5 \cdot 10^3$ / 24-Well
Versuch C	Laufzeit: 28 Tage	Analysierte Wells pro Zeitpunkt: 3	Eingesetzte Zellen d0: $5 \cdot 10^3$ / 24-Well

Wie in Abbildung 16 ersichtlich, führte die Verwendung von Zytokinen zu weit stärkeren Expansionsraten der Gesamtzellzahl (bis zu 970- bzw. 560-fach) als die Kokultur auf den verschiedenen Feederzellen. Hierbei erreichte die Gesamtzellzahl bei Verwendung von 6 Zytokinen ihren Maximalwert jeweils innerhalb von 14 Tagen und fiel anschließend wieder ab. Die Kombination Flt3-L/SCF/THPO zeigte eine langsamere Kinetik, führte jedoch bis Tag 29 zu einem konstanten Anstieg der Zellzahl, welche auch die mit der Kombination aus 6 Zytokinen erreichten Maximalwerte übertraf.

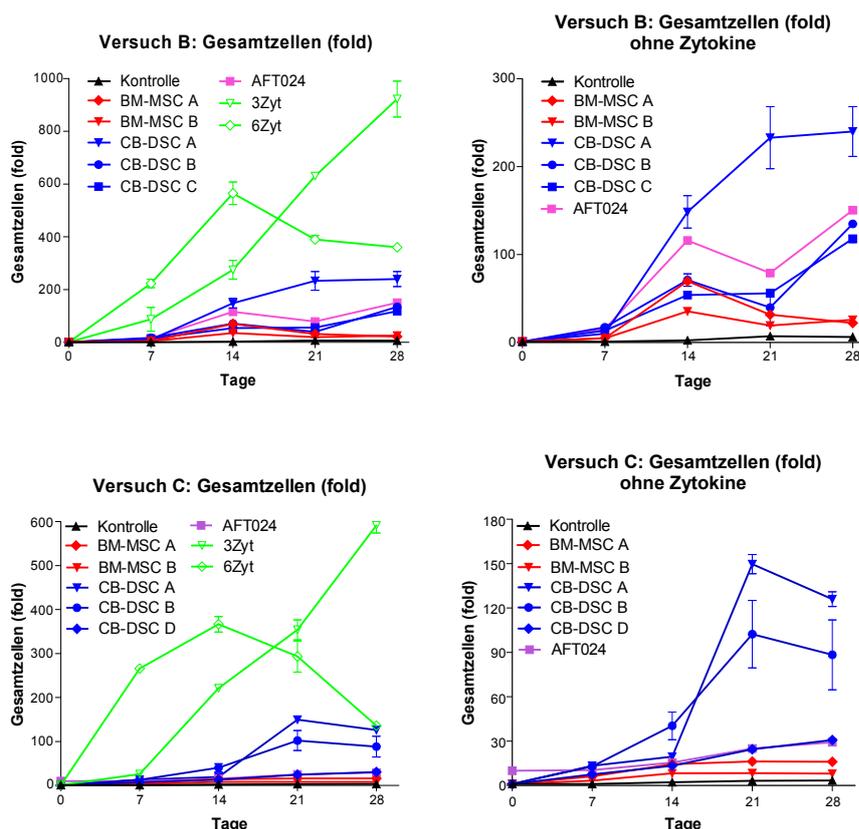


Abbildung 16: Entwicklung Gesamtzellzahlen in der Kokultivierung von CD34-positiven Zellen auf CB-DSC / BM-MSC in Versuch B und C. In beiden Experimenten führte die Verwendung von Zytokinen (grün) jeweils zu der höchsten Expansion der Gesamtzellzahl. Unter den verwendeten Feederzellen bewirkten Stromazellen aus Nabelschnurblut (blau) teilweise eine deutlich stärkere Expansion als Stromazellen aus Knochenmark (rot) und murine fötale Leberzellen (pink).

Bei Auswertung der Kokulturen mit Feederzellen ergab die statistische Auswertung der jeweiligen Höchstwerte für jede Linie weder für die zeitkinetische Entwicklung noch für die Maximalwerte in Versuch B (CB-DSC $164,30 \pm 38,16$ n=3, BM-MSC $52,60 \pm 17,20$, p= 0,1158; siehe Anhang 6a) noch in Versuch C (CB-DSC $94,24 \pm 34,57$ n=3, BM-MSC $12,30 \pm 3,97$ n=2, p= 0,1643; siehe Anhang 6b) einen signifikanten Unterschied. Auffällig war, dass die Linie CB-DSC A in beiden Versuchen zu den höchsten Maximalwerten an Gesamtzellen, CD34-positiven Zellen als auch CFU führte. Die im Vergleich zu Versuch A deutlich höheren Expansionsraten auf AFT024 in Versuch B sind durch eine höhere Konfluenz des AFT024-feeders (~100%) in diesem Ansatz zu erklären. Als Konsequenz führte diese Dichte jedoch zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Ablösens der Feederzellen vom Boden der Zellkulturplatten und somit zum Verlust des entsprechenden Ansatzes. In Versuch C und allen folgenden Ansätzen wurde dies berücksichtigt und für alle verwendeten Zelllinien eine vergleichbare Konfluenz von 85 bis maximal 90% zum Zeitpunkt der Bestrahlung angestrebt. In Bezug auf die Gesamterweiterung CD34-positiver Zellen zeigten sich die höchsten Expansionen ebenfalls bei der Supplementierung mit Zytokinen (bis zu 42- bzw. 93-fach; siehe Abbildung 17).

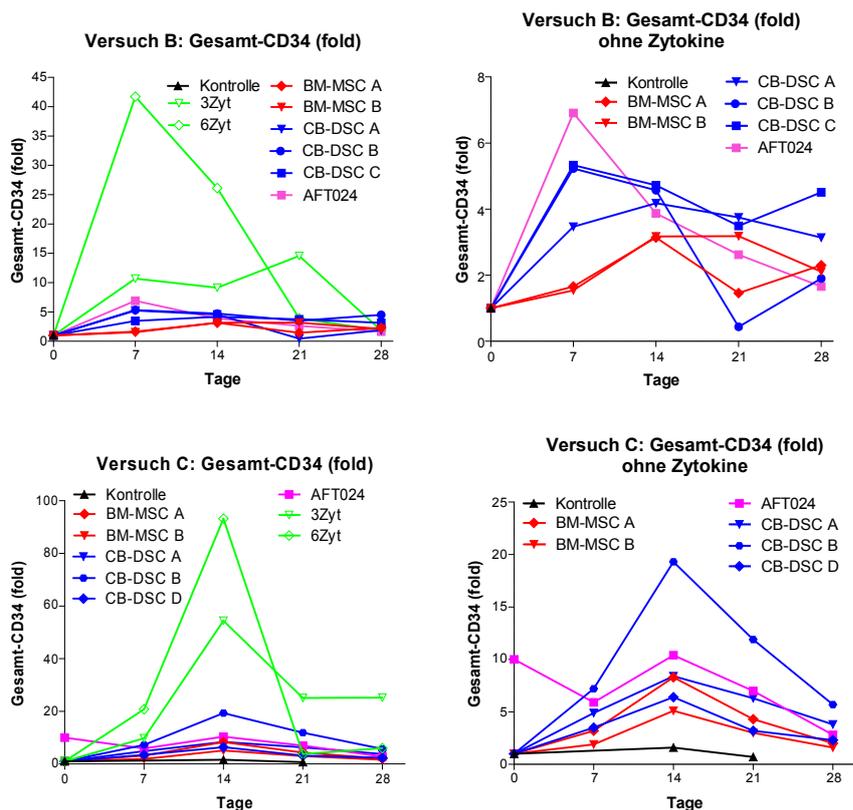


Abbildung 17: Entwicklung CD34-positiver Zellen in der Kokultivierung auf CB-DSC / BM-MSC in Versuch B und C. In beiden Experimenten führte die Verwendung von Zytokinen (grün) auch zu der jeweils höchsten Expansion CD34-positiver Zellen während unter den verwendeten Feederzellen Stromazellen aus Nabelschnurblut (blau) als auch murine fötale Leberzellen (pink) eine tendenziell stärkere Expansion als Stromazellen aus Knochenmark (rot) bewirkten.

Erneut zeigte sich eine tendenziell stärkere Vermehrung auf CB-DSC als auf BM-MSC, vergleichbar zu der auf AFT024. Eine statistische Signifikanz ergab sich dabei in Versuch B für Tag 7 (CB-DSC $4,68 \pm 0,60$ n=3 gegen BM-MSC $1,60 \pm 0,06$ n=2, $p=0,0292$) und 14 (CB-DSC $4,49 \pm 0,16$ n=3 gegen BM-MSC $3,16 \pm 0,02$ n=2, $p=0,0077$) sowie in Bezug auf die maximal erreichten Expansionswerte (CB-DSC $4,91 \pm 0,37$ n=3 gegen BM-MSC $3,16 \pm 0,02$ n=2, $p=0,0342$), jedoch zu keinem Zeitpunkt in Versuch C.

Deutlich zu ersehen war auch in diesen Versuchen der Unterschied innerhalb der CB-DSC: Während Linie D eine zu BM-MSC identische Expansion der Gesamtzellen bewirkte, führte Linie A in beiden Versuchen zu mehr als 5-fach höheren Werten. In reinem H5100-Medium stand zu fast allen Zeitpunkten aufgrund der geringen Zellzahlen nicht genug Material für eine durchflusszytometrische Analyse zur Verfügung. Die in Versuch C an Tag 14 und 21 durchgeführten Messungen deuten jedoch darauf hin, dass hier, wie auch im Vorversuch, innerhalb der ersten 2 Wochen nur ein Erhalt erfolgte.

Abbildung 18 verdeutlicht, dass sich die Gesamtvermehrung der im CFU-Assay ermittelten Progenitoren kongruent zur Expansion der CD34-positiven Zellen verhielt und die zytokingetriebene Expansion in den höchsten Werten (21- bzw. 36-fach) resultierte.

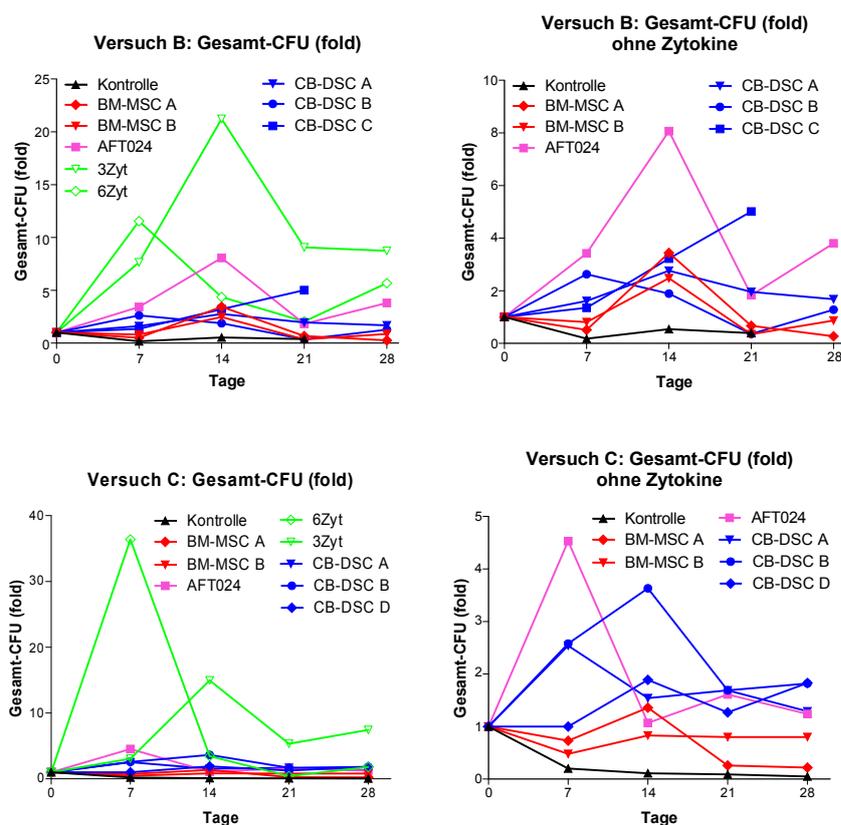


Abbildung 18: Entwicklung koloniebildender Einheiten in der Kokultivierung CD34-positiver Zellen auf CB-DSC / BM-MSC in Versuch B und C. Sowohl in Versuch B als auch in Versuch C führte die Verwendung von Zytokinen (grün) zu der höchsten Expansion koloniebildender Zellen. Unter den verwendeten Feederzellen hingegen konnten tendenziell nur Stromazellen aus Nabelschnurblut (blau) und murine fötale Leberzellen (pink) eine effektive Expansion bewirken, während Stromazellen aus Knochenmark (rot) nur zu einem Erhalt der CFU führten.

Unter den verwendeten Feederzellen führte die Verwendung von AFT024 in beiden Experimenten innerhalb der ersten 14 Tage zu den höchsten Maximalwerten (8,1- bzw. 4,5-fach), wohingegen auf BM-MSC in beiden Versuchen nur an Tag 14 eine Expansion der CFU ($2,96 \pm 0,48$ $n=2$ bzw. $1,10 \pm 0,27$ $n=2$) erreicht wurde (siehe Tabelle 10). CB-DSC führten sowohl in Versuch B (maximal $3,47 \pm 0,77$ $n=3$) als auch Versuch C (maximal $2,69 \pm 0,51$ $n=3$) zu allen untersuchten Zeitpunkten zu einer effektiven Vermehrung (>1 -fach). Bei getrennter Betrachtung der entstandenen weißen Kolonien (CFU-GM), welche als Vorläufer der verschiedenen myeloiden Leukozyten von besonderem Interesse sind, sowie den erythroiden koloniebildenden Zellen (CFU-E), lässt sich sowohl ein Unterschied in der generellen Auswirkung der Expansion (stärkere Vermehrung der CFU-GM als CFU-E) als auch ein Unterschied durch die verschiedenen Feederzellen (Höchste Werte mit AFT024; keine Vermehrung der CFU-E auf BM-MSC) auf diese beiden Untergruppen erkennen (siehe Abbildung 19).

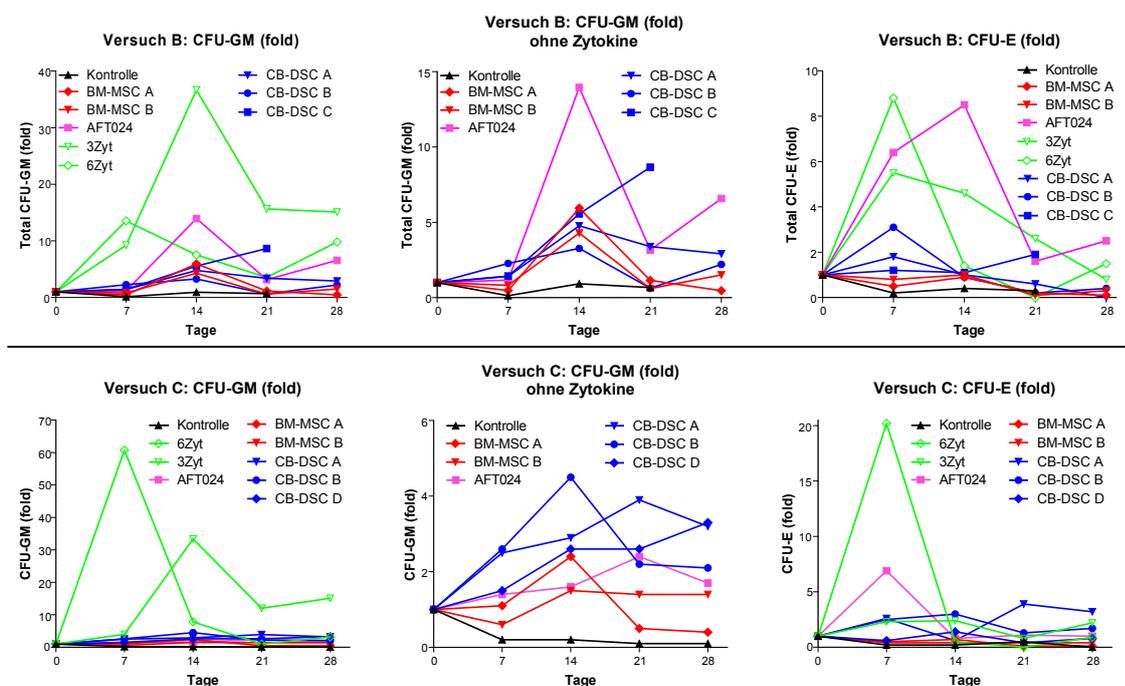


Abbildung 19: Entwicklung weißer (CFU-GM) und roter (CFU-E) Progenitoren in der Kokultivierung CD34-positiver Zellen auf CB-DSC / BM-MSC in Versuch B und C. Bei Unterteilung der koloniebildenden Zellen in rote und weiße Progenitoren lässt sich allein für die verwendeten murinen fötalen Leberzellen (pink) als Auffälligkeit feststellen, dass unter den Feederzellen nur diese zu einer deutlichen, mit der durch Zytokinen erreichten vergleichbaren, Expansion an roten CFU-E führte. Speziell in Versuch C zeigt sich zudem deutlich eine höhere Expansion der CFU-GM auf Stromazellen aus Nabelschnurblut (blau) im Vergleich zu Stromazellen aus Knochenmark (rot).

Die Verwendung von Zytokinen führte innerhalb kurzer Zeit zu den höchsten Expansionswerten, für CFU-GM (maximal 37-fach in Versuch B bzw. 61-fach in Versuch D) lagen die erreichten Werte dabei deutlich höher als für CFU-E (9- bzw. 20-fach). Auf CB-DSC spiegelte sich dieser Effekt ebenfalls

wieder, demnach sich CFU-E ($2,27 \pm 0,42$ n=3 in Versuch B bzw. $2,77 \pm 0,73$ n=3 in Versuch C für die jeweiligen Maximalwerte pro Linie) unter den gegebenen Bedingungen im Verhältnis schwächer anreichern ließen als CFU-GM ($5,56 \pm 1,60$ n=3 in Versuch B bzw. $3,90 \pm 0,35$ n=3 in Versuch C). Die Kokultur auf BM-MSC für CFU-GM wies eine zur Kokultur auf CB-DSC gleichwertige ($5,12 \pm 0,83$ n=2 n=3 in Versuch B, p= 0,8488) bzw. etwas geringere ($1,95 \pm 0,45$ n=2 in Versuch C, p= 0,0398) maximale Expansion auf, allerdings war im Gegensatz hier zu keinem Zeitpunkt eine Vermehrung der CFU-E festzustellen. Die Kokultur auf AFT024 hingegen führte in beiden Versuchen zu den jeweils höchsten Expansionswerten an CFU-E durch Feederzellen (8,5-fach bzw. 6,9-fach). Ebenso führten diese unter den verwendeten Feederzellen in Versuch B zu der höchsten Expansion an CFU-GM (13,9-fach), während die in Versuch C erreichte Expansion (2,4-fach) zwischen den für CB-DSC und BM-MSC ermittelten Werten lag.

Tabelle 10: Übersicht maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen auf CB-DSC gegenüber BM-MSC in Versuch B und C.

Versuch B : Maximale Expansionswerte CB-DSC (C) versus BM-MSC (B)		
Gesamtzellen	CD34⁺-Zellen	CFU gesamt
C: $164,30 \pm 38,16$ n=3 (d28/d28/d28) B: $52,60 \pm 17,20$ n=2 (d14/d14) p= 0,1158	C: $4,91 \pm 0,37$ n=3 (d14/d7/d7) B: $3,16 \pm 0,02$ n=2 (d14/d21) p= 0,0342	C: $3,47 \pm 0,77$ n=3 (d14/d7/d21) B: $2,96 \pm 0,48$ n=2 (d14/d14) p= 0,6652
CFU-GM	CFU-E	
C: $5,56 \pm 1,60$ n=3 (d14/d14/d21) B: $5,12 \pm 0,83$ n=2 (d14/d14) p= 0,8488	C: $2,27 \pm 0,42$ n=3 (d7/d7/d21) B: 1,00 (Keine Expansion) p= 0,1004	

Versuch C : Maximale Expansionswerte CB-DSC (C) versus BM-MSC (B)		
Gesamtzellen	CD34⁺-Zellen	CFU gesamt
C: $94,24 \pm 34,57$ n=3 (d21/d21/d28) B: $12,30 \pm 3,97$ n=2 (d21/d21) p= 0,1643	C: $11,37 \pm 4,01$ n=3 (d14/d14/d14) B: $6,70 \pm 1,60$ n=2 (d14/d14) p= 0,4442	C: $2,69 \pm 0,51$ n=3 (d7/d14/d14) B: $1,10 \pm 0,27$ n=2 (d14/d14) p= 0,1026
CFU-GM	CFU-E	
C: $3,90 \pm 0,35$ n=3 (d21/d14/d28) B: $1,95 \pm 0,45$ n=2 (d14/d14) p= 0,0398	C: $2,77 \pm 0,73$ n=3 (d21/d14/d14) B: 1,00 (Keine Expansion) p= 0,1580	

Wie auch in Vorversuch A führte die große Varianz zwischen den einzelnen CB-DSC-Kokulturen trotz konsequent (bis zu 3-fach) höheren Maximalwerten zu nicht-signifikanten Unterschieden gegenüber der Expansion auf BM-MSC.

Aus den Ergebnissen der Kokulturen in Verbindung mit der beobachteten Produktion von hämatopoietisch aktiven Zytokinen ergab sich die Fragestellung, ob und inwiefern allein von den Zelllinien sekretierte Stoffe für das Wachstum der hämatopoietischen Zellen bzw. den zwischen CB-DSC und BM-MSC beobachteten Unterschiede verantwortlich sind. Hierzu wurde für Versuch D Medium zuvor 3 Tage auf den entsprechenden CB-DSC oder BM-MSC entsprechend der regulären Zellkulturführung (je $3 \cdot 10^6$ Zellen/50ml auf T225-Zellkulturflaschen) konditioniert und analog der vorhergegangenen Versuche für die Expansion CD34-positiver Zellen aus zwei separat isolierten Nabelschnurbluten (CB1 und CB2) eingesetzt, während als Kontrolle erneut unmanipuliertes H5100-

Medium diente. Aufgrund der limitierten Menge an konditioniertem Medium konnte nur mit einem Well/Linie/Zeitpunkt gearbeitet werden.

Versuch D:

Versuch D	Laufzeit: 28 Tage	Analysierte Wells pro Zeitpunkt: 1	Eingesetzte Zellen $d0:2,25 \cdot 10^4$ /24-Well
-----------	-------------------	------------------------------------	--

Wie aus den Graphen in Abbildung 20 zu ersehen ist, wurden bei dieser Anordnung geringere Expansionswerte im Vergleich zu den vorhergegangenen Versuchen erreicht. Trotz rückläufiger Expansion auf BM-MSC an Tag 28 ergab sich bei Betrachtung der zeitlichen Entwicklung zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in Bezug auf Gesamtzellzahl, CD34⁺-Zellen oder CFU (siehe Anhang 7). Im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen zeigte sich für die Gesamtzellzahl eine deutlich geringere Expansion durch konditioniertes Medium im Vergleich zu Ansätzen mit direkter Kokultur, während der Anteil CD34-positiver Zellen und koloniebildender Einheiten annähernd identische Expansionswerte aufwiesen.

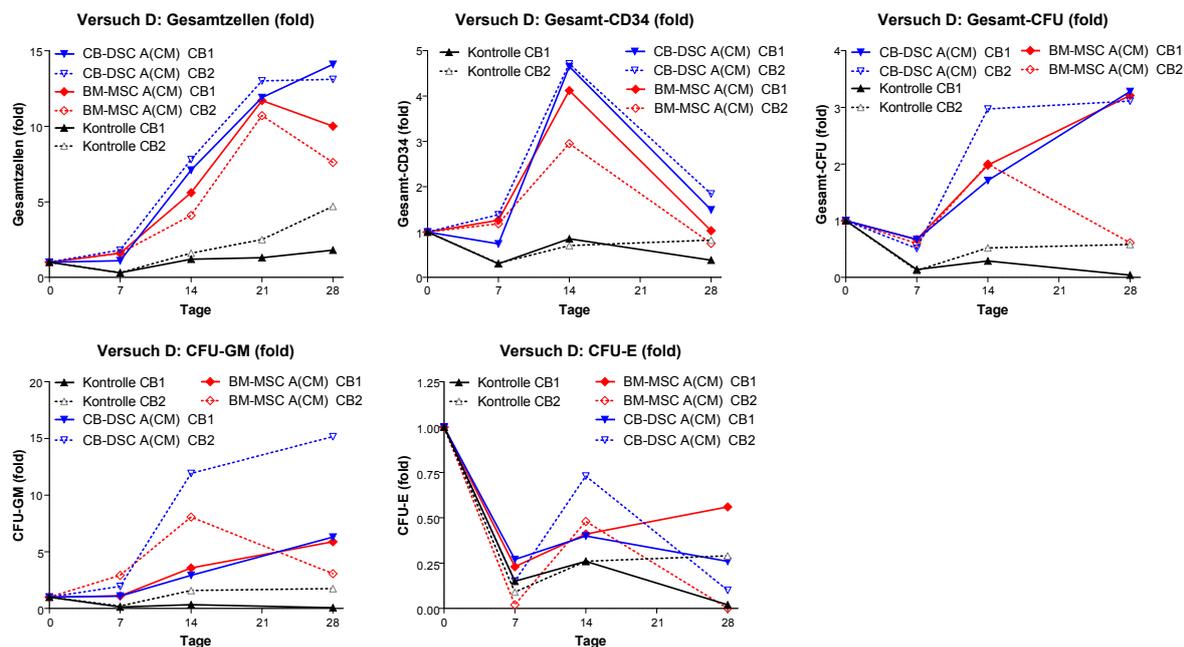


Abbildung 20: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34⁺-Zellen und CFU während der Expansion mittels konditioniertem Medium in Versuch D. Bei Verwendung konditionierten Mediums wurden deutlich geringere Expansionsraten für die Gesamtzellzahl als bei direkter Kokultur erreicht, auch konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verwendung von Stromazellen aus Nabelschnurblut (blau) oder Knochenmark (rot) zur Konditionierung des Mediums festgestellt werden

Für die Maximalwerte (siehe Tabelle 11) konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied für die Konditionierung durch CB-DSC oder BM-MSC in der Expansion der Gesamtzellzahl (maximal $13,60 \pm$

0,50 n=2 auf CB-DCS versus maximal $11,20 \pm 0,50$ n=2 auf BM-MSC, $p=0,0769$), der CD34-positiven Zellen ($4,68 \pm 0,03$ n=2 gegen $3,54 \pm 0,59$ n=2, $p=0,1898$) und der CFU gesamt ($3,20 \pm 0,09$ n=2 gegen $2,61 \pm 0,61$ n=2, $p=0,4361$) bzw. der CFU-GM ($10,73 \pm 4,43$ n=2 gegen $6,98 \pm 1,09$ n=2, $p=0,4975$) festgestellt werden. Für CFU-E ließ sich wie, bereits in den vorangegangenen Versuchen, generell keine Expansion nachweisen.

Tabelle 11: Übersicht maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen mit durch CB-DSC bzw. BM-MSC konditioniertem Medium in Versuch D.		
Versuch D: Maximale Expansionswerte konditioniertes Medium CB-DSC (C) versus konditioniertes Medium BM-MSC (B)		
Gesamtzellen	CD34⁺-Zellen	CFU gesamt
C: $13,60 \pm 0,50$ n=2 (d28/d28) B: $11,20 \pm 0,50$ n=2 (d21/d21) $p=0,0769$	C: $4,68 \pm 0,03$ n=2 (d14/d14) B: $3,54 \pm 0,59$ n=2 (d14/d14) $p=0,1898$	C: $3,20 \pm 0,09$ n=2 (d28/d28) B: $2,61 \pm 0,61$ n=2 (d28/d14) $p=0,4361$
CFU-GM	CFU-E	
C: $10,73 \pm 4,43$ n=2 (d28/d28) B: $6,98 \pm 1,09$ n=2 (d28/d14) $p=0,4975$	C: 1,00 (Keine Expansion) B: 1,00 (Keine Expansion) $p= N/A$	
Außer für die Expansion der weißen koloniebildenden Einheiten (CFU-GM) konnten nur marginale Unterschiede zwischen der Verwendung von CB-MSC- bzw. BM-MSC-konditioniertem Mediums zur Expansion CD34-selektionierter Zellen aus Nabelschnurblut beobachtet werden.		

Aus diesem Versuch ergab sich der Hinweis auf die Notwendigkeit oder zumindest eines positiven Einflusses des Zell-Zell-Kontaktes zwischen hämatopoietischen und Stromazellen. Es blieb zusätzlich einzuwenden, dass bei Verwendung konditionierten Mediums die Versorgung mit Zytokinen (sowohl aufgrund der geringen Konzentration als auch durch die kurze Haltbarkeit) potentiell ein limitierender Faktor ist. Um diese Problematik zu umgehen, wurde ein ergänzender Versuch unter Verwendung so genannter Transwell-Inserts durchgeführt. Hierbei wurden CD34-positiv hämatopoietische Zellen in einer indirekten Kokultur durch Transwell-Einsätze („TW“; Corning; siehe Abschnitt 2.6) mittels einer Membran mit Poren von 1 μm Größe räumlich von den Feederzellen getrennt gehalten.

Versuch E:

Versuch E	Laufzeit: 21 Tage	Analysierte Wells pro Zeitpunkt: 3	Eingesetzte Zellen d0: $4 \cdot 10^4$ / 24-Well
-----------	-------------------	------------------------------------	---

Im Gegensatz zur Verwendung konditionierten Mediums erfolgte so eine konstante Neuproduktion der (gegebenenfalls) relevanten Wachstumsfaktoren. Bei zeitkinetischer Auswertung unter Verwendung des paired t-Tests (jeweils Werte aufsteigend gegenübergestellt;) ergab sich jeweils für die Gesamtzellzahl an Tag 21, für CD34⁺-Zellen an Tag 7, sowie für CFU gesamt und CFU-GM an Tag 7

bzw. 21 ein statistischer Unterschied zwischen direkter und indirekter Kokultur (siehe Abbildung 21 und Anhang 8).

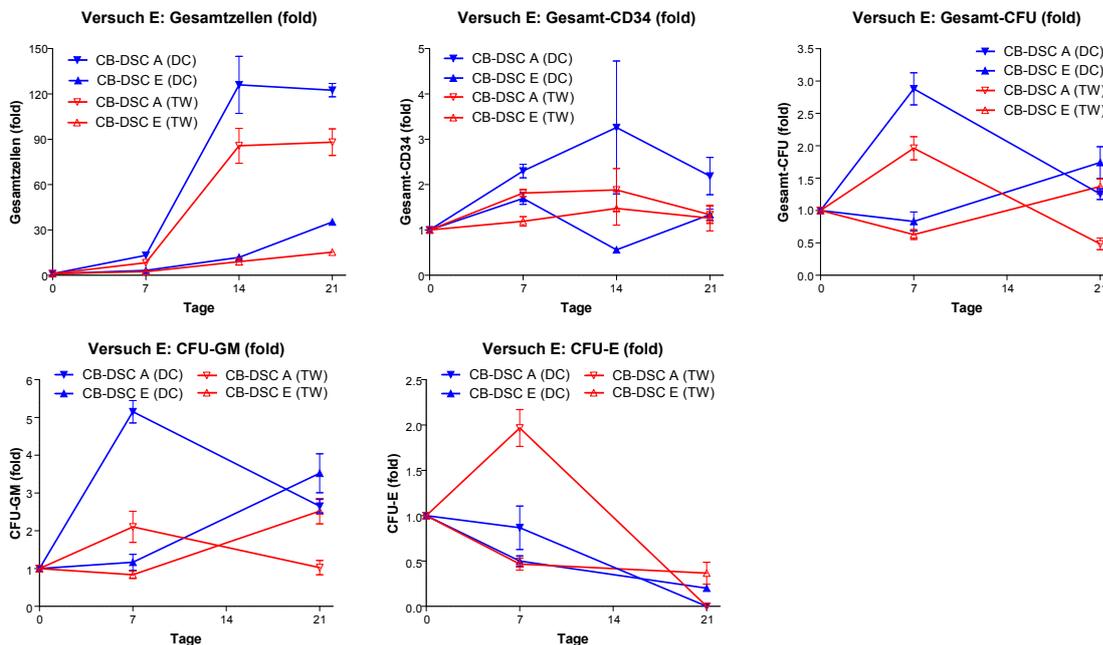


Abbildung 21: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34+-Zellen und CFU bei direkter (DC) und indirekter (TW) Kokultur in Versuch E. Insbesondere für die Expansion der Gesamtzellzahl ergaben sich bei direkter Kokultur (blau) deutlich höhere Werte als bei transwell-separierter indirekter Kokultur (rot). Sowohl für Gesamtzellzahl, den Anteil CD34-positiver Zellen und die Expansion koloniebildender Einheiten zeigte sich zudem ein Zusammenhang mit der verwendeten Feederzell-Linie, wobei die Linie CB-DSC A jeweils zu den höchsten Maxima führte.

Für die maximale Expansion der Gesamtzellen ($80,63 \pm 21,99$ $n=6$ gegen $51,71 \pm 16,74$ $n=6$, $p=0,0050$) sowie der CFU-GM ($4,34 \pm 0,45$ $n=6$ gegen $2,31 \pm 0,26$ $n=6$, $p=0,0079$) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen direkter und indirekter Kokultur ermittelt werden, wobei die direkte Kokultur jeweils zu den höheren Expansionsraten führte (siehe Tabelle 12). Bei einzelner Analyse der verwendeten Linien ergibt sich für die Linie CB-DSC A in Bezug auf die Zellzahl an Tag 7 ($13,17 \pm 1,543$ $n=3$ gegen $8,33 \pm 0,17$ $n=3$, $p=0,0357$) und Tag 21 ($122,50 \pm 4,39$ $n=3$ gegen $88,08 \pm 8,81$ $n=3$, $p=0,0250$), in Bezug auf die CD34-positiven Zellen an Tag 7 ($2,30 \pm 0,15$ $n=3$ gegen $1,81 \pm 0,08$ $n=3$, $p=0,0461$), in Bezug auf die CFU gesamt an Tag 7 ($2,88 \pm 0,25$ $n=3$ gegen $1,96 \pm 0,18$ $n=3$, $p=0,0401$) und Tag 21 ($1,25 \pm 0,08$ $n=3$ gegen $0,48 \pm 0,09$ $n=3$, $p=0,0033$) sowie auf die Unterteilung in CFU-GM an Tag 7 ($5,15 \pm 0,30$ $n=3$ gegen $2,10 \pm 0,41$ $n=3$, $p=0,0039$) und Tag 21 ($2,65 \pm 0,18$ $n=3$ gegen $1,03 \pm 0,19$ $n=3$, $p=0,0033$) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen direkter und indirekter Kokultur zugunsten des potentiell notwendigen Zell-Zell-Kontaktes. Für CFU-E zeigte sich an Tag 7 nur auf dieser Zelllinie und nur in Transwells eine Expansion ($1,97 \pm 0,20$ $n=3$). Bei der parallel verwendeten Linie CB-DSC E fiel der Unterschied zwischen direkter und indirekter Kokultur deutlich geringer und nur für die Gesamtzellzahl an Tag 21 ($35,25 \pm 1,89$ $n=3$ gegen $15,33 \pm 0,98$ $n=3$, $p=$

0,0007) und den Anteil CD34-positiven Zellen an Tag 7 ($1,69 \pm 0,13$ n=3 gegen $1,19 \pm 0,10$ n=3, $p=0,0383$) statistisch relevant aus, auch führte diese Linie zu generell niedrigen Expansionsmaxima.

Tabelle 12: Übersicht maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen in direkter gegenüber indirekter Kokultur in Versuch E.

Versuch E : Maximale Expansionswerte direkte Kokultur (DC) versus indirekte Kokultur (TW)		
Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt
DC: $80,63 \pm 21,99$ n=6 (d14/d21) TW: $51,71 \pm 16,74$ n=6 (d21/d21) p* = 0,0050	DC: $2,48 \pm 0,75$ n=6 (d14/d7) TW: $1,68 \pm 0,28$ n=6 (d14/d14) p* = 0,1932	DC: $2,31 \pm 0,30$ n=6 (d7/d21) TW: $1,67 \pm 0,16$ n=6 (d7/d21) p* = 0,0869
CFU-GM	CFU-E	
DC: $4,34 \pm 0,45$ n=6 (d7/d21) TW: $2,31 \pm 0,26$ n=6 (d7/d21) p* = 0,0079	DC: 1,00 (Keine Expansion) TW: $1,22 \pm 0,35$ n=6 (d7/d7) p* = 0,5616	

p* = Statistische Auswertung mittels paired t-Test, Werte (n=3 pro Linie) je Linie aufsteigend gegenübergestellt.

Sowohl für die Expansion der Gesamtzellzahl als auch den Anteil weißer koloniebildender Einheiten (CFU-GM) ergab die direkte Kokultur signifikant höhere Maximalwerte als die Transwell-separierte Kokultur.

3.1.4 *In vivo*-Experimente mit Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-DSC) in NOD/SCID-Mäusen

Aufgrund der Ergebnisse aus den Kokulturversuchen sowie der nachgewiesenen prinzipiellen Fähigkeit der CB-DSC zur Migration *in vitro* [128] wurden parallel zu den Kokulturrexperimenten *in vivo*-Versuche in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. John E. Dick (University Health Network, Toronto, Kanada) durchgeführt. Hierbei wurden immundefekte NOD/SCID-Mäuse verwendet, welche als Referenzmodell für die hämatopoietische Rekonstitution etabliert sind [113] und in denen bereits ein Effekt durch zusätzliche Applikation von BM-MSC, speziell bei limitierter Anzahl an HSC, beschrieben wurde [129-132]. Nach Injektion der Zellen (CB-DSC und/oder zuvor kryokonservierte CD34-positive Zellen aus CB) wurde nach einer Laufzeit von bis zu 5 Wochen das Engraftment der humanen Zellen im Knochenmark der Tiere mittels Durchflusszytometrie untersucht sowie relevante Organe (Milz, Leber, Niere, Herz, Hirn) immunohistochemisch auf die Anwesenheit humaner Zellen analysiert. Die Applikation der Zellen erfolgte dabei entweder intrafemoral (IF, in den Oberschenkelknochen) und/oder intravenös (IV, über die Schwanzvene).

A) Intrafemorale Applikation

Für den ersten Versuchsabschnitt lag der Fokus auf dem Nachweis einer eventuellen aktiven Migration der CB-DSC nach intrafemoraler Applikation [133, 134]. Vorteil der intrafemoralen gegenüber der intravenösen Applikation liegt in der lokalen Platzierung der Zellen direkt in der hämatopoietischen Nische, wodurch a) die Notwendigkeit einer anfängliche Migration umgangen wird sowie b) eine potentielle Detektion der applizierten Zellen in anderen Organen zu späteren

Zeitpunkten ein Nachweis für eine aktive Migration aus dem injizierten Femur wäre. Die Zellen (Pools aus je 2-3 Linien) wurden in den rechten Oberschenkel zuvor subletal bestrahlter Tiere (3,5 Gy; n=15) verabreicht. Die applizierte Menge variierte dabei von $1 \cdot 10^6$ bis $5 \cdot 10^6$ CB-DSC pro Tier. Im zweiten Teil des Versuches wurden vorab isolierte und bis Versuchsstart kryokonservierte $CD34^+$ -selektierte Zellen zusammen mit CB-DSC in variierter Kombination IF/IV injiziert (4 Tiere erhielten CB-DSC intrafemural und $CD34$ -positive Zellen intravenös sowie je 4 Tiere beides intrafemural bzw. beides intravenös, siehe auch Schema in Abbildung 22. Als Kontrollen dienten sowohl für intravenöse als auch intrafemorale Applikation ebenfalls je 4 Tiere, welche nur $CD34^+$ -Zellen erhielten. Bei diesem Versuch verstarb jedoch ein großer Anteil der Tiere vor Ablauf des Experimentes an Infektionen innerhalb der NOD/SCID-Tierkolonie (2 Kontrolle $CD34^{IV}$; 1 Kontrolle $CD34^{IF}$; 3 $CB-DSC^{IF}+CD34^{IF}$), sodass nur für den Ansatz $CB-DSC^{IV} + CD34^{IF}$ nach 6 Wochen ausreichend auswertbare Tiere zur Verfügung standen.

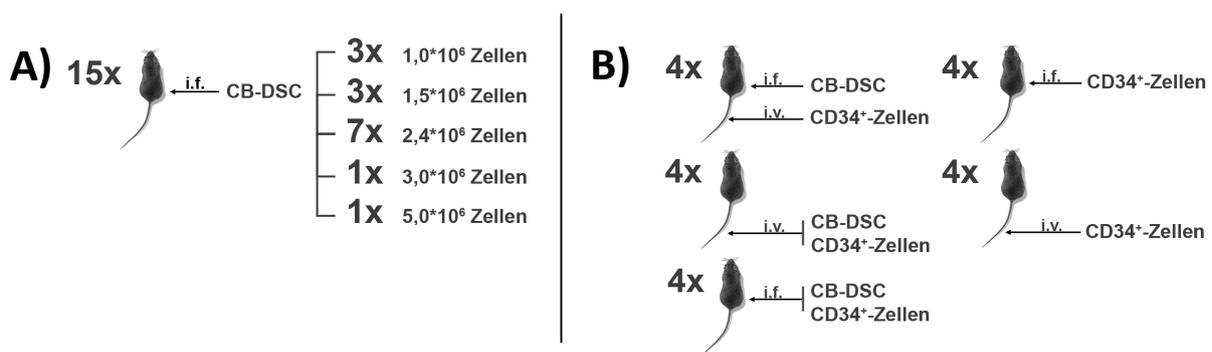


Abbildung 22: Schema intrafemorale/Intravenöse Injektion humaner Zellen in NOD/SCID-Mäuse. (A) Für alleinige intrafemorale Applikation von CB-DSC wurden 15 Tiere mit variierter Zellzahl injiziert. (B) Für die Koinjektion wurden jeweils $5 \cdot 10^4$ $CD34$ -positive Zellen allein oder mit $1 \cdot 10^6$ CB-DSC in verschiedener Kombination i.f. / i.v. in insgesamt 20 Tiere injiziert.

In allen Ansätzen konnte in der durchflusszytometrischen Analyse ausschließlich in den Versuchen mit Beteiligung von $CD34$ -selektierten Zellen humane Zellen (mittels Untersuchung von der Oberflächenexpression von $CD45/CD34$) in Knochenmark detektiert werden. Ebenso konnten auch nur in diesen Tieren humane Zellen (mittels immunohistochemischer Färbung gegen humane Zellkerne) in Milz und Femur (siehe Abbildung 23) sowie teilweise in der Leber nachgewiesen werden.

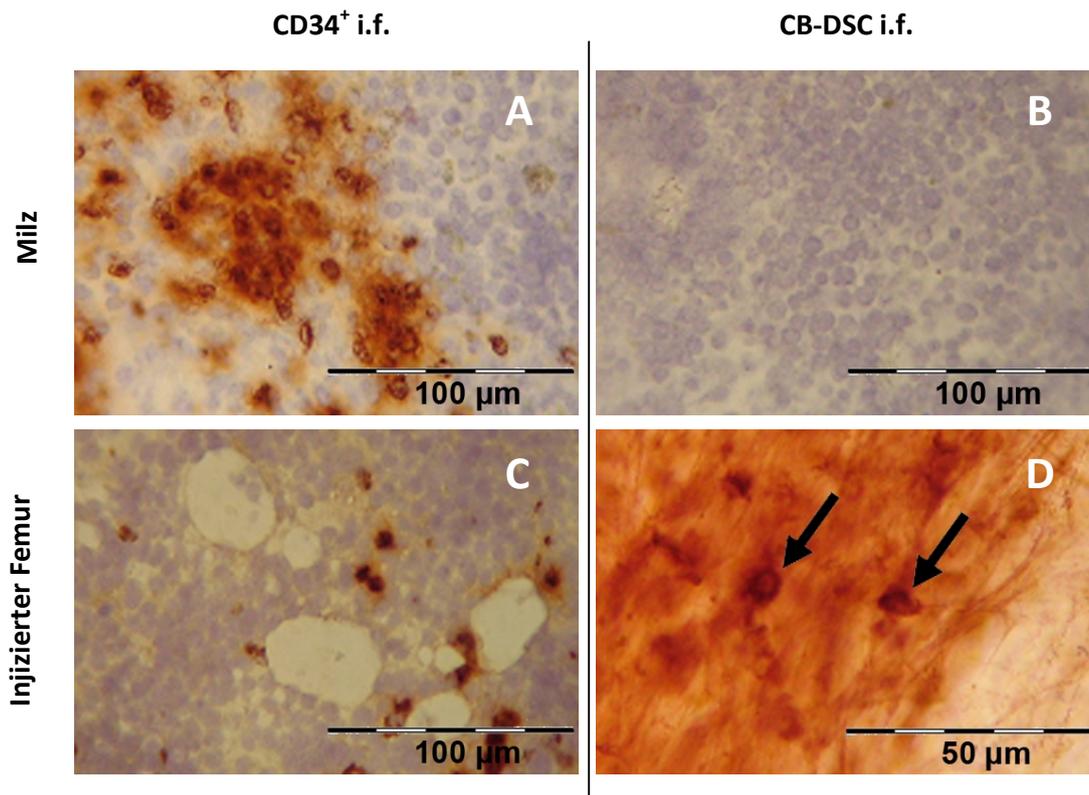


Abbildung 23: Milz und Femur nach intrafemorale Injektion humaner Zellen in NOD/SCID-Mäuse. Mittels immunohistochemischer Färbung (DAB-basierend gegen humane Zellkerne mit Hämalaun-Gegenfärbung) konnten 6 Wochen nach intrafemorale (i.f.) Injektion humane Zellen in der Milz ausschließlich in Ansätzen mit CD34-positiven Zellen (A) beobachtet werden, nicht jedoch bei Applikation von CB-DSC (B). Ebenso waren auch nur nach Injektion CD34-positiver Zellen im Knochenmark des injizierten Femurs humane Zellen deutlich zu detektieren (C) während die Verwendung von CB-DSC zu diffusen Bereichen im Femur führte (D).

Obwohl in der Literatur bei der intrafemorale Applikationsmethode ein generell höheres Engraftment beschrieben ist [135, 136], zeigten bereits bei den Kontrollen nur die beiden überlebende Tiere der IV-Injektion (4,6 und 0,3 %), aber keines der drei IF-injizierten Tiere humane Lymphozyten (definiert über Expression von CD45) im Knochenmark. Ebenso wurde bei den Ansätzen mit zusätzlich verabreichten CB-DSC in der Gruppe CB-DSC^{IF} + CD34^{IV} nur in 2 von 4 Tieren (4,0 und 15,2 %), bei CB-DSC^{IV} + CD34^{IV} nur in 1 von 4 Tieren (0,6%) sowie in der einzelnen überlebenden Maus der Gruppe CB-DSC^{IF} + CD34^{IF} (1,1 %) humane Zellen im Knochenmark detektiert, insgesamt somit in nur 6 von 14 mit CD34-positiven Zellen injizierten Tieren.

Während in keinem der verschiedenen Ansätze humane Zellen in Lunge, Muskel, Hirn oder Herz der Tiere nachweisbar waren, konnte bei jenen mit intrafemorale Applikation von CB-DSC am injizierten Femur eine diffuse Färbung in der Histochemie (nach Permeabilisierung und Färbung gegen humane Zellkerne mittels des Antikörpers MAB1281, siehe auch Abschnitt 2.8) beobachtet werden. Möglicherweise führte hier die lokale Läsion bei der intrafemorale Applikation bereits zu einer

induzierten osteogenen Differenzierung der CB-DSC und somit zu einer Reparatur des Knochens. Aufgrund dieser Ergebnisse und in Anbetracht der extrem niedrigen Rate an Tieren mit nachweisbarem Engraftment wurde von weiteren intrafemuralen Versuchen abgesehen und im Folgenden ausschließlich mit intravenöser Applikation in die Schwanzvene gearbeitet.

B) Intravenöse Applikation

Im anschließenden Versuch wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen einer von 2 CB-DSC-Linien (F und G) sowie $1 \cdot 10^4$ zuvor kryokonservierte CD34-positive Zellen aus Nabelschnurblut jeweils allein bzw. in Kombination miteinander intravenös über die Schwanzvene in zuvor mit 3,5 Gy subletal bestrahlte NOD/SCID-Mäuse injiziert und diese nach 5 Wochen bzw. nach 21 Stunden exemplarisch je ein Tier pro Ansatz analysiert (Schema siehe Abbildung 24).



Abbildung 24: Schema intravenöse Injektion humaner Zellen in NOD/SCID-Mäuse. Als Kontrolle wurden 6 Tiere allein mit $1 \cdot 10^4$ CD34-positiven Zellen injiziert, 10 Tiere erhielten zusätzlich $1 \cdot 10^6$ CB-DSC. Von beiden Gruppen wurden je 2 Tiere 21 Stunden nach Applikation, die restlichen nach insgesamt 5 Wochen untersucht.

In der durchflusszytometrischen Analyse des Anteils humaner Zellen im Knochenmark zeigte sich bei den überlebenden Tieren nach 5 Wochen kein Einfluss durch die zusätzliche Injektion der CB-DSC (7.77 ± 3.08 %; n=7) gegenüber reiner CD34⁺-Applikation (7.90 ± 3.61 %; n=4; p= 0,9796), während nach 21 Stunden in keinem Tier humane Zellen aufzufinden waren.

Bei einzelner Analyse der verwendeten CB-DSC-Linien (siehe Abbildung 25) ließ sich im Gegensatz dazu erkennen, dass CB-DSC F zu einem höheren mittlerem Engraftment (12.57 ± 6.33 %; n=3) als CB-DSC-Linie G (4.16 ± 1.75 %; n=4) führte. Statistisch ergab sich jedoch weder zur alleinigen CD34⁺-Zellinjektion (p= 0,5221) noch zur Verwendung der Linie CB-DSC-Linie G (p= 0,1988) ein signifikanter Unterschied. In Tieren, welche nur CB-DSC erhielten, konnten keine humanen Zellen im Knochenmark detektiert werden.

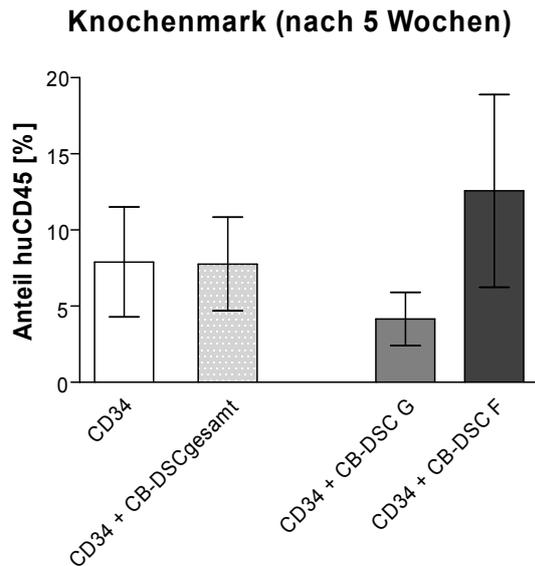


Abbildung 25: Humane Zellen im murinen Knochenmark 5 Wochen nach Injektion humaner Zellen. Während bei gemeinsamer Auswertung der zusätzlich applizierten Zellen kein Einfluss von CB-DSC auf das Engraftment humaner CD34⁺-Zellen in das Knochenmark festzustellen war, zeigte sich bei Einzelanalyse (rechts) ein Unterschied zwischen den beiden zusätzlich injizierten CB-DSC-Linien G und F.

Die immunohistochemische Färbung des Femurs gegen humane Zellkerne bestätigte diese Ergebnisse, insbesondere die negative Nachweise in Tieren ohne CD34⁺-Zellen. In Tieren mit positivem Nachweis zeigte sich, dass humane Zellen dabei lokal konzentriert am Übergangsbereich der Markhöhle (Cavitas medullaris) zum umgebenden Knochenmaterial aufzufinden waren (siehe Abbildung 26).

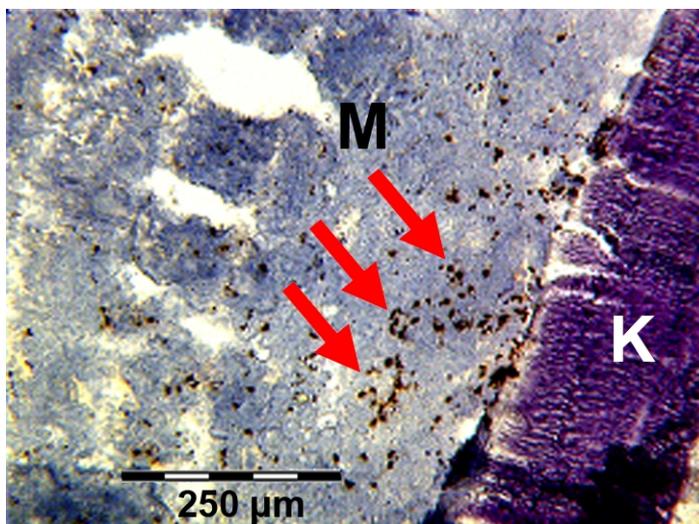


Abbildung 26: Muriner Femur 5 Wochen nach intravenöser Injektion CD34-positiver humaner Zellen. DAB-basierende Färbung gegen humane Zellkerne (MAB1281; dunkelbraun/schwarz) mit Hämalaun-Gegenfärbung. Deutlich war die erhöhte Konzentration humaner Zellen (Pfeile) im Übergangsbereich Knochenmark (M; blau gefärbter Bereich links) zum Knochen (K; dunkel-violett gefärbter Bereich rechts) zu erkennen.

Nur nach Applikation von CD34⁺-Zellen konnten sowohl in der Milz als auch vereinzelt in der Leber geringe Mengen humaner Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 27).

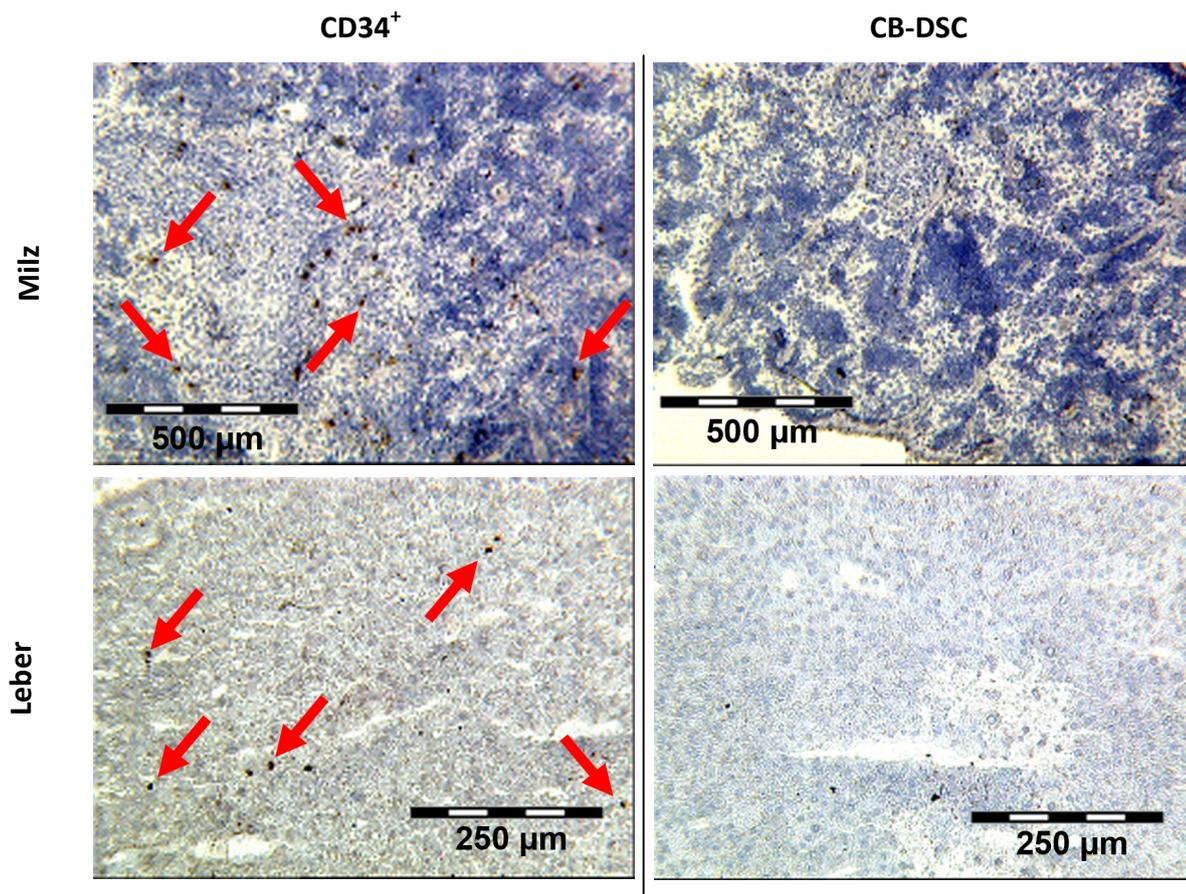


Abbildung 27: Murine Milz und Leber 5 Wochen nach intravenöser Injektion humaner Zellen. DAB-basierende Färbung gegen humane Zellkerne (MAB1281; dunkelbraun/schwarz) mit Hämalaun-Gegenfärbung. 5 Wochen nach Applikation konnten in Milz und Leber humane Zellen in der Immunohistochemie, ausschließlich in Ansätzen mit CD34-positiven Zellen (A, C), beobachtet werden. In Tieren mit ausschließlicher Applikation von CB-DSC konnten weder in Milz (B) noch in Leber (D) humane Zellen detektiert werden.

Unerwartet war der vergleichsweise hohe Anteil humaner Zellen in der Lunge nach Applikation CD34-positiver Zellen, wie in Abbildung 28 dargestellt ist. Während hier humane Zellen auch nach 5 Wochen detektiert werden konnten, zeigten sich nach Injektion von USSC/CB-MSK humane Zellen nur in den Analysen 21 Stunden nach Injektion (n=2). Unklar ist, ob dieses auf einer physikalischen Filterwirkung der feinen Lungenkapillaren oder einem echten *Homing*-Effekt beruht.

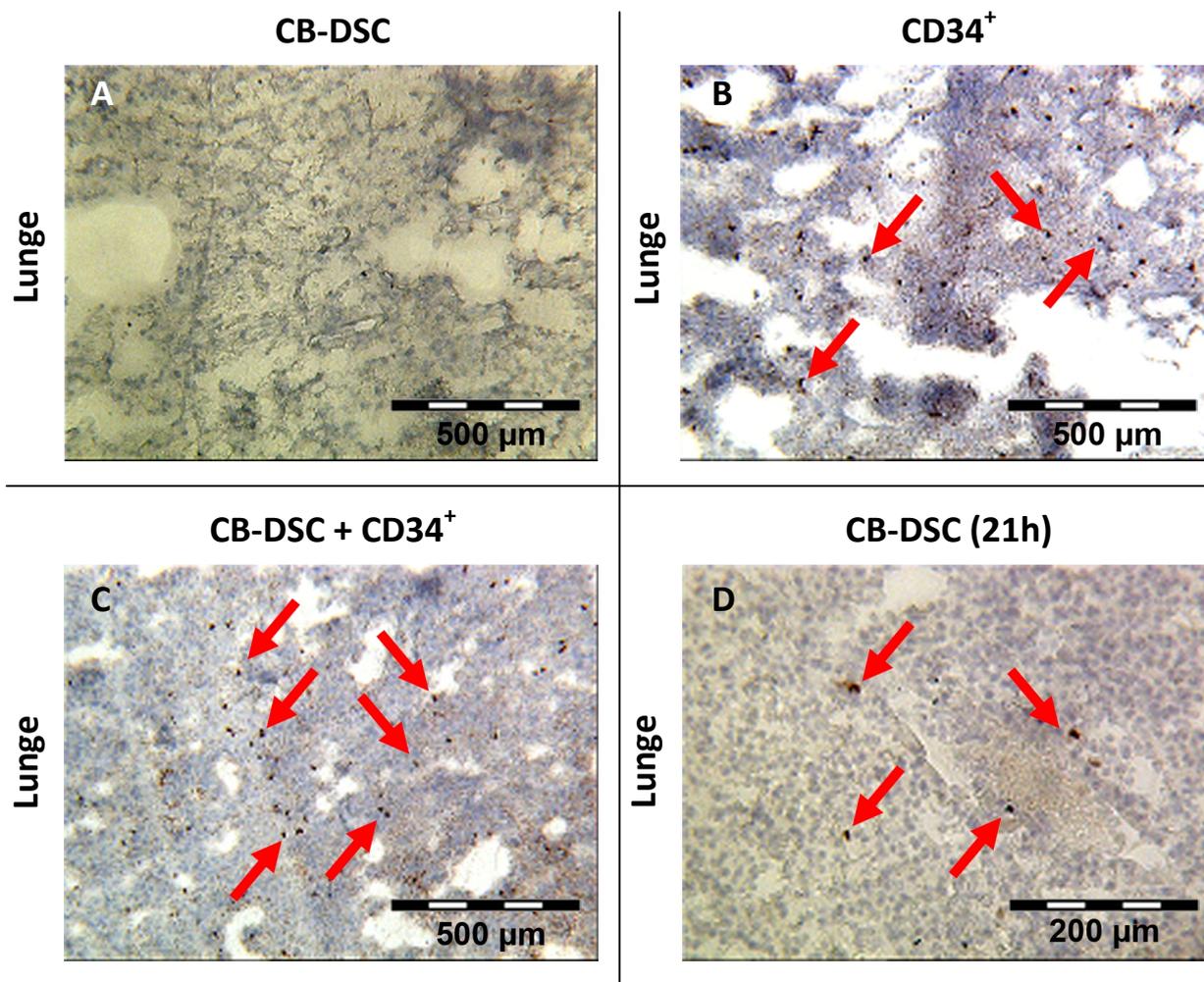


Abbildung 28: Murine Lunge nach intravenöser Injektion humaner Zellen. DAB-basierende Färbung gegen humane Zellkerne (MAB1281; dunkelbraun/schwarz) mit Hämalan-Gegenfärbung. Allein in der Lunge konnten 21h nach Injektion auch in den Ansätzen ohne CD34⁺-Zellen humane Zellen nachgewiesen werden (D), jedoch nicht mehr nach 5 Wochen (A). Bei Injektion von CD34⁺-Zellen (allein oder in Kombination; B und C) hingegen konnten auch nach 5 Wochen teilweise deutliche Mengen an humanen Zellen detektiert werden.

Zusätzlich wurden für jedes Tier Hirn, Niere, Oberschenkelmuskulatur sowie Herz analysiert und waren in allen Fällen negativ (n=16; siehe Abbildung 29).

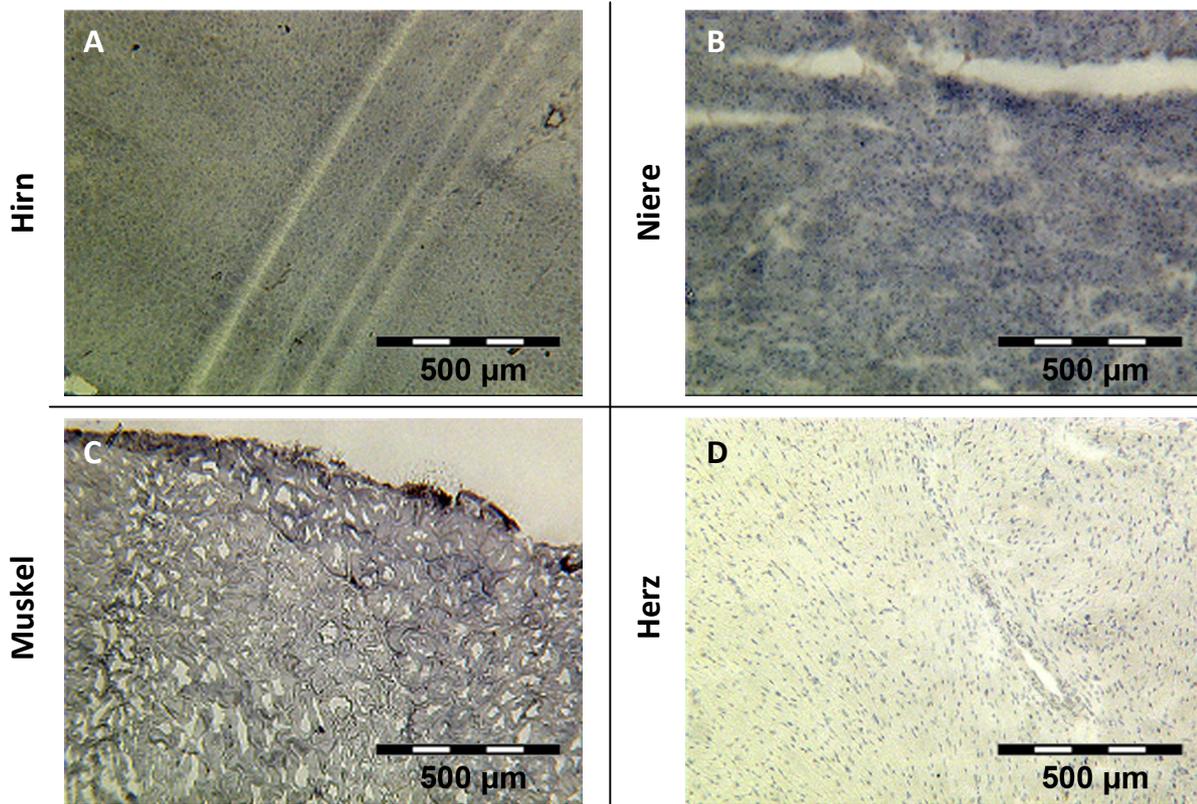
CB-DSC / CD34⁺ / CB-DSC + CD34⁺

Abbildung 29: Weitere untersuchte murine Organe/Gewebe nach intravenöser Injektion humaner Zellen. DAB-basierende Färbung gegen humane Zellkerne (MAB1281) mit Hämalaun-Gegenfärbung. Sowohl in Hirn (A), Niere (B), Muskelgewebe (C) als auch Herz (D) konnten in keinem Fall humane Zellen nachgewiesen werden.

3.1.5 Zusammenfassung

Aus den Beobachtungen der Zytokinexpression und der Kokulturversuche bestätigt sich, dass aus Nabelschnurblut generierte Zelllinien analog zu BM-MSC eine hämatopoiese-unterstützende Fähigkeit aufweisen, deren Effekt bei direktem Kontakt zwischen hämatopoietischen Zellen mit den unterstützenden Feederzellen deutlich stärker ausfällt [62].

In *in vivo*-Tierversuchen konnte kein eindeutiger Nachweis einer positiven Beeinflussung des Engraftments humaner hämatopoietischer Progenitoren durch zusätzliche Applikation von CB-DSC erbracht werden, es zeigten sich jedoch Hinweise auf eine osteogene Reparaturfunktion bei intrafemoraler Injektion.

Ebenso deuten die Ergebnisse der Kokulturen als auch der intravenösen Applikation in NOD/SCID-Mäuse an, dass es innerhalb der aus Nabelschnurblut gewonnenen Stromazellen in Bezug auf die Fähigkeit zur Hämatopoiese-Unterstützung mindestens zwei verschiedene Untergruppen gibt. Während ein Teil der Linien sich *in vitro* kaum von BM-MSC unterscheiden, weisen andere, wie die in

den bislang aufgeführten Beispielen die Linie CB-DSC A, einen deutlich stärkeren Effekt auf die Expansion hämatopoietischer Progenitoren auf und können potentiell auch *in vivo* als supportive Zellen zu einem verbesserten Engraftment hämatopoietischer Zellen führen. Tatsächlich wurde diese Beobachtung bestätigt und resultierte in der Klassifizierung der CB-DSC in unrestricted somatic stem cells (USSC) und cord blood multipotent stromal cells (CB-MS), welche im nächsten Abschnitt weiter analysiert wird.

3.2 Vergleich Unrestringierte somatische Stammzellen (USSC) und Multipotente Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-MSc)

2010 wurden von unserer Arbeitsgruppe erstmals Marker zur Unterscheidung der USSC von Cord blood-derived multipotent stromal cells (CB-MSc) beschrieben. Grundlage war die Beobachtung, dass einige Linien aus Nabelschnurblut sich als nicht adipogen induzierbar erwiesen, woraufhin entsprechende Untersuchungen zeigten, dass *Delta-like homologue 1* (DLK-1; auch: *Preadipocyte factor 1*, Pref-1) auf Transkriptebene in diesen Linien stark exprimiert war [66]. Annähernd parallel zeigte sich, dass in diesen Zellen keine bzw. kaum Homeobox (HOX)-Gene aktiv sind [67]. Aufgrund dieser Kriterien wurde somit die aktuelle Definition der USSC formuliert, während die zweite Gruppe (Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung und/oder kein Nachweis von DLK-1-RNA und/oder positives HOX-Profil) aufgrund ihrer Homologie zu den Stromazellen des Knochenmarks (Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung / kein Nachweis von DLK-1 / positives HOX-Profil) als CB-MSc definiert wurde.

3.2.1 Erweiterter Immunophänotyp von Unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) und Multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-MSc)

Da über den bislang untersuchten Standard-MSc-Immunophänotyp keine erfassbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Stromazellen detektierbar waren, wurden weitere mögliche extra- als auch intrazelluläre Marker in der Durchflusszytometrie getestet. Ziel war es, eine prospektive Isolierung der USSC direkt aus der Fraktion der mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes zu ermöglichen und/oder eine praktikable Methode zur qualitativen Einschätzung einer neu generierten adhären Zelllinie zur Verfügung zu haben.

Ergänzend zu den in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Markern wurden hierbei zusätzlich die Oberflächenexpression von CD10, CD13, CD18, CD29, CD33, CD36, CD56, CD106, CD117, CD133/1, CD146, CD184, CD271 und NG2 (*Neural/glial antigen 2*) erfasst und analysiert.

Für die meisten untersuchten Oberflächenmarker ließ sich kein definitiver Unterschied zwischen USSC, CB-MSc oder BM-MSc feststellen (siehe Abbildung 30). Über bestimmte Expressionsmuster ließ sich hingegen ein Rückschluss auf die Qualität der Zellen bzw. eine potentielle Identifizierung als USSC vornehmen.

Erweiterter allgemeiner Immunphänotyp USSC / CB-MSc / BM-MSc

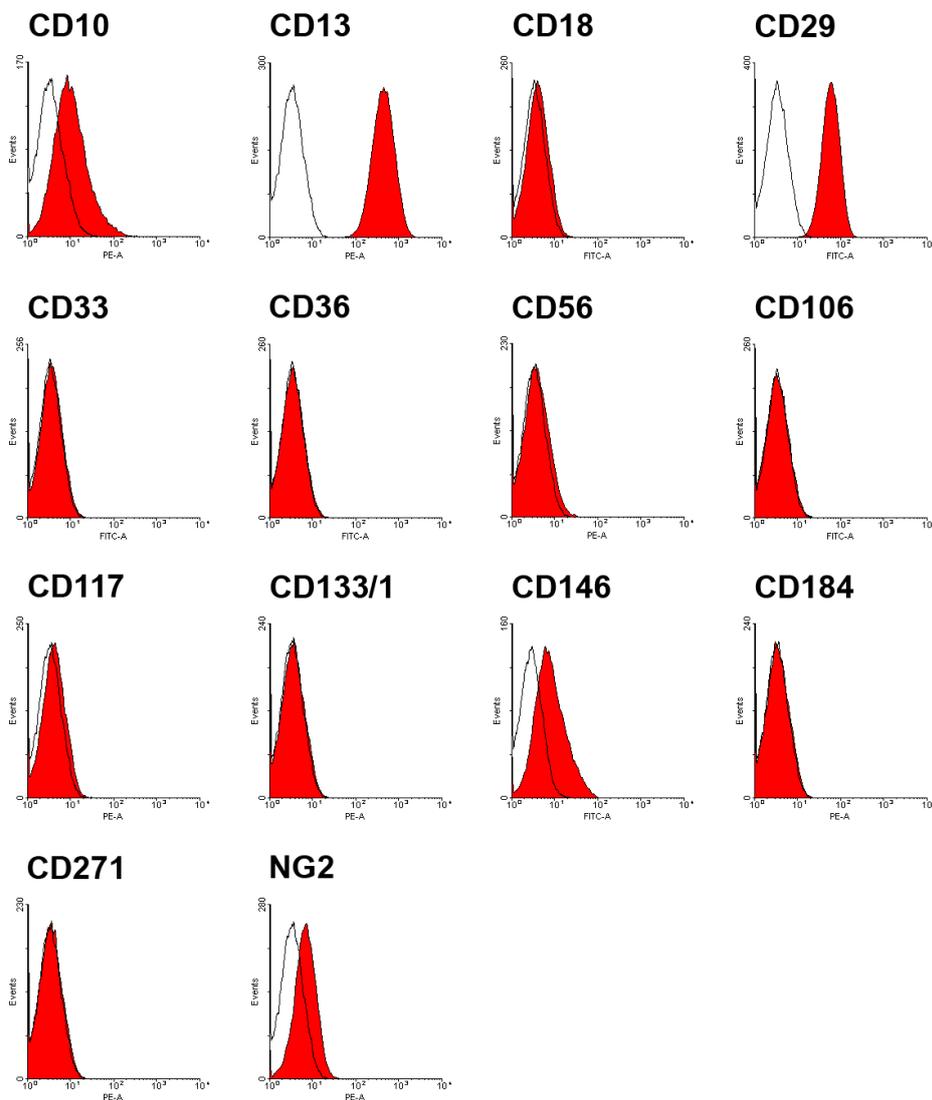


Abbildung 30: Erweiterter Immunphänotyp von USSC, CB-MSc und BM-MSc. Durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenexpression verschiedener Marker des erweiterten Protokolls einer USSC nach ca. 32 CPD (Passage 5), repräsentativ für alle untersuchten USSC, CB-MSc und BM-MSc (je $n > 20$). Dargestellt sind die zusätzlich zum modifizierten ISCT-Protokoll aufgenommenen Oberflächenmarker als Overlays (rot gefüllt) gegen entsprechende Isotyp-Kontrolle (keine Farbe).

Die Expression des Immunglobulins CD56 (*Neural cell adhesion molecule*, NCAM) war sowohl auf CB-MSc als auch auf BM-MSc variabel, konnte jedoch auf keiner der untersuchten USSC-Linien nachgewiesen werden. Innerhalb der Leukozytenpopulation dient CD56 der Identifizierung der natürlichen Killerzellen sowie der speziellen, „*non-MHC restricted*“ T-Zell-Subpopulation [137], ist unter anderem aber auch an der Zell-Zell-Bindung bzw. Zell-Matrix-Bindung und der Entwicklung (speziell der Ausprägung der Axone) von Neuronen/Gliazellen beteiligt [138-140]. Zusätzlich ist die

Expression von CD56 auch für Skelettmuskelzellen beschrieben [141-143] und wurde von Evseenko *et al.* als früher Marker während der mesodermalen Differenzierung von ESC nachgewiesen [144].

Speziell für CB-MSC ließ sich eine Tendenz erkennen, dass Linien mit (in der Regel homogener) nachweisbarer CD56-Expression zu einer schwächeren Proliferation neigten bzw. diese bereits in früheren Passagen seneszent wurden (siehe Abbildung 31) während es bei den tendenziell heterogenen exprimierenden Linien aus Knochenmark im Laufe der Kultur zu einem Verlust der positiven Population kam.

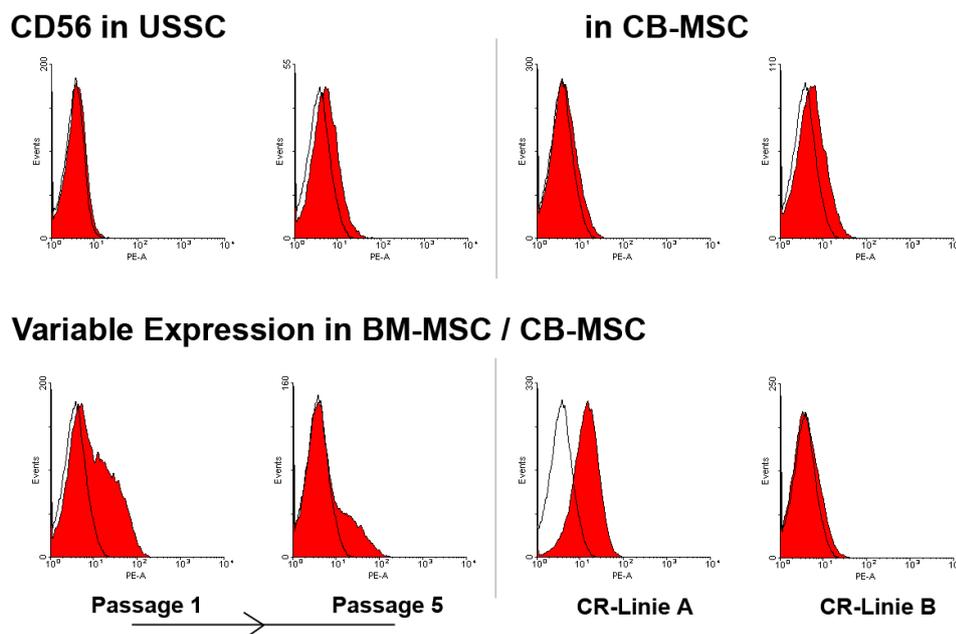


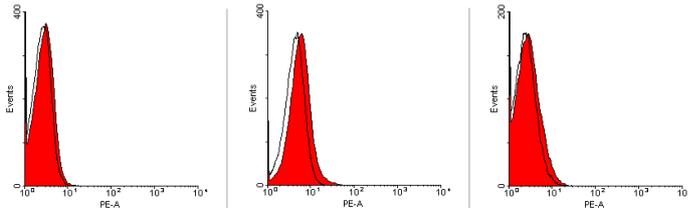
Abbildung 31: Expression von CD56 auf der Oberfläche verschiedener Stromazellen. Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression von CD56, dargestellt als Overlays (rot gefüllte) gegen entsprechende Isotyp-Kontrolle (keine Farbe). Generell zeigte sich für USSC und CB-MSC keine oder nur eine marginale Oberflächenexpression (obere Reihe). In BM-MSC konnte beobachtet werden, dass eine anfängliche Expression im Laufe der Kultivierung zurückging (untere Reihe links). Bei Verwendung von Cloning-Ringen (CR) zur separaten Analyse einzelner aus einem CB generierter Kolonien konnte in Einzelfällen eine differenzielle Expression beobachtet werden (untere Reihe, rechts). Während sich vollständig CD56-positive Linien (in der Regel bei Ansätzen aus CB) aufgrund reduzierten Wachstums kaum über 30 CPD (Passage 5) kultivieren ließen, konnte bei heterogenen Ansätzen (bei Ansätzen aus BM) ein Verlust dieser Population verfolgt werden.

Unter ungünstigen Kulturbedingungen, speziell nach Kultivierung unter hoher Zelldichte (>90 % Konfluenz), zeigten entsprechende Zelllinien irreversibel eine stark reduzierte Proliferation. Als Indikator für diese qualitative Veränderung erwies sich auch die Expression von CD184 (auch: CXCR4). Dieser, meist im Zusammenhang mit der Migration hämatopoietischer Zellen beschriebene, Rezeptor für SDF-1 [145], [146] konnte unter normalen Standard-Kulturbedingungen sowohl auf USSC als auch auf CB-MS und BM-MSC nur intrazellulär und nicht bzw. nur marginal auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Besagte im Wachstum beeinträchtigte Ansätze wiesen hingegen eine deutlich positive Oberflächenexpression auf (siehe Abbildung 32). Ein solcher Mechanismus

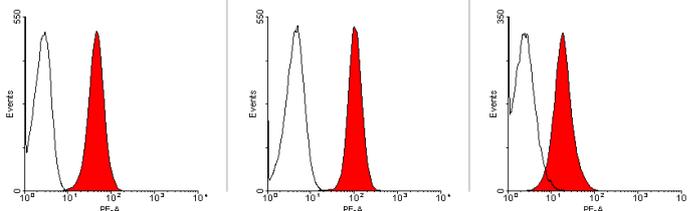
wurde für humane MSC nach Zytokinstimulation im Zusammenhang mit einer verbesserten Migrationsfähigkeit bereits publiziert [147], für eine Fortführung regulärer Zellkultur erwiesen sich diese Linien jedoch aufgrund der verringerten Proliferation sowie morphologischer Veränderungen wie beispielsweise der Bildung von lokalen, dicht gepackten Zellaggregaten (Nodulen) als ungeeignet.

CD184 in USSC / CB-MSC / BM-MSC

Extrazellulär



Intrazellulär



Extrazellulär nach Kultur mit hoher Konfluenz

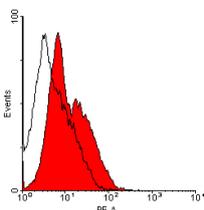
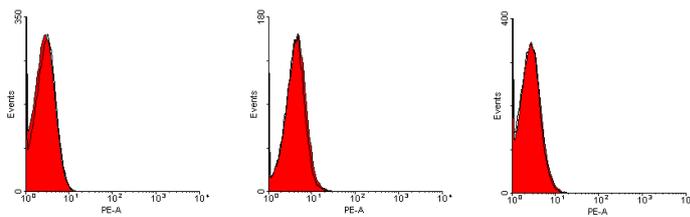


Abbildung 32: Oberflächen- und intrazelluläre Expression von CD184 auf USSC, CB-MSC und BM-MSC. Durchflusszytometrische Messung der Oberflächen- bzw. intrazellulären Expression von CD184, dargestellt als Overlays (rot gefüllte) gegen entsprechende Isotyp-Kontrolle (keine Farbe). Unter Standardbedingungen (37° C, 5% CO₂, 21% O₂, gesättigte Luftfeuchtigkeit, maximal 90% Konfluenz) auf der Oberfläche (oben), intrazellulär (mitte) und nach Kultivierung unter hoher Konfluenz (unten).

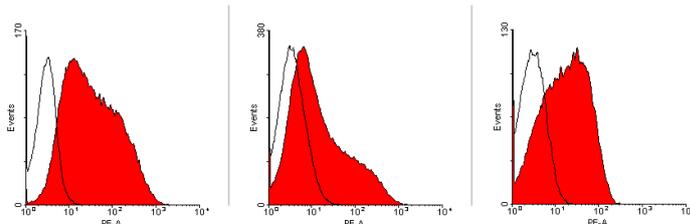
Auffällig war ebenfalls der äußerst deutliche Nachweis von CD271 („*Low affinity nerv growth factor receptor*“; LNGFR) auf nur drei aller bislang untersuchten Zelllinien (ausnahmslos CB-MSC, darunter auch die in den Kokultorexperimenten verwendete Linie CB-MSC B, siehe Abbildung 33).

Dieser für neuronales und nicht-neuronales Gewebe beschriebene [148] Oberflächenmarker wird in der Literatur auch als Kandidat für eine prospektive Isolierung von MSC aus Knochenmark [112, 149] bzw. aus Fettgewebe [150] diskutiert, konnte aber für die im Rahmen der Arbeit untersuchten Linien mit keiner qualitativen Bewertung oder besonderen Beobachtung in Korrelation gebracht werden.

CD271 in USSC / CB-MSC / BM-MSC



Ungewöhnliche Expressionsmuster (nur in CB-MSC)



(CB-MSC Linie B)

Abbildung 33: Expression von CD271 auf der Oberfläche von USSC, CB-MSC und BM-MSC. Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression von CD271, dargestellt als Overlays (rot gefüllte) gegen entsprechende Isotyp-Kontrolle (keine Farbe). Bis auf Ausnahme von 3 Linien (unten) konnte CD271 auf USSC, CB-MSC oder BM-MSC (oben) nicht nachgewiesen werden.

Zu erwähnen ist hierbei, dass an der Linie CB-MSC B eine klonale Expansion nach Einzelzell-Ablage (AVISIO CellCelector; ALS Automated Lab Solutions, Jena, Deutschland) vorgenommen wurde und die daraus resultierten Zellen erneut eine zur Ausgangslinie identische Verteilung (siehe Abbildung 3.2.4., unten links) der starken und sehr starken Expression aufwiesen. Diese Beobachtung schließt somit eine heterogene Primärkultur als Ursache dieses Expressionsmusters aus.

CD146 („*Melanoma cell adhesion molecule*“; MCAM), welches im Gegensatz zu Fibroblasten auf MSC stark exprimiert wird [151], ermöglichte als bislang einziger untersuchter Oberflächenmarker eine immunophänotypische Unterscheidung der USSC von CB-MSC und BM-MSC. Alle drei Zelltypen sind prinzipiell für diesen Marker positiv, in der Expressionsstärke ließ sich hingegen ein genereller Unterschied feststellen.

Wie in Abbildung 34 an jeweils vier Linien pro Zelltyp exemplarisch dargestellt, zeigten USSC im Vergleich zur entsprechenden Isotyp-Kontrolle nur eine schwache bis mittelstarke Oberflächenexpression, während sowohl CB-MSC als auch BM-MSC eine starke bis sehr starke Expression aufwiesen.

Diese Ergebnisse korrelierten mit der Publikation von Russel *et al.* [152], welche in CD146^{low}-sortierten BM-MSC ebenfalls eine verringerte bzw. fehlende Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung beobachteten.

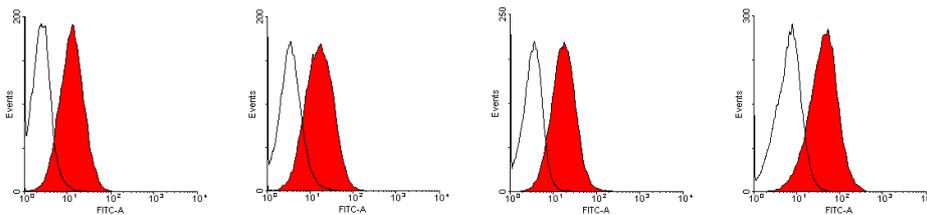
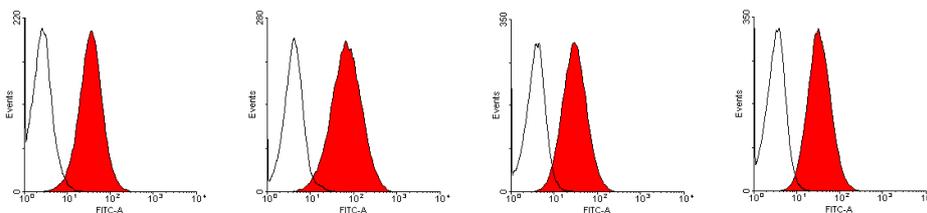
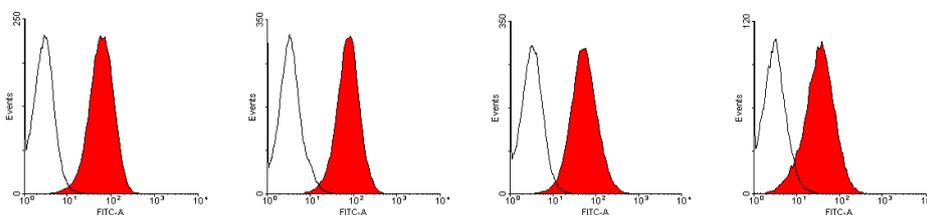
CD146 in USSC**in CB-MSC****in BM-MSC**

Abbildung 34: Ausgewählte Beispiele der variablen Intensität in der Oberflächenexpression von CD146 auf USSC, CB-MSC und BM-MSC. Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression von CD146, dargestellt als Overlays (rot gefüllt) gegen entsprechende Isotyp-Kontrolle (keine Farbe) auf USSC (obere Reihe), CB-MSC (mittlere Reihe) und BM-MSC (untere Reihe).

Anzumerken ist, dass die in vielen Publikationen [153, 154] für BM-MSC beschriebene Oberflächenexpression von CD106 („*Vascular cell adhesion molecule 1*“, VCAM-1) weder auf BM-MSC noch auf CB-DSC bestätigt werden konnte. Allein in den frühesten Passagen neu isolierter Knochenmarkslinien konnte ein schwaches Signal auf den Zellen detektiert werden, welches ab Passage 5 (ca. 24 CPD), spätestens aber ab Passage 7 (ca. 25-26 CPD), nicht mehr nachweisbar war (siehe Abbildung 35).

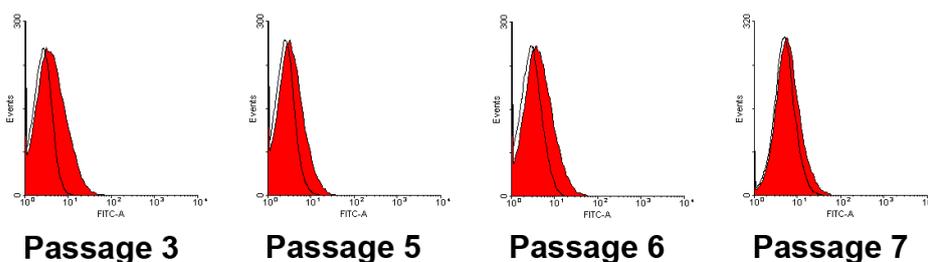
CD106 in BM-MSC

Abbildung 35: Reduktion der Expression von CD106 auf BM-MSC während der Kultivierung. Durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression, dargestellt als Overlays (rot gefüllte) gegen entsprechende Isotyp-Kontrolle (keine Farbe). Bei einer exemplarisch verfolgten BM-MSC-Linie zeigte sich nur in den ersten Passagen eine schwache Expression von CD106, welche im Laufe der Kultivierung vollständig verschwand.

3.2.2 Zytokinprofile von Unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) und Multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-MSC)

Für ein Screening auf Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen als USSC und CB-MSC klassifizierten Zelllinien wurde das erweiterte RayBiotec-Membransystem (*Human Cytokine Array C-Series 200*) verwendet, welches das aktuell maximale für dieses System verfügbare Spektrum (174 Zytokine) erfasst. Untersucht wurden dabei vier USSC (A, B, C und D) zwei repräsentative CB-MSC (A und B) sowie der Abkömmling von Linie B (CB-MSC B^{klon}). Letzterer wurde durch Einzelzellablage generiert und anschließend klonal expandiert. Bis auf CB-MSC B^{klon} (Passage 10; ca. 38 CPD) befanden sich alle untersuchten Linien in Passage 5-7 (24-35 CPD).

In Abänderung zu der im vorherigen Kapitel beschriebenen Auswertung wurden die Fluoreszenz-Intensitäten optisch über ein Dokumentationssystem (LAS-3000 Transiluminator/Imaging System; FujiFilm, Tokio, Japan) erfasst und anschließend semi-quantitativ in Bezug auf das Verhältnis zwischen den Proben ausgewertet. Hierfür wurden die in Dubletten ermittelten densitometrischen Werte (ImageQuant TL-Software; GE Healthcare; Buckinghamshire, UK) für jedes Zytokin in Relation zum Mittelwert der Positivkontrollen (definiert als 100 %, n=6) auf der entsprechenden Membran normiert.

Werte von mindestens 10 % Intensität der Kontrolle wurden als positiver Nachweis definiert, wobei dies für insgesamt 23 der 174 Zytokine im Überstand von USSC und/oder CB-MSC erfüllt wurde (siehe Anhang 9). Hierbei erwiesen sich die Zytokine Interleukin-6 (bis zu 190 % der Intensität der Positivkontrolle), Interleukin-8 (bis zu 167 %) und *Tissue inhibitor of metalloproteinases 2* (TIMP-2, bis zu 102 %) als stark (>100 %) sowie *Growth related oncogene* (GRO, bis zu 92 %), *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* (TIMP-1, bis zu 57 %), *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1, bis zu 48 %) und *Insulin-like growth factor-binding protein 4* (IGFBP-4, bis zu 41 %) als deutlich nachweisbar (>40%), wobei sich jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen USSC und CB-MSC feststellen ließ. Ebenso ist anzumerken, dass sich für die meisten Zytokine bereits ein Wert bis maximal ca. 10 % in frischen Kulturmedium ergab, für Angiopoietin 2 (ANGPT2) jedoch ein Wert von 26 %, eventuell bedingt durch ein Struktur analogon im fötalem Kälberserum.

Für SCF (USSC 5,00 +/- 1,06 %, n=4; CB-MSC 3,03 +/- 0,54 %, n=3; p=0,2022) und LIF (USSC 3,23 +/- 0,29 %, n=4; CB-MSC 2,03 +/- 0,15 %, n=3; p=0,0239) konnte die nach den vorangegangenen Daten (siehe Abschnitt 3.1.2) erwartete Sekretion durch USSC nicht bestätigt werden. Für LIF lässt sich dies durch mangelnde Sensitivität des Arrays erklären (10.000 pg/ml), nicht jedoch für SCF (10 pg/ml).

3.2.3 Kokulturen von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut mit Unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) und Multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut (CB-MSc)

Da laut Literatur DLK-1 die Hämatopoiese positiv beeinflusst [155] und ein HOX-negatives Expressionsprofil für eine entwicklungsbiologisch jüngere Zelle bzw. eine von mesenchymalen Zellen unterschiedliche Herkunft spricht, wurden weitere Experimente zur direkten Kokultur durchgeführt. Hypothese war, dass die in den ursprünglichen Kokulturen beobachteten Unterschiede innerhalb der CB-DSC sich in der Unterteilung USSC und CB-MSc widerspiegeln. Dementsprechend wurden in den folgenden Ansätzen aufgrund ihres HOX- und DLK-1-Expressionsprofils definierte USSC- bzw. CB-MSc-Linien miteinander verglichen. Im Gegensatz zu früheren Versuchen wurden die Kokulturen a) in DMEM mit 30% fötalem Kälberserum und b) in 6-Well-Platten anstatt in 24-Well-Platten durchgeführt. Der Wechsel des Mediums lag darin begründet, dass H5100-Medium neben FCS auch Pferdeserum enthält und somit allein eine zusätzliche Quelle an möglichen Wachstumsfaktoren darstellt, dieser Effekt für die Unterscheidung der Hämatopoiese-Unterstützung der entsprechenden Feederzellen jedoch zu minimieren war.

Versuch F:

Versuch F	Laufzeit: 14 Tage	Analysierte Wells pro Zeitpunkt: 3	Eingesetzte Zellen d0: $2,3 \cdot 10^4$ / 6-Well
-----------	-------------------	------------------------------------	--

Ein Vorversuch über 14 Tage mit zwei USSC-Linien und einer CB-MSc-Linie bestätigte, dass USSC nicht nur im Vergleich zu BM-MSc sondern auch zu CB-MSc zu einer stärkeren Expansion der Gesamtzellzahl (maximal 55.15 ± 8.33 n=6 gegen 15.50 ± 1.54 n=3, p=0,0143) führen (siehe Abbildung 36).

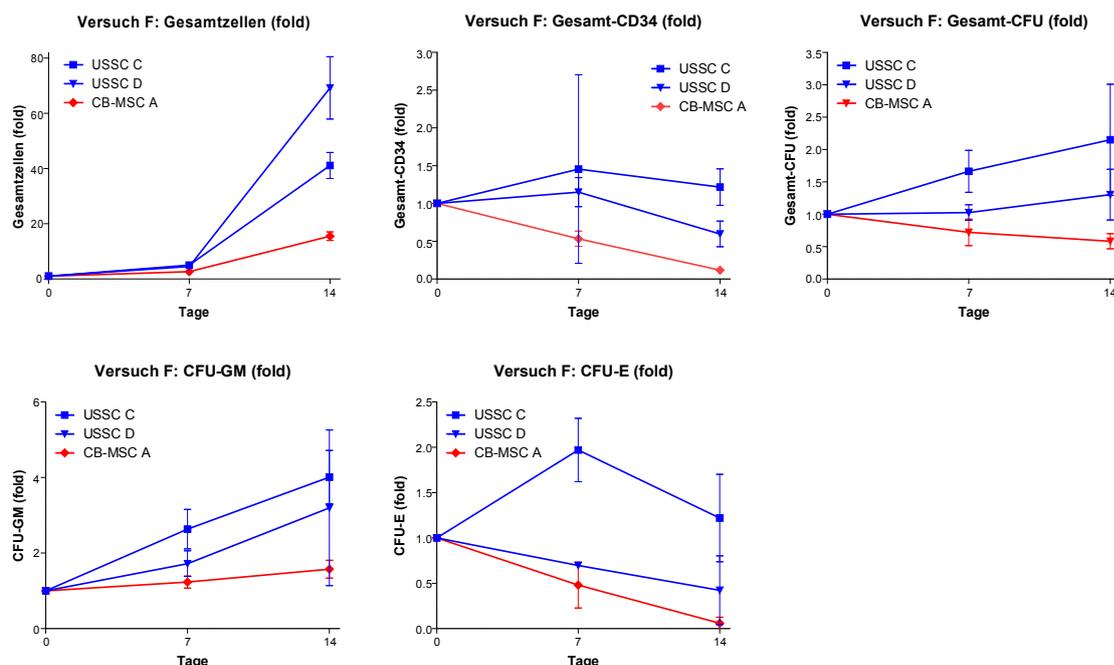


Abbildung 36: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34⁺-Zellen und CFU auf USSC/CB-MSC Feederzellen in Vorversuch F. USSC (blau) führten bei direkter Kokultur mit HSC zu einer signifikant höheren Expansion der Gesamtzellzahl sowie zu tendenziell höheren Werten für die Vermehrung von CD34-positiven Zellen und koloniebildenden Einheiten als CB-MSC (rot).

Auch in Bezug auf CD34-positive Zellen (maximal 1.30 ± 0.33 n=6, p=0,5547) und die Gesamt-CFU (maximal 1.72 ± 0.31 n=6, p=0,0399) war nur auf USSC eine Expansion erkennbar, wobei auffällig ist, dass allein auf USSC-Linie C eine Expansion der CFU-E erreicht werden konnte (d7: $1,97 \pm 0,20$ n=3, d14: $1,22 \pm 0,28$ n=3). Während bei zeitkinetischer Analyse an Tag 14 die Kokultur auf USSC sowohl für Gesamtzellzahl, Anteil CD34-positiver Zellen als auch CFU signifikant höhere Werte als auf CB-MSC zeigte (siehe Anhang 10), ergab sich dies für die Maximalwerte nur für die Gesamtzellzahl (siehe Tabelle 13), was auf den rückläufigen Werten (<1-fach) für die Expansion auf CB-MSC beruht.

Tabelle 13: Übersicht maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen auf USSC gegenüber CB-MSC in Vorversuch F.

Versuch F : Maximale Expansionswerte USSC (U) versus CB-MSC (C)		
Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt
U: 55.15 ± 8.33 n=6 (d14/d14)	U: 1.30 ± 0.33 n=6 (d7/d7)	U: 1.35 ± 0.17 n=6 (d7/d7)
C: 15.50 ± 1.54 n=3 (d14/d14)	C: 1.00 (Keine Expansion)	C: 1.00 (Keine Expansion)
p= 0,0143	p= 0,5547	p= 0,1518
CFU-GM	CFU-E	
U: 3.60 ± 0.59 n=6 (d14/d14)	U: 1.00 (Keine Expansion)	
C: 1.57 ± 0.14 n=3 (d14/d14)	C: 1.00 (Keine Expansion)	
p= 0,0522	p= N/A	

Für die Maximalwerte ergab sich für die Expansion hämatopoietischer Zellen ein signifikanter Unterschied in der Gesamtzellzahl zwischen USSC und CB-MSC als Feederzellen. Obwohl die Vermehrung des Anteils CD34-positiver Zellen und der koloniebildenden Einheiten keine Signifikanzen aufwiesen, konnten auch hier tendenziell höhere Werte für USSC erfasst werden.

Versuch G:

Versuch G	Laufzeit: 14 Tage	Analysierte Wells pro Zeitpunkt: 6	Eingesetzte Zellen d0: $5 \cdot 10^4$ / 6-Well
-----------	-------------------	------------------------------------	--

Mit Fokus auf die initialen Expansionswerte wurden die folgenden Versuche auf den Zeitraum der ersten 2 Wochen ausgerichtet und jeweils an Tag 3, 7, 10 und 14 ausgewertet.

Es zeigte sich, dass sich die erhöhte supportive Fähigkeit der USSC-Linien bereits ab Tag 3 in Bezug auf Gesamtzellzahl signifikant auswirkt (0.93 ± 0.05 n=12 gegen 0.74 ± 0.05 n=12, $p=0,0150$), ab Tag 7 für CD34-positive Zellen (1.37 ± 0.04 n=6 gegen 0.95 ± 0.12 n=6, $p=0,0078$) und die Gesamtheit koloniebildender Einheiten (2.85 ± 0.23 n=6 gegen 2.19 ± 0.13 n=6, $p=0,0317$) (siehe Anhang 11). Obwohl sich die Zellzahl und der Anteil CD34⁺-Zellen zwischen Tag 10 und 14 auf allen Feederzellen konstant erhöhte, war in Bezug für die CFU auf den meisten Linien die maximale Expansion an Tag 10 erreicht und an Tag 14 bereits rückläufig (siehe Abbildung 37).

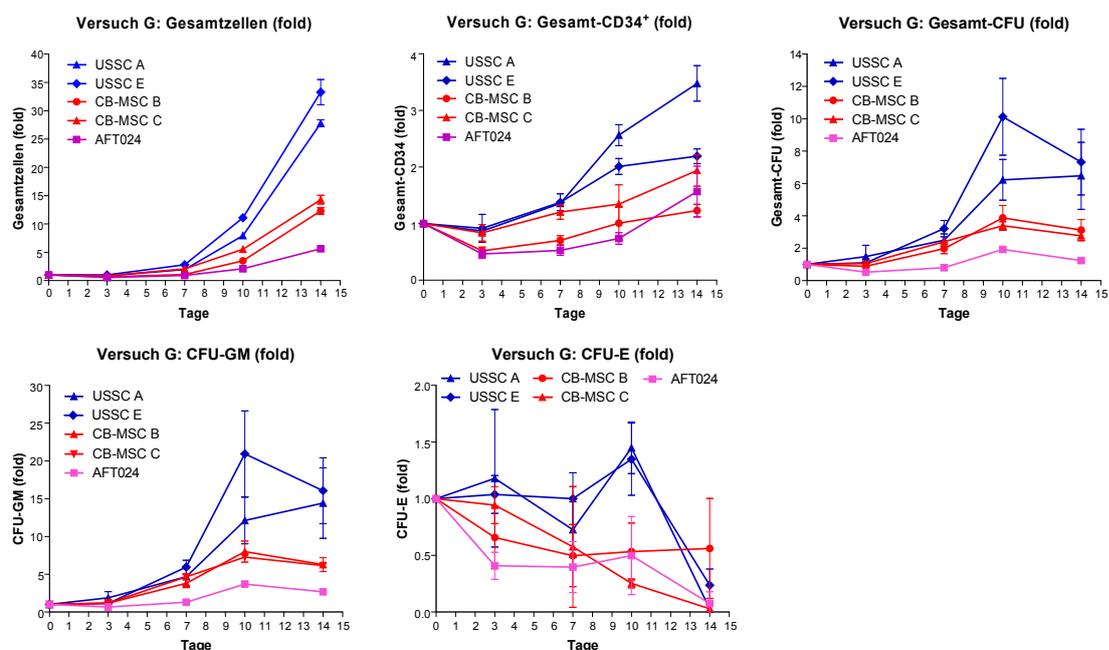


Abbildung 37: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34⁺-Zellen und CFU während der Kokultur auf USSC, CB-MSC und AFT024 in Versuch G. Sowohl für die Expansion der Gesamtzellzahl, des Anteils CD34-positiver Zellen auch für Vermehrung koloniebildender Einheiten konnten innerhalb von 14 Tagen signifikant höhere Werte durch USSC (blau) als Feederzellen gegenüber fötalen CB-MSC (rot) oder murinen fötalen Zellen (pink) erzielt werden. Nur auf USSC-Feeder konnten zudem CFU-E für zumindest 10 Tage erhalten bzw. gering expandiert werden, während diese auf CB-MSC und murinen fötalen Zellen konstant abnahmen.

Für die maximal erreichten Expansionswerte ergibt sich in allen untersuchten Aspekten (Gesamtzellzahl, Anteil CD34-positiver Zellen und CFU) ein signifikanter Unterschied zwischen USSC und CB-MSC. Bestätigt wurde analog zu Versuch F, dass eine Expansion der CFU-E nur auf USSC als Feeder zu beobachten war (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Übersicht zeitkinetische und maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen auf USSC gegenüber CB-MSC in Versuch G.
Versuch G : Maximale Expansionswerte USSC (U) versus CB-MSC (C)

Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt
U: 30.54 ± 1.37 n=12 (d14/d14) C: 13.49 ± 0.59 n=10 (d14/d14) p < 0.0001	U: 2.83 ± 0.30 n=6 (d14/d14) C: 1.59 ± 0.18 n=6 (d14/d14) p = 0,0050	U: 8,26 ± 1,39 n=4 (d14/d10) C: 3,63 ± 0,27 n=4 (d10/d10) p = 0,0166
CFU-GM	CFU-E	
U: 17,68 ± 2,84 n=4 (d14/d10) C: 7,63 ± 0,48 n=4 (d10/d10) p = 0,0129	U: 1.40 ± 0.12 n=4 (d10/d10) C: 1,00 (Keine Expansion) p = 0,0141	

Für die Expansion innerhalb der ersten 14 Tage ergab sich für USSC als Feederzellen für hämatopoietische Nabelschnurblutzellen für alle untersuchten Aspekte signifikant höhere Maximalwerte als bei der Verwendung von CB-MSC.

Versuch H:

Versuch H	Laufzeit: 14 Tage	Analysierte Wells pro Zeitpunkt: 6	Eingesetzte Zellen d0: $5 \cdot 10^4$ / 6-Well
-----------	-------------------	------------------------------------	--

Die potentielle Sekretion von DLK-1 durch USSC war ein möglicher Erklärungsansatz für die verbesserte Hämatopoiese-Unterstützung dieser Zellen. Entsprechend wurde getestet, inwiefern sich eine DLK-1-Überexpression in CB-MSC auf Kokulturversuche auswirkt.

Während die Linie USSC E ein zum vorherigen Versuch G analoges Expansionsprofil aufwies, führte die Überexpression von DLK-1 (CB-MSC B^{DLK}) zu quasi identischen Werten wie die native Ausgangslinie CB-MSC B (siehe Abbildung 38).

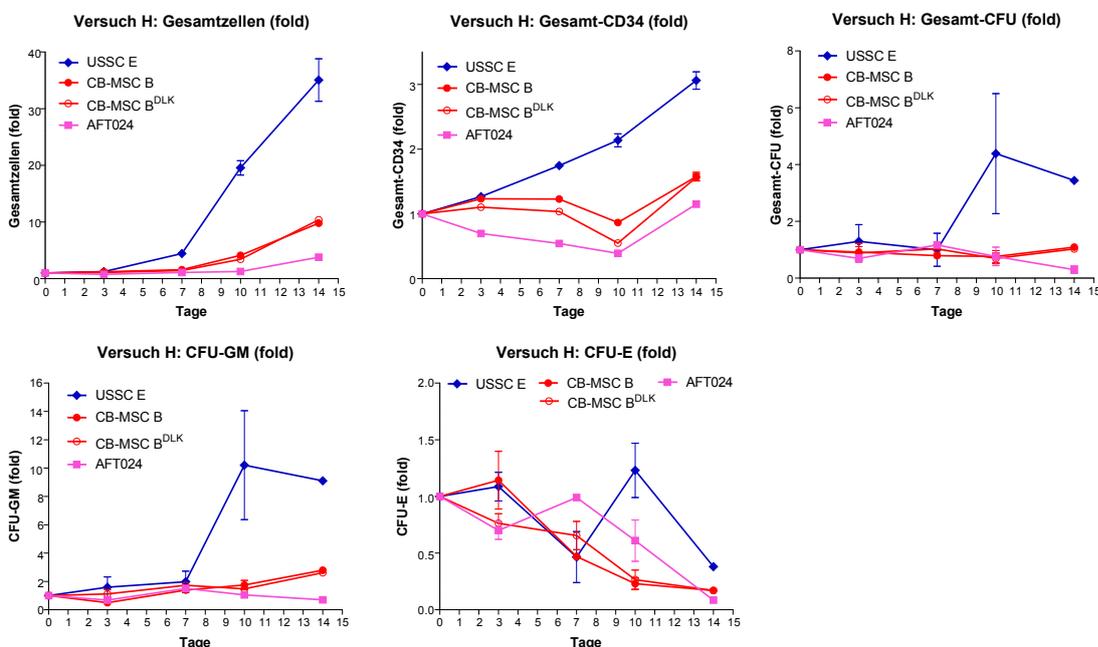


Abbildung 38: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34⁺-Zellen und CFU während der Kokultur auf USSC, CB-MSC, DLK-1-überexprimierenden CB-MSC und AFT024 in Versuch H. Sowohl für die Expansion der Gesamtzellzahl, des Anteils CD34-positiver Zellen auch für Vermehrung koloniebildender Einheiten konnte kein Unterschied zwischen nativen CB-MSC (rot, gefüllter Kreis) und CB-MSC mit Überexpression von DLK-1 (rot, leerer Kreis) festgestellt werden. Für alle Parameter konnten innerhalb von 14 Tagen signifikant höhere Werte durch USSC (blau) als Feederzellen gegenüber CB-MSC (rot) oder murinen fötalen Zellen (pink) erzielt werden. Nur auf USSC-Feeder konnten zudem auch CFU-E für zumindest 10 Tage erhalten bzw. gering expandiert werden, während diese auf CB-MSC und murinen fötalen Zellen konstant abnahmen.

Daher wurden für die statistische Auswertung die Ergebnisse beider Linien zusammengefasst (siehe Anhang 12). Dabei zeigte sich, dass für die Gesamtzellzahl und für die Vermehrung der CD34-positiven Zellen sowohl für die maximal erreichte Expansion als auch für die zeitkinetische Entwicklung (außer an Tag 3) jeweils stark signifikant ($p > 0.0001$) höhere Werte auf USSC als auf CB-MSC erreicht wurden (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Übersicht zeitkinetische und maximale Expansionswerte CD34-positiver Zellen auf USSC gegenüber CB-MSC mit DLK-1-Überexpression in Versuch H.		
Versuch H : Maximale Expansionswerte USSC (U) versus CB-MSC und DLK-1-überexprimierende CB-MSC (C)		
Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt
U: 35,05 ± 3,75 n=6 (d14) C: 10,09 ± 0,37 n=12 (d14/d14) p < 0,0001	U: 3,06 ± 0,08 n=3 (d14) C: 1,57 ± 0,02 n=6 (d14/d14) p < 0,0001	U: 4,39 ± 1,50 n=2 (d10) C: 1,06 ± 0,03 n=2 (d14/d14) p= 0,1562
CFU-GM	CFU-E	
U: 10,21 ± 3,85 n=2 (d10) C: 2,71 ± 0,09 n=2 (d14/d14) p= 0,1905	U: 1,23 ± 0,24 n=2 (d10) C: 1.00 (Keine Expansion) p= 0,4390	
Die Überexpression von DLK-1 in CB-MSC hatte keine Auswirkung auf die Hämatopoiese-Unterstützung in <i>in vitro</i> Kokulturen. Während zwischen nativen CB-MSC und DLK-1-überexprimierenden CB-MSC kein Unterschied festzustellen war und diese daher für die Auswertung zusammengefasst wurden, führten USSC generell zu teilweise signifikant (Gesamtzellen und CD34-positiven Progenitoren) höherem Expansionsraten.		

Für CFU, CFU-GM als auch CFU-E wurde zumindest an Tag 10 jeweils ein statistisch relevanter Unterschied festgestellt, wobei für Tag 21 nur aufgrund mangelnder Werte für die Kokultur auf USSC trotz weiterhin deutlich höherer Werte keine statistische Auswertung möglich war. Wie in vorangegangenen Versuchen war nur auf USSC kurzzeitig (Tag 10) eine geringe ($1,23 \pm 0,24$ n=2) Expansion der CFU-E erfolgt.

3.2.4 *In vivo*-Experimente zu *Homing* und Hämatopoiese-Unterstützung mit Unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) in NOD/SCID- und Nacktmäusen

A) Engraftment USSC / BM-MSC

Da die *in vitro*-Experimente eine deutlich höheres Hämatopoiese-Unterstützung durch USSC aufzeigten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jens Zeller vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ; Heidelberg, Deutschland) weitere Experimente mit NOD/SCID-Mäusen zur Untersuchung eines Effektes von USSC auf das Engraftment hämatopoietischer Zellen durchgeführt [156]. Im Gegensatz zu den vorherigen Ansätzen wurden die CD34-positiven Zellen maximal 24 Stunden vor Versuchsbeginn aus Nabelschnurblut isoliert und bis zur Applikation bei 4 °C in Iscove-Medium (Biochrom) gelagert, die USSC/BM-MSC vor Ort kultiviert und direkt vor Injektion mit Trypsin geerntet sowie die Tiere 3 Stunden vor Applikation mit 3 Gy bestrahlt.

Im ersten Versuchsabschnitt wurden USSC bzw. BM-MSC allein intravenös injiziert, um deren Verbleib an Tag 2 und 7 sowie nach 8 Wochen Laufzeit (Schema siehe Abbildung 39) durch FCM-Analyse von peripherem Blut, Knochenmark und Milz sowie immunohistochemischer Untersuchung von Niere, Lunge, Leber, Hirn, Herz und Milz zu verfolgen.

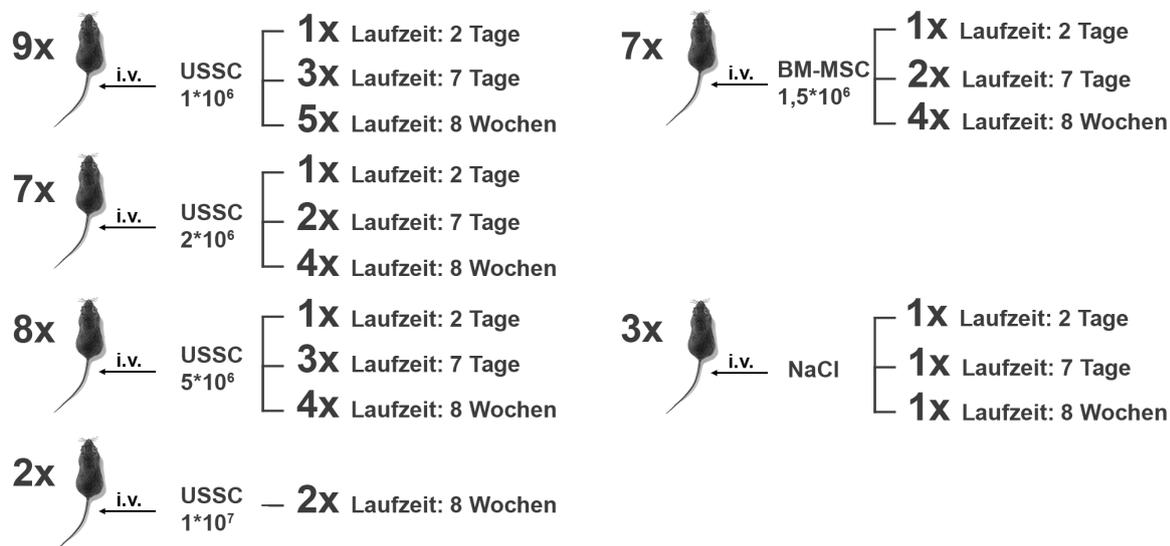


Abbildung 39: Schema der Versuchsanordnung zur intravenösen Injektion von USSC und BM-MSC in NOD/SCID-Mäusen. Verschiedene Konzentrationen an USSC ($1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$) sowie $1,5 \cdot 10^6$ BM-MSC wurden zur Verfolgung des Engraftments stromaler Zellen intravenös über die Schwanzvene appliziert und nach 2 Tagen, 7 Tagen und 8 Wochen analysiert. Als Kontrolle dienten Tiere mit injizierter Kochsalzlösung.

Während bei BM-MSC nur ein Maximum von $1,5 \cdot 10^6$ Zellen sicher zu injizieren war ließen sich bei USSC bis zu $1 \cdot 10^7$ Zellen verabreichen.

Dieser Versuchslauf bestätigte die bisherigen Ergebnisse, demnach weder USSC noch BM-MSC nach längerem Zeitraum im Gewebe wiedergefunden werden konnten. In keinem der untersuchten Tiere konnte nach 8 Wochen humane Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse (Blut, Knochenmark, Milz) oder in der Immunohistochemie (Milz, Leber, Lunge, Hirn, Herz und Niere; siehe Abbildung 40) nachgewiesen werden.

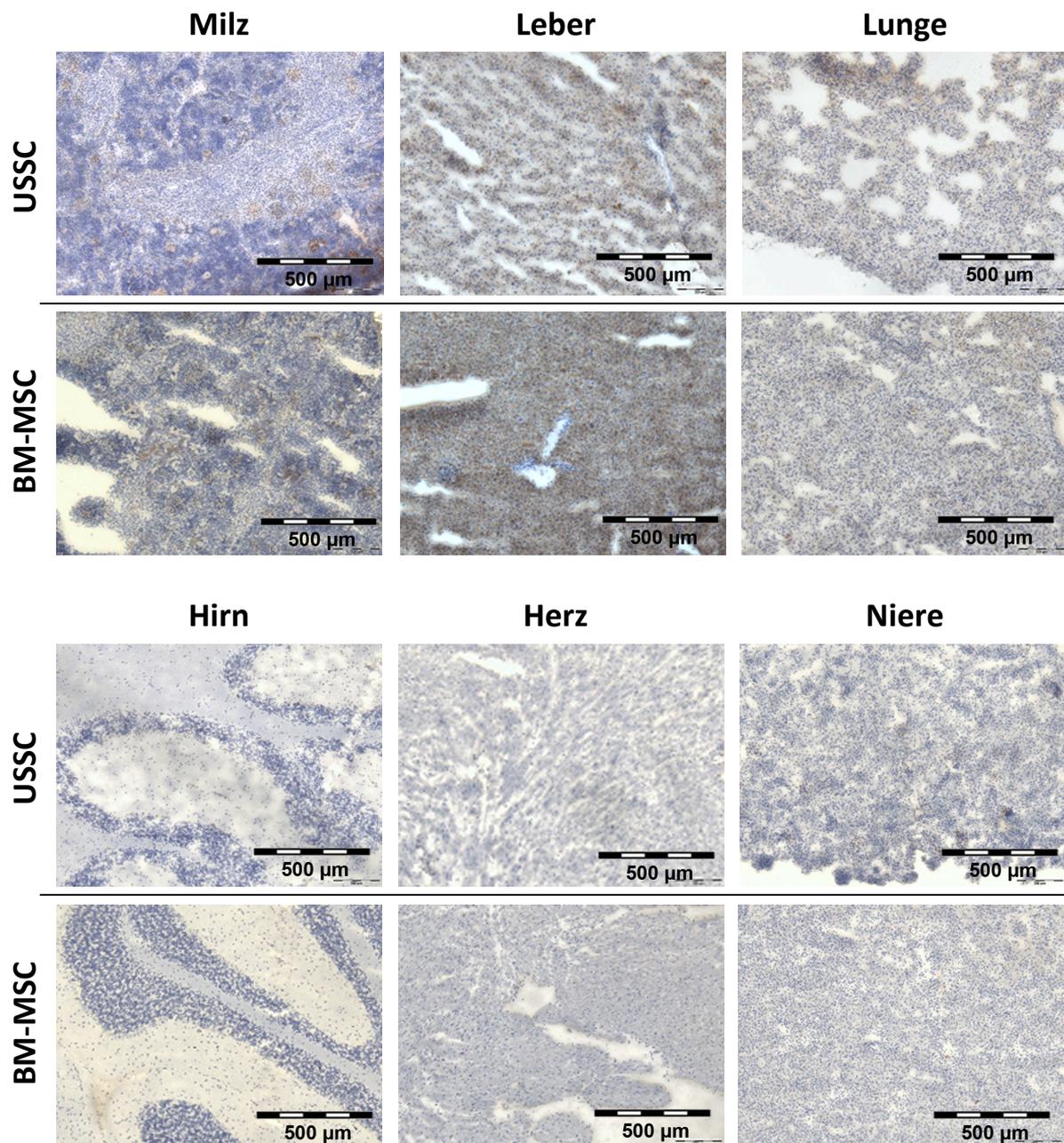


Abbildung 40: Verschiedene murine Organe nach Applikation von USSC/BM-MSC. DAB-basierende Färbung gegen humane Zellkerne (MAB 1281) mit Hämalan-Gegenfärbung. 8 Wochen nach Applikation von USSC oder BM-MSC konnte in keinem der untersuchten Tiere humane Zellen in Milz, Leber, Lunge, Hirn, Herz oder Nieren nachgewiesen werden.

Sowohl bei Applikation von USSC als auch BM-MSC konnten an Tag 2 und Tag 7 in den Lungen der Tiere humane Zellen, als deutliche Cluster zusammengelagert, detektiert werden (siehe Abbildung 41), wogegen weitere untersuchte Organe, peripheres Blut und Knochenmark keine humanen Zellen aufwiesen.

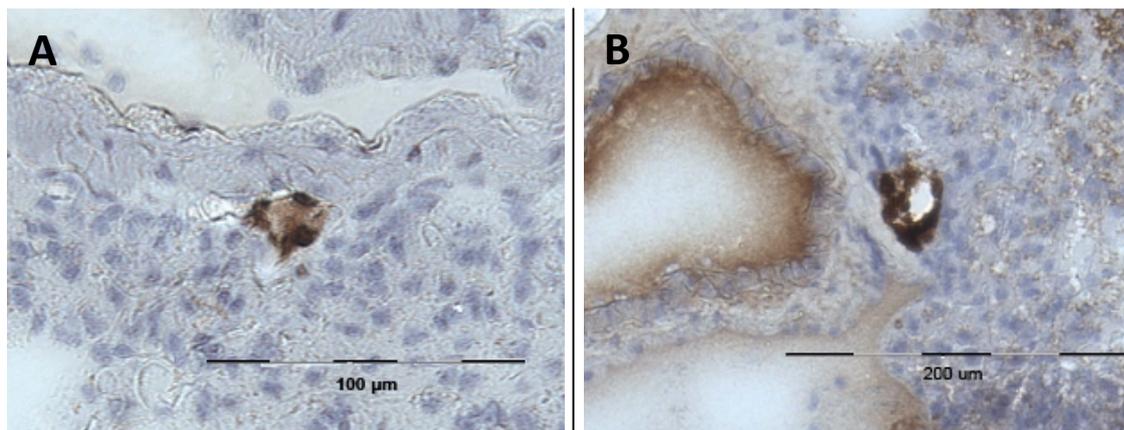


Abbildung 41: Cluster humaner Zellen in der murinen Lunge Applikation von USSC/BM-MSK. DAB-basierende Färbung gegen humane Zellkerne (MAB1281; dunkelbraun/schwarz) mit Hämalaun-Gegenfärbung. Zellen der stromalen Linien konnten in den ersten Tagen nach Applikation im Lungengewebe als lokale Ansammlungen nachgewiesen werden (A, B).

B) Koinjektion von USSC und $CD34^+$ -Zellen

Im zweiten Versuchsteil wurde die Rekonstitution durch $CD34$ -positive hämatopoietische Zellen allein und in Koinjektion mit USSC untersucht, wobei die Applikation der Zelltypen getrennt voneinander erfolgte. Hierzu wurden, nach Bestrahlung der Tiere mit 3 Gy als Vorbereitung, die USSC ($1 \cdot 10^6$) 24 bzw. 3 Stunden vor den $CD34^+$ -Zellen ($5 \cdot 10^4$) injiziert. Insgesamt wurden 10 Tiere als Kontrolle allein mit $CD34$ -positiven Zellen und 20 zusätzlich mit USSC behandelt. Nach 4 Wochen wurden 4 bzw. 8 Tiere analog zu den vorangegangenen Versuchen analysiert, die restlichen 6 bzw. 12 Tiere nach 8 Wochen (Schema siehe Abbildung 42).

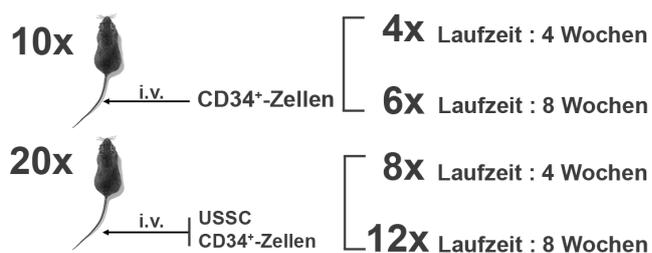


Abbildung 42: Schema der Versuchsanordnung zur Koinjektion von USSC und $CD34^+$ -Zellen in NOD/SCID-Mäuse. Insgesamt 30 Tiere erhielten jeweils $5 \cdot 10^4$ $CD34$ -selektierte hämatopoietische Zellen aus Nabelschnurblut. 10 Tiere dienten als Kontrolle während 20 zusätzlich vorab mit $1 \cdot 10^6$ USSC injiziert worden waren. Die Auswertung des Engraftments der humanen hämatopoietischen Zellen erfolgte nach 4 und 8 Wochen Laufzeit.

In Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analysen von Knochenmark, peripherem Blut und Milz (siehe Tabelle 16) zeigte sich dabei nach 4 Wochen ein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil humaner Leukozyten ($CD45$ -positiv) in Knochenmark zwischen Tieren mit $CD34^+$ -Zellen allein ($5,89 \pm 1,34$ %, $n=4$) und $CD34^+$ -Zellen in Kombination mit zuvor applizierten USSC ($30,86 \pm 6,59$ %, $n=7$, $p=0,0213$; siehe Abbildung 43). Dieser erwies sich nach 8 Wochen aufgrund der stärkeren Streuung ($CD34^+$: $11,28 \pm 4,84$ %, $n=6$; $CD34^+$ +USSC: $24,17 \pm 5,06$ %, $n=12$) als nicht mehr signifikant ($p=0,1260$). Im Blut und in der Milz der $CD34^+$ +USSC-Tiere ließen sich tendenziell mehr humane

Zellen nachweisen, allerdings nicht in statistisch relevantem Unterschied (auch wenn dieser in der Milz nach 8 Wochen mit $p=0.0688$ nur knapp nicht-signifikant ausfällt).

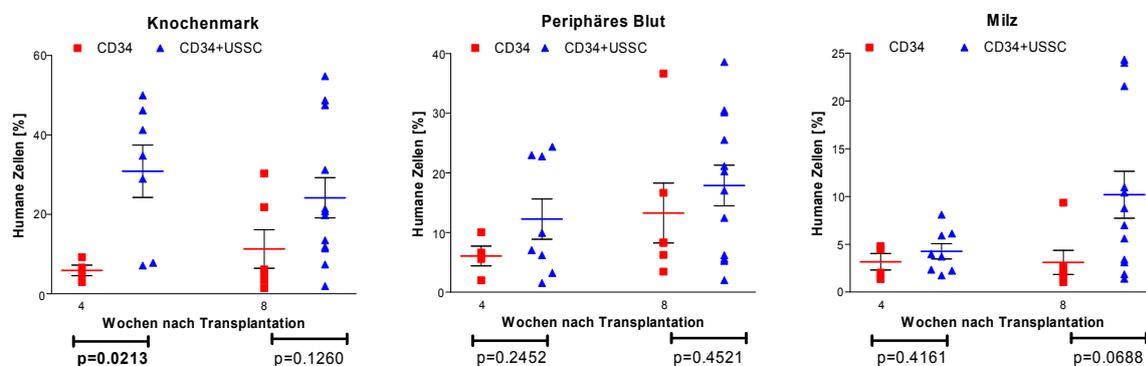


Abbildung 43: Anteil humaner Zellen in murinem Knochenmark, Blut und Milz nach Koinjektion von USSC und CD34+-Zellen. In allen Tieren konnte ein erfolgreiches Engraftment und das Vorkommen humaner Leukozyten (detektiert über CD45-Expression) beobachtet werden, wobei generell die Koinjektion von USSC zu höheren Werten führte. Für den Anteil im Knochenmark nach 4 Wochen ergab sich ein statistisch höherer Wert bei Kotransplantation von USSC.

Bei weiterer Untersuchung der humanen Zellen auf Expression von CD34 (etwa 5-10 % der detektierten CD45-positiven Zellen; siehe Abbildung 44) hingegen zeigt sich zu keinem Zeitpunkt und in keinem Organ ein statistisch relevanter Unterschied, auch wenn dieser in der Milz nach 8 Wochen mit $p=0,0593$ ebenfalls annähernd erreicht wird und tendenziell auch hier die Kotransplantation von USSC zu höheren Werten führte.

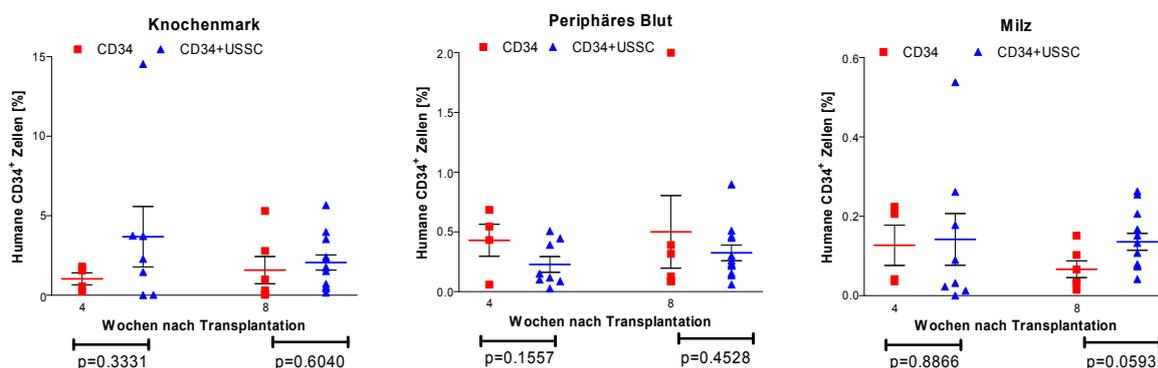


Abbildung 44: Anteil humaner CD34-positiver Zellen in murinem Knochenmark, Blut und Milz nach Koinjektion von USSC und CD34+-Zellen. In allen untersuchten Tieren konnten humane hämatopoietische Zellen (CD45/CD34-positiv) nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Anteil gesamter humaner Leukozyten waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen deutlich geringer und nicht signifikant.

Tabelle 16: Übersicht über den Nachweis humaner Zellen in NOD/SCID-Mäusen nach Injektion CD34-positiver Zellen alleine oder in Kombination mit USSC nach 4 und 8 Wochen in Knochenmark, Blut und Milz.

Humane Leukozyten und hämatopoietischer Progenitoren in NOD/SCID-Mäusen nach Injektion CD34-positiver Zellen allein (C) oder in Kombination mit USSC (C+U)			
Humane Leukozyten (CD45 ⁺) [%]	Knochenmark	Blut	Milz
nach 4 Wochen	C: 5,89 ± 1,34 n=4 C+U: 30,86 ± 6,57 n=7 p= 0,0213	C: 6,06 ± 1,66 n=4 C+U: 12,25 ± 3,38 n=8 p= 0,2452	C: 3,16 ± 0,86 n=4 C+U: 4,26 ± 0,80 n=8 p= 0,4161
nach 8 Wochen	C: 11,28 ± 4,84 n=6 C+U: 24,17 ± 5,06 n=12 p= 0,1260	C: 13,27 ± 5,01 n=6 C+U: 17,89 ± 3,42 n=12 p= 0,4521	C: 3,10 ± 1,27 n=6 C+U: 10,19 ± 2,46 n=12 p= 0,0688
Humane häm. Progenitoren (CD45 ⁺ /CD34 ⁺) [%]	Knochenmark	Blut	Milz
nach 4 Wochen	C: 1,03 ± 0,38 n=4 C+U: 3,68 ± 1,90 n=7 p= 0,3331	C: 0,43 ± 0,13 n=4 C+U: 0,23 ± 0,07 n=8 p= 0,1557	C: 0,13 ± 0,05 n=4 C+U: 0,14 ± 0,07 n=8 p= 0,8866
nach 8 Wochen	C: 1,58 ± 0,85 n=6 C+U: 2,06 ± 0,48 n=12 p= 0,6040	C: 0,50 ± 0,30 n=6 C+U: 0,32 ± 0,07 n=12 p= 0,4528	C: 0,07 ± 0,02 n=6 C+U: 0,14 ± 0,02 n=12 p= 0,0593

Obwohl nur für den Anteil humaner Blutzellen im Knochenmark 4 Wochen nach Transplantation als signifikant nachgewiesen, so resultierte die Kotransplantation von USSC doch in tendenziell höheren Werten humaner Blutzellen bzw. hämatopoietischer Progenitor/Stammzellen.

Niere, Lunge, Leber, Hirn, Herz und Milz der Tiere wurden entsprechend den vorangegangenen Versuchen mittels Gefriermicrotom geschnitten (8 µm Schichtdicke) und nach Protokoll gegen humane Zellkerne (Antikörper MAB1281) gefärbt (siehe Abschnitt 2.8). Die Ergebnisse der immunohistochemischen Untersuchung spiegeln dabei das hohe Engraftment humaner Zellen in der Milz in Tieren mit zusätzlicher USSC-Injektion wider. Da dieses, wie in Abbildung 45 zu sehen, lokal stark variierte, konnten hier keine Aussagen zum Anteil humaner Zellen an der Zellmenge getroffen werden. In Niere, Lunge, Leber, Hirn und Herz konnten hingegen keine humanen Zellen detektiert werden.

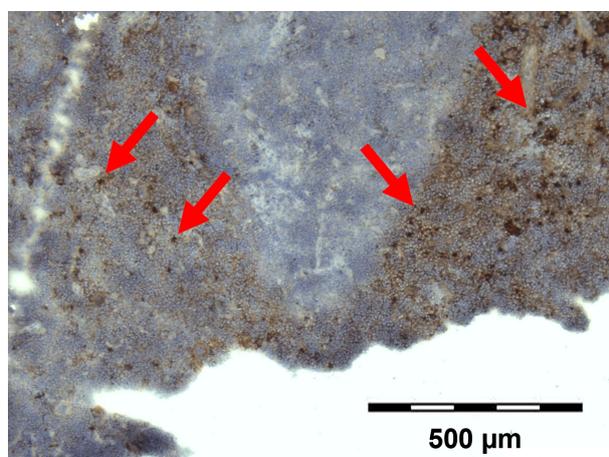


Abbildung 45: Lokal konzentriertes Engraftment humaner Zellen in der murinen Milz. DAB-basierende Färbung gegen humane Zellkerne (MAB1281; dunkelbraun/schwarz) mit Hämalaun-Gegenfärbung. Deutlich zu erkennen ist, dass das Engraftment humaner Zellen nur in bestimmten Regionen der Milz nachzuweisen war (Pfeile), während andere Bereiche frei von humanen Zellen waren (mittlere Region).

C) Tumorigenitätstest

Für eine potentielle klinische Anwendung muss die spontane Bildung von Teratomen durch die applizierten Zellen, wie sie für embryonale Stammzellen bzw. induzierte pluripotente Stammzellen beschrieben ist, ausgeschlossen werden. Daher wurde zusätzlich in Kooperation mit dem DKFZ ein Tumorigenitätstest an Nacktmäusen (nu/nu) durchgeführt, konzipiert als Langzeitversuch mit Laufzeit bis Verdacht auf Tumorbildung bzw. zum natürlichen Tod der Tiere. Hierbei wurden, aufgeteilt in 3 Versuchansätze, zwischen $5 \cdot 10^6$ und $5 \cdot 10^7$ Zellen in 500 μ l subkutan (s.c.) in die Flanke der Tiere injiziert. Insgesamt wurden 30 Tiere mit Stromazellen aus Nabelschnurblut (7 Linien), 10 mit BM-MSC (3 Linien) und 10 Tiere mit Kochsalzlösung als Kontrolle getestet. Die Tiere wurden regelmäßig begutachtet und bei Verdacht auf Erkrankung, beispielsweise bei plötzlichem akutem Gewichtsverlust, getötet und analysiert. Bei Tumorentwicklung wurde dieser als auch gegebenenfalls befallene Gewebe/Organe (zumeist waren zusätzlich zu einem soliden Tumor auch Milz und Leber betroffen) ebenfalls immunohistochemisch mittels Färbung von Gewebeschnitten (8 μ m) gegen humane Zellkerne (MAB1281, nach Permeabilisierung) untersucht.

Obwohl im Laufe des Versuches einige Tiere spontane Tumore entwickelten (jeweils 25 %: 4/30 mit CB-DSC, 2/10 mit BM-MSC und 2/10 mit Kochsalzlösung injizierten Tieren), war nachweislich keiner humanen Ursprungs, wie in Abbildung 46 exemplarisch gezeigt.

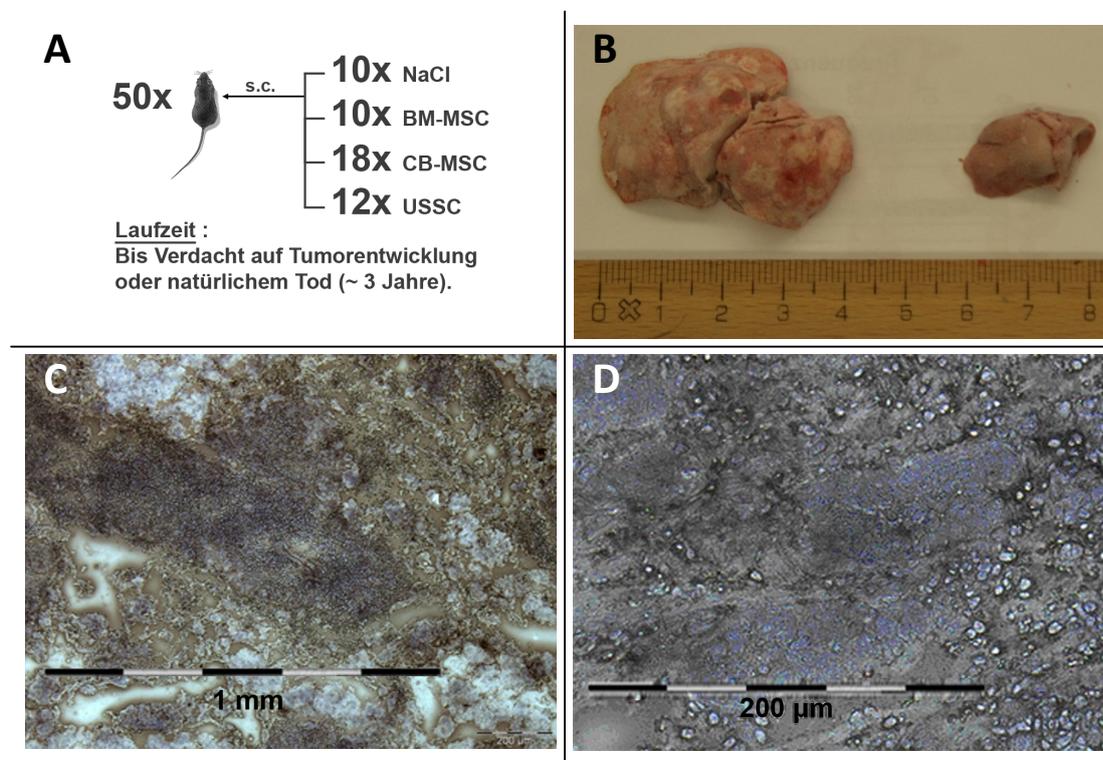


Abbildung 46: Tumorigenitätstest USSC/BM-MSC nach subkutaner Applikation in Nacktmäusen. (A) Schema der Versuchsanordnung des Tumorigenitätstests. Insgesamt wurden 50 Tiere mit Stromazellen aus Knochenmark und Knochenmark bzw. Kochsalzlösung als Kontrolle injiziert. (B) Größenvergleich metastasierte Leber (links) gegen gesunde Leber (rechts). (C und D) Sämtliches untersuchte Tumorgewebe zeigte keine Zellen humanen Ursprungs (DAB-basierende Färbung gegen humane Zellkerne mit MAB1281-Antikörper und Hämalaun-Gegenfärbung).

3.2.5 Zusammenfassung

Die Unterscheidung zwischen USSC und CB-MSC als definitiv unterschiedliche Gruppen konnte zusätzlich zu den bisher beschriebenen Methoden (Nachweis von DLK-1 auf Transkriptebene sowie ein HOX-negatives Expressionsprofil für USSC) um die in Relation geringere Oberflächenexpression von CD146 auf USSC erweitert werden.

In Kokulturversuchen resultierte die Verwendung von USSC als Feederzellen in stärkerer und schnellerer Expansion an Gesamtzellen, CD34-positiven Progenitoren und CFU-GM. Obwohl keine effektive Expansion der erythroiden CFU erfolgte, so fiel der Verlust dieser Zellen über die Versuchslaufzeit deutlich geringer aus als auf CB-MSC.

In vivo-Versuche bestätigten, dass weder USSC noch BM-MSC zu einem Engraftment in zuvor sublethal bestrahlten NOD/SCID-Mäusen führen, es bis 7 Tage nach Applikation hingegen zu einem transienten Zurückhalten („*Entrapment*“) der Zellen in den Lungen der Tiere kommt. Trotz des fehlenden Engraftments führt die Koinjektion von USSC mit CD34-positiven Zellen zu einem erhöhten Anteil humaner hämatopoietischer (CD45-positiver) Zellen nach 4 Wochen im Vergleich zur alleinigen Verabreichung von CD34-positiven Zellen in peripherem Blut, Knochenmark und Milz. Interessant ist hierbei, dass der Anteil CD34-positiver hämatopoietischer Stammzellen durch die zusätzliche Applikation der USSC nicht beeinflusst wurde, was allein auf einen proliferationsfördernden Effekt der Koinjektion schließen lässt, welcher sich innerhalb der initialen Phase nach Transplantation signifikant auf die Rekonstitution auswirkt.

Im Tumorigenitätstest konnte parallel hierzu nachgewiesen werden, dass sowohl weder USSC, CB-MSC noch BM-MSC über ein tumorigenes Potential verfügen und somit potentiell für eine klinische Anwendung geeignet sind.

3.3 Vergleich Unrestringierte somatische Stammzellen (USSC) mit Induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), Endodermal differenzierten iPS (Endo-iPS) und Stromazellen aus der Nabelschnur (UC-MSc)

Aufgrund der Expression von DLK-1 und des negativen HOX-Profiles ließ sich die Hypothese aufstellen, dass USSC im Gegensatz zu CB-MSc biologisch näher der fötalen Leber als den Zellen des Knochenmarks stehen. Um dies zu untersuchen, wurden USSC induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) aus USSC nach endodermaler Differenzierung (Endo-iPS), als Modell einer Nische ähnlich der sich entwickelnden embryonalen Leber, gegenübergestellt. Undifferenzierte iPS-Zellen (siehe Abbildung 47) besitzen als pluripotente Zellen zudem die Fähigkeit, selbst in hämatopoietische Richtung zu differenzieren, wie es auch für embryonale Stammzellen, beispielsweise durch Kultur auf OP9-Feederzellen, bereits beschrieben wurde [157, 158]. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich mit direkt aus der Nabelschnur isolierten Stromazellen (in der Literatur als UC-MSc, „*Umbilical cord multipotent stromal cells*“, deklariert), welche aufgrund ihrer Herkunftsquelle (einem allein der Fötalentwicklung vorbehaltenem mesodermem Gewebe, welches ausschließlich dem Bluttransport dient) potentiell ebenfalls regulatorischen Einfluss auf hämatopoietische Zellen nehmen.

Induzierte pluripotente Stammzellen wurden dabei in Kooperation mit H. Zaehres (Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster) nach dem von der Gruppe um Shinya Yamanaka [68] beschriebenen Protokoll durch Überexpression von Oct4, Sox9, KLF4 und c-Myc aus USSC generiert [159]. Anschließend wurden diese nach einem in unserem Labor etablierten zweistufigen Protokoll endodermal in hepatozyten-ähnliche Zellen differenziert, um als Modell der fötalen hämatopoietische Nische in molekularbiologischen Analysen verwendet zu werden.

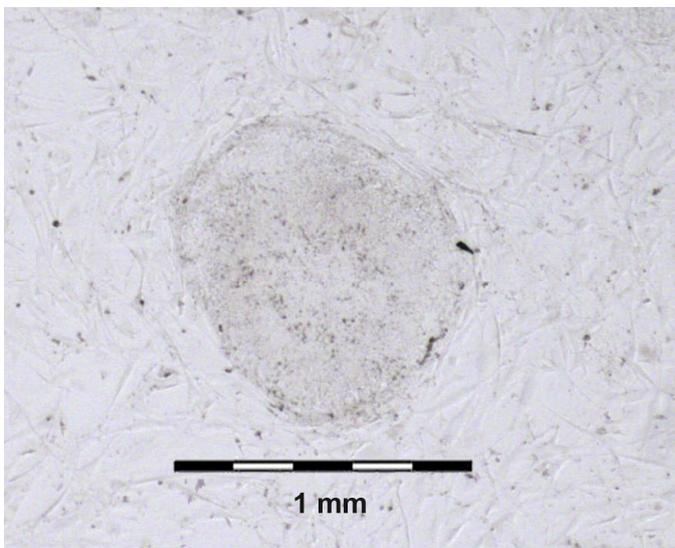


Abbildung 47: Kolonie induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) aus USSC. Aus USSC generierte iPS wurden auf murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) als Feederzellen kultiviert. Charakteristisch für iPS ist das Wachstum in Kolonien sowie die geringe Größe der einzelnen Zellen.

Die erfolgreiche endodermale Differenzierung konnte sowohl durch Nachweis spezifischer Transkriptionsmarker (HSA, AFP, FBP1, G6PC, ARG1, CPS1, CYP3A4, HEX, PROX1, HNF1 α , FOXA2, HNF4 α) als auch funktionell (Albuminsekretion, Harnstoffproduktion) nachgewiesen werden (Dissertation Simon Waclawczyk, „Hepatische Differenzierung multipotenter unrestringierter somatischer Stammzellen (USSC) und induziert pluripotenter Stammzellen (iPS) *in vitro*“, 2011).

Stromazellen aus der Nabelschnur wurden wie beschrieben (siehe Abschnitt 2.1.1) von unserer Gruppe generiert und kultiviert [111].

3.3.1 Immunphäotypisierung Induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) und Stromazellen aus der Nabelschnur (UC-MSC)

iPS

Für die aus USSC generierten induzierten pluripotenten Stammzellen (USSC-iPS) erfolgte eine durchflusszytometrische Messung mit ausgewählten Oberflächenmarkern. Eine Übersicht über das gesamte erfasste Profil und die gemessenen Expressionen ist in Tabelle 17 dargestellt, wobei speziell die für embryonale Stammzellen beschriebenen Oberflächenmarker, SSEA-4 (*stage-specific antigen 4*) sowie die Proteoglycane TRA-1-60 und TRA-1-81 („*Tumor rejection antigen*“) als Kontrolle der Pluripotenz dienten (siehe Abbildung 48).

Tabelle 17: Übersicht Immunphäotypisierung von induzierten pluripotenten Stammzellen aus USSC.

USSC-iPS					
Antigen	Expression	Antigen	Expression	Antigen	Expression
CD10	+	CD49f	+++	CD324 (E-Cad)	+++ ²
CD13	(+)	CD90	+++	CD326 (Ep-CAM)	+++
CD18	(-)	CD106	-	HLA-ABC	(+)
CD24	+++	CD117 (c-kit)	+	HLA-DR	-
CD29	++	CD133/1 (AC133)	++	NG2	(+)
CD31	-	CD144	+	SSEA4	+++
CD34	-	CD184 (CXCR4) ¹	(-)	TRA-1-60	+++
CD44	++	CD197 (CCR7)	-	TRA-1-81	+++
CD45	-	CD271 (LNGFR)	+		

¹: Für die Expression von CD184 konnten teilweise 2 Populationen, negativ und deutlich positiv (~15 %), detektiert werden.

²: Neben der stark positiven Hauptpopulation war bei CD324 (*Epithelial cadherin*) in einer Probe auch eine negative Subpopulation nachweisbar (siehe Abbildung 48), was für eine beginnende Differenzierung und Lösung aus dem Verband der iPS-Kolonie dieser Zellen spricht.

Im Vergleich zu nativen USSC zeigten die untersuchten USSC-iPS neben den stark auf der Oberfläche detektierbaren Pluripotenzmarkern SSEA4, TRA1-60 und TRA1-81 auch eine deutliche Expression von CD 133/1 sowie eine verringerte Expression von CD13. Die endothelialen/hämatopoietischen Marker CD18, CD31, CD34, CD45, CD106, CD117 und CD184 waren, wie auch auf nativen USSC, negativ.

Immunophänotypische Untersuchung iPS

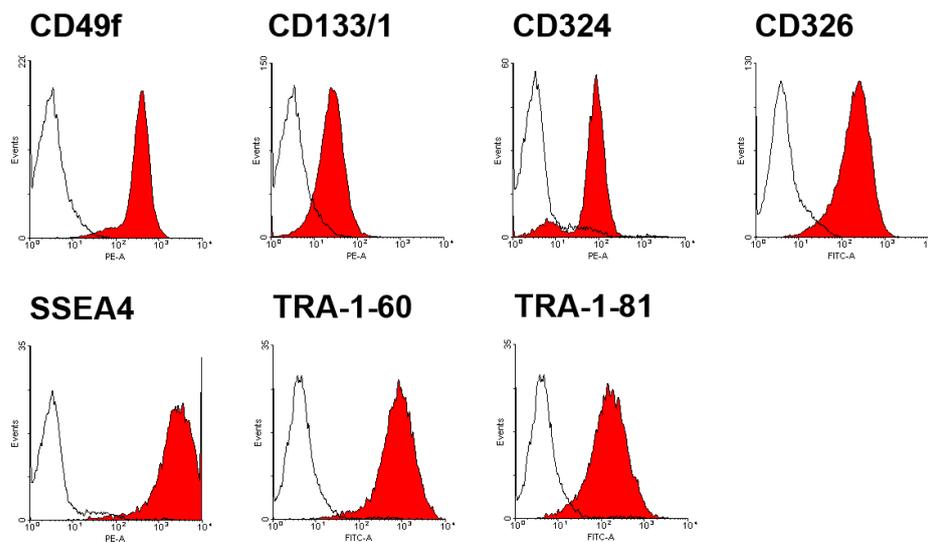


Abbildung 48: Ausgewählte Oberflächenmarker der iPS-Immunophänotypisierung. Die untersuchten iPS-Zellen zeigten die in der Literatur für iPS/ESC beschriebene Expression der Oberflächenmarker CD133/1, CD324, CD326, SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81. Die in einer Probe beobachtete negative Fraktion in der Färbung gegen CD324 lässt sich durch unvollständige Reprogrammierung oder spontane Differenzierung einzelner Zellen erklären.

Die in einer Probe ebenfalls zu erkennende negative Subpopulation für CD324 (E-Cadherin), einem vor allem auf embryonalen und epithelialen Zellen exprimiertem Adhäsionsmolekül, beruhte eventuell auf

- a) einer nicht vollständigen Reprogrammierung oder
- b) einem Verlust des ursprünglich exprimierten E-Cadherins aufgrund Differenzierung in mesenchymale Richtung („*epithelial-mesenchymal transition*“, EMT; [160]).

Stromazellen aus der Nabelschnur (UC-MSC)

Da sowohl für USSC als auch CB-MSC bislang die genaue Herkunft nicht geklärt werden konnte, wurden gezielt stromal wachsende Zellen aus dem Gewebe der Nabelschnur isoliert um zu analysieren, ob und inwiefern dieses möglicherweise als Quelle der aus dem Blut gewonnen Zellen in Erwägung zu ziehen ist. Die generierten Zelllinien wurden entsprechend den vorangegangenen Experimenten sowohl immunphänotypisch als auch auf ihr Differenzierungspotential hin untersucht und mit USSC und CB-MSC verglichen.

Sowohl bei mikroskopischer Betrachtung als auch für die Expression der meisten untersuchten Oberflächenmarker waren UC-MSC nicht von CB-MSC oder BM-MSC zu unterscheiden. Die Zellen waren ebenfalls von fibroblastoider Gestalt und zeigten den typischen MSC-Immunophänotyp (siehe Abbildung 49). Allein die im erweiterten Profil durchflusszytometrisch erfasste Expression von CD56

konnte auf allen untersuchten Linien nachgewiesen werden, ebenso war CD146, ähnlich wie auf CB-
MSC und BM-MSC, ausnahmslos stark auf der Oberfläche exprimiert (siehe Abbildung 50).

Immunophänotypische Untersuchung UC-MSC

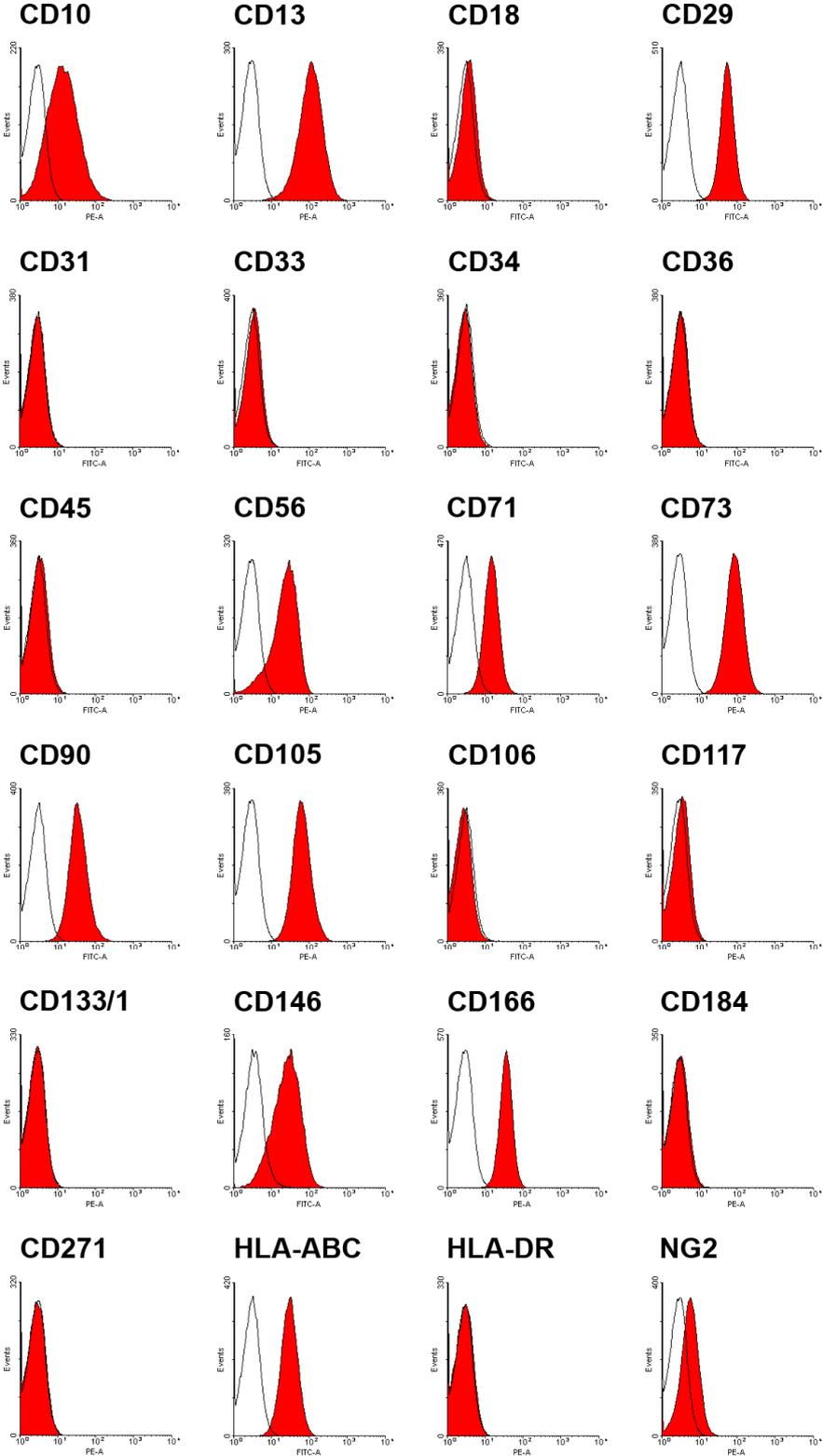


Abbildung 49: Phänotyp Oberflächenmarker auf UC-MSC. Immunophänotypisch waren UC-MSC durch die starke CD56-
Oberflächenexpression von USSC, CB-MSC oder BM-MSC zu unterscheiden.

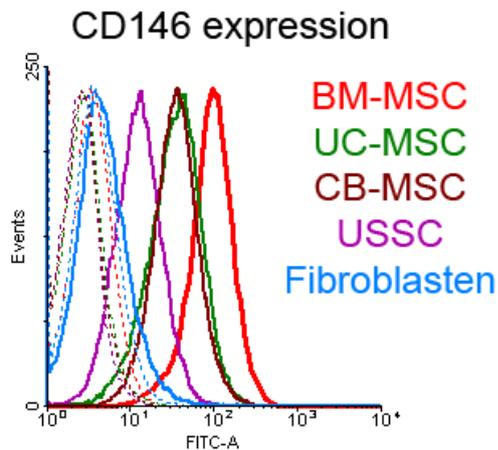


Abbildung 50: Unterschiede in der Oberflächenexpression von CD146 (MCAM) auf verschiedenen Zelltypen. Während BM-MSC (rot), CB-MSC (braun) und UC-MSC (grün) eine starke Expression aufwiesen, konnte diese auf USSC nur in deutlich geringerem Maße beobachtet werden. Fibroblasten (blau) als Kontrolle zeigten keine Expression; alle Isotypkontrollen (gestrichelte Linien) waren von annähernd identischer Intensität (siehe auch [111]).

Im Gegensatz zu den aus Nabelschnurblut bzw. Knochenmark generierten Linien ließ sich hingegen keine der untersuchten UC-MSC-Linien (n=6) adipogen, osteogen oder chondrogen induzieren, was in Widerspruch zu den Kriterien der Definition einer multipotenten (Stamm-)Zelle steht. Nahe liegend ist, dass diese Zellen entweder bereits terminal differenziert sind und in der Nabelschnur eine spezifische, bislang noch unbekannte Funktion erfüllen und/oder nur über ein stark eingeschränktes Differenzierungspotential verfügen. Trotz dieser inzwischen von unserer Arbeitsgruppe publizierten Einschränkung [111] wird der Begriff UC-MSC in dieser Arbeit weiterhin als Bezeichnung verwendet.

3.3.2 Zytokinexpression in Induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), Endodermal differenzierten iPS (Endo-iPS) und verschiedenen Stromazellen auf Transkript-Ebene

2010 beschrieben Song Chou und Harvey F. Lodisch [82] eine Subpopulation fötaler Leberzellen in der Maus, welche sich durch eine ausgeprägte Hämatopoiese-Unterstützung auszeichnete. Diese, nur in geringem Anteil (2 %) in der fötalen Leber vorkommenden Zellen, ließen sich dabei anhand ihrer deutlichen Expression von DLK-1 (auch: Pref-1; „*Preadipocyte factor 1*“) isolieren. Die in dieser Publikation beschriebenen hämatopoietisch aktiven Proteine „*Fibroblast growth factor 1*“ (FGF1), „*Insulin-like growth factor 2*“ (IGF2), „*Insulin-like growth factor-binding protein 1*“ (IGFBP1), „*Stem cell factor*“ (SCF), „*Stromal-derived factor 1*“ (SDF-1) und Thrombopoetin (THPO) sowie zusätzlich Angiopoetin 1 (ANGPT1) wurden daraufhin auf Transkriptebene (verwendete Primersequenzen siehe Anhang 2) an adulten und fetalen Hepatozyten, USSC, CB-MSC, BM-MSC sowie iPS (undifferenziert sowie endodermal differenziert) getestet, um zu untersuchen, inwiefern das Expressionsprofil dieser Zytokine für die DLK-1-positiven USSC eher endodermalen oder mesenchymalen Zellen zuzuordnen ist. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) wurde, als ein in allen Zellen für die Glykolyse konstitutiv exprimiertes Gen („housekeeping-Gen“), zur Kontrolle (bei RT-PCR) bzw. zur Normierung (bei quantitativer real-time PCR) verwendet. Auffällig war im Vorversuch (RT-PCR, siehe

Abbildung 51), dass bis auf Hepatozyten alle Zelllinien deutlich SCF exprimierten, wobei im Gegensatz zu den Erwartungen anhand der ELISA-Daten hier kein Unterschied zwischen USSC/CB-MSC und BM-MSC erkennbar war.

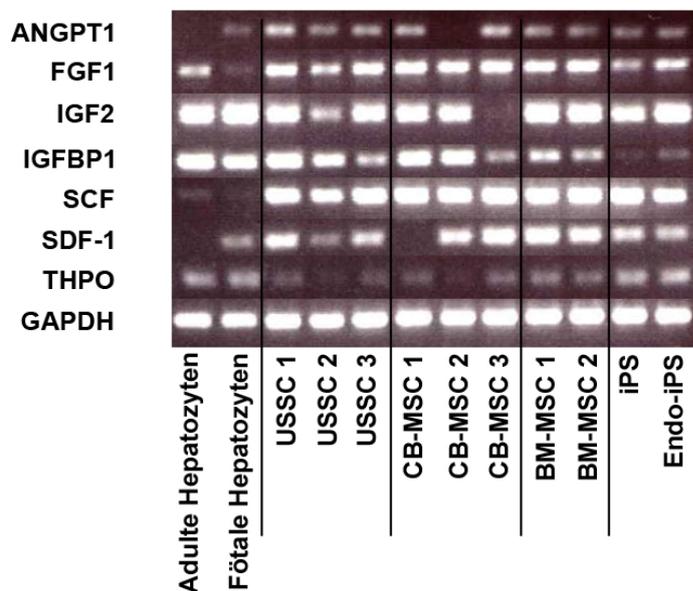


Abbildung 51: RNA-Expression Hepatozyten, USSC, CB-MSC und iPS. Repräsentative Abbildungen nach RT-PCR (35 Zyklen). Innerhalb der Gruppe der CB-MCS (n=3) zeigten sich hier bereits Unterschiede im Expressionsprofil (*ANGPT1*, *IGF2*, *SDF-1*), während USSC (n=3) und BM-MSC (n=2) homogenere Ergebnisse erbrachten.

Im Gegensatz dazu war die Expression von SDF-1 in BM-MSC als auch CB-MSC (mit Ausnahme einer Linie) stärker als in USSC oder Hepatozyten. Es war deutlich zu erkennen, dass innerhalb der aus Nabelschnurblut gewonnenen Zelltypen eine teilweise starke Varianz in der Expression vorkam, während die beiden ausgewählten BM-MSC ein absolut identisches Profil aufwiesen.

Eine quantitative Verifizierung für fötale Leber (als Referenz der fötalen hämatopoietischen Nische), endodermal differenzierte iPS-Zellen, USSC, CB-MSC, BM-MSC und UC-MSC erfolgte durch quantitative Real-time PCR (qPCR) (siehe Abbildung 52).

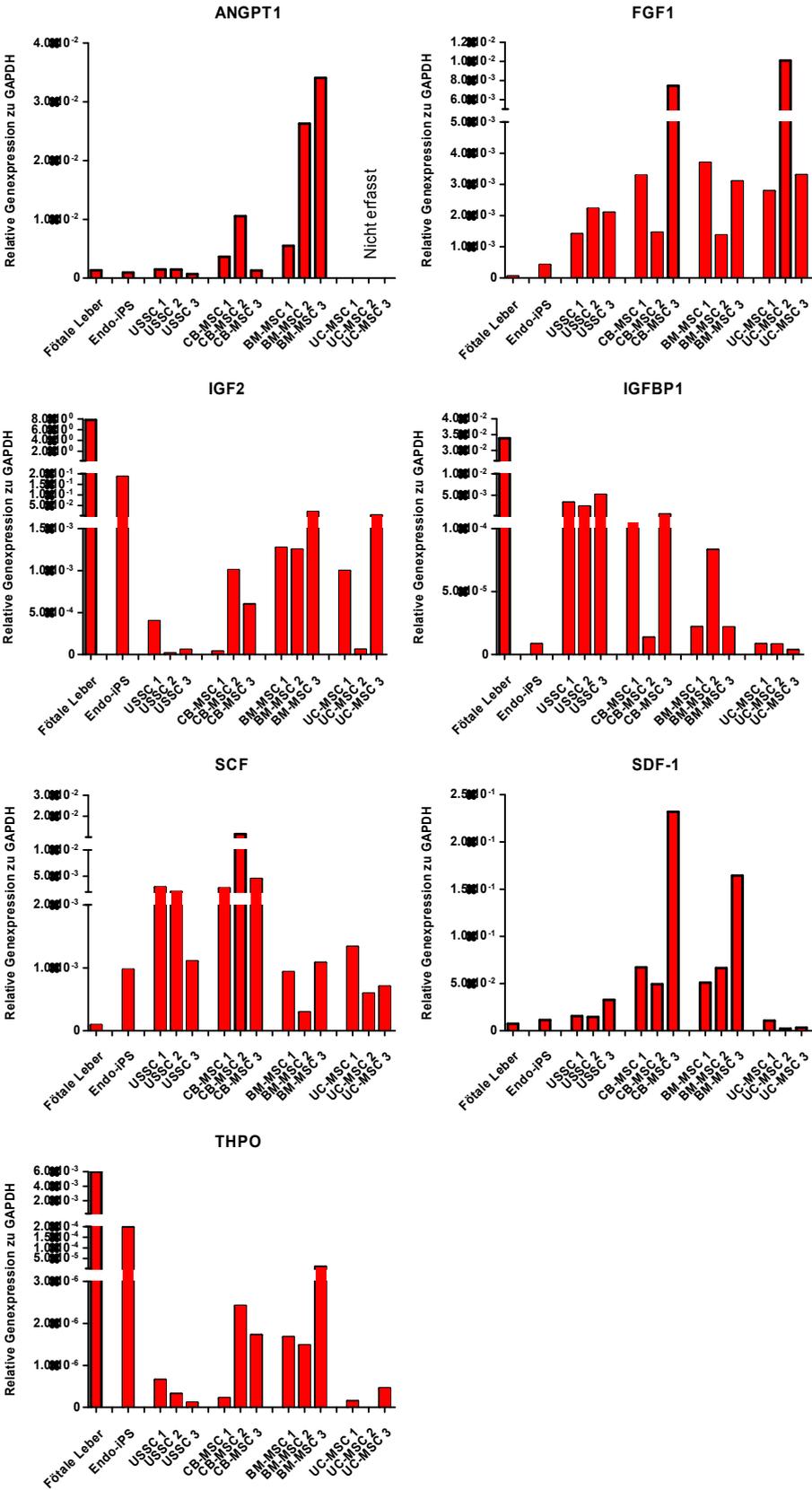


Abbildung 52: RNA-Expression in fötaler Leber, endodermal differenzierten iPS, USSC, CB-MSC, BM-MSC und UC-MSC. Ergebnisse nach quantitativer real-time PCR, normiert auf die Expression von *GAPDH* als housekeeping-Gen. Bis auf die Ausnahme von *IGFBP1* zeigten endodermal differenzierte iPS ein zu fötaler Leber übereinstimmendes Expressionsprofil für die untersuchten Zytokine. CB-MSC und BM-MSC zeigten weitgehend ähnliche Expressionsmuster, während USSC sich für *ANGPT1*, *IGF2*, *SDF-1* und *THPO* von diesen abhoben. UC-MSC hingegen zeigten eigenes Muster, welches teilweise mit dem der USSC (*IGFBP1*, *SDF-1*, *THPO*) korrelierte, teilweise mit dem der BM-MSC (*IGF2*, *SCF*).

Die in Tabelle 18 zusammengefassten Ergebnisse zeigten, dass *ANGPT1* in CB-MSC und BM-MSC deutlich stärker als in anderen Zelltypen nachzuweisen war, wohingegen *FGF1* in allen untersuchten stromalen Zellen trotz Variabilität deutlich höher als in fötaler Leber exprimiert. *IGF2* wurde von fötaler Leber als auch von endodermal differenzierten iPS-Zellen deutlich erhöht exprimiert, während USSC tendenziell die geringste Expression aufwies. Für *IGFBP1* zeigte sich, neben einer deutlichen Expression in fötaler Leber, in USSC im Vergleich zu CB-MSC und BM-MSC eine tendenziell höhere Expression, wogegen in Endo-iPS und UC-MSC ein deutlich geringerer Nachweis erfolgte. *SCF* wurde in USSC und CB-MSC höher als in allen anderen Zelltypen und in fötaler Leber auffällig gering exprimiert. Im Gegensatz hierzu wurde *SDF-1* sowohl von CB-MSC als auch BM-MSC deutlich stärker als in den anderen untersuchten Zelltypen exprimiert. Analog wurde ebenfalls *THPO* von diesen beiden Zelltypen stärker als von USSC und UC-MSC exprimiert, die stärksten Nachweise erfolgten hingegen in fötaler Leber und Endo-iPS.

Tabelle 18: RNA-Expressionswerte ausgewählter Zytokine in verschiedenen Zelltypen.

Ergebnisse Realtime-PCR: Genexpressionen in Relation zu GAPDH						
Gen:	Fötale Leber (n=1)	Endo-iPS (n=1)	USSC (n=3)	CB-MSC (n=3)	BM-MSC (n=3)	UC-MSC (n=3)
<i>ANGPT1</i>	1,35*10 ⁻³	9,53*10 ⁻⁴	1,21*10 ⁻³ (± 2,65*10 ⁻⁴)	5,18*10⁻³ (± 2,78*10 ⁻³)	2,20*10⁻² (± 8,53*10 ⁻³)	N.t.
<i>FGF1</i>	5,06*10 ⁻⁵	4,15*10 ⁻⁴	1,91*10 ⁻³ (± 2,51*10 ⁻⁴)	4,06*10⁻³ (± 1,77*10 ⁻³)	2,72*10 ⁻³ (± 6,99*10 ⁻⁴)	5,39*10⁻³ (± 2,36*10 ⁻³)
<i>IGF2</i>	7,80*10⁻⁰	1,86*10⁻¹	1,55*10 ⁻⁴ (± 1,21*10 ⁻⁴)	5,46*10 ⁻⁴ (± 2,81*10 ⁻⁴)	7,09*10 ⁻³ (± 5,83*10 ⁻³)	1,38*10 ⁻³ (± 8,91*10 ⁻⁴)
<i>IGFBP1</i>	3,38*10⁻²	8,38*10 ⁻⁶	3,57*10⁻³ (± 8,01*10 ⁻⁴)	2,13*10 ⁻⁴ (± 1,57*10 ⁻⁴)	4,22*10 ⁻⁵ (± 2,05*10 ⁻⁵)	6,64*10 ⁻⁶ (± 1,54*10 ⁻⁶)
<i>SCF</i>	9,06*10 ⁻⁵	9,70*10 ⁻⁴	2,00*10⁻³ (± 5,18*10 ⁻⁴)	6,22*10⁻³ (± 2,68*10 ⁻³)	7,68*10 ⁻⁴ (± 2,41*10 ⁻⁴)	8,76*10 ⁻⁴ (± 2,32*10 ⁻⁴)
<i>SDF-1</i>	7,43*10 ⁻³	1,14*10 ⁻²	2,09*10 ⁻² (± 5,91*10 ⁻³)	1,16*10⁻¹ (± 5,81*10 ⁻²)	9,39*10⁻² (± 3,55*10 ⁻²)	5,39*10 ⁻³ (± 2,62*10 ⁻³)
<i>THPO</i>	6,00*10⁻³	1,96*10⁻⁴	3,62*10 ⁻⁷ (± 1,59*10 ⁻⁷)	1,45*10 ⁻⁶ (± 6,49*10 ⁻⁰⁷)	4,94*10 ⁻⁶ (± 3,37*10 ⁻⁶)	2,00*10 ⁻⁷ (± 1,34*10 ⁻⁷)

Die Ergebnisse nach realtime-PCR, normiert auf die Expression von *GAPDH* als *housekeeping*-Gen (die beiden höchsten Werte für jedes Gen sind fett hervorgehoben), zeigten insbesondere eine große Ähnlichkeit zwischen CB-MSC und BM-MSC als auch zwischen fötalen Leberzellen und endodermal differenzierten iPS auf, wobei wiederum die aus Nabelschnurblut gewonnenen Zellen in ihrer erhöhten Expression von *SCF* miteinander korrelierten. N.t.= *Not tested*; Werte in Klammern geben den Standardfehler (SEM) an.

Die differenzielle Expression von *SCF* und *SDF-1* zwischen USSC und CB-MSC wurde inzwischen auch durch zusätzliche, extern durchgeführte Affymetrix-Analysen (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen; je Zelltyp n=3 Linien) bestätigt. Die maximalen relativen Intensitätsstärken waren hier für *SCF* in USSC (7589 ± 1374) 1,74-fach höher als in CB-MSC (4385 ± 1164; p=0,1499), während *SDF-1* in CB-MSC (22933 ± 3029) 1,73-fach signifikant stärker exprimiert wurde als in USSC (13120 ± 1356; p= 0,0417).

3.3.3 Kokulturen von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut auf Stromazellen aus der Nabelschnur (UC-MSC)

Analog zu den bisher beschriebenen Ansätzen wurden in begleitenden Experimenten Kurzzeit-Kokulturen auf UC-MSC (Versuch I) im Vergleich zu USSC durchgeführt (siehe Abbildung 53).

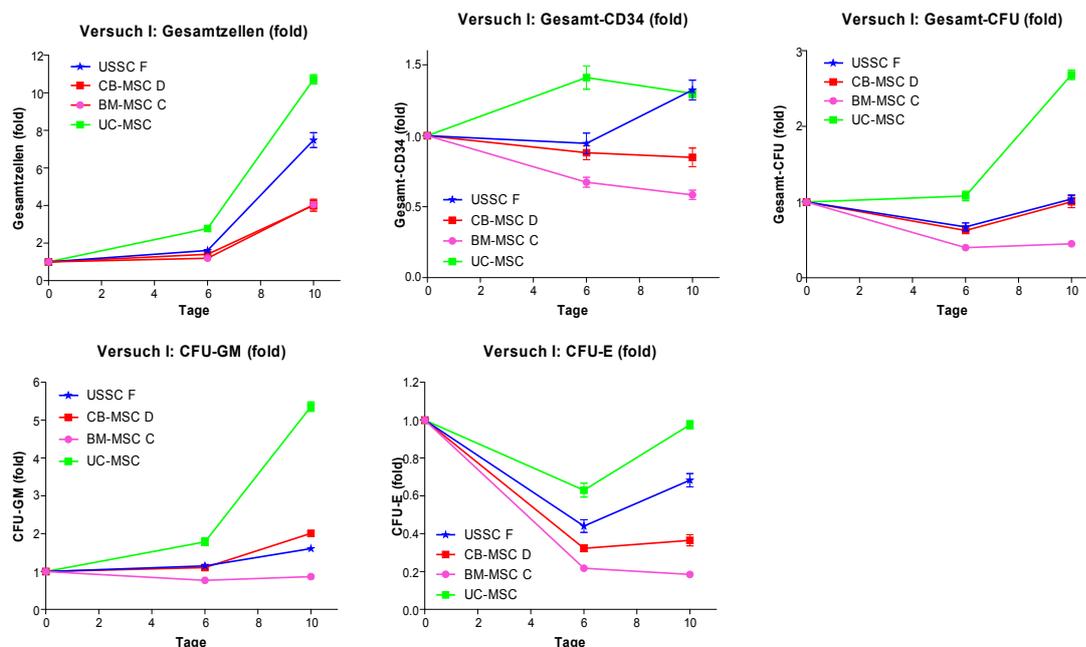


Abbildung 53: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34⁺-Zellen und CFU in Kokulturen auf USSC, CB-MSC und UC-MSC in Versuch I. Im Vergleich zu anderen Stromazellen führten UC-MSC als Feederzellen zu einer deutlich stärker ausgeprägten Vermehrung der gesamten Zellen, der CD34⁺-Progenitoren und der koloniebildenden Einheiten.

UC-MSC führten zu einer ausgeprägten Expansion, speziell der CFU-GM ($5,36 \pm 0,12$ n=4), die sogar jene durch USSC-Feeder ($1,61 \pm 0,08$ n=4; $p < 0.0001$) übertraf (siehe Anhang 13).

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die aus der Expansion auf UC-MSC resultierenden Zellen sich von denen nach Kokultur auf USSC, CB-MSC oder BM-MSC unterschieden. Dies war anhand der Expressionsstärken von CD45 ersichtlich, da nach Expansion auf UC-MSC die Zellpopulation einen deutlich geringeren Anteil an stark CD45-positiven Zellen (~20 %) im Vergleich zu auf CB-MSC und USSC (30-40 %) oder BM-MSC (60 %, siehe Abbildung 54) kultivierten Zellen aufwies. Da innerhalb der groben Klassifizierung der Leukozyten eine stärkere CD45-Expression auf reifen Lymphozyten und Monozyten zu beobachten („CD45^{high}“) ist, während sowohl Granulozyten, unreife Progenitoren als auch CD34-positive Stammzellen eine geringere Oberflächenexpression („CD45^{low}“) aufweisen [161, 162], spricht dies für eine potentielle lymphoide/monozytäre Differenzierung der Zellen.

Expression von CD45 auf expandierten Zellen nach Kokultur

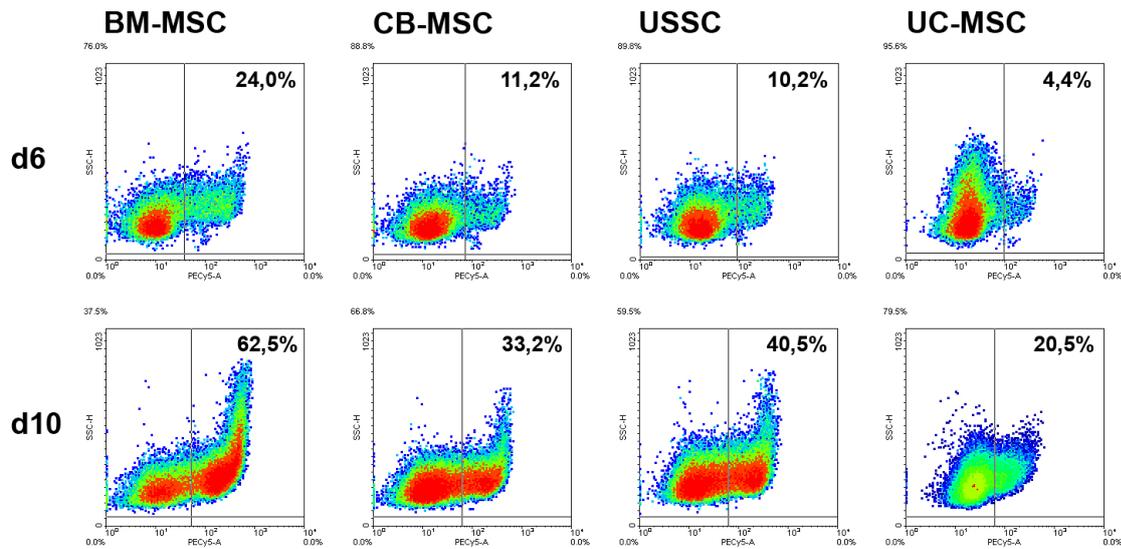


Abbildung 54: Subpopulationen identifiziert anhand der CD45-Oberflächenexpression nach Kokultur/Expansion auf verschiedenen Feeder-Linien. Nach 6 bzw. 10 Tagen Kokultur zeigten sich deutliche Unterschiede in der Gesamtpopulation der expandierten Zellen, wobei auf BM-MSC ein deutlich höherer und auf UC-MSC deutlich geringerer Anteil an stark CD45-positiven Zellen ermittelt wurde (Dargestellung als Dichte-Plots Intensität CD45-PECy5 vs. Seitenstreuung). Die stärkere Expression dieses Pan-Leukozytenmarkers spricht dabei für eine Verschiebung in lymphozytäre oder monozytäre Richtung.

Für eine weitere Untersuchung dieses Effektes auf mögliche Unterschiede in den mit der Expansion verbundenen Differenzierungsprozessen wurden erneut CD34-positive Zellen aus 2 separaten Nabelschnurbluten (A und B) für 10 Tage auf UC-MSC (n=2) und, da diese in Bezug auf die CD45-Expression den größten Unterschied zu UC-MSC zeigten, auf BM-MSC (n=1) kokultiviert (siehe Abbildung 55).

Die Auswertung ergab, dass auf UC-MSC als Feederzellen sowohl für die Gesamtzellzahl als auch für die verschiedenen bzw. gesamten CFU signifikant höhere Expansionsraten erreicht wurden (siehe Tabelle 19), wobei aber für beide Nabelschnurblute unabhängig von der verwendeten Feeder-Zelllinie keine Vermehrung an CD34-positiven hämatopoietischen Stamm-/Progenitorzellen festzustellen war.

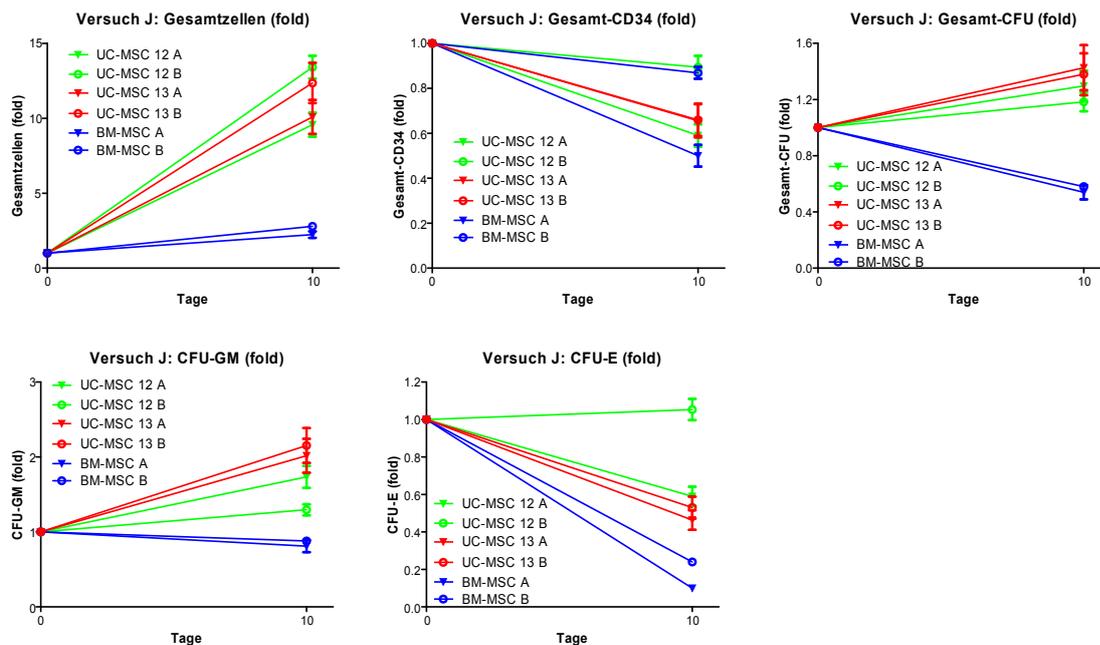


Abbildung 55: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34⁺-Zellen und CFU in Kokulturen auf UC-MSC gegen BM-MSC in Versuch J. In einer 10-tägigen Kokultur führten UC-MSC (rot/grün) bei 2 verschiedenen Ansätzen mit CD34-positiven Zellen aus Nabelschnurblut zu einer deutlich höheren Expansion der Gesamtzellen als Feeder aus BM-MSC (blau). Für weiße koloniebildende Einheiten (CFU-GM) konnte nur auf UC-MSC eine Expansion erreicht werden, während auf BM-MSC ein Abfall der Anzahl beobachtet wurde. Für CD34-positive Zellen konnten in diesem Versuch in keinem der untersuchten Ansätze eine effektive Vermehrung nachgewiesen werden.

Tabelle 19: Übersicht Expansionswerte auf UC-MSC gegen BM-MSC in Versuch J.

Versuch J : Mittlere Expansionswerte BM-MSC (B) versus UC-MSC (X)					
Tag	Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt	CFU-GM	CFU-E
d10	B: 2.51 ± 0.16 n=6 X: 11.36 ± 0.65 n=12 p < 0.0001	B: 0.68 ± 0.09 n=6 X: 0.70 ± 0.04 n=12 p= 0,8603	B: 0.56 ± 0.03 n=6 X: 1.32 ± 0.06 n=12 p < 0.0001	B: 0.85 ± 0.04 n=6 X: 1.80 ± 0.13 n=12 p < 0.0001	B: 0.17 ± 0.03 n=6 X: 0.66 ± 0.07 n=12 p= 0,0003

Sowohl für die Gesamtzellzahl als auch den Anteil koloniebildender Einheiten ergaben sich mit UC-MSC als Feederzellen signifikant höhere Werte. Allerdings konnte bei beiden verwendeten Nabelschnurbluten (A und B) bei keiner der verwendeten Stromazellen eine Expansion der CD34-positiven Zellen erfasst werden; auch fiel, wie in fast allen bisherigen Versuchen, die Menge an erythroiden koloniebildenden Einheiten (CFU-E) zumeist konstant ab.

Im Anschluss wurde die gesamte Fraktion der expandierten Zellen mittels Durchflusszytometrie auf ausgewählte Marker für verschiedene hämatopoietische (Progenitor-) Zellen hin untersucht. Die Auswertung der Messergebnisse gestaltete sich, speziell für die auf BM-MSC expandierten Zellen, aufgrund teilweise starker und mutmaßlich unspezifischer (da für jede Antikörper-Kombination sowohl im FITC- als auch PE-Kanal zu beobachten) Färbungen als schwierig (siehe Abbildung 56).

Unspezifische Färbungen nach Expansion

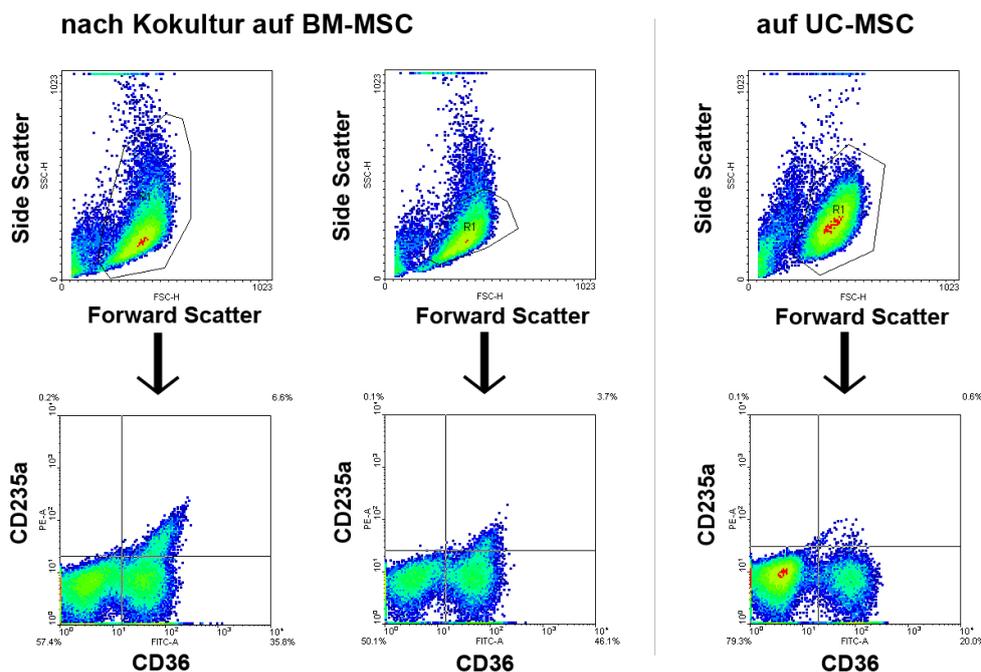


Abbildung 56: Unspezifische Färbung bei auf BM-MSC expandierten Zellen im Vergleich zu auf UC-MSC expandierten Zellen in Versuch J. Exemplarische Dichte-Plots (CD36-PE vs. CD235a-FITC). Nur auf BM-MSC konnte eine deutliche Population an in Relation granulärer Zellen beobachtet werden, welche eine konstante, unspezifische (da gleichmäßig für FITC und PE unabhängig von den verwendeten Antikörpern) Färbung aufwies. Für die Auswertung musste diese Population berücksichtigt und durch entsprechendes *Gating* von der Analyse ausgeschlossen werden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Aufgrund dieser, trotz konsequentem *Gatings* nicht vollständig auszuschließenden Störungsquelle wurden für die im Folgenden dargestellten Vergleiche nur eindeutige Populationen (Anteil > 4%) berücksichtigt (siehe Tabelle 20). Obwohl die verwendeten Kombinationen nur bedingt eindeutige Ergebnisse erbrachten, lässt sich eine generelle Tendenz erkennen. So wiesen die durch Kokultur auf BM-MSC erhaltenen Zellen einen weit höheren Anteil an Zellen mit Markern der myeloiden Linie (CD33) auf, was wiederum die zuvor aufgrund des hohen Anteils an CD45^{high}-Zellen aufgestellte Vermutung bestätigt. UC-MSC hingegen wiesen einen höheren Anteil an potentiell lymphoiden Progenitoren (CD7) auf. Allerdings sind die Daten durchaus auch widersprüchlich. Beispielsweise zeigten die auf UC-MSC expandierten Zellen einen höheren Anteil an CD24-positiven Zellen, was bei einer lymphoiden Differenzierung auf B-Zellentwicklung hindeuten würde. Dennoch ließ sich auf diesen Zellen keine Expression von CD19 nachweisen, welches wiederum bereits ab dem Pro-B Zellstadium exprimiert sein müsste.

Tabelle 20: Übersicht über die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf hämatopoietischen Zellen nach Expansion auf UC-MSC oder BM-MSC in Versuch J.

Ansatz (FITC/PE/PECy5)	Nachweis von	Ungefährer Anteil (UC-MSC vs. BM-MSC)
CD33/CD13/CD45	CD33 ⁺ : Myeloide Progenitoren / Monozyten CD13 ⁺ : Granulozyten/Monozyten /CFU-GM CD33 ⁺ /CD13 ⁺ : Monozyten / CFU-GM	0-20%* vs. 70% 80-100* vs. 100% 0-20%* vs. 60%
CD7/CD10/CD45	CD7 ⁺ : T-Zellen / NK-Zellen CD10 ⁺ : Lymphoide Progenitoren/Granulozyten CD7 ⁺ /CD10 ⁺ : T-Zell Progenitoren	80% vs. 45% 0% vs. 5% 0% vs. 0%
CD36/CD235a/CD45	CD36 ⁺ : Erythroide Progenitoren / Monozyten CD235a ⁺ : Erythroide Progenitoren CD36 ⁺ /CD235a ⁺ : Erythroide Progenitoren	25% vs. 35% 0% vs. 0% 0% vs 0%
CD7/CD56/CD45	CD7 ⁺ : T-Zellen / NK-Zellen CD56 ⁺ : NK-Zellen CD7 ⁺ /CD56 ⁺ : NK-Zellen	80% vs. 45% 0% vs. 0% 0% vs 0%
CD7/CD4/CD45	CD7 ⁺ : T-Zellen / NK-Zellen CD4 ⁺ : T-Helferzellen / Monozyten CD7 ⁺ /CD4 ⁺ : T-Helferzellen	80% vs. 45% 0% vs. 5% 0% vs. 0%
CD3/CD8/CD45	CD3 ⁺ : T-Zellen CD8 ⁺ : NK-Zellen / Cytotoxische T-Zellen CD3 ⁺ /CD8 ⁺ : Cytotoxische T-Zellen	0% vs. 0% 0% vs. 0% 0% vs. 0%
CD24/CD19/CD45	CD24 ⁺ : B-Zellen / Granulozyten CD19 ⁺ : B-Zellen CD19 ⁺ /CD24 ⁺ : B-Zellen	80% vs. 40% 0% vs. 0% 0% vs 0%
CD34/CD41/CD45	CD34 ⁺ : HPC / Endotheliale Progenitoren CD41 ⁺ : Megakaryozyten	4% vs. 20% 0% vs 0%
CD31/CD34/CD45	CD31 ⁺ : Endothelzellen / Monozyten / Granulozyten CD34 ⁺ : HPC / Endotheliale Progenitoren CD31 ⁺ /CD34 ⁺ : Endotheliale Progenitoren	20% vs. 20% 4% vs. 20% 0% vs 0%

Spezifische Antikörper-Kombinationen wurden für die durchflusszytometrische Analyse der expandierten Zellen eingesetzt, um Rückschlüsse auf das Vorhandensein bzw. die Verteilung der verschiedenen Leukozytenarten zu treffen. Auch wenn kaum konkrete Zuordnungen möglich waren, so bestätigte sich doch die anhand der differentiellen CD45-Expression postulierte Annahme, dass Expansion auf BM-MSC zu einer eher monozytären Entwicklung der Zellen führte.

3.3.4 Zusammenfassung:

USSC konnten unter Verwendung des von S. Yamanaka beschriebenen Protokolls in pluripotente Stammzellen (iPS) reprogrammiert und nach dem von unserer Gruppe beschriebenen Verfahren in endodermale Richtung differenziert werden (Endo-iPS), um als mögliches Modell der hämatopoietischen Nische in Versuchen eingesetzt zu werden. Zusätzlich wurden MSC-ähnliche Zelllinien aus dem Gewebe der Nabelschnur (UC-MSC) isoliert und expandiert um zu eruieren, inwiefern diese als Herkunftsquelle der USSC und/oder CB-MSC in Betracht gezogen werden muss.

Bei der Untersuchung dieser Zelltypen im Vergleich zu fötaler Leber, USSC, CB-MSC und BM-MSC zeigten sich für ausgewählte hämatopoietisch aktive Zytokine teilweise deutliche Unterschiede sowohl zwischen stromalen Zellen und fötaler Leber / endodermal differenzierten iPS als auch zwischen den Stromalinen selbst. Trotzdem ließ sich als Tendenz erkennen, dass auf Transkriptebene:

- a) Die aus Nabelschnurblut stammenden USSC und CB-MSC deutlich höhere Mengen an SCF produzierten
- b) CB-MSC und BM-MSC erhöhte Mengen SDF-1 exprimierten
- c) Endodermal differenzierte iPS mit Ausnahme von IGFBP1 für die untersuchten Zytokine ein ähnliches Profil wie Zellen der fötalen Leber aufwiesen
- d) UC-MSC ein von USSC als auch CB-MSC unterschiedliches Zytokinexpressionsprofil zeigten und somit eine nahe Verwandtschaft dieser Zellen eher unwahrscheinlich ist. Auch können UC-MSC allein aufgrund ihrer Oberflächenexpression von CD56 / CD146 von USSC unterschieden werden.

Abschließend wurden UC-MSC als Feederzellen in Kokulturversuchen mit CD34-positiven Zellen aus Nabelschnurblut eingesetzt, was zu einer starken Vermehrung von Gesamtzellen, CD34⁺-Progenitoren und koloniebildenden Einheiten führte. Die immunophänotypische Analyse zeigte, dass die Expansion auf UC-MSC andere Auswirkungen auf die expandierten Zellen hatte als mit USSC, CB-MSC oder BM-MSC als Feeder. So bestehen die auf UC-MSC expandierten Zellpopulationen eher aus Zellen mit geringer Intensität in der Oberflächenexpression von CD45, während auf BM-MSC expandierte Zellen größtenteils CD45 stark exprimieren und sich potentiell in monozytäre Richtung entwickeln.

4 Diskussion

Seit der erstmaligen Beschreibung von aus Nabelschnurblut gewonnenen Stromazellen mit mesenchymalem Differenzierungspotential im Jahre 2004 [35] wurden detaillierte Analysen zum Vergleich mit mesenchymalen Stromazellen aus Knochenmark durchgeführt.

Für die vorliegende Dissertation wurden Stromazellen aus Nabelschnurblut immunophänotypisch auf die Expression verschiedener Oberflächenantigene, auf Sekretion ausgewählter Zytokine sowie auf die Fähigkeit zur Hämatopoese-Unterstützung *in vitro* untersucht. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Zellen über eine gleichwertige bzw. höhere hämatopoese-unterstützende Fähigkeit als BM-MSK verfügen [62].

Aufgrund von hier beobachteten Unterschieden erfolgte eine Unterteilung in Stromazellen mit mesenchymalem Charakter (CB-MSK) und multipotente unrestringierte somatische Stromazellen (USSC). Diese Klassifizierung wurde parallel durch Etablierung des Nachweises der Expression des Präadipozytenmarkers DLK-1 [66] und der Homeobox-Gene [67] als weitere Kriterien zur definitiven Unterscheidung durch unsere Arbeitsgruppe bestätigt. Vergleiche erfolgten mit Stromazellen aus Knochenmark (BM-MSK) und Nabelschnurgewebe (UC-MSK) sowie undifferenzierten und endodermal differenzierten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS).

Zusätzlich wurden *in vivo* im NOD/SCID- bzw. Nacktmausmodell Versuche mit USSC zur Untersuchung zum *Homing*, zum Einfluss auf die Rekonstitution nach Kotransplantation mit hämatopoietischen Stammzellen (HSC) und zur Tumorigenität im Vergleich zu CB-MSK und BM-MSK durchgeführt.

4.1 **Phänotypische Charakterisierung von unrestringierten somatischen Stromazellen im Vergleich zu weiteren Stromazellen aus Nabelschnurblut, Nabelschnur und Knochenmark**

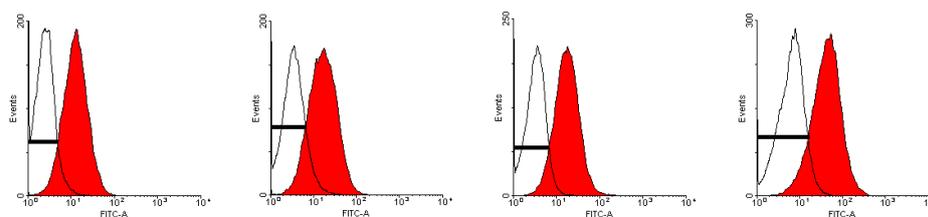
Stromale, adhären wachsende Zellen mit fibroblastoider Morphologie können aus verschiedenen Geweben isoliert und *in vitro* kultiviert werden, darunter die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Zellen aus Knochenmark (BM-MSK), Nabelschnurblut (USSC und CB-MSK) und aus dem Gewebe der Nabelschnur (UC-MSK). Bei immunohistochemischer Untersuchung erfüllten alle stromalen Zelltypen die Kriterien des 2006 von der *International society for cellular therapy* (ISCT) für MSC vorgeschlagenen Expressionsprofils verschiedener Oberflächenmarker [114], Unterschiede waren hingegen in ihrem Differenzierungspotential nachweisbar. Während BM-MSK und CB-MSK *in vitro* sowohl osteogen, chondrogen als auch adipogen differenziert werden konnten, zeigten USSC nach adipogener Induktion keine detektierbare Bildung von Lipid-Vakuolen. Die direkt aus dem

Gewebe der Nabelschnur gewonnenen UC-MSC zeigten weder nach osteogener, chondrogener noch adipogener Induktion eine Differenzierung in die entsprechende Richtung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine Erweiterung des von der ISCT vorgeschlagenen Profils an zu untersuchenden Oberflächenmarkern etabliert, welche die Unterscheidung zwischen mesenchymalen (CB-MSC, BM-MSC), multipotenten (USSC) und Zellen ohne nachweisbares Differenzierungspotential (UC-MSC) sowie eine qualitative Einschätzung allein anhand durchflusszytometrischer Analysen ermöglicht.

So zeigten multipotente USSC eine geringer ausgeprägte Oberflächenexpression des Zelladhäsionsmoleküls CD146 (*melanoma cell adhesion molecule*, MCAM) als CB-MSC, BM-MSC und UC-MSC (siehe Abbildung 57).

CD146 in USSC



in BM-MSC

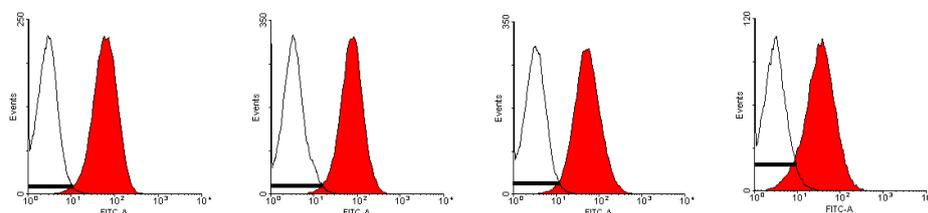


Abbildung 57: Unterschiedliche CD146-Expression auf USSC und BM-MSC. Anhand der Histogramm-Überlagerungen („Overlay“) gegen die entsprechende Isotypkontrolle und Markierung des Schnittpunktes der beiden Histogramme kann die unterschiedlich stark ausgeprägte Oberflächenexpression von CD146 auf USSC (obere Reihe) und BM-MSC (untere Reihe) verdeutlicht werden. BM-MSC sind in dieser Abbildung stellvertretend für CB-MSC und UC-MSC, welche eine vergleichbar stark ausgeprägte CD146-Expression aufweisen, exemplarisch dargestellt (siehe Abschnitt 3.2.1).

Die schwächere Expression auf USSC korreliert dabei mit den Beobachtungen von Russel *et al.* für BM-MSC [152]. Ebenso wie USSC, in denen kein adipogenes Differenzierungspotential nachgewiesen werden konnte, zeigten in den von dieser Gruppe durchgeführten Experimenten auch CD146^{low}-sortierte BM-MSC nur ein bilineares (zumeist osteogenes und chondrogenes), Zellen mit CD146^{high}-Expression hingegen ein trilineares (osteogenes, chondrogenes und adipogenes) Differenzierungspotential.

Für MSC-ähnliche Zellen lässt sich somit CD146 sowohl zur Identifizierung als auch zur Einschätzung des Differenzierungspotentials verwenden. Allein die starke Expression auf UC-MSC, für die bislang kein Differenzierungspotential nachgewiesen werden konnte, steht hierzu scheinbar im Widerspruch. Da diese Zellen jedoch noch nicht vollständig charakterisiert sind, ist eine gemeinsame Einordnung mit USSC, CB-MSC und BM-MSC kritisch zu sehen [111], zumal sie im Gegensatz zu den anderen Zelltypen direkt aus festem Gewebe, der *Wharton's jelly* („Whartonsche Sulze“), gewonnen wurden.

Diese Abgrenzung der UC-MSC von den anderen Stromazellen wurde auch durch die beobachtete CD56 („*Neural cell adhesion molecule*“, NCAM)-Expression unterstützt, welche unter den verschiedenen untersuchten Zelltypen nur auf UC-MSC konstant nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 58). Dieses Antigen ist unter anderem zur Identifizierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) im Blut etabliert, zudem wird es in Geweben sowohl von neuronalen/Glia-Zellen als auch glattmuskulären und skelettalen Muskelzellen exprimiert. Obwohl UC-MSC im Gegensatz zu Perizyten ($CD146^+/CD56^-$) oder Satellitenzellen ($CD146^+/CD56^+$) [163-166] in entsprechenden Ansätzen keine Fähigkeit zur vollständigen myogenen Differenzierung *in vitro* zeigten [111], ist nicht auszuschließen, dass es sich bei diesen $CD56^+/CD146^+$ -Zellen um eine ähnliche, spezialisierte Zellart handelt.

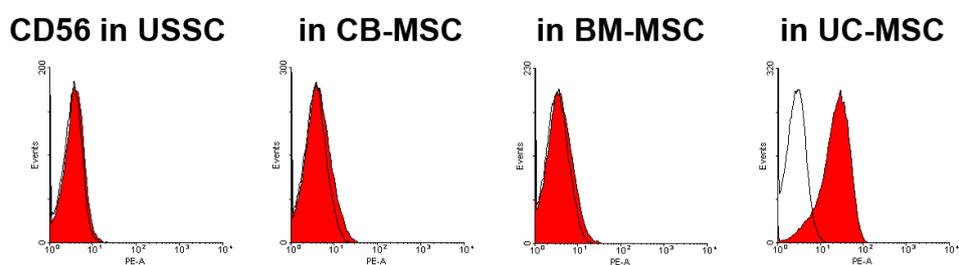


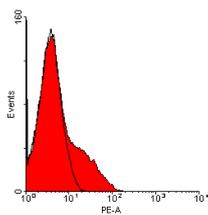
Abbildung 58: Identifizierung von UC-MSC anhand CD56-Expression. Nur für UC-MSC (rechts) konnte eine starke Oberflächenexpression von CD56 detektiert werden. USSC, CB-MSC und BM-MSC waren im Gegensatz hierzu unter normalen Bedingungen in der durchflusszytometrischen Analyse negativ (siehe Abschnitte 3.2.1 und 3.3.1).

Neben dieser diskriminierenden Funktion erlaubte die Untersuchung von CD56 auch eine qualitative Beurteilung von CB-MSC und BM-MSC. Während repräsentative Linien (konstantes Wachstum in Kultur, unveränderte Morphologie) negativ für CD56 waren, konnte in seltenen Fällen auf der Oberfläche neu generierter Linien eine schwache Expression von CD56 bzw. CD56-positive Subpopulationen nachgewiesen werden. Die entsprechenden Linien (ausschließlich BM-MSC bzw. CB-MSC) wiesen im Gegensatz zu den CD56-positiven UC-MSC ein deutlich vermindertes Wachstum auf, das zumeist frühzeitig vollständig stagnierte. Die Expression von CD56 war dabei jeweils ab der ersten Analyse durchflusszytometrisch nachzuweisen, für alle anderen untersuchten

Oberflächenmarker nach ISCT-Protokoll zeigte sich hingegen zu anderen Linien kein Unterschied im Immunphänotyp.

Als weiterer Marker für eine qualitative Beurteilung erwies sich neben CD56 auch die Oberflächenexpression von CD184 (auch: CXCR4; siehe Abbildung 59).

**CD56 Subpopulation
in Linie mit geringer Proliferations-
kapazität (Passage 5)**



**CD184 Extrazellulär exprimiert
nach Kultur mit hoher Konfluenz**

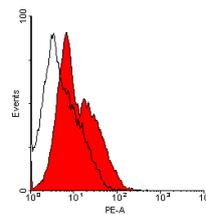


Abbildung 59: CD56- und CD184-Expression als qualitative Marker für CB-MSC und BM-MSC. Sowohl BM-MSC als auch CB-MSC/USSC waren für CD56 und CD184 unter normalen Bedingungen negativ, positive Subpopulationen konnten nur auf Linien mit deutlich verringertem Wachstum beobachtet werden. Hierbei konnte CD56 bereits direkt in den ersten durchgeführten Analysen nach Generierung nachgewiesen werden, ein späterer Nachweis auf einer zuvor negativen Linie wurde nicht beobachtet. Eine Expression von CD184 konnte hingegen nur auf durch Kultur unter hoher Konfluenz wachstumsbeeinträchtigten Linien detektiert werden.

Insbesondere die Kultivierung unter hoher Konfluenz (>90 %) resultierte in einer stark verringerten Proliferation, welche auch durch anschließendes Kultivieren mit geringerer Dichte nicht reversibel war. Zudem konnten morphologische Veränderungen beobachtet werden, vornehmlich trat hierbei die Bildung von Nodulen auf, ähnlich wie sie während osteogener Differenzierung zu beobachten sind. Ebenfalls ließen sich diese Zellen selbst unter Verwendung von Trypsin/EDTA nicht oder nur nach deutlich längerer Einwirkungszeit von der Oberfläche der Zellkulturflaschen ablösen. Ausschließlich in diesen Ansätzen wurden Subpopulationen mit positiver Oberflächenexpression des ansonsten nur intrazellulär in Stromazellen exprimierten Rezeptors CD184 nachgewiesen, wodurch dieser als Marker zur Kontrolle der Kulturbedingungen verwendet werden konnte.

Das Auftreten einer extrazellulären Expression nach hoher Konfluenz lässt sich anhand von verschiedenen Effekten erklären. Potapova *et al.* [167] publizierten beispielsweise 2008, dass BM-MSC nach dreidimensionaler Kultur in Sphären, was annähernd den Bedingungen unter hoher Konfluenz entspricht, ebenfalls CD184 auf der Oberfläche exprimierten. Zudem zeigten Shi *et al.* [147] 2007, das KDR („Kinase insert domain receptor“)-positive MSC nach Stimulation mit einem Zytokin-Cocktail aus Flt3-L („Fms-related tyrosine kinase 3 ligand“), SCF („Stem cell factor“), IL-6 („Interleukin 6“), HGF („Hepatocyte growth factor“) und IL-3 („Interleukin 3“) eine verstärkte

Expression von intrazellulärem als auch extrazellulärem CD184 aufwiesen. Da insbesondere IL-6 und HGF bereits konstitutiv von allen aus Nabelschnurblut und Knochenmark generierten Linien exprimiert und ins Medium sekretiert werden, kann es sich hierbei auch um einen parakrinen Effekt handeln. Die Verwendung von CD184 als qualitativer Marker zur Kontrolle der Zellkulturbedingungen (Nicht-Überschreitung einer Konfluenz von ca. 80 % und Versorgung mit frischem Medium zur Verhinderung der Anreicherung von Zytokinen) ist somit plausibel. Die Bedeutung der Abwesenheit dieses für migratorische Vorgänge relevanten Rezeptors wird gesondert in Abschnitt 4.3 diskutiert.

Ebenfalls in diesem Zusammenhang zu diskutieren ist das seltene Auftreten (n= 3) von CD271-positiven CB-MSC-Linien. Auffällig war, dass CD271 in jeder dieser Linien heterogen (stark und sehr stark) exprimiert wurde. Diese Aufteilung in zwei Subpopulationen stellte sich auch nach klonaler Expansion mittels Einzelzell-Ablage (AVISO CellCelector; ALS Automated Lab Solutions; Jena, Deutschland) mit annähernd gleichen Verhältnissen wieder ein. Trotz dieser Besonderheit zeigten die entsprechenden Linien keine weitergehenden Auffälligkeiten im Immunophänotyp, Wachstum oder Differenzierungspotential. Dieser Oberflächenmarker (auch: „*Low affinity nerve growth factor receptor*“, LNGFR [148]) wird in der Literatur als geeignet zur prospektiven Isolierung von Vorläufern mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe beschrieben [112, 150, 168]. Allerdings treten diese Zellen in Nabelschnurblut in deutlich geringerer Frequenz auf (0,02 % gegenüber 0,75 % CD271/CD133-positive Zellen; Mabuchi *et al.* 2009 [169]) und Versuche zur gezielten Generierung CD271-positiver stromaler Linien aus Nabelschnurblut nach Selektion entsprechender Zellen durch *fluorescence activated cell sortings* (FACS) blieben erfolglos.

Die hier vorgestellte Erweiterung des ISCT-Protokolles um die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker CD56, CD146 und CD184 ermöglicht somit innerhalb der Stromazellen

- USSC von CB-MSC/BM-MSC und UC-MSC zu unterscheiden (CD146^{low}-Expression)
- UC-MSC von CB-MSC/BM-MSC und USSC zu unterscheiden (CD56^{high}-Expression)
- qualitative Aussagen über neu generierte USSC, CB-MSC und BM-MSC zu treffen (CD56-Expression)
- Veränderung der Zellen aufgrund von Kulturbedingungen auszuschließen (CD184-Expression).

4.2 Zytokinproduktion durch unrestringierte somatische Stromazellen im Vergleich zu Stromazellen aus Nabelschnurblut, Nabelschnur und Knochenmark

Sowohl Nabelschnurblut- als auch Knochenmarkstromazellen weisen die Sekretion verschiedener hämatopoetisch aktiver Zytokine auf, darunter insbesondere proliferationsfördernde Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise koloniestimulierende Faktoren (GM-CSF, MCSF) und Interleukine (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-1; siehe Abschnitt 3.1.2).

Bei weiterer Analyse mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR; siehe Abschnitt 3.3.2) zeigten USSC im Vergleich zu CB-MSC und BM-MSC in der Auswertung schwächer ausgeprägte Nachweise für *ANGPT1* (Angiopoetin 1), *IGF2* („*Insulin-like growth factor 2*“), *SDF-1* („*Stromal-derived factor 1*“) und *THPO* (Thrombopoetin) als die in ihrem Expressionsprofil zueinander ähnlichen CB-MSC und BM-MSC. Hingegen konnte in der Expression von *SCF* („*Stem cell factor*“), für USSC ($2,00 \cdot 10^{-3}$ -fach; in Relation zu *GAPDH*) und CB-MSC ($6,22 \cdot 10^{-3}$ -fach) als neonatale Zelllinien aus Nabelschnurblut eine von BM-MSC ($7,68 \cdot 10^{-4}$ -fach) unterschiedliche Expression erfasst werden. Sowohl die relative stärkere Expression von *SCF* als auch die geringere von *SDF-1* in USSC im Vergleich zu CB-MSC wurde durch eine an jeweils 3 Linien extern durchgeführte Affymetrix-Analyse bestätigt. Für die Verhältnisse ergab sich hier für *SCF* eine im Mittel 1,74-fach höhere Expression in USSC, wohingegen *SDF-1* in CB-MSC um Faktor 1,73 signifikant stärker nachgewiesen wurde. Zusätzlich konnte die differenzielle Expression von *SCF* mittels ELISA ebenfalls für sekretiertes Protein bestätigt werden, wo sich zwischen Stromazellen aus Nabelschnurblut (119.58 ± 20.14 pg/ml) und Knochenmark (0.43 ± 0.43 pg/ml) ein signifikanter Unterschied ergab.

Ein annähernd vollständig von USSC, CB-MSC und BM-MSC unterschiedliches Expressionsprofil ergab sich für die untersuchten UC-MSC. Im Gegensatz zu CB-MSC und BM-MSC zeigten diese beispielsweise eine nur marginale Expression von *IGFBP1*, *SDF-1* und *THPO*. Während *SDF-1* und *THPO* auch in USSC deutlich geringer exprimiert sind, unterschieden sich UC-MSC von diesen anhand einer stärkeren Expression von *FGF1* (2,8-fach höher) und *IGF2* (8,9-fach höher).

Allein die Erweiterung des Analyse-Spektrums um den Nachweis dieser Zytokine erlaubte bereits eine weitere Diskriminierung zwischen den verschiedenen Zelltypen. Durch eine Kombination der hier beschriebenen Expressionsmuster und der in Abschnitt 4.1 diskutierten Oberflächenmarker lässt sich somit ein Schema erstellen, mit dem USSC, CB-MSC, BM-MSC und UC-MSC durch durchflusszytometrische Analysen und quantitative PCR eindeutig identifiziert werden können (siehe Tabelle 21):

Tabelle 21: Übersicht zur Identifizierung der verschiedenen Stromazellen anhand des relativen Expressionsprofils selektierter Marker.

	CD56	CD146	Angiopoetin 1	Insulin-like growth factor	Stem cell factor	Stromal-derived factor 1	Thrombopoietin
USSC	-	+	(-)	(-)	++	(-)	(-)
CB-MSC	-*	++	+	variabel	++	+ / ++	+ / ++
BM-MSC	-*	++	++	++	(-)	+ / ++	+ / ++
UC-MSC	+	++	N.t.	variabel	(-)	(-)	(-)

*Für CB-MSC und BM-MSC wurde CD56-Expression ausschließlich auf Linien mit beeinträchtigter Proliferationsfähigkeit detektiert.

Nachweise der relativen Expression von Oberflächenmarkern (Durchflusszytometrie, rot) und Zytokinen (qPCR, grün) angegeben als negativ [-], gering [(-)], schwach positiv [+], stark positiv [++] oder variabel exprimiert. N.t.= Not getestet.

4.3 Hämatopoiese-Unterstützung durch unrestringierte somatische Stammzellen im Vergleich zu multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut, Nabelschnur und Knochenmark *in vitro*

Neben der Etablierung von Methoden zur Identifizierung der verschiedenen Stromazelltypen lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der Fähigkeit dieser Zellen, hämatopoietische Stammzellen zu unterstützen. *In vitro* erfolgten diese Analysen mittels Kokultivierung von humanen hämatopoietischen Stammzellen aus Nabelschnurblut mit den stromalen Zellen als so genannte *Feeder*.

Die Fähigkeit zur Hämatopoiese-Unterstützung, ermittelt anhand der Expansion der Gesamt-, CD34-positiven oder koloniebildenden Zellen, erwies sich in USSC und UC-MSC deutlich stärker ausgeprägt als in CB-MSC und BM-MSC. Kokulturen mit direktem Zell-Zell-Kontakt führten zudem zu signifikant höheren Expansionswerten als die Verwendung von konditioniertem Medium oder bei membrangetrennter Kokultur (ca. Faktor 1,5).

Insbesondere für die Gesamtzellzahl ließen sich auf USSC-Feederzellen auch bei kurzzeitiger Kokultur (14 Tage) signifikant höhere Expansionswerte als auf CB-MSC erreichen, wobei die auf USSC-Feeder ermittelte Expansion in der Regel um Faktor 3 stärker ausfiel.

Ebenso erfolgte bei Verwendung von DMEM/FCS anstatt des H5100-Mediums, welches zusätzlich Pferdeserums und damit weitere Wachstumsstoffe beinhaltet, im Vergleich zu CB-MSC und BM-MSC nur auf USSC und UC-MSC innerhalb von 14 Tagen eine Vermehrung an Stamm-/Vorläuferzellen (mit bis zu 3-facher Expansion der CD34-positiven Zellen um Faktor 2 höher).

Obwohl sich weiße koloniebildende Einheiten (CFU-GM) auf allen verwendeten Feederzellen vermehren ließen (bei bis zu 10-facher Vermehrung ebenfalls auf USSC um Faktor 2 bis 3 höher als

auf CB-MSC), stieg die Gesamtmenge an roten koloniebildenden Einheiten (CFU-E) nur bei Verwendung von H5100-Medium leicht an. Mit DMEM/FCS hingegen fiel die Anzahl an CFU-E in der Regel konstant ab, wobei auf USSC- und UC-MSC-Feeder der Verlust an Zellen tendenziell geringer ausfiel bzw. verzögert auftrat.

Trotz der in Relation zu USSC sogar höheren Expression von SCF („*Stem cell factor*“) auf Transkriptebene (Faktor 3,11; siehe Abschnitt 3.3.2) zeigten CB-MSC in diesen Experimenten eine zu BM-MSC vergleichbare Hämatopoiese-Unterstützung. Im Gegensatz hierzu führten UC-MSC trotz einer zu BM-MSC ähnlichen, geringeren Expression von SCF (Faktor 1,14 gegenüber BM-MSC, 0,44 gegenüber USSC und 0,14 gegenüber CB-MSC) zu den höchsten Expansionswerten, sowohl die Gesamtzellzahl als auch den Anteil koloniebildender Einheiten betreffend (siehe auch Abschnitt 3.3.3). Insbesondere diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass ein oder mehrere andere exprimierte Zytokine bzw. Faktoren für die hohe supportive Kapazität verantwortlich sind und dass SCF, obwohl in der Literatur als einer der potentesten hämatopoietischen Wachstumsfaktoren beschrieben [118], nicht allein das hauptverantwortliche Zytokin für die hier erfassten Expansionen ist. Da in der direkten Kokultur höhere Expansionswerte als bei indirekter Kokultur nachgewiesen wurden, muss solch ein Faktor bzw. solch eine Kombination an Faktoren zudem auf der Oberfläche der stromalen Zellen vorhanden sein und die Proliferation der hämatopoietischen Stammzellen ausschließlich bei vorhandenem Zell-Zell-Kontakt fördern.

Ein möglicher Kandidat für einen solchen proliferationsfördernden Faktor ist das hier für die Identifizierung von USSC beschriebene *Delta-like homologue 1* (DLK-1). 1997 wurde publiziert, dass die murine Form von DLK-1 (auch: Pref-1) einen positiven Einfluss auf die *in vitro*-Kokultur von HSC besitzt. Moore *et al.* [155] konnten zeigen, dass es in seiner löslichen Form (auch als „*Fetal antigene 1*“, FA1, bezeichnet [170]) alleine keinen Effekt auf die Proliferation hämatopoietischer Stammzellen ausübte, während die Zugabe zu HSC in Anwesenheit DLK1-negativer Feederzellen zu einer deutlich erhöhten Expansionsrate führte.

Während DLK-1 sowohl in CB- als auch BM-MSC auf Transkriptebene nur im Bereich der Nachweisgrenze und auf Proteinebene überhaupt nicht zu detektieren ist (Dissertation Simone Maria Kluth, „Charakterisierung von multipotenten Stromazellen aus dem Nabelschnurblut anhand des Markers DLK-1“, 2011), sind USSC (bereits per Definition) und UC-MSC deutlich positiv für *DLK-1*. Da das Protein, wie in durchflusszytometrischen Analysen nachgewiesen, von diesen Zellen nicht auf der Oberfläche exprimiert wurde, sich der stärkere hämatopoiese-unterstützende Effekt für USSC jedoch nur bei vorhandenem Zell-Zell-Kontakt in direkter Kokultur auswirkte, ist möglicherweise vorab eine Interaktion der HSC mit den Stromazellen notwendig, um die für die Proliferationsförderung verantwortliche Kaskade zu aktivieren. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse der Kokulturen mit *DLK-*

1-überexprimierenden CB-MSC (siehe Abschnitt 3.2.3, Versuch H). Obwohl diese im Gegensatz zu nativen USSC bei durchflusszytometrischer Untersuchung eine deutliche Expression des DLK-1-Proteins auf der Zelloberfläche aufwiesen, zeigten sie bei Verwendung als Feederzellen keinen Einfluss auf die Hämatopoiese-Unterstützung. Dies lässt sich ebenfalls durch eine benötigte, in CB-MSC nicht vorhandene, Kompetenz der Zellen erklären, DLK-1 in der hierzu erforderlichen funktionellen Form zu exprimieren.

Alternativ ist es ebenso möglich, dass ein bislang nicht untersuchtes Protein als zusätzlicher Faktor benötigt wird und dieses sowohl in CB-MSC als auch BM-MSC nicht exprimiert wird. Die Beteiligung eines oder mehrerer weiterer regulierender Faktoren bietet zudem eine Erklärung für die Ergebnisse der auf UC-MSC kokultivierten Zellen, wo die durchflusszytometrischen Analysen auf eine Differenzierung der hämatopoietischen Zellen in eher lymphoide als myeloide Richtung hindeuteten.

Die in CB-MSC und BM-MSC ähnlich ausgeprägte Fähigkeit zur Hämatopoiese-Unterstützung lässt sich zudem dadurch erklären, dass die Wirkung des in CB-MSC exprimierten SCF durch einen oder mehrere andere Faktoren relativiert wird. Entsprechend hierzu verhält sich die Expression von sowohl *SDF-1* als auch *ANGPT1*. *SDF-1* fungiert in löslicher Form über Interaktion mit dem Rezeptor CD184 als Chemoattraktor für hämatopoietische Stammzellen [171], bewirkt jedoch in der membranassoziierten Form auf Stromazellen, ebenso wie *ANGPT1*, dass HSC in einen ruhenden Zustand („*Quiescence*“) versetzt werden [101]. Sowohl in BM-MSC als auch auf CB-MSC konnten beide Faktoren auf Transkriptebene im Vergleich zu USSC als mindestens 4,28-fach stärker exprimiert nachgewiesen werden, während sich in den durchgeführten Untersuchungen für das sekretierte (chemotaktisch wirkende) *SDF-1*-Protein keine signifikanten Unterschiede zwischen BM-MSC, CB-MSC und USSC ergaben.

Sowohl die relative stärkere Expression von SCF als auch die geringere von *SDF-1* durch USSC im Vergleich zu CB-MSC wurde durch eine an jeweils 3 Linien extern durchgeführte Affymetrix-Analyse bestätigt. Für die Expressionsverhältnisse ergab sich hier für SCF eine im Mittel 1,74-fach höhere Expression in USSC, wohingegen *SDF-1* in CB-MSC um Faktor 1,73 signifikant stärker nachgewiesen wurde.

Plausibel ist demnach eine entsprechend stärkere Expression von *SDF-1* auf der Oberfläche von CB-MSC und BM-MSC, welches wiederum für einen zur hämatopoietischen Nische ähnlichen Effekt der durch CD184/*SDF-1* vermittelten *Quiescence* spricht und somit die geringeren erreichten Expansionsraten erklärt.

4.4 Homing und Hämatopoiese-Unterstützung von unrestringierten somatischen Stammzellen und multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark *in vivo*

Für eine potentielle klinische Anwendung der aus Nabelschnurblut gewonnenen Zellen wurden *in vivo*-Experimente zum *Homing* und zur Unterstützung der hämatopoietischen Rekonstitution sowie zur Tumorigenität in NOD/SCID-Mäusen bzw. Nacktmäusen durchgeführt. Im Rahmen der Versuche zum *Homing* und zur Hämatopoiese-Unterstützung wurden Stromazellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark intravenös oder intrafemoral appliziert und ihr Verbleib zu bestimmten Zeitpunkten nach Injektion in verschiedenen Organen immunhistochemisch untersucht. Die Applikation der Zellen zur Untersuchung der Tumorigenität erfolgte subkutan. Bei Formation von Tumoren wurden diese Tiere ebenfalls immunhistochemisch auf die Präsenz humaner Zellen untersucht.

Homing stromaler Zellen

Nach alleiniger, intravenöser Injektion von Stromazellen konnten humane Zellen ausschließlich innerhalb der ersten 14 Tage in geringer Menge in der Lunge detektiert werden, alle weiteren analysierten Gewebe (Herz, Hirn, Leber, Milz, Muskel und Niere) waren, ebenso wie das Knochenmark des Oberschenkels, hierfür negativ. Nach intrafemoraler Injektion konnten hingegen bei immunhistochemischen Untersuchungen mit einem Antikörper gegen humane Zellkerne in den hierzu analysierten Tieren vereinzelt humane Zellen im Knochenmaterial des Femurs detektiert werden.

Dass keine humanen Zellen in anderen Organen und Geweben detektiert werden konnten, bestätigt die Möglichkeit einer sicheren potentiellen Anwendung im Menschen, zumal auch im gesondert durchgeführten Tumorigenitätstest nach Applikation der verschiedenen Stromazellen bei einer Laufzeit von bis zu 3 Jahren keine Bildung von humanen Tumoren zu beobachten war. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass (wie von Rombouts und Ploemacher für murine BM-MSC publiziert [172]) sowohl humane Stromazellen aus Nabelschnurblut als auch Knochenmark bereits nach kurzer Zeit in Kultur ihre Fähigkeit zur Migration verlieren. In der Literatur wird hierfür hauptsächlich die fehlende Oberflächenexpression von CD184 als Rezeptor für das Chemokin SDF-1 in Zusammenhang gebracht, welcher in diesen Zellen nur noch intrazellulär nachzuweisen ist [173, 174]. In weiteren Untersuchungen in Kooperation mit dem DKFZ konnte zudem gezeigt werden, dass in Stromazellen neben *CD184* auch weitere Gene für Proteine, welche in hämatopoietischen Zellen für Migration und *Homing* relevant sind (*CD44*, *CD62L*, *Lymphocyte function-associated antigen 1*, *Very late antigen 4* sowie *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*), kaum oder in deutlich geringerer Expressionsstärke als in HSC exprimierten (publiziert in Jeltsch *et al.* 2010 [156]).

Als Erklärung für den transienten Nachweis in der Lunge kann angeführt werden, dass die vergleichsweise großen humane Stromazellen in den feinen Lungenkapillaren über *Entrapment*, also einem physikalischen Zurückhalten, festgehalten werden können und dieser Effekt nur durch Anwendung von gefäßerweiternden Vasodilatoren reduziert werden kann [175]. Solch physikalisch bedingte Effekte werden, neben anderen Einflüssen, Grund für die teilweise konträren Angaben zur Fähigkeit von MSC zu Migration und *Homing* in verschiedene Organe in der Literatur sein, da es je nach Injektionsstelle der Zellen auch in anderen, stark durchbluteten und/oder mit feinen Kapillaren durchzogenen Organen (z.B. Niere oder Leber) zu einem solchen *Entrapment* kommen kann. Unter diesem Aspekt sind entsprechende Publikationen, insbesondere jene, welche ein *Homing* von MSC in verschiedene Organe ausschließlich aufgrund eines Nachweises auf DNA-Ebene proklamieren (z.B. [176, 177]), kritisch zu betrachten.

Weitere Faktoren sind Applikationsmethode der Zellen und die Konditionierung der Empfänger. Nach aktuellem Kenntnisstand ist ein effektives *Homing* humaner MSC nur mit einer vorhergehenden Schädigung des Empfängers zu erreichen [178]. Bei jeder Schädigung von Gewebe ergibt sich eine ausgeprägtere Rekrutierung von Zellen zur Regeneration, beispielsweise durch erhöhte lokale Sekretion von SDF-1 [179]. Dies trifft auch auf die vorhergehende Konditionierung der Tiere (z.B. durch Bestrahlung) zu, die somit zusätzlich ein Grund für unterschiedlichen und teilweise gegensätzlichen publizierten Beobachtungen zum *Engraftment* in verschiedenen Organen sein kann. Devine *et al.* beobachteten passend hierzu bei Versuchen in Primaten im unkonditioniertem Tier ein deutlich verringertes *Homing* der Zellen gegenüber Tieren mit Konditionierung durch Ganzkörperbestrahlung (letal mit 10 Gy) [180].

Diese verletzungsbedingte Rekrutierung von Stromazellen zur Regeneration erklärt auch die nach intrafemorale Injektion nachgewiesenen Färbungen im Knochenmaterial. Da diese nur am injizierten Femur der Tiere auftraten (siehe Abschnitt 3.1.4) liegt nahe, dass die applizierten Stromazellen durch die Verletzung des Knochengewebes im Rahmen eines lokalen Reparaturvorganges rekrutiert wurden und in osteogene Richtung differenzierten.

Hämatopoiese-Unterstützung und Ausschluss von Tumorigenität

Nach intravenöser Kotransplantation hämatopoietischer Stamm-/Vorläuferzellen konnten humane Zellen in signifikanten Mengen im Knochenmark, Leber und Milz sowie auch, zu frühen Zeitpunkten, in der Lunge nachgewiesen werden. Hierbei führte die zusätzliche Injektion von USSC 4 Wochen nach Transplantation der Tiere zu einem signifikant höheren Anteil von humanen Zellen im Knochenmark (30.86 ± 6.57 %) gegenüber Kontrolltieren (5.89 ± 1.34 %). Ebenfalls waren die mittleren Werte für

humane Leukozyten (CD45⁺) im Blut und humane hämatopoietische Progenitoren (CD45⁺/CD34⁺) im Knochenmark um mindestens Faktor 2 höher. 8 Wochen nach Transplantation war dieser Unterschied weniger stark ausgeprägt (24,17 ± 5,06 % vs. 11,28 ± 4,84 %). Tiere mit zusätzlich injizierten USSC wiesen jedoch weiterhin im Mittel zumeist höhere Anteile an humanen CD45 bzw. CD34-positiven Zellen in Knochenmark, Blut und Milz auf.

Für Stromazellen aus Knochenmark wurden bislang mehrfach experimentelle Daten zur Unterstützung des *Homings* und des *Engraftments* hämatopoietischer Zellen publiziert. Das meistverwendete *in vivo*-Modell ist dabei das auch in der vorliegenden Arbeit genutzte NOD/SCID-Mausmodell. Trotzdem gestaltete sich eine vergleichende Betrachtung der im Rahmen dieser Arbeit erfassten Werte mit veröffentlichten Ergebnissen aufgrund der großen Varianz der verschiedenen Parameter (insbesondere applizierte Zellzahlen, Vorbehandlung der Tiere, Laufzeit der Versuche, Analysemethoden etc.) schwierig. Insbesondere die absoluten Anteile humaner Zellen in Kontrolltieren variieren je nach Versuchsaufbau bereits von <1 % bis hin zu >50 % für den gleichen Zeitraum (um 4-8 Wochen). Daher kann ein Einfluss kotransplantierte Zellen nur anhand der relativen Änderung (als Vielfaches des Anteils humaner Zellen in entsprechenden Kontrolltieren) beurteilt werden. Hierbei ergaben sich, mit einem im Mittel 5,2-fach höherem Anteil nach 4 Wochen und 2,1-fach höherem Anteil nach 8 Wochen, für die Kotransplantation von USSC im Vergleich zu publizierten Werten für MSC(-ähnliche) Zellen höhere bzw. gleichwertige Effekte (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Vergleich verschiedener Publikationen zu Koinjektionen hämatopoietischer Stammzellen mit stromalen Zellen.

	Zellen / Versuchsaufbau	Humane Zellen im Knochenmark
Bensidhoum <i>et al.</i> 2004 [181]	Stro1-negative BM-MSC + CD34-positive HSC in NOD/SCID-Mäuse; Laufzeit 12 Wochen	27% vs. 48%: 1,8-facher Unterschied
Park <i>et al.</i> 2007 [12]	BM-MSC + CD34-positive HSC in NOD/SCID-Mäuse; Laufzeit 4 Wochen	29,2% vs. 55,6%: 1,9-facher Unterschied
Chan <i>et al.</i> 2006 [182]	„USSC“ + CD34-positive HSC in NOD/SCID-Mäuse; Laufzeit 6 Wochen	0,40% vs. 0,84%: 2,1-facher Unterschied
Hiwase <i>et al.</i> 2009 [183]	CD34-positive HSC aus einem (single) oder zwei (double) CB + plazentare MSC in NOD/SCID-Mäuse; Laufzeit 6 bis 8 Wochen	Single : 17,5% vs. 48,7%: 2,8-facher Unterschied Double : 14,9% vs. 51,8%: 3,7-facher Unterschied
Jeltsch <i>et al.</i> 2011 [156]	USSC + CD34-positive HSC in NOD/SCID-Mäuse; Laufzeit 4 und 8 Wochen	4 Wochen: 5,9% vs. 30,9% : 5,2-facher Unterschied 8 Wochen: 11,3% vs. 24,2% : 2,1-facher Unterschied

Zudem zeigt der in Relation stärker ausgeprägte Einfluss nach 4 gegenüber 8 Wochen, dass die koapplizierten USSC vor allem das initiale *Engraftment* der hämatopoietischen Zellen verbessern und somit eine beschleunigte Rekonstitution erreicht wird.

4.5 Einordnung von unrestringierten somatischen Stromazellen und multipotenten Stromazellen aus Nabelschnurblut in das Modell der fötalen hämatopoietischen Nische

Die hämatopoietische Nische bezeichnet spezialisierte Regionen im Organismus, die der Regulation von Vermehrung und Erhalt der hämatopoietischen Stammzellen dienen. Im adulten Säugetier ist diese fast ausschließlich auf das Knochenmark begrenzt, wobei hierzu als weiterführende Klassifizierung die osteoblastische Nische im Übergangsbereich von Knochen zu Knochenmark und die vaskuläre Nische im Übergangsbereich der sinusoiden Gefäße zum Knochenmark als Regionen mit spezifischer Funktion identifiziert wurden [86, 87, 93-95]. Im Gegensatz hierzu sind während der embryonalen Entwicklung anfänglich Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (im Menschen bis zum 2. Monat), Leber (2.-9. Monat) und Milz (ab 4. Monat) beteiligt. Erst ab dem 6. Monat verlagert sich die Neubildung der Blutzellen annähernd exklusiv in das Knochenmark, in welchem auch mesenchymale Stromazellen an der Regulation von Migration und *Homing* der HSC beteiligt sind [89, 108, 109].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Klassifizierung der Zellen anhand der zuvor vorgestellten Kriterien, welche mit Etablierung des Nachweises von *DLK-1* sowie der *HOX*-Gene als ebenfalls diskriminierende Marker bestätigt wurde, sich gleichermaßen in der Hämatopoiese-Unterstützung *in vitro* widerspiegelte. USSC führten dabei im Vergleich zu CB-MSK und BM-MSK *in vitro* zu einer signifikant höheren Expansion der Gesamtzellzahl und zu einem verbesserten Erhalt CD34-positiver Stamm- und Vorläuferzellen, während sich CB-MSK in ihrem Effekt auf die Expansion hämatopoietischer Zellen nicht von BM-MSK unterscheiden ließen (siehe auch Abschnitt 4.3). Insbesondere aus den hierzu korrelierenden Ergebnissen der Zytokinexpressionsprofile ergeben sich weitere Hinweise zur möglichen Klassifizierung der Zellen anhand von Übereinstimmungen zwischen USSC und CB-MSK bzw. zwischen CB-MSK und BM-MSK. So konnte nur bei Letzteren jeweils eine nachweisbare Expression von *SDF-1* detektiert werden, während *SCF* in den aus Nabelschnurblut gewonnenen Linien deutlich stärker exprimiert wurde. Für den Vergleich USSC mit fötalen Leberzellen zeigten sich hingegen teilweise ähnlich starke (*IGFBP1*) bzw. geringe (*ANGPT1* und *SDF-1*) RNA-Expressionen. Auch im Vergleich zu einer von Chou und Lodish beschriebenen Subpopulation der fötalen Leberzellen, welche sich *in vitro* durch eine besonders ausgeprägte Hämatopoiese-Unterstützung auszeichnete [82], zeigten sich weitere Übereinstimmungen, wie die starke Expression von *DLK-1*, *IGFBP1* und *SCF* sowie eine hohe Kapazität zur Unterstützung hämatopoietischer Zellen.

Auf Basis der erfassten Daten für Immunphänotyp, Zytokinproduktion und Hämatopoiese-Unterstützung wurde eine Hierarchie der neonatalen Zellen im Vergleich zu BM-MSC erstellt, welche Rückschlüsse auf Unterschiede im Herkunftsort von CB-MSC und USSC erlaubt. Dieses Modell (siehe Abbildung 60) postuliert, dass aus Nabelschnurblut gewonnene USSC biologisch der fötalen Leber nahe stehen und möglicherweise auch aus dieser stammen, wobei CB-MSC eine Übergangsform von USSC zu BM-MSC darstellen. Nicht zuletzt wird diese Hypothese auch von den *HOX*-Profilen der jeweiligen Zelllinien unterstützt, da ein *HOX*-negatives Expressionsmuster, wie für USSC definiert, ebenfalls sowohl auf fötalem als auch adultem Lebergewebe zu beobachten ist.

Die direkt aus dem Gewebe der Nabelschnur gewonnenen UC-MSC lassen sich aufgrund ihres Zytokinexpressionsmusters, ihres Immunphänotyps und ihrer Auswirkung in Kokultur hingegen als eine eigene Gruppe außerhalb der hämatopoietischen Nische einordnen. Da diese Zellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur als Referenz herangezogen wurden, haben weitere Untersuchungen zu klären, ob und inwiefern die hier beobachtete starke Expansion hämatopoietischer Zellen mit der durch USSC, CB-MSC und BM-MSC vermittelten Hämatopoiese-Unterstützung vergleichbar ist.

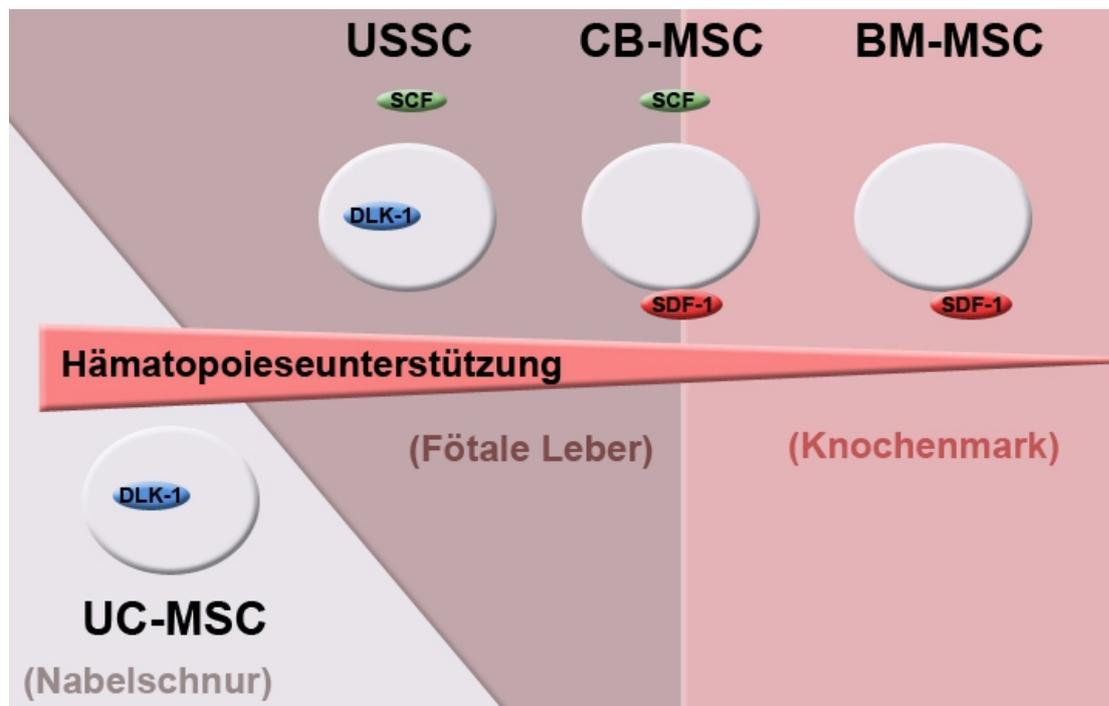


Abbildung 60: Modell einer Hierarchie der untersuchten stromalen Zelltypen. Aufgrund ihrer supportiven Wirkung auf HSC sowie der nachgewiesenen hämatopoiese-relevanten Faktoren lassen sich USSC, CB-MSC und BM-MSC wie abgebildet hierarchisch einordnen. CB-MSC entsprechen in diesem Modell der Übergangsform der fötalen zur adulten hämatopoietischen Nische, während UC-MSC einen hiervon getrennt zu betrachtenden Zelltyp darstellen.

4.6 Ausblick auf weiterführende Untersuchungen und potentielle klinische Anwendung der aus Nabelschnurblut gewonnenen Stromazellen

Für die weiterführende Aufklärung der hämatopoiese-unterstützenden Funktion der USSC/CB-MSC sollten zukünftige Untersuchungen hauptsächlich zwei Fragestellungen im Fokus haben:

Primär wäre zu klären, ob die Unterschiede in der *in vitro*-Expansion von HSC auf den verschiedenen Zelltypen aus einem verstärkendem Effekt durch DLK-1 auf USSC und UC-MSC bzw. einem abschwächendem Einfluss durch SDF-1 auf CB-MSC und BM-MSC resultieren oder ob und inwiefern weitere Faktoren von Bedeutung sind. Gezielt wären dabei auch weitere Untersuchungen zu den jeweiligen Vorkommen der gelösten und membrangebundenen Formen durchzuführen. Überschneidend hierzu wäre die zweite Fragestellung, welche Ursache die deutlich unterschiedliche Entwicklung der expandierten hämatopoietischen Zellen auf UC-MSC im Vergleich zu USSC, CB-MSC und BM-MSC hat und ob auch zwischen Letzteren, eventuell weniger stark ausgeprägt, ähnliche Unterschiede nachzuweisen sind.

Unabhängig hiervon sind USSC aufgrund ihres positiven Einflusses auf das *Engraftment* in NOD/SCID-Mäusen Kandidaten für eine klinische Anwendung zur Verbesserung der Rekonstitution nach Transplantation hämatopoietischer Zellen. So ist die Notwendigkeit einer *ex vivo*-Expansion hämatopoietischer Zellen zur Erreichung der für klinische Anwendungen benötigten Mindestzellmengen zwar aufgrund der inzwischen etablierten Doppeltransplantation mit Nabelschnurblutpräparaten reduziert worden, allerdings führt auch diese trotz höherer transplanteder Zellzahlen nicht zu einem beschleunigtem *Engraftment* [184]. Damit besteht weiterhin das für die Nabelschnurbluttransplantation beschriebene Problem des längeren Zeitraumes bis zur neutrophilen Rekonstitution des Patienten, in welchem dieser aufgrund der fehlenden immunologischen Abwehr besonders gefährdet ist. Sollten USSC auch bei Anwendung im Menschen einen Effekt wie in den in dieser Arbeit vorgestellten *in vivo*-Versuchen haben und das initiale *Engraftment* beschleunigen, so könnte die Mortalitätsrate für Patienten nach Transplantation aufgrund von Infektionen bei verzögerter Rekonstitution deutlich verringert werden. Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass humane Stromazellen bereits wenige Tage nach intravenöser Injektion nicht mehr im Organismus nachzuweisen waren, ist hierzu vorrangig zu untersuchen, inwiefern eine kontinuierliche Supplementierung mit supportiven Zellen den hämatopoiese-unterstützenden Effekt weiter verstärken kann.

Zusätzlich zu der Anwendung als unterstützende Zellen bei hämatopoietischer Rekonstitution bieten sich diese Zellen aufgrund der Ergebnisse nach intrafemoraler Applikation potentiell auch zur Verwendung bei osteogener Regeneration an. Insbesondere nach Verlust größerer Mengen

Knochenmaterials („*critical size defects*“) ist eine natürliche Heilung oftmals stark beeinträchtigt bzw. nicht mehr gegeben. Somit wäre, basierend auf den hier vorgestellten Versuchsergebnissen sowie den 2004 im Ratten-Modell beschriebenen Experimenten [35], auch eine Anwendung zur verbesserten Regeneration schwerer Knochenfrakturen plausibel, wie sie bereits 1998 für BM-MSC postuliert wurde [185]. Leucht *et al.* [186] konnten zudem zeigen, dass auch das HOX-Profil Einfluss auf die Fähigkeit zur osteogenen Regeneration nimmt. So führten HOX-negative skelettale Progenitorzellen der Mandibel in der HOX-positiven Umgebung der Tibia zu erfolgreicher osteogener Reparatur nach Läsion, während umgekehrt HOX-positive skelettale Progenitorzellen aus der Tibia sich in der HOX-negativen Umgebung der Mandibel ausschließlich in chondrogene Richtung entwickelten. Unter diesem Aspekt bleibt zu klären, ob und inwiefern sich auch USSC aufgrund ihres negativen HOX-Profiles eher an verschiedene Umgebungen adaptieren können und somit ein größeres Anwendungsspektrum als CB-MSC bzw. BM-MSC aufweisen.

Die Möglichkeit einer GMP-gerechten Herstellung, das Fehlen unerwünschten Engraftments der intravenös injizierten Zellen sowie eine nicht nachweisbare Tumorigenität nach subkutaner Applikation sprechen für eine sichere Anwendung von aus Nabelschnurblut gewonnenen Stromazellen in Patienten. Hierbei stellen die hauptsächlich in dieser Arbeit herausgearbeiteten Aspekte (Unterstützung der Hämatopoiese und der osteogenen Regeneration) sicherlich nur einen begrenzten Ausblick auf die möglichen therapeutischen Eignungen dieser Zellen im Bereich der regenerativen Medizin dar.

5 Referenzen

1. Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., et al., **Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling.** N Engl J Med, 1989. 321(17): p. 1174-1178.
2. Barker, J.N., Weisdorf, D.J., DeFor, T.E., et al., **Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning.** Blood, 2003. 102(5): p. 1915-1919.
3. Jacobsohn, D.A. and Vogelsang, G.B., **Acute graft versus host disease.** Orphanet J Rare Dis, 2007. 2: p. 35.
4. Cutler, C. and Antin, J.H., **Chronic graft-versus-host disease.** Curr Opin Oncol, 2006. 18(2): p. 126-131.
5. Odom, L.F., August, C.S., Githens, J.H., et al., **Remission of relapsed leukaemia during a graft-versus-host reaction. A "graft-versus-leukaemia reaction" in man?** Lancet, 1978. 2(8089): p. 537-540.
6. Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., et al., **Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation.** Blood, 1990. 75(3): p. 555-562.
7. Barrett, J.A., **Strategies to enhance the graft-versus-malignancy effect in allogeneic transplants.** Ann N Y Acad Sci, 1995. 770: p. 203-212.
8. Laughlin, M.J., Eapen, M., Rubinstein, P., et al., **Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia.** N Engl J Med, 2004. 351(22): p. 2265-2275.
9. Rocha, V. and Gluckman, E., **Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells.** Biol Blood Marrow Transplant, 2006. 12(1 Suppl 1): p. 34-41.
10. Gluckman, E., Rocha, V., Arcese, W., et al., **Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice.** Exp Hematol, 2004. 32(4): p. 397-407.
11. Barker, J.N., Weisdorf, D.J., DeFor, T.E., et al., **Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy.** Blood, 2005. 105(3): p. 1343-1347.
12. Park, S.K., Won, J.H., Kim, H.J., et al., **Co-transplantation of human mesenchymal stem cells promotes human CD34+ cells engraftment in a dose-dependent fashion in NOD/SCID mice.** J Korean Med Sci, 2007. 22(3): p. 412-419.
13. Meuleman, N., Tondreau, T., Ahmad, I., et al., **Infusion of Mesenchymal Stromal Cells can aid Hematopoietic Recovery following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Myeloablative Transplant: A Pilot Study.** Stem Cells Dev, 2009.
14. Bruno, S., Gunetti, M., Gammaitoni, L., et al., **Fast but durable megakaryocyte repopulation and platelet production in NOD/SCID mice transplanted with ex-vivo expanded human cord blood CD34+ cells.** Stem Cells, 2004. 22(2): p. 135-143.
15. Huang, G.P., Pan, Z.J., Jia, B.B., et al., **Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood.** Cell Transplant, 2007. 16(6): p. 579-585.
16. Ahmed, F., Ings, S.J., Pizzey, A.R., et al., **Impaired bone marrow homing of cytokine-activated CD34+ cells in the NOD/SCID model.** Blood, 2004. 103(6): p. 2079-2087.
17. Hofmeister, C.C., Zhang, J., Knight, K.L., et al., **Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche.** Bone Marrow Transplant, 2007. 39(1): p. 11-23.
18. Rocha, V., Wagner, J.E., Jr., Sobocinski, K.A., et al., **Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources.** N Engl J Med, 2000. 342(25): p. 1846-1854.

19. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., et al., **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts**. *Science*, 1998. 282(5391): p. 1145-1147.
20. Siminovitch, L., McCulloch, E.A. and Till, J.E., **The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies**. *J Cell Physiol*, 1963. 62: p. 327-336.
21. Till, J.E., McCulloch, E.A. and Siminovitch, L., **A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1964. 51: p. 29-36.
22. Lewis, J.P. and Trobaugh, F.E., Jr., **Haematopoietic Stem Cells**. *Nature*, 1964. 204: p. 589-590.
23. Bach, F.H., Albertini, R.J., Joo, P., et al., **Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome**. *Lancet*, 1968. 2(7583): p. 1364-1366.
24. Lemoli, R.M. and D'Addio, A., **Hematopoietic stem cell mobilization**. *Haematologica*, 2008. 93(3): p. 321-324.
25. Gluckman, E., Devergie, A., Bourdeau-Esperou, H., et al., **Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia**. *Nouv Rev Fr Hematol*, 1990. 32(6): p. 423-425.
26. Meisel, R., Laws, H.J., Balzer, S., et al., **Comparable long-term survival after bone marrow versus peripheral blood progenitor cell transplantation from matched unrelated donors in children with hematologic malignancies**. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007. 13(11): p. 1338-1345.
27. Gluckman, E., Rocha, V. and Chevret, S., **Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplant**. *Transfus Clin Biol*, 2001. 8(3): p. 146-154.
28. Eapen, M., Rubinstein, P., Zhang, M.J., et al., **Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study**. *Lancet*, 2007. 369(9577): p. 1947-1954.
29. Kemp, K.C., Hows, J. and Donaldson, C., **Bone marrow-derived mesenchymal stem cells**. *Leuk Lymphoma*, 2005. 46(11): p. 1531-1544.
30. Moore, K.A. and Lemischka, I.R., **Stem cells and their niches**. *Science*, 2006. 311(5769): p. 1880-1885.
31. Caplan, A.I., **Mesenchymal stem cells**. *J Orthop Res*, 1991. 9(5): p. 641-650.
32. Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., et al., **Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement**. *Cytotherapy*, 2005. 7(5): p. 393-395.
33. Bianco, P., Robey, P.G., Saggio, I., et al., **"Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease**. *Hum Gene Ther*, 2010. 21(9): p. 1057-1066.
34. Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., II and Petrakova, K.V., **Osteogenesis in transplants of bone marrow cells**. *J Embryol Exp Morphol*, 1966. 16(3): p. 381-390.
35. Kogler, G., Sensken, S., Airey, J.A., et al., **A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential**. *J Exp Med*, 2004. 200(2): p. 123-135.
36. Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., et al., **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells**. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(12): p. 4279-4295.
37. Wang, J.F., Wang, L.J., Wu, Y.F., et al., **Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation**. *Haematologica*, 2004. 89(7): p. 837-844.
38. Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., et al., **The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis**. *Blood Rev*, 2006. 20(3): p. 161-171.
39. Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M., et al., **Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(7): p. 3213-3218.
40. Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., et al., **Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality**. *Stem Cells*, 2002. 20(6): p. 530-541.

41. Bruder, S.P., Jaiswal, N. and Haynesworth, S.E., **Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.** J Cell Biochem, 1997. 64(2): p. 278-294.
42. Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., et al., **In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.** Exp Cell Res, 1998. 238(1): p. 265-272.
43. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., et al., **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** Science, 1999. 284(5411): p. 143-147.
44. Keilhoff, G., Goehl, A., Langnase, K., et al., **Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells.** Eur J Cell Biol, 2006. 85(1): p. 11-24.
45. Kurpinski, K., Lam, H., Chu, J., et al., **Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells.** Stem Cells, 2010. 28(4): p. 734-742.
46. Le Blanc, K. and Pittenger, M., **Mesenchymal stem cells: progress toward promise.** Cytotherapy, 2005. 7(1): p. 36-45.
47. Bernardo, M.E., Locatelli, F. and Fibbe, W.E., **Mesenchymal stromal cells.** Ann N Y Acad Sci, 2009. 1176: p. 101-117.
48. Charwat, S., Gyongyosi, M., Lang, I., et al., **Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art.** Exp Hematol, 2008. 36(6): p. 672-680.
49. Gonzalo-Daganzo, R., Regidor, C., Martin-Donaire, T., et al., **Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults.** Cytotherapy, 2009. 11(3): p. 278-288.
50. Fang, B., Li, N., Song, Y., et al., **Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia.** Pediatr Transplant, 2009. 13(4): p. 499-502.
51. Kang, K.S., Kim, S.W., Oh, Y.H., et al., **A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study.** Cytotherapy, 2005. 7(4): p. 368-373.
52. Moviglia, G.A., Fernandez Vina, R., Brizuela, J.A., et al., **Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients.** Cytotherapy, 2006. 8(3): p. 202-209.
53. Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K., et al., **Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone.** Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(13): p. 8932-8937.
54. Lazarus, H.M., Haynesworth, S.E., Gerson, S.L., et al., **Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use.** Bone Marrow Transplant, 1995. 16(4): p. 557-564.
55. Koc, O.N., Gerson, S.L., Cooper, B.W., et al., **Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy.** J Clin Oncol, 2000. 18(2): p. 307-316.
56. Aktas, M., Buchheiser, A., Houben, A., et al., **Good manufacturing practice-grade production of unrestricted somatic stem cell from fresh cord blood.** Cytotherapy, 2010. 12(3): p. 338-348.
57. Erdo, F., Buhrlé, C., Blunk, J., et al., **Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke.** J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(7): p. 780-785.
58. Ye, Z.Q., Burkholder, J.K., Qiu, P., et al., **Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth.** Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(25): p. 12140-12144.
59. Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A. and Smirnov, V.N., **Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord.** Stem Cells, 2003. 21(1): p. 105-110.

60. Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., et al., **Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood**. *Blood*, 2004. 103(5): p. 1669-1675.
61. Wexler, S.A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., et al., **Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not**. *Br J Haematol*, 2003. 121(2): p. 368-374.
62. Kogler, G., Radke, T.F., Lefort, A., et al., **Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells**. *Exp Hematol*, 2005. 33(5): p. 573-583.
63. Kogler, G., Sensken, S. and Wernet, P., **Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood**. *Exp Hematol*, 2006. 34(11): p. 1589-1595.
64. Degistirici, O., Jager, M. and Knipper, A., **Applicability of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells in tissue engineering concepts**. *Cell Prolif*, 2008. 41(3): p. 421-440.
65. Waclawczyk, S., Buchheiser, A., Flogel, U., et al., **In vitro differentiation of unrestricted somatic stem cells into functional hepatic-like cells displaying a hepatocyte-like glucose metabolism**. *J Cell Physiol*, 2010. 225(2): p. 545-554.
66. Kluth, S.M., Buchheiser, A., Houben, A.P., et al., **DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood**. *Stem Cells Dev*, 2010. 19(10): p. 1471-1483.
67. Liedtke, S., Buchheiser, A., Bosch, J., et al., **The HOX Code as a "biological fingerprint" to distinguish functionally distinct stem cell populations derived from cord blood**. *Stem Cell Res*, 2010. 5(1): p. 40-50.
68. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., et al., **Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors**. *Cell*, 2007. 131(5): p. 861-872.
69. Kim, J.B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M.J., et al., **Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4**. *Nature*, 2009.
70. Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., et al., **Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors**. *Nature*, 2008. 454(7204): p. 646-650.
71. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., et al., **Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors**. *Science*, 2008. 322(5903): p. 949-953.
72. Ikuta, K., Uchida, N., Friedman, J., et al., **Lymphocyte development from stem cells**. *Annu Rev Immunol*, 1992. 10: p. 759-783.
73. Mikkola, H.K. and Orkin, S.H., **The journey of developing hematopoietic stem cells**. *Development*, 2006. 133(19): p. 3733-3744.
74. Tavian, M., Biasch, K., Sinka, L., et al., **Embryonic origin of human hematopoiesis**. *Int J Dev Biol*, 2010. 54(6-7): p. 1061-1065.
75. Morrison, S.J., Uchida, N. and Weissman, I.L., **The biology of hematopoietic stem cells**. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. 11: p. 35-71.
76. Christensen, J.L. and Weissman, I.L., **Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): p. 14541-14546.
77. Morrison, S.J. and Kimble, J., **Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer**. *Nature*, 2006. 441(7097): p. 1068-1074.
78. Dick, J.E., **Stem cells: Self-renewal writ in blood**. *Nature*, 2003. 423(6937): p. 231-233.
79. Lessard, J., Faubert, A. and Sauvageau, G., **Genetic programs regulating HSC specification, maintenance and expansion**. *Oncogene*, 2004. 23(43): p. 7199-7209.
80. Cellot, S. and Sauvageau, G., **In vitro stem cell expansion: stepping closer towards self-renewal**. *Gene Ther*, 2006. 13(23): p. 1617-1618.
81. Schofield, R., **The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell**. *Blood Cells*, 1978. 4(1-2): p. 7-25.
82. Chou, S. and Lodish, H.F., **Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(17): p. 7799-7804.

83. Sugiyama, D., Kulkeaw, K., Mizuochi, C., et al., **Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production**. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 410(2): p. 301-306.
84. Suda, T., Arai, F. and Hirao, A., **Hematopoietic stem cells and their niche**. *Trends Immunol*, 2005. 26(8): p. 426-433.
85. Yin, T. and Li, L., **The stem cell niches in bone**. *J Clin Invest*, 2006. 116(5): p. 1195-1201.
86. Taichman, R., Reilly, M., Verma, R., et al., **Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors**. *Br J Haematol*, 2001. 112(2): p. 438-448.
87. Zhang, J., Niu, C., Ye, L., et al., **Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size**. *Nature*, 2003. 425(6960): p. 836-841.
88. Jung, Y., Wang, J., Havens, A., et al., **Cell-to-cell contact is critical for the survival of hematopoietic progenitor cells on osteoblasts**. *Cytokine*, 2005. 32(3-4): p. 155-162.
89. Bianco, P., Sacchetti, B. and Riminucci, M., **Osteoprogenitors and the hematopoietic microenvironment**. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011. 24(1): p. 37-47.
90. Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., et al., **Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency**. *Blood*, 2004. 103(9): p. 3258-3264.
91. Kollet, O., Dar, A., Shivtiel, S., et al., **Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells**. *Nat Med*, 2006. 12(6): p. 657-664.
92. Kollet, O., Dar, A. and Lapidot, T., **The multiple roles of osteoclasts in host defense: bone remodeling and hematopoietic stem cell mobilization**. *Annu Rev Immunol*, 2007. 25: p. 51-69.
93. Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., et al., **Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis**. *Nat Med*, 2004. 10(1): p. 64-71.
94. Kopp, H.G., Avecilla, S.T., Hooper, A.T., et al., **The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization**. *Physiology (Bethesda)*, 2005. 20: p. 349-356.
95. Kopp, H.G., Hooper, A.T., Avecilla, S.T., et al., **Functional heterogeneity of the bone marrow vascular niche**. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. 1176: p. 47-54.
96. Dalakas, E., Newsome, P.N., Harrison, D.J., et al., **Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury**. *Faseb J*, 2005. 19(10): p. 1225-1231.
97. Massa, M., Rosti, V., Ferrario, M., et al., **Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction**. *Blood*, 2005. 105(1): p. 199-206.
98. Hattori, K., Heissig, B., Tashiro, K., et al., **Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells**. *Blood*, 2001. 97(11): p. 3354-3360.
99. Lapidot, T. and Kollet, O., **The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice**. *Leukemia*, 2002. 16(10): p. 1992-2003.
100. Lapidot, T., Dar, A. and Kollet, O., **How do stem cells find their way home?** *Blood*, 2005. 106(6): p. 1901-1910.
101. Nie, Y., Han, Y.C. and Zou, Y.R., **CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells**. *J Exp Med*, 2008. 205(4): p. 777-783.
102. Itkin, T. and Lapidot, T., **SDF-1 keeps HSC quiescent at home**. *Blood*, 2010. 117(2): p. 373-374.
103. Christopherson, K.W., 2nd, Cooper, S. and Broxmeyer, H.E., **Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells**. *Blood*, 2003. 101(12): p. 4680-4686.
104. Christopherson, K.W., 2nd, Hangoc, G. and Broxmeyer, H.E., **Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells**. *J Immunol*, 2002. 169(12): p. 7000-7008.

105. Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., et al., ***Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells***. J Exp Med, 1999. 189(7): p. 1139-1148.
106. Papayannopoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., 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.
107. Papayannopoulou, T., Priestley, G.V. and Nakamoto, B., ***Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway***. Blood, 1998. 91(7): p. 2231-2239.
108. Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., et al., ***Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche***. Nature, 2010. 466(7308): p. 829-834.
109. Isern, J. and Mendez-Ferrer, S., ***Stem cell interactions in a bone marrow niche***. Curr Osteoporos Rep, 2011. 9(4): p. 210-218.
110. Kogler, G., Callejas, J., Hakenberg, P., et al., ***Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues***. J Hematother, 1996. 5(2): p. 105-116.
111. Bosch, J., Houben, A.P., Radke, T.F., et al., ***Distinct Differentiation Potential of "MSC" Derived from Cord Blood and Umbilical Cord: Are Cord-Derived Cells True Mesenchymal Stromal Cells?*** Stem Cells Dev, 2012.
112. Buhring, H.J., Battula, V.L., Trembl, S., et al., ***Novel markers for the prospective isolation of human MSC***. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1106: p. 262-271.
113. Vormoor, J., Lapidot, T., Pflumio, F., et al., ***Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice***. Blood, 1994. 83(9): p. 2489-2497.
114. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., et al., ***Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement***. Cytotherapy, 2006. 8(4): p. 315-317.
115. Montesinos, J.J., Flores-Figueroa, E., Castillo-Medina, S., et al., ***Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression***. Cytotherapy, 2009. 11(2): p. 163-176.
116. Campioni, D., Lanza, F., Moretti, S., et al., ***Loss of Thy-1 (CD90) antigen expression on mesenchymal stromal cells from hematologic malignancies is induced by in vitro angiogenic stimuli and is associated with peculiar functional and phenotypic characteristics***. Cytotherapy, 2008. 10(1): p. 69-82.
117. Wiesmann, A., Buhring, H.J., Mentrup, C., et al., ***Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation***. Head Face Med, 2006. 2: p. 8.
118. Kent, D., Copley, M., Benz, C., et al., ***Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway***. Clin Cancer Res, 2008. 14(7): p. 1926-1930.
119. Thoren, L.A., Liuba, K., Bryder, D., et al., ***Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells***. J Immunol, 2008. 180(4): p. 2045-2053.
120. Kita, K., Lee, J.O., Finnerty, C.C., et al., ***Cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion***. Stem Cells Int, 2011. 2011: p. 276193.
121. Ronnstrand, L., ***Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit***. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(19-20): p. 2535-2548.
122. Escary, J.L., Perreau, J., Dumenil, D., et al., ***Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation***. Nature, 1993. 363(6427): p. 361-364.
123. Keller, J.R., Gooya, J.M. and Ruscetti, F.W., ***Direct synergistic effects of leukemia inhibitory factor on hematopoietic progenitor cell growth: comparison with other hematopoietins that use the gp130 receptor subunit***. Blood, 1996. 88(3): p. 863-869.

124. Shih, C.C., Hu, M.C., Hu, J., et al., ***A secreted and LIF-mediated stromal cell-derived activity that promotes ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells.*** Blood, 2000. 95(6): p. 1957-1966.
125. McNiece, I., Harrington, J., Turney, J., et al., ***Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells.*** Cytotherapy, 2004. 6(4): p. 311-317.
126. Robinson, S.N., Ng, J., Niu, T., et al., ***Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells.*** Bone Marrow Transplant, 2006. 37(4): p. 359-366.
127. Punzel, M., Gupta, P. and Verfaillie, C.M., ***The microenvironment of AFT024 cells maintains primitive human hematopoiesis by counteracting contact mediated inhibition of proliferation.*** Cell Commun Adhes, 2002. 9(3): p. 149-159.
128. Trapp, T., Kogler, G., El-Khattouti, A., et al., ***Hepatocyte growth factor/c-MET axis-mediated tropism of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells for neuronal injury.*** J Biol Chem, 2008. 283(47): p. 32244-32253.
129. Fibbe, W.E., Noort, W.A., Schipper, F., et al., ***Ex vivo expansion and engraftment potential of cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice.*** Ann N Y Acad Sci, 2001. 938: p. 9-17.
130. Noort, W.A., Kruisselbrink, A.B., in't Anker, P.S., et al., ***Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice.*** Exp Hematol, 2002. 30(8): p. 870-878.
131. Angelopoulou, M., Novelli, E., Grove, J.E., et al., ***Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice.*** Exp Hematol, 2003. 31(5): p. 413-420.
132. Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., et al., ***Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation.*** Bone Marrow Transplant, 2004. 33(6): p. 597-604.
133. Kushida, T., Inaba, M., Hisha, H., et al., ***Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice.*** Blood, 2001. 97(10): p. 3292-3299.
134. Wang, J., Kimura, T., Asada, R., et al., ***SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34- cells assured by intra-bone marrow injection.*** Blood, 2003. 101(8): p. 2924-2931.
135. Yahata, T., Ando, K., Sato, T., et al., ***A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow.*** Blood, 2003. 101(8): p. 2905-2913.
136. Castello, S., Podesta, M., Menditto, V.G., et al., ***Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency.*** Exp Hematol, 2004. 32(8): p. 782-787.
137. Robertson, M.J. and Ritz, J., ***Biology and clinical relevance of human natural killer cells.*** Blood, 1990. 76(12): p. 2421-2438.
138. Bixby, J.L., Pratt, R.S., Lilien, J., et al., ***Neurite outgrowth on muscle cell surfaces involves extracellular matrix receptors as well as Ca²⁺-dependent and -independent cell adhesion molecules.*** Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(8): p. 2555-2559.
139. Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., et al., ***Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing.*** Science, 1987. 236(4803): p. 799-806.
140. Walsh, F.S. and Doherty, P., ***Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance.*** Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. 13: p. 425-456.
141. Moore, S.E. and Walsh, F.S., ***Specific regulation of N-CAM/D2-CAM cell adhesion molecule during skeletal muscle development.*** Embo J, 1985. 4(3): p. 623-630.
142. Walsh, F.S. and Moore, S.E., ***Expression of cell adhesion molecule, N-CAM, in diseases of adult human skeletal muscle.*** Neurosci Lett, 1985. 59(1): p. 73-78.

143. Walsh, F.S., Hobbs, C., Wells, D.J., et al., ***Ectopic expression of NCAM in skeletal muscle of transgenic mice results in terminal sprouting at the neuromuscular junction and altered structure but not function.*** Mol Cell Neurosci, 2000. 15(3): p. 244-261.
144. Evseenko, D., Zhu, Y., Schenke-Layland, K., et al., ***Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells.*** Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(31): p. 13742-13747.
145. Dar, A., Goichberg, P., Shinder, V., et al., ***Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells.*** Nat Immunol, 2005. 6(10): p. 1038-1046.
146. Dar, A., Kollet, O. and Lapidot, T., ***Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice.*** Exp Hematol, 2006. 34(8): p. 967-975.
147. Shi, M., Li, J., Liao, L., et al., ***Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice.*** Haematologica, 2007. 92(7): p. 897-904.
148. Rogers, M.L., Beare, A., Zola, H., et al., ***CD 271 (P75 neurotrophin receptor).*** J Biol Regul Homeost Agents, 2008. 22(1): p. 1-6.
149. Jarocha, D., Lukaszewicz, E. and Majka, M., ***Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells.*** Folia Histochem Cytobiol, 2008. 46(3): p. 307-314.
150. Meyerrose, T.E., De Ugarte, D.A., Hofling, A.A., et al., ***In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models.*** Stem Cells, 2007. 25(1): p. 220-227.
151. Covas, D.T., Panepucci, R.A., Fontes, A.M., et al., ***Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts.*** Exp Hematol, 2008. 36(5): p. 642-654.
152. Russell, K.C., Phinney, D.G., Lacey, M.R., et al., ***In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment.*** Stem Cells, 2010. 28(4): p. 788-798.
153. De Ugarte, D.A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., et al., ***Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow.*** Immunol Lett, 2003. 89(2-3): p. 267-270.
154. Le Blanc, K. and Ringden, O., ***Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation.*** Biol Blood Marrow Transplant, 2005. 11(5): p. 321-334.
155. Moore, K.A., Pytowski, B., Witte, L., et al., ***Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs.*** Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(8): p. 4011-4016.
156. Jeltsch, K.S., Radke, T.F., Laufs, S., et al., ***Unrestricted somatic stem cells: interaction with CD34+ cells in vitro and in vivo, expression of homing genes and exclusion of tumorigenic potential.*** Cytotherapy, 2011. 13(3): p. 357-365.
157. Nakano, T., Kodama, H. and Honjo, T., ***Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture.*** Science, 1994. 265(5175): p. 1098-1101.
158. Nakano, T., ***Lymphohematopoietic development from embryonic stem cells in vitro.*** Semin Immunol, 1995. 7(3): p. 197-203.
159. Zaehres, H., Kogler, G., Arauzo-Bravo, M.J., et al., ***Induction of pluripotency in human cord blood unrestricted somatic stem cells.*** Exp Hematol, 2010. 38(9): p. 809-818, 818 e801-802.
160. Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., et al., ***Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways.*** Cancer Res, 2008. 68(10): p. 3645-3654.
161. Shah, V.O., Civin, C.I. and Loken, M.R., ***Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis.*** J Immunol, 1988. 140(6): p. 1861-1867.

162. Stelzer, G.T., Shults, K.E. and Loken, M.R., ***CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens***. Ann N Y Acad Sci, 1993. 677: p. 265-280.
163. Cerletti, M., Molloy, M.J., Tomczak, K.K., et al., ***Melanoma cell adhesion molecule is a novel marker for human fetal myogenic cells and affects myoblast fusion***. J Cell Sci, 2006. 119(Pt 15): p. 3117-3127.
164. Capkovic, K.L., Stevenson, S., Johnson, M.C., et al., ***Neural cell adhesion molecule (NCAM) marks adult myogenic cells committed to differentiation***. Exp Cell Res, 2008. 314(7): p. 1553-1565.
165. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., et al., ***A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs***. Cell Stem Cell, 2008. 3(3): p. 301-313.
166. Chen, C.W., Montelatici, E., Crisan, M., et al., ***Perivascular multi-lineage progenitor cells in human organs: regenerative units, cytokine sources or both?*** Cytokine Growth Factor Rev, 2009. 20(5-6): p. 429-434.
167. Potapova, I.A., Brink, P.R., Cohen, I.S., et al., ***Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells***. J Biol Chem, 2008. 283(19): p. 13100-13107.
168. Harichandan, A. and Buhring, H.J., ***Prospective isolation of human MSC***. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. 24(1): p. 25-36.
169. Mabuchi, Y., Morikawa, S., Suzuki, S., et al., ***Prospective isolation and identification of human mesenchymal stem cells by flow cytometry***. Inflammation and Regeneration, 2009. 29(1): p. 73-78.
170. Garces, C., Ruiz-Hidalgo, M.J., Bonvini, E., et al., ***Adipocyte differentiation is modulated by secreted delta-like (dlk) variants and requires the expression of membrane-associated dlk***. Differentiation, 1999. 64(2): p. 103-114.
171. Mohle, R., Bautz, F., Rafii, S., 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. 4523-4530.
172. Rombouts, W.J. and Ploemacher, R.E., ***Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture***. Leukemia, 2003. 17(1): p. 160-170.
173. Bhakta, S., Hong, P. and Koc, O., ***The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation***. Cardiovasc Revasc Med, 2006. 7(1): p. 19-24.
174. Wynn, R.F., Hart, C.A., Corradi-Perini, C., et al., ***A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow***. Blood, 2004. 104(9): p. 2643-2645.
175. Gao, J., Dennis, J.E., Muzic, R.F., et al., ***The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion***. Cells Tissues Organs, 2001. 169(1): p. 12-20.
176. Allers, C., Sierralta, W.D., Neubauer, S., et al., ***Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice***. Transplantation, 2004. 78(4): p. 503-508.
177. Erices, A.A., Allers, C.I., Conget, P.A., et al., ***Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion***. Cell Transplant, 2003. 12(6): p. 555-561.
178. Sordi, V., ***Mesenchymal stem cell homing capacity***. Transplantation, 2009. 87(9 Suppl): p. S42-45.
179. Ponomaryov, T., Peled, A., Petit, I., et al., ***Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function***. J Clin Invest, 2000. 106(11): p. 1331-1339.
180. Devine, S.M., Cobbs, C., Jennings, M., et al., ***Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates***. Blood, 2003. 101(8): p. 2999-3001.

181. Bensidhoum, M., Chapel, A., Francois, S., et al., **Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment.** Blood, 2004. 103(9): p. 3313-3319.
182. Chan, S.L., Choi, M., Wnendt, S., et al., **Enhanced in Vivo Homing of Uncultured and Selectively Amplified Cord Blood Cd34+ Cells by Co-Transplantation with Cord Blood Derived Unrestricted Somatic Stem Cells.** Stem Cells, 2006.
183. Hiwase, S.D., Dyson, P.G., To, L.B., et al., **Cotransplantation of placental mesenchymal stromal cells enhances single and double cord blood engraftment in nonobese diabetic/severe combined immune deficient mice.** Stem Cells, 2009. 27(9): p. 2293-2300.
184. Chen, Y.B., Aldridge, J., Kim, H.T., et al., **Reduced-Intensity Conditioning Stem Cell Transplantation: Comparison of Double Umbilical Cord Blood and Unrelated Donor Grafts.** Biol Blood Marrow Transplant, 2011.
185. Bruder, S.P., Jaiswal, N., Ricalton, N.S., et al., **Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration.** Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S247-256.
186. Leucht, P., Kim, J.B., Amasha, R., et al., **Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration.** Development, 2008. 135(17): p. 2845-2854.
187. Boelens, J., Lust, S., Vanhoecke, B., et al., **Chronic lymphocytic leukaemia.** Anticancer Res, 2009. 29(2): p. 605-615.
188. Hoelzer, D., Gokbuget, N., Ottmann, O., et al., **Acute lymphoblastic leukemia.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2002: p. 162-192.
189. Barnett, M.J., Eaves, A.C. and Phillips, G.L., **An overview of bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia.** Cmaj, 1990. 143(3): p. 187-193.
190. Deschler, B. and Lubbert, M., **Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology.** Cancer, 2006. 107(9): p. 2099-2107.
191. List, A.F., Vardiman, J., Issa, J.P., et al., **Myelodysplastic syndromes.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004: p. 297-317.
192. Nishino, H.T. and Chang, C.C., **Myelodysplastic syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis.** Arch Pathol Lab Med, 2005. 129(10): p. 1299-1310.
193. Gaspar, H.B., Gilmour, K.C. and Jones, A.M., **Severe combined immunodeficiency--molecular pathogenesis and diagnosis.** Arch Dis Child, 2001. 84(2): p. 169-173.
194. Young, N.S., Calado, R.T. and Scheinberg, P., **Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia.** Blood, 2006. 108(8): p. 2509-2519.
195. Muller, A., Jacobsen, H., Healy, E., et al., **Hazard classification of chemicals inducing haemolytic anaemia: An EU regulatory perspective.** Regul Toxicol Pharmacol, 2006. 45(3): p. 229-241.
196. Siegel, F.P. and Petrides, P.E., **Congenital and acquired polycythemias.** Dtsch Arztebl Int, 2008. 105(4): p. 62-68.
197. Almendro, N., Bellon, T., Rius, C., et al., **Cloning of the human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization.** J Immunol, 1996. 157(12): p. 5411-5421.
198. Lanza, F., Healy, L. and Sutherland, D.R., **Structural and functional features of the CD34 antigen: an update.** J Biol Regul Homeost Agents, 2001. 15(1): p. 1-13.
199. Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., et al., **Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells.** J Immunol, 1984. 133(1): p. 157-165.
200. Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., et al., **CD34: structure, biology, and clinical utility.** Blood, 1996. 87(1): p. 1-13.
201. Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., et al., **Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells.** Blood, 1990. 75(12): p. 2417-2426.

202. Trowbridge, I.S. and Omary, M.B., **Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin**. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(5): p. 3039-3043.
203. Airas, L., Niemela, J., Salmi, M., et al., **Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells**. J Cell Biol, 1997. 136(2): p. 421-431.
204. Barry, F., Boynton, R., Murphy, M., et al., **The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells**. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 289(2): p. 519-524.
205. Craig, W., Kay, R., Cutler, R.L., et al., **Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells**. J Exp Med, 1993. 177(5): p. 1331-1342.
206. Li, C., Hampson, I.N., Hampson, L., et al., **CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells**. Faseb J, 2000. 14(1): p. 55-64.
207. Nassiri, F., Cusimano, M.D., Scheithauer, B.W., et al., **Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy**. Anticancer Res, 2011. 31(6): p. 2283-2290.
208. Rokhlin, O.W., Cohen, M.B., Kubagawa, H., et al., **Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow**. J Immunol, 1995. 154(9): p. 4456-4465.
209. Caterson, E.J., Nesti, L.J., Li, W.J., et al., **Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam**. J Biomed Mater Res, 2001. 57(3): p. 394-403.
210. Barry, F.P., Boynton, R.E., Haynesworth, S., et al., **The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105)**. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 265(1): p. 134-139.
211. Bruder, S.P., Ricalton, N.S., Boynton, R.E., et al., **Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation**. J Bone Miner Res, 1998. 13(4): p. 655-663.
212. Ohneda, O., Ohneda, K., Arai, F., et al., **ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development**. Blood, 2001. 98(7): p. 2134-2142.
213. Arai, F., Ohneda, O., Miyamoto, T., et al., **Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation**. J Exp Med, 2002. 195(12): p. 1549-1563.

Anhang

Anhang 1a

Hämatopoiese-betreffende Erkrankungen	
Kurzform	Beschreibung
CLL	Die Chronische Lymphatische Leukämie ist hierbei eine häufig erst im Erwachsenenalter auftretende Leukämieerkrankung, die durch eine krankhafte Veränderung der Lymphozyten, vorwiegend der B-Zellen, gekennzeichnet ist [187]. Namensgebend ist das bei diesen malignen Erkrankungen zu beobachtende erhöhte Auftreten weißer Blutzellen.
ALL	Analog zur CLL ist die Akute Lymphatische Leukämie die häufigste bei Kindern vorkommende Krebserkrankung, meist bereits im Alter um vier Jahre [188]. Infolge dieser Erkrankung werden gesunde Blutzellen bereits im Knochenmark von den leukämischen zerstört und verdrängt. Als Therapiemaßnahmen kommen bei beiden Formen Chemotherapie, Strahlentherapie, Immuntherapie oder Stammzell-Transplantation zur Anwendung.
CML	Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (auch: Chronische Myelose) [189] entarten die Stammzellen zumeist aufgrund einer Veränderung auf Chromosom 22 (Philadelphia-Chromosom). Als Therapien stehen zurzeit die dauerhafte Verabreichung von Interferon α , aggressive Chemotherapie oder Stammzelltransplantation zur Verfügung, eine dauerhafte Heilung konnte bisher ausschließlich durch Stammzelltransplantation erreicht werden.
AML	Bei der als Akute Myeloische Leukämie [190] bezeichneten Entartung der Myeloblasten im Knochenmark werden in kürzester Zeit die gesunden Vorläufer der Leukozyten durch erkrankte Zellen verdrängt. Dies ist die häufigste bei Erwachsenen auftretende leukämische Erkrankung, auch hier werden Chemotherapie und Stammzelltransplantation zur Heilung eingesetzt.
MDS	Das Myelodysplastische Syndrom gehört ebenfalls zu den leukämischen Erkrankungen [191], [192]. Hierbei handelt es sich um eine Vorstufe der akuten Leukämien, bei der die Proliferation und Reifung einzelner oder mehrerer hämatopoietischer Zelltypen im Knochenmark gestört ist, was zu Anämien (Erythrozytenmangel), Gefahr von Blutungen (Thrombozytenmangel) und/oder erhöhtem Infektionsrisiko (Leukozytenmangel) führt. Allein eine Stammzelltransplantation bietet Aussicht auf vollständige Heilung.
SCID	Die Serwere Combined Immuno-Deficiency umfasst verschiedene genetisch bedingte Defekte des Immunsystems, welche alle in funktionsunfähigen T-Zellen resultieren (teilweise ebenfalls in inaktiven B- und NK-Zellen, [193]). Da betroffene Patienten immunologisch stark geschwächt sind führen Infektionen oftmals bereits im Kleinkindalter zum Tod. Neben ersten Ansätzen mittels Gentherapie bietet die Stammzelltransplantation die bislang einzige Möglichkeit zur vollständigen Heilung.
AA	Bei der Aplastischen Anämie [194] (auch als Panmyelopathie oder Knochenmarksversagen bezeichnet) kann es sich um eine angeborene Erkrankung (Fanconi Anämie, Diamond-Blackfan-Syndrom) handeln, sie kann aber auch infolge einer Schädigung des Knochenmarks durch chemische Stoffe, Virusinfektion oder Autoimmunerkrankung auftreten. Hierbei wird die Zellproduktion durch die Stammzellen im Knochenmark stark verringert oder völlig eingestellt, sodass keine ausgereiften Blutzellen gebildet werden. Als Therapiemöglichkeiten stehen sowohl Chemotherapie als auch Stammzelltransplantation zur Wahl.
HA	Im Falle der Hämolytischen Anämie [195] tritt ein übermäßiger Abbau der Erythrozyten auf, wobei die Ursachen in korpuskuläre oder extrakorpuskuläre Gründe unterschieden werden. Zu ersterem gehören unter anderem erblich bedingte Defekte wie die Kugelzellanämie (Sphärozytose), Sichelzellanämie (Drepanozytose) oder Pyruvatkinasemangel (Favismus). Extrakorpuskuläre Ursachen hingegen können oft medikamentös bedingt sein, als Folge einer Transplantation (Graft-versus-Host-Disease) bzw. Autoimmunreaktion auftreten oder aber als Symptom einer Infektion mit z.B. Malaria, Mumps oder Cholera. Teilweise kann als mögliche Therapie eine Milzentfernung erwogen werden, in der Regel werden aber Chemotherapie und Stammzelltransplantation zur Behandlung eingesetzt.
PV	Im Gegensatz zur Anämie steht das Auftreten von Polyzythämie [196]. Dies bezeichnet das Auftreten von übermäßig vielen Erythrozyten und einem damit verbundenem erhöhtem Hämatokrit-Wert sowie erhöhter Blutviskosität. Dies kann bereits bei kurzem Sauerstoffmangel, z.B. nach circa 1 Woche Aufenthalt in Höhenluft der Fall sein (ein teilweise von Sportlern genutzter Effekt), allerdings kann Polyzythämie auch als Sekundärerkrankung eines Lungen-, Herz- oder Nierenleidens oder bei maligner Erkrankung des Knochenmarks (Polyzythaemia vera) auftreten. Generell steht primär die Symptombehandlung im Vordergrund, bei der Blut durch Kochsalzlösung ausgetauscht wird. Ergänzend kann durch Chemotherapie die Anzahl der Zellen reduziert (z.B. durch Interferon α) oder auch das Blut (z.B. durch Acetylsalicylsäure) verdünnt werden. Eine vollständige Heilung der Polyzythaemia vera ist bislang nur durch eine Stammzelltransplantation erreichbar.

Anhang 1a: Übersicht der häufigsten Erkrankungen des blutbildenden Systems.

Anhang 1b

Anhang 1b: Zusammensetzung des adulten peripheren Blutes.				
Zelltyp	Menge / μl Blut	Anteil an Gesamtzahl	Anteil an Leukozyten	Anteil an Lymphozyten
Erythrozyten	~ 5.000.000	~ 95 %	-	-
Thrombozyten	~ 200.000	~ 4-5 %	-	-
Leukozyten	~ 10.000	~ 0,2 %	-	-
Lymphozyten	~ 4.000	~ 0,1 %	~ 25-40 %	-
T-Zellen	~ 2.500	> 0,1 %	~ 20-30 %	~ 70-80 %
B-Zellen	~ 500	> 0,01 %	~ 4-5 %	~ 15 %
NK-Zellen	~ 400	> 0,01 %	~ 3-4 %	~ 10%
Monozyten	~ 500	> 0,01 %	~ 5 %	-
Granulozyten	~ 6.000	~ 0,1 %	~ 45-75 %	-
Dendritische Zellen	~ 50	> 0,001 %	~ 0,1-0,5 %	-

Anhang 2

Primersequenzen für den Nachweis ausgewählter Zytokin-RNA		
Zytokin	Sequenz Forward(5') / Reverse(3') Primer	Annealingtemperatur [°C] /Produktgröße [bp]
Angiopoetin (ANGPT1)	Forward: ATGCTGGAGATAGGAACC Reverse: TGTCTGTTGAAGAAGTTGC	55 °C 165 bp
<i>Fibroblast growth factor 1</i> (FGF1)	Forward: TACAAGAAGCCCAAACCTCT Reverse: GCCGTATAAAAGCCCGTC	60 °C 204 bp
<i>Insulin-like growth factor 2</i> (IGF2)	Forward: ATTGCTGCTTACCGCCCA Reverse: CACTCCTCAACGATGCCACG	60 °C 143 bp
<i>Insulin-like growth factor-binding protein 1</i> (IGFBP1)	Forward: CAAAAAATGGAAGGAGCCC Reverse: GATGTCTCACACTGTCTGC	60 °C 153 bp
<i>Stem cell factor</i> (SCF)	Forward: GGATAAGCGAGATGGTAGTA Reverse: CTTCAGGAGTAAAGAGCC	55 °C 210 bp
<i>Stromal-derived factor 1</i> (SDF-1)	Forward: CTCAACTCCAACTGTGC Reverse: GCTTTCTCCAGGTACTCC	60 °C 110 bp
Thrombopoetin (THPO)	Forward: TCACCCTTGCCTACACC Reverse: GTCCTGCTCCAGAATGT	60 °C 108 bp

Anhang 2: Übersicht der für die molekularbiologischen Analysen verwendeten Primersequenzen.

Anhang 3

Kriterien MSC-Phänotyp nach ISCT bzw. modifiziertem ISCT-Protokoll.			
Antigen	ISCT	ISCT Mod.	Vorkommen / Funktion (nur für modifiziertes Protokoll angegeben)
CD11b	-		Monozyten / Makrophagen
CD14	-		Monozyten/ Makrophagen
CD19	-		B-Zellen
CD31		-	CD31 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule; PECAM-1) dient dem Ausschluss endothelialer Zellen, welche diesen Marker stark exprimieren. Ebenso wird CD31 innerhalb der Leukozytenpopulation auf der Oberfläche von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und bestimmten T-Zell-Subpopulationen sowie auf Thrombozyten exprimiert [197]
CD34	-	-	Innerhalb der Leukozytenpopulation dient der Oberflächenmarker CD34 , dessen genau Funktion noch unbekannt ist [198], zur Identifizierung junger hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen (hematopoietic stem/ progenitor cells, HSC /HPC) [199], [200], ebenfalls wird er von Endothelzellen exprimiert [201].
CD45	-	-	CD45 (Leukocyte common antigen, LCA) dient der Identifizierung aller Leukozyten, wobei sich die verschiedenen Subtypen bezüglich der Expressionsstärken in zwei Gruppen, low und high (auch: dim und high) aufteilen [161].
CD71		+	CD71 ist der spezifische Rezeptor für das Eisen-Transportprotein Transferrin (TRF). Dieser ist unabdingbar zur Initiierung der DNA-Synthese, wodurch TRF als Proliferationsfaktor gewertet wird. Folgerichtig weisen proliferierende Zellen eine deutliche Expression von CD71 auf [202].
CD73	+	+	CD73 (5'-Ecto-Nukleotidase) hat neben einer enzymatischen Funktion (u.a. der Synthese von Adenosinmonophosphat und somit Einfluss auf die Adenosin-Rezeptoren) auch Anteil an der Zell-Zell-Interaktion zwischen T-/B-Zellen und Endothelzellen sowie mutmaßlich der Adhäsion [203]. Die genau Wirkungsweise bei MSC ist ungeklärt, aktuell wird eine Funktion bei der Zell-Zell-Interaktion zu Lymphozyten postuliert [204].
CD79b	-		B-Zellen
CD90	+	+	CD90 (Thymus cell antigen 1, Thy-1) ist auf CD34-positiven humanen HPC ein Selektionsmarker für frühe Vorläuferzellen („early progenitors“) bzw. <i>Long-term culture initiating cells</i> [205]. Die Bedeutung der generell positiven Expression auf MSC ist ungeklärt.
CD105	+	+	CD105 (TGF- β 1/3 Rezeptor, Endoglin), welcher unter anderem auf hämatopoietischen, endothelialen als auch Tumor-Zellen vorkommt, beeinflusst speziell die Angiogenese [206], [207]. Für die auf BM-MSc nachgewiesenen Expression [208] besteht vermutlich ein Zusammenhang mit der TGF- β 1-induzierten Chondrogenese [209] als auch eventuell bei der Zell-Zell-Interaktionen mit hämatopoietischen Zellen [210].
CD166		+	CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule, ALCAM), ursprünglich auf epithelialen sowie T- und B-Zellen als auch auf Monozyten nachgewiesen, wurde 1998 als ebenfalls auf MSC exprimiert beschrieben [211]. Postuliert wird neben einem positiven Effekt auf den Erhalt hämatopoietischer Stammzellen [212] auch ein Zusammenhang mit der Multipotenz und speziell der osteogenen Differenzierung [213].
HLA-ABC	+	+	HLA-ABC und HLA-DR stellen die ersten beiden Klassen des humanen Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC), auch als Humanes Leukozytenantigen-System (HLA-System) bezeichnet, dar. Im Fall der Klasse I (HLA-A, -B und -C) werden über diese Rezeptoren von der Zelle produzierte Peptide aus dem Zytoplasma (zur Erkennung als körpereigen), im Fall von Klasse II (HLA-D und -R) von aufgenommenen Peptiden (als körperfremd, z.B. Virusmaterial), präsentiert. HLA-Klasse I wird von allen kernhaltigen Zellen exprimiert (wobei eine tumorogene Entartung häufig mit einem Verlust oder einer Veränderung einhergeht), HLA-Klasse II von antigenpräsentierenden (antigen presenting cells, APC) wie beispielsweise Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, oder stimulierten Zellen.
HLA-DR	-	-	

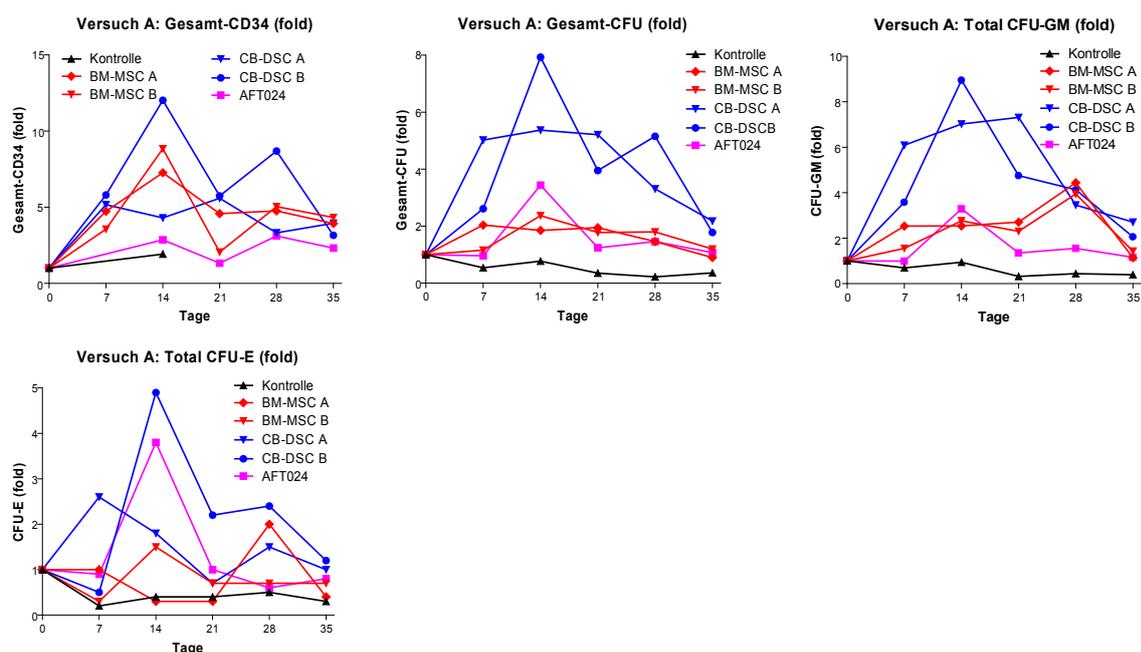
Anhang 3: Übersicht des ISCT- und des modifizierten (ISCT Mod.) Protokolles zur phänotypische Untersuchung der Oberflächenmarker auf MSC und ihrer Bedeutung.

Anhang 4**Anhang 4: Ergebnisse und Sensitivitäten RayBiotech Human Cytokine Array V.**

<u>Zytokin</u>	<u>pg/ml</u>	<u>Zytokin</u>	<u>pg/ml</u>	<u>Zytokin</u>	<u>pg/ml</u>
Angiogenin	> 10	IGFBP-4	> 1000	MIG	< 1
BDNF	~ 100	IGF-I	< 10	MIP-1beta	> 10
BLC	< 10	IL-10	~ 10	MIP-1delta	~ 100
Ck beta 8-1	< 1000	IL-12	> 12	MIP-3alpha	< 100
EGF	> 1	IL-13	< 100	NAP-2	> 100
ENA-78	> 1	IL-15	< 100	NT-3	> 20
Eotaxin	< 1	IL-16	~ 1	NT-4	> 2
Eotaxin-2	~ 1	IL-1alpha	~ 1000	OSM	> 100
Eotaxin-3	< 320	IL-1beta	< 100	Osteoprotegerin	> 100
FGF-4	~ 1000	IL-2	< 25	PARC	> 1000
FGF-6	< 1000	IL-3	< 100	PDGF-B	< 1000
FGF-7	~ 1	IL-4	< 1	PIGF	> 100
FGF-9	~ 100	IL-5	< 1	RANTES	< 2000
Flt-3 Ligand	< 1	IL-6	> 1	SCF	< 10
Fractalkine	< 1600	IL-7	< 100	SDF-1	< 2000
GCP-2	< 100	IL-8	> 1	TARC	< 100
GDNF	> 100	IP-10	> 10	TGF-beta	< 200
GM-CSF	< 100	Leptin	< 100	TGF-beta2	> 1000
GRO	> a/b:1000;g:1	LIF	> 1000	TGF-beta3	< 100
GRO-alpha	< 1000	LIGHT	< 1	TIMP-1	> 1
G-CSF	< 2000	MCP-1	> 3	TIMP-2	> 10
HGF	> 200	MCP-2	> 100	TNF-alpha	~ 10
I-309	< 1000	MCP-3	> 1000	TNF-beta	< 1000
IFN-gamma	< 100	MCP-4	< 100	THPO	~ 100
IGFBP-1	> 1	MCSF	> 1	VEGF	> 100
IGFBP-2	> 10	MDC	< 1000		
IGFBP-3	> 1000	MIF	> 100		

Sowohl CB-DSC als auch BM-MSC zeigten ein identisches Profil mit deutlicher (>, fett hervorgehoben), schwacher (~) oder nicht nachweisbarer (<) Zytokinexpression. Zu beachten sind hierbei jedoch die stark variierende Sensitivitäten des Assays.

Anhang 5a



Anhang 5a: Entwicklung Gesamtzellzahl, CD34⁺-Zellen und CFU in Vorversuch A. Sowohl für die Gesamtzellzahl als auch die koloniebildenden Einheiten ergab sich auf Stromazellen aus Nabelschnurblut (blau) eine deutlich stärkere Expansion als auf Stromazellen aus Knochenmark (blau) oder murinen fötalen Leberzellen (pink).

Anhang 5b

Versuch A :					
Mittlere Expansionswerte CB-DSC (C) versus BM-MSC (B)					
Tag	Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt	CFU-GM	CFU-E
d7	C: 20.10 ± 1.60 n=2 B: 14.00 ± 2.00 n=2 p= 0,1402	C: 5.49 ± 0.32 n=2 B: 4.15 ± 0.59 n=2 p= 0,1812	C: 3.82 ± 1.21 n=2 B: 1.60 ± 0.44 n=2 p= 0,2264	C: 4.84 ± 1.26 n=2 B: 2.04 ± 0.49 n=2 p= 0,1737	C: 1.55 ± 1.05 n=2 B: 0.65 ± 0.35 n=2 p= 0,5015
d14	C: 182.50 ± 35.00 n=2 B: 38.00 ± 3.50 n=2 p= 0,0545	C: 8.16 ± 3.86 n=2 B: 8.06 ± 0.79 n=2 p= 0,9812	C: 6.65 ± 1.28 n=2 B: 2.11 ± 0.26 n=2 p= 0,0737	C: 7.99 ± 0.97 n=2 B: 2.65 ± 0.11 n=2 p= 0,0316	C: 3.35 ± 1.55 n=2 B: 0.90 ± 0.60 n=2 p= 0,2784
d21	C: 361.25 ± 131.25 n=2 B: 55.00 ± 2.50 n=2 p= 0,1449	C: 5.67 ± 0.08 n=2 B: 3.32 ± 1.26 n=2 p= 0,2043	C: 4.58 ± 0.63 n=2 B: 1.87 ± 0.09 n=2 p= 0,0507	C: 6.03 ± 1.28 n=2 B: 2.51 ± 0.21 n=2 p= 0,1128	C: 1.45 ± 0.75 n=2 B: 0.50 ± 0.20 n=2 p= 0,3456
d28	C: 302.50 ± 77.50 n=2 B: 71.25 ± 8.75 n=2 p= 0,0974	C: 6.01 ± 2.69 n=2 B: 4.90 ± 0.14 n=2 p= 0,7209	C: 4.23 ± 0.92 n=2 B: 1.63 ± 0.17 n=2 p= 0,1088	C: 3.80 ± 0.34 n=2 B: 4.19 ± 0.25 n=2 p= 0,4444	C: 1.95 ± 0.45 n=2 B: 1.35 ± 0.65 n=2 p= 0,5271
d35	C: 245.00 ± 85.00 n=2 B: 145.00 ± 15.00 n=2 p= 0,3663	C: 3.56 ± 0.40 n=2 B: 4.13 ± 0.20 n=2 p= 0,3236	C: 1.98 ± 0.20 n=2 B: 1.05 ± 0.15 n=2 p= 0,0653	C: 2.39 ± 0.33 n=2 B: 1.29 ± 0.15 n=2 p= 0,0907	C: 1.10 ± 0.10 n=2 B: 0.55 ± 0.15 n=2 p= 0,0927
Maximale Expansionswerte CB-DSC (C) versus BM-MSC (B)					
Gesamtzellen		CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt		
C: 361.25 ± 131.25 n=2 (d21/d21) B: 145.00 ± 15.00 n=2 (d35/d35) p= 0,2433		C: 8.81 ± 3.21 n=2 (d21/d14) B: 8.06 ± 0.79 n=2 (d14/d14) p= 0,9812	C: 6.65 ± 1.28 n=2 (d14/d14) B: 2.21 ± 0.17 n=2 (d7/d14) p= 0,0749		
CFU-GM		CFU-E			
C: 8.13 ± 0.82 n=2 (d21/d14) B: 4.19 ± 0.25 n=2 (d28/d28) p= 0,0442		C: 3.75 ± 1.15 n=2 (d7/d14) B: 1.75 ± 0.25 n=2 (d27/d14) p= 0,2313			

Anhang 5b : Übersicht zeitkinetische und Maximale Expansionswerte auf CB-DSC gegenüber BM-MSC in Vorversuch A.

Anhang 6a

Versuch B : Mittlere Expansionswerte CB-DSC (C) versus BM-MSC (B)					
Tag	Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt	CFU-GM	CFU-E
d7	C: 13.63 ± 2.14 n=3 B: 4.88 ± 0.13 n=2 p= 0,0504	C: 4,68 ± 0,60 n=3 B: 1,60 ± 0,06 n=2 p= 0,0292	C: 1,86 ± 0,39 n=3 B: 0,66 ± 0,15 n=2 P= 0,1022	C: 1,71 ± 0,28 n=3 B: 0,65 ± 0,17 n=2 p= 0,0711	C: 2,03 ± 0,56 n=3 B: 0,65 ± 0,15 n=2 p= 0,1554
d14	C: 91.20 ± 29.12 n=3 B: 52.60 ± 17.20 n=2 p= 0,4028	C: 4,49 ± 0,16 n=3 B: 3,16 ± 0,02 n=2 p= 0,0077	C: 2,62 ± 0,39 n=3 B: 2,96 ± 0,48 n=2 P= 0,6236	C: 4,53 ± 0,67 n=3 B: 5,12 ± 0,83 n=2 p= 0,6223	C: 1,00 ± 0,06 n=3 B: 0,95 ± 0,05 n=2 p= 0,5908
d21	C: 109.60 ± 61.88 n=3 B: 25.50 ± 6.10 n=2 p= 0,3704	C: 2,56 ± 1,06 n=3 B: 2,32 ± 0,86 n=2 p= 0,8841	C: 2,44 ± 1,36 n=3 B: 0,51 ± 0,16 n=2 P= 0,3534	C: 4,22 ± 2,35 n=3 B: 0,88 ± 0,28 n=2 p= 0,3517	C: 0,90 ± 0,51 n=3 B: 0,15 ± 0,05 n=2 p= 0,3405
d28	C: 164.30 ± 38.16 n=3 B: 24.05 ± 1.85 n=2 p= 0,0653	C: 3,18 ± 0,75 n=3 B: 2,21 ± 0,10 n=2 p= 0,3899	C: 1,48 ± 0,20 n=2 B: 0,57 ± 0,30 n=2 P= 0,1276	C: 2,56 ± 0,35 n=2 B: 0,99 ± 0,52 n=2 p= 0,1292	C: 0,20 ± 0,20 n=2 B: 0,20 ± 0,10 n=2 p= 1,0000
Maximale Expansionswerte CB-DSC (C) versus BM-MSC (B)					
Gesamtzellen		CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt		
C: 164,30 ± 38,16 n=3 (d28/d28/d28) B: 52,60 ± 17,20 n=2 (d14/d14) p= 0,1158		C: 4,91 ± 0,37 n=3 (d14/d7/d7) B: 3,16 ± 0,02 n=2 (d14/d21) p= 0,0342	C: 3,47 ± 0,77 n=3 (d14/d7/d21) B: 2,96 ± 0,48 n=2 (d14/d14) p= 0,6652		
CFU-GM		CFU-E			
C: 5,56 ± 1,60 n=3 (d14/d14/d21) B: 5,12 ± 0,83 n=2 (d14/d14) p= 0,8488		C: 2,27 ± 0,42 n=3 (d7/d7/d21) B: 1,00 (Keine Expansion) p= 0,1004			

Anhang 6a: Übersicht zeitkinetische und Maximale Expansionswerte auf CB-DSC gegenüber BM-MSC in Versuch B.**Anhang 6b**

Versuch C : Mittlere Expansionswerte CB-DSC (C) versus BM-MSC (B)					
Tag	Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt	CFU-GM	CFU-E
d7	C: 11,27 ± 1,87 n=3 B: 4,77 ± 1,47 n=2 p= 0,0915	C: 5,20 ± 1,08 n=3 B: 2,55 ± 0,65 n=2 p= 0,1701	C: 2,04 ± 0,52 n=3 B: 0,61 ± 0,13 n=2 P= 0,1246	C: 2,20 ± 0,35 n=3 B: 0,85 ± 0,25 n=2 p= 0,0705	C: 1,90 ± 0,65 n=3 B: 0,45 ± 0,05 n=2 p= 0,1831
d14	C: 24,42 ± 8,15 n=3 B: 11,37 ± 3,10 n=2 p= 0,3126	C: 11,37 ± 4,01 n=3 B: 6,70 ± 1,60 n=2 p= 0,4442	C: 2,35 ± 0,65 n=3 B: 1,10 ± 0,27 n=2 P= 0,2385	C: 3,33 ± 0,59 n=3 B: 1,95 ± 0,45 n=2 p= 0,1949	C: 1,67 ± 0,71 n=3 B: 0,55 ± 0,15 n=2 p= 0,3107
d21	C: 50,42 ± 25,96 n=3 B: 16,70 ± 8,37 n=2 p= 0,3954	C: 7,13 ± 2,55 n=3 B: 3,65 ± 0,65 n=2 p= 0,3714	C: 1,55 ± 0,14 n=3 B: 0,53 ± 0,27 n=2 P= 0,0326	C: 2,90 ± 0,51 n=3 B: 0,95 ± 0,45 n=2 p= 0,0786	C: 1,87 ± 1,05 n=3 B: 0,25 ± 0,15 n=2 p= 0,3199
d28	C: 81,69 ± 27,70 n=3 B: 12,00 ± 4,00 n=2 p= 0,1474	C: 3,93 ± 0,98 n=3 B: 1,80 ± 0,20 n=2 p= 0,1938	C: 1,65 ± 0,18 n=3 B: 0,51 ± 0,29 n=2 p= 0,0368	C: 2,87 ± 0,38 n=3 B: 0,90 ± 0,50 n=2 p= 0,0505	C: 1,90 ± 0,70 n=3 B: 0,25 ± 0,15 n=2 p= 0,1677
Maximale Expansionswerte CB-DSC (C) versus BM-MSC (B)					
Gesamtzellen		CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt		
C: 94,24 ± 34,57 n=3 (d21/d21/d28) B: 12,30 ± 3,97 n=2 (d21/d21) p= 0,1643		C: 11,37 ± 4,01 n=3 (d14/d14/d14) B: 6,70 ± 1,60 n=2 (d14/d14) p= 0,4442	C: 2,69 ± 0,51 n=3 (d7/d14/d14) B: 1,10 ± 0,27 n=2 (d14/d14) p= 0,1026		
CFU-GM		CFU-E			
C: 3,90 ± 0,35 n=3 (d21/d14/d28) B: 1,95 ± 0,45 n=2 (d14/d14) p= 0,0398		C: 2,77 ± 0,73 n=3 (d21/d14/d14) B: 1,00 (Keine Expansion) p= 0,1580			

Anhang 6b: Übersicht zeitkinetische und Maximale Expansionswerte auf CB-DSC gegenüber BM-MSC in Versuch C.

Anhang 7

Versuch D : Mittlere Expansionswerte konditioniertes Medium CB-DSC (C) versus konditioniertes Medium BM-MSC (B)					
Tag	Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt	CFU-GM	CFU-E
d7	C: 1,45 ± 0,35 n=2 B: 1,60 ± 0,00 n=2 p= 0,7099	C: 1,06 ± 0,32 n=2 B: 1,22 ± 0,04 n=2 p= 0,6690	C: 0,59 ± 0,08 n=2 B: 0,64 ± 0,04 n=2 p= 0,6576	C: 1,51 ± 0,43 n=2 B: 2,02 ± 0,91 n=2 p= 0,6666	C: 0,21 ± 0,06 n=2 B: 0,13 ± 0,11 n=2 p= 0,5549
d14	C: 7,45 ± 0,35 n=2 B: 4,85 ± 0,75 n=2 p= 0,0881	C: 4,68 ± 0,03 n=2 B: 3,54 ± 0,59 n=2 p= 0,1898	C: 2,34 ± 0,63 n=2 B: 1,99 ± 0,01 n=2 p= 0,6344	C: 7,42 ± 4,50 n=2 B: 5,82 ± 2,25 n=2 p= 0,7811	C: 0,57 ± 0,17 n=2 B: 0,45 ± 0,04 n=2 p= 0,5506
d21	C: 12,45 ± 0,55 n=2 B: 11,20 ± 0,50 n=2 p=0,2347	C: N/A B: N/A p= N/A	C: N/A B: N/A p= N/A	C: N/A B: N/A p= N/A	C: N/A B: N/A p= N/A
d28	C: 13,60 ± 0,50 n=2 B: 8,80 ± 1,20 n=2 p= 0,0662	C: 1,67 ± 0,18 n=2 B: 0,89 ± 0,14 n=2 p= 0,0744	C: 3,20 ± 0,09 n=2 B: 1,91 ± 1,30 n=2 p= 0,4279	C: 10,73 ± 4,43 n=2 B: 4,48 ± 1,41 n=2 p= 0,3110	C: 0,18 ± 0,08 n=2 B: 0,28 ± 0,28 n=2 p= 0,7640
Maximale Expansionswerte konditioniertes Medium CB-DSC (C) versus konditioniertes Medium BM-MSC (B)					
Gesamtzellen		CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt		
C: 13,60 ± 0,50 n=2 (d28/d28) B: 11,20 ± 0,50 n=2 (d21/d21) p*= 0,0769		C: 4,68 ± 0,03 n=2 (d14/d14) B: 3,54 ± 0,59 n=2 (d14/d14) p*= 0,1898	C: 3,20 ± 0,09 n=2 (d28/d28) B: 2,61 ± 0,61 n=2 (d28/d14) p= 0,4361		
CFU-GM		CFU-E			
C: 10,73 ± 4,43 n=2 (d28/d28) B: 6,98 ± 1,09 n=2 (d28/d14) p= 0,4975		C: 1,00 (Keine Expansion) B: 1,00 (Keine Expansion) p= N/A			

Anhang 7: Übersicht zeitkinetische und Maximale Expansionswerte mit durch CB-DSC bzw. BM-MSC konditioniertem Medium in Versuch D.**Anhang 8**

Versuch E : Expansionswerte direkte Kokultur (DC) versus indirekte Kokultur (TW)					
Tag	Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt	CFU-GM	CFU-E
d7	DC: 8,21 ± 2,33 n=6 TW: 5,38 ± 1,33 n=6 p*=0,0519	DC: 2,00 ± 0,16 n=6 TW: 1,50 ± 0,15 n=6 p*= 0,0494	DC: 1,85 ± 0,48 n=6 TW: 1,29 ± 0,31 n=6 p*= 0,0245	DC: 3,16 ± 0,91 n=6 TW: 1,47 ± 0,34 n=6 p*= 0,0400	DC: 0,68 ± 0,14 n=6 TW: 1,22 ± 0,35 n=6 p*= 0,0909
d14	DC: 68,92 ± 26,89 n=6 TW: 47,35 ± 17,93 n=6 p*= 0,0650	DC: 1,91 ± 0,89 n=6 TW: 1,68 ± 0,28 n=6 p*= 0,8101	DC: N/A TW: N/A p*= N/A	DC: N/A TW: N/A p*= N/A	DC: N/A TW: N/A p*= N/A
d21	DC: 78,88 ± 19,63 n=6 TW: 51,71 ± 16,74 n=6 p*= 0,0010	DC: 1,76 ± 0,27 n=6 TW: 1,30 ± 0,15 n=6 p*= 0,1636	DC: 1,50 ± 0,16 n=6 TW: 0,92 ± 0,21 n=6 p*= 0,0033	DC: 3,09 ± 0,31 n=6 TW: 1,77 ± 0,38 n=6 p*= 0,0007	DC: 0,10 ± 0,045 n=6 TW: 0,18 ± 0,098 n=6 p= 0,2586
Maximale Expansionswerte direkte Kokultur (DC) versus indirekte Kokultur (TW)					
Gesamtzellen		CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt		
DC: 80,63 ± 21,99 n=6 (d14/d21) TW: 51,71 ± 16,74 n=6 (d21/d21) p*= 0,0050		DC: 2,48 ± 0,75 n=6 (d14/d7) TW: 1,68 ± 0,28 n=6 (d14/d14) p*= 0,1932	DC: 2,31 ± 0,30 n=6 (d7/d21) TW: 1,67 ± 0,16 n=6 (d7/d21) p*= 0,0869		
CFU-GM		CFU-E			
DC: 4,34 ± 0,45 n=6 (d7/d21) TW: 2,31 ± 0,26 n=6 (d7/d21) p*= 0,0079		DC: 1,00 (Keine Expansion) TW: 1,22 ± 0,35 n=6 (d7/d7) p*= 0,5616			

p*= Statistische Auswertung mittels paired t-Test, Werte (n=3 pro Linie) je Linie aufsteigend gegenübergestellt.

Anhang 8: Übersicht zeitkinetische und Maximale Expansionswerte direkte gegenüber indirekte Kokultur in Versuch E.

Anhang 9

Zytokin	USSC (n=4)	+/-	CB-MS-C (n=3)	+/-	Kontrolle (n=1)	p-Wert USSC vs. CB-MS-C	Sensitivität (pg/ml)
ALCAM	16,80	1,71	11,87	1,22	3,13	0,0789	100
Angiogenin	18,63	3,08	16,40	1,27	3,03	0,5845	10
Angiopoietin-2	13,13	1,06	16,80	2,12	26,32	0,1527	10000
Axl	13,18	0,75	15,80	1,42	5,34	0,1337	10000
ENA-78	10,40	2,30	10,53	4,62	5,72	0,9732	1
GCP-2	11,70	3,73	3,53	0,74	2,98	0,1267	100
GRO	81,15	23,69	92,17	44,79	2,74	0,8233	a: 1000, b: 1000, g: 1
GRO-a	27,60	12,33	31,17	21,51	3,11	0,8838	1000
HGF	11,40	4,67	31,70	14,04	3,92	0,1788	200
IGFBP-2	14,83	1,41	16,97	4,99	3,36	0,6499	10
IGFBP-4	41,00	5,57	38,80	3,09	4,53	0,7682	1000
IGFBP-6	12,38	1,88	14,07	1,43	3,47	0,5344	1000
IL-6	189,60	45,65	172,83	25,54	0,73	0,7849	1
IL-8	143,35	30,44	166,90	31,14	5,85	0,6187	1
MCP-1	24,95	14,96	47,60	14,87	2,11	0,3429	3
MIF	10,50	1,14	11,10	1,62	6,60	0,7708	100
Osteoprotegerin	7,60	1,89	12,53	3,02	4,87	0,2047	100
s IL-6 R	15,23	3,82	22,90	8,70	4,89	0,4110	10
s TNF RI	29,05	2,65	30,97	2,78	7,85	0,6403	100
s uPAR	27,00	6,96	35,33	4,50	4,78	0,3993	100
TIMP-1	48,90	4,23	57,23	4,50	4,64	0,2419	100
TIMP-2	83,40	6,92	101,60	8,35	4,17	0,1520	1
VEGF	12,68	3,82	14,73	2,26	2,05	0,6951	100

Anhang 9: Ergebnisse Raybiotech Cytokine Array C-Series 200. Werte angegeben in % relativ zur internen Positivkontrolle. Übersicht der Zytokine mit mindestens schwach positivem Nachweis (>10% Intensität der internen Positivkontrollen im Mittel).

Anhang 10

Versuch F : Expansionswerte USSC (U) versus CB-MS-C (C)					
Tag	Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt	CFU-GM	CFU-E
d7	U: 4.78 ± 0.32 n=6 C: 2.63 ± 0.27 n=3 p= 0,0038	U: 1.30 ± 0.33 n=6 C: 0.53 ± 0.06 n=3 p= 0,1598	U: 1.35 ± 0.17 n=6 C: 0.72 ± 0.12 n=3 p= 0,0457	U: 2.18 ± 0.26 n=6 C: 1.23 ± 0.09 n=3 p= 0,0441	U: 1.33 ± 0.30 n=6 C: 0.48 ± 0.15 n=3 p= 0,0982
d14	U: 55.15 ± 8.33 n=6 C: 15.50 ± 1.54 n=3 p= 0,0143	U: 0.91 ± 0.16 n=6 C: 0.12 ± 0.01 n=3 p= 0,0113	U: 1.72 ± 0.31 n=6 C: 0.58 ± 0.07 n=3 p= 0,0399	U: 3.60 ± 0.59 n=6 C: 1.57 ± 0.14 n=3 p= 0,0522	U: 0.82 ± 0.24 n=6 C: 0.06 ± 0.038 n=3 p= 0,0659
Maximale Expansionswerte USSC (U) versus CB-MS-C (C)					
Gesamtzellen		CD34⁺-Zellen		CFU gesamt	
U: 55.15 ± 8.33 n=6 (d14/d14) C: 15.50 ± 1.54 n=3 (d14/d14) p= 0,0143		U: 1.30 ± 0.33 n=6 (d7/d7) C: 1.00 (Keine Expansion) p= 0,5547		U: 1.35 ± 0.17 n=6 (d7/d7) C: 1.00 (Keine Expansion) p= 0,1518	
CFU-GM		CFU-E			
U: 3.60 ± 0.59 n=6 (d14/d14) C: 1.57 ± 0.14 n=3 (d14/d14) p= 0,0522		U: 1.00 (Keine Expansion) C: 1.00 (Keine Expansion) p= N/A			

Anhang 10: Übersicht zeitkinetische und maximale Expansionswerte auf USSC- gegenüber CB-MS-C-Feederzellen in Vorversuch F.

Anhang 11

Versuch G : Expansionswerte USSC (U) versus CB-MSC (C)					
Tag	Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt	CFU-GM	CFU-E
d3	U: 0.93 ± 0.05 n=12 C: 0.74 ± 0.05 n=12 p= 0,0150	U: 0.89 ± 0.06 n=6 C: 0.68 ± 0.08 n=6 p= 0,0687	U: 1.29 ± 0.21 n=6 C: 0.97 ± 0.10 n=6 p= 0,1883	U: 1.50 ± 0.28 n=6 C: 1.17 ± 0.14 n=6 p= 0,3058	U: 1.11 ± 0.17 n=6 C: 0.80 ± 0.10 n=6 p= 0,1466
d7	U: 2.36 ± 0.15 n=12 C: 1.58 ± 0.16 n=12 p= 0,0019	U: 1.37 ± 0.04 n=6 C: 0.95 ± 0.12 n=6 p= 0,0078	U: 2.85 ± 0.23 n=6 C: 2.19 ± 0.13 n=6 p= 0,0317	U: 5.30 ± 0.48 n=6 C: 4.23 ± 0.30 n=6 p= 0,0861	U: 0.86 ± 0.11 n=6 C: 0.54 ± 0.16 n=6 p= 0,1135
d10	U: 9.66 ± 0.58 n=11 C: 4.61 ± 0.45 n=11 p< 0.0001	U: 2.29 ± 0.14 n=6 C: 1.18 ± 0.14 n=6 p= 0,0002	U: 8.17 ± 1.37 n=4 C: 3.63 ± 0.27 n=4 p= 0,0172	U: 16.52 ± 3.16 n=4 C: 7.63 ± 0.48 n=4 p= 0,0318	U: 1.40 ± 0.12 n=4 C: 0.39 ± 0.11 n=4 p= 0,0007
d14	U: 30.54 ± 1.37 n=12 C: 13.49 ± 0.59 n=10 p< 0.0001	U: 2.83 ± 0.30 n=6 C: 1.59 ± 0.18 n=6 p= 0,0050	U: 6.90 ± 0.87 n=4 C: 2.94 ± 0.23 n=4 p= 0,0046	U: 15.24 ± 1.90 n=4 C: 6.21 ± 0.32 n=4 p= 0,0034	U: 0.13 ± 0.07 n=4 C: 0.30 ± 0.20 n=4 p= 0,4735
Maximale Expansionswerte USSC (U) versus CB-MSC (C)					
Gesamtzellen		CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt		
U: 30.54 ± 1.37 n=12 (d14/d14) C: 13.49 ± 0.59 n=10 (d14/d14) p< 0.0001		U: 2.83 ± 0.30 n=6 (d14/d14) C: 1.59 ± 0.18 n=6 (d14/d14) p= 0,0050	U: 8,26 ± 1,39 n=4 (d14/d10) C: 3,63 ± 0,27 n=4 (d10/d10) p= 0,0166		
CFU-GM		CFU-E			
U: 17,68 ± 2,84 n=4 (d14/d10) C: 7,63 ± 0,48 n=4 (d10/d10) p= 0,0129		U: 1.40 ± 0.12 n=4 (d10/d10) C: 1,00 (Keine Expansion) p= 0,0141			

Anhang 11: Übersicht zeitkinetische und maximale Expansionswerte auf USSC- gegenüber CB-MSC-Feederzellen in Versuch G.

Anhang 12

Versuch H : Expansionswerte USSC (U) versus CB-MSC und DLK-1-überexprimierende CB-MSC (C)					
Tag	Gesamtzellen	CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt	CFU-GM	CFU-E
d3	U: 1,24 ± 0,05 n=6 C: 1,17 ± 0,05 n=12 p= 0,3276	U: 1,27 ± 0,00 n=3 C: 1,17 ± 0,03 n=6 p= 0,0548	U: 1,29 ± 0,34 n=3 C: 0,90 ± 0,10 n=6 p= 0,1828	U: 1,59 ± 0,73 n=3 C: 0,81 ± 0,20 n=6 p= 0,2026	U: 1,09 ± 0,13 n=3 C: 0,95 ± 0,15 n=6 p= 0,5808
d7	U: 4,45 ± 0,06 n=6 C: 1,51 ± 0,06 n=12 P< 0,0001	U: 1,75 ± 0,01 n=3 C: 1,13 ± 0,04 n=6 p< 0,0001	U: 1,00 ± 0,41 n=2 C: 0,95 ± 0,10 n=3 p= 0,8901	U: 1,98 ± 0,75 n=2 C: 1,62 ± 0,12 n=3 p= 0,5783	U: 0,47 ± 0,23 n=2 C: 0,59 ± 0,09 n=3 p= 0,5804
d10	U: 19,56 ± 1,27 n=6 C: 3,77 ± 0,17 n=12 p< 0,0001	U: 2,14 ± 0,06 n=3 C: 0,71 ± 0,07 n=6 p< 0,0001	U: 4,39 ± 1,50 n=2 C: 0,73 ± 0,08 n=4 p= 0,0167	U: 10,21 ± 3,85 n=2 C: 1,61 ± 0,18 n=4 p= 0,0222	U: 1,23 ± 0,24 n=2 C: 0,25 ± 0,042 n=4 p= 0,0035
d14	U: 35,05 ± 3,75 n=6 C: 10,09 ± 0,37 n=12 p< 0,0001	U: 3,06 ± 0,08 n=3 C: 1,57 ± 0,02 n=6 p< 0,0001	U: 3,44 n=1 C: 1,06 ± 0,03 n=2 p= N/A	U: 9,10 n=1 C: 2,71 ± 0,09 n=2 p= N/A	U: 0,38 n=1 C: 0,17 ± 0,00 n=2 p= N/A
Maximale Expansionswerte USSC (U) versus CB-MSC und DLK-1-überexprimierende CB-MSC (C)					
Gesamtzellen		CD34 ⁺ -Zellen	CFU gesamt		
U: 35,05 ± 3,75 n=6 (d14) C: 10,09 ± 0,37 n=12 (d14/d14) p< 0,0001		U: 3,06 ± 0,08 n=3 (d14) C: 1,57 ± 0,02 n=6 (d14/d14) p< 0,0001	U: 4,39 ± 1,50 n=2 (d10) C: 1,06 ± 0,03 n=2 (d14/d14) p= 0,1562		
CFU-GM		CFU-E			
U: 10,21 ± 3,85 n=2 (d10) C: 2,71 ± 0,09 n=2 (d14/d14) p= 0,1905		U: 1,23 ± 0,24 n=2 (d10) C: 1,00 (Keine Expansion) p= 0,4390			

Anhang 12: Übersicht zeitkinetische und maximale Expansionswerte auf USSC- gegenüber CB-MSC-Feederzellen mit DLK-1-Überexpression in Versuch H.

Anhang 13

Versuch I : Mittlere Expansionswerte USSC (C) versus UC-MSC (X)					
Tag	Gesamtzellen	CD34⁺-Zellen	CFU gesamt	CFU-GM	CFU-E
d6	U: 1.61 ± 0.12 n=4 X: 2.78 ± 0.16 n=4 p= 0,0012	U: 0.95 ± 0.07 n=4 X: 1.41 ± 0.08 n=4 p= 0,0055	U: 0.67 ± 0.05 n=4 X: 1.08 ± 0.06 n=4 p= 0,0025	U: 1.15 ± 0.09 n=4 X: 1.79 ± 0.10 n=4 p= 0,0035	U: 0.44 ± 0.03 n=4 X: 0.63 ± 0.04 n=4 p= 0,0087
d10	U: 7.48 ± 0.39 n=4 X: 10.72 ± 0.25 n=4 p= 0,0004	U: 1.32 ± 0.07 n=4 X: 1.30 ± 0.03 n=4 p= 0,7578	U: 1.04 ± 0.05 n=4 X: 2.68 ± 0.06 n=4 p< 0.0001	U: 1.61 ± 0.08 n=4 X: 5.36 ± 0.12 n=4 p< 0.0001	U: 0.68 ± 0.04 n=4 X: 0.98 ± 0.02 n=4 p= 0,0004

Anhang 13: Übersicht zeitkinetische Expansionswerte auf USSC, CB-MSC und UC-MSC in Versuch I.

Danksagung

All jenen gerecht zu werden, welche im Laufe der Zeit und speziell in den letzten Jahren auf unterschiedlichste Weise dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit zustande kam, ist vermutlich schwieriger und bedarf mehr Seiten als die eigentliche Dissertation.

Zu Dankbarkeit verpflichtet bin ich vor allem Prof. Dr. Gesine Kögler, die mir als Betreuerin die Chance gab, mich mit dieser Arbeit zu beweisen, die mich förderte und forderte, mich motivierte wenn möglich und bremste wenn nötig. Ihr und Prof. Dr. Joachim Ernst, welcher das Koreferat übernahm, möchte ich hiermit an dieser Stelle noch einmal für die Betreuung dieser Arbeit danken.

Die Zahl der Kollegen, Kooperationspartner und Freunde, die mir durch Bereitstellung von Hilfe, Materialien oder einem offenen Ohr beiseite standen, ist Legion. So möchten mir diejenigen verzeihen, deren Namen im Folgenden nicht explizit erwähnt werden. Es liegt nicht daran, dass ich es nicht zu schätzen wüsste, sondern ausschließlich an dem begrenzten Platz auf dieser Seite... und/oder meinem schlechten Namensgedächtnis.

Neben Kathrin Jeltsch und Magda Klepak, welche beide im Rahmen ihrer eigenen Dissertation bzw. Diplomarbeit an einzelnen Experimenten dieser Arbeit direkt beteiligt waren, gilt mein Dank allen Mitarbeitern des ITZ, speziell aber Steffi, Maria, Andrea, Julia und Amelie (ich brauche halt normalverrückte Leute um mich) sowie Sandra, die mich die erste Zeit an die Hand genommen hatte. Ohne Kollegen wie Euch wäre es einfach nur ein Job, so ist es ein Abenteuer.

Aber auch außerhalb des Biotops „Arbeitsplatz“ gab es Menschen, die mich oft genug ins wahre Leben zurückgeholt haben. Wie angedroht danke ich hierfür unter anderem Helene und ihrem Team von McFit in Düsseldorf-Lierenfeld und meinen Trainingspartnern... oft genug konnte ich bei/mit Euch meinen Frust rauspowern.

Die kumulative Hauptlast und somit Verantwortung trägt jedoch unbestreitbar alles in allem meine Familie, die mich seit jeher unterstützt hat, sei es bei der Entscheidung erst nicht zu studieren,... dann doch... und dann auch noch zu promovieren. Nicht viele hätten soviel Verständnis für einen Sohn gehabt, der sich Jahr für Jahr weiter erfolgreich um ehrliche, harte Arbeit drückt, oder? Und wenn ich von Familie rede...

Milena... das schließt dich und Martin mit ein.

Gero... jetzt bist du wieder am Zug.

Mama... hör bitte sofort auf zu heulen.

Erklärung

Die hier vorgelegte Inauguraldissertation habe ich eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die Inauguraldissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 24.4.2012

(Teja Falk Radke)