



Institut für Biotechnologie

***Innovative Strategien zur Expansion
hematopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen
im klinisch relevanten Maßstab***

Tina Fischbach

***Innovative Strategien zur Expansion
hematopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen
im klinisch relevanten Maßstab***

Tina Fischbach

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4111

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4111

D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung:

Die gezielte Expansion hematopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut stellt nach wie vor eine Herausforderung in der modernen Biotechnologie dar. Die unterschiedlichen und sehr komplexen Mechanismen, die *in vivo* für die Regulation der Hematopoiese sorgen, sind nur in Teilen bekannt, und der Grad ihrer Vernetzung erschwert die Aufklärung der physiologischen Vorgänge. Allerdings konnte in etlichen Experimenten die besondere Rolle, die den stromalen Zellen des Knochenmarks bei der Steuerung so unterschiedlicher Prozesse wie Differenzierung, Reifung, Expansion, Apoptose etc. zufällt, nachgewiesen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Kultursysteme machen sich diese Erkenntnis zunutze. Der erste Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung des Prozesses zur Herstellung konditionierter Medien durch Variation verschiedener Parameter und unter Verwendung von drei stromalen, murinen Zelllinien. Ferner wurden die beobachteten Unterschiede der Medien unter Zuhilfenahme molekularbiologischer Techniken weiter untersucht. Dies hat zur Identifizierung eines Proteins geführt, dessen isolierte Wirkung auf hematopoietischen Zellen der Wirkung des konditionierten Mediums, aus welchem es gewonnen wurde, entsprach. Im zweiten Abschnitt wurde die Wechselwirkung der hematopoietischen Zellen mit den stromalen Zellen auf wesentlich komplexere Weise nachgestellt, um dadurch eine effizientere Nachahmung der Hämatopoiese bzw. der gezielten Expansion der hematopoietischen Zellen zu bewirken. Stromale Zellen wurden in Membran-separierter Co-Kultur mit hematopoietischen Zellen kultiviert. Kleine, 1µm große Poren erlaubten zwar den Austausch von Nähr- und Botenstoffen zwischen den beiden Kammern des zu diesem Zweck entwickelten Bioreaktors, hielten jedoch den Zellkörper der Stromalen Zellen zurück, sodass es nicht zu einer Vermischung der beiden Zelltypen kam und die hematopoietischen Zellen separat gewonnen werden konnten. Im Mittel konnten mononukleäre Zellen über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen um Faktor 61, Vorläuferzellen und frühe Vorläuferzellen jeweils um Faktor 22 bzw. 19 expandiert werden. Der Entwicklung des Bioreaktors im klinischen Maßstab ging die Erprobung und Optimierung des Ansatzes in einem miniaturisierten Testsystem voraus.

Abstract:

Hematopoiesis is a highly regulated process. A large variety of signaling factors, cell surface receptors and extracellular matrix molecules influence and direct cell expansion, maturation, differentiation, and apoptosis. Up to date, this complex network could not be clarified in detail, making it impossible to establish natural hematopoiesis for potential medical use *in vitro*. Despite this imprecise understanding, what is known, is the important role that bone marrow stromal cells play in aforementioned processes. In this work, the regulatory role of stromal cells during the expansion of hematopoietic stem and progenitor cells, isolated from cord blood, was analysed and finally exploited in order to improve biotechnological processes as for example the large scale expansion of cells. At first, optimal conditions for the production of stroma-conditioned media were established. Thereafter, differences between media, gained from three murine stromal cell lines, were analysed on single protein level. One protein, which could be isolated and identified, turned out to mimic the medium's effect on hematopoietic cells. Second, a novel bioreactor system, based on membrane-separated co-cultivation of murine stromal cells and human hematopoietic stem and progenitor cells, was developed. This special arrangement allows for the exchange of signaling molecules and nutrients through small pores in the membrane, whereas the harvest of stem cells can be performed without contaminating murine stromal cells. After 7 days of cultivation, mononuclear cells, progenitor cells and early progenitor cells could be expanded on average 61-fold, 22-fold and 19-fold, respectively. A small scale test system served for the analysis and further development of a clinical scale bioreactor.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen, Symbole und Warenzeichen

I

I. EINLEITUNG UND THEORETISCHER HINTERGRUND..... 1

I.1. DAS HÄMATOPOIETISCHE SYSTEM.....	1
I.1.1. Die hämatopoietische Stammzelle.....	1
I.1.2. Möglichkeiten der Zellcharakterisierung.....	5
I.1.3. Die Entwicklung des hämatopoietischen Systems	8
I.1.4. Plastizität der Stammzellen.....	9
I.2. DAS KNOCHENMARK - ORT DER REGULATION.....	11
I.2.1. Struktur des Knochenmarks.....	12
I.2.2. Mechanismen der Signaltransduktion.....	13
I.2.3. Das homing der HSPC.....	20
I.3. MEDIZINISCHE ASPEKTE	22
I.3.1. Verschiedene Quellen für HSPC.....	23
I.3.2. Weitere Therapieansätze mit HSPC	26

II. ZIELSETZUNG UND MOTIVATION.....27

III. PROBLEMSTELLUNG 29

III.1. SYSTEMVERGLEICH – WAS BISHER GESCHAH.....	30
III.1.1. Stroma konditioniertes Medium.....	32
III.1.2. Identifizierung stromaler Faktoren zur gezielten Supplementierung.....	33
III.1.3. Membran-separierte Co-Kultur.....	34

IV. MATERIAL UND METHODEN 35

IV.1. ZELLKULTUR.....	35
IV.1.1. Verwendete Zellen und Zelllinien.....	35
IV.1.2. Bestrahlung der stromalen Zellen.....	35
IV.1.3. Cytokine und ihre biologische Funktion	35
IV.1.4. Gewinnung humaner HSPC aus Nabelschnurblut	36
IV.1.5. Generelle Kulturbedingungen für die Suspensionskultur	36
IV.1.6. Herstellung konditionierter Medien (Grundlagen)	37
IV.1.7. Kultivierung im Mini-Membranreaktor (MMR)	38
IV.2. ANALYTIK.....	39
IV.2.1. Medienanalytik.....	39
IV.2.2. Zellzahlbestimmung.....	40
IV.2.3. Biologische Assays	40
IV.2.4. FACS-Analytik	41
IV.3. BIOCHEMIE/MOLEKULARBIOLOGIE	42
IV.3.1. Gelelektrophorese	44
IV.3.2. MALDI-TOF MS	46
IV.3.3. Datenbankanalyse der Spektren.....	48
IV.4. REM-AUFNAHMEN	49
IV.5. TIERVERSUCH.....	49

V. STATISTISCHE UNTERSUCHUNGEN	53
V.1. VOLUMEN UND REINHEIT DER AUFGEARBEITETEN BLUTPROBEN	54
V.2. DIE STANDARD-SUSPENSIONSKULTUR.....	54
V.3. MAXIMALE RELATIVE EXPANSIONEN.....	56
VI. KONDITIONIERTE MEDIEN.....	59
VI.1. VORBEMERKUNG	59
VI.1.1. Die grundsätzliche Eignung der stromalen Zellen zur Herstellung von SCM	62
VI.1.2. Strategien zur Kultivierung von HSPC in SCM.....	68
VI.1.3. Kurzzusammenfassung und Diskussion I.....	85
VI.2. PROTEINFREIE KONDITIONIERTE MEDIEN	95
VI.2.1. Kultivierung in proteinfreien SCM.....	98
VI.2.2. Kurzzusammenfassung und Diskussion II.....	119
VII. MEMBRAN-SEPARIERTE CO-KULTIVIERUNG	121
VII.1. MINI-MEMBRANREAKTOR.....	121
VII.1.1. Technischer Aufbau des Mini-Membranreaktors	123
VII.1.2. Etablierung der Kultivierungsstrategie im MMR	127
VII.1.3. Kulturvarianten.....	136
VII.1.4. Der NOD/SCID Maus-Repopulierungsversuch.....	147
VII.1.5. Kurzzusammenfassung und Diskussion III.....	152
VII.2. MEMBRANREAKTOR.....	158
VII.2.1. Technische Aspekte	158
VII.2.2. Biologische Aspekte.....	169
VII.2.3. Kurzzusammenfassung und Diskussion IV.....	173
VII.2.4. Kritische Schlussbemerkungen zum Thema klinische Relevanz	175
VIII. ZUSAMMENFASSUNG	179
IX. AUSBLICK	181
X. LITERATURVERZEICHNIS.....	185
ANHANG A SPEKTREN DER MITTELS MALDI-TOF MS IDENTIFIZIERTEN PROTEINE.....	201
ANHANG B TECHNISCHE DATEN DER BIOREAKTOREN	203
ANHANG C STANDARDBETRIEBSANWEISUNG DES MEMBRAN-REAKTORS...	209
ANHANG D HERLEITUNG DES MINDESTSAUERSTOFFBEDARFS.....	215
ANHANG E HERSTELLERNACHWEISE.....	217
DANKSAGUNG	221
LEBENS LAUF	223

Verzeichnis der Abkürzungen, Symbole und Warenzeichen

Abkürzungen

ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
BCA	<u>B</u> icin <u>ch</u> onic <u>A</u> cid (Bicinchoninsäure)
bFGF	<u>b</u> asic <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
BFU-E	<u>B</u> urst- <u>F</u> orming <u>U</u> nit- <u>E</u> rythroid
BHK	<u>B</u> aby <u>H</u> amster <u>K</u> idney
BM	<u>B</u> one <u>M</u> arrow
BNX	<u>B</u> eige <u>N</u> ude <u>S</u> cid
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine
XCAM	<u>X</u> Cell <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule
CAFC	<u>C</u> obblestone <u>A</u> rea <u>F</u> orming <u>C</u> ell
CB	<u>C</u> ord <u>B</u> lood
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
CFC	<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>C</u> ell
CFU-C	<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nit- <u>C</u> ell
CHO	<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary
CMV	<u>C</u> ytome <u>g</u> alie- <u>V</u> irus
CRD	<u>C</u> arbohydrate <u>R</u> ecognition <u>D</u> omain
X-CSF	<u>X</u> - <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
CXCR4	(Fusin) Rezeptor des Cytokins CXCL12 (SDF-1)
DMSO	<u>D</u> imethylsulfo <u>x</u> yd
ECM	<u>E</u> xtrac <u>e</u> llular <u>M</u> atrix
EPO	<u>E</u> rythropoietin
FAC	<u>F</u> ocal <u>A</u> dhesion <u>C</u> omplex
FACS	<u>F</u> luorescence- <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orter
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum
FITC	<u>F</u> luorescein Isothiocyanat
FL	<u>F</u> lt-3 <u>L</u> igand
Flt	<u>F</u> etal <u>L</u> iver <u>T</u> yrosinkinase
GAG	<u>G</u> lykosaminoglykan
GvHD	<u>G</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>H</u> ost <u>D</u> isease
GvL	<u>G</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>L</u> eukemia
HLA	<u>H</u> uman <u>L</u> eukocyte <u>A</u> ntigen
HS	<u>H</u> orse <u>S</u> erum

HSPC	<u>H</u> ämatopoietic <u>S</u> tem and <u>P</u> rogenitor <u>C</u> ell
IEF	<u>I</u> so <u>e</u> lektrische <u>F</u> okussierung
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IL-x	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin <u>x</u>
IMDM	<u>I</u> scove's <u>M</u> odified <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> edium
INF- α	<u>I</u> nter <u>f</u> eron- α
kDa	<u>K</u> ilo <u>d</u> alton
KO	<u>K</u> nock <u>O</u> ut
LCA	<u>L</u> euocyte <u>C</u> ommon <u>A</u> ntigen
LTC-IC	<u>L</u> ong- <u>T</u> erm <u>C</u> ulture- <u>I</u> nitiating <u>C</u> ell
MACS	<u>M</u> agnetic- <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting
MALDI-TOF	<u>M</u> atrix <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption <u>I</u> onisation – <u>T</u> ime <u>O</u> f <u>F</u> light
MC	<u>M</u> ethyl <u>C</u> ellulose
MIP-1 α	<u>M</u> acrophage <u>I</u> nflammatory <u>P</u> rotein <u>1</u> α
ML-IC	<u>M</u> yeloid/ <u>L</u> ymphoid- <u>I</u> nitiating <u>C</u> ell
MLR	<u>M</u> iniaturized <u>L</u> oop <u>B</u> io <u>r</u> eactor
MMP	<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase
MMR	<u>M</u> ini- <u>M</u> embran <u>r</u> eaktor
MNZ	<u>M</u> ono <u>n</u> ukleäre <u>Z</u> elle(n)
MW	<u>M</u> olecular <u>W</u> eight
NK	<u>N</u> atural <u>K</u> iller (Cell)
NOD/SCID	<u>N</u> on <u>o</u> bese <u>D</u> iabetic/ <u>S</u> evere <u>C</u> ombined <u>I</u> mmunode <u>f</u> icient
PB	<u>P</u> eripheres <u>B</u> lut
PBS	<u>P</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>S</u> aline
PC	<u>P</u> olycarbonate
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
PEEK	<u>P</u> oly <u>e</u> ther <u>e</u> ther <u>k</u> eton
PFA	<u>P</u> erfluor- <u>A</u> lkoxyalkan
PMF	<u>P</u> eptide <u>M</u> ass <u>F</u> ingerprints
PMMA	<u>P</u> olymethylmethacrylat
PSU	<u>P</u> olyethersulfon
PTFE	<u>P</u> olytetrafluorethylen
REM	<u>R</u> asterelektronenmikroskop
SCF	<u>S</u> tem <u>C</u> ell <u>F</u> actor
SCM	<u>S</u> troma <u>C</u> onditioned <u>M</u> edium
SDF-1	<u>S</u> troma <u>D</u> erived <u>F</u> actor- <u>1</u>
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfat - <u>P</u> olyacrylamid <u>G</u> elelektrophorese

SI	<u>S</u> teel
SOD	<u>S</u> uperoxyde <u>D</u> ismutase
SRC	<u>S</u> cid <u>R</u> epopulating <u>C</u> ell
TGF- β	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor- β
TIMP	<u>T</u> issue <u>I</u> nhibitor of <u>M</u> MP
TNF- α	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor- α
TPO	<u>T</u> hrombopoietin
UV	<u>U</u> ltraviolett
VEGF	<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
VEGFR2	<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor <u>2</u>
VLA	<u>V</u> ery <u>L</u> ate <u>A</u> ntigen

Symbole

c	<u>c</u> ell
d	<u>d</u> ay
Gy	<u>G</u> ray
kDa	<u>K</u> ilodalton
L	<u>L</u> iter
m	<u>m</u> illi
n	Anzahl der Versuche, <u>n</u> ano
U	<u>U</u> nit

Tabelle 0-1: Warenzeichen

Bezeichnung	Inhaber
CASY	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CellGro	Mediatech, Inc., Herndon, VA, USA
Falcon	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
MACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Marprene	Watson-Marlow Ltd., Falmouth, UK
Optisep	North Carolina SRT, Inc., NC, USA
Plexiglas	Röhm GmbH & Co. KG
Replicell	Aastrom Biosciences, Inc., Ann Arbor, MI, USA
Teflon	E.I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE, USA
Voyager-DE STR Biospectrometry	Applied Biosystems, Weiterstadt

I. EINLEITUNG UND THEORETISCHER HINTERGRUND

I.1. DAS HÄMATOPOIETISCHE SYSTEM

I.1.1. Die hämatopoietische Stammzelle

Eine Stammzelle definiert sich durch ihre Fähigkeit, eine enorm große Menge reifer, funktionaler Zellen zu produzieren, ohne dabei die Fähigkeit zur Selbsterneuerung zu verlieren [1-3].

Embryonale Stammzellen, aus der Inneren Zellmasse einer Blastocyste gewonnen, können sich, je nach Stimulus, zu sämtlichen Zellen bzw. Gewebetypen des menschlichen Organismus, immerhin bestehend aus mehr als 200 verschiedenen Zelltypen, entwickeln. Es ist nicht möglich, aus diesen Zellen einen vollständigen Organismus zu generieren. Diese Fähigkeit besitzen nur diejenigen Zellen, die aus dem Verband eines Embryos im Achtzellstadium gewonnen wurden, und die als totipotente Stammzellen bezeichnet werden. Pluripotente Stammzellen sind entsprechend ihrer Definition in der Lage, die Zelltypen des Keimblattes (Mesoderm, Endoderm, Ektoderm), aus dem sie isoliert wurden, zu produzieren. Adulte Stammzellen, mit deren *ex vivo* Kultivierung sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, sind in ihrem Differenzierungspotential noch weiter eingeschränkt. Sie können lediglich Zellen des Gewebes, aus dem sie isoliert wurden, bilden. In diesem Fall sind also die untersuchten hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen (*Hematopoietic Stem and Progenitor Cell*, HSPC) ausschließlich geeignet, für die Produktion der Zellen des hämatopoietischen Systems zu sorgen.

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts war es Alexander Alexandrowich Maximow, der die Fachwelt mit seiner Theorie über die Existenz einer gemeinsamen „Mutterstammzelle“, von der sämtliche hämatopoietischen Zellen abstammen sollten, irritierte [4].

Im Laufe der Zeit konnte seine Theorie durch experimentelle Befunde erhärtet werden, sodass das Konzept der Stammzellen mittlerweile auf sämtliche Organe und Gewebe des Körpers übertragen wurde [5-9]. Insbesondere die Untersuchungen von Till und McCulloch an Mäusen, deren hämatopoietisches System durch Bestrahlung zerstört wurde, lieferten wichtige Hinweise auf die Natur der HSPC.

Die Leistungsfähigkeit der hämatopoietischen Stammzellen ist beeindruckend. Sie müssen nicht nur sich selbst erhalten, sondern auch flexibel und je nach Bedarf für die Produktion von Zellen des gesamten hämatopoietischen Spektrums sorgen, und zwar etwa in der Größenordnung von $3,7E+11$ reifen Blutzellen pro Tag! Dabei läuft die Entwicklung von der Stammzelle zur funktionalen Effektorzelle nicht linear und geradlinig ab. Vielmehr handelt es sich um eine Kaskade mehrerer, nicht scharf voneinander abzugrenzender Entwicklungsschritte. Dabei wird das jeweilige Entwicklungspotential der Zellen immer weiter eingegrenzt, bis sie nur noch ein definiertes Schicksal annehmen können. Gleichzeitig zu diesem Reifungs- bzw. Entwicklungsprozess verläuft ein Prozess der massiven Zellproliferation. Die Vermehrung der Zellen ist unweigerlich an ihre Differenzierung gekoppelt.

Bisher konnte noch nicht aufgeklärt werden, wie zum einen die Anzahl der „echten“ Stammzellen im Organismus reguliert wird. Zum andern ist der Mechanismus der asymmetrischen Teilung, also der Generierung einer neuen Stammzelle neben einer weiter ausdifferenzierten Zelle, noch nicht gänzlich verstanden. Eine Vermehrung der Stammzellen

durch Selbsterneuerung ist *ex vivo* bislang nicht gelungen [2].

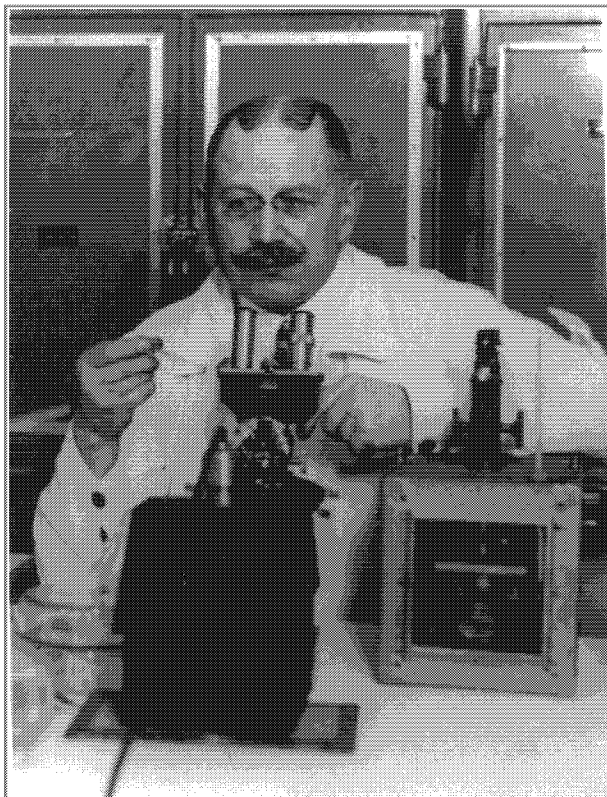


Abbildung I-1: Alexander A. Maximow, aus einem Bericht von Igor E. Konstantinow in <http://muse.jhu.edu/demo/pbm/43.2konstantino>

Sehr bewusst wird in dieser Arbeit auf die Abbildung eines hämatopoietischen Systems und die darin aufgezeigten Entwicklungsschritte verzichtet. Zu viele Fragen sind in dieser Hinsicht noch unbeantwortet, und die Darstellung der Hämatopoiese als klar geordnete, zielgerichtete Abfolge von zellulären Entwicklungsprozessen erscheint mir zu stark vereinfacht und daher irreführend. Die intrinsische Funktionalität einer hämatopoietischen Zelle wird durch sehr viele verschiedene intra- und extrazelluläre Prozesse reguliert. Inwieweit diese Prozesse einer bestimmten Ordnung und Hierarchie unterliegen, ob sie in Teilen oder vollständig umkehrbar sind, und ob es tatsächlich einen *point*

of no return gibt, ist noch ungeklärt [10].

Betrachtet man die Aufgaben, die einer adulten Stammzelle zugeschrieben werden, so sollte man bei der Verwendung des Begriffs „Stammzelle“ eher eine biologische Funktion oder Aktivität denn eine zelluläre Einheit zugrunde legen [11]. Die Leistung einer Stammzelle umfasst:

- ✓ *steady-state* Produktion aller reifen, funktionalen Effektorzellen
- ✓ unmittelbare, flexible und regulierte Reaktion auf Stress (Schädigung des Gewebes, Infektion, Blutverlust etc.)
- ✓ lebenslange Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase

Im Folgenden wird nicht die Gesamtheit des hämatopoietischen Systems betrachtet, sondern lediglich bestimmte Zellpopulationen unterschiedlichen Differenzierungsgrades. Dabei erfolgt die Einteilung und Unterscheidung der Populationen entsprechend der Expressionsmuster bestimmter Oberflächenmoleküle, oder sie werden charakterisiert durch ihre Aktivität in biologischen Assays. Es ist bislang nicht möglich, die hämatopoietische Stammzelle zu erforschen, da sie bisher nicht zweifelsfrei und exakt identifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wird im Rahmen der Arbeit als Synonym für „Stammzellaktivität“ der Sammelbegriff der hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen gebraucht. Die Population der HSPC ist relativ heterogen, und in ihr sind Zellen unterschiedlichster Entwicklungsstufen enthalten. Sie werden anhand der Expression des Oberflächenmoleküls CD34 (*Cluster of Differentiation*) eingeteilt und isoliert.

CD34 ist der bedeutendste und am häufigsten eingesetzte Marker zur Identifizierung und Aufreinigung einer Zellpopulation, die HSPC enthält.

Entdeckt wurde der HSPC-Oberflächenmarker im Jahre 1984. Civin *et al.* nutzten die humane myeloide Zelllinie KG-1a zur Immunisierung von Mäusen und waren später in der Lage, einen monoklonalen Antikörper zu isolieren. Dieser präzipitierte spezifisch das auf den KG-1a-Zellen exprimierte Oberflächenantigen My-10, welches heute die Bezeichnung CD34 trägt. Es stellte sich heraus, dass der Oberflächenmarker ebenfalls von hämatopoietischen Vorläuferzellen exprimiert wird [12]. Diese Erkenntnis eröffnete die Möglichkeit, eine definierte, nämlich CD34-positive, zelluläre Subpopulation zu isolieren und gezielt zu analysieren. Dabei behilflich sind Technologien, die mittlerweile eine erhebliche industrielle Bedeutung besitzen. Die FACS-Analyse (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*) bzw. Durchflusszytometrie macht es möglich, Expressionsmuster von Oberflächenantigenen auf Zellen zu detektieren. Die Expression von Zelltyp-spezifischen Oberflächenmarkern

(z. B. CD19 auf B-Zellen oder CD3 auf T-Zellen) kennzeichnet funktionale, reife Blutzellen, wohingegen die Abwesenheit solcher Marker darauf hinweist, dass es sich um eine Zelle handelt, die sich in ihrer Entwicklung noch nicht definitiv festgelegt hat. So konnte z. B. ein funktionaler Zusammenhang zwischen dem Erscheinen des CD38-Antigens und einer zunehmenden Differenzierung der HSPC aufgezeigt werden: CD34⁺/CD38⁻-Zellen sind unreifer und besitzen ein größeres Entwicklungspotential als CD34⁺/CD38⁺-Zellen. Mit Hilfe der MACS™-Technik (*Magnetic-Activated Cell Sorting*) können gezielt Zellen, die einen charakteristischen Oberflächenmarker tragen, aus einem heterogenen Zellgemisch steril isoliert und anschließend kultiviert werden.

Nachdem ein potentieller Oberflächenmarker gefunden war, der möglicherweise HSPC kennzeichnete, musste der Beweis erbracht werden, dass es tatsächlich möglich sein würde, geschädigte hämatopoietische Systeme durch die Transplantation von CD34-positiven HSPC wiederherzustellen.

1988 gelang es Berenson *et al.*, die Hämatopoiese in letal bestrahlten Pavianen durch eine autologe Knochenmarkspende aus CD34-positiven Zellen zu rekonstituieren [13]. Von diesem Zeitpunkt an war der Oberflächenmarker CD34 das allgemein akzeptierte Kennzeichen für hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen, denn CD34-positive Zellen waren im Affenmodell, also in einem prinzipiell dem Menschen sehr ähnlichen Organismus, eindeutig in der Lage, ein zerstörtes hämatopoietisches System funktionell zu ersetzen und ein normales Blutbild zu etablieren. Tiere, denen CD34-depletierte Knochenmarkszellen verabreicht wurden, starben bzw. litten noch 100 Tage nach der Transplantation an Panzytopenie.

Erst 1996 wurde das Dogma der CD34-positiven Stammzelle zum ersten Mal erschüttert. Osawa *et al.* berichteten in einem *Science*-Artikel von der erfolgreichen langzeitigen Wiederherstellung des lymphohämatopoietischen Systems im Mausmodell nach der Transplantation einer einzelnen CD34⁻/lo-Zelle [14]. Zwei Jahre später wurden weitere Hinweise auf CD34-negative Stammzellen veröffentlicht. Zanjani *et al.* transplantierten humane CD34-negative Knochenmarkszellen in Schafe. Sie konnten neben sich daraus entwickelnden hämatopoietischen Zellen verschiedener Entwicklungsrichtungen auch humane CD34-positive Zellen detektieren, die aus ihren CD34-negativen Vorläufern hervorgegangen sein mussten [15]. CD34-negative Zellen waren jedoch nicht in der Lage, *ex vivo* reife Blutzellen zu bilden.

Nachdem diese und andere Berichte die Fachwelt irritiert hatten und die unangenehme Frage aufwarfen, ob man etwa die ganze Zeit über die besten Stammzellen, nämlich CD34-negative, verworfen hatte und Patienten mit den in ihrer Entwicklung bereits fortgeschritteneren CD34-positiven Zellen transplantiert hatte, folgten Analysen zur Dynamik der CD34-Expression [16-18]. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Aktivierungs-

status der Zellen und ihrem CD34-Expressionsmuster aufgezeigt werden. So wurden CD34-negative murine Knochenmarkszellen, die zur Rekonstitution des Knochenmarks fähig waren, durch Kultivierung in Cytokin-haltigem Medium aktiviert und begannen, CD34 zu exprimieren. Traten sie erneut in den stationären Zustand, also die G₀-Phase des Zellzyklus, ein, verschwand CD34 von ihrer Oberfläche. Eine andere Arbeitsgruppe brachte die Expression des Oberflächenmarkers mit ontologischen Prozessen in Verbindung. Murine HSPC exprimieren CD34 im Embryo, in neugeborenen und jungen Mäusen. In erwachsenen Mäusen, also älter als zehn Wochen, nimmt die Expression ab. Ebenfalls in Mäusen gelang die Sekundärtransplantation mit CD34-negativen HSPC. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte die CD34⁺- vs. CD34⁻-Frage nicht abschließend geklärt werden, und in klinischen Anwendungen werden weiterhin CD34-positive Zellen eingesetzt (s. u.).

Neben CD34 wurden im Laufe der Zeit weitere Marker zur Identifizierung von HSPC bekannt. Eine kleine Zellpopulation, die zusätzlich zu CD34 auch den VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, auch als KDR bezeichnet) trägt, scheint die HSPC-Fraktion weiter in Richtung Stammzelle einzugrenzen und enthält keine Vorläuferzellen [19]. AC133, ein 7-Helix-Transmembranrezeptor, ebenso wie der Farbstoff Hoechst 33342 sind weitere, in der Forschung eingesetzte HSPC-Marker [20, 21]. Die Abwesenheit von linienspezifischen Markern ist ebenfalls ein Charakteristikum der Stammzellen, welches zur Aufreinigung dieser Zellen eingesetzt werden kann.

Es ist wünschenswert, dass in nächster Zeit ein effektiverer HSPC-Marker entwickelt wird, der die durchaus heterogene CD34-positive Fraktion weiter eingrenzt und somit die Identifizierung und Charakterisierung einer echten hämatopoietischen Stammzelle ermöglicht.

1.1.2. Möglichkeiten der Zellcharakterisierung

Die einfachste und schnellste Methode, auch eine große Anzahl von Zellproben auf ihren HSPC-Gehalt zu testen, ist eine CD34-spezifische FACS-Analyse. Allerdings muss dabei bedacht werden, dass diese Spezifizierung sehr grob ist und sowohl Stammzellen als auch *single-lineage committed progenitors* umfasst. Werden isolierte HSPCs *ex vivo* zum Zweck ihrer Vermehrung kultiviert, so ist es jedoch von großem Interesse, die gewählten Kulturbedingungen hinsichtlich ihres Einflusses auf die HSPC-Qualität detailliert zu überprüfen und den Differenzierungsstatus der Zellen exakter zu ermitteln. Oben wurde bereits erläutert, dass in der Welt der HSPC die Anzahl der vermehrten Zellen nicht immer mit ihrer Qualität korrelieren muss und die Proliferation der *ex vivo* kultivierten Zellen meist an Differenzierungs- und Reifungsprozesse gekoppelt ist. Aus diesem Grund wurden biologische Assays entwickelt, mit deren Hilfe man das Entwicklungspotential

bzw. den Reifungsgrad der untersuchten Zellen bestimmen kann [22].

Die hier beschriebenen Assays unterscheiden sich in einigen wichtigen Punkten. Der bedeutendste Unterschied liegt in der Art der detektierten Zellpopulation bzw. des jeweiligen Differenzierungspotentials der Zellen. Schematisch ist in Abbildung I-3 die Entwicklung von einer totipotenten Stammzelle hin zu einer reifen Effektorzelle, z. B. einem Erythrocyt, dargestellt. Die Pfeile oberhalb der Zellsymbole deuten an, dass diese Zellen noch in der Lage sind, sich durch Teilung selbst zu erneuern bzw. zu erhalten. Mit der so klassifizierten primitiven Vorläuferzelle nimmt diese Fähigkeit ab, der Prozess der Reifung und Differenzierung setzt ein (angedeutet durch den gestrichelten Pfeil in Abbildung I-3). In der unteren Hälfte der Abbildung ist durch Pfeile angedeutet, welche Population mithilfe eines bestimmten Assays detektiert werden kann. Die Übergänge sind hierbei fließend.

Auch der zeitliche Aufwand der Assays ist verschieden und reicht von zwei bis sechs Wochen bis zu mehreren Jahren, bis ein verwertbares Ergebnis vorliegt.

Mit dem CFU-C- (Colony-Forming Unit-Cell) oder auch MC- (Methyl Cellulose) Assay detektiert man Vorläuferzellen (CFC, Colony Forming Cell), die hinsichtlich ihres Entwicklungspotentials bereits stark eingeschränkt sind (vergleiche Abbildung I-2 A). So haben Zellen des Typs CFU-GEMM (Colony-Forming Unit-Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte) noch die Fähigkeit, Granulozyten, Erythrocyten, Makrophagen und Megakaryocyten zu bilden, während aus CFU-GM (Colony-Forming Unit-Granulocyte, Macrophage) nur Granulozyten oder Makrophagen, aus CFU-E (Colony-Forming Unit-Erythroid) nur erythroide Zellen entstehen können.

Der CAFC-Assay (Cobblestone-Area Forming-Cell) detektiert frühe Vorläuferzellen, deren Entwicklungspotential noch größer ist als das der CFU-C (Abbildung I-2 B). Es handelt sich um eine heterogene Population, die neben primitiven myeloiden Vorläuferzellen auch transiente SRC (Scid Repopulating Cell) umfasst [23]. Die Zellen besitzen jedoch nicht die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Verfaillie *et al.* beschrieben 1999 eine multipotente humane Vorläuferzelle, ML-IC (Myeloid-Lymphoid Initiating Cell). Die aus diesem Zelltyp hervorgehenden Vorläuferzellen haben das Potential, über einen längeren Zeitraum *in vitro* verschiedene reife Blutzellen des myeloiden und auch des lymphoiden Typs zu bilden [24]. Es bedarf noch weiterer Untersuchungen, um zu klären, ob es sich bei der ML-IC um eine echte hämatopoietische Stammzelle handelt und wie groß ihr mögliches Potential zur Selbsterneuerung tatsächlich ist.

Einige Analysen zur Qualität verschiedener hämatopoietischer Zellpopulationen bedienen sich eines sehr aufwendigen und teuren Verfahrens, der Transplantation in Tiermodellen.

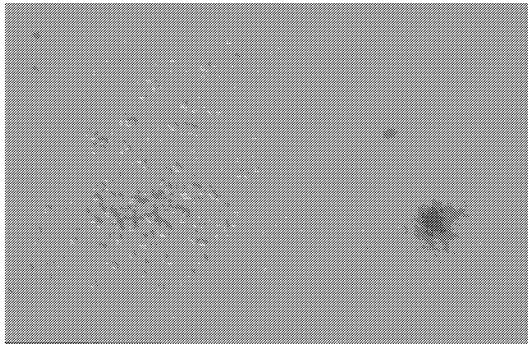
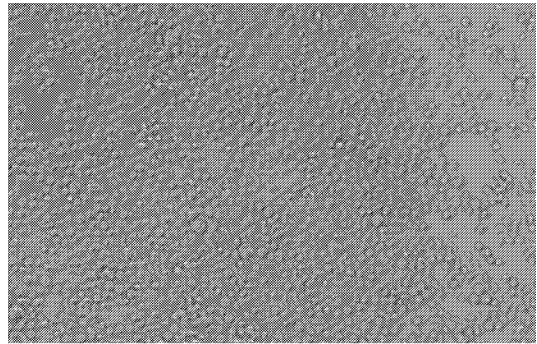
**A****B**

Abbildung I-2: Fotografie von CFC und CAFC. A: CFU-G (links), CFU-E (rechts); B: CAFC Woche sechs

Diese Technik ermöglicht es, Zellen in einem komplexen Organismus zu studieren. Sie unterliegen der Steuerung und Regulation des Wirtsorganismus und müssen dort alle entscheidenden Funktionen einer Stammzelle erfüllen. Dazu gehört die Wanderung der Zellen aus der Peripherie ins Knochenmark, ihre Ansiedelung und nachfolgende Produktion von Blutzellen des gesamten hämatopoietischen Repertoires. Die erfolgreiche Rekonstitution eines zuvor geschädigten hämatopoietischen Systems gilt als deutlicher Hinweis auf die Anwesenheit von Stammzellen im Transplantat. Es existieren allein für die Maus mehrere Modelle, u. a. SCID-hu (Severe-Combined-Immunodeficiency-human), BNX (Beige-Nude-SCID) und NOD/SCID (Non-Obese Diabetic), wobei hier nur Letzteres näher beschrieben wird. Humane hämatopoietische Zellen werden intravenös in immundefiziente NOD/SCID-Mäuse transplantiert, nachdem die wenigen vorhandenen HSPC der Maus mittels Bestrahlung zerstört wurden. Nach ca. sechs Wochen kann, das Überleben des Tieres vorausgesetzt, der Anteil humaner Zellen in verschiedenen Geweben des xenogenen hämatopoietischen Systems ermittelt werden. Ein signifikanter Anteil dieser Zellen ist B-lymphoid. Die Entwicklung humaner T-Zellen wird in diesem System nicht unterstützt.

Verdünnungsreihen (*limiting dilution*) und Sekundärtransplantationen liefern ein noch genaueres Bild von der Potenz der eingesetzten Zellen.

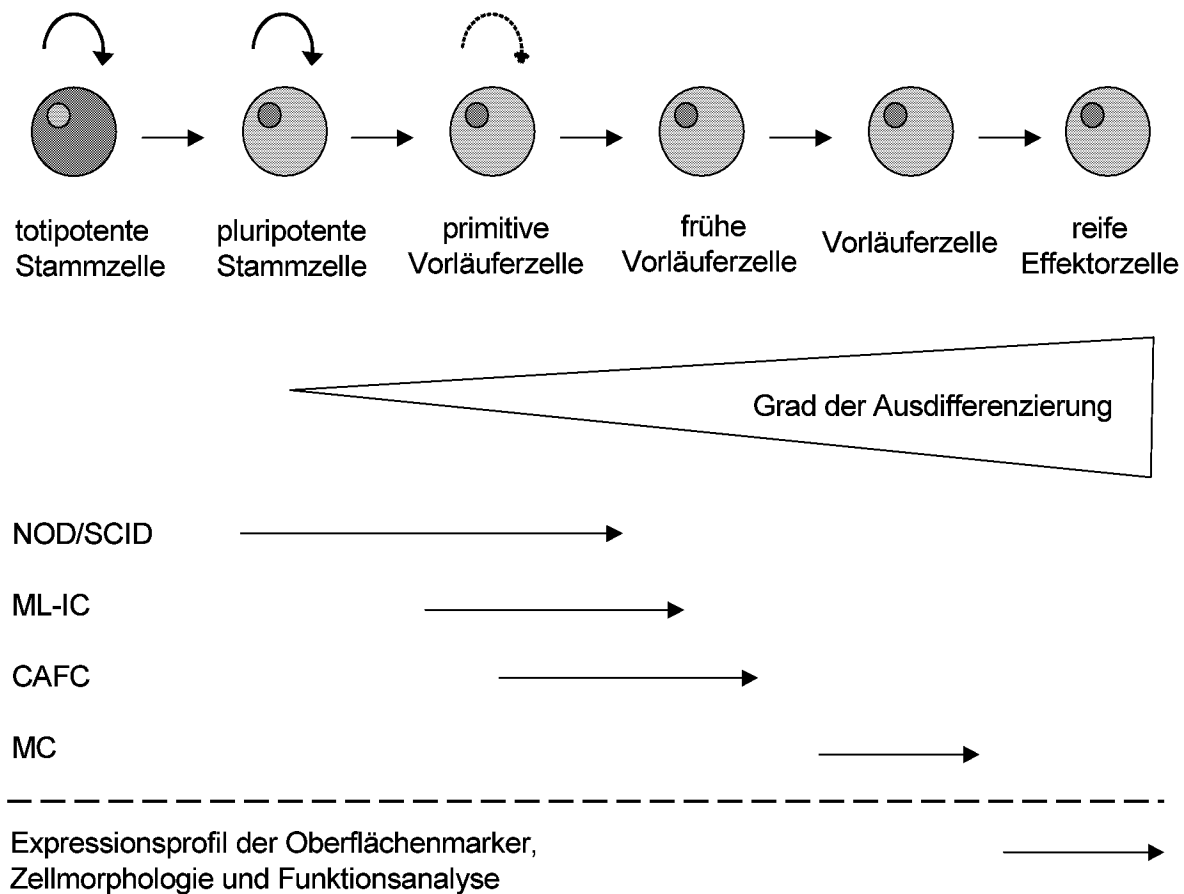


Abbildung I-3: Möglichkeiten der Identifizierung und Charakterisierung von hämatopoietischen Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien durch biologische Assays. Mit Hilfe des Expressionsprofils der Oberflächenmarker, der Zellmorphologie und Funktionsanalyse können reife Effektorzellen charakterisiert werden

Es sollte erwähnt sein, dass Variationen im experimentellen Setup und der Interpretation der Ergebnisse einen Vergleich von MC- und CAFC-Assay-Resultaten zwischen einzelnen Arbeitsgruppen erschweren. Zudem, und vielleicht auch gerade aus diesem Grund, ist ein verstärkter Trend in Richtung NOD/SCID-Modell und sekundäre Transplantation zu beobachten. Die daraus resultierenden Ergebnisse gelten als verlässlicher und informativer, obwohl auch hier erhebliche Variationen auftreten können [25].

1.1.3. Die Entwicklung des hämatopoietischen Systems

Die Entwicklung des hämatopoietischen Systems von Säugetieren kann in zwei Phasen unterteilt werden: eine embryonale und eine fetale/adulte Phase. Zellen der ersten sind transient und tragen nicht zur späteren lebenslangen Produktion von hämato-

poietischen Zellen bei. Es handelt sich vielmehr um sogenannte *blood islands*, angesiedelt im extraembryonalen und Dottersack-Mesoderm. Hier werden kernhaltige erythroide Zellen gebildet, die im Embryo zirkulieren und das sich entwickelnde Gewebe mit Sauerstoff versorgen. Sie durchlaufen stetig den Zellzyklus und verharren nicht, wie adulte Stammzellen, für längere Zeit in G_0 . Später sterben sie apoptotisch und werden durch pluripotente hämatopoietische Stammzellen ersetzt [26]. Diese entstehen zu einem späteren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung in der sogenannten AGM-Region (Aorta, Gonaden, Mesonephros) des embryonalen Mesoderms, besiedeln schließlich die Leber und bilden die Basis für das fetale bzw. adulte Blutsystem. Auch Milz und Thymus sind im Embryo Orte der Hämatopoiese. Etwa zum Zeitpunkt der Geburt verlagert sich die Hämatopoiese erneut, diesmal ins Knochenmark der großen Röhrenknochen (Becken, Rippe, Oberschenkel), wo sie verbleibt und für eine stetige Produktion reifer Blutzellen sorgt. Bei pathologischen Veränderungen (z. B. Hämoblastosen) kann die Blutbildung im Erwachsenen erneut in Milz und Leber stattfinden. Interessant ist, dass fetales Hämoglobin eine höhere Sauerstoffaffinität besitzt als die adulte Variante. Dies bewirkt, dass die Sauerstoffversorgung vom mütterlichen zum fetalen Blutkreislauf optimiert wird. Entsprechend besitzt auch das Myoglobin fetaler Muskeln eine höhere O_2 -Affinität, sodass hier ebenfalls der Sauerstofftransfer problemlos verläuft [27, 28].

Einige Anhaltspunkte weisen darauf hin, dass es sich bei den Zellen, die, ausgehend von der AGM-Region, die späteren Blutstammzellen bilden, um gemeinsame Vorläufer für endotheliale und hämatopoietische Zellen handelt. Sowohl endotheliale als auch frühe hämatopoietische Vorläuferzellen exprimieren die Oberflächenmarker CD34 und KDR, und $CD34^+/KDR^+$ -hämatopoietische Zellen können *in vitro* einen adhärenenten, endothelialen Phänotyp annehmen. Der potentielle gemeinsame Vorläufer wird als Hemangioblast bezeichnet und unterstreicht die Plastizität des Blut bildenden Systems [29].

1.1.4. Plastizität der Stammzellen

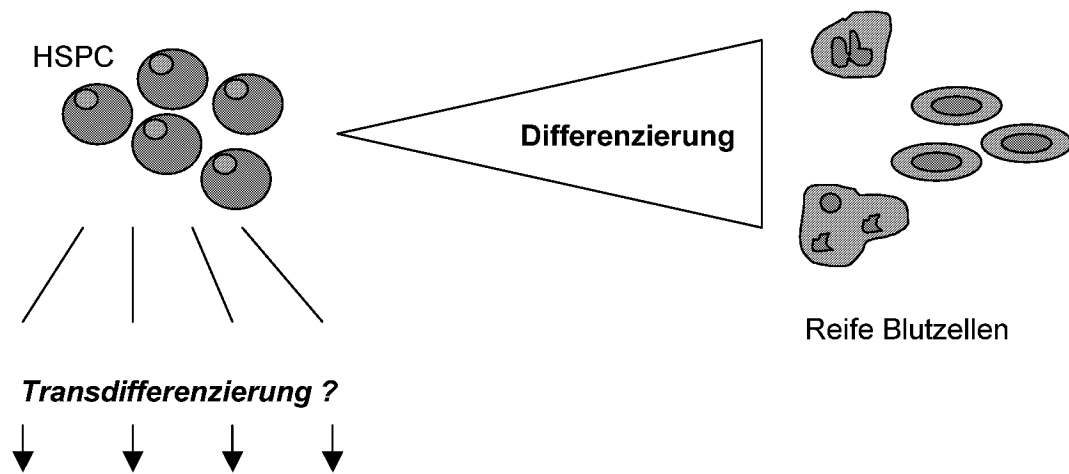
Wie oben beschrieben, ging man bisher davon aus, dass insbesondere in Geweben und Organen mit einem hohen zellulären *turn-over* (wie z. B. Blut, Haut oder dem Darmepithel) spezifische Stammzellen für die Bildung der jeweils benötigten Zellen verantwortlich sind. Demnach sollen HSPC nur für die Bildung von Blut und nichts anderem verantwortlich sein. Die klassische Vorstellung von einer multipotenten, organ- oder gewebespezifischen Stammzelle, die für eine lebenslange Neuproduktion reifer, funktionaler Zellen des Gewebes, in dem sie angesiedelt ist, sorgt, wird durch etliche in letzter Zeit erschiene Publikationen in Frage gestellt [30-41]. Es wird berichtet, dass Zellen des Kno-

chenmarks in der Lage seien, leber-, muskel-, nerven-, knochen- und knorpelspezifische Zellen zu bilden (vergleiche Abbildung I-4). Andererseits könnten Stammzellen aus Nervengewebe hämatopoietische Nachkommen produzieren. Dieses Phänomen wird als Plastizität bzw. Transdifferenzierung bezeichnet. Solcherlei Berichte wecken die Hoffnung, dass adulte Stammzellen ein viel größeres Potential als bisher angenommen besitzen könnten. Insbesondere im Zusammenhang mit der z. T. heftig geführten Debatte um den Sinn und Nutzen einer Forschung an embryonalen Stammzellen (ES) sollten die oben zitierten Literaturstellen kritisch betrachtet werden. Denn wäre es tatsächlich möglich, aus Nervenstammzellen Blut zu generieren, könnte man das Problem der *ex vivo* Expansion der HSPC leicht umgehen, da Nervenzellen wesentlich einfacher zu kultivieren sind. Man bräuchte sie also nur zu expandieren und anschließend in Richtung Blut „umzuprogrammieren“. Alternativ könnten die leichter zu gewinnenden HSPC als Nervenersatz in Patienten dienen, denen man keine Nervenstammzellen aus dem Hirn entnehmen kann.

Es muss festgestellt werden, dass die Bezeichnung „Stammzelle“ nicht einheitlich definiert ist bzw. auch für heterogene Populationen verwandt wird, die Stammzellaktivität beinhalten. Ein Grund für diese relative Beliebigkeit ist im Mangel an definitiven Stammzellmarkern (s. o.) begründet. Genauso wenig einheitlich wird der Begriff „Plastizität“ benutzt, um das scheinbar breite Potential der adulten Stammzellen zu beschreiben. Ihor Lemischka hat in seinem Kommentar zur *Experimental Hematology*-Sonderausgabe darauf verwiesen, dass prinzipiell alle Stammzellen die folgenden plastischen Eigenschaften haben und diese sogar ein notwendiges Merkmal der Stammzellen sind [42]:

- Sie müssen zwischen Selbsterneuerung oder Differenzierung wählen.
- Im Fall der HSPC können aus ihr mindestens zehn verschiedenartige reife Blutzellen entstehen.
- Die proliferative Aktivität wird je nach Bedarf reguliert.

Eine Stammzelle besitzt demnach eine sehr flexible und dynamische Funktion. Sie ist kein starres Gebilde. Übertragen auf die oben zahlreich erwähnten Beispiele der Plastizität von Stammzellen bedeutet dies, dass es möglicherweise eine intrinsische Fähigkeit der Zellen ist, eine neue Identität anzunehmen. Dies würde bedeuten, dass sie stets die genetische Voraussetzung für einen Identitätswechsel besitzen. Das entsprechende genetische Programm müsste nur abgerufen werden, z. B. aufgrund von instruktiven lokalen Reizen des umgebenden Gewebes. Daraus resultiert, dass sowohl der Status der Stammzelle, als auch der der reifen Effektorzelle permanent durch äußere Einflüsse wie z. B. Cytokine reguliert und aufrecht erhalten werden muss. Eindrucksvoll bewiesen wurde die Möglichkeit der „Reprogrammierung“ einer reifen Zelle durch die Geburt von Dolly.



Nerven-, Muskel-, Darm-, Leberzelle

Abbildung I-4: Konzept der Transdifferenzierung (nach [8], verändert)

Aber sind die beschriebenen Fälle von Plastizität in Stammzellen tatsächlich klinisch relevant? Oder ist man nicht vielmehr auf der Suche nach einer politisch korrekten Alternative zu embryonalen Stammzellen, die erwiesenermaßen das Potential zur Bildung aller Zellen der drei Keimschichten haben? Diese Fragen haben dazu geführt, dass überzeugendere Beweise für die Plastizität der Stammzellen gefordert werden [2, 8, 42, 43]. Es ist nicht ausreichend, die Morphologie oder Markerexpression der scheinbar umprogrammierten Zellen zu betrachten. Vielmehr muss auf klonaler Ebene, also nicht ausgehend von einem heterogenen Zellgemisch, nachgewiesen werden, dass eine einzelne Stammzelle die Fähigkeit besitzt, nicht nur ihre vorgegebene, sondern auch eine neue Identität anzunehmen. Zudem muss der Anteil der Zellen mit neuer Funktion von Bedeutung sein, und nicht, wie bisher, ein seltenes Ereignis. Bisher konnte nicht zweifelsfrei und reproduzierbar geklärt werden, ob Stammzellen tatsächlich in der Lage sind, ihr Schicksal umzuprogrammieren und dabei einen quantitativen und qualitativen Anteil am neuen Gewebe darzustellen. Deshalb wird es auch weiterhin nötig sein, die Kulturbedingungen zur *ex vivo* Expansion von HSPC zu optimieren.

I.2. DAS KNOCHENMARK - ORT DER REGULATION

Im Erwachsenen ist die Hämatopoiese im extravaskulären Bereich des Knochen-

marks angesiedelt. Seine 3D-Struktur, bestehend aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen und den von stromalen Zellen synthetisierten Komponenten der Extrazellulärmatrix (*Extra Cellular Matrix*, ECM), bildet ein optimales Mikromilieu für HSPC. Neben ECM-Komponenten werden auch Wachstumsfaktoren produziert und sekretiert, sodass sich ein regulatorisches Netzwerk ausbildet, welches die Hämatopoiese, abgestimmt auf die jeweiligen Bedürfnisse des Organismus, steuern kann. Dabei wird nicht nur die Produktion von HSPC bzw. deren schrittweise Differenzierung zu reifen Blutzellen reguliert, sondern auch der Transport reifer Zellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf. Ebenso gelangen HSPC, vermittelt durch stromale Signale, aus der Peripherie zurück ins Knochenmark.

Bereits 1977 beschrieb Dexter eine Form der direkten Co-Kultur von adhärenenten stromalen Zellen des Knochenmarks mit hämatopoietischen Vorläuferzellen, CFU-S (*Colony-Forming Unit Spleen*). Eine Unterstützung durch stromale Zellen war essentiell für den Erhalt und die Vermehrung der CFU-S *in vitro* [44]. Im darauffolgenden Jahr entwarf Schofield das Konzept einer „Stammzell-Nische“, welches darauf basiert, dass HSPC in engem räumlichem Kontakt zu anderen Zellen existieren und diese das Verhalten der Stammzellen determinieren, sie also instruieren, sich selbst zu erneuern oder auszureifen [45]. 1988 gelang Roberts *et al.* der Nachweis, dass die Wachstumsfaktoren GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) und IL-3 (Interleukin-3) an Heparan-Sulfat, ein Bestandteil der stromalen ECM, gebunden werden. Auch in gebundenem Zustand sind die Faktoren biologisch aktiv, sodass die Bindung und Akkumulation von Wachstumsfaktoren an sulphonierte Glykosaminoglykane der ECM ein Mechanismus sein könnte, mit dem das Knochenmark-Stroma HSPC reguliert [46]. Im Folgenden wird zunächst kurz die Makrostruktur des Knochenmarks beschrieben. Daran schließt sich ein Überblick über potentielle Regulationsmechanismen der Hämatopoiese an, und schließlich werden die beteiligten Signalwege im Detail besprochen.

1.2.1. Struktur des Knochenmarks

Im extravaskulären Raum zwischen den Knochenmarksinussen findet die Hämatopoiese statt. Sich entwickelnde Blutzellen müssen, um in den peripheren Blutstrom zu gelangen, die Sinuswand überwinden. Diese ist abluminal, also in Richtung der HSPC, mit adventitiellen reticulären Zellen ausgekleidet, und eine Endothelschicht kleidet den Sinus luminal aus. Beide Zellschichten werden durch eine dünne Basallamina getrennt. Die reticulären Zellen bilden mit ihren langen cytoplasmatischen Ausläufern das physikalische Grundgerüst, welches den HSPC Halt bietet, also das 3D-Netzwerk. Diese Zellen scheinen der Ursprung von in Kulturen gewonnenen Fibroblastenzellen zu sein, allerdings ist noch nicht geklärt, ob die Zellen des Knochenmark-Stroma von einer gemeinsamen Vor-

läuferzelle abstammen oder nicht. Neben den vorgenannten können auch Fettzellen und Makrophagen im Knochenmark detektiert werden, ebenso wie Zellen des Knochengewebes und Knorpel [27, 47].

1.2.2. Mechanismen der Signaltransduktion

Grundsätzlich kann die Regulation und Signaltransduktion innerhalb des hämatopoietischen Systems auf vier verschiedenen Wegen der interzellulären Kommunikation ablaufen (vergleiche Abbildung I-5) [48]:

1. Chemische Botenstoffe (Cytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren) werden von einer Effektorzelle ausgesandt und von einer Empfängerzelle meist mittels Oberflächenrezeptoren spezifisch registriert. Es erfolgt die Umwandlung des Signals in biochemische Prozesse, die eine konkrete Antwort der Zielzelle bewirken. Da mehrere Zellen gleichzeitig auf das Signal reagieren können, kommt es zu einer koordinierten Reaktion einer größeren Anzahl von Zellen (Abbildung I-5 a).
2. Bei *gap junctions* handelt es sich um Proteinkanäle, die zwei benachbarte Zellen direkt miteinander verbinden und einen unmittelbaren Stoffaustausch ermöglichen. Nicht nur Metabolite, sondern auch Signalmoleküle können auf diesem Weg von Zelle zu Zelle ausgetauscht werden (Abbildung I-5 b).
3. Zell-Zell-Interaktionen über Oberflächenmoleküle sind eine weitere Form des direkten Zell-Zell-Kontaktes. Hier bindet ein Oberflächenrezeptor an seinen komplementären Partner auf einer benachbarten Zelle. Diese Komplexbildung löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die in beiden Zellen eine Reaktion hervorruft, also bidirektional wirkt (Abbildung I-5 c).
4. Zell-ECM-Interaktionen, u. a. vermittelt durch Integrin-Rezeptoren, die an Komponenten der Extrazellulärmatrix binden, übertragen Signale an das Cytoskelett und aktivieren intrazelluläre Signalübertragungswege. Integrine sind ein wichtiger Bestandteil der Zellmobilität (Abbildung I-5 d).

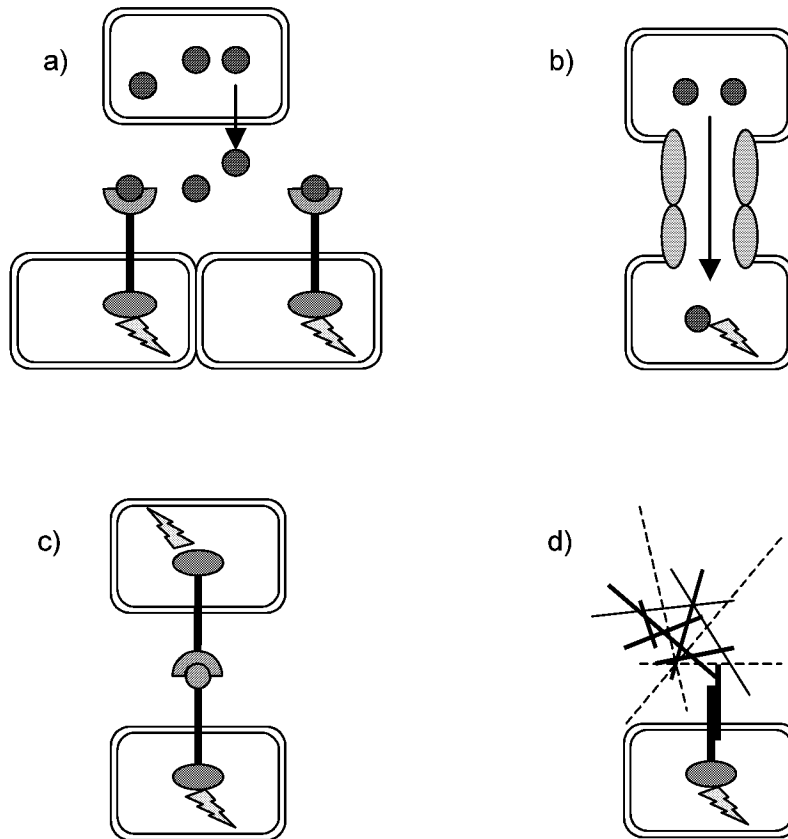


Abbildung I–5: Die prinzipiellen Mechanismen der interzellulären Kommunikation. a) Interzelluläre Botenstoffe b) *Gap-Junction* c) Oberflächenproteine d) Rezeptoren für die ECM (nach [48], verändert)

Wachstumsfaktoren, Chemokine und Cytokine

Abgeleitet von der „immunologischen Synapse“, die sich während einer Immunantwort zwischen T- und B-Zellen ausbildet, könnte man die räumliche Nähe zwischen HSPC und stromalen Zellen als „hämatopoietische Synapse“ bezeichnen. Sekretierte Cytokine und andere regulatorische Faktoren gelangen von der signalgebenden Zelle in den Zellzwischenraum und erreichen die Zielzelle. Dort bindet der Signalstoff, z. B. ein Cytokin, an einen spezifischen Rezeptor, der nach erfolgter Ligandenbindung internalisiert wird. Die Cytokinwirkung ist, anders als die der Hormone, auf einen engen Radius mit kurzen Diffusionswegen beschränkt.

Die Antwort der Zielzelle ist, abhängig von der Natur des Signals, sehr vielfältig. Die Weiterleitung des Signals, welches an der Zelloberfläche registriert wird, erfolgt über eine Kaskade von Phosphorylierungsschritten. Cytokinrezeptoren sind cytoplasmatisch entweder permanent oder durch Ligandenbindung induziert mit Tyrosinkinasen assoziiert. Signale, die von Tyrosinkinasen vermittelt werden, können bis in den Kern hinein getragen

werden und enden dann in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (c-Myc, c-Fos oder Stat5 [49]) mit wachstumsregulierenden und morphogenetischen Funktionen. Die Aktivierung des sog. Ras-Signalweges ermöglicht eine breite Fächerung der Signalkaskade, da es sich um ein multifunktionales Signalmolekül mit vielfältigen Wechselwirkungen zu anderen Molekülen handelt. Die Aktivierung verschiedener Rezeptoren kann über dieses Netzwerk zu ähnlichen Reaktionen der Zelle, wie z. B. Regulation der Proliferation, des Überlebens oder der Adhäsion, führen [50-52].

Die Regulation der Signalkaskade ist entscheidend vom Phosphorylierungsstatus der beteiligten intrazellulären Botenstoffe abhängig. Dem Verhältnis zwischen Kinasen und Phosphatasen bzw. deren Aktivität kommt demnach eine besondere Bedeutung bei der Signalweiterleitung zu.

Von den Zellen des Knochenmark-Mikromilieus sekretierte Polypeptide - dazu gehören Wachstumsfaktoren, Chemokine und Cytokine - bestimmen maßgeblich das Schicksal der hämatopoietischen Zellen und steuern die Entscheidung über Selbsterneuerung, Proliferation oder Differenzierung [53].

Wachstumsfaktoren sind z. B. VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), FL (*Flt-3 Ligand*) oder TPO (*Thrombopoietin*).

Chemokine (SDF-1, IL-8 u. a.) sind chemotaktische Cytokine, deren mittlerweile über 50 Mitglieder in vier Untergruppen - CC, CXC, C und CX₃C - eingeteilt werden. Basis der Unterteilung ist die relative Position eines konservierten Cysteins (C). Chemokine sind kleine Moleküle mit einem MW zwischen acht und 14kDa, untereinander strukturverwandt, und leiten ihr Signal über 7-Transmembranrezeptoren in die Zellen [54-56].

Zu den **Cytokinen** gehören die Interleukine, Interferone, CSFs (*Colony-Stimulating Factor*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) und Erythropoietin (EPO) (wobei EPO genau genommen ein Hormon ist, welches hauptsächlich in der Milz, zu einem kleineren Teil auch in der Leber produziert wird) [57] [58]. Die Unterteilung dieser Faktoren in Wachstumsfaktoren, Chemokine und Cytokine wird nicht immer konsequent eingehalten und kann sich, abhängig von neuen Erkenntnissen, ändern.

In den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts haben Sachs *et al.* erheblich zur Identifizierung der CSFs beigetragen [59]. Sie fanden, dass HSPC nur in Anwesenheit stromaler Fibroblastenzellen *in vitro* überleben konnten [60]. HSPC bildeten in diesen Co-Kulturen Kolonien aus Granulozyten und Makrophagen, die in Medium, versetzt mit Methylzellulose oder Agar, detektiert werden konnten [61] [62]. Die für die Bildung der Kolonien verantwortlichen Faktoren waren in der Lage, durch eine Schicht aus Agar zu diffundieren. Diese Beobachtung führte zu der Entdeckung, dass die offensichtlich löslichen Faktoren in

konditioniertem Medium (Stroma Conditioned Medium, SCM) der Fibroblastenzellen angereichert waren. Ausgehend von SCM konnten diese Faktoren später als M-CSF, G-CSF, GM-CSF und IL-3 (auch als multi-CSF bezeichnet) identifiziert werden. Es erfolgte dann von anderen Gruppen die Identifizierung weiterer Cytokine (SCF (Stem Cell Factor), FL, TPO) [63, 64] [65].

Cytokine wirken häufig redundant, sodass verschiedene Cytokine ähnliche oder überlappende Effekte auf eine Zielzelle ausüben. Durch diese Flexibilität wird vermieden, dass der Ausfall nur eines Cytokins gravierende Schäden im Regulationssystem hinterlässt. Zugleich sind Cytokine oftmals pleiotrop, können also in unterschiedlichen Zellen und Geweben jeweils andere Reaktionen hervorrufen [50].

Des Weiteren können Cytokine antagonistisch wirken, oder ein positiver Effekt wird durch die Anwesenheit inhibierender Moleküle, wie z. B. TNF- α , INF- α (Interferon- α) oder TGF- β (Transforming Growth Factor- β), unterdrückt. Auch die relative Konzentration des Signalstoffes, der auf eine Zielzelle einwirkt, kann darüber entscheiden, ob das Signal positiv oder negativ ausfällt [66]. Cytokine sind in der Lage, die Produktion weiterer Cytokine zu induzieren. So bewirkt beispielsweise IL-3 die Produktion von IL-6 in HSPC [67]. Die Wirkung der Signal- oder Botenstoffe kann bei Bedarf durch sich selbst verstärkende, autokrine oder parakrine Signalschleifen erheblich gesteigert werden [68, 69], sodass eine schnelle und umfassende Reaktion, z. B. nach einer Infektion, möglich ist und der damit verbundene Bedarf an reifen Abwehrzellen gedeckt werden kann.

Nicht nur mittels löslicher Signalstoffe, sondern auch durch die Variation der Expression entsprechender Rezeptoren kann eine Regulation der Signaltransduktion erfolgen.

Während der Entwicklung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen zu reifen Effektorzellen wird die Selbsterneuerung und Proliferation der Zellen von einem bestimmten Cytokin-Cocktail unterstützt, wohingegen die Differenzierung und endgültige Ausreifung der Zellen, verbunden mit einem Proliferationsstop, von einem anderen Cocktail aus Cytokinen und Faktoren bewirkt wird [70, 71]. HSPC sind also im Laufe ihrer Entwicklung ständig wechselnden Signalen ausgesetzt, die schließlich dazu führen, dass aus multipotenten Stammzellen ein ausgewogener und dem Bedarf angepasster Mix aus reifen Blutzellen entsteht [72].

Gap junctions

Gap junctions entstehen zwischen benachbarten Zellen, wenn sich zwei Halbkannäle (Hemiconnexon), bestehend aus jeweils sechs Polypeptid-Untereinheiten (Connexine), zu einem Kanal, dem Connexon, zusammenschließen. Diese Kanäle mit einem Durch-

messer von etwa 1,5nm sind selektiv permeabel für Substanzen mit einem MW von ca. 1kDa. *Gap junctions* aus Connexin 43 (Cx43) konnten in verschiedenen stromalen Fibroblasten-Zelllinien nachgewiesen werden. Ihre Aufgabe scheint die direkte Verbindung stromaler Zellen im Knochenmark zu sein. Cx43-KO-Mäuse (*Knock Out*) weisen einen geringen Anteil an HSPC auf, und Cx43-defiziente stromale Zellen unterstützen CAFC deutlich schlechter als vergleichbare Zellen, die noch zur Bildung von *gap junctions* fähig sind. Werden *gap junctions* in Stromakontakt-Kulturen universell blockiert, so wird die Bildung von CAFC vollständig, jedoch reversibel, verhindert. Bisher konnte noch kein bedeutender Anteil an *gap-junction*-Verbindungen zwischen HSPC und Stroma nachgewiesen werden, und es scheint, dass diese Form der Zellkommunikation auf stromale Zellen beschränkt ist, aber dennoch Auswirkungen auf die Qualität der HSPC-Unterstützung durch das Stroma hat [73, 74].

Zelladhäsionsmoleküle

Zusätzlich zu den oben bereits beschriebenen Cytokinen, die das Überleben, das Wachstum und die Differenzierung von HSPC steuern, existiert eine zweite Gruppe von Molekülen, die zur Aufrechterhaltung der Hämatopoiese beiträgt. Hierbei handelt es sich um Zelladhäsionsmoleküle (*Cell Adhesion Molecules, CAMs*), die als Transmembranmoleküle den engen physiologischen Kontakt zwischen HSPC und stromalen Zellen bzw. ECM-Komponenten herstellen [75-79]. CAMs lassen sich in sechs Struktur-Superfamilien unterteilen: Integrine, Immunglobulin ähnliche Moleküle, Cadherine, Selektine, Sialomucine und CD44, wobei die Sialomucine, Selektine und Integrine im Folgenden näher behandelt werden. Sie unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau und, besonders wichtig, in der Avidität für ihre Liganden und damit in der Stärke und Stabilität der vermittelten Adhäsion [77, 80, 81].

Sialomucine, von denen zehn auf HSPC und/oder stromalen Zellen nachgewiesen wurden, zeichnen sich durch einen hohen Prolin-, Threonin- und Serin-Anteil aus. Die Serin- und Threonin-Reste sind stark O-glykosyliert. Sialomucine, dazu zählt u. a. auch CD34, vermitteln durch Bindung an entsprechende Selektin-Liganden Zell-Zell Adhäsion.

Die Familie der **Selektine** besteht aus drei Vertretern, E-(*Endothelial*), P-(*Platelet*) und L-(*Leukocyte*) Selektin. Endotheliale Zellen des Knochenmarks exprimieren E- und P-Selektin konstitutiv, L-Selektin wird von CD34-positiven Zellen exprimiert, ebenso wie Liganden für E- und P-Selektin. Selektine sind Ca^{2+} -abhängige Lektine und vermitteln eine

schnelle, relativ Scherstress-resistente Adhäsion durch Bindung an spezifische Zuckerreste, z. B. Mucine. Untersuchungen an doppel- und tripel-P/E-, P/L- und P/E/L-Selektin-KO-Mäusen zeigten, dass die HSPC dieser Mäuse einen Defekt im *homing* (vergleiche Abschnitt I.1.3.) aufwiesen, wohingegen Mäuse, die jeweils nur für ein Selektin oder E/L-Selektin doppel-defizient waren, keinerlei Abnormalitäten aufwiesen. Selektine scheinen demnach redundant den gerichteten Transport der HSPC ins Knochenmark zu regulieren [82, 83].

Von besonderer Bedeutung für die Regulation der Hämatopoiese durch Adhäsionsmoleküle sind die **Integrine**, Heterodimere, die sich jeweils aus einer von 16 α -Untereinheiten und einer von acht β -Untereinheiten zusammensetzen. Beide Untereinheiten interagieren mit ECM-Proteinen (Collagen, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin etc.) und/oder Immunglobulin ähnlichen Oberflächenmolekülen wie ICAM-1-3 und VCAM-1, wobei die α -Untereinheit für die Spezifität der Wechselwirkung verantwortlich ist. CD34-positive Zellen exprimieren die β_1 -Integrine VLA-4 (*Very Late Antigen-4*) und VLA-5. Beide Moleküle binden Fibronectin, VLA-4 bindet zusätzlich das stromale Oberflächenprotein VCAM-1.

Schon der Name der Moleküle weist auf ihre besondere Rolle in der Integration von extrazellulären Signalen und intrazellulären Reaktionen hin. Die β -Kette der Integrine ist eng mit Bestandteilen des Cytoskelettes, den FACs (*Focal Adhesion Complex*) assoziiert. Es scheint, dass Wachstumssignale, übertragen von Cytokinen, und Adhäsionssignale, übertragen von CAMs, eine funktionale Überlappung und gegenseitige Beeinflussung aufweisen. Die schwache Bindung von β_1 -Integrinen kann durch gleichzeitige Aktivierung von Cytokinrezeptoren (z. B. c-kit) oder anderen CAMs deutlich verstärkt werden. Diese kooperative Wechselwirkung wird als „*inside-out* Aktivierung“ bezeichnet, da ein extrazelluläres Signal (z. B. SCF, IL-3 oder GM-CSF) die Avidität der Integrin-Rezeptoren an ihre extrazellulären Liganden beeinflussen kann [84, 85]. Die Signalweiterleitung verläuft dabei, wie oben beschrieben, über Phosphorylierungskaskaden im Zellinnern, wobei den Bestandteilen des Cytoskeletts eine besondere Bedeutung zukommt. Allein VLA-4 kann, abhängig von der An- oder Abwesenheit weiterer Signale, mindestens drei verschiedene Aktivierungszustände, d. h. Bindungsstärken zu verschiedenen Liganden, einnehmen [81, 86] und somit die Zelladhäsion graduell variieren.

ECM-Proteine und Glykosaminoglycane/Proteoglycane

Neben den oben beschriebenen CAMs sind weitere Bestandteile des Knochenmark-Mikromilieus, ECM-Proteine und Glykosaminoglycane/Proteoglycane, an der Regulation der Hämatopoiese beteiligt.

Fibrilläre Makromoleküle wie z. B. **Collagen**, **Fibronectin** und **Laminin** werden von Fibroblasten synthetisiert und bilden das Netzwerk der Extrazellulärmatrix. Fibronectin (lat. *fibra* (Faser) und *nectere* (verbinden)) vermittelt Zellen den Kontakt zu Collagen und anderen Bestandteilen der ECM. Dies geschieht durch die reversible Bindung an Integrinmoleküle, die die Zellmembran durchspannen, und an Collagenfasern [28].

Tabelle I-1: Übersicht über die von stromalen Zellen exprimierten ECM-Proteine, Glykosaminoglycane und CAMs.

ECM-Proteine	Glykosaminoglycane	CAMs
• Collagen I, III-VI • Fibronectin • Vitronectin • Laminin • Thrombospondin • Elastin • Proteintrückgrat der Proteoglycane	• Chondroitin Sulfat • Heparan Sulfat • Hyaluronsäure • Heparin • Dermatan Sulfat	• ICAM-1 (CD54) • N-CAM (CD56) • VCAM-1 (CD106) • LFA-3 (CD58) • $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61) • Thy-1 (CD90) • E- und P-Selektin (CD62E, CD62P)

Collagen, Fibronectin und Laminin tragen nicht nur Bindungsstellen für CAMs (insbesondere Integrine), sondern auch für **Glykosaminoglycane**. Letztere sind die Kohlenhydratkomponente der Proteoglycane. Diese Moleküle bestehen aus einem Proteinanteil (ca. 5%), der das Rückgrat des Moleküls bildet. Polysaccharid-Untereinheiten (ca. 95%), hauptsächlich repetitive, sulfonierte Disaccharide (Glykosaminoglycane), binden daran. Proteoglycane bilden die viskoelastische Grundsubstanz der ECM, da sie als Polyanionen reichlich Wasser binden können.

Hyaluronsäure bildet lange Disaccharidketten und enthält keinen Proteinanteil, kann jedoch von Proteoglycanen über ein Verbindungsprotein gebunden werden [87].

Heparansulfat-Proteoglycane (Syndecan und Glypican) finden sich auf der Oberfläche stromaler Zellen und innerhalb der ECM. Sie spielen eine Hauptrolle bei der Adhäsion von HSPC zu ECM-Komponenten, und sie regulieren in entscheidendem Maße das proliferative Verhalten der HSPC [88, 89]. Chemokine und Wachstumsfaktoren binden über ionische Wechselwirkungen Heparansulfat, werden dadurch immobilisiert und den Zellen in einer lokal erhöhten Konzentration präsentiert. bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) benötigt Heparansulfat als Co-Rezeptor, um mit hoher Affinität an seinen zellulären Rezeptor zu binden und diesen zu aktivieren. Die Wachstumsfaktoren GM-CSF und IL-3

binden ebenso an Heparansulfat, wie das inhibierende Chemokin MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Protein-1 α*). Auch für SDF-1 α (*Stromal Cell-Derived Factor-1*) konnte eine spezifische Bindung an Heparansulfat nachgewiesen werden [90]. Die ECM ist kein statisches Gerüst, sondern unterliegt vielmehr einem ständigen Umwandlungsprozess. Maßgeblich daran beteiligt sind MMPs (*Matrix Metalloproteinases*), eine Familie aus mindestens 20 Zn-abhängigen Endopeptidasen, die von Endothelzellen, epithelialen und hämatopoietischen Zellen synthetisiert werden. Sie lassen sich grob in Collagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Membran-Typ-MMPs unterteilen. TIMPs (*Tissue Inhibitors of MMPs*) inhibieren den MMP-vermittelten Abbau der ECM durch Bindung an das aktive Zentrum der Enzyme. Die genaue Balance zwischen MMPs und TIMPs reguliert die ECM-Umbildung, wobei die Expression der einzelnen MMPs und TIMPs von Cytokinen, Hormonen, und Zell-ECM-Wechselwirkungen reguliert wird. Die Aktivität der Enzyme und ihrer Inhibitoren spielt ebenfalls beim *homing* bzw. der Mobilisierung von HSPC eine bedeutende Rolle, da zu diesem Zweck die Endothelschicht des Knochenmarks abgebaut werden muss, um eine Verbindung zum peripheren Blutkreislauf zu schaffen. Dieser partielle Abbau wird von MMPs bewirkt [91].

Metastasierende Zellen entgehen der oben beschriebenen Regulation und sind daher in der Lage, unkontrolliert aus dem umliegenden Gewebe in den Blutkreislauf zu gelangen. Zudem weisen diese Zellen einen Fibronectin-Mangel auf, der möglicherweise für ihr metastasierendes Verhalten mitverantwortlich ist [28, 91].

1.2.3. Das *homing* der HSPC

Die gerichtete Bewegung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen aus dem peripheren Blutkreislauf ins Knochenmark wird als *homing* bezeichnet [92]. Die Effizienz dieses Prozesses nach intravenöser Applikation von HSPC im Rahmen einer Stammzelltransplantation entscheidet über den Erfolg der Therapie. Denn nur wenn die Zellen ihren Weg ins Knochenmark finden, kann sich ein neues, gesundes hämatopoietisches System etablieren. Entscheidend beteiligt am *homing* der HSPC sind Chemokine, d. h. chemotaktisch wirksame Cytokine, deren Rezeptoren, und CAMs, insbesondere die Integrine VLA-4 und VLA-5 [93]. Während des *homing* kommt es zu wechselnden Anheftungs- und Ablösephasen der hämatopoietischen Zellen. In einem ersten Schritt haften sie an Endothelzellen des Knochenmarks. Anschließend passieren sie die Endothelschicht und adhären an stromale Zellen und ECM-Komponenten des Knochenmarks. 1997 wurde SDF-1, ein Chemokin der CXC-Familie, als effektiver Lockstoff für HSPC identifiziert. HSPC tragen den spezifischen Rezeptor CXCR4, wohingegen SDF-1 von stromalen Zellen des Knochenmarks produziert wird [94]. Mäuse, die einen *knock-out* für SDF-1 oder CXCR4

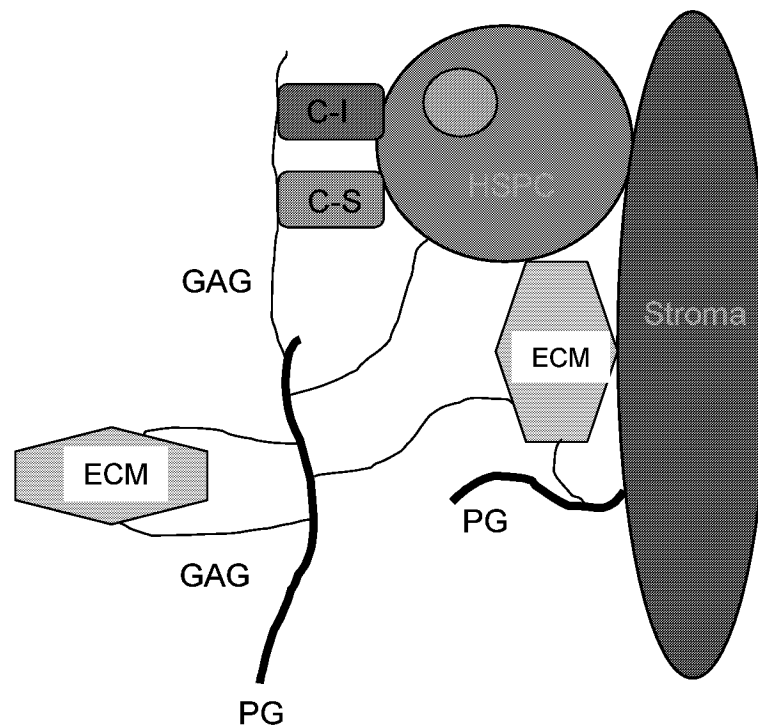


Abbildung I-6: Schematische Übersicht der molekularen Wechselwirkungen im Knochenmark-Mikromilieu. C-I: inhibitorisches Cytokin; C-S: stimulatorisches Cytokin; ECM: Komponenten der Extrazellulärmatrix; GAG: Glykosaminoglykane; HSPC: hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzelle; PG: Proteoglykan-Rückgrat; Stroma: stromale Zellen (aus [100], verändert)

tragen, zeigen einen identischen Phänotyp: die Hämatopoiese verlagert sich während der Embryonalentwicklung nicht ins Knochenmark. *In vitro* sind hämatopoietische Zellen in der Lage, sich entlang eines SDF-1-Gradienten zu bewegen [95-97], und die Stärke der CXCR4-Expression scheint mit der Migrationseffizienz zu korrelieren. Die Expression des Chemokin-Rezeptors kann durch die Wirkung der Cytokine SCF und IL-6 verstärkt werden [98]. Neben dem Wechselspiel von SDF-1 und CXCR4 scheint auch der Zellzyklusstatus der Zellen beim *homing* eine Rolle zu spielen. Zellen in G_0 sind besser in der Lage, ihren Weg ins Knochenmark zu finden, als sich aktiv teilende Zellen in S/G₂/M [99]. Die Expression von CXCR4, VLA-4 und VLA-5 unterscheidet sich in diesen Stadien des Zellzyklus.

Trotz dieser Kenntnisse ist der genaue Mechanismus des *homing* und sind die entscheidenden regulatorischen Abläufe noch nicht vollständig aufgeklärt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Regulation der Hämatopoiese ein extrem komplexes Wechselspiel unterschiedlichster Faktoren darstellt. Daran beteiligt sind verschiedene Zelltypen, sekretierte Cytokine und Chemokine, Hormone, Oberflächenmo-

leküle, Transmembranrezeptoren und die Bestandteile der Extrazellulärmatrix. Diese Komponenten können sich auf vielfältige Weise gegenseitig beeinflussen, wobei die Wirkung stimulierend oder inhibierend sein kann. Zusätzlich wirken einige Faktoren synergistisch, andere hemmen sich gegenseitig. Auch das jeweilige Mengenverhältnis der beteiligten Moleküle und ihre effektive Konzentration können die Aktivität der Einzelkomponenten beeinflussen. HSPC fungieren nicht nur als Signalempfänger. Sie können sich und ihre Umgebung auch gezielt durch autokrine und parakrine Signalschleifen beeinflussen und tragen so zur interzellulären Kommunikation bei (vergleiche Abbildung I-6).

Die obige Zusammenfassung der komplexen Mechanismen, die bei der Regulation sämtlicher Aspekte der Hämatopoiese (Proliferation, Differenzierung, *homing*, Migration, Apoptose etc.) eine Rolle spielen, zeigt, wie anspruchsvoll der Versuch ist, dieses biologische Meisterwerk im Labor nachzubilden. Nicht ohne Grund konnte bisher keine befriedigende Imitation beschrieben werden.

Die im Folgenden kurz genannten klinisch/medizinischen Aspekte der Stammzellforschung machen jedoch deutlich, warum weiterhin intensiv an hämatopoietischen Stammzellen, insbesondere im Hinblick auf die Vermehrung von HSPC aus Nabelschnurblut, geforscht wird.

I.3. MEDIZINISCHE ASPEKTE

Eine künstliche Rekonstitution des hämatopoietischen Systems kann notwendig werden bei angeborener oder erworbener Knochenmarkaplasie (z. B. Fanconi-Anämie, Strahlenschäden) oder bei malignen Erkrankungen wie z. B. akuten und chronischen Leukämien (AML (akute myeloische Leukämie), ALL (akute lymphoblastische Leukämie), CML (chronisch-myeloische Leukämie), CLL (chronisch-lymphatische Leukämie)).

Ein konkretes Beispiel für eine pathologische Veränderung der Hämatopoiese sind die Vorläuferzellen von CML-Patienten. Sie weisen eine verminderte Adhäsion zu Knochenmarkzellen und Fibronectin auf. Die sog. Philadelphia-Translokation ist für das Entstehen des Fusionsproteins p210 Bcr-Abl verantwortlich. Es handelt sich um eine deregulierte Proteinkinase, die Einfluss auf die Aktivität von Integrinen nimmt. Die Zellen werden der oben beschriebenen Kommunikation und Regulation entzogen, wodurch sie entarten.

1.3.1. Verschiedene Quellen für HSPC

Im Fall der malignen Erkrankungen werden die Patienten einer Hochdosis-Chemotherapie oder Strahlentherapie unterworfen. Dabei werden nicht nur die entarteten Zellen, sondern auch die Blut bildenden Zellen des Knochenmarks zerstört. Mit Hilfe einer allogenen Stammzelltransplantation kann das hämatopoietische System der Patienten neu aufgebaut werden, falls eine autologe Spende nicht in Frage kommt. Grundsätzlich stehen hierbei drei Stammzellquellen zur Verfügung: das Knochenmark, mobilisiertes peripheres Blut und Blut aus der Nabelschnur-Vene (CB, Cord Blood). Das Knochenmark gilt als klassische Quelle für hämatopoietische Stammzellen, und 1963 wurden erstmalig HSPC aus dem Knochenmark transplantiert [100, 101]. 1981 folgte die erste Transplantation mit Stammzellen aus peripherem Blut zur Behandlung eines CML-Patienten [102]. Mit der Einführung des ersten rekombinanten hämatopoietischen Wachstumsfaktors rhG-CSF (recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor) im Jahre 1986 konnte die Ausbeute der HSPC im peripheren Blut erhöht werden. Bisher wurden drei Cytokine in klinischen Studien, z. T. in Kombination miteinander, eingesetzt. G-CSF, GM-CSF und FL mobilisieren HSPC aus dem Knochenmark, welche in den Blutkreislauf gelangen und mittels Leukapherese gewonnen werden können [103-105]. Nach 1980 wurde Nabelschnurblut als alternative Quelle für hämatopoietische Stammzellen entdeckt [106], und bereits 1988 wurde in Paris ein Kind mit Fanconi-Anämie mit Hilfe von Nabelschnurblut eines HLA-identischen Geschwister erfolgreich transplantiert [107]. 1993 erfolgte die erste Transplantation mit der Nabelschnurblutprobe eines unverwandten Spenders. Bisher sind ca. 2000 Nabelschnurblutproben weltweit für die Transplantation eingesetzt worden, und über 40.000 Proben sind in Nabelschnurblut-Banken gelagert, darunter die ersten im Jahre 1993 in Düsseldorf, Mailand und New York [108, 109]. Da sich die Zellen je nach Ursprung in ihrer Qualität z. T. deutlich voneinander unterscheiden, sollen hier exemplarisch Knochenmark und Nabelschnurblut miteinander verglichen werden. Tabelle I-2 fasst bekannte Unterschiede zusammen [108, 110-115].

Ein Vorteil des CB ist seine kurzfristige Verfügbarkeit, da etliche Proben mittlerweile kryokonserviert in verschiedenen Nabelschnurblut-Banken, die untereinander vernetzt sind, vorliegen. Die mittlere Wartezeit auf eine geeignete Knochenmarkspende beträgt dagegen 3,7 Monate. In klinischen Studien hat sich herausgestellt, dass bei einer HSPC-Transplantation aus CB nicht alle sechs HLA-Antigene (Human Leucocyte Antigen) der Spende mit dem Empfänger übereinstimmen müssen: trotz fehlender Übereinstimmung in bis zu 2 HLA-Antigenen sind die *engraftment*-Wahrscheinlichkeit, das GvHD-Risiko (Graft-

versus-Host Disease) und die Überlebensrate vergleichbar mit Transplantationen von HLA-identischen Knochenmarkspenden. Das GvHD-Risiko, also die immunologische Abwehrreaktion des Transplantates gegen den Wirtsorganismus, verläuft nach einer CB-HSPC-Transplantation milder, und es treten nicht so häufig chronische Fälle auf. Dies ist bedingt durch die relative Naivität der fetalen T-Zellen, die noch nicht durch vorhergehende Aktivierung auf Abwehr getrimmt sind. Zum anderen ist der Anteil an NK-Zellen (*Natural Killer*) und damit die unspezifische Abwehrreaktion deutlich vermindert. Allerdings bewirkt dies auch einen abgeschwächten GvL-Effekt (*Graft versus Leukemia*), in der Art, dass verbliebene Krebszellen nicht von den transplantierten Immunzellen angegriffen werden. Das Risiko einer Virusübertragung, vor allem CMV (*Cytomegalie-Virus*), ist bei der Transplantation von CB-Zellen deutlich geringer, da die Plazenta zum Schutz des Embryos als Immunbarriere fungiert. Für den Spender besteht – im Gegensatz zu der unter Vollnarkose durchgeführten Knochenmarkspende – kein Risiko. Neben diesen Vorteilen der HSPC aus Nabelschnurblut existiert auch eine Reihe entscheidender Nachteile. Das *engraftment* ist deutlich verzögert, und die neutropene Phase verlängert. Dies bedeutet, dass der Patient nach der Transplantation für einen längeren Zeitraum ohne funktionale Abwehrzellen ein hohes Infektionsrisiko trägt und erst spät neutrophile Granulozyten, die erste Abwehrlinie, detektiert werden können. Ein weiterer Nachteil liegt darin begründet, dass keine Informationen über den Spender verfügbar sind, sodass unwissentlich genetische Erkrankungen mit den Zellen übertragen werden könnten.

Die in Tabelle I-2 dargestellte Übersicht der Vor- und Nachteile verschiedener Zellquellen zeigt, dass HSPC aus Nabelschnurblut eine geeignete Alternative zur herkömmlichen Knochenmarktransplantation darstellen. Allerdings ist ihre grundsätzliche Anwendung limitiert durch die geringe Anzahl an Zellen, die aus einer punktierten Nabelschnur und Plazenta gewonnen werden können.

Der Anteil CD34-positiver HSPC an der Gesamtmenge der mononukleären Zellen liegt im Knochenmark bei 1-3%, im Nabelschnurblut bei lediglich 0,01-1,0% [112]. Allerdings ist der Anteil früher Vorläuferzellen im CB erhöht, und sie zeigen *in vitro* ein höheres Proliferationspotential als adulte Knochenmarkzellen. Eine weitere Besonderheit der CB-Zellen ist die Länge ihrer Telomere [116-118].

Verschiedentlich konnte bei HSPC aus Nabelschnurblut ein enger Zusammenhang zwischen dem erfolgreichen *engraftment* der Zellen und der eingesetzten Zelldosis festgestellt werden. Die zur Verfügung stehende Zellmenge ist demnach ein kritischer Parameter der Transplantation, und es sollten mindestens $1,5\text{--}3,5 \times 10^7$ MNZ pro kg Körpergewicht transplantiert werden. Je mehr, desto besser. Für Knochenmarktransplantationen werden in etwa $3,0 \times 10^8$ MNZ/kg Körpergewicht eingesetzt [104, 109, 110]. Einige Studien

legen nicht die Anzahl an MNZ, sondern die Menge an CD34-positiven Zellen oder CFU-GM zugrunde. Aus der entscheidenden Bedeutung der Zelldosis für den Verlauf der Therapie resultiert, dass bisher hauptsächlich Kinder mit HSPC aus CB transplantiert wurden. Um diese wertvollen Zellen auch Erwachsenen zugänglich zu machen, wird vielfach versucht, sie nach unterschiedlichsten Protokollen *ex vivo* zu expandieren. Alternativ wurde bereits eine Patientin mit zwölf gepoolten CB-Proben transplantiert, um die Zellzahl zu erhöhen [113]. Das Risiko der Unverträglichkeit ist bei diesem Ansatz extrem hoch. Zudem ist die Anzahl der zur Verfügung stehenden Blutproben limitiert, da das Spenden von Nabelschnurblut noch nicht alltäglich ist.

Tabelle I-2: Vor- und Nachteile von Nabelschnurblut und Knochenmark als Quelle für hämatopoietische Stammzellen zur allogenen Transplantation

	Nabelschnurblut	Knochenmark
Vorteile	• kurzfristig verfügbar • geringere HLA-Übereinstimmung tolerabel • geringeres GvHD-Risiko • geringeres Risiko einer Virusübertragung • kein Risiko für den Spender	• große Erfahrung • Spender ist bekannt • schnelles <i>engraftment</i> • GvL-Effekt
Nachteile	• kaum Erfahrung • Spender ist nicht bekannt • verzögertes <i>engraftment</i> • kein GvL-Effekt	• zeitintensive Spendersuche • HLA sollte übereinstimmen • höheres GvHD-Risiko • höheres Risiko einer Virusübertragung • evtl. Risiko für den Spender durch Narkose

1.3.2. Weitere Therapieansätze mit HSPC

Neben der Stammzelltransplantation gibt es weitere Verwendungsmöglichkeiten für *ex vivo* expandierte HSPC.

Mit Hilfe der Gentherapie könnten Erbinformationen in Stammzellen eingebracht werden, die diese dann konstitutiv an ihre Nachkommen weitergeben würden, sodass die neue genetische Information nicht verloren ginge und von einer großen Anzahl Zellen exprimiert würde. Problematisch ist, dass retrovirale Vektoren, die effektivsten und am besten charakterisierten Genfähern, nur in sich teilende Zellen eindringen, HSPC jedoch ohne äußeren Stimulus in G_0 verharren. Die für den Gentransfer genutzten Viren bedeuten per se ein potientes Risiko und können im bereits geschwächten Organismus eine Infektion hervorrufen. Da Retroviren ihre genetische Information an einem beliebigen Ort der Wirts-DNA ablegen, kann es zu einer erheblichen Schädigung des Erbgutes kommen. Dies kann u. a. zur Entstehung von Krebs beitragen. In Deutschland sind genau aus diesem Grund die vier aktuellen Studien zur Gentherapie unter Verwendung retroviraler Vektoren ausgesetzt worden [119]. Bisher konnte noch kein sicheres und effektives Protokoll für den generellen Einsatz der Gentherapie etabliert werden [120-122].

Ein anderes potientes Einsatzgebiet expandierter HSPC ist die Produktion reifer Blutzellen, hauptsächlich Erythrocyten und Thrombocyten für die Transfusionsmedizin, und Granulozyten für die Behandlung von Sepsis-Patienten und zur Überbrückung der neutropenen Phase nach einer HSPC-Transplantation. Reife Blutzellen haben eine kurze Lebensspanne (reife Granulozyten wenige Stunden, Thrombocyten einige Tage) und sind z. T. nur schlecht zu lagern. Zudem sind die Lagerbestände knapp und nur auf wenige regionale Zentren beschränkt. Durch die Produktion reifer Blutzellen könnte dieser Engpass aufgehoben werden. Die Transplantate wären quasi frei von viralen und bakteriellen Kontaminanten und stünden sofort zur Verfügung.

Zudem ist es denkbar, dass in Zukunft die zelluläre Zusammensetzung von Transplantaten nach einer Krebstherapie speziell entworfen werden kann, sodass ein ausgewogener Anteil an Zellen mit lang- und kurzzeitigem *engraftment*, aber auch reifere Blutzellen zur sofortigen Immunabwehr verabreicht werden können.

II. ZIELSETZUNG UND MOTIVATION

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Konzeptionierung und Entwicklung eines Bioreaktorsystems für die klinisch relevante *ex vivo* Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen zum Zweck der Transplantation. Bisher ist es noch nicht gelungen, *in vitro* kultivierte Zellen nachweislich erfolgreich zu transplantieren.

Mit dieser Arbeit soll zum einen ein Beitrag im Hinblick auf alternative Bioreaktorkonzepte geleistet werden. Zum anderen soll durch die Analyse Stroma konditionierter Medien die Bedeutung des Stromalen Mikromilieus während der Hämatopoiese weiter aufgeklärt werden.

Zur Erreichung des Zieles werden, ausgehend von der klassischen Zellkulturtechnik, sowohl verfahrenstechnische als auch molekularbiologische Methoden angewandt, um eine komplexe Problemstellung von verschiedenen Seiten anzugehen.

Die persönliche Motivation zu dieser Arbeit rührt von der Chance her, mein biologisches Verständnis von den Vorgängen innerhalb einer Zelle zu verknüpfen mit den wesentlich abstrakteren Ansätzen der Bioreaktortechnologie.

War es mir bisher ein Anliegen, in die Zelle hineinzuschauen, so soll sich jetzt die Perspektive umkehren, um möglichst ideale äußere Bedingungen für das Wachstum der Zellen bereitzustellen.

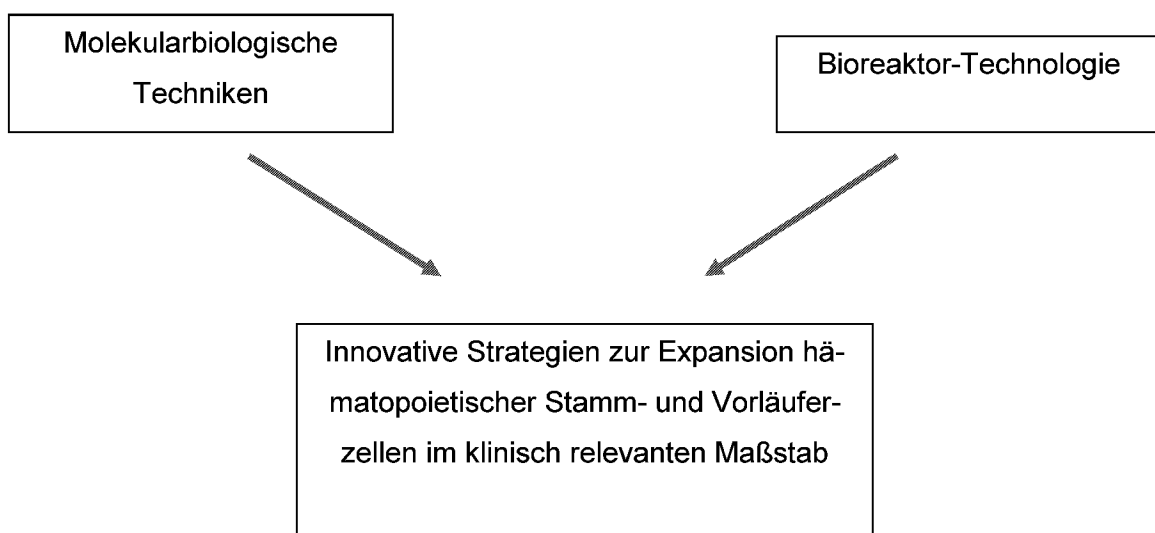


Abbildung II–1: Schema der Methodik

III. PROBLEMSTELLUNG

Um im klinischen Alltag Anwendung zu finden, muss ein Bioreaktorsystem zur HSPC-Expansion vielfältige Bedingungen erfüllen. Richtlinien zur Transplantation und vorhergehende Kultivierung von HSPC aus Nabelschnurblut wurden u. a. von der FDA und dem Paul-Ehrlich-Institut festgelegt. Grundsätze und Leitlinien zu GMP hat die Europäische Kommission veröffentlicht. Ebenso müssen natürlich auch ethische [123] und haftungsrechtliche [124] Aspekte bedacht werden.

Es ist nicht Ziel dieser Arbeit, einen kliniktauglichen Prozess zu entwickeln. Vielmehr sollen neue Ansätze erprobt werden, deren zukünftige Verwendung im klinischen Alltag denkbar wäre. Denn die bisher zur Verfügung stehenden Systeme überzeugen nicht. So ist z. B. von der Firma Aastrom Biosystems, Inc. (USA) ein automatisiertes System zur *ex vivo* Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen entwickelt worden, welches bereits mehrfach in der Klinik eingesetzt wurde. Dieses System, Aastrom Replicell™, ist ein Flachbettreaktor, worin die Zellen, auf einer Kunststoffoberfläche aufliegend, kontinuierlich mit Medium überströmt werden.

Es konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass expandierte Zellen tatsächlich an der langfristigen Rekonstitution des hämatopoietischen Systems beteiligt sind. Bisher wird so verfahren, dass nur ein kleiner Teil der Zellprobe *ex vivo* expandiert wird. Die übrigen Zellen werden ohne Manipulation transplantiert, die expandierten Zellen folgen nach dem Ende der Kultur, also ca. sieben bis zwölf Tage später. Der Nutzen der Transplantation zu diesem Zeitpunkt ist nicht geklärt. Zudem ist es nicht möglich, expandierte und unmanipulierte Zellen voneinander zu unterscheiden, da beide Populationen genetisch identisch sind. Somit kann der Beitrag einzelner Zellen am *engraftment*, also der erfolgreichen Ansiedlung von HSPC im Knochenmark, nicht geklärt werden. In anderen Fällen wurde das hämatopoietische System des Patienten nicht vollständig zerstört [125, 126]. Es hätte also selbst zur Wiederherstellung beitragen können [113]. Bisher wird in nur einem einzigen Artikel von der ausschließlichen Transplantation expandierter Zellen aus peripherem Blut berichtet [127]. Bei den vier beteiligten Patienten versagte die Transplantation, und sie mussten zusätzlich mit unmanipulierten Zellen transplantiert werden, was schließlich zur erfolgreichen Produktion von Neutrophilen führte. Eine spanische Arbeitsgruppe um Fernandez *et al.* untersuchte den Anteil expandierter HSPC aus CD34-positiven Nabelschnurblutzellen, die an einer erfolgreichen Wiederherstellung der Hämatopoiese beteiligt waren [110]. Es konnte auf relativ einfache Art und Weise bewiesen

werden, dass expandierte Zellen keinen Beitrag zur Rekonstituierung der Hämatopoiese leisten.

Bei den oben beschriebenen Systemen zur Kultivierung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen handelt es sich stets um Suspensionskulturen, supplementiert mit Cytokinen. Berücksichtigt man die Komplexität des hämatopoietischen Systems, das regulatorische Netzwerk und die Vielzahl der beteiligten Zellen und Moleküle, so ist leicht vorstellbar, dass der Zusatz von drei bis vier ausgewählten Cytokinen nicht ausreicht, die Natur nachzubilden. Auch wenn elementare Aspekte der Kultivierung, wie Medienzusammensetzung, Perfusionsraten, Sauerstoffversorgung und die Eignung des verwendeten Reaktormaterials, berücksichtigt werden, kann eine isolierte Suspensionskultur nie an die Effizienz des Hochleistungsgewebes Knochenmark heranreichen.

III.1. SYSTEMVERGLEICH – WAS BISHER GESCHAH

Um die Natur exakter imitieren zu können, wurde im Institut für Biotechnologie 2 des Forschungszentrums Jülich (Deutschland) ein Verfahren entwickelt, welches es erlaubt, immobilisierte HSPC in direkter Co-Kultur mit stromalen Zellen zu kultivieren. Die Zellen haften dabei auf Collagen-Trägern in einem Miniatur-Schlaufenreaktor bzw. einem Festbettreaktor (Details zu den Systemen siehe Anhang B) [128, 129].

Diese Bioreaktoren sind in mehreren Punkten ein besseres Abbild der Natur als eine reine Suspensionskultur:

- Stromale Zellen und HSPC werden in direktem Kontakt miteinander kultiviert, sodass ein bidirektionaler Informationsaustausch erfolgen kann.
- Die Regulation der kultivierten Zellen erfolgt durch Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakte ebenso wie über die Sekretion wachstumsfördernder und –inhibierender Faktoren.
- Die 3D-Struktur der Träger und daran haftende stromale Zellen bilden ein ideales Mikromilieu, worin sich HSPC ansiedeln können.

Trotz dieser positiven Aspekte und überzeugender Ergebnisse im Labor ist die Co-Kultur im Festbettreaktor keine kliniktaugliche Alternative zur reinen Suspensionskultur. Die Gründe sind folgende:

- Die verwendeten stromalen Zelllinien sind murinen Ursprungs. Ein HSPC-Transplantat müsste garantiert frei von diesen Zellen sein, um immunologische Komplikationen und

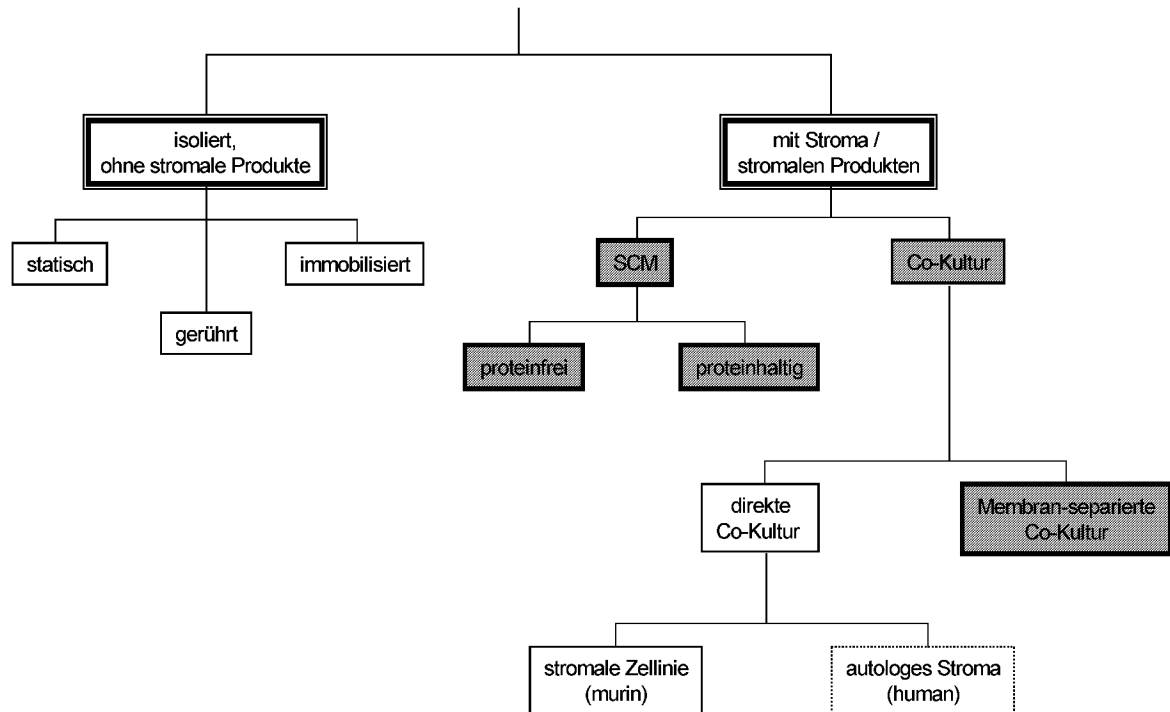


Abbildung III–1: Schematischer Überblick über mögliche Kulturvarianten zur Expansion von HSPC. Dünne Linie: zuvor bereits bearbeitete Varianten; dünne Linie, gestrichelt: zur Zeit bearbeitete Variante; unterlegter Kasten: in dieser Arbeit untersuchte Varianten.

das Risiko einer Virusübertragung zu vermeiden. Es ist aber nicht möglich, nach der Kultur HSPC vollständig von stromalen Zellen abzutrennen.

- Die verwendeten Träger sind aus Rindercollagen und werden zur Zellernte enzymatisch abgebaut, wobei aber stets Restpartikel in der Zellsuspension verbleiben.

Da bis zum heutigen Zeitpunkt keine humanen stromalen Zelllinien existieren, welche die Expansion der HSPC unter Erhalt ihrer Qualität unterstützen, wäre die Verwendung autologen Stromas oder autologer Endothelzellen, z. B. isoliert aus der Nabelschnur, eine mögliche Strategie. Eine Alternative zur direkten Co-Kultur ist eine Kultivierungsstrategie, die die Trennung humaner und muriner Zellen gewährleistet und darüber hinaus die Vermehrung der HSPC aus Nabelschnurblut im klinisch relevanten Maßstab ermöglicht.

Abbildung III-1 liefert einen schematischen Überblick über mögliche Kulturvarianten zur Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen. Zunächst muss entschieden werden, ob die Kultur unter Verwendung stromaler Produkte durchgeführt werden soll, oder ob lediglich rekombinante Cytokine und Wachstumsfaktoren supplementiert werden. Beispiele für isolierte Kulturen sind Gewebekulturflaschen und –platten (statisch) oder

Spinnerkulturen (gerührt). Diese Kulturvarianten weisen einige, oben z. T. beschriebene Schwächen auf. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auf Systeme fokussiert, die sich in unterschiedlichem Maße stromale Zellen bzw. deren Produkte zunutze machen (vergleiche rechte Hälfte der Abbildung III-1, unterlegte Kästen).

Die direkte Co-Kultur, immobilisiert auf Rindercollagen-Trägern, kommt für eine klinische Anwendung so nicht infrage und weist Mängel bei der Zellernte auf (s. o.). Alternativ wurde der Einsatz löslicher stromaler Faktoren in Form von Stroma konditioniertem Medium zur Kultivierung von HSPC untersucht. Eine zweite in dieser Arbeit entwickelte Methode stellt eine Variante der direkten Co-Kultur dar, wobei hier HSPC und stromale Zellen durch eine dünne, poröse Membran voneinander getrennt werden (vergleiche Abbildung III-1, unterlegte Kästen).

Innovative Kultivierungsstrategien

Im Folgenden werden die beiden in dieser Arbeit etablierten und charakterisierten Strategien zur Kultivierung von HSPC aus Nabelschnurblut kurz beschrieben und vergleichend betrachtet.

III.1.1. Stroma konditioniertes Medium

Die direkte Co-Kultur von stromalen und hämatopoietischen Zellen ist ein relativ komplexes *in vitro* Modell der natürlichen Gegebenheiten des Knochenmarks (Abb. III-2 b), wohingegen die Cytokin supplementierte Suspensionskultur eine stark vereinfachte Abbildung darstellt (Abb. III-2 a). Will man sich zumindest die Komplexität der sekretierten stromalen Faktoren, jedoch ohne eine direkte Beteiligung der stromalen Zellen, zunutze machen, bietet sich die Verwendung Stroma konditionierter Medien zur Kultivierung von HSPC an. Die genaue Zusammensetzung des SCM verschiedener stromaler Zelllinien ist nicht bekannt, es enthält aber deutlich mehr Proteinverbindungen, als isoliert in Form von Cytokinen und Wachstumsfaktoren zu HSPC-Kulturen zugegeben werden. Der positive Effekt einer solchen natürlichen Mischung übertrifft den der einzelnen Cytokine, zumal auch die Konzentrationen der sekretierten Proteine in physiologisch relevanteren Bereichen liegen dürften.

Im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung ist die garantierte Abwesenheit stromaler Zellen in der Kultur von Vorteil, da HSPC leicht und ohne kontaminierende stromale Zellen gewonnen werden können. Die Problematik, die durch das simultane Verabreichen

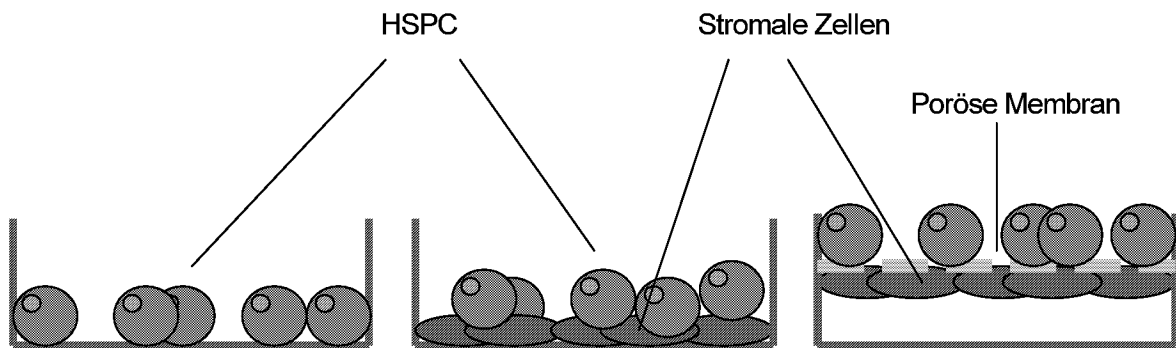


Abbildung III–2: Schematische Darstellung von drei Kulturvarianten zur Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen. a) Suspensionskultur, evtl. unter Verwendung von SCM b) Direkte Co-Kultur c) Membran-separierte Co-Kultur

von stromalen Faktoren einer murinen Zelllinie mit dem Transplantat entstehen könnte, ist quasi vernachlässigbar, da der Patient durch die Vorbehandlung seiner Krankheit (Cytostatika und/oder Bestrahlung) kein funktionierendes Immunsystem besitzt. Eine Immunabwehrreaktion gegen die fremden Proteine ist deshalb nicht zu befürchten. Schwerer wiegt in diesem Zusammenhang die mögliche Übertragung artfremder Viren. Dies ist bei der Verwendung von SCM zur Kultivierung der HSPC allerdings quasi auszuschließen, da murine stromalen Zellen die Kultur nicht „kontaminieren“.

In biologischer Hinsicht berücksichtigt diese Kulturvariante lediglich einen Teilaspekt der natürlichen Bedingungen, da keine Form der bidirektionale Kommunikation (Zell-Zell und Zell-ECM) zur Regulation der HSPC-Expansion beitragen kann. Die Medienzusammensetzung ist zwar nicht definiert, aber es ist möglich, vor Beginn der Kultur in SCM einige Parameter des Mediums zu testen, und diese gegebenenfalls genau auf die Bedürfnisse der HSPC einzustellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung von drei verschiedenen murinen stromalen Zelllinien die Herstellung von SCM zur Kultivierung hämatopoietischer Zellen optimiert. Zielgröße war die maximale Expansion der hämatopoietischen Zellen unter Erhalt ihrer Qualität, d. h. der Unterdrückung von Differenzierungsprozessen.

III.1.2. Identifizierung stromaler Faktoren zur gezielten Supplementierung

Ein Teilprojekt im Rahmen der oben genannten Optimierung von SCM befasste

sich mit der vergleichenden Untersuchung Stroma sekretierter Faktoren mittels 2D-Gelelektrophorese und nachfolgender MALD-TOF-Analyse. Verglichen wurde das Sekretionsmuster zweier stromaler Zelllinien, SI/SI und MS-5, deren SCM die Expansion hämatopoietischer Zellen in unterschiedlichem Maße unterstützen. Ziel war die Detektion und Identifizierung von Faktoren, die möglicherweise Ursache der sich unterscheidenden biologischen Wirksamkeit der SCM sein könnten.

Die hier entwickelte Methode ermöglicht es, neben den bereits bekannten noch weitere regulatorische Moleküle in SCM zu identifizieren, um sie später gezielt supplementieren und ihre Wirkung auf HSPC analysieren zu können.

Die Ergebnisse dieses Teilprojektes sind Bestandteil einer Diplomarbeit [130].

III.1.3. Membran-separierte Co-Kultur

Wie schon oben dargestellt, ist die Verwendung von SCM zur Kultivierung von HSPC zwar eine kliniktaugliche Methode, die in ihrer biologischen Effizienz reine Cytokin supplementierte Suspensionskulturen übertreffen soll. Allerdings ist die unterstützende Wirkung des Stromas auf lösliche Faktoren beschränkt. Um auch von den positiven Effekten der zahlreichen Zell-Zell- und Zell-ECM-Wechselwirkung profitieren zu können, wurde ein neuartiges Reaktorkonzept entwickelt, die Membran-separierte Co-Kultur (vergleiche Abb. III-2 c). Hierbei wird unter Verwendung einer porösen Membran die räumliche Trennung von humanen HSPC und murinen stromalen Zellen in zwei Kompartimente erreicht. Es kann dennoch eine Kommunikation über ECM-Komponenten und Signalrezeptoren erfolgen, da stromale Zellausläufer durch die Poren der Membran gelangen können und so auf die hämatopoietischen Zellen treffen. Ebenso diffundieren lösliche Faktoren von beiden Seiten der Membran in das jeweils andere Kompartiment. Obwohl beide Zellarten getrennt voneinander kultiviert werden, können sie sich aller relevanten Mechanismen der hämatopoietischen Regulation bedienen, um optimale Kulturbedingungen zu schaffen. HSPC können schließlich nach Ende der Kultur ohne Kontamination durch Stroma geerntet werden.

Neben der räumlichen Trennung herrscht auch eine Art funktionaler Trennung durch die beiden Kompartimente. Im einen Fall werden regulatorische und unterstützende Funktionen bereitgestellt, auf der anderen Seite profitiert das Produkt der Fermentation, die HSPC, von diesen Einflüssen. Allerdings kommt es natürlich zu erheblichen Wechselwirkungen, die eine klare Aufgabentrennung in diesem Sinn nicht erlauben. Ebenso wie in Suspensionskulturen, denen SCM zugesetzt wurde, ist auch im Fall der Membran-separierten Co-Kultur die Zusammensetzung des Kulturmediums nicht genau definiert und unterliegt natürlichen Schwankungen.

IV. MATERIAL UND METHODEN

IV.1. ZELLKULTUR

IV.1.1. Verwendete Zellen und Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden die adhärent wachsenden murinen Fibroblasten-Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI (beide erhältlich bei Fa. CellSystems, St. Katharinen) sowie MS-5, erhältlich bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, (DSMZ-Nr. ACC 441), verwendet.

M2-10B4 mod. und SI/SI wurden durch Transfektion genetisch so verändert, dass sie die humanen Cytokine G-CSF und IL-3 bzw. SCF und IL-3 produzieren. Da die Zellen genetisch nicht stabil sind, muss durch regelmäßige Kultivierung mit G-418 und Hygromycin B die transformierte Population selektioniert werden.

Als Modellzelle für HSPC diente die myeloide humane Zelllinie KG-1 (DSMZ-Nr. ACC 14). Sie kann schnell in Medium ohne Cytokin-Supplementierung vermehrt werden.

Die Stammhaltung dieser Zellen erfolgte in IMDM + 10% FCS.

IV.1.2. Bestrahlung der stromalen Zellen

Die Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI wurden bei Bedarf in einer Cs-137 Gamma-Bestrahlungsanlage mit 80Gy bestrahlt, die MS-5 wurde mit 170Gy bestrahlt.

IV.1.3. Cytokine und ihre biologische Funktion

Folgende Cytokine wurden zur Kultivierung von HSPC eingesetzt:

- **FL** (MW 30kDa) existiert in verschiedenen biologisch aktiven Isoformen, als Transmembran-Protein, Membran-gebundenes Protein, und als löslicher Faktor (in dieser Arbeit verwendet). FL wird in vielen Geweben, u. a. von Knochenmark-Fibroblasten, produziert, wohingegen sein Rezeptor, flt3, besonders in hämatopoietischem Gewebe (z. B. CAFC) exprimiert ist. Das Cytokin FL induziert, synergistisch mit anderen *early acting cytokines* (z. B. SCF) die Vermehrung von HSPC. Ohne die Anwesenheit anderer Cytokine wirkt es sich dagegen eher positiv auf die Vitalität der Zellen aus, ohne die Proliferation zu unterstützen.

- **IL-3** (MW 14-30 kDa) ist ein Wachstumsfaktor, der die Verbindung zwischen Immunsystem und Hämatopoiese herstellt. Er unterstützt die Proliferation fast aller Vorläuferzellen (CFU-GEMM, BFU-E (*Burst-Forming Unit-Erythroid*) und CFU-GM) und ist einer der *priming*-Faktoren für hämatopoietische Stammzellen. Das bedeutet, dass IL-3 diese Zellen empfänglich macht für Cytokine wie z. B. EPO, GM-CSF und IL-6, die eine Weiterdifferenzierung der Zellen bewirken. Zusätzlich induziert IL-3 die verstärkte Expression von CSF-Rezeptoren. IL-3 bildet innerhalb der ECM Komplexe mit Heparansulfat und liegt dadurch lokal in einer höheren Konzentration vor. Dies ist ein Aspekt der besonderen biologischen Bedeutung der direkten Co-Kultur von HSPC mit stromalen Zellen.

- **SCF** (MW 25-44 kDa) ist einer der Faktoren, die für die Aufrechterhaltung der *steady-state*-Hämatopoiese verantwortlich sind. Er ist ein Wachstumsfaktor für frühe lymphoide und myeloide Vorläuferzellen, die das Oberflächenantigen CD34 exprimieren. Synthetisiert wird SCF von Knochenmark-Fibroblasten. Einige solide Tumore können durch die Produktion von SCF in einer autokrinen Schleife den ebenfalls exprimierten SCF-Rezeptor c-kit aktivieren und somit das Tumorzellwachstum fördern.

- **TPO** (MW 68-85 kDa) wird exprimiert von HSPC, Megakaryozyten und Blutplättchen. Es ist der potenteste Stimulus zur Produktion von Blutplättchen. Zudem fördert es synergistisch mit anderen Cytokinen (SCF, FL oder IL-3) die Expansion früher Vorläuferzellen.

IV.1.4. Gewinnung humaner HSPC aus Nabelschnurblut

Nabelschnur-Venenblut von gesunden Neugeborenen wurde in 50mL-Falcon™-Röhrchen (enthielten je 1000U Heparin in 1mL PBS) aufgefangen und bis zur Aufarbeitung bei +4°C gelagert. Es wurden lediglich Proben, die nicht älter als 24h waren und ein Volumen von mindestens 15mL hatten, verwendet. Nachdem humane MNZ mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Nabelschnurblut isoliert worden waren, wurden HSPC durch Positivselektion von CD34-positiven Zellen in MACS™ MS und LS Säulen nach Herstellerprotokoll (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) aufgereinigt [131]. Die so gewonnenen Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

IV.1.5. Generelle Kulturbedingungen für die Suspensionskultur

Da das Ziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung eines innovativen Kultursystems zur Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen ist, muss die Qualität der etab-

lierten Neuentwicklungen mit existierenden Systemen verglichen werden können. Aus diesem Grund wurde mit jedem Kultivierungsexperiment ein Kontrollansatz in Form einer Suspensionskultur angesetzt. So können Expansionsfaktoren und weitere Merkmale der Kultur als „relativ zur Suspensionskultur“ angegeben werden.

Die stets eingehaltenen Kulturbedingungen der Kontrolle sind in Tabelle IV-1 dargestellt.

Tabelle IV-1: Generelle Kulturbedingungen für die Suspensionskultur

Parameter	
Zellen	CD34 ⁺ , aus Nabelschnurblut
Anzahl gepoolte Spender	3
Zellkonzentration [c/mL]	5,0E+03
Kulturmedium	X-Vivo 10
Cytokin-Cocktail	TPO (20ng/mL), SCF (50ng/mL), IL-3 (10ng/mL) und FL (50ng/mL)
Kulturvolumen	1mL
Kulturgefäß	12-Loch Gewebekulturplatte
Dauer der Kultur (h)	168
n	3

IV.1.6. Herstellung konditionierter Medien (Grundlagen)

Die in dieser Arbeit beschriebenen konditionierten Medien wurden, falls nicht anders vermerkt, wie folgt hergestellt.

2D konditioniertes Medium:

Im Fall der zweidimensionalen Stromakultur (2D) bilden die Zellen einen zweidimensionalen Zellrasen auf dem Boden einer Gewebekulturflasche aus.

Die Zellen der gewählten stromalen Zelllinie wurden in IMDM/10%FCS bestrahlt. Vor dem Aussäen in T25-Gewebekulturflaschen wurden die Zellen zweimal mit je 10mL X-Vivo 10 gewaschen, um verbleibende Serumreste zu entfernen, und schließlich in einer Standardkonzentration von 4,0E+04 Zellen/mL X-Vivo 10 in einem Gesamtvolumen von 10mL inokuliert. Die Komponenten des Mediums unterstützen das Anheften der Zellen, sodass keine weiteren Anheftungsfaktoren aus Serum zugesetzt werden müssen. Nach 125h wurde das konditionierte Medium gewonnen und verbliebene zelluläre Bestandteile abzentrifugiert und, im Fall des proteinfreien Mediums, steril filtriert. Bis zur weiteren Ver-

wendung wurde das Medium bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung proteinfreier konditionierter Medien wurden die bestrahlten stromalen Zellen zunächst über Nacht in IMDM/10%FCS adhärirt, anschließend mit PBS gewaschen und in ProCHO4-CDM oder SMIF-6 für den gewünschten Zeitraum kultiviert.

Zur Herstellung des konditionierten Mediums der myeloiden Zelllinie KG-1 wurden die Zellen in X-Vivo 10 gespült und unbestrahlt in einer Konzentration von $2,0\text{E}+05/\text{mL}$ in einer T25-Gewebekulturflasche für 125h kultiviert. Das Gesamtvolumen betrug 10mL.

3D konditioniertes Medium:

In der dreidimensionalen Kultur (3D) besiedeln die stromalen Zellen rundliche, poröse Mikroträger und bilden dadurch einen kompakten Zellverband.

In einer 12-Loch-Gewebekulturplatte wurden je Loch 3mL X-Vivo 10 vorgelegt, ein Mini-Magnetrührer zugegeben und schließlich der Einsatz des Miniatur-Schlaufenreaktors mit Haltesieb platziert [128]. Die Einsätze wurden gleichmäßig mit porösen Mikroträgern (Collagen oder Siran) befüllt. Bestrahlte, in X-Vivo 10 gewaschene stromale Zellen wurden in einem Milliliter Medium auf die Träger gegeben. Das Gesamtvolumen betrug 4mL Medium. Die so befüllte Gewebekulturplatte wurde auf einem Magnetrührer im Brutschrank inkubiert. Durch die Schlaufenströmung wurden die auf den Trägern haftenden Zellen mit Nährmedium umspült. Nach der gewünschten Kulturdauer wurden die Einsätze entfernt und die Medien der stets in Triplikaten angesetzten Kulturen vereinigt. Vor der Verwendung des Mediums zur Kultivierung von HSPC wurden verbliebene Träger und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt.

Zur Spülung der Träger wurden jeweils ca. 3mL Trägerschüttvolumen in 20mL Spülmedium (X-Vivo 10) in einem 50mL-Falcon™-Röhrchen für den gewünschten Zeitraum im Brutschrank inkubiert und gelegentlich durchmischt. Anschließend wurden die Träger noch einmal kräftig aufgewirbelt und zur weiteren Verwendung in frischem Medium aufgenommen.

IV.1.7. Kultivierung im Mini-Membranreaktor (MMR)

In einer 12-Loch Gewebekulturplatte wurden je Loch 3mL X-Vivo 10 vorgelegt und der Membraneinsatz vorsichtig, ohne Luftblasen zu bilden, mit der Stroma-Membranseite nach oben, im Medium platziert. Anschließend wurde 1mL Medium je Einsatz entfernt und die bestrahlten, in X-Vivo 10 gespülten stromalen Zellen in einem Volumen von ca. 100-200 μL auf die Membran aufgebracht. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank adhärirt. Danach wurde der Einsatz umgedreht und in 3mL gem X-Vivo 10 in einer neuen Vertiefung der Gewebekulturplatte platziert. Je $5,0\text{E}+03$ (falls nicht anders angegeben) frisch aufgetaute $\text{CD}34^{+}$ hämatopoietische Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von

600µl für einen Zeitraum von 120 Stunden (falls nicht anders angegeben) auf der Membran kultiviert. Zur Ernte der kultivierten Zellen wurde der Membraneinsatz in ein leeres Loch überführt, die Zellsuspension abgezogen und die Membran 2x mit je 1mL PBS gespült. Da die hämatopoietischen Zellen z. T. während der Kultur von der Membran an den Halteringen vorbei auf den Boden der Kulturplatte gelangten, wurde die Anzahl dieser Zellen ebenfalls zur Bilanzierung der Gesamtzellmenge ermittelt. Allerdings ist es wichtig zu bemerken, dass die Zellen, welche zum Zeitpunkt der Zellernte nicht auf der Membran auflagen, nicht zur Herstellung der biologischen Assays eingesetzt wurden. Man kann davon ausgehen, dass die hämatopoietischen Zellen auf dem Boden der Kulturplatte nicht ausreichend intensiv Kontakt zur stromalen Schicht auf der unteren Membranseite hatten bzw. die lokale Botenstoff-Konzentration deutlich geringer war, sodass der biologische Effekt minimal sein würde und daher das Ergebnis der Assays verfälschen könnte. Technischer Aufbau des Mini-Membranreaktors: siehe Ergebnisse und Anhang B.

IV.2. ANALYTIK

IV.2.1. Medienanalytik

Die Medienanalytik erfolgte mit zellfreien Medienproben, welche zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten aus der Kultur oder unmittelbar aus der Medienflasche entnommen wurden.

Osmolalität

Die Osmolalität der Proben wurde mithilfe eines Osmometers unter Ausnutzung der Gefrierpunktniedrigung salzhaltiger Lösungen im Vergleich zu reinem Wasser bestimmt. Hierbei wurden 50µL des zu untersuchenden Mediums nach Unterkühlung auf -7° mit einem Impfkristall zur Kristallisation gebracht. Die ermittelte Gefrierpunkttemperatur ist ein Maß für die Osmolalität der Lösung.

Glukose

Mithilfe einer membrangebundenen Glukose-Oxydase wird Glukose zu Glukonsäure umgesetzt. Dabei entstehendes Wasserstoffperoxyd oxydierte an einer Platinelektrode zu Sauerstoff, und der dann messbare Strom ist proportional zum Glukosegehalt der Probe. Diese enzymatisch-amperometrische Messung erfolgte automatisiert in einem Glukose-Analyzer.

Glutamin/Glutamat

Das Messprinzip des Glutamat-Analyzers entspricht dem des Glukose-Messgerätes. Glutamat wird enzymatisch zu α -Ketoglutarat, Ammoniak und Wasserstoffperoxyd umgesetzt. Letzteres oxydiert an einer Platinsonde, und der entstehende Stromfluss ist proportional zum Glutamatgehalt der Probe. Glutamin wird mit einer Glutaminase zu Glutamat umgesetzt und anschließend entsprechend bestimmt.

Laktat

Laktat wird durch eine Laktatoxydase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxyd umgesetzt, also ebenfalls, wie oben beschrieben, enzymatisch-amperometrisch in einem Analyzer bestimmt.

IV.2.2. Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung wurde ein Aliquot der Zellen mit Erythrosin B versetzt. Da der Farbstoff in Zellen eindringt, deren Membran nicht mehr intakt ist, können im Hämacytometer tote, gefärbte Zellen von lebenden Zellen unterschieden werden. Diese Abgrenzung ist mit dem Zellszählgerät CASY 1™ nicht so exakt möglich. Hier wird mittels Widerstandsmessung die Zellzahl bestimmt. Eine Pulsflächenanalyse gibt Aufschluss über die Größenverteilung der Zelle, wobei Zellen ohne intakte Membran lediglich in den Größenbereichen ihres Zellkerns dargestellt werden.

IV.2.3. Biologische Assays

MC-Assay

Der MC-Assay wurde wie folgt angelegt:

Je 100 Zellen (an Tag 0) bzw. 300 Zellen (nach 168-stündiger Expansion) wurden in 400 μ L IMDM aufgenommen und zu 4 mL einer Methylzellulose-Lösung (Fa. CellSystems, St. Katharinen) in einem 15 mL Falcon™ gegeben. Nach gründlicher Durchmischung der Lösung wurden dreimal je 1 mL der zellhaltigen Methylzellulose luftblasenfrei in kleine Petrischalen überführt. Es folgte die Inkubation von je zwei kleinen Schalen und einem Schälchen mit sterilem Wasser in einer großen Petrischale für zwei Wochen im Brutschrank. Danach erfolgte die Auswertung der entstandenen Kolonien. Kriterien für die Auswertung: siehe [132].

CAFC-Assay

Der CAFC-Assay wurde wie folgt angelegt:

Zunächst wurden je $6,0 \times 10^3$ bestrahlte stromale Zellen der Linien M2-10B4 mod. und SI/SI in einem Gesamtvolumen von 100 μ L Medium (75% IMDM, 12,5% FCS, 12,5% HS) pro Vertiefung in einer 96-well-Platte vorgelegt. Die äußeren Vertiefungen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit je 150 μ L sterilem Aqua bidest. befüllt, sodass insgesamt sechs Reihen mit jeweils zehn Vertiefungen pro Reihe Zellen enthielten. Die so vorbehandelten Platten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurde eine Probe der Inokulumszellen (Tag 0) in sechs Verdünnungsschritten auf die Stromaschicht gegeben, sodass in den zehn Vertiefungen der oberen Reihe statistisch 243 Zellen eingesät wurden, in den jeweils folgenden Reihen jedoch nur noch 1/3 der Zellmenge vorlagen. In der unteren der sechs Reihen befand sich demnach nur noch eine Zelle pro Vertiefung. Es wurden vier Platten dieser Art angelegt.

Nach 168h wurden die in den jeweiligen Ansätzen expandierten HSPC in einer höheren Konzentration eingesetzt, nämlich zwischen 1215 Zellen und fünf Zellen pro Vertiefung. Hiervon wurden zur besseren Handhabbarkeit lediglich zwei Platten pro Ansatz angelegt.

Die Zellen wurden in einem Volumen von 100 μ L zugegeben. Wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt.

Die Auswertung des Assays erfolgte nach 6-wöchiger Inkubation im Brutschrank.

Kriterien für die Auswertung: siehe [23, 133]

IV.2.4. FACS-Analytik

Zwei- oder dreifach FACS-Färbungen wurden an einem FACScan (Becton Dickinson, BD) mit Hilfe des CellQuest-Programms durchgeführt [134, 135]. Die Antikörper wurden ebenfalls über BD bezogen:

- Klon 581 des R-Phycoerythrin-(R-PE) gekoppelten, monoklonalen mIgG1 κ Antikörpers detektiert das humane CD34-Antigen (CD, *Cluster of Differentiation*). Antikörper gegen CD34 werden eingesetzt zur Quantifizierung und Aufreinigung von lymphohämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen zu Forschungszwecken oder klinischen Knochenmarkstransplantationen. CD34 gehört zur Familie der hoch-glykosylierten Mucine. Seine biochemische Aktivität ist nicht bekannt.
- Klon HIT2 des Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC) gekoppelten, monoklonalen mIgG1 κ Antikörpers detektiert das humane CD38-Antigen. CD38 ist ein Typ-II-Transmembranprotein mit einem MW von 45kDa. Es wird exprimiert auf der Mehrzahl der hämatopoietischen Zellen, vornehmlich während früher Differenzierungs-

und Zellaktivierungsvorgänge. CD38 ist sowohl ein positiver als auch ein negativer Regulator der Zellaktivierung und Proliferation, abhängig von weiteren Umgebungsfaktoren. CD34⁺/CD38⁻-Zellen sind genealogisch jünger als CD34⁺/CD38⁺-Zellen

- Klon HI30 des Fluorescein Isothiocyanat (FITC) gekoppelten, monoklonalen mIgG_{1,κ} Antikörpers detektiert das humane CD45-Antigen. CD45 ist eine Phosphatase und für die T- und B-Zellrezeptor-vermittelte Zellaktivierung essentiell. Es handelt sich um ein Typ-I-Transmembranmolekül mit einem MW von 210-220kDa. Das Protein ist in hohem Maße auf allen hämatopoietischen Zellen exprimiert (alternative Bezeichnung: LCA, *Leukocyte Common Antigen*). Es ist ein wichtiger Bestandteil der Zelloberflächen-Glykostruktur und interagiert mit Galectin-1.
- Klon 12G5 des R-Phycoerythrin- (R-PE) gekoppelten, monoklonalen mIgG_{2a}, Antikörpers detektiert das humane CXCR4-Antigen (CD184, Fusin). CD184 gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Chemokin-Rezeptoren und bindet selektiv SDF-1. CD184 vermittelt die chemotaktische Migration von hämatopoietischen Zellen entlang eines SDF-1-Gradienten und spielt demnach eine bedeutende Rolle im *homing* von Stammzellen aus der Peripherie ins Knochenmark. Dieser Prozess basiert auf dem Rearrangement des Cytoskelettes und der Integrin-vermittelten Adhäsion an ECM-Komponenten.

IV.3. BIOCHEMIE/MOLEKULARBIOLOGIE

Aufarbeitung der proteinfreien SCM

Nach der oben beschriebenen Gewinnung der SCM, ausgehend von proteinfreiem Pro-CHO4-CDM, muss das Medium zur weiteren Analyse mittels Gelelektrophorese und Massenspektrometrie weiter aufgearbeitet werden. Die detaillierten Protokolle und Rezepte sind in der in diese Promotion eingebundenen Diplomarbeit nachzulesen [130].

Reinigung der Probe mittels Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie basiert auf dem Prinzip des Molekularsiebeffektes. Größere Moleküle werden in der stationären, porösen Gelmatrix einer Säule, hier Sephadex G-25, zurückgehalten, wohingegen kleinere Moleküle, z. B. Salze, durch die Zwi-

schenräume der Matrix gelangen und schließlich ausgespült werden. In einem zweiten Schritt können die höhermolekularen Stoffe, wie z. B. Peptide und Proteine, frei von störenden Substanzen von der Säule eluiert werden.

Besonders die Entsalzung der Medienprobe ist von besonderer Bedeutung für die anschließende Gelelektrophorese, da die Proteine während der isoelektrischen Fokussierung entsprechend ihrer Nettoladung getrennt werden. Fremde Ionen würden diesen Prozess beeinträchtigen.

Auch der Farbstoff Phenolrot, der dem ProCHO4-CDM in geringen Mengen zugesetzt wurde, kann auf diese Weise größtenteils aus der Probe entfernt werden.

Die Gelfiltration wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und lieferte, ausgehend von 2,5mL Probevolumen, jeweils 3,5mL proteinhaltiges Eluat.

Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Konzentration der im SCM befindlichen Proteine wurde mittels BCA-Test nach Herstellerangaben durchgeführt (Fa. Pierce, Rockford, USA).

Proteine reduzieren Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion) zu Cu^+ -Ionen. Dies führt zur Komplexierung von Cu^+ -Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA). Der blauviolette Komplex kann bei einer Wellenlänge von 570nm photometrisch bestimmt werden. Der lineare Bereich liegt bei einer Komplex-Konzentration von 20-200 $\mu\text{g/mL}$ mit einem Detektionsminimum von etwa 5 $\mu\text{g/mL}$. Unterschiedliche Proteine können bei gleicher Konzentration verschiedene Messwerte liefern, sodass eine Eichung mit BSA (*Bovine Serum Albumine*) nur suboptimal für die Konzentrationsbestimmung eines Proteingemisches geeignet ist.

Störende Substanzen sind u. a. Phenolrot und Lipide, die allerdings größtenteils durch Gelfiltration (s. o.) und Acetonfällung (s. u.) beseitigt werden können.

Aufkonzentrierung der Medienprobe

Die von den stromalen Zellen während der Konditionierung sekretierten Moleküle liegen in einem Gesamtvolumen von 10mL Medium vor, und durch die Gelfiltrationschromatographie wird das Medium noch weiter verdünnt. Die Proteine wurden daher aufkonzentriert, um eine geeignete Probenmenge in einem geringen Volumen Elektrophoresepuffer aufnehmen zu können.

Eine Methode zur Aufkonzentrierung von Proteinen ist die Vakuumzentrifugation. Wässrige Lösungen verdampfen bereits bei Raumtemperatur, und nach Entfernen des Überstandes können die präzipitierten Proteine für weitere Analysen verwendet werden.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Fällung der Proteine mit Aceton dar.

IV.3.1. Gelelektrophorese

Theoretischer Hintergrund:

Mit Hilfe der Gelelektrophorese ist es möglich, ein komplexes Gemisch aus Makromolekülen unterschiedlicher Ladung und Molekulargröße zu trennen und die einzelnen Fraktionen sichtbar zu machen. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins im elektrischen Feld hängt von der angelegten Feldstärke, der Nettoladung des Proteins, und einem Reibungskoeffizienten ab. Führt man die elektrophoretische Trennung nicht in Lösung, sondern in einer porösen Gelmatrix durch, so kann man sich zusätzlich die Molekularsiebeigenschaften des Gels zunutze machen und eine verfeinerte Trennung der Proben erreichen. Unter denaturierenden Bedingungen werden Proteine hauptsächlich aufgrund ihrer Massenunterschiede in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Für die SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Geleelektrophorese) wird das Proteingemisch zunächst mit dem Detergens SDS versetzt, dessen Anionen durch Bindung an die Proteine nichtkovalente Wechselwirkungen aufheben. β -Mercapthoethanol und/oder Dithiothreitol reduzieren Disulfidbrücken der Proteine. Die Eigenladung der Proteine wird durch die stark negative Ladung des gebundenen SDS vernachlässigbar. Etwa ein SDS-Molekül bindet pro zwei Aminosäurereste, sodass ein konstantes Ladung-zu-Masse-Verhältnis im Proteingemisch entsteht. Es ist möglich, Proteine zu trennen, deren Massen sich um 2% unterscheiden, entsprechend einer Differenz von ca. zehn Aminosäureresten.

1D-Gelelektrophorese

Während der eindimensionalen (1D-) Gelelektrophorese wandern die Proteine zur Anode. Kleine Proteine wandern schneller durch die Gelmatrix, größere Moleküle werden im Gel zurückgehalten.

In dieser Arbeit wurden homogene Tris-Glycin-Gele (18%) verwendet. Zur besseren Trennung des Proteingemisches in den kleinen Molekulargrößen-Bereichen wurden ebenfalls Bis-Tris-Gradientengele eingesetzt. Die Gele wurden von der Fa. Invitrogen bezogen, und die Elektrophorese wurde entsprechend der Herstellerempfehlung durchgeführt.

2D-Gelelektrophorese

Werden Proteine nicht durch SDS denaturiert und stark negativ geladen, wandern sie entsprechend ihrer Nettoladung in einem pH-Gradienten bis zu ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Hier ist ihre Nettoladung gleich null, ebenso wie die elektrophoretische Mobilität. Dieses Prinzip wird als IEF (Isoelektrische Fokussierung) bezeichnet. Es ist möglich,

Proteine zu trennen, deren pI-Werte sich um lediglich 0,01, also um eine Ladung, unterscheiden. Immobilisierte pH-Gradientengele werden aus Ampholyten, das sind Polymere mit zahlreichen Amino- und Carboxylgruppen, hergestellt. Die in dieser Arbeit eingesetzten Immobiline unterscheiden sich von freien Trägerampholyten, da sie mit der Gelmatrix co-polymerisieren und entsprechend ihres pI im Gel fixiert sind. Auf diese Weise entsteht ein dünner Gelstreifen mit einem definierten pH-Gradienten. Im Anschluss an die IEF kann per SDS-PAGE eine Trennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgen. Man spricht dann von einer zweidimensionalen (2D-) Gelelektrophorese.

Die in dieser Arbeit dargestellten 2D-Gele wurden unter Verwendung von 18cm langen IPGstrips (Fa. Invitrogen) mit einem pH-Gradienten von pH4 bis pH7 in der ersten Dimension, bzw. einem 12-14%igen SDS-Polyacrylamid-Gel (Fa. Invitrogen) in der zweiten Dimension hergestellt. Die Elektrophorese wurde mit einer Multiphor II IEF-Einheit bzw. aus organisatorischen Gründen zu Beginn der Arbeit mit einer IPGphor IEF-Einheit (beide Fa. Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei Bedarf wurden die IPGstrips bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Färbeprotokolle

Es existieren vielfältige Möglichkeiten, Proteinspots im Gel sichtbar zu machen. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich z. T. stark in ihrer Sensitivität. Die Detektionsgrenze von colloidalem Coomassie liegt bei 100-500ng, wohingegen noch 10-fach geringere Mengen mit Silber angefärbt werden können (beispielhaft für einen MW von 100kD). Andere Färbetechniken sind in der Lage, Proteine bis zu einer Grenze von 10^{-6} bis 10^{-3} fMol zu detektieren.

Die Farbstoffe binden entweder nichtkovalent durch hydrophobe Wechselwirkungen (Coomassie), oder sie gehen eine kovalente Bindung mit funktionellen Resten des Proteins ein. Ag^{+} -Ionen komplexieren mit sauren Gruppen und Sulfhydrylresten, Formaldehyd reduziert die Ag^{+} -Ionen zu elementarem Silber. Diese Färbung ergibt braune bis rötliche Spots, die Coomassie-Färbung liefert blaue Spots.

Die Proteine werden zunächst im Gel denaturiert, dabei fixiert und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue G-250 oder Silbernitrat gefärbt. Färbungen dieser Art sind nicht quantitativ.

Es ist ein bekanntes Problem, dass die Silberfärbung aufgrund der Verwendung von Glutaraldehyd und/oder Formaldehyd zur Vernetzung der Proteine nicht kompatibel ist mit einer MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) interessanter Proteinspots. Aus diesem Grund wurde neben der modifizierten Färbemethode nach Blum auch das SilverQuest Silver Staining Kit (Fa. Invitrogen),

welches auf den Zusatz von Glutardialdehyd und Formaldehyd verzichtet, zur Visualisierung der Proteine eingesetzt.

Zur Kontrolle wurden in einem Fall IPGstrips mit einer Violet-17-Lösung angefärbt [136].

IV.3.2. MALDI-TOF MS

Theoretischer Hintergrund:

Werden Proteine enzymatisch, z. B. mit Trypsin, verdaut, sind die entstehenden Fragmentmuster nicht zufällig entstanden. Endopeptidasen schneiden ein Molekül an bestimmten Konsensussequenzen (an den beiden basischen Aminosäuren Lys und Arg im Fall von Trypsin). Die massenspektrometrische Analyse von Peptidgemischen mit MALDI-TOF MS liefert Spektren, die Fingerabdruckqualität für das jeweilige Protein besitzen. Daher werden diese Spektren auch „*Peptide Mass Fingerprints*“ (PMF) genannt, mit deren Hilfe sich Proteine zweifelsfrei identifizieren lassen.

Im Anschluss an ein hochauflösendes Trennverfahren (z. B. 2D-Gelelektrophorese) werden interessante Spots aus dem Gel ausgestanzt und tryptisch verdaut. Anschließend werden sie in eine kristalline Matrix (hier α -Cyano-4-hydroxymethylsäure) eingebunden. Diese Probe wird im MS mit einem gepulsten Laserstrahl beschossen. Die Matrix absorbiert das Laserlicht und verdampft dabei, sodass die darin eingebundenen Probenmoleküle schonend, ohne zu fragmentieren, in die Gasphase überführt werden. Zusätzlich sorgt die Matrix über Protonierungs- bzw. Deprotonierungsreaktionen für die Ionisierung der Probenmoleküle, die überwiegend einfach geladen werden. Die in der Ionenquelle eines MS erzeugten und beschleunigten Ionen sind charakterisiert durch ihr spezifisches Masse-zu-Ladung Verhältnis (m/z), die Geschwindigkeit und ihre Häufigkeit bzw. Intensität. Ionen gleicher Masse und Ladung verhalten sich nicht gleichförmig, sie können sich in ihrer Anfangsfluggeschwindigkeit (Energie) unterscheiden, und sie sind zu geringfügig anderen Zeiten und von einem anderen Ort innerhalb der Matrix gestartet. Diese Unschärfe kann mithilfe ionenoptischer Fokussierungsmassnahmen minimiert werden. Ein Ionenreflektor erzeugt am Ende der Flugbahn der Ionen ein homogenes elektrisches Feld mit der gleichen Polarität wie die Ionen. In diesem „Ionenspiegel“ werden die Ionen abgebremst und dann in die entgegengesetzte Richtung auf den Detektor beschleunigt. Betrachtet man Ionen gleicher m/z -Verhältnisse (also gleicher Masse), aber unterschiedlicher kinetischer Energie (Geschwindigkeit), so tauchen die schnelleren Ionen tiefer in das Reflektorfeld ein (Geschwindigkeitsfokussierung) und werden später gleichzeitig mit den langsameren Ionen am Detektor registriert.

Es entsteht eine Häufigkeitsverteilung von Ionen in Abhängigkeit ihres m/z -Verhältnisses, wobei die Genauigkeit der Peptidmassen-Bestimmung bei ca. 50ppm bzw. 0,1Da liegt. Da die Masse der in den Proteinen enthaltenen Elemente einer Isotopenverteilung unterliegt, wird bei der Datenanalyse lediglich das Spektrum der monoisotopen Moleküle betrachtet. Deren Masse ist geringer als die der Isotopomere, die unterschiedliche Isotope der einzelnen Elemente besitzen.

Es ist wichtig zu bedenken, dass größere Proteine potentiell eine größere Anzahl an Konsensussequenzen für die verwendeten Enzyme tragen. Entsprechend entsteht beim Verdau dieser Proteine ein komplexeres Fragmentmuster, welches die spätere Identifizierung der Proteine eindeutiger macht. Ein kleines Protein dagegen weist möglicherweise nur eine einzige Schnittstelle auf, und die entstehenden zwei Bruchstücke sind nicht sehr spezifisch. Erschwerend kommt hinzu, dass man bei der Zuordnung der Massenspektren häufig davon ausgeht, dass im Mittel eine Schnittstelle „übersehen“ wurde, der Verdau also nicht immer vollständig war. Man wählt diese Einstellung für die Parameter zur Proteinidentifizierung, um die Chance einer Übereinstimmung zu erhöhen, da der Verdau der Proteine aufgrund ihrer aufwendigen Vorbehandlung (Reinigung, Aufkonzentrierung, Gelelektrophorese, Isolierung aus dem Gel) nicht unbedingt optimal, wie *in silico* berechnet, ablaufen muss. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Identifizierung größerer Proteine einfacher und eindeutiger ist.

Praktische Durchführung:

Interessante Spots wurden mit einer Pasteur-Pipette aus dem Gel ausgestantzt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 350 μ L einer 30%igen Acetonitril-Lösung in 0,1M Ammoniumhydrogencarbonat für ca. 10 Minuten unter Schütteln inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Schritt wiederholt. Anschließend wurden die gelösten Proteine für ca. 20 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 1 μ L Trypsin-Lösung rehydratisiert und für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 2ML 3mM Tris-Puffer folgte eine Inkubation über Nacht. Danach wurden 6 μ L Aqua bidest. zugegeben und die Probe wurde erneut, jetzt für 10 Minuten, inkubiert. Nach Zugabe von 5 μ L 30% Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure (TFA) und Inkubation für 10 Minuten wurden die Proben bei -20°C gelagert. Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die Proben unter Zuhilfenahme von ZipTip_{C18}-Pipettenspitzen (Fa. Millipore) aufkonzentriert und gereinigt. Danach erfolgte die Elution der Proben in der Matrixsubstanz (α -Cyano-2-hydroxyzimtsäure in 50% Acetonitril und 0,1% TFA) auf das Proben target, welches in die Probenschleuse des MALDI-TOF Gerätes (Voyager-DE™ STR Biospectrometry™ Workstation, Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) eingebracht wurde. Die angelegten Messpa-

parameter sind in Tabelle IV-2 zusammengefasst.

Tabelle IV-2: Messparameter zur Aufnahme von Massenspektren im MALDI-TOF MS

Control Mode	Manual
Accelerating Voltage	20000V
Grid Voltage	65%
Delay Time	125ns
Spectrum acquisition:	
Shots/Spectrum	200
Mass Range (Da)	800-4000
Low Mass Gate (Da)	700
Calibrationmatrix	α -Cyano-4-hydroxycinnamidacid
Manual Laser Intensity	~2400

IV.3.3. Datenbankanalyse der Spektren

Theoretischer Hintergrund:

Die aufgenommenen Spektren der tryptisch verdauten Proteine werden zur Identifikation mit Spektren theoretisch, d. h. *in silico* verdauter Proteine, welche in verschiedenen Internet Datenbank abrufbar sind, verglichen. Je mehr Übereinstimmungen gefunden werden, je genauer diese Übereinstimmungen sind und je weniger Peptidmassen im gemessenen Fingerabdruck nicht zugeordnet werden können, umso besser wird das Qualitätsmaß. Von Vorteil ist es, wenn das Protein nur wenige Schnittstellen besitzt, denn längere Peptidfragmente können eindeutiger zugeordnet werden. Ungenauigkeiten bei dem Vergleich der Spektren treten auf, wenn das *in vitro* verdaute Proteine bestimmte Modifikationen wie z. B. Glykosylierungen trägt, die die Masse verändern können. Auch ist es denkbar, dass nicht alle Schnittstellen vom Enzym erkannt werden, also auch größere Fragmente vorliegen, die nicht im theoretischen Verdau auftauchen.

Praktische Durchführung:

Ausgewertet wurden die Spektren mit der software MS-Fit (<http://prospector.uscf.de>), die es erlaubt, verschiedene Analyseparameter (siehe Tabelle IV-3) zu wählen, um die Suche nach übereinstimmenden Spektren in der NCBI-Datenbank zu konkretisieren. Die ungefähre Masse und der pI des gesuchten Proteins sind bereits durch die 2D-Gelelektrophorese bekannt, ebenso wie das eingesetzte Enzym, die Matrix und die Spe-

zies, von der das Protein stammt. Die theoretische Abweichung der Massen sollte zwischen +/- 50 bzw. 100ppm liegen.

Tabelle IV-3: Analyseparameter zur Identifizierung von Proteinen anhand ihrer Massenspektren in Proteindatenbanken

Database	NCBI Nr. 7.9.2002
Digest	Trypsin
Cys modified by	carbamidomethylation
N term	Hydrogen
C term	Free acid
Species	Mus musculus / Mammals
MW of protein	1000 – 100000 Da
Protein pl	4 – 7
Search mode	identity
Instrument	MALDI-TOF
Peptide masses are	monoisotopic
Mass tolerance	+/- 50 (100) ppm
Data format	PP m/z charge

IV.4. REM-AUFNAHMEN

Die auf den ausgewählten Membranausschnitten haftenden Zellen wurden mit 25%iger Glutardialdehyd-Lösung über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Proben gewaschen und in steigender Aceton-Konzentration entwässert. Daran schloss sich eine Kritischer-Punkt Trocknung an, und die Proben wurden schließlich für die REM-Aufnahmen auf Probentellerchen fixiert.

IV.5. TIERVERSUCH

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, dient der NOD/SCID-Mausversuch zur Analyse der Repopulierungsfähigkeit *in vitro* expandierter HSPC. Der in dieser Arbeit beschriebene Versuch wurde in Zusammenarbeit mit der Firma MainGen, Frankfurt, durchgeführt.

Um zu analysieren, inwieweit die Qualität der im Mini-Membranreaktor expandierten Zellen erhalten bleibt, wurden HSPC wie oben beschrieben im MMR kultiviert. Insgesamt wurden drei Versuche angesetzt: mit M2-10B4 mod. oder MS-5 als stromale Schicht, und zur Kontrolle im well ohne Einsatz und Stroma. In allen Fällen betrug das Medienvolumen 3,6mL/MMR bzw. well. Die Menge der eingesetzten HSPC wurde auf $2,0E+04$ bzw. $3,0E+04$ Zellen pro MMR bzw. well erhöht. Es wurden jeweils 12 MMRs bzw. wells mit je $11 \times 2,0E+04$ und $1 \times 3,0E+04$ Zellen angelegt. Die Zellen stammten wie üblich von drei verschiedenen, gepoolten Spendern.

Von der Inokulumsprobe an Tag 0 wurden $2,5E+05$ Zellen in 1mL Heparinlösung (10U Heparin in PBS) aufgenommen und zur Weiterverwendung nach Frankfurt gefahren. Dort wurden den bestrahlten (1,0Gy) NOD/SCID-Mäusen jeweils $2,0E+04$ Zellen in 250 μ l Heparinlösung in die Schwanzvene injiziert. Zusätzlich und um das *engraftment* zu optimieren, wurden Rattenfibroblasten, die IL-3 produzieren, verabreicht ($5,0E+06$ Zellen/Maus). Insgesamt wurden vier Tiere mit den Zellen behandelt. Die zusätzlichen Zellen dienten als Puffervolumen in der Spritze.

Nach 168 Stunden Kulturdauer wurden die expandierten Zellen von den einzelnen MMRs bzw. aus den wells abgeerntet und für jeden Ansatz vereinigt. Die Zellen wurden gezählt und jeweils in 1mL Heparinlösung aufgenommen, sodass die Gesamtzellmenge auf theoretisch fünf Mäuse verteilt werden konnte (praktisch wurden pro Ansatz nur je vier Mäuse eingesetzt). Die Tiere erhielten ebenfalls ein Co-Transplantat mit Rattenfibroblasten.

An Tag 0 und nach 168 Stunden wurde zusätzlich jeweils einer Kontrollmaus die Heparinlösung ohne Zellen injiziert (Negativkontrolle). Ausserdem wurden von den Tag 0 Zellen und den kultivierten Zellen der drei Ansätze jeweils eine FACS-Färbung durchgeführt und MC- und CAFC-Assays angelegt.

Nach einer Inkubationszeit von sechs Wochen, beginnend am Tag der Injektion, wurden die Mäuse zur Analyse getötet. Aus Frankfurt geliefert wurden peripheres Blut, suspendierte Knochenmarkzellen und die Milz der Tiere. Die Milz wurde in kleine Petrischalen überführt, mit 1mL PBS überschichtet und mit der Rückseite eines Spritzenkolbens zerkleinert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde durch einen Gazefilter geschickt, um verbliebenes Stützgewebe zu entfernen. Von den drei Zellproben, Blut, Knochenmark und Milz, wurden jeweils 200-300 μ L Suspension in ein FACS-Röhrchen überführt und mit je 10 μ L des entsprechenden Antikörpers versetzt.

Färbungen:

- CD45 FITC / CD34 PE
- CD34 FITC / CXCR4 PE
- CD4 FITC / CD19 PE

- **Negativkontrolle**

Nach einer Inkubation von 30 Minuten im Dunkeln wurden jeweils 100µl OptiLyse B Lösung (Fa. Beckman Coulter, Krefeld) zur Lyse der Erythrocyten zugegeben und die Proben für weitere zehn Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben mit 1mL Aqua bidest. aufgefüllt, kurz geschüttelt und erneut für zehn Minuten inkubiert. Vor ihrer durchflusszytometrischen Charakterisierung wurden die Proben zur Entfernung von Gewebetrümmern filtriert.

V. STATISTISCHE UNTERSUCHUNGEN

Das übergeordnete Ziel der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten innovativen Kultivierungsstrategien war die Vermehrung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen. Ausgangsmaterial für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche sind Zellen gewesen, die aus der Nabelschnurblutvene Neugeborener entnommen wurden. Es ist wichtig, an dieser Stelle zu bemerken, dass es sich bei den entnommenen Zellen um Primärmaterial handelt. Ebenso, wie sich die Neugeborenen zu eigenen Persönlichkeiten mit charakteristischen Merkmalen entwickeln, so unterscheiden sich auch die verschiedenen Stammzellproben in ihren biologischen Eigenschaften voneinander. Die zelluläre Zusammensetzung der Proben unterliegt natürlichen Schwankungen und hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Die Qualität der Stammzellprobe ist zusätzlich auch äußeren Einflüssen ausgesetzt, denn der Zeitpunkt der Entnahme nach der Entbindung, die Lager-temperatur und Dauer bis zur Aufarbeitung waren aus praktischen und logistischen Gründen nicht konstant.

Es soll deutlich werden, dass es sich bei dem in dieser Arbeit auftretenden Hauptdarsteller nicht um eine gleichgeschaltete Zelllinie handelt. Vielmehr mussten die Kulturbedingungen für hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen optimiert werden, die sich, trotz gleich bleibender Kulturbedingungen, in ihrem proliferativen Verhalten unterscheiden (vergleiche Abbildung V-1). Mögliche Ursache dafür ist die uneinheitliche zelluläre Zusammensetzung der Blutprobe. Im Kulturmedium liegen lediglich vier verschiedene Cytokine vor, die die Zellen nicht im gleichen Maße zur Teilung anregen, da nicht alle Zellen gleichförmig auf die angebotenen Faktoren ansprechen.

Um einen etwas konkreteren Eindruck von der Qualität der ursprünglichen und expandierten Zellen zu erhalten, wurde ebenfalls die Frequenz der Vorläufer (CFC) und frühen Vorläufer (CAFC) bestimmt. Es handelt sich dabei um den prozentualen Anteil der Zellen einer Probe, die mittels CFC- bzw. CAFC-Assay detektiert werden können. Je größer der Anteil dieser Zellen, insbesondere der CAFC, an der Gesamtzellmenge, desto besser ist die Qualität der Probe. Denn CFC und CAFC sind noch wenig ausgereifte Zellen (vergleiche Abbildung I-2), die zur Wiederherstellung eines geschädigten blutbildenden Systems erheblich beitragen können. Da die Proliferation der Zellen zwangsläufig mit ihrer Reifung einhergeht, ist es besonders wichtig, den Gehalt an Zellen zu messen, die noch nicht gänzlich ausgereift sind. Denn reife, funktionale Blutzellen haben nur eine relativ kurze Lebensdauer und sind nicht in der Lage, einen neuen Organismus längerfristig zu repopulieren.

Die Expansionsfaktoren der CFC und CAFC setzen sich zusammen aus ihrem prozentualen Anteil in der Population vor bzw. nach der Expansion, und aus dem Gesamtexpansionsfaktor der Kultur. Denn man muss bedenken, dass sich der Anteil der Vorläufer und frühen Vorläufer im Verlauf der Kultur verändert, man demnach nicht automatisch den Gesamtexpansionsfaktor zugrunde legen darf, sondern auch den tatsächlich verbliebenen Anteil der CFC und CAFC nach der Expansion bestimmen muss.

V.1. VOLUMEN UND REINHEIT DER AUFGEARBEITETEN BLUTPROBEN

Um einen anschaulichen Eindruck von der Varianz der aufgearbeiteten Blutproben zu vermitteln, zeigt Tabelle V-1 Mittelwerte des gewonnenen Blutvolumens, der Zellausbeute und Reinheit der Proben. Dargestellt sind die gemittelten Werte von 93 Blutproben, die im Zeitraum dieser Arbeit aufgearbeitet wurden. Es konnte ein mittleres Blutvolumen von 31mL aus der Nabelschnur-Vene entnommen werden. Im Mittel erhält man $7,5E+05$ CD34⁺ Zellen (entsprechend $2,4E+04$ CD34⁺ Zellen/mL Blut). In diesem Fall ist die Schwankungsbreite besonders eindrucksvoll. Dies liegt nicht in den unterschiedlichen Volumina der Proben begründet, sondern in einer gelegentlichen, sehr reichhaltigen Probe, die den mittleren Gehalt an CD34⁺-Zellen besonders deutlich übertrifft. Die Reinheit lag bei etwa 88%, wobei die Qualität der Aufarbeitung im Verlauf der Zeit gesteigert werden konnte und die Reinheit mittlerweile stets bei über 90% liegt.

Tabelle V-1: Statistik der Blutaufreinigung

Parameter	Werte
Blutvolumen (mL)	31 ($\pm 9,8$)
CD34 ⁺ -Zellen je Probe	$7,5E+05c$ (min. $1,4E+05c$; max. $1,9E+06c$)
Reinheit der aufgearbeiteten Zellen (%)	88 (± 15)

V.2. DIE STANDARD-SUSPENSIONSKULTUR

Es ist von Vorteil, vergleichend eine standardisierte Kultur zu betrachten, um beurteilen zu können, ob und inwieweit eine neu entwickelte Kultivierungsstrategie tatsächlich einen positiven Effekt auf die Expansion und Qualität der eingesetzten Zellen hat. Zu diesem Zweck wurde parallel zum entwickelten Ansatz, sei es das Stroma konditionierte Medium oder die Membran-separierte Co-Kultur, eine Referenz in Form einer einfach aufge-

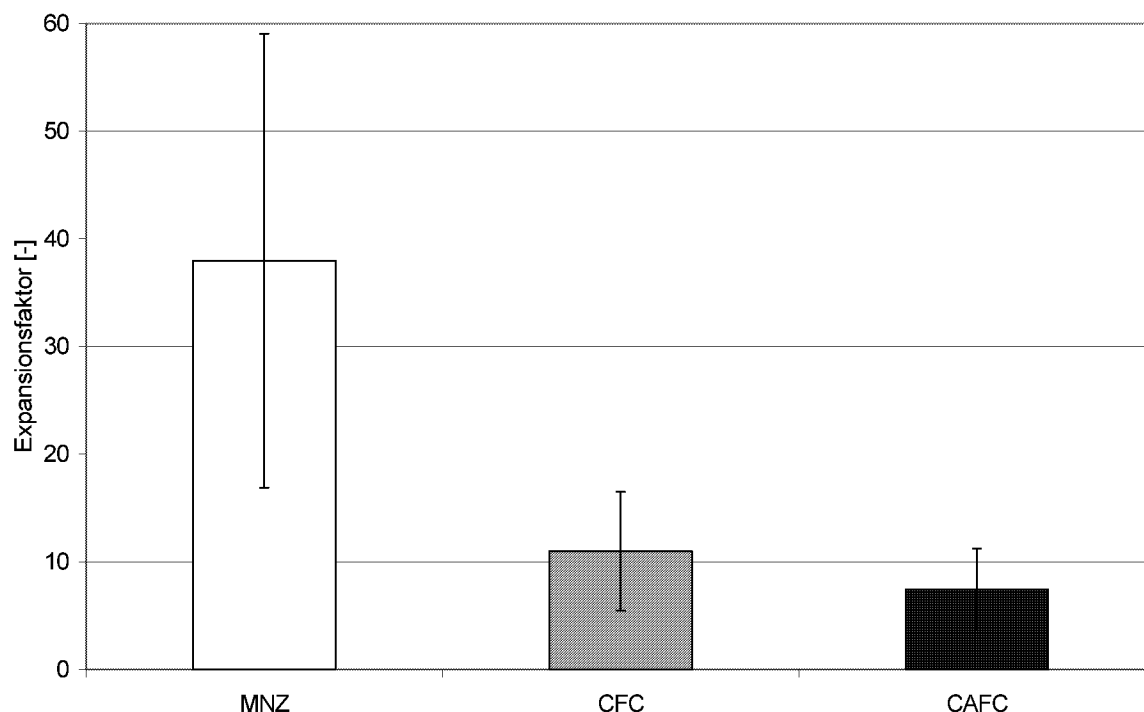


Abbildung V-1: Mittlere Expansionsfaktoren der mononukleären Zellen (MNZ), Koloniebildenden Zellen (CFC), sowie der frühen Vorläuferzellen (CAFC) in Referenz-Suspensionskulturen

bauten Suspensionskultur angelegt (siehe Material/Methoden). Es sind stets Zellen derselben Probe verwendet worden, die auch zur Kultivierung im neuen System zum Einsatz kam.

Die Kulturbedingungen der Suspension waren konstant: serumfreies X-Vivo 10 Medium wurde mit vier Cytokinen (TPO, SCF, IL-3 und FL) versetzt. Das Kulturvolumen betrug 1mL, die Zellkonzentration war $5,0E+03$ CD34-positive Zellen pro Milliliter (falls nicht anders angegeben). Die Versuche wurden stets in Triplikaten durchgeführt.

Wenn möglich, werden zu jedem der im Folgenden dargestellten Versuche die absoluten Expansionsfaktoren der jeweiligen Referenzkultur angegeben. Die Ergebnisse der Referenzkultur werden in Form einer Tabelle dem entsprechenden Experiment vorangestellt und nicht weiter kommentiert. Sie dienen dazu, sich einen Eindruck von den effektiven Expansionen zu machen. Denn die Expansionsdaten der betrachteten Zellpopulationen, MNZ, CFC und CAFC, der entsprechenden Experimente sind zur besseren Vergleichbarkeit zumeist als „relativ zur Suspensionskultur“ angegeben. Dadurch sollten die natürlichen Schwankungen der Expansionsraten (s. u.) relativiert werden. Denn das Verhältnis der Expansionen in der Neuentwicklung im Vergleich zur Suspensionskultur sollte, eine

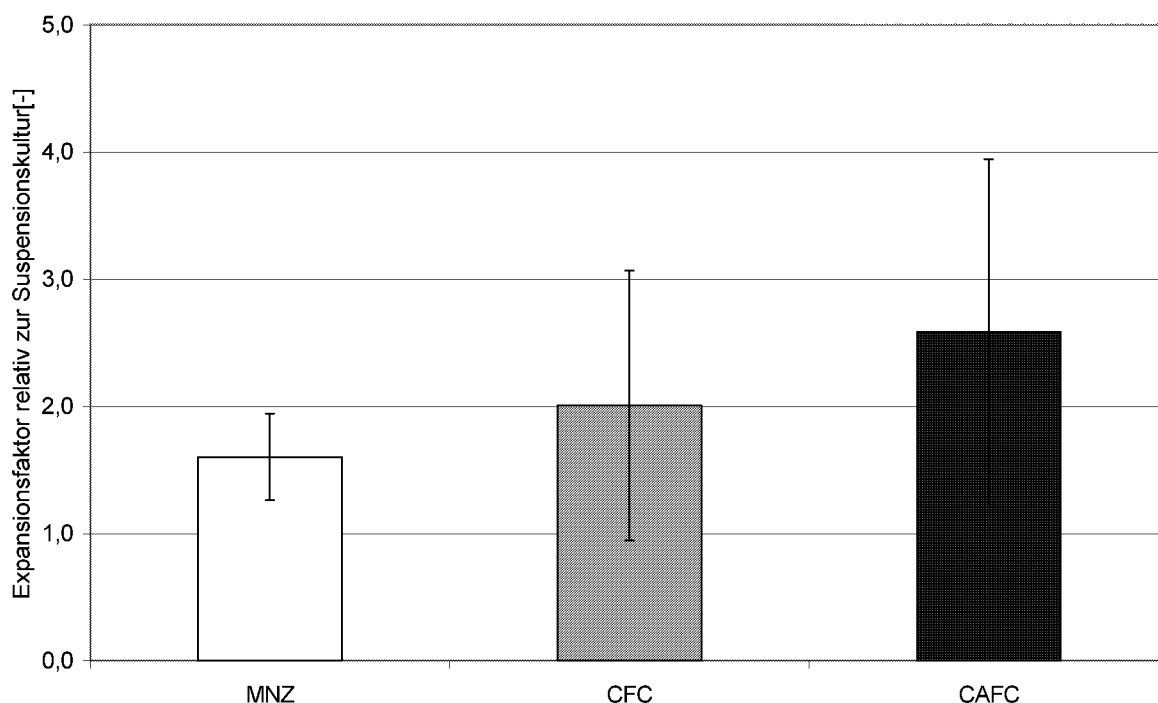


Abbildung V-2: Maximale Expansionsfaktoren unterschiedlicher Zellpopulationen, relativ zur Suspensionskultur

gewisse experimentelle Güte vorausgesetzt, annähernd konstant bleiben.

Betrachtet man jetzt die Expansionen der verschiedenen zellulären Subtypen in diesen Referenz-Suspensionskulturen (hier die Mittelwerte aus 24 unabhängigen Versuchen), so fällt die Varianz zwischen den eingesetzten Zellproben noch stärker ins Gewicht. Ausgehend von einer Inokulumsdichte von $5,0E+03c/mL$, konnte die Zellzahl in einer Standard-Suspensionskultur im Mittel um Faktor 38 (± 21) vermehrt werden. Die CFC-Menge wurde um Faktor 11 ($\pm 5,5$), die Anzahl der CAFC um Faktor 7,4 ($\pm 2,6$) gesteigert.

V.3. MAXIMALE RELATIVE EXPANSIONEN

Einen kurzen Vorabeindruck über die Qualität der entwickelten Kultivierungssysteme liefert Abbildung V-2. Dargestellt sind hier die maximal erreichten Expansionsfaktoren, relativ zur Standard-Suspensionskultur. Es wurden sowohl Daten der SCM-Kulturen als auch der Kulturen im MMR-System herangezogen und gemittelt. Denn in beiden Fällen wurden die Zellen in den neuen Systemen jeweils gleichzeitig zu der oben dargestellten Referenzkultur kultiviert. Eine spezifische und detaillierte Betrachtung der einzelnen Systeme und ihrer *Performance* folgt in den entsprechenden Kapiteln.

Erfreulich ist, dass insbesondere die frühen Vorläuferzellen (CAFC) im Vergleich zur reinen Suspensionskultur durch die innovativen Kulturstrategien noch weiter vermehrt werden konnten (Faktor $2,6 \pm 1,4$). Auch die Menge der Kolonie-bildenden Zellen wurde deutlich, um 100%, gesteigert. Mononukleäre Zellen vermehrten sich um über 50% gegenüber der Referenzkultur.

Diese knappe Zusammenfassung der Daten lässt darauf schließen, dass die etablierten Neuentwicklungen der Standard-Suspensionskultur klar überlegen sind. Mögliche Gründe dafür und die Besonderheiten der alternativen Kultursysteme sollen im Folgenden genauer betrachtet werden.

VI. KONTITIONIERTE MEDIEN

VI.1. VORBEMERKUNG

Bevor die Ergebnisse dieser Arbeit im einzelnen vorgestellt und diskutiert werden, soll kritisch und etwas provozierend bemerkt werden, dass hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen, einmal aus ihrer natürlichen Umgebung isoliert und *ex vivo* expandiert, quasi automatisch ihr hämatopoietisches Potential verlieren. Dafür gibt es drei Gründe [137]:

1. Die Zellen werden unter Kulturbedingungen dazu angeregt, in den aktiven Zellzyklus einzutreten. Normalerweise verharren die meisten HSPC in der G₀-Phase des Zyklus, um so vor Schädigungen der DNA geschützt zu sein. Geöffnete, nicht kondensierte Stränge der DNA sind während der Replikation besonders gefährdet. Die Aktivierung des Zellzyklus hat zur Folge, dass die Zellen ihren Stammzellcharakter verlieren und sogar apoptotisch werden. Die Proliferation der primitiven HSPC läuft dem Erhalt ihrer Stammzellfunktionen entgegen.
2. Die adhäsiven Eigenschaften der Zellen und damit ihre Fähigkeit, sich gezielt im Knochenmark anzusiedeln, werden in *ex vivo* Kulturen verändert. Dabei unterscheidet sich nicht nur das Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen, sondern auch deren Funktion. Interessanterweise konnten die Expression von Adhäsionsmolekülen und der Zellzyklusstatus der entsprechenden Zellen korreliert werden. Eine Theorie besagt, dass die Adhäsion der HSPC an bestimmte Elemente ihres Mikromilieus im Knochenmark verantwortlich ist für den Arrest der Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus.
3. Die den Kulturen zugesetzten Cytokine und Wachstumsfaktoren entsprechen in ihrer Zusammensetzung, Konzentration und Identität nicht den natürlichen Bedingungen.

Trotz dieser Einschränkungen und bekannten Limitierungen wurde der Versuch unternommen, auf verschiedene Art und Weise dem natürlichen Prozess der Hämatopoiese ein Stück näher zu kommen, um sie *ex vivo* nachzubilden.

Wie bereits eingangs in Kapitel III erläutert, stellt die Verwendung von Stroma konditioniertem Medium (SCM) zur Kultivierung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen eine geeignete Alternative zur rein Cytokin-supplementierten Suspensionskultur dar.

Die Regulation der Hämatopoiese erfolgt unter anderem mittels löslicher Faktoren (Cytokine, Wachstumsfaktoren etc.), die von den stromalen Zellen des Knochenmarks entsprechend den gerade vorherrschenden physiologischen Bedingungen produziert und sekretiert werden. Die Synthese dieser Substanzen unterliegt einer dynamischen Kontrolle, um zu gewährleisten, dass, natürlich immer im Zusammenspiel mit anderen Regulationsmechanismen, die Hämatopoiese optimal ablaufen kann.

Macht man sich diesen natürlichen Vorgang durch die Verwendung von Stroma konditioniertem Medium zunutze, so ist man im Sinne der Kultivierungsstrategie der Natur schon entscheidend näher gekommen, verglichen mit einer Suspensionskultur, die lediglich einige ausgewählte Cytokine bestimmter Konzentration enthält. Allerdings existieren noch gravierende Unterschiede zur natürlichen Mikroumgebung der hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen.

Betrachtet man beispielhaft den menschlichen Organismus als im Sinne der Biologie idealen Bioreaktor mit optimalen Voraussetzungen zur Produktion von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen, ergeben sich etliche Unterschiede zur Suspensionskultur mit Stroma konditioniertem Medium:

Technisch betrachtet...

- ...ist im Knochenmark eine ideale Versorgung der Zellen gewährleistet. Durch den permanenten Blutstrom werden Sauerstoff und Nährsubstrate zur Verfügung gestellt, gleichzeitig werden schädliche Stoffwechselendprodukte abtransportiert. Dies kann in einer statischen, ungefütterten Suspensionskultur nicht erreicht werden. Vielmehr besteht die Gefahr, dass Substrate limitierend sind und der Sauerstoffgehalt nicht den Erfordernissen entspricht. Laktat und andere Stoffwechselprodukte können wachstumshemmende Konzentrationen erreichen.

Man kann auch davon ausgehen, dass die Körpertemperatur an den natürlichen Orten der Hämatopoiese durch die räumliche Nähe zu großen Muskeln etwas erhöht ist und nicht konstant bei 37°C liegt.

- ...ist Polystyrol nicht die natürliche Wachstumsgrundlage der HSPC. Ein gewisser Materialeinfluss kann daher nicht ausgeschlossen werden.

- ...ist die Geometrie einer 12-Loch Gewebekulturplatte im Bezug auf die Zellmenge, das umgebende Volumen und die zur Verfügung stehende Fläche dem Knochenmark nicht vergleichbar. Aspekte einer 3D-Kultur kommen nicht zum Tragen.

Die biologischen Unterschiede wiegen besonders schwer:

- Den HSPC stehen nur lösliche Faktoren als Regulatoren zur Verfügung. Komponenten der Extrazellulärmatrix und zelluläre Rezeptoren spielen keine Rolle. Zudem ist die Kommunikation unidirektional, es besteht nicht die Möglichkeit einer wechselseitigen Beeinflussung stromaler und hämatopoietischer Zellen.
- HSPC können sich nicht in distinkten Nischen ansiedeln. Vielmehr herrscht die eingestellte Kulturbedingung für alle Zellen des inokulierten Zellgemisches gleichermaßen.
- Das natürliche Knochenmark-Stroma setzt sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen zusammen. Die zur Herstellung des Stroma konditionierten Mediums eingesetzten Zellen hingegen sind ausschließlich Fibroblasten, der Einfluss der übrigen Zellen wird vernachlässigt. Hinzu kommt, dass es sich bei den Fibroblasten um eine entartete Zelllinie handelt, die nicht mehr den natürlichen Mechanismen der Apoptose unterliegt. Der Ursprungsorganismus ist die Maus, nicht der Mensch.
- Der in der Zellkultur verwendete Blutersatz, das Medium X-Vivo 10, enthält kaum Proteinbestandteile, nur Albumin, Insulin, Transferrin, jedoch keine Serumproteine. Die Zusammensetzung ist dadurch wesentlich weniger komplex als die des Blutes.

Man muss sich dieser bedeutenden Unterschiede zwischen Natur und Laborkultur bewusst sein. Um sich dennoch diesen einen Aspekt der Regulation, die Vielfalt der stromalen Faktoren, zunutze zu machen, wurde Stroma konditioniertes Medium zur Kultivierung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen eingesetzt.

Stromale Zellen (= Fibroblastenzellen) sezernieren eine Vielzahl von Cytokinen und anderen Wachstumsfaktoren in das sie umgebende Kulturmedium. Die Zusammensetzung und jeweilige Konzentration der gelösten Substanzen ist nicht genau bekannt. Ihre Identität und biologische Funktion wurde vielfach untersucht [138-145].

Veränderte Kulturbedingungen können einen deutlichen Effekt auf die Produktion bzw. Sekretion der Faktoren haben und folglich die Qualität der später in SCM kultivierten hä-

matopoietischen Zellen beeinflussen. Um möglichst ideale Bedingungen zur Herstellung und Lagerung des konditionierten Mediums zu schaffen, wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt, welche die grundsätzliche Eignung der zur Verfügung stehenden stromalen Zelllinien zur Produktion von SCM feststellen sollten.

VI.1.1. Die grundsätzliche Eignung der stromalen Zellen zur Herstellung von SCM

Wachstumsverhalten stromaler Zellen in serumhaltiger und serumfreier Kultur

Um einen möglichst unverfälschten Eindruck von der Wirkung der sekretierten stromalen Faktoren auf das Verhalten der hämatopoietischen Zellen zu bekommen, wurde zur Herstellung des konditionierten Mediums das serumfreie X-Vivo 10 eingesetzt. Auf den Zusatz von Serum wurde bewusst verzichtet, da dessen Zusammensetzung, gerade im Hinblick auf Wachstumsfaktoren, stark schwanken kann bzw. die Anzahl der enthaltenen Faktoren zu groß ist, um den Einfluss stromaler sekretierter Faktoren ermitteln zu können. Der Gesamtproteingehalt in FCS schwankt um einen Wert von 3,2-7,0g/mL. Im Serum enthaltene Proteasen könnten zudem positiv wirkende Faktoren abbauen, und einzelne Zelltypen könnten selektiv durch Inhibitoren oder Aktivatoren beeinflusst werden. Da die Stammhaltung des Stromas in serumhaltigem Medium erfolgte, wurde zunächst untersucht, ob und inwieweit sich das Wachstum bzw. der Medienverbrauch der Zellen nach der Überführung in das proteinfreie X-Vivo 10 Medium verändert. Morphologisch konnte kein bedeutender Unterschied zwischen den Kulturen festgestellt werden. Die Abbildungen VI-1 und VI-2 zeigen charakteristische Wachstumskurven der Zelllinien SI/SI, M2-10B4 mod. und MS-5 in serumhaltigem bzw. -freiem Medium.

Es ist nicht bekannt, ob die Produktion der HSPC-förderlichen Faktoren durch Zelllinien an deren Wachstumsverhalten gekoppelt ist. In der Natur werden die Verhältnisse andere sein, da im Knochenmark keine permanente Zelllinien, sondern primäres Stroma vorkommt.

Ein Blick auf die Wachstumskurven der drei untersuchten stromalen Zelllinien, SI/SI, M2-10B4 mod. und MS-5 macht klare Unterschiede deutlich. In serumhaltigem Medium werden von allen drei Zelllinien deutlich größerer Zellzahlen erreicht. Besonders die M2-10B4 mod. scheint in serumfreier Kultur ihr Wachstumspotential nicht ausspielen zu können. Ähnlich ist hingegen in beiden Medien das erheblich langsamere Wachstum der MS-5 im Vergleich zu den übrigen Zelllinien.

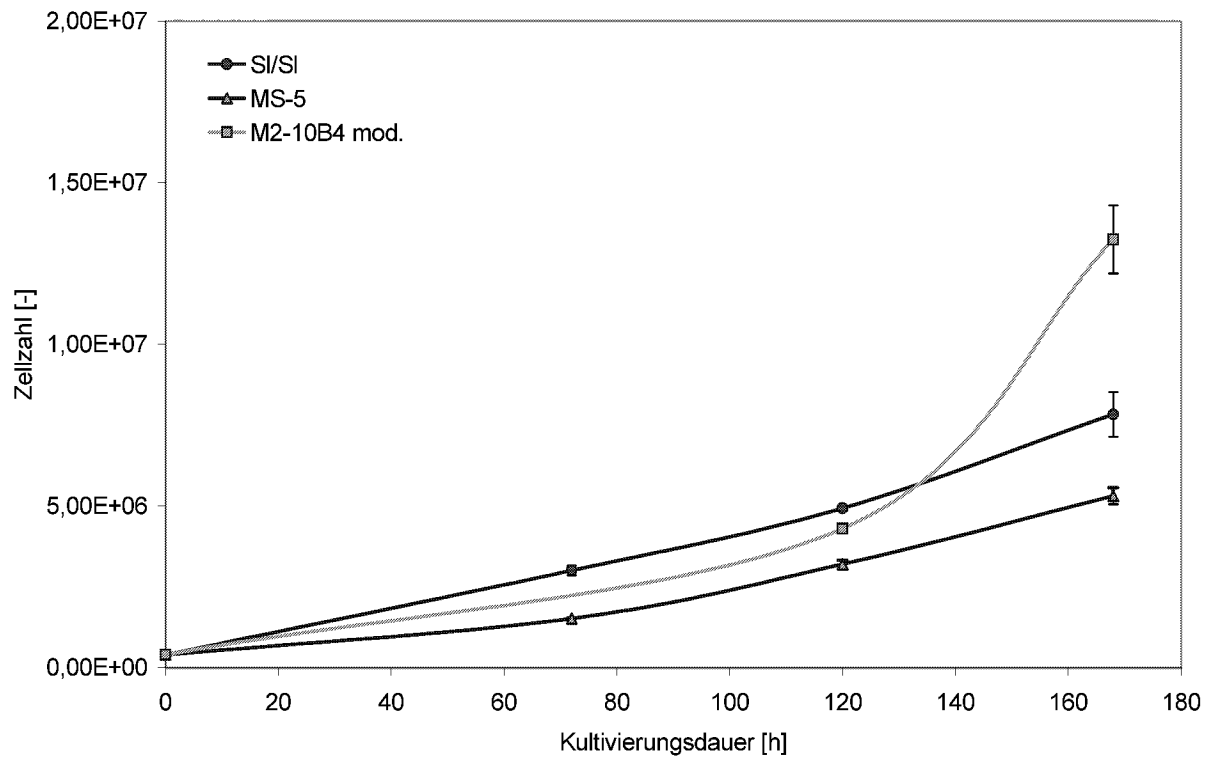


Abbildung VI-1: Wachstumskurven stromaler Zelllinien in IMDM/10%FCS

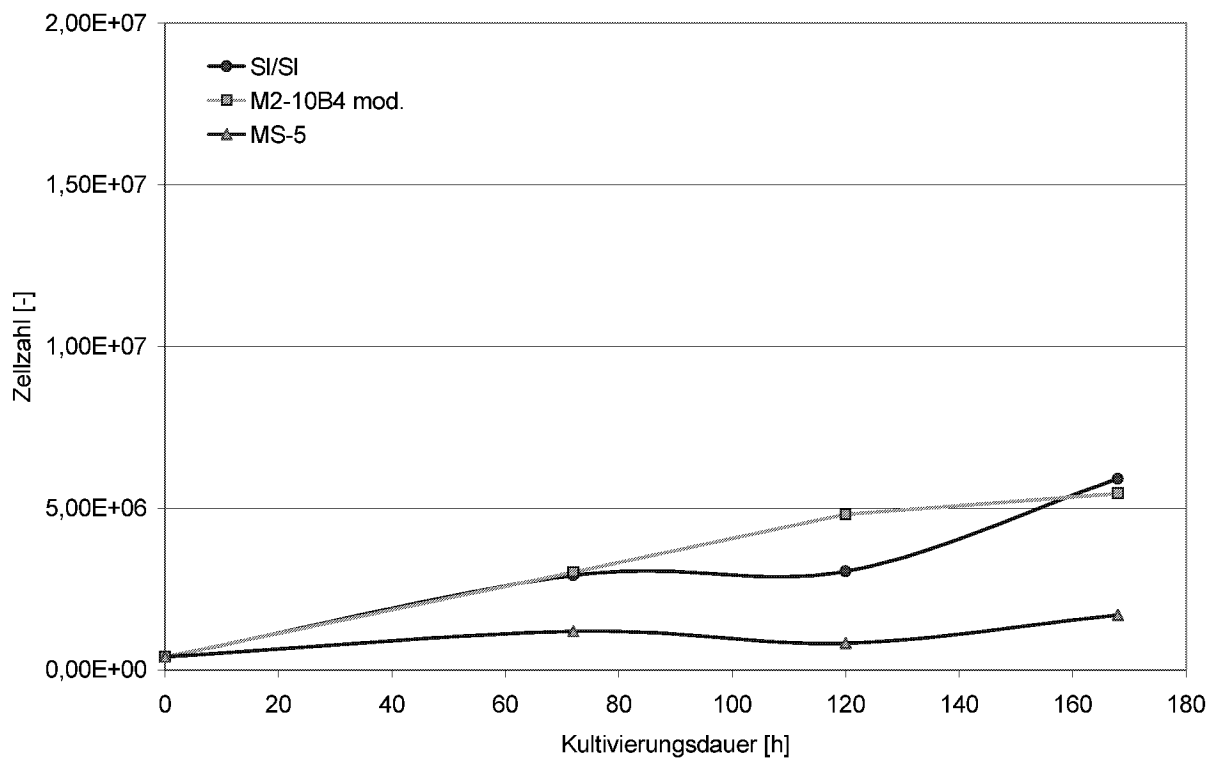


Abbildung VI-2: Wachstumskurven stromaler Zelllinien in X-Vivo 10

Es ist auszuschließen, dass der Effekt der Serumdepletion auf ein ineffizienteres Anheften der Zellen auf dem Boden der Gewebekulturflasche zurückzuführen ist, denn Adhäsionsfrequenz und –kinetik sind in beiden Medien vergleichbar. Zur Zellzahlbestimmung wurden ausschließlich die adhärenenten, vitalen Zellen berücksichtigt.

Die Tabellen VI-1 und VI-2 fassen exemplarisch die nach 168h in beiden betrachteten Medien erreichten Zellzahlen sowie die Konzentrationen von Glukose und Laktat am Ende der Kultur zusammen. Ausgangswerte sind jeweils 25mmol/L Glukose und 0mmol/L Laktat.

Tabelle VI-1: Zellzahl und Medienkomponenten in IMDM/10%FCS nach 168h

Parameter	M2-10B4 mod.	SI/SI	MS-5
Zellzahl	1,3E+07	7,8E+06	5,3E+06
Glukose-Konzentration [mmol/L]	0,069	0,043	0,0154
Laktat-Konzentration [mmol/L]	25	29	7,2

Tabelle VI-2: Zellzahl und Medienkomponenten in X-Vivo 10 nach 168h

Parameter	M2-10B4 mod.	SI/SI	MS-5
Zellzahl	5,5E+06	5,9E+06	1,7E+06
Glukose-Konzentration [mmol/L]	9,4	15	16
Laktat-Konzentration [mmol/L]	18	11	1,0

Der Serumangel hat besonders deutliche Auswirkungen auf die MS-5 Zellen, deren Zellzahl in X-Vivo 10 nur ca. 30% ihres Wertes in serumhaltigem Medium beträgt. M2-10B4 mod. und SI/SI erreichen noch jeweils ca. 40% bzw. 75%. Es kann also festgehalten werden, dass sich zum einen das Wachstumsverhalten der stromalen Zellen in serumhaltigem und serumfreiem Medium unterscheidet. Bemerkenswert und für die Analyse der SCM-Qualität von Bedeutung ist jedoch insbesondere der Unterschied der Zelllinien untereinander im bezug auf ihre Wachstum und den Substratverbrauch. Es wäre nicht wünschenswert, dass qualitative Unterschiede der SCM lediglich auf diese Aspekte zurückzuführen sind. Vielmehr sollen stromale sekretierte Faktoren ausschlaggebend sein für die Überlegenheit der einen oder der anderen Zelllinie.

Für die folgende Betrachtung der Qualität der SCM ist insbesondere die Restkonzentration an Glukose, aber auch die akkumulierte Menge Laktat von Interesse. Glukose stellt neben Glutamin die wichtigste C-Quelle für eine anschließende Kultivierung der hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen dar. Also muss eine gewisse Mindestmenge zur Verfügung stehen, denn ansonsten könnten mögliche positive Effekte der stromalen Faktoren durch einen gravierenden Nährstoffmangel der Zellen überlagert werden. Auch die Konzentration des Stoffwechselendproduktes Laktat sollte einen bestimmten Wert nicht überschreiten, da der pH-Wert zu stark in den sauren Bereich verschoben und somit wenig optimale Bedingungen für die HSPC vorherrschen würden. In Versuchen unter isosmotischen Bedingungen konnte kein schädlicher Einfluss eine Laktat-Konzentration von bis zu 15mmol/L festgestellt werden. Ab 20mmol/L wirkte das zugesetzte Laktat wachstumshemmend auf mononukleäre Zellen (nicht gezeigt).

Die in Tabelle VI-1 angegebenen Werte für Glukose und Laktat, so, wie sie am Ende der Kultur nach 168h vorlagen, haben kritische Werte erreicht. Glukose ist fast völlig verbraucht, und die Laktatkonzentration wirkt im Fall der SI/SI und M2-10B4 bereits inhibierend. Wurden die Zellen in X-Vivo 10 kultiviert (Tabelle VI-2), ist die Glukosekonzentration des M2-10B4 mod. Ansatzes sehr niedrig, die Laktatmenge recht hoch. Insgesamt ist die Glukosekonzentration der Ansätze hier höher, die des Laktat niedriger, vergleich mit der serumhaltigen Kultur. Dennoch unterscheiden sich die Daten deutlich von den Ausgangswerten.

Es wird deutlich, wie stark der Einfluss des Mediums auf das Wachstumsverhalten und den Nährstoffbedarf der Zellen ausgeprägt sein kann. Die Anheftungseffizienz der stromalen Zellen war gleich gut. Um mit Sicherheit die Möglichkeit ausschließen zu können, dass sich der Serummangel während der Anheftungsphase nicht negativ auf das anschließend gewonnene SCM auswirkt, wurden die stromalen Zellen ebenfalls versuchsweise in serumhaltigem Medium adhärirt. Vor Beginn der Konditionierung wurden die anhaftenden Zellen gründlich mit PBS gespült und anschließend für den gewünschten Zeitraum in X-Vivo 10 kultiviert. Es konnte kein Unterschied der SCM-Qualität im Vergleich zur herkömmlichen Strategie festgestellt werden.

Trotz der Überlegenheit des serumhaltigen Mediums im bezug auf das Wachstum der Zellen wurden die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen in serumfreiem X-Vivo 10 durchgeführt.

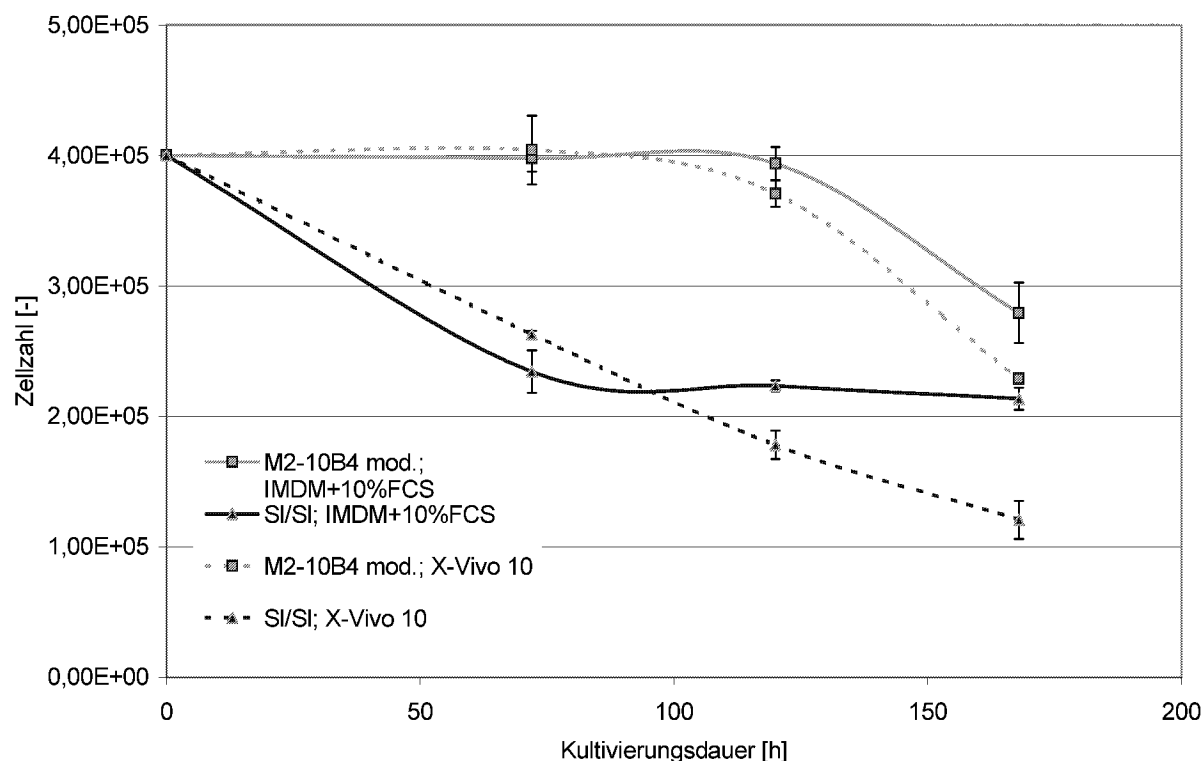


Abbildung VI-3: Wachstumsentwicklung der bestrahlten stromalen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI in serumfreiem (gestrichelte Linie) und serumhaltigem (durchgezogene Linie) Medium

Wachstumsverhalten bestrahlter vs. unbestrahlter stromaler Zellen

Um den Einfluss des Medienverbrauchs durch stromale Zellen zu mindern, lag es nahe, bestrahlte Zellen zur Produktion des konditionierten Mediums zu verwenden.

Durch die Bestrahlung der Zellen findet kaum noch aktives Zellwachstum statt (max. eine weitere Zellteilung), und der Medienverbrauch wird deutlich verringert. Damit verbunden ist allerdings auch eine verminderte Lebensfähigkeit der Zellen. Abbildung VI-3 zeigt, dass sich die bestrahlten Zellen der Linien M2-10B4 mod. und SI/SI sowohl in serumhaltigem als auch in serumfreiem Medium jeweils ähnlich verhalten. Die Zellzahl der M2-10B4 mod. blieb nach Bestrahlung bis zu 125h quasi konstant, bis sich nach 168h die Anzahl der adhären, und damit vitalen Zellen auf 60-70% des Ausgangswertes verringerte. Die Zellpopulation der SI/SI hatte sich nach 125h bereits um 35-40% vermindert. Dieser Trend setzte sich weiter fort. Nach 168h konnten im Vergleich nur noch 50% der in serumhaltigem Medium inokulierten Zellen detektiert werden. In serumfreiem Medium verringerte sich die Zellzahl auf verbleibende 30% des Ausgangswertes.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bestrahlung einen deutlich negativen Einfluss auf die Adhärenz bzw. Vitalität der Zellen hat. Dieser Effekt ist Serum-unabhängig. Ein großer Teil der Zellen stirbt im Verlauf der Kultur ab und löst sich von der Oberfläche des Kulturgefäßes. Abgestorbene Zellen und Zelltrümmer bleiben in Suspension im Kulturmedium zurück. Da das konditionierte Medium vor der Verwendung lediglich zentrifugiert, nicht aber filtriert wurde, ist nicht auszuschließen, dass Membranbruchstücke bzw. daran haftende Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren in geringem Umfang zur Wirkung des Mediums auf hämatopoietische Zellen beigetragen haben.

Die Tabelle VI-3 fasst nochmals die Zellzahlen und Konzentrationen von Glukose bzw. Laktat, so, wie sie am Ende der Kultur nach 168h vorlagen, zusammen.

Tabelle VI-3: Zellzahlen und Medienkomponenten nach Kultivierung von bestrahlten vs. unbestrahlten stromalen Zellen in X-Vivo 10 nach 168h

	Zellzahl		Glukose [mmol/L]		Laktat [mmol/L]	
	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt
M2-10B4 mod.	2,3E+05	5,5E+06	18	9,4	9,0	18
SI/SI	1,2E+05	5,9E+06	20	15	7,8	11
MS-5	6,2E+05	1,7E+06	19	16	4,6	1,0

Die Tabellenwerte machen deutlich, dass mithilfe der Bestrahlung das Wachstum der Zellen und daraus resultierend der Medienverbrauch wesentlich reduziert werden kann. Die verbliebene Glukosekonzentration ist im Fall der bestrahlten Zellen noch sehr hoch, und die Laktatmengen liegen mit ca. 5-9mmol/L in einem unkritischen Bereich. Auffällig ist, dass die Laktatkonzentration im MS-5 Ansatz höher liegt, wenn die Zellen bestrahlt sind und damit die Zellzahl reduziert ist.

Zusammenfassend ergibt sich aus den vorgestellten Daten, dass hinsichtlich der Vitalität und Adhärenz der stromalen Zellen eine Kultivierung in serumfreiem Medium unproblematisch ist. Werden die Zellen zusätzlich bestrahlt, kann der Substratverbrauch der Zellen und dadurch die Akkumulation von Stoffwechselendprodukten wesentlich reduziert werden. Der Einfluss der Bestrahlung auf die Qualität des hergestellten SCM im Bezug auf die Kultur von HSPC wird später diskutiert.

Lagerung des Stroma konditionierten Mediums

Ein weiterer Aspekt, der die Qualität des Stroma konditionierten Mediums verändern könnte, ist seine Lagerung. Im Rahmen der Versuchsplanung ist es oftmals wünschenswert, verschiedene konditionierte Medien miteinander zu vergleichen und sie dementsprechend im selben Versuchsansatz einzusetzen. Es wurde also untersucht, ob die Lagerung des Ausgangsmediums bei -20°C im Vergleich zur unmittelbaren Verwendung nach der Herstellung einen Einfluss auf das Wachstum und die Qualität der darin kultivierten hämatopoietischen Zellen hat. Es zeigte sich, dass die Expansion der HSPC um ca. 10% niedriger lag, wenn das Medium zuvor bei -20°C aufbewahrt wurde. Da diese Qualitätseinbuße nicht allzu dramatisch ist und zudem für alle untersuchten SCM eines Versuches die gleichen Bedingungen herrschten, wurde zur Entzerrung des Versuchsplanes ein Teil der Medien bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren gelagert.

Ein spezifischer Einfluss des Einfrierens auf einzelne Proteine kann schwerlich bestimmt werden, solange die Identität der Proteine nicht bekannt ist. Um Veränderungen des Proteinmusters zu vermeiden, wurde zur Analyse der SCM-Proben in 1D- und 2D-Elektrophoresegelel stets frisches SCM verwendet (siehe unten).

VI.1.2. Strategien zur Kultivierung von HSPC in SCM

An die oben beschriebenen Vorversuche schließen sich nun Experimente an, die sich, ausgehend von festgelegten Standard-Kulturbedingungen (siehe Kapitel IV.1.5.), jeweils in ein bis zwei Kulturparametern zur Herstellung des konditionierten Mediums unterscheiden. Im Anschluss an die Herstellung wurde die Güte des Mediums im Hinblick auf seine Fähigkeit, die Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen zu unterstützen, untersucht. Beurteilungsgrundlage war die Expansion der kultivierten Zellen bzw. die Resultate der biologischen Assays.

SCM von bestrahlten vs. unbestrahlten Zellen

Wie in den Vorversuchen gezeigt, beeinflusst die Bestrahlung des Stromas dessen Wachstum und Medienverbrauch. Bei den stromalen Zellen handelt es sich um immortalisierte Zelllinien, wohingegen die hämatopoietischen Zellen zunächst durch Zugabe von

Wachstumsfaktoren zur Zellteilung angeregt werden müssen. Ihre Teilungs- und Medienverbrauchsrate liegen deutlich unterhalb der Werte für stromale Zellen. Daher ist es wünschenswert, den Wachstumsvorteil des Stromas und den dadurch bedingten Medienverbrauch durch Bestrahlung zu verringern, ohne die Produktion positiver Faktoren zu beeinträchtigen.

Aus Abbildung VI-4 geht hervor, dass sich die Bestrahlung unterschiedlich und z. T. gegensätzlich auf die Qualität des produzierten SCM auswirkt, abhängig von der jeweils betrachteten Zelllinie. Der Einfluss des SCM der Zelllinie SI/SI auf HSPC hat sich durch die Bestrahlung nicht verändert, die Expansionen der MNZ, CFC und CAFC sind für beide Ansätze quasi identisch. Dagegen wurde die Qualität des SCM von MS-5 durch die Bestrahlung vermindert. Die relativen Expansionen der Vorläufer (CFC) und frühen Vorläufer (CAFC) liegen in CM von unbestrahlten Zellen höher. Am deutlichsten ist der Effekt der Bestrahlung auf die Qualität des SCM von M2-10B4 mod. Hier liegen die relativen Expansionen im unbestrahlten Ansatz nur knapp oberhalb der Referenzkultur, wohingegen die Zellexpansionen, insbesondere die der CAFC, im bestrahlten CM eindeutig darüber liegen.

Tabelle VI-4: Expansionen in der Referenzkultur

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	26 ($\pm 1,7$)
CFC	6,6 ($\pm 2,3$)
CAFC	11

Eine mögliche Ursache für das schlechte Abschneiden des SCM von unbestrahlten M2-10B4 ist die relativ hohe Laktat-Konzentration von ca. 18mM. Laktatmengen in dieser Größenordnung können bereits inhibierend auf das Wachstum der hämatopoietischen Zellen wirken. Zudem ist auch die Glukose-Konzentration mit ca. 9mM deutlich unterhalb des Ausgangswertes von ca. 25mM. Daher wirkt sich eine Wachstumsarretierung bzw. die dadurch verursachte Verminderung der Stoffwechselaktivität der Stromalen Zellen auf die Qualität des SCM besonders förderlich aus. HSPC können die positiven, von den Stromalen Zellen sekretierten Faktoren nutzen, ohne dass das Basismedium schon zu stark verbraucht bzw. reich an Abfallprodukten ist.

Das SCM der unbestrahlten MS-5 enthält lediglich 1,0mM Laktat, beeinflusst aus diesem Grund also die Expansion der HSPC nicht negativ. Auch die Glukose-Konzentration liegt

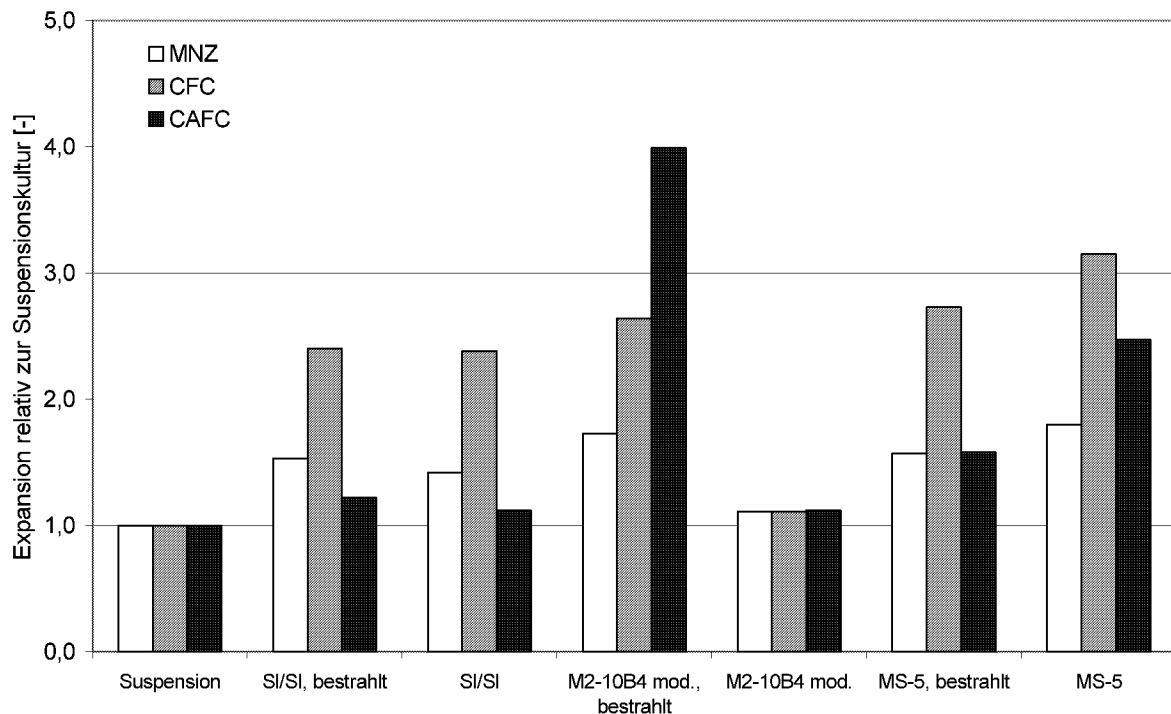


Abbildung VI-4: Expansionsfaktoren verschiedener Subpopulationen in SCM bestrahlter oder unbestrahlter stromaler Zelllinien

mit ca. 16mM noch relativ hoch. Dennoch scheint der Prozess der Bestrahlung einen ungünstigen Einfluss auf die Zellen zu haben, denn trotz erhöhter Stoffwechselaktivität der unbestrahlten Zellen schneidet ihr SCM besser ab.

Alles in allem scheint die Verwendung bestrahlter Zellen zur Herstellung von SCM gegenüber der unbestrahlten Variante vorteilhaft zu sein. Der Medienverbrauch kann minimiert werden, ohne die Produktion positiver Faktoren erheblich zu beeinträchtigen. Auch die Expansionen im SCM der bestrahlten MS-5 liegen noch klar oberhalb der Referenz.

Glukose-Supplementierung

Oben wurde gezeigt, dass das SCM der stromalen Zelllinie M2-10B4 mod. deutlich an Qualität einbüßt, wenn die Zellen zuvor nicht durch Bestrahlung wachstumsarretiert werden. Eine Ursache kann in der geringeren Glukosekonzentration des SCM von unbestrahlten Zellen liegen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde beiden SCM-Ansätzen, also sowohl von bestrahlten als auch von unbestrahlten stromalen Zellen, Glukose bis zum Ausgangswert von 25mmol/L zugesetzt. Anschließend wurde das Verhalten der hämatopoietischen Zellen in diesen Medien untersucht und mit den Ergebnissen der oben gezeigten Ansätze ohne Glukose-Supplementierung verglichen.

Aus Tabelle VI-5 geht hervor, dass durch Glukose-Supplementierung die Differenz der Expansionsfaktoren in SCM aus bestrahlten bzw. unbestrahlten stromalen Zellen vermindert werden kann.

Tabelle VI-5: Expansionen in der Referenzkultur

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	27 ($\pm 2,1$)
CFC	4,8 (± 0)
CAFC	12

Betrachtet man die relativen CAFC-Expansionen der beiden SCM von bestrahlten bzw. unbestrahlten M2-10B4 mod. des zuvor gezeigten Experimentes, so liegt der Expansionsfaktor der Zellen in bestrahltem Medium um Faktor 3,6 deutlich über dem der Zellen aus unbestrahltem Stroma (relative Faktoren 4,0 bzw. 1,1, siehe Abbildung VI-4). Die MNZ liegen um Faktor 1,6 höher, die CFC expandieren in SCM bestrahlter Zellen um Faktor 2,4 besser als im Vergleichsmedium unbestrahlter Zellen (siehe Tabelle VI-6, linke Ergebnisspalte).

Diese ausgeprägten Differenzen zwischen den relativen Expansionsfaktoren der hämatopoietischen Zellen werden deutlich vermindert, wenn sowohl das SCM der bestrahlten als auch das der unbestrahlten stromalen Zellen mit Glukose bis zum Ausgangswert von 25mmol/L supplementiert wird.

Insbesondere die frühen Vorläuferzellen expandieren jetzt im Glukose-supplementierten Medium unbestrahlter Zellen annähernd genauso gut wie in der Vergleichskultur mit SCM bestrahlter Zellen. Unterschieden sich die relativen Expansionen der CAFC im unsupplementierten Ansatz (rel. Expansionsfaktoren 1,1 bzw. 4,0, siehe Abbildung VI-4) um Faktor 3,6 (siehe Tabelle VI-6, linke Ergebnisspalte), so minimiert sich diese Differenz im Glukose-supplementierten Medium auf Faktor 1,2 (siehe Tabelle VI-6, rechte Ergebnisspalte).

Tabelle VI-6: Differenz der relativen Expansionen in bestrahlten zu unbestrahlten Ansätzen, mit und ohne Glukose-Supplementierung

Zellpopulation	ohne Glukose-Supplementierung	mit Glukose-Supplementierung
MNZ	1,6	1,3
CFC	2,4	1,3
CAFC	3,6	1,2

Diese Daten unterstreichen, dass es sinnvoll ist, zur Herstellung der SCM die stromalen Zellen zu bestrahlen. Dadurch kann der Medienverbrauch verringert werden, ohne die Produktion positiver Faktoren zu beschränken. Für alle weiteren Versuche wurden daher ausschließlich SCM bestrahlter Zellen ohne Glukose-Supplementierung eingesetzt.

Variation der Zelllinie

Vergleicht man die SCM der drei zur Verfügung stehenden stromalen Zelllinien (M2-10B4 mod., SI/SI und MS-5) hinsichtlich ihres Potentials, die Expansion von MNZ, CFC und CAFC zu unterstützen, so zeigt sich, dass SCM der Linie M2-10B4 mod. besonders im Hinblick auf die frühen Vorläufer gegenüber SCM der anderen Zelllinien überlegen ist und hier den 4-fachen Expansionsfaktor der Referenz erreicht (vergleiche Abbildung VI-5). Expansionsdaten der MNZ und CFC unterscheiden sich dagegen kaum voneinander und liegen in allen Fällen deutlich, um ca. Faktor 1,5 oberhalb der Kontrollwerte. Die Expansion der CFC und CAFC ist im Ansatz mit SCM von MS-5 etwas besser als im SCM von SI/SI.

Diese Daten sind einem repräsentativen Versuch entnommen. Die jeweiligen Werte können schwanken, liefern jedoch in der Tendenz die gleichen Ergebnisse.

Variation der Zellzahl

In den bisher gezeigten Versuchen wurde stets eine Stromazell-Konzentration von $4,0E+04$ c/mL Medium eingesetzt. In dem hier dargestellten Versuch wurde die Zellzahl der Linie M2-10B4 mod. variiert. So wurden jeweils $2,0E+04$, $4,0E+04$ und $8,0E+04$ c/mL Medium zur Konditionierung für einen gleichbleibenden Zeitraum von 125h eingesetzt.

Tabelle VI-7: Expansionen in der Referenzkultur

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	15 ($\pm 1,0$)
CFC	16 ($\pm 3,5$)
CAFC	5

In Abbildung VI-6 lässt sich erkennen, dass die Standard-Zellkonzentration von $4,0E+04$ c/mL (gesamt $4,00E+05$ c/T25) besonders im Hinblick auf die frühen Vorläuferzellen die besten Ergebnisse liefert.

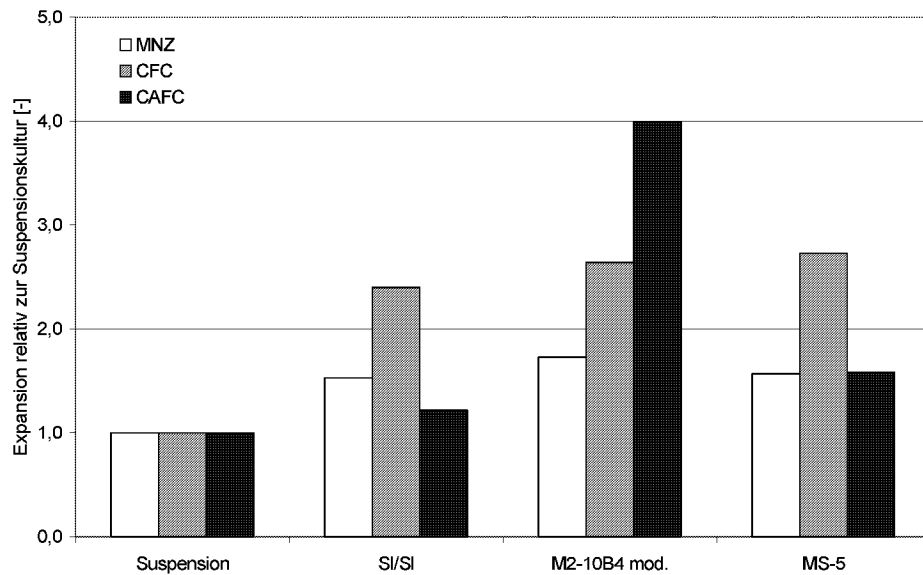


Abbildung VI-5: Expansion der MNZ, CFC und CAFC in SCM verschiedener, bestrahlter Zelllinien, relativ zur Suspensionskultur

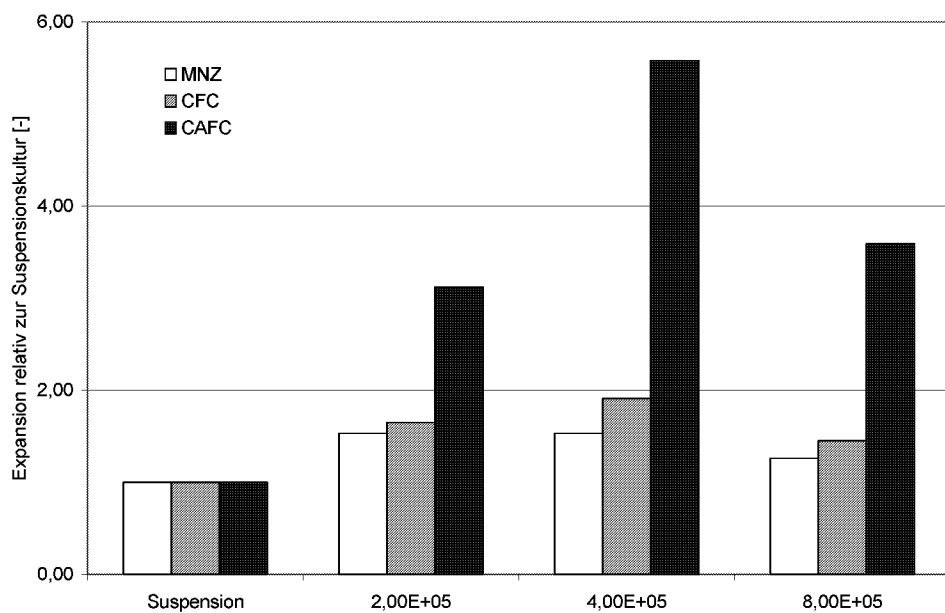


Abbildung VI-6: Expansion von MNZ, CFC und CAFC in SCM von M2-10B4 mod. variierender Gesamtzellzahl, relativ zur Suspensionskultur

Diese Zellkonzentration ist auch für die Expansion der CFC am besten geeignet, wobei der Unterschied zu den übrigen Ansätzen weniger stark ausgeprägt ist. Die MNZ-Expansionen unterscheiden sich in den drei Ansätzen kaum. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die geringe Stroma-Zelldichte von $2,0E+04c/mL$ nicht ausreicht, um genügend positive Faktoren in das Medium zu sekretieren. Dagegen scheint das Medium der hohen Zelldichte von $8,0E+04c/mL$ schon zu stark verbraucht zu sein. Eine mögliche Akkumulation an stromalen Faktoren kann die Expansion gegenüber dem Ansatz mit mittlerer Zellkonzentration nicht weiter steigern (vergleiche Tabelle VI-8).

Zudem expandieren die MNZ, aber auch die CFC, in stärker verbrauchtem Medium des Ansatzes mit $8,0E+04c/mL$ schlechter. Die CAFC hingegen profitieren noch von der wahrscheinlich erhöhten Menge an stromalen Faktoren und sind gegenüber dem verminderten Nährstoffangebot weniger sensibel. Aus diesem Grund liegt ihr relativer Expansionsfaktor im höher konzentrierten Ansatz um Faktor 0,5 über dem Wert von SCM der niedrigeren Stroma-Konzentration.

Es scheint also einen wirksamen Schwellenwert der stromalen Faktoren zu geben. Dieser wird offensichtlich nach 125-stündiger Kultur von $2,0E+04c/mL$ nicht erreicht. Eine Verdopplung der Zellkonzentration reicht allerdings aus, um einen positiven Effekt hervorzurufen. Wird die Menge der Zellen nochmals verdoppelt, so schlägt sich der Effekt ins Gegenteil um, da nun der vermehrte Medienverbrauch einer vermehrten Produktion der stromalen Faktoren entgegenwirkt. Offensichtlich ist es wichtig, die Balance zwischen Substratverbrauch und Faktorproduktion mittels einer geeigneten Zellkonzentration einzustellen. Wahrscheinlich ist, dass auch andere, nicht quantifizierte Medienkomponenten eine Rolle spielen, denn mit 13mmol/L Glukose und 14mmol/L Laktat sind noch keine besonders kritischen Werte erreicht, und die Differenz zum Ansatz mit mittlerer Zelldichte ist nicht wesentlich.

Tabelle VI-8: Mediendaten von Stroma-Kulturen mit unterschiedlicher Zelldichte

Medienkomponente	$2,0E+04c/mL$	$4,0E+04c/mL$	$8,0E+04c/mL$
[mmol/L]			
Glukose	22	16	13
Laktat	2,7	11	14

Variation der Dauer der Konditionierung

Die Dauer der Konditionierung beträgt im Standard-Ansatz 125h. Es wurde untersucht, inwieweit, ausgehend von einer konstanten Zellkonzentration von $4,0E+04$ c/mL Medium, die Dauer einen Einfluss auf die Qualität des hergestellten SCM hat. Hier wurde also die Zeit bestimmt, die von den zwei untersuchten Zelllinien, M2-10B4 mod. und SI/SI, benötigt wird, um einen kritischen Schwellenwert an wirksamen Faktoren im Medium zu akkumulieren. Vergleicht man die in Abbildung VI-7 und VI-8 dargestellten Ergebnisse für die Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI, so fällt auf, dass die Dauer der Konditionierung keinen Einfluss auf die Expansion der MNZ hat. Auch die Expansion der CFC in SCM von M2-10B4 mod. verändert sich kaum, wohingegen mit zunehmender Konditionierungsdauer eine stetige Abnahme der CFC-Expansion in SCM von SI/SI zu beobachten ist. Die Expansion der CAFC hat in SCM von M2-10B4 mod. nach 125h bereits mit Faktor 1,7 ihr Maximum erreicht. Dagegen kann der Wert in SCM von SI/SI nach 168h noch weiter gesteigert werden (von Faktor 1,2 nach 125h auf Faktor 1,9 nach 168h). Die stromalen Faktoren, die auf die verschiedenen Zellpopulationen wirken, scheinen demnach in den untersuchten Zelllinien unterschiedlich schnell eine Schwellenwert-Konzentration zu erreichen, um biologisch wirksam zu werden.

Tabelle VI-9: Expansionen in der Referenzkultur

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	39 ($\pm$)
CFC	15 ($\pm$)
CAFC	12

Auch hier scheint die Variation der Kulturbedingungen hauptsächlich die Expansion der frühen Vorläufer zu treffen, analog den Ergebnissen des vorherigen Experimentes zur Variation der Zellzahl. Diese Population ist offensichtlich gegenüber Veränderungen in der Kultur sehr sensitiv und reagiert deutlich auf ein geändertes Substratangebot, sei es in Form von Nährstoffen oder auch in Form von stromalen, wachstumsfördernden Faktoren. Die beobachteten Schwankungen der Expansionen sind bei den mononukleären Zellen bzw. den Kolonie bildenden Zellen wesentlich schwächer ausgeprägt.

Eine reine Analyse der expandierten Zellmenge hätte also im Fall der Stroma konditionierten Medien keine interessanten Informationen geliefert. Da die Qualität der expandierten HSPC ja insbesondere vom Anteil der frühen Vorläufer abhängt, ist es entscheidend, die Kulturbedingungen für diese Zellen optimal zu wählen.

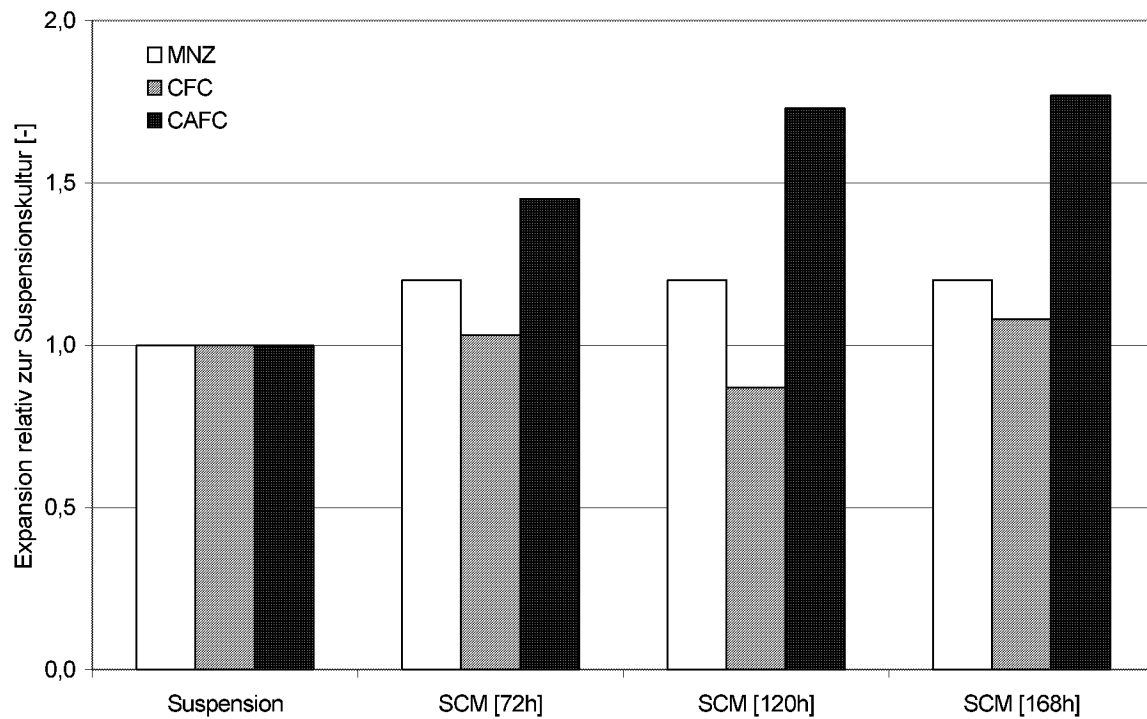


Abbildung VI-7: Expansion der MNZ, CFC und CAFC in SCM von M1-10B4 mod. nach variierender Konditionierungsdauer, relativ zur Suspensionskultur

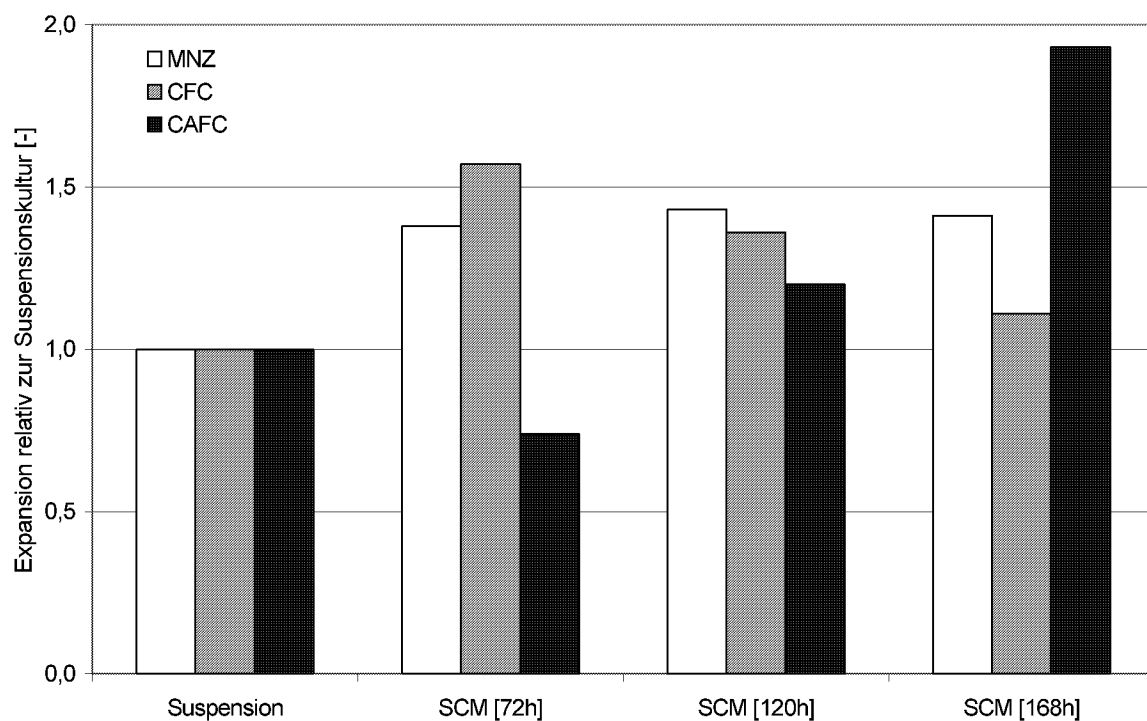


Abbildung VI-8: Expansion der MNZ, CFC und CAFC in SCM von SI/SI nach variierender Konditionierungsdauer, relativ zur Suspensionskultur

3D-konditioniertes Medium

In den bisher dargestellten Versuchen wurde das konditionierte Medium in T25 Gewebekulturflaschen hergestellt. Hierbei haftet das Stroma auf dem Boden des Kulturgefäßes und bildet einen zweidimensionalen Zellrasen aus. Um die natürlichen Bedingungen des Knochenmarks, speziell seine dreidimensionale Struktur und höhere räumliche Zelldichte, besser abbilden zu können, wurden die stromalen Zellen in weiteren Versuchen auf Collagen-Trägern (Fa. Cellex Biosciences, Inc.) im Miniatur-Schlaufenreaktor kultiviert (vergleiche Kapitel IV.1.6.) und das so gewonnene konditionierte Medium zur Kultur hämatopoietischer Zellen eingesetzt.

Tabelle VI-10 fasst die Parameter der im Folgenden beschriebenen Kulturen zusammen.

Tabelle VI-10: Parameter zur Herstellung von 2D- und 3D-SCM

Parameter	
Zelllinie	M2-10B4 mod. bestrahlt
Dauer der Konditionierung (h)	144
Stroma-Inokulum [c/mL]	2,5E+04 (A); 4,0E+04 (B)
Trägermaterial in 3D Kultur	Collagen
Durchmesser der Träger	400-700µm
Porendurchmesser	40-50µm

Tabelle VI-11: Expansionen in der Referenzkultur

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	45 (± 2,6)
CFC	43 (± 6,0)
CAFC	3,3

In einem ersten Parallelexperiment wurden die konditionierten Medien aus 2D- und 3D-Kulturen miteinander verglichen, wobei zusätzlich die Konzentration des zur Herstellung der Medien eingesetzten Stromas variiert wurde. Die übrigen Parameter sind in Tabelle VI-10 zusammengefasst.

Abbildung VI-9 zeigt, dass die hämatopoietischen Zellen in konditionierten Medien der 3D-

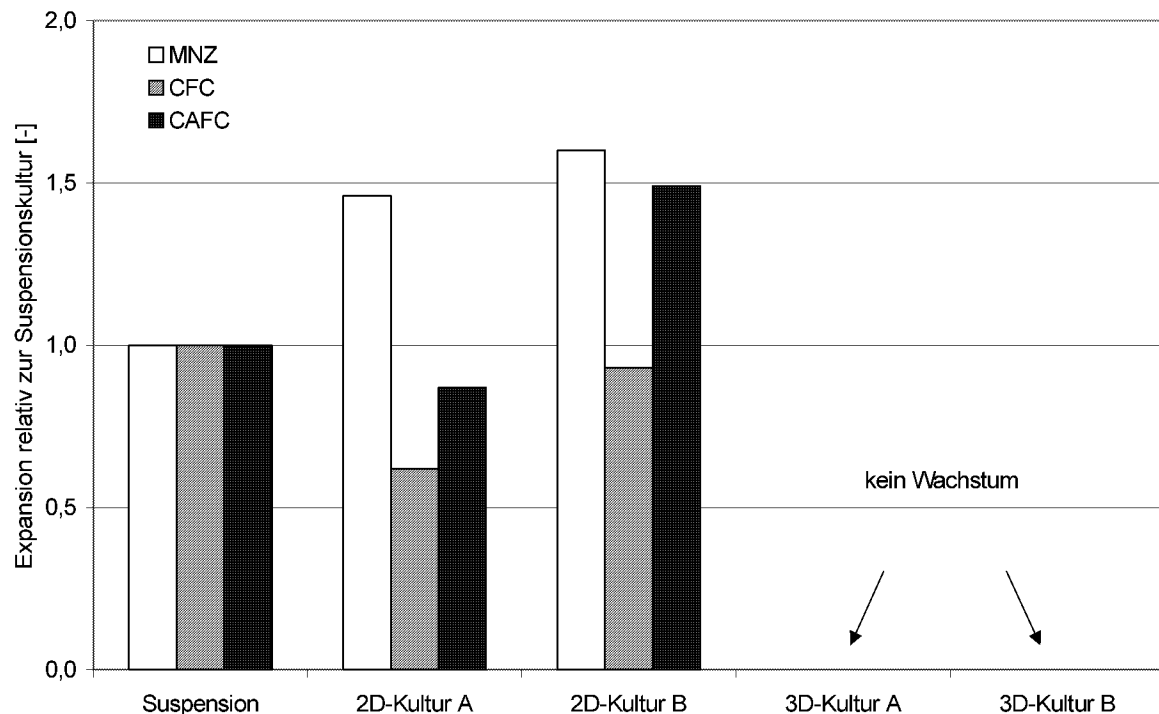


Abbildung VI-9: Relative Expansionen der MNZ, CFC und CAFC in 2D- oder 3D-SCM der Zelllinie M2-10B4 mod. (Variation der stromalen Zellkonzentration A: $2,5E+04c/mL$; B: $4,0E+04c/mL$)

Kultur nicht gewachsen sind. Im Gegensatz dazu konnte die Gesamtzellzahl (MNZ) in Medien der 2D-Kulturen deutlich gegenüber der Kontrolle in X-Vivo 10 vermehrt werden (Faktor 1,5 und 1,6). Der Einfluss der inokulierten Stroma-Zellzahl zeigt sich erneut besonders ausgeprägt in bezug auf die Expansion der frühen Vorläuferzellen. In konditioniertem Medium, hergestellt mit einer höheren Stroma-Zelldichte ($4,0E+04c/mL$), expandieren die CAFC um Faktor 1,5 relativ zur Kontrolle (verglichen mit einem Faktor 0,9 im Ansatz mit geringerer Stroma-Zelldichte). Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor gezeigten Daten über die Variation der Stroma-Zellzahl zur Herstellung des konditionierten Mediums (vergleiche Abbildung VI-6). Im aktuellen Experiment bleiben die CFC-Expansionen in konditioniertem Medium hinter der Kontrolle zurück (lediglich Faktor 0,6 bzw. 0,9), wobei erneut das Medium mit höherer Stroma-Zelldichte überlegen ist. Insgesamt bleiben die Expansionsdaten in 2D-konditioniertem Medium der Stroma-Zelllinie M2-10B4 mod. hinter den bisherigen, oben gezeigten Ergebnissen zurück.

Um auszuschließen, dass das sehr schlechte Abschneiden der 3D-Kultur zur Herstellung des konditionierten Mediums auf eine schlechte Qualität der stromalen Zellen zurückzuführen ist, wurde dieser Versuch mit den Zelllinien SI/SI und MS-5 wiederholt, wobei dies-

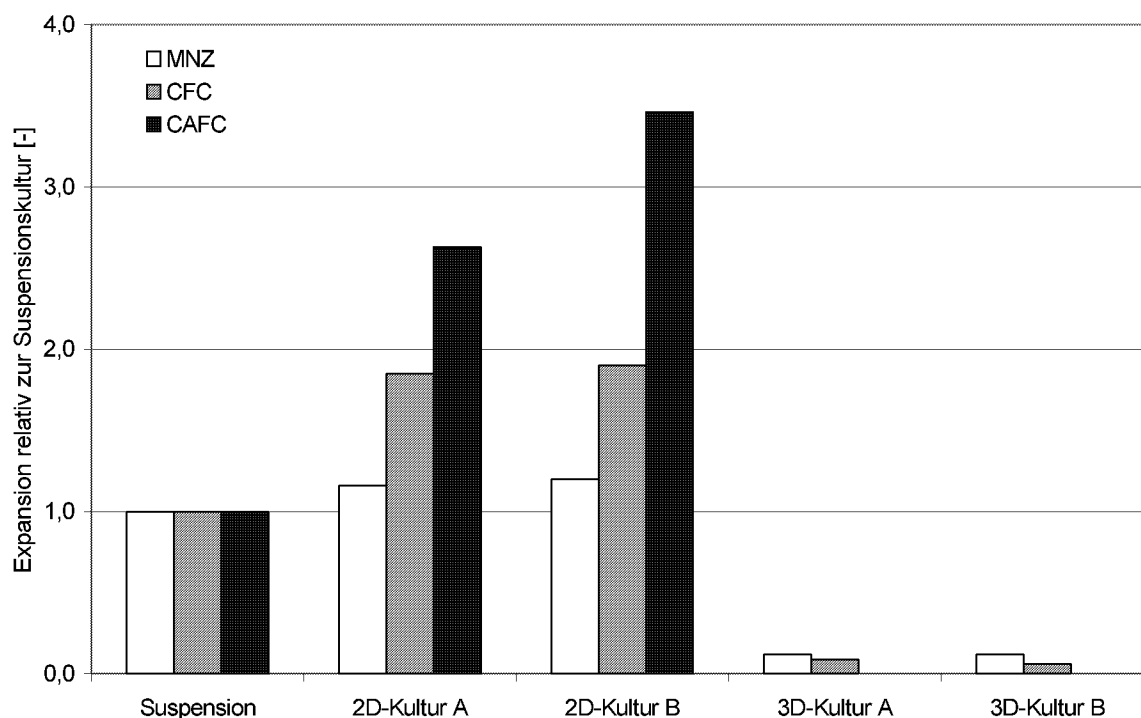


Abbildung VI-10: Relative Expansions der MNZ, CFC und CAFC in 2D- oder 3D-SCM der Zelllinien SI/SI (A) und MS-5 (B); stromale Zellkonzentration: $4,0E+04c/mL$ (Trägermaterial: Collagen)

mal lediglich die höhere Zellkonzentration zur Konditionierung eingesetzt wurde. Die Dauer der Konditionierung betrug 125h.

Tabelle VI-12: Expansionen in der Referenzkultur

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	25 ($\pm 3,5$)
CFC	9,3 ($\pm 0,5$)
CAFC	44

Die negative Auswirkung des 3D-konditionierten Mediums ist reproduzierbar und offensichtlich nicht von der eingesetzten Zelllinie abhängig. Die 2D-konditionierten Medien bei der Zelllinien ermöglichen hingegen hohe relative Expansionsraten im bezug auf die drei analysierten Zellpopulationen (rel. Expansionsfaktor MNZ: 1,2 und CFC: 1,9), wobei ein Unterschied zwischen den beiden Medien lediglich bei den frühen Vorläufern deutlich ausgeprägt ist (rel. Expansionsfaktor in Medium kond. mit SI/SI: 2,6; MS-5: 3,5).

Der quasi toxische Effekt des 3D-konditionierten Mediums auf darin kultivierte hämatopoi-

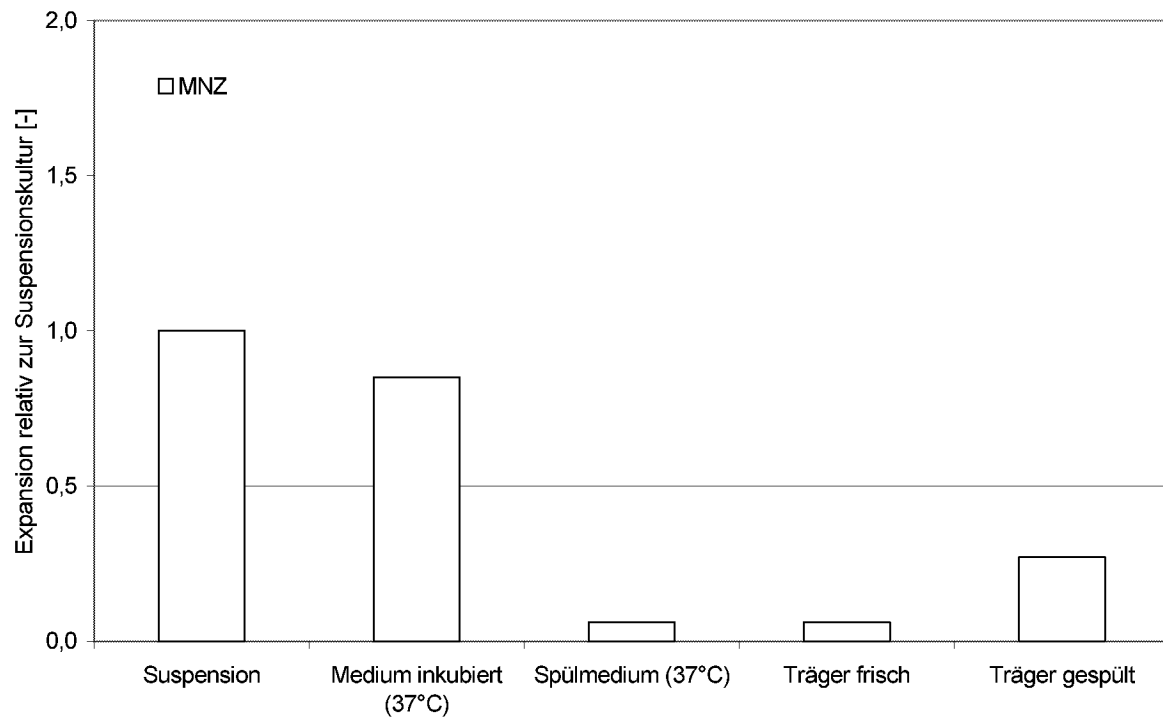


Abbildung VI-11: Relative Expansionen der MNZ in unterschiedlichen konditionierten Medien (zellfrei) (Trägermaterial: Collagen)

etische Zellen kann zwei mögliche Ursachen haben. Zum einen ist es denkbar, dass die Collagen-Träger schädliche Substanzen in das Medium abgeben; zum anderen könnten positive stromale Faktoren an die Trägersoberfläche gebunden werden und somit den hämatopoietischen Zellen nicht mehr zur Verfügung stehen. Ebenso könnten beide Mechanismen gleichzeitig wirksam sein. Um die Ursache zu bestimmen, wurden in einem Ansatz die Collagen-Träger vor ihrem Einsatz im Miniatur-Schlaufenreaktor für 96h im Brutschrank in X-Vivo 10 gespült. Das Spül-Medium wurde später ebenfalls zur Kultur von hämatopoietischen Zellen eingesetzt. Zur Kontrolle diente Medium, welches ohne Träger im Brutschrank gelagert wurde, um einen möglichen Effekt der höheren Temperatur auf das Medium zu detektieren. Zusätzlich wurden Träger wie bisher, also ohne vorheriges Spülen in Medium, im Miniatur-Schlaufenreaktor eingesetzt. Die Konditionierungsdauer in reinem Medium betrug 144h. Es wurden diesmal keinerlei stromale Zellen eingesetzt, um einen direkten Effekt der Collagen-Träger messen zu können. Ausgewertet wurden lediglich die MNZ-Expansionen (Faktor 47 in der Referenzkultur).

Aus Abbildung VI-11 geht hervor, dass sogar das Medium, welches zum Spülen der Collagen-Träger verwendet wurde, den negativen Effekt des 3D-konditionierten Mediums widerspiegelt. Es lässt sich nicht eindeutig bestimmen, ob essentielle Bestandteile des X-Vivo 10 Mediums quasi vollständig an die Träger gebunden wurden und somit den Zellen

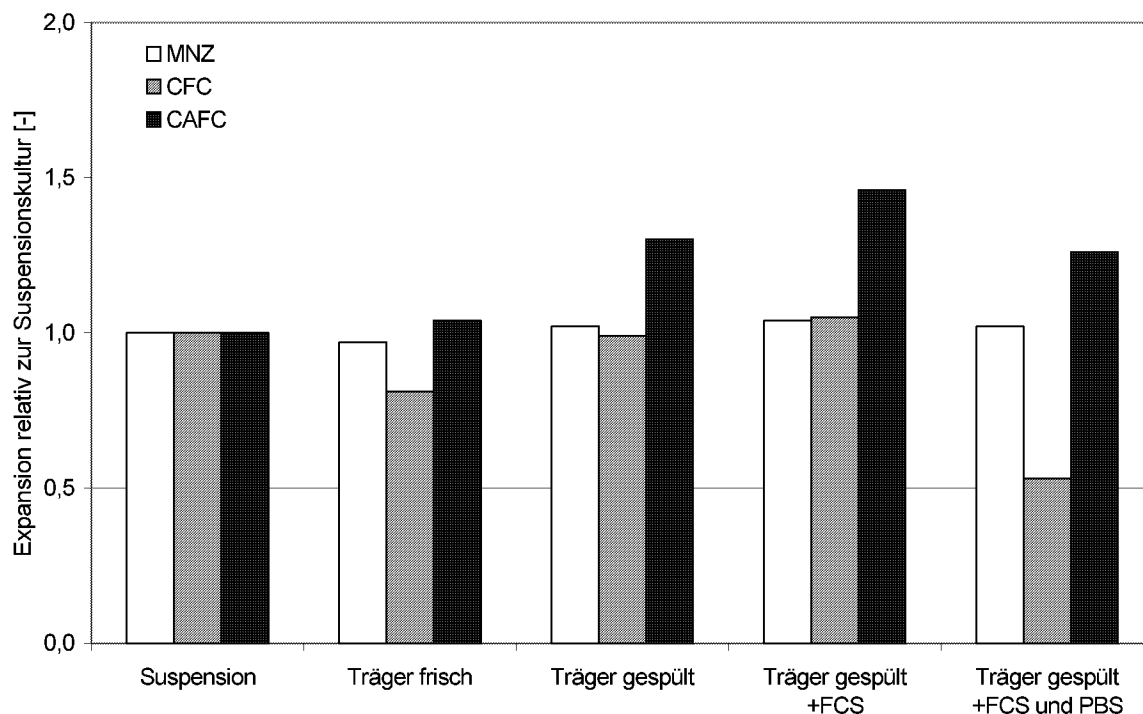


Abbildung VI-12: Relative Expansion der untersuchten Subpopulationen in 3D-SCM der Zelllinie M2-10B4 mod. (Trägermaterial: Siran)

nicht mehr zur Verfügung standen, oder ob die Träger eine toxische Substanz/Substanzen in das Medium abgegeben haben. Betrachtet man das Ergebnis der Kultur in Träger konditioniertem Medium von gespülten Trägern, so ist der negative Effekt weniger stark ausgeprägt, verglichen mit konditioniertem Medium von frischen Trägern. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die negative Substanz durch das vorhergehende Spülen in Medium bereits zu einem gewissen Teil ausgewaschen ist. Eine Idee von der Natur dieser Substanz/Substanzen gibt es nicht. Denn die Träger sollten lediglich aus Rinderschwanzcollagen und Metallpartikeln zur Beschwerung bestehen, gelagert in sterilem PBS.

Um dennoch feststellen zu können, ob eine veränderte Geometrie der Stroma-Kultur zu Änderungen im Sekretionsmuster bestimmter, für die Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen förderlicher Faktoren führen kann, wurden in einem abschließenden Versuch zur 3D-Konditionierung Siran-Träger (Fa. Schott) eingesetzt. In einem Vergleichsansatz wurden die Träger entweder frisch eingesetzt, oder vor der Stroma-Inokulierung (hier wieder M2-10B4 mod.) in X-Vivo 10 oder X-Vivo 10 + 10%FCS inkubiert. In einem vierten Ansatz wurden die in X-Vivo 10 + 10%FCS inkubierten Träger anschließend mit PBS gewaschen, um die FCS-Bestandteile auszuspülen. Das Spülen der

Träger in X-Vivo 10 bzw. serumhaltigem Medium sollte der besseren Anheftung der Zellen auf den weniger porösen Siran-Trägern dienen. Collagen ist ja eine natürliche Verankerungssubstanz des Stromas im Knochenmark [78]. Die Dauer der Konditionierung im Miniatur-Schlaufenreaktor betrug 120h.

Es zeigt sich, dass Siran-Träger *per se* keinen toxischen Effekt auf hämatopoietische Zellen ausüben. Wurde das Stroma auf frischen Trägern adhäriert, waren die Expansionen in 3D-SCM vergleichbar mit der Kontrolle. Wurden die Träger zuvor in Medium gespült, so expandierten MNZ und CFC in 3D-SCM im gleichen Maße wie in der Kontrolle. Lediglich die Expansion der CAFC ist in 3D-SCM gespülter Träger gegenüber der Kontrolle überlegen. Ein Grund dafür könnte zum einen die bessere Haftung des Stromas auf mit Medien- und Serumbestandteilen beschichteten Trägern und die damit verbundene höhere Sekretion von Faktoren sein. Verbliebene Serumbestandteile könnten auch selbst zu diesem Effekt beigetragen haben, da die CAFC-Expansion in SCM, hergestellt mit PBS-gespülten Trägern, nicht so hoch ist wie in SCM ungespülter, also serumhaltiger Träger.

Alles in allem ist ein positiver Effekt auf die Qualität der SCM, welcher durch eine veränderte Geometrie des Kultursystems hervorgerufen werden sollte, nicht zu beobachten. Die in dieser Arbeit eingesetzten Collagen-Träger sind zur Herstellung von SCM gänzlich ungeeignet, da sich selbst reines Medium, welches mit den Trägern in Kontakt kam, auf die kultivierten HSPC negativ auswirkt. Das konditionierte Medium von stromalen Zellen, die auf Siran-Trägern kultiviert wurden, hat ebenfalls keinen überzeugenden Effekt auf die Menge und Qualität der darin expandierten hämatopoietischen Zellen. Der Einfluss der Systemgeometrie auf die Qualität des SCM wird wahrscheinlich durch Materialeinflüsse überlagert und müsste auf andere Art untersucht werden.

Vivaspin-Konzentrate

Die bis zu diesem Punkt dargestellten Versuche haben eindeutig gezeigt, dass durch die Konditionierung des Kulturmediums mit stromalen Zellen lösliche Faktoren angereichert werden, die sich positiv auf die Vermehrung von hämatopoietischen Vorläuferzellen auswirken. Es liegt nahe zu vermuten, dass es sich hierbei um sekretierte Proteine handelt. Mit Hilfe von Vivaspin-Membranfiltern (Fa. Sartorius AG, Göttingen) unterschiedlicher Porengröße wurde SCM der Linie M2-10B4 mod. eluiert. So sollte ermittelt werden, ob es möglich ist, das SCM abzureichern, und, falls ja, in welchem Molekülgrößenbereich die wirksamen Faktoren liegen. Zum Vergleich wurde unfiltriertes SCM untersucht. Um zu überprüfen, ob sich durch die Halbierung der Menge an positiven Faktoren bereits ein

Effekt auf die HSPC nachweisen lässt, wurde ebenfalls eine 50%ige Lösung, verdünnt mit X-Vivo 10 eingesetzt. Es handelt sich also um eine Depletion positiv wirkender Faktoren.

Tabelle VI-13: Expansionen in der Referenzkultur, zwei unabhängige Versuche

Zellpopulation	Expansionsfaktoren
MNZ	18 ($\pm 1,3$); 11 ($\pm 0,1$)
CFC	11 ($\pm \text{nd}$); 6,2 ($\pm 1,7$)
CAFC	9,7; 4,2

Abbildung VI-13 zeigt, dass die Verdünnung des SCM mit frischem Medium keinen Einfluss auf die Expansion der MNZ hat. Die CFC expandieren etwas besser in unverdünntem CM. Der Effekt der Verdünnung fällt im Hinblick auf die Expansion der frühen Vorläufer hingegen drastisch aus. Der Expansionsfaktor liegt in 50%igem SCM auch nur noch halb so hoch, verglichen mit unverdünntem SCM. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch den Zusatz von frischem Medium keine weitere Steigerung der Expansionen bewirkt werden kann. Im Gegenteil scheinen wesentliche Faktoren, die zur Expansion der CAFC beitragen, verdünnt zu werden und dabei einen kritischen Schwellenwert zu unterschreiten. Diese These wird durch oben gemachte Beobachtungen klar unterstützt.

Es ist ebenfalls interessant festzustellen, dass das Ersetzen von 50% SCM durch frisches Medium keinerlei positiven Effekt auf die Expansionen aller betrachteten Populationen ausübt. Für SCM von unbestrahlten stromalen Zellen konnte eine positive Wirkung durch die Supplementierung von Glukose erzielt werden (vergleiche Tabelle VI-6). Im Fall der SCM bestrahlter stromaler Zellen überwiegt jedoch offensichtlich der Verdünnungseffekt, wenn frisches Medium, welches ja sämtliche eventuell verbrauchten Bestandteile des Mediums, nicht nur Glukose, enthält, zugesetzt wird. Wird SCM bestrahlter Stromas eingesetzt, ist also scheinbar hauptsächlich die Konzentration der akkumulierten positiven stromalen Substanzen für die Qualität des Mediums entscheidend. Limitierungen durch geringe Substratkonzentrationen oder angereicherte Stoffwechselendprodukte treten nicht merklich auf bzw. werden überlagert.

Mithilfe der Membranfiltration sollte nun festgestellt werden, ob gezielt Moleküle bestimmter Molekularmassen dem Medium entzogen werden können und ob sich dadurch das Wachstumsverhalten der HSPC entsprechend verändert. Diese Vorgehensweise der Abreicherung positiver Faktoren wurde gewählt, da das Volumen des evtl. mit positiven Faktoren angereicherte Retentats für eine Kultivierung zu gering war. Es wurde angenommen, dass Faktoren der niedrigen Molekülmassen eher den Chemokinen und Cytokinen

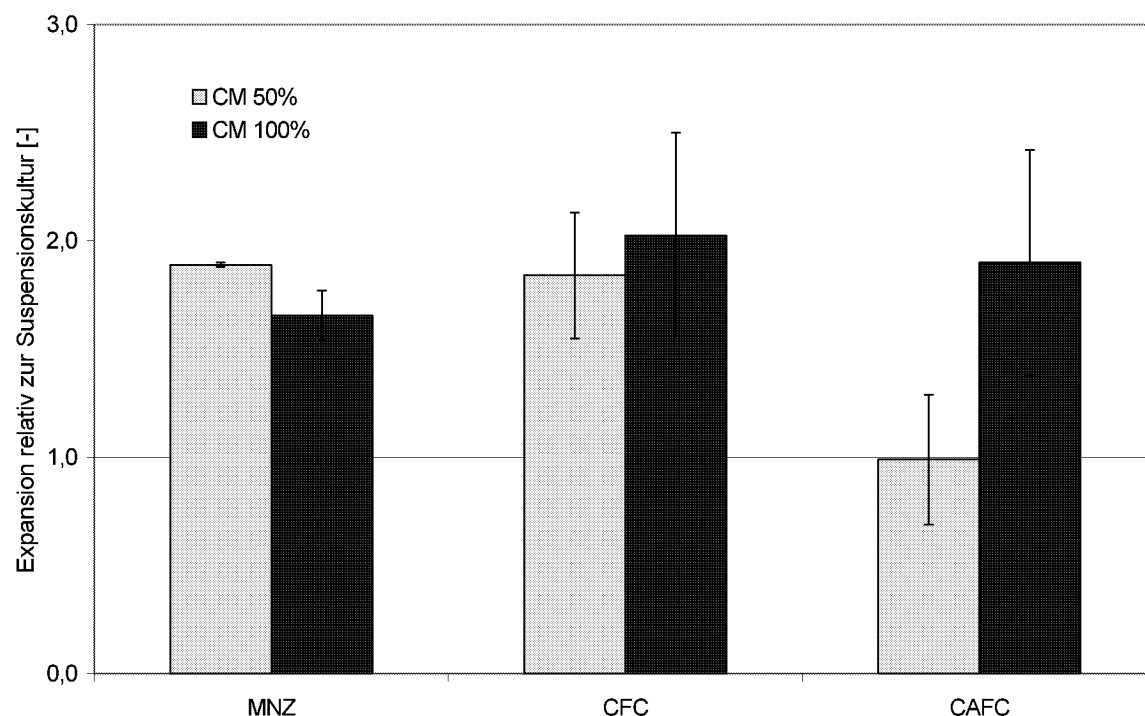


Abbildung VI-13: Relative Expansion der MNZ, CFC und CAFC, kultiviert in 50% oder 100% SCM der Zelllinie M2-10B4 mod.

zugehörig sind, wohingegen größere Moleküle nicht unbedingt der klassischen Cytokinfamilie angehören. Mit diesem Ansatz sollten Hinweise auf die Größe der positiv wirkenden Faktoren gewonnen werden.

Die Elution des SCM über Membranen der formalen *cutoffs* 10kDa, 30kDa, 50kDa und 100kDa bewirkte, dass die Expansionen der betrachteten Zellpopulationen bei lediglich ca. 50% der Kontrollwerte lagen. Da nicht anzunehmen war, dass die interessierenden Signalmoleküle in einem Größenbereich von 100kDa liegen, wurde daraufhin ebenfalls reines X-Vivo 10 Medium über die Säulen eluiert. Es sollte dadurch getestet werden, ob der beobachtete Effekt tatsächlich auf die spezifische Abreicherung stromaler Produkte zurückzuführen ist, oder ob vielmehr essentielle Bestandteile des Mediums, wie z. B. die enthaltenen Proteine, zurückgehalten werden. Tatsächlich ergab sich in der Kontrolle mit reinem X-Vivo 10 im Wesentlichen das gleiche Bild (nicht gezeigt). Lediglich Medium, welches über die 100kDa-Säule geschickt wurde, ließ zumindest die CFC annähernd gut wachsen, wie das Kontrollmedium. MNZ und CAFC expandierten in diesem Filtrat besser als in den übrigen, erreichten jedoch nicht die Werte der Kontrollgruppe.

Insgesamt ist es also nicht möglich, gezielt stromale Effektorsubstanzen aus dem Medium zu filtrieren, da ein möglicher negativer Effekt des abgereicherten Mediums auf HSPC

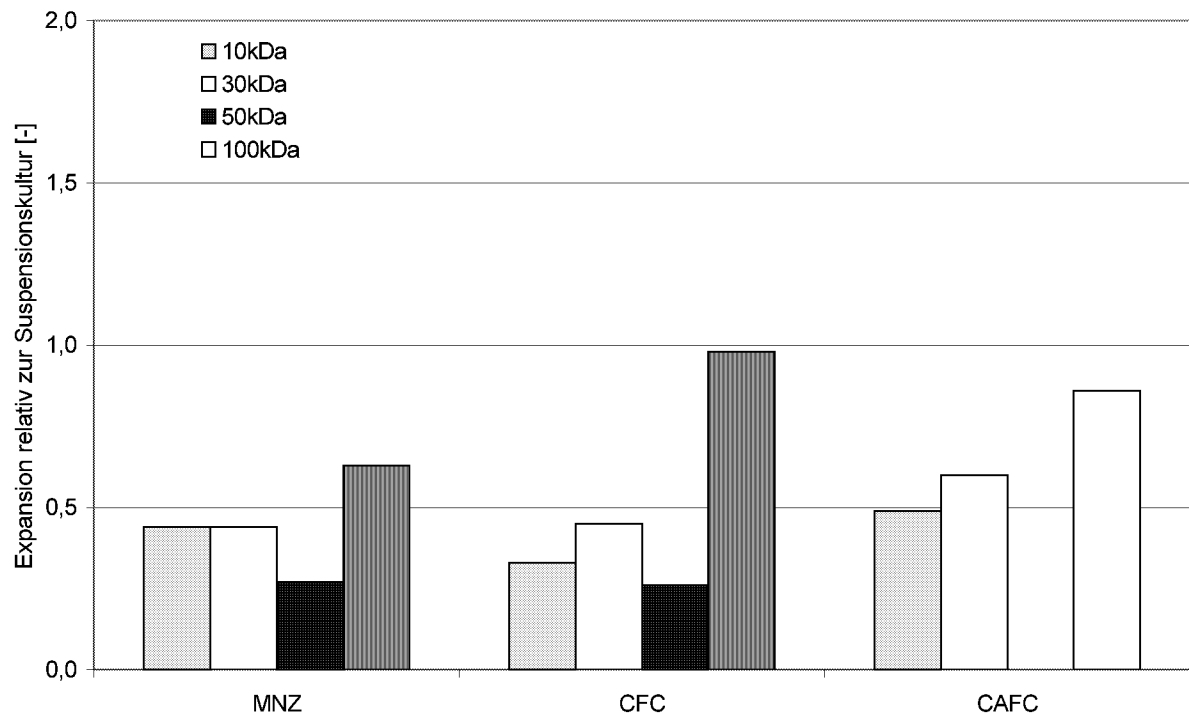


Abbildung VI-14: Relative Expansion der MNZ, CFC und CAFC in X-Vivo 10 nach der Filtration über Membranen verschiedener *cutoffs*

durch die Entfernung von Basismediumbestandteilen überlagert wird. Eine Abreicherung der im Medium vorhandenen Proteine (Insulin ca. 5,4kDa, Transferrin ca. 90kDa und Albumin ca. 66kDa) hat bereits einen deutlichen, stark negativen Einfluss auf die Qualität des Mediums.

Es solle erwähnt sein, dass es sich bei den Membran *cutoffs* nicht um absolute Ausschlussgrenzen handelt. Vielmehr spielt auch die Geometrie der Moleküle eine Rolle. So werden globuläre Moleküle weniger effektiv zurückgehalten als Moleküle der gleichen Molekulargröße, die jedoch eine fibrilläre Struktur aufweisen. Transferrin und z. T. auch Albumin können theoretisch von einer Membran mit einem *cutoff* von 100kDa zurückgehalten werden. Zusätzlich beeinflusst auch das Vielfache der Erdbeschleunigung, welches zur Filtration angelegt wurde, die Effizienz der Trennung. hier 25 Minuten, 2000rpm.

VI.1.3. Kurzzusammenfassung und Diskussion I

Die Analyse des Stroma konditionierten Mediums

Der fördernde Einfluss stromaler sekretierter Faktoren ist bereits seit längerem be-

kannt, und verschiedene Gruppen haben sich mit der Aufreinigung und Identifizierung dieser Produkte beschäftigt [89, 91, 138, 139, 142, 144-152]. Es hat sich gezeigt, dass stromale Zelllinien funktional relativ heterogen sind und sich in ihrer unterstützenden Funktion deutlich voneinander unterscheiden. So wurden in primären Stromakulturen und auch in Kulturen stromaler Zelllinien eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren identifiziert. Dazu gehören G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), SCF, FL, und SDF-1 α . Zusätzlich zu diesen wurden ebenfalls inhibierende Faktoren wie IL-1 α , IFN- γ (Interferon- γ), TGF- β , TNF- α und MIP-1 α detektiert [153].

All diese Faktoren sind identifiziert und charakterisiert, und ihre Wirkung auf HSPC wurde untersucht. Da bisher nur ein kleiner Cocktail an Faktoren, wie z. B. IL-3, IL-6, SCF, TPO, FL, EPO und GM-CSF zur Kultivierung eingesetzt wird, ist anzunehmen, dass stromale Zellen noch weitere, bisher unbekannte Moleküle sekretieren, die einen stimulierenden Einfluss auf die Expansion der HSPC besitzen. Zunächst wurde deshalb eine Strategie zur Herstellung Stroma konditionierten Mediums entwickelt und optimiert, um sich die Gesamtheit der stromalen Faktoren zunutze zu machen. Die Güte des Mediums wurde anhand der Expansionen und Frequenzen verschiedener HSPC Subpopulationen, MNZ, CFC und CAFC, bestimmt. Nicht nur die reine Zellvermehrung, sondern auch der Erhalt des Differenzierungspotentials entscheiden über die Qualität des Kulturmediums.

Warum Serum freies Medium?

Serum ist eine reiche Quelle an essentiellen Nährstoffen wie z. B. Glukose (ca. 1,3g/L) und Vitaminen (z. B. Vitamin E ca. 1,1mg/L), Hormonen (z. B. Wachstumshormon ca. 30 μ g/L) und Wachstumsfaktoren. Aber auch Inhibitoren wie z. B. Bakterientoxine können enthalten sein. Diese unvollständige Aufzählung der in Serum enthaltenen Substanzen macht deutlich, wie heterogen ein solcher Medienzusatz ist. Die jeweilige Zusammensetzung und die Konzentrationen der Komponenten können z. T. stark schwanken. Dadurch werden bestimmte Populationen des Zellgemisches der hier untersuchten CD34-positiven hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen selektiv beeinflusst. Des Weiteren ist Serum keine physiologische Flüssigkeit, und es enthält Proteasen [91], die erwünschte Proteine abbauen können. Zudem ist der Einsatz tierischer Seren für eine klinische Anwendung nicht zulässig. Neben weiteren Negativaspekten sprechen insbesondere die undefinierten Kulturbedingungen gegen eine Verwendung von Serum zur Kultivierung von HSPC [154] [155].

Im Hinblick auf die Qualitätsanalyse des Stroma konditionierten Mediums ist es natürlich auch wünschenswert, einen direkten und unverfälschten Eindruck vom Potential der jeweiligen Stroma sekretierten Faktoren zu bekommen. Serumbestandteile könnten den Einfluss dieser Faktoren überlagern oder sogar eine positive Wirkung aufheben.

Aus diesen Gründen wurde zur Herstellung der Stroma konditionierten Medien und der Referenzkultur ausschließlich serumfreies X-Vivo 10 Medium eingesetzt. Dieses Medium ist zudem für eine klinische Anwendung zugelassen.

Sind stromale Fibroblasten ein Abbild des natürlichen Knochenmarks?

Bei den in dieser Arbeit vergleichend betrachteten stromalen Zelllinien, SI/SI, M2-10B4 mod. und MS-5, handelt es sich um murine Fibroblasten. Die Zelllinie SI/SI entstammt den Embryonen einer SCF-defizienten Maus [156]. M2-10B4 mod. Zellen wurden aus murinem Knochenmark gewonnen [157]. Beide Zellen tragen genetische Modifikationen zur Produktion humaner Cytokine [133]. Die Zelllinie MS-5 entstammt ebenfalls murinem Knochenmark [143]. Nicht nur das Knochenmark, auch die AGM-Region [158] und mesenchymale Stammzellen [159] dienen gelegentlich als potentielle Quelle für stromale Zelllinien.

Das natürliche Mikromilieu des Knochenmarks hingegen besteht neben den Fibroblasten zusätzlich aus spezialisierten retikulären Endothelzellen, Makrophagen, Adipocyten, osteogenen Vorläuferzellen, mesenchymalen Stammzellen, T- und B-Lymphocyten sowie Monocyten, ist also wesentlich komplexer aufgebaut. Es sollte auch bedacht werden, dass der Übergang von primitiven zu weiter ausgereiften hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen von distinkten stromalen Nischen reguliert wird, und dass die entsprechenden Stammzell-Subpopulationen mit den entsprechenden Zellen innerhalb der Nischen interagieren. In den oben beschriebenen Ansätzen zur Herstellung von SCM wird diese Dynamik nicht berücksichtigt. Es wird nur ein kleiner, relativ statischer Ausschnitt des komplexen Regulationsnetzwerkes betrachtet. Und natürlich handelt es sich um murine Fibroblasten, deren Effektoren nicht zwangsläufig auch humane hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen unterstützen müssen. Zudem wurde beschrieben, dass humane CD34-positive Zellen in der Lage sind, die Produktion von IL-6 und G-CSF durch stromale Zellen anzuregen [160]. Auch auf Ebene der löslichen Signalmoleküle ist demnach scheinbar eine bi-direktionale Zell-Zell Kommunikation möglich, denn die Induktion erfolgt auch, wenn beide Zelltypen keinen direkten Kontakt zueinander haben, sondern lediglich über Medium miteinander verbunden sind (Transwell-System). Diese Form des bi-direktionalen Informationsaustausches ist während der Produktion des Stroma kondi-

onierten Mediums nicht möglich. Stromale Zellen können nicht auf Botenstoffe der HSPC reagieren, sondern produzieren und sekretieren Faktoren auf einem basalen Niveau. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt sein, dass auch der Zusatz von 10% FCS eine Steigerung der IL-6 und IL-8 Produktion humaner primärer Stromazellen bewirkt. Zusätzlich stimuliert IL-6 die Produktion von IL-8, und umgekehrt. Es scheint sich also um Regulationsschleifen zu handeln, die sich durch das zugesetzte Serum gegenseitig verstärken [151]. IL-8 ist ein gutes Beispiel für einen autokrin-parakrin wirkenden Faktor, da er sowohl von stromalen als auch von hämatopoietischen Zellen produziert wird. Zellen, die IL-8 sekretieren, tragen in der Regel ebenfalls den entsprechenden Rezeptor für dieses Cytokin [161].

Es soll deutlich gemacht werden, dass zum einen in den oben beschriebenen Experimenten lediglich ein bestimmter, kleiner Ausschnitt des stromalen, induktiven Mikromilieus betrachtet wurde, die Fibroblastenzellen. Der regulatorische Einfluss der übrigen Zellen blieb dabei unberücksichtigt. Zum anderen wurde lediglich der Einfluss der stromalen sekretierten Faktoren analysiert. Sämtliche anderen Aspekte der Zell-Zell und Zell-ECM Kommunikation kamen in diesen Ansätzen nicht zum Tragen.

In dieser Arbeit konnte in vorangestellten Untersuchungen gezeigt werden, dass durch Bestrahlung das Wachstum, und insbesondere der Nährstoffverbrauch und damit die Akkumulation von Stoffwechselendprodukten im Medium entscheidend reduziert wurde. In darauffolgenden Kultivierungen von HSPC in SCM bestrahlter bzw. unbestrahlter Zellen zeigte sich ein uneinheitliches Bild. Die Qualität des SCM von SI/SI wurde durch die Bestrahlung nicht beeinflusst, wohingegen die HSPC, insbesondere Vorläufer und frühe Vorläufer, in SCM von bestrahlten MS-5 weniger stark expandierten. Am deutlichsten ist der Effekt der Bestrahlung ausgeprägt, wenn man die Expansionen der HSPC in SCM von M2-10B4 mod. betrachtet. Hier wiesen die hämatopoietischen Zellen ein minimales Wachstum auf, wenn sie in SCM bestrahlter Zellen kultiviert wurden. Im Gegensatz dazu erreichten die CAFC in SCM bestrahlter Zellen eine verbesserte Expansion gegenüber der Kontrolle. Auch die MNZ und CFC Expansionen konnten klar gesteigert werden.

Mögliche Ursache für diese Effekte des Bestrahlens liegen in der Konzentration an Nährstoffen und der Akkumulation von Stoffwechselendprodukten. Die Zellen selbst werden durch die Bestrahlung nicht so stark geschädigt, als dass eine Verwendung ihrer SCM nicht in Frage käme. Zudem ist die Bestrahlung stromaler Zellen, ob zur Produktion von SCM oder im Rahmen einer direkten Co-Kultur, gängige Praxis auch in anderen Gruppen, die Ergebnisse sind daher vergleichbar.

Betrachtet man nun vergleichend die Expansion von HSPC in SCM aller drei bestrahlten stromalen Zelllinien, so fällt auf, dass sich die Qualität der Medien im Hinblick auf eine unterstützende, positive Funktion unterscheiden. Interessanterweise unterscheidet sich die Expansion der MNZ und CFC kaum, liegen jedoch wesentlich über den Werten der Suspensionskontrolle, die lediglich vier ausgewählte Cytokine enthält. Auch die CAFC in SCM von SI/SI und MS-5 expandieren ähnlich gut. Auffällig ist das gute Abschneiden des SCM von M2-10B4 mod. im Hinblick auf die Expansion der wichtigen frühen Vorläuferzellen. Sie konnten erheblich im Vergleich zur Kontrolle expandiert werden (vergleiche Abbildung VI-5).

Es ist denkbar, dass die Zellen zwar das gleiche Set an Faktoren produzieren und sekretieren, sich jedoch die Kinetik der Produktion unterscheidet. Andererseits wäre es natürlich genauso gut möglich, dass die Qualitätsunterschiede tatsächlich von Variationen des Sekretionsmusters herrühren. Denn obwohl es sich in allen drei Fällen um Fibroblastenzellen handelt, ist deren Herkunft und mögliche genetische Aktivität verschieden. Zudem exprimieren die Zelllinien SI/SI und M2-10B4 mod. zusätzlich humane Wachstumsfaktoren. Allerdings scheint dies zumindest im Fall der SI/SI keine Steigerung der SCM Qualität zu bewirken. Man sollte dabei nicht nur die Anwesenheit fördernder Faktoren, sondern auch die Abwesenheit oder geringere Menge inhibierender Faktoren im SCM der unterstützenden Stromazelllinien bedenken.

Der Einfluss einer variierten Zellkonzentration zeigt, dass mit zunehmender Zellzahl die vermehrte Produktion löslicher Faktoren mit einem gestiegenen Medienverbrauch korreliert. Es lässt sich eine optimale Konzentration von etwa $4,0E+04$ c/mL festlegen. Die MNZ und CFC bleiben relativ unbeeindruckt, wohingegen die frühen Vorläuferzellen die mittlere hier untersuchte Zellkonzentration klar bevorzugen (Abbildung VI-6).

Ein recht ähnliches Bild spiegelt sich bei der Betrachtung variierten Zeiträume für die Konditionierung der Medien wider. Auch hier reagieren insbesondere die frühen Vorläuferzellen auf eine veränderte Medienzusammensetzung, die Expansionen der MNZ und CFC verändern sich insgesamt kaum (Abbildungen VI-7 und VI-8).

Wird Stroma konditioniertes Medium zur Hälfte mit frischem Basismedium X-Vivo 10 verdünnt, so vermindert sich entsprechend die Expansion der CAFC um 50%, auf den Wert des Basismediums. Erneut sind die Expansionen der MNZ und CFC kaum verändert (Abbildung VI-13).

Aus der Betrachtung dieser Kultivierungsexperimente ergibt sich, dass veränderte Kulturbedingungen nur zu einem geringen Teil die Expansion der MNZ und CFC beeinflussen.

Diese Zellpopulationen reagieren relativ träge und scheinen in einem breiten Bereich unterschiedlicher Kulturbedingungen relativ gute Voraussetzungen vorzufinden, die maßgeblich von der guten Qualität der Referenzkultur bestimmt werden (vergleiche Abbildung V-1).

Tabelle VI-14: Vergleich der Expansionen von MNZ, CFC und CAFC in Serum freien Medien (BM: Knochenmark, CB: Nabelschnurblut, PB: peripheres Blut)

Referenz	Expansionen	Medium/-zusatz	Dauer [h]	Cytokine [ng/mL]	Zellquelle
[162]	CFC: >500 CAFC: 62±22	IMDM Serumersatz BIT LDL (40µg/mL)	240	FL (9000), SCF (9000), IL-3, IL-6 und G-CSF (je 180)	BM
[72]	MNZ : ~30 CFC: ~200 CAFC: ~3	IMDM BSA (20ng/mL) hu Insulin (10µg/mL) hu Transferrin (200µg/mL)	168	FL (300), SCF (300), IL-3 (60)	CB
[155]	MNZ: 77 CFC: 4,6 CAFC: 1,2	IMDM BSA (1%)	336	SCF (10), IL-1β (3), IL-6 (100), EPO (1U/mL)	PB
[163]	MNZ: 237 CFC: nd CAFC: nd	CellGro®	192	SCF (300), FL (300), IL-3 (50)	CB
[164]	MNZ: 44±22 CFC: 42±20 CAFC: nd	SFM	144	TPO, SCF, IL-3, FL (je 50)	CB
diese Arbeit	MNZ: 38±21 CFC: 11±5,5 CAFC: 7,4±2,6	X-Vivo 10 (enthält Albumin, Transferrin und huInsulin)	168	TPO (20), SCF (50), IL-3 (10), FL (50)	CB

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Referenzkultur in X-Vivo 10 plus Cytokinen wurden schneller, nach nur 168h, und mit deutlich geringeren Cytokinmengen erzielt, verglichen mit anderen Serum freien Kultivierungsstrategien (vergleiche Tabelle V-14).

Es scheint eindeutig erforderlich, die Kulturbedingungen den Anforderungen der CAFC anzupassen, denn die Expansionen der frühen Vorläuferzellen weisen in den betrachteten Kulturvarianten eindeutig Optima auf. Es ist also nicht allein die erreichte Zellzahl, die über die Güte einer Kultivierungsstrategie entscheidet, sondern vor allem die Qualität der kultivierten Zellen. Denn Ziel ist ja die Vermehrung der Zellen unter Erhalt ihrer Qualität.

Die optimierte Strategie zur Herstellung von SCM lautet:

- Serum freies Medium **X-Vivo 10** als Basismedium
- Verwendung **bestrahlter stromaler Zellen** zur Minimierung des Medienverbrauches
- **M2-10B4** mod. liefert die besten Ergebnisse
- eine Zellkonzentration von **4,0E+04c/mL** ist ausreichend
- innerhalb eines Zeitraumes von ca. **125 h** ist eine biologisch wirksame Konzentration an stromalen Faktoren erreicht
- die Kultivierung stromaler Zellen in einer 3D-Kultur hatte keine bis negative Effekte auf die Expansion der HSPC

Wie lassen sich die gemachten Beobachtungen biologisch erklären?

Wie bereits oben kurz erwähnt, handelt es sich bei der Proliferation und Differenzierung der HSPC um Kaskaden zellulärer Reaktionen auf das induktive Mikromilieu unterschiedlicher Nischen im Knochenmark. Auf dem Weg von der primitiven Stammzelle zur ausgereiften, funktionalen Blutzelle erfährt sie verschiedenste Formen der Regulation, u. a. auch auf Ebene löslicher stromaler Faktoren. Dabei reagieren die HSPC je nach Reifungsgrad unterschiedlich auf die Stimuli. Srour *et al.* konnten zeigen, dass hämatopoietische Stammzellen, die aus dem Knochenmark isoliert wurden und sich in G₀ des Zellzyklus befanden, eines sequentiellen und systematischen Cytokinstimulus bedurften, um zu maximaler Proliferation angeregt zu werden [165]. Dabei reagierten die Zellen nicht gleichförmig auf das Signal, sondern es konnten insgesamt mindestens vier Zellgruppen identifiziert werden, die sich in ihrem proliferativen Verhalten unterschieden. Übertragen auf obige Ergebnisse bedeutet dies, dass die jeweils vorherrschende Zusammensetzung der SCM die HSPC unterschiedlich stark zur Proliferation anregt. Besonders die frühen Vorläuferzellen reagieren auf veränderte Konzentrationen und, leider so nicht messbar, auf eine veränderte Zusammensetzung der löslichen Stoffe. Betrachtet man im Hinblick auf die von Srour *et al.* gemachten Beobachtungen die Referenzkultur, so erklärt sich die enorme Schwankungsbreite der Expansionen in dieser Kultur, denn zwar sind die Kultur-

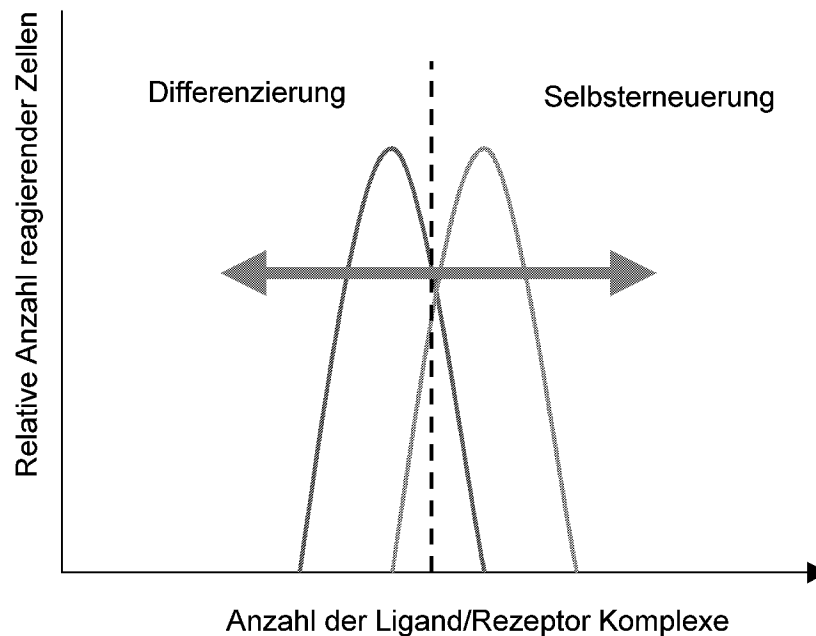


Abbildung VI–15: Modell der Ligand/Rezeptor-Komplex Schwellenwertkonzentration (nach [66], verändert)

bedingungen standardisiert, aber die untersuchte Probe ist ein heterogenes Gemisch, dessen Zellen nicht uniform auf die angebotene Cytokinkombination reagieren. Eaves *et al.* beschrieben im selben Jahr ihre Beobachtung, dass CAFC zur maximalen Proliferation eine 30-fach höhere Konzentration an Cytokinen benötigten als weiter ausdifferenzierte CFC [162]. 1998 konnte dieselbe Gruppe zeigen, dass sich der Cytokinbedarf von HSPC aus Nabelschnurblut von denen aus dem Knochenmark unterscheidet und die Reaktionen der Zellen auf bestimmte Cytokine unterschiedlich ausfallen. Sie schließen daraus, dass eine veränderte Reaktivität auf Cytokinstimuli das Kennzeichen früher hämatopoietischer Abläufe ist, und dass sich der Cytokinbedarf während der Ontogenese ändert [72]. Ähnliche Ergebnisse stammen von Jacobsen *et al.*, die optimale Kulturbedingungen für verschiedene Populationen der primitiven und frühen Vorläuferzellen untersucht haben [166]. Eaves *et al.* entwickelten schließlich ein Modell, mit dessen Hilfe die Expansion wenig ausdifferenzierte Zellen unter Erhalt ihrer Qualität möglich werden sollte. Grundlage dabei ist eine Signalschwellenwertkonzentration, d. h. die Anzahl der wirksamen Ligand/Rezeptor Komplexe (siehe Abbildung VI-15). Wird diese unterschritten, z. B. durch Verminderung der Rezeptorexpression, Depletion des Signalmoleküls oder Abschwächung der intrazellulären Signalweiterleitung, so kommt es zur Ausdifferenzierung der Zellen. Wird der Schwellenwert des Ligand/Rezeptor Signalkomplexes überschritten, z. B. durch Affinitätsänderungen der Wechselwirkung, eine lokal erhöhte Ligandenkonzentration durch Präsentation mittels ECM Komponenten, oder durch komplementär wirkende

Signalwege, dann geht der Trend in Richtung Selbsterneuerung, also der Proliferation unter Erhalt der Zellqualität [66].

Dieses Modell könnte erklären, warum Veränderungen in der CAFC Expansion zu beobachten sind, wenn die Konzentration an löslichen Faktoren verändert wird, entweder durch eine verminderte Zellzahlen, kurze Konditionierungszeiträume, oder durch die Verdünnung des Mediums. Ein entscheidender Schwellenwert der Ligand/Rezeptor Konzentration scheint dann unterschritten zu sein, die frühen Vorläufer beginnen, auszudifferenzieren. An dieser Stelle sollte bereits vorweggreifend auf das Ergebnis eines Fütterungsexperimentes hingewiesen werden (Abbildung VII-15). Auch hier wird durch täglichen Austausch des *in situ* konditionierten Mediums durch frisches Medium ein Signalschwellenwert unterschritten, die CAFC beginnen auszudifferenzieren.

Was macht die Konkurrenz?

Ploemacher *et al.* erzielten mit einer 50%igen SCM-Lösung von murinen (FBMD-1) oder humanen (L87/4 und L88/5) stromalen Zelllinien maximale Expansionen der CFC um Faktor 12-14 gegenüber dem Ausgangswert [142]. Dabei enthielt das Basismedium IMDM 2% Pferdeserum und relativ hohe Konzentrationen von fünf bis sechs verschiedenen Cytokinen (SCF 100ng/mL, IL-3 30ng/mL, IL-6 2000U/mL, IL-11 1µg/mL, GM-CSF 1µg/mL und G-CSF 1µg/mL). In den oben dargestellten Experimenten konnte im Mittel eine relative Steigerung der Expansion der CFC von Faktor 2 erzielt werden, entsprechend einer Gesamtexpansion von ca. Faktor 22. Die CAFC wurden von Ploemacher *et al.* um Faktor 2,2 (SCM von FBMD-1) bzw. Faktor 4,5 und 4,9 (SCM von L87/4 und L88/5) vermehrt. In dieser Arbeit ist es gelungen, die CAFC relativ um bis zu Faktor 2, in einigen Fällen um bis zu über Faktor 5, entsprechend Faktor 15-37 zu vermehren, also eine klare Steigerung gegenüber der Konkurrenz. Eine andere Gruppe um Smith *et al.* nennt keine Expansionsfaktoren, sondern beschreibt lediglich eine Zunahme der MNZ Expansion in SCM von 200% relativ zur Expansion in Basismedium. Ein zusätzlicher Effekt auf CAFC gegenüber der Referenz konnte nicht beobachtet werden. Das Medium enthielt 10% FCS und 10% HS [140]. Forman *et al.* konnten eine Abhängigkeit der Frequenz CD34-positiver Zellen von der Konzentration des eingesetzten SCM feststellen, haben aber leider keine Expansionen von CFC und CAFC ermittelt [139]. Andere gehen bei der Betrachtung des SCM Effektes nicht konkret auf Expansionen und Frequenzen ein [143, 146], oder beschäftigen sich eher mit Migrationsprozessen der HSPC [95].

Wie geht es weiter?

Um der Identität der stromalen, unterstützenden Faktoren auf die Spur zu kommen, bedarf es der Anwendung molekularbiologischer Techniken. Erste Versuche, die konditionierten Medien durch Filtration zu Fraktionieren, scheiterten an dem Proteingehalt des Basismediums.

Strategien zur Aufklärung der stofflichen Identität des sog. „Faktor X“ werden im folgenden Kapitel beschrieben.

VI.2. PROTEINFREIE KONDITIONIERTE MEDIEN

Anhand der oben dargestellten Experimente konnte gezeigt werden, dass die förderliche Wirkung des Stroma konditionierten Mediums auf die Expansion von HSPC auf lösliche, sekretierte Faktoren zurückzuführen ist.

Deren gezielte Charakterisierung und Identifizierung ist mit herkömmlichen Methoden sehr aufwendig. Dies liegt zum einen in der großen Anzahl, aber auch in der enormen Vielfalt der Proteine, die von einer Zelle produziert werden, begründet, auch wenn sich die Proteom-Analyse in diesem Fall lediglich auf sekretierte, also in das umgebende Kulturmedium abgegebene, Faktoren beschränkt. Erschwerend hinzu kommt, dass stromale Zellen in der Regel in Medien mit relativ hohen Serumkonzentrationen (bis zu 20%) kultiviert werden, sodass die darin enthaltenen Serumbestandteile eine Identifizierung der Stroma-Proteine weiter verkomplizieren.

Das Proteom, begrifflich erst im Jahre 1995 geprägt, ist nicht nur die Summe der von einer Zelle produzierten Proteine. Vielmehr stellt die Proteom-Analyse eine Verbindung zwischen Genregulation, Transkription und Translation bzw. Endprodukt, also dem z. T. vielfach modifizierten Protein her. Es kann davon ausgegangen werden, dass pro Gen drei oder mehr Proteinformen gebildet werden können. Allein auf post-translationaler Ebene existieren wahrscheinlich bis zu 200 Möglichkeiten der Proteinmodifikation, wie z. B. Glykosylierung, Phosphorylierung, Acetylierung, Sulphatierung oder Ubiquitinierung. Zudem können Proteine dimerisieren oder größere Proteinkomplexe bilden. Dazu muss bedacht werden, dass die Zelle in der Lage ist, dynamisch auf veränderte Umweltafordernungen zu reagieren, sich also durch Ausnutzen der beschriebenen Mechanismen auf genetischer und Proteinebene anzupassen.

Für den hier beschriebenen Ansatz wird die Akkumulation sekretierter Proteine im konditionierten Medium über einen verhältnismäßig langen Zeitraum, ca. 120 Stunden, bestimmt. Es handelt sich demnach nicht um eine Momentaufnahme des Proteingehaltes der einzelnen Zellen. Betrachtet man vergleichend die Proteinsekretionsmuster verschiedener stromaler Fibroblastenzellen, so müssen die jeweiligen Unterschiede besonders deutlich ausgeprägt sein, um sie detektierbar zu machen. Denn Variationen der Expressionsdynamik und -stärke werden innerhalb eines Zeitraums von 120 Stunden schnell verwischt.

Es bedarf üblicherweise eines relativ hohen technischen Aufwandes, um komplexe Proteingemische, die zusätzlich große Mengen Serum enthalten, zu trennen, die einzelnen

Komponenten zu visualisieren, zu identifizieren und später funktional zu charakterisieren. Übertragen auf die Analyse von Medienüberständen zur Identifizierung HSPC-förderlicher Proteine bedeutet das, dass man bereits vor der Untersuchung genau wissen muss, wonach man sucht, um eine entsprechende optimierte Aufreinigungen durchführen zu können. Kandidatenproteine wären in diesem Fall schon bekannt, man könnte lediglich ihre An- oder Abwesenheit in dem entsprechenden SCM feststellen und evtl. ihre Konzentration bestimmen.

Die murine Fibroblasten-Zelllinie MS-5 wurde bereits auf vielfältige Art untersucht, stets mit dem Ziel, ihrer positiven Wirkung auf HSPC eine stoffliche Identität zu geben. Im Jahre 1995 haben Kobari *et al.* mit Hilfe von Northernblot und RT-PCR die Transkripte verschiedener, bereits bekannter Wachstumsfaktoren in MS-5 untersucht. Sie konnten jedoch keinem dieser Faktoren die besondere biologische Wirkung der MS-5 Zellen, im Vergleich zu anderen stromalen Zellen, zuordnen. Zudem haben etliche Studien gezeigt, dass es nur eine sehr schwach Korrelation zwischen mRNA und dem Proteinexpressionslevel gibt. Nishi *et al.* haben 1997 versucht, mit Hilfe verschiedener Chromatographie-Techniken SCM-Fractionen zu gewinnen, die die biologisch wirksame Substanz enthalten. Bis auf die bereits bekannten Faktoren SCF und G-CSF konnten keine weiteren Substanzen identifiziert werden. 1999 wurde von Tordjman *et al.* die *gene trap strategy* eingesetzt, um gezielt sekretierte und Transmembranmoleküle zu detektieren. Dabei wurde der Oberflächenrezeptor Neuropilin-1 identifiziert. Im Jahr 2000 haben Han *et al.* mittels Westernblot und immunohistochemischen Färbungen MS-5 Zellen auf die Expression von Delta-like-1 Protein untersucht.

Diese Beispiele zeigen, dass bisherige Versuche, der biologischen Wirkung der MS-5 Zelllinie eine molekulare Grundlage zu verschaffen, relativ aufwendig waren und z. T. auf genetischer Ebene erfolgten. Die Erfolge sind dabei, verglichen mit dem hohen technischen und zeitlichen Aufwand, eher unspektakulär.

In dieser Arbeit wurde eine innovative Möglichkeit zur Detektion und Identifizierung stromaler, die Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen unterstützender Produkte etabliert. Der kritischste und entscheidende Punkt war dabei, vollständig auf den Zusatz von sonst üblichen 10-20% Serum zur Kultivierung stromaler Fibroblasten zu verzichten. Aus den Erfahrungen heraus, die bei der Filtration des proteinhaltigen Mediums X-Vivo 10 gewonnen wurden, wurde sogar auf jegliche Mediumproteine verzichtet. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die im konditionierten Medium enthaltenen Proteinen ausschließlich von stromalen Zellen herrührten, und nicht etwa von Medium- oder Serumkomponenten. Eine aufwendige Probenaufarbeitung sollte dadurch unnötig sein.

Praktische Durchführung:

Zunächst wurden die stromalen Zelllinien, SI/SI und MS-5, in proteinfreiem Medium kultiviert (in Vorversuchen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen proteinfreiem SCM von M2-10B4 mod. und MS-5 festgestellt werden, daher werden im Folgenden lediglich SI/SI und MS-5 untersucht). In den so gewonnenen SCM folgte anschließend eine Kultivierung von HSPC, deren Expansion und biologische Qualität nach Ende der Kultur analysiert wurde. Gleichzeitig wurde jeweils eine Probe des entsprechenden SCM gelelektrophoretisch und massenspektrometrisch untersucht. Da die stromalen Zellen ohne jegliche Protein- und Serumbestandteile kultiviert wurden, enthielten die Medienüberständen lediglich die von den Zellen produzierten und sekretierten Substanzen. Nachdem Salze und weitere niedermolekulare Substanzen mittels Gelfiltration aus den Medien entfernt worden waren, wurden die verbliebenen, gereinigten Proteine aufkonzentriert. Es folgte eine Auftrennung der jeweiligen Proteingemische mittels 2D-Gelelektrophorese, und die Identifizierung von Kandidatenproteinen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Eine biologische, HSPC-unterstützende Funktion konnte auf die oben beschriebene Weise bis auf ihre molekulare Ebene verfolgt werden.

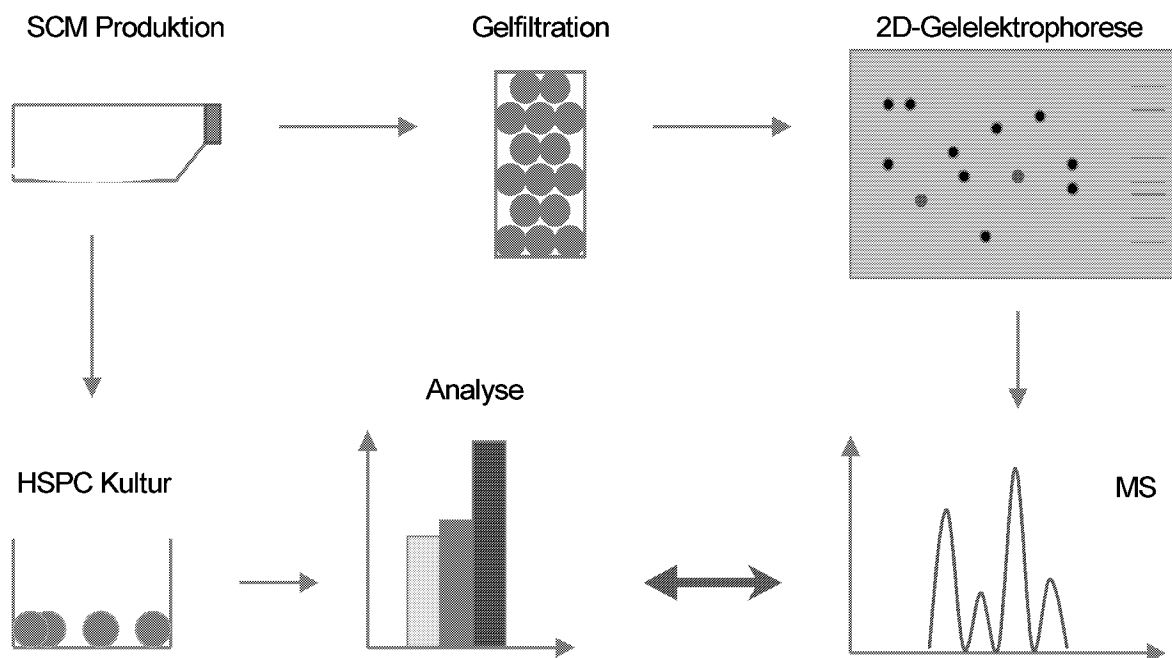


Abbildung VI-16: Schema der Aufarbeitung, Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatenproteinen aus SCM

VI.2.1. Kultivierung in proteinfreien SCM

Wachstum stromaler Zellen in proteinfreien Medien

Zur Herstellung des proteinfreien SCM standen zwei Medien, ProCHO4-CDM und SMIF-6, zur Verfügung. ProCHO4-CDM enthält das niedermolekulare Protein Insulin (5µg/mL), SMIF-6 ist vollständig frei von Proteinen. ProCHO4-CDM ist demnach ein definiertes Medium, wird allerdings vom Hersteller selbst und in dieser Arbeit als proteinfrei bezeichnet, um es von X-Vivo 10 abzuheben. In einem Vorversuch sollte die grundsätzliche Eignung der beiden Medien zur Kultur von stromalen Zellen analysiert werden. Dazu wurden nicht bestrahlte SI/SI in beiden Medien kultiviert und die Expansion der Zellen nach 120 und 216 Stunden ermittelt. In jedem Fall war es notwendig, die Zellen zunächst in serumhaltigem Medium zu adhären und erst nach erfolgter Anheftung der Zellen zur Kultivierung in proteinfreiem Medium überzugehen.

Tabelle VI-15: Expansionsfaktoren der SI/SI in zwei proteinfreien Medien

Dauer [h]	ProCHO4	SMIF-6
120	6,2	3,6
216	8,5	4,4

Nicht nur die höheren Expansionsfaktoren, sondern auch die deutlich bessere optische Qualität der Zellen gab den Ausschlag für die Verwendung des ProCHO4-CDM Mediums in allen folgenden Versuchen. Obwohl das Wachstum der stromalen Zellen in diesen beiden Medien deutlich geringer ist als in X-Vivo 10 oder IMDM/10%FCS, wurden die oben für proteinhaltiges Medium beschriebenen optimierten Bedingungen für die Herstellung von SCM übernommen. Denn das Ziel dieses Teilprojektes war nicht die Optimierung der Bedingungen in proteinfreier Kultur, sondern die Analyse der Zelllinien spezifischen Qualitätsunterschiede des SCM.

Wachstum von HSPC in proteinfreien Medien

Da sich proteinfreie Medien grundsätzlich nur schlecht bis überhaupt nicht zur Kultivierung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen eignen, wurden zu deren Kultur in ProCHO4-CDM zusätzlich, neben den stets supplementierten Cytokinen, die Proteine Transferrin (31µg/mL) und Albumin (1mg/mL) zugesetzt. Ein Vergleich der MNZ-

Expansionen in X-Vivo 10 und ProCHO4-CDM, letzteres jeweils mit (+) und ohne Protein-zusatz, zeigte, dass HSPC in den ProCHO4-CDM-Varianten wesentlich weniger stark proliferierten als in dem speziell für ihre Expansion entwickelten X-Vivo 10.

Der positive Effekt der zugesetzten Proteine war nur minimal und führte nicht zu einer wesentlichen Steigerung der Proliferation im Vergleich zur proteinfreien Variante des Mediums. X-Vivo 10 lieferte erwartungsgemäß im Hinblick auf die Expansion sowohl der MNZ als auch der CFC erheblich bessere Ergebnisse. Die analysierte Frequenz der CAFC unterscheidet sich hingegen nicht und deutet daher auf einen Erhalt der Qualität unter verminderter Proliferation hin.

Tabelle VI-16: Expansion bzw. Frequenz der betrachteten Subpopulationen in unterschiedlichen Medien

Kultivierungsmedium	MNZ-Expansion [-]	CFC-Expansion [-]	CAFC-Frequenz [%]
X-Vivo 10	35	11	13
ProCHO4-CDM	3,8	1,5	16
ProCHO4-CDM+	4,7	1,5	13

Die im Folgenden beschriebenen Kultivierungsversuche wurden unter Verwendung des proteinsupplementierten Mediums (ProCHO4-CDM+) durchgeführt. Die Expansion der mononukleären Zellen in diesem Medium liefert eine für ihre Charakterisierung ausreichende Zellmenge.

Wachstum und Qualität der HSPC in unterschiedlichen SCM

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen optimierten Bedingungen zur Herstellung von SCM wurden auf die Verwendung von proteinfreiem Medium übertragen:

Bevor hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen in den auf diese Weise produzierten SCM oder dem Basismedium ProCHO4-CDM kultiviert wurden, wurden die Medien mit den üblichen Cytokinen und den Proteinen Transferrin und Albumin supplementiert. Die übrigen Kultivierungsparameter sind ausführlich in Kapitel IV erläutert. Referenzkultur ist in diesem Fall eine Suspension auf ProCHO4-CDM+ Basis.

Das Ergebnis der Kultivierung von HSPC in SCM von SI/SI und MS-5 ist im Vergleich zur Kultur in Basismedium in Abbildung VI-17 dargestellt. Betrachtet man die Mittelwerte von

drei unabhängigen Versuchen, so fällt deutlich das besonders gute Abschneiden des SCM von MS-5 auf. Wurden hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen in konditioniertem Medium dieser Zelllinie kultiviert, so expandierten die MNZ absolut um Faktor 13,6, die CFC um Faktor 4,2, und die Menge der CAFC konnte um Faktor 1,7 gesteigert werden. Im Vergleich zum Basismedium ohne stromale Faktoren ergeben sich relative Expansionsfaktoren von 2,0 (MNZ), 4,8 (CFC) und 2,2 (CAFC). Die Expansion der MNZ in SCM von SI/SI kann hingegen im Vergleich zum Basismedium nicht weiter gesteigert werden (Abbildung VI-18). Kolonie-bildende Zellen und die frühen Vorläuferzellen weisen sogar reduzierte relative Expansionen auf (CFC: Faktor 0,5; CAFC: Faktor 0,1).

Tabelle VI-17: Parameter zur Herstellung von SCM mit Protein freiem Medium

Parameter	
Zellen	SI/SI und MS-5, bestrahlt
Medium	ProCHO4-CDM
Zellkonzentration	4,0E+04c/mL
Kulturvolumen	10mL
Kultursystem	T25 Gewebekulturflasche
Kulturdauer	120h

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die stromale Zelllinie MS-5 im Gegensatz zu der ebenfalls betrachteten Zelllinie SI/SI Faktoren ins Medium sekretiert, die sich auf die Expansion der untersuchten Zellpopulationen deutlich positiv auswirken.

Da die Proliferation der Zellen z. T. auf Kosten ihrer Qualität stattfindet, es jedoch Ziel der Kultivierungsstrategie ist, Zellen hauptsächlich unter Erhalt ihrer Qualität zu vermehren, wurden ebenfalls die jeweiligen Frequenzen der CFC und CAFC betrachtet. Dies ermöglicht eine Aussage über den Anteil der vermehrten Zellen, die noch zur Bildung von Kolonien bzw. *cobblestone areas* in der Lage sind, also in ihrer Differenzierung noch nicht so weit fortgeschritten sind (vergleiche Kapitel I, Abbildung I-2).

Tabelle VI-18: Frequenzen der untersuchten Populationen in unterschiedlichen Medien [%]

Population	ProCHO4-CDM	SCM SI/SI	SCM MS-5
CFC	4,2	0,4	13
CAFC	6,5	0,1	11

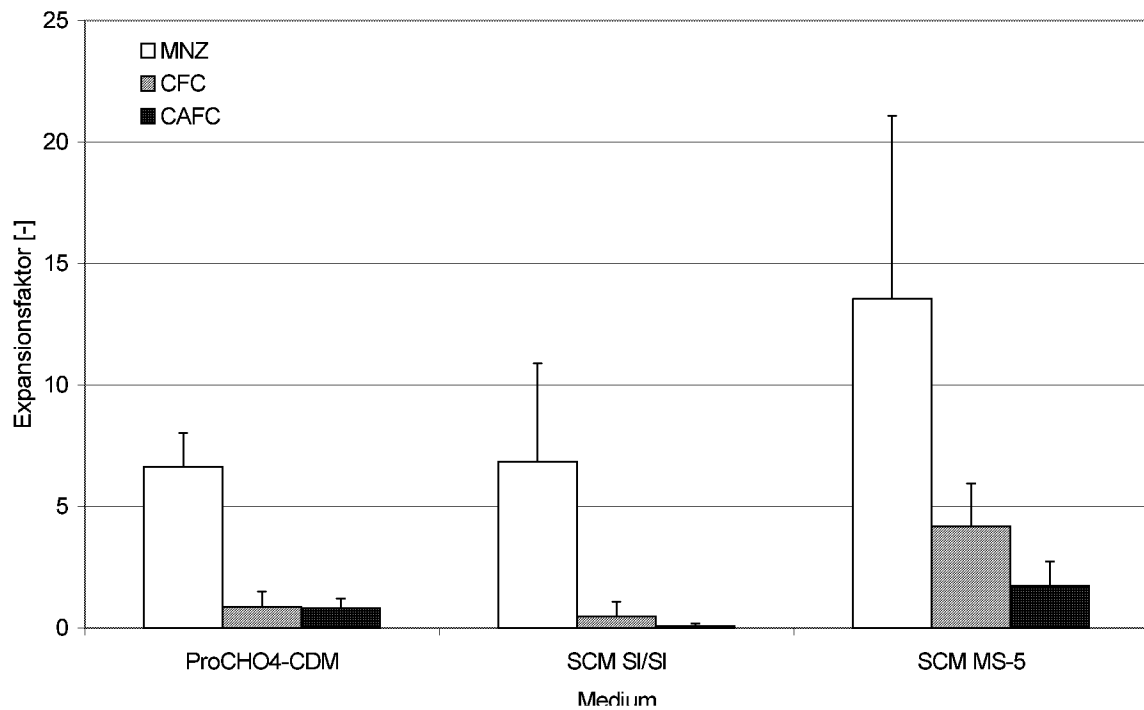


Abbildung VI-17: Expansionen der MNZ, CFC und CAFC in SCM von SI/SI und MS-5 (Mittelwerte aus drei Kultivierungen)

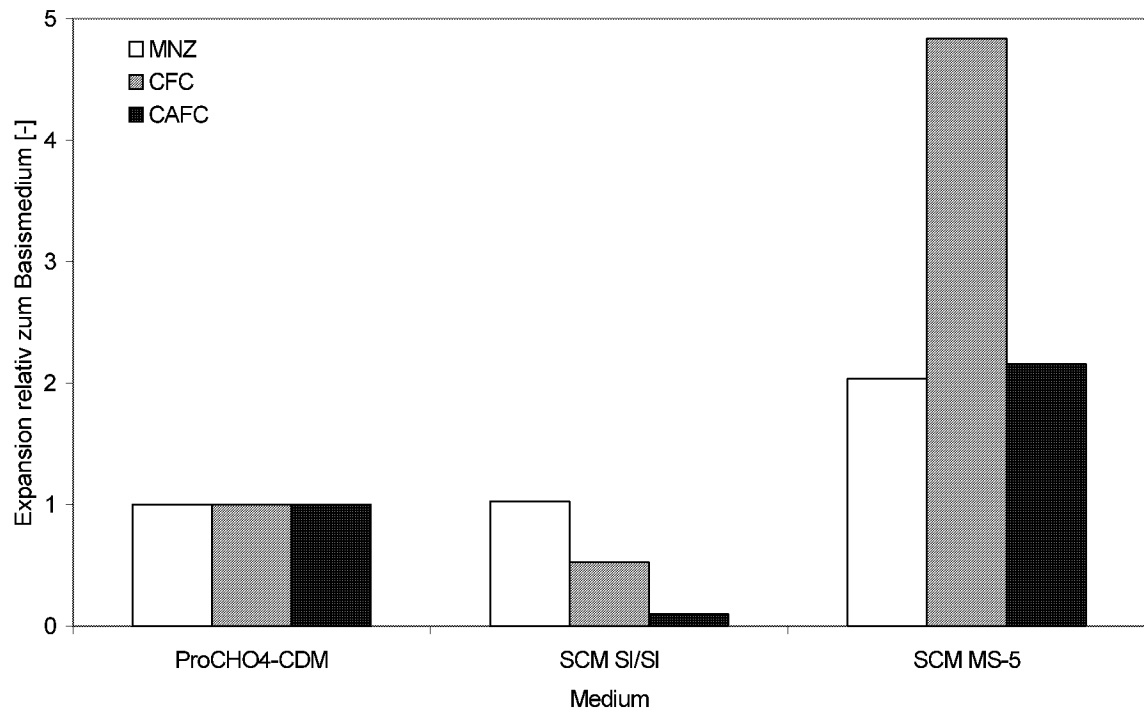


Abbildung VI-18: Relative Expansionsfaktoren der MNZ, CFC und CAFC in verschiedenen SCM im vergleich zum Basismedium

Proteinanalytik

Die Kultivierung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen in verschiedenen SCM und nachfolgende Betrachtung des proliferativen Verhaltens der Zellen und die Analyse ihrer Qualität hat ergeben, dass SCM der Zelllinie MS-5 eindeutig besser abschneidet als das der stromalen Linie SI/SI.

Um der stofflichen Natur dieser überlegenen Wirkung auf die Spur zu kommen, wurde das Proteinsekretionsmuster der beiden Zelllinien verglichen. Dabei wurde angenommen, dass MS-5 positive, HSPC-unterstützende Faktoren produziert, die im SCM der SI/SI fehlen oder in nicht detektierbaren Mengen vorhanden sind. Die Sekretionsmuster der Zellen sollten sich, analog der biologischen Wirkung ihrer SCM, unterscheiden. Diese Strategie der differentiellen Analyse wurde schon erfolgreich von anderen Gruppen eingesetzt, um gezielt Unterschiede im Sekretionsmuster von Zellen zu detektieren [167, 168].

Aufreinigung der Proteine aus SCM

Zunächst wurden die gewonnenen SCM säulenchromatographisch von Salzen und weiteren niedermolekularen Substanzen gereinigt. Die einzelnen Fraktionen dieser Aufreinigung wurden zur Kontrolle der Reinigungseffizienz und zur Detektion möglicher Proteinverluste einzeln aufkonzentriert und elektrophoretisch unter Verwendung eines Bis-Tris-Gradientengeles (4-12% Acrylamid) analysiert.

In der unten dargestellten Abbildung entspricht Fraktion 1 der Proteinfraktion, die sämtlich die auf die Säule aufgebracht und entsalzten Proteine enthalten sollte (Eluat). Die folgenden Fraktionen 2 und 3 entsprechen der anschließenden Säulenäquilibration und sollten keine Proteine mehr enthalten, sondern lediglich die zuvor in den Gel-Poren zurückgehaltenen Salze, die erst durch die Äquilibration ausgespült werden.

Es zeigt sich, dass tatsächlich ausschließlich das Eluat Proteine enthält, wohingegen in den Äquilibrationsfraktionen kein Protein nachweisbar ist, es demnach nicht zu deutlichen Verlusten gekommen ist und die Proteine tatsächlich vollständig von der Säule eluiert wurden. Die erfolgreiche Entsalzung der Medien konnte durch Bestimmung der Osmolalitäten der einzelnen Fraktionen nachgewiesen werden. Sie lagen in der ersten (Protein-) Fraktion zwischen 20 und 40 mOsmol/kg, wohingegen in der zweiten (Äquilibrations-) Fraktion Werte zwischen 120 und 160 mOsmol/kg gemessen wurden. Die Säulenchromatographie erwies sich demnach als einfache und schnelle Methode zur Probenaufarbeitung. Das auf diese Weise vorbehandelte Proteingemisch ließ sich problemlos und mit guter Qualität gelelektrophoretisch trennen, einzelne Proteinbanden sind deutlich sichtbar.

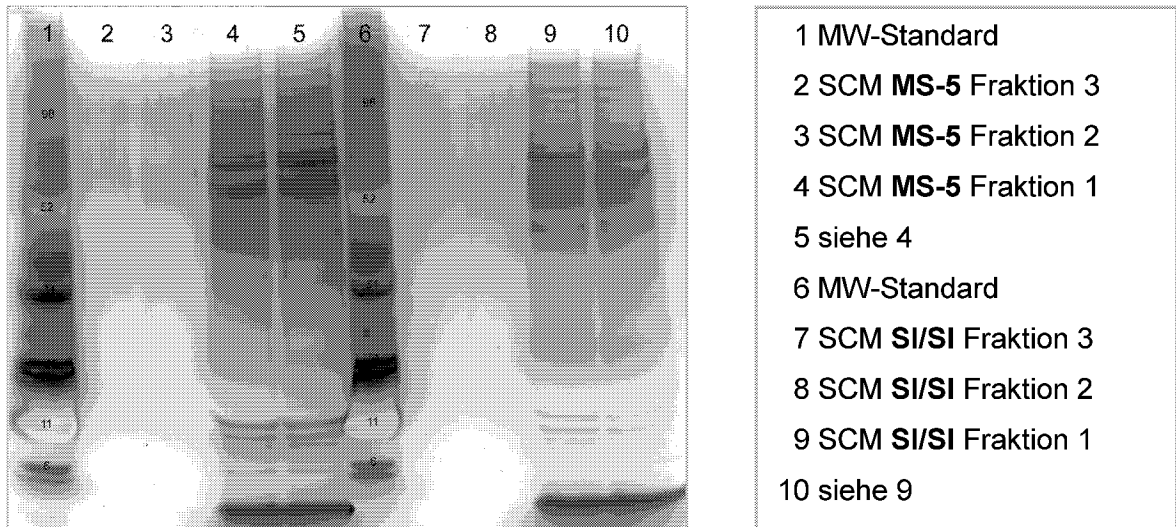


Abbildung VI-19: 1D-Gel von SCM-Proben der Zelllinien SI/SI und MS-5 nach Gelfiltration

1D-Gelelektrophorese

Für eine genauere Betrachtung des Proteingehaltes der beiden SCM wurden zunächst weitere eindimensionale SDS-PAGE angefertigt. Die Trennung des Proteingemisches erfolgt hierbei ausschließlich aufgrund der Molekülgröße. SDS bindet an die Proteine, hebt dadurch deren Eigenladung und Faltung auf und sorgt für eine einheitliche Wanderung der nun stark negativ geladenen, gestreckten Proteine in Richtung Anode. Größere SDS-Protein Komplexe werden im Acrylamid-Netzwerk zurückgehalten, kleinere Moleküle können das Netzwerk besser durchdringen. Der Grad der Vernetzung kann durch Veränderung der Acrylamid-Konzentration variiert werden. Dadurch erreicht man eine optimierte Anpassung der Porengröße, entsprechende der Molekülgröße, die betrachtet werden soll. Für kleine Proteine wählt man vorzugsweise höherprozentige Gele, um die Auflösung der Trennung zu verbessern.

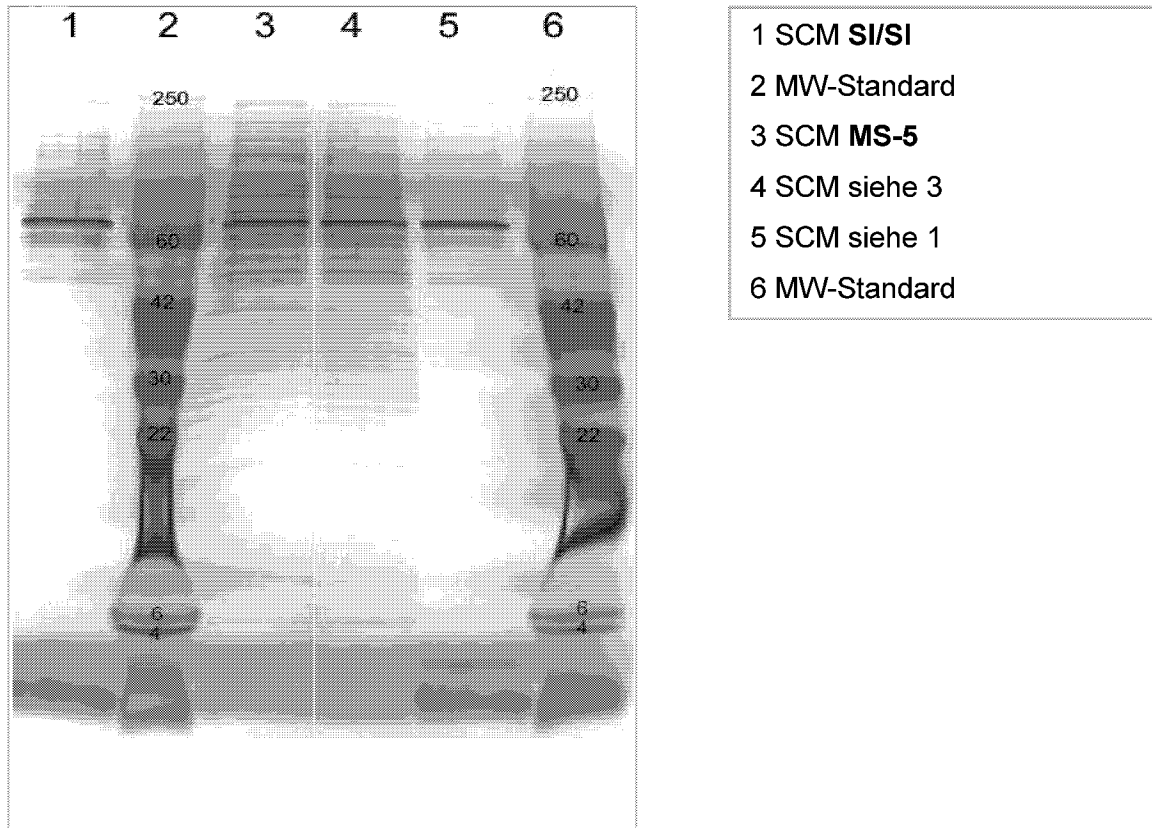


Abbildung VI-20: 1D-Gel von SCM-Proben der Zelllinien SI/SI und MS-5 (homogenes Gel)

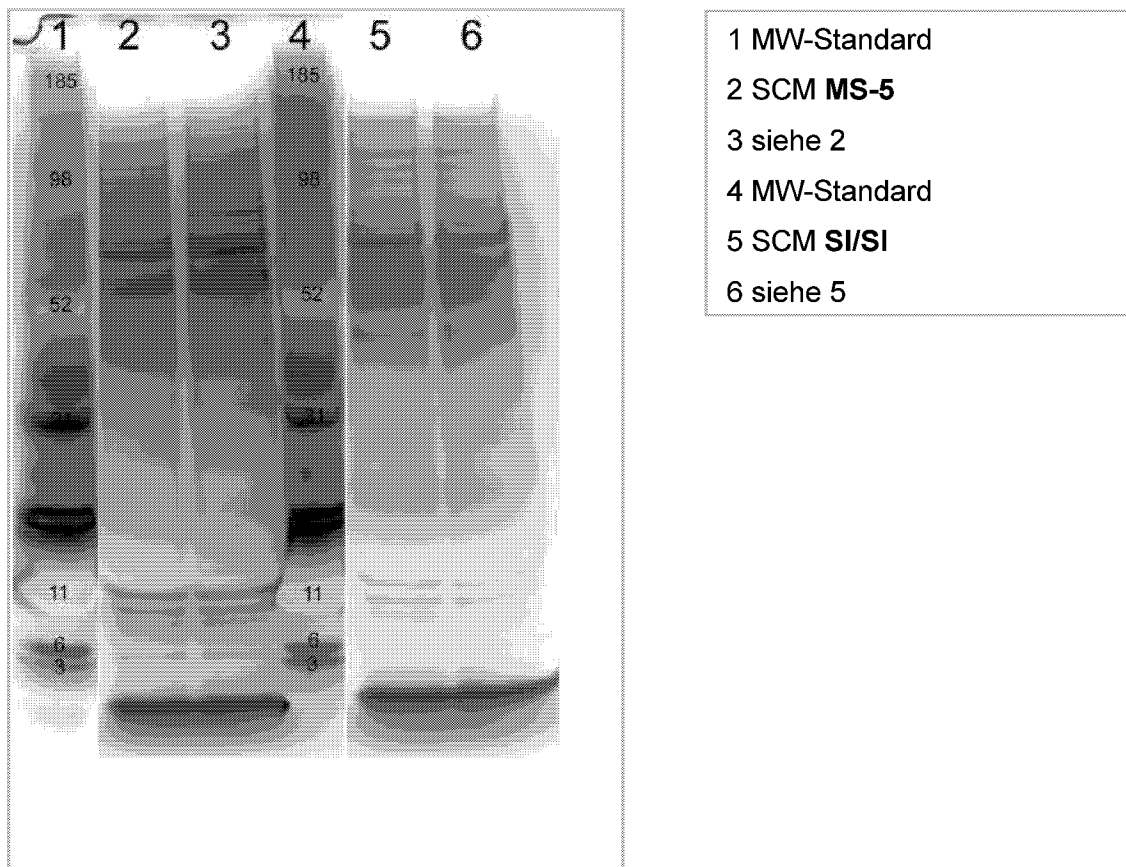


Abbildung VI-21: 1D-Gel von SCM-Proben der Zelllinien SI/SI und MS-5 (Gradienten-Gel)

In Abbildung VI-20 sind die in SCM von SI/SI und MS-5 enthaltenen Proteine vergleichend dargestellt. Die Trennung des Molekülgemisches erfolgte in einem homogenen, 18%igen SDS-Acrylamidgel. Mittels Silberfärbung wurden die einzelnen Proteinbanden sichtbar gemacht. Bei der Betrachtung des abgebildeten Gels fällt zunächst auf, dass die SCM beider Zelllinien eine ganze Reihe unterschiedlicher Proteine enthalten, deren Molekulargewichtsverteilung eine relativ große Spanne umfasst. Der Hauptanteil der Proteine liegt zwischen ca. 50-100kDa. Das SCM der MS-5 enthält bei gleicher Proteinmenge zusätzlich einen größeren Anteil kleiner Proteine. Ihr Molekulargewicht liegt unterhalb von ca. 42kDa, ein Bereich, in dem viele Signalmoleküle (Cytokine, Chemokine) zu finden sind. Erfreulich ist insgesamt, dass die relativ hohe Anzahl und Größenvielfalt der detektierten Proteine in SCM eine weitere Betrachtung mittels 2D-Gelelektrophorese lohnend macht.

Zunächst wurde jedoch zur noch genaueren Analyse der Proteinmuster ein Gradienten-Gel verwendet. Hier nimmt die Acrylamid-Konzentration kontinuierlich von 4% bis auf 12% zu, die Porosität des Netzwerkes nimmt entsprechend ab. Dadurch erreicht man eine weitere Schärfung der Proteinbanden und eine besonders gute Trennung kleinerer Moleküle. Betrachtet man Abbildung VI-21 und vergleicht die entsprechenden Bandenmuster mit dem Gel in Abbildung VI-20, so fällt auf, dass im Gradienten-Gel zusätzlich Banden kleiner Proteine auftauchen. Diese sind bei gleicher Gesamtproteinkonzentration erneut im SCM von MS-5 stärker ausgeprägt. Ihre Größenverteilung liegt zwischen ca. 3kDa und 11-12kDa. Da anzunehmen ist, dass Signalmoleküle eher im Bereich niedriger Molekülgrößen zu finden sind, ist die Aufklärung der Identität dieser Proteine von besonderem Interesse.

2D-Gelelektrophorese

Mithilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese kann ein heterogenes Proteingemische nach einem zusätzlichen physiko-chemischen Parameter aufgetrennt werden – dem Isoelektrischen Punkt der Proteine. Der Isoelektrische Punkt (IEP) eines Proteins wird definiert durch den pH-Bereich, an dem die Nettoladung des Proteins gleich null ist, es sich deshalb in einem elektrischen Feld nicht mehr bewegt. Native Proteine unterschiedlicher Ladungszustände wandern in einem pH-Gradienten bei angelegter Spannung, entweder Richtung Anode oder Kathode, bis zu ihrem IEP. Bei den hier verwendeten pH-Gradienten-Gelen (sog. IPGstrips) handelt es sich um immobilisierte Gradienten. Dazu werden schwach basische oder saure Immobiline (sie tragen entweder eine Carboxy- oder Aminogruppe) mit den Acrylamid-Monomeren co-polymerisiert. Das Mischungs-

verhältnis der verwendeten Immobiline, die über jeweils unterschiedliche pK-Werte verfügen, entscheidet über den eingestellten pH-Bereich.

In einem Vorversuch wurden die Proteine einer SCM-Probe entsprechend ihres IEP getrennt. Um die Güte der Trennung, also das entstandene Bandenmuster auf den IPGstrips beurteilen zu können, wurden diese mit einer Violet-17 Färbelösung eingefärbt. Die Proteine hatten sich an verschiedenen Stellen des immobilisierten pH-Gradienten angesammelt, und die sichtbaren Banden waren relativ scharf voneinander abgegrenzt (Daten nicht gezeigt).

Auf diese erfolgreiche Kontrolle folgte zunächst eine 2D-Gelelektrophorese der MS-5 Proteine. In der ersten Dimension, der Trennung entsprechend ihres IEF, wurden die Proteine in IPGstrips mit einem Bereich von pH4 bis pH7 aufgetrennt. Anschließend erfolgte in der zweiten Dimension eine Größentrennung unter Verwendung eines 12-14%igen Gradienten-Gels. Die so entstandenen Proteinspots wurden entweder Coomassie-gefärbt oder mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht.

Betrachtet man vergleichend die beiden in Abbildung VI-22 dargestellten Gele A und B, so fällt sofort der erhebliche Unterschied in der Sensitivität der beiden Färbemethoden ins Auge. Obwohl beide Gele jeweils mit einer relativ hohen Proteinmenge beladen wurden (350µg/Gel), sind nur sehr wenige Spots Coomassie-gefärbt (Gel A), die Anzahl der durch die sensitivere Silberfärbung sichtbaren Proteine ist wesentlich größer (Gel B). Interessanterweise unterscheidet sich die Intensität der Färbung des Molekulargewichts-Standardes (siehe Bandenmuster am rechten Gelrand) in beiden Gelen nicht so ausgeprägt. Die Ursache dafür, warum selektiv die Proteine der SCM-Probe von Coomassie nicht oder nur unzureichend angefärbt wurden, ist nicht bekannt.

Die Silberfärbung des Gels wurde mithilfe des MS-kompatiblen SilverQuest Silver Staining Kits durchgeführt. Um zu testen, ob die vom Hersteller versprochene MS-Kompatibilität tatsächlich gegeben war, wurden einige Proteinspots der SCM-Probe, aber auch des Proteinstandards, ausgestochen, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Das Ergebnis war relativ ernüchternd. Die aufgenommenen Spektren der Proteine enthielten zum einen relativ wenige *peaks*, zum anderen war die Intensität der *peaks* sehr gering, sodass eine eindeutige Identifizierung der Proteine nicht möglich war. Die zwei Proteine des Standards, Triosephosphat-Isomerase (27kDa) und die β -Kette des Insulins (2-3kDa) lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Während das Enzym eindeutig identifiziert werden konnte, war es nicht möglich, die Identität der deutlich kleineren Insulin-Untereinheit zu bestimmen. Die Problematik der Identifizierung kleiner Proteine mittels MS

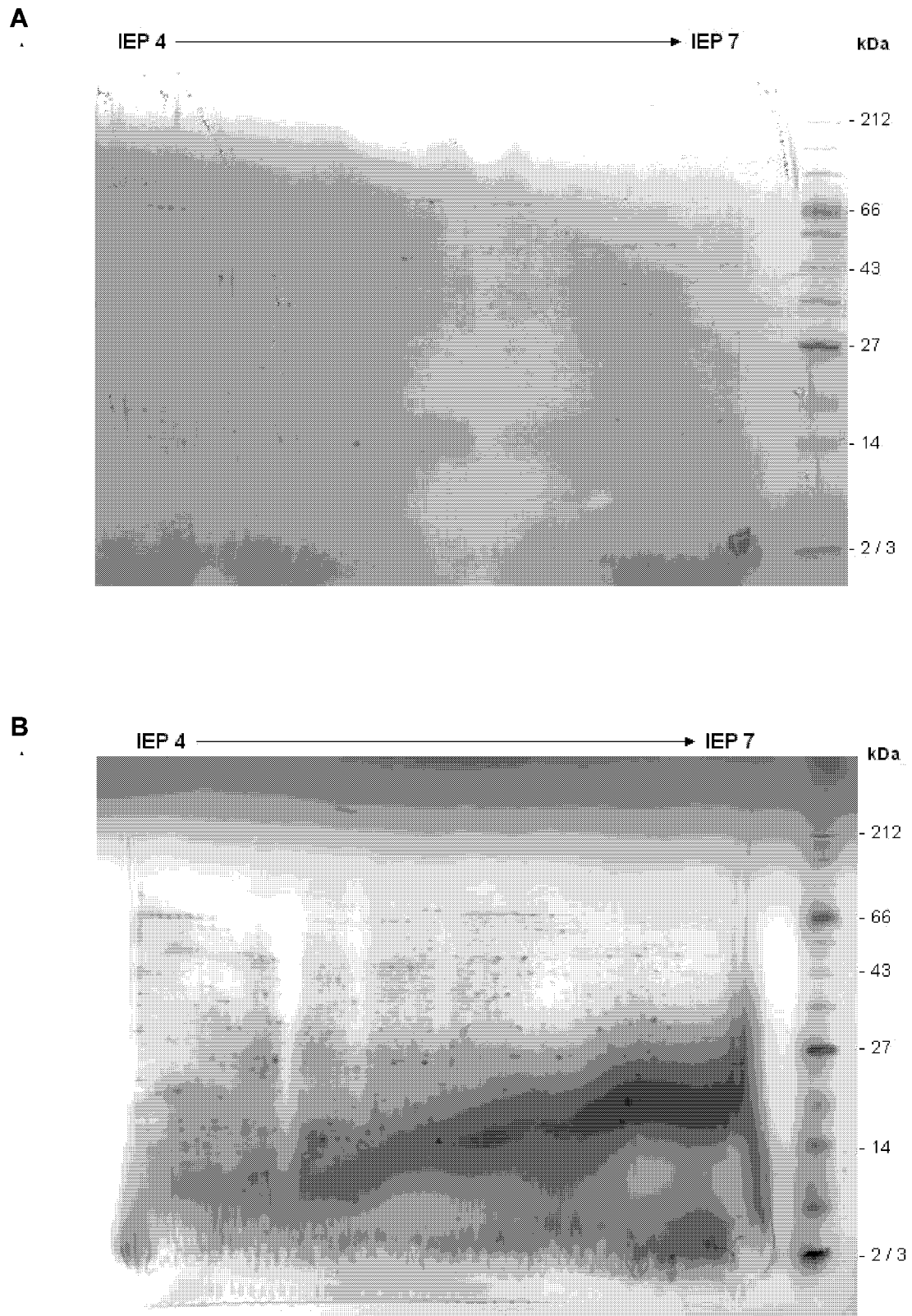


Abbildung VI-22: 2D-Gel von SCM-Proben der Zelllinie MS-5 (A: Coomassie gefärbt; B: Silber gefärbt)

liegt in der geringen Anzahl von Trypsin-Schnittstellen begründet, sodass keine eindeutigen Massenspektren aufgenommen werden können. Da es nicht möglich war, SCM-Proteine nach einer SilverQuest Silver Staining-Färbereaktion massenspektrometrisch zu identifizieren, wurde die Strategie zur Visualisierung und anschließenden Identifizierung, wie weiter unten näher erläutert, verändert.

Zunächst einmal wurden SCM-Proben von SI/SI und MS-5 anhand von 2D-Gelen vergleichend betrachtet. Die Abbildung VI-22 bestätigt die oben gezeigten Ergebnisse der 1D-Gelelektrophorese: SCM der Zelllinie MS-5 enthält eine wesentlich höhere Anzahl an Proteinen, besonders im Bereich kleinerer Moleküle. Zusätzlich lassen sich schwache Proteinspots erkennen, die ihren IEP im eher schwach sauren bis neutralen Bereich (pH 6-7) haben. In der SCM Probe von SI/SI fehlen diese Moleküle oder lassen sich nicht detektieren. Es kommen demnach eine ganze Reihe Kandidatenproteine infrage, die von der Stromalen Zelllinie MS-5, nicht aber von SI/SI produziert und sekretiert werden und aus diesem Grund für die Überlegenheit des MS-5 SCM verantwortlich sein könnten.

Bevor mit der Charakterisierung dieser Kandidaten begonnen wurde, wurde versucht, die Ursache für das Erscheinen von „Perlenketten-Mustern“ zu klären. Betrachtet man die Spots der größeren Proteine in beiden Gelen der zwei SCM, so erkennt man, dass einige Proteine nicht nur einen diskreten Spot erzeugen, sondern vielmehr eine regelrechte Aneinanderreihung, sodass es scheint, als würden sie wie an einer Perlenschnur aufgereiht vorliegen. Die Spots unterscheiden sich nicht wesentlich in ihren apparenten Molekulargewichten, da die Genauigkeit der Trennung in diesem Größenbereich nicht sehr groß ist. Im Gegensatz dazu lässt sich sehr deutlich eine Verschiebung der jeweiligen IEP der einzelnen Spots beobachten. Falls es sich, und das ist sehr wahrscheinlich, jeweils um identische Proteine handelt, ist zu vermuten, dass die Unterschiede im IEP auf Proteinmodifikationen zurückzuführen sind, die zwar eine Änderung der Proteinladung, nicht aber der Masse des Proteins bewirken [169]. Infragekommende Modifikationen sind u. a. Glykosylierung, Phosphorylierung, Hydroxylierung, Prenylierung, Methylierung, ADP-Ribosylierung, Nucleotidylierung, und Acetylierung. Die biologische Bedeutung dieser komplexen Seitenkettenchemie ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Fest steht jedoch, dass alle Aminosäuren Modifikationen tragen können [170].

Für die in dieser Arbeit betrachteten Proben lag es nahe, zu untersuchen, ob die Veränderungen des IEP auf Glykostrukturen unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung zurückzuführen sind. Sekretierte, lösliche Proteine tragen z. T. sehr

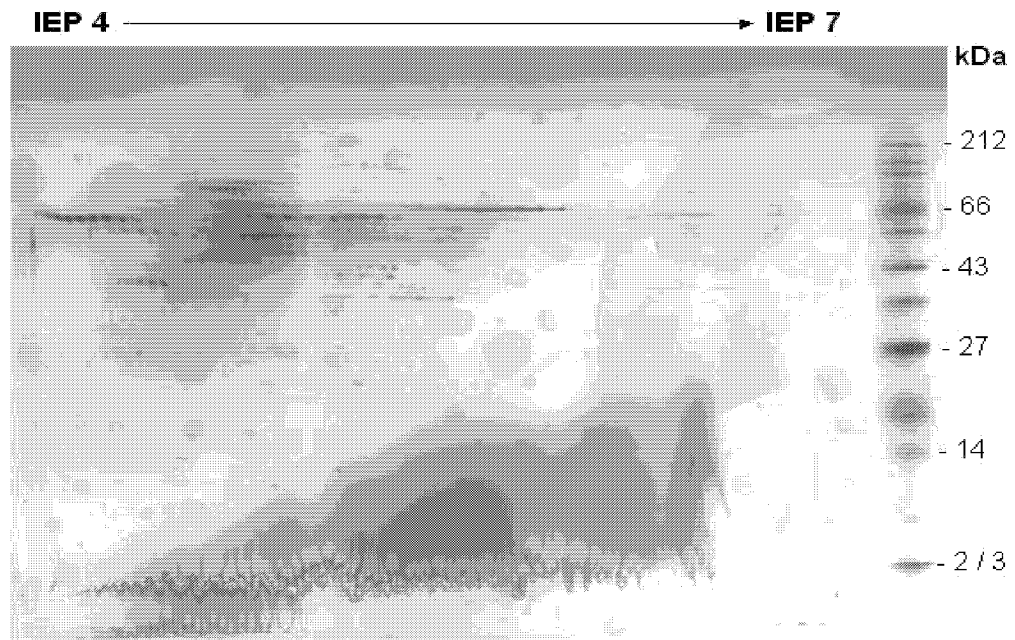


Abbildung VI-23: 2D-Gel einer SCM-Probe der Zelllinie SI/SI (80µg Protein, Silber gefärbt)

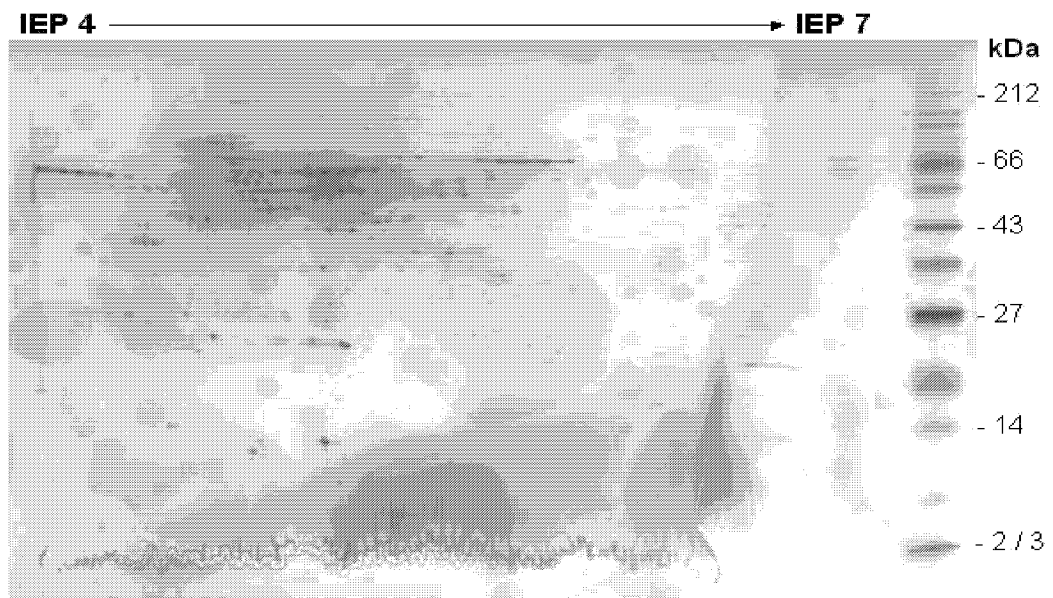


Abbildung VI-24: 2D-Gel einer SCM-Probe der Zelllinie MS-5 (80µg Protein, Silber gefärbt)

komplexe Glykostrukturen, im Gegensatz zu nicht oder nur einfach glykosylierten Proteinen des Cytosols, die max. eine *N*-Acetylglukosamin-Gruppe tragen. Die weitaus häufigste Anknüpfung einer Glykostruktur erfolgt im Endoplasmatischen Reticulum an die NH_2 -Gruppe der Seitenkette des Asparagins, und wesentlich seltener an die Hydroxy-Gruppe der Serin-, Threonin - oder Hydroxylysin-Seitenketten [171].

Um die Glykostrukturen möglichst effizient zu entfernen und dadurch eventuell die Perlenketten-Muster aufzuheben, wurden die Proteine vor ihrer gelelektrophoretischen Trennung mit PNGase F (N-Glykosidase F, Fa. New England BioLabs) behandelt. Dieses Enzym hydrolysiert nahezu alle N-gebundenen Zuckerketten. Dies geschieht durch Spaltung des inneren GlcNAc-Restes von Asparagin [172]. Die nachfolgende 2D-Gelelektrophorese zeigte, dass der Effekt nur minimal war, da nicht, wie erwartet, pro Protein nur noch ein Spot zu sehen war. Vielmehr waren die Spots in einer Art Schmier zusammengelaufen. Die Abspaltung der Glykostrukturen war entweder nicht vollständig, oder weitere, durch die Behandlung mit PNGase nicht entfernte Modifikationen trugen weiterhin zur Variation des IEP bei. Da die Existenz der Perlenketten-Struktur für die Identifizierung interessanter Proteine nicht hinderlich ist und in diesem Fall kein Unterschied zwischen den beiden SCM zu beobachten ist, wurde auf eine weitere Optimierung zur Entfernung dieser Muster verzichtet.

Wie oben und in Kapitel IV bereits ausführlich erläutert, eignen sich die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden der Silberfärbung von 2D-Proteingelen nicht für eine anschließende MS-Analyse. Eine Alternative zur Identifizierung der Proteine wäre ihre Sequenzierung. Dies würde es erfordern, die Proben zunächst vom Gel auf eine Membran zu transferieren. Dazu müsste entweder ein kleiner Bereich des 2D-Geles ausgewählt werden (die Gesamtfläche ist zu groß), oder es könnten lediglich 1D-Gele verwendet werden, wobei in diesem Fall wahrscheinlich relativ viele unterschiedliche Proteine in einer Bande vorliegen. Das erschwert ihre eindeutige Sequenzierung, da diese Methode, im Vergleich zur MALDI-TOF MS, gegenüber Proteingemischen sehr störanfällig ist. Ein weiterer Nachteil ist die relativ hohe Probenmenge, mindestens ca. 50-100pmol Protein pro Spot. Berücksichtigt man noch eventuelle Verluste, die beim Transfer der Proteine auf die Membran auftreten, so würde sich die Gesamtproteinmenge, die auf ein Gel aufgetragen werden müsste, noch erhöhen. Aus diesen Gründen, und weil die Etablierung einer verlässlichen Transfer-Methode für das vorliegende Proteingemisch unter Umständen sehr aufwendig ist, wurde auf eine Sequenzierung der Proteine verzichtet.

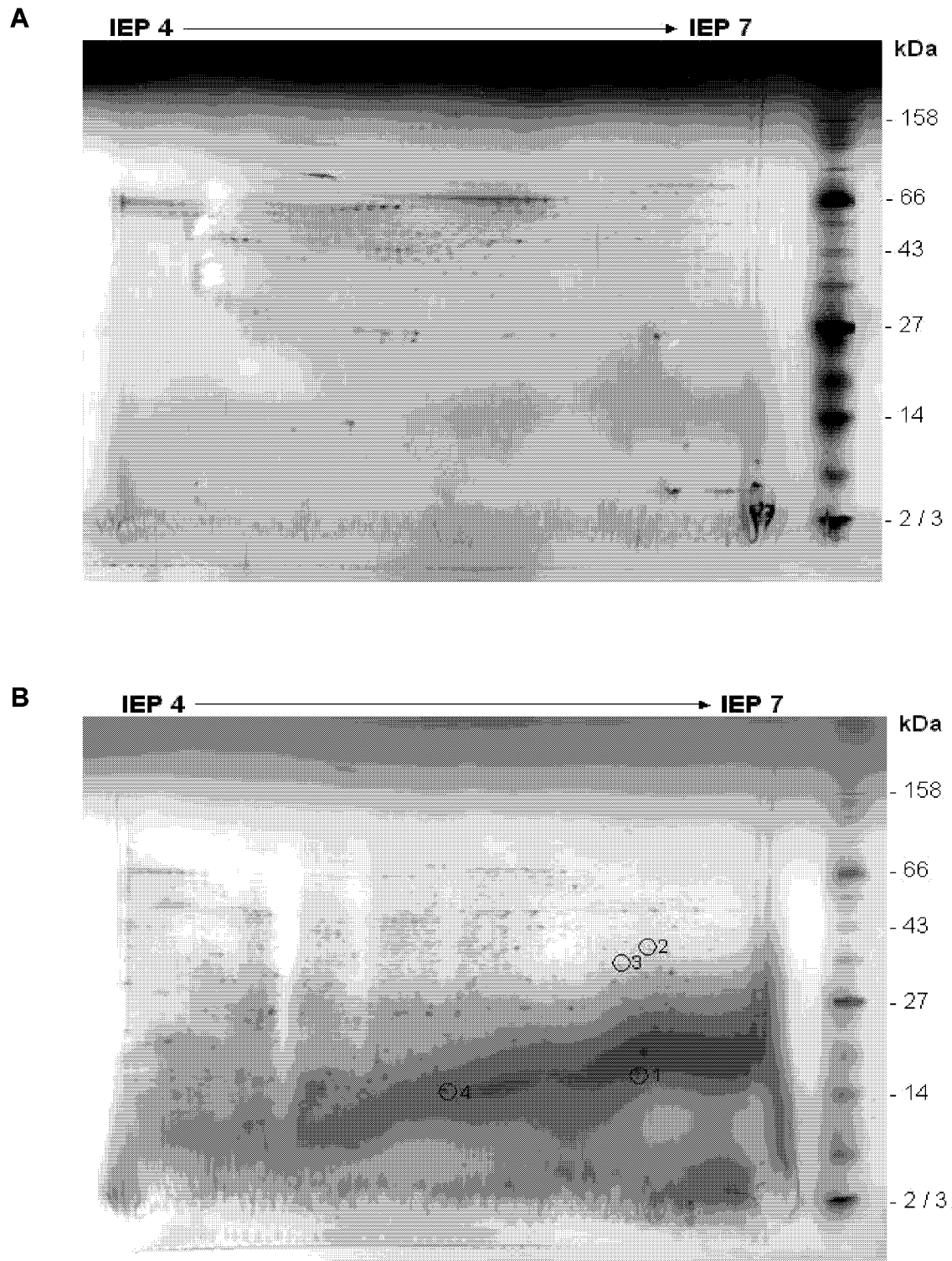


Abbildung VI-25: 2D-Gele von SCM-Proben der Zelllinie A: SI/SI und B: MS-5 (je 350µg Protein, Silber gefärbt); nummerierte Kreise in B markieren die analysierten Proteinspots

Um dennoch MS-Spektren ausgewählter Proteine erhalten zu können, wurden von SCM-Proben der Zelllinie MS-5 jeweils zwei 2D-Gele angefertigt. Eines der Gele wurde Silber gefärbt, um durch die hohe Sensitivität dieser Färbung eine möglichst gute und vollständige Visualisierung der Proteine zu erzielen. Das zweite Gel wurde mit colloidalem Coomassie angefärbt. Die Qualität dieser Färbung ist, wie bereits beschrieben, deutlich schlechter, lässt aber problemlos eine Identifizierung der Proteine mittels MS zu. Da immerhin einige Proteinspots deutlich sichtbar waren, wurden diese zur Orientierung benutzt, um die Position der übrigen Proteine, die nur auf dem Silber-gefärbten Gel sichtbar waren, festzulegen.

Die in Abbildung VI-25 und VI-26 dargestellten 2D-Gele wurden mit einer größeren Proteinmenge (je 350µg) beladen. Es fällt auf, dass im Vergleich zu den oben gezeigten Gelen, die nur jeweils 80µg Protein enthalten, weitere Spots sichtbar werden. Dieser Unterschied ist nicht allein auf die veränderte Proteinmenge zurückzuführen, da die Silberfärbung theoretisch ausreichend sensitiv sein sollte, um auch schon bei geringen Proteinkonzentrationen Spots anzufärben. Vielmehr wurden die unten gezeigten 2D-Gele in einer anderen Apparatur hergestellt (Multiphor II IEF Einheit) als die bisher gezeigten (IPGphor IEF Einheit). Dies lässt darauf schließen, dass die Wahl der verwendeten Apparaturen einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Qualität der Probenauftrennung hat. Offensichtlich werden die in dieser Arbeit untersuchten SCM-Proteine mithilfe der Multiphor II IEF Einheit effizienter aufgetrennt. Qualitätsunterschiede und Besonderheiten der Apparaturen sind bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben [173].

Wurde nun das Silber gefärbte Gel der MS-5 Probe mit einem ebenfalls Silber gefärbten Gel der SI/SI Probe verglichen, konnten eindeutig Proteine bestimmt werden, die nur im SCM der MS-5 sichtbar waren. Die Position dieser so ausgewählten Proteinspots wurde auf das Coomassie gefärbte Gel übertragen, die entsprechenden Proben ausgestanzt, verdaut und im MALDI-TOF MS analysiert. Die Spots, die den im Coomassie-Gel entnommenen Proben entsprechen und identifiziert werden konnten, sind in Abbildung VI-25B durch einen Kreis gekennzeichnet. Zwar ist die Qualität der Abbildung nicht ideal, aber beim Vergleich der Original-Gele konnte sicher und zweifelsfrei bestimmt werden, dass die entsprechenden Proteine nur in der SCM-Probe der Zelllinie MS-5, nicht aber in der der Linie SI/SI sichtbar waren.

MALDI-TOF Analyse

Die ausgestanzten, tryptisch verdauten Proteine wurden zur Identifizierung mit einem MALDI-TOF MS untersucht. Dabei lieferten vier der insgesamt 16 betrachteten Proteine Massenspektren mit Fingerabdruck-Qualität, die eine eindeutige Charakterisierung der Proben erlaubte. Es handelte sich dabei um:

- Cu/Zn-Superoxyd Dismutase (Cu/Zn-SOD)
- Procathepsin L / Cathepsin L (auch *major excreted protein*, MEP)
- Malatdehydrogenase
- Galectin-1 (Mitglied der Familie der *β -Galactoside binding proteins*)

Im Anhang sind die Spektren der einzelnen Proteine dargestellt. Tabelle VI-19 liefert eine Übersicht der Proteindaten, anhand derer die Identifizierung erfolgte. Die Differenz der gemessenen zur theoretisch ermittelten Peptidmasse ist in jedem Fall sehr niedrig und liegt unterhalb der gestatteten 50-100ppm. Die übrigen zwölf Spektren waren prinzipiell verwertbar, es fanden sich allerdings keine Übereinstimmungen zu Einträgen in den untersuchten Datenbanken.

Identifizierte Proteine und deren biologische Bedeutung

Die biologische Bedeutung der vier identifizierten Proteine soll im Folgenden näher betrachtet und ihre Relevanz für die HSPC-Kultur diskutiert werden.

Cu/Zn-Superoxid Dismutase (SOD)

Die extrazelluläre Cu(II)/Zn(II)-Superoxid Dismutase (SOD) ist ein tetrameres Glykoprotein mit einem MW von ca. 15,7kDa und einem IEP von 6,0. Die Hauptaufgabe des Enzyms besteht im Schutz vor zellschädigenden Sauerstoffradikalen, die im Verlauf einer Immunantwort von aktivierten Neutrophilen und Makrophagen synthetisiert werden, indem es die Umwandlung des Superoxyd-Anions O_2^- zu Wasserstoffperoxyd katalysiert. Die SOD wird synthetisiert von mesenchymalen Zellen wie z. B. Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Gliomzellen. Lokalisiert ist sie hauptsächlich auf der Oberfläche von Endothelzellen, wird aber auch an Heparansulfat-Reste der ECM gebunden [174].

Tabelle VI-19: Daten der identifizierten Proteine

# Spot	Protein	m/z ge- messen	m/z be- rechnet	Differenz [Δ ppm]	Sequenz der Peptide
1	Cu/Zn-SOD MW: 15762 IEP: 6,0	1367,8822	1367,7647	86	VISLSGEHSIIGR
		1512,8589	1512,7447	76	GDGPVQGTHFEQK
		2183,2794	2183,1283	69	AVCVLKGDGPVQGTHFEQK
		2323,3261	2323,1642	70	HVGDLGNVTAGKDGVANVSIEDR
2	Cathepsin L MW: 37530 IEP: 6,4	1134,7047	1134,6233	72	LFQEPLMLK
		1452,7943	1452,6872	74	LYGTNEEEWRR
		1452,7943	1452,6872	74	RLYGTNEEEWR
		1643,8463	1643,7164	79	NSWGSEWGMEGYIK
		1709,8935	1709,7712	72	FDQTFSAEWHQWK
		1960,0422	1959,8983	73	DRDNHCGLATAASYPVVN
		2151,1750	2151,0358	65	NLDHGVLLVGYGYEGTDSNK
		2393,3604	2393,1737	78	NLDHGVLLVGYGYEGTDSNKNK
3	Malatdehydrogenase MW: 36468 IEP: 5,9	1393,7866	1393,7116	54	FVEGLPINDFSR
		1706,9656	1706,8538	66	SAPSIPKENFSCLTR
		2280,1961	2280,1162	35	NVIWGNHSSTQYPDVNHAK
4	Galectin-1 MW: 14806 IEP: 5,3	1456,8120	1456,7337	54	LPDGHEFKFPNR
		1486,7607	1486,6861	50	DSNNLCLHFNPR
		1661,8345	1661,7706	38	FNAHGDANTIVCNTK
		2345,3420	2345,1825	68	SFVLNLGKSSNNLCLHFNPR

In Säugerzellen konnten drei verschiedene Formen der SOD nachgewiesen werden: zwei intrazelluläre Enzyme, die mitochondriale Mn-SOD und die cytosolische Cu/Zn-SOD. Letztere kann aktiv aus Zellen ausgeschleust werden und wird dann zur extrazellulären Cu/Zn-SOD [175].

Neben einer schützenden Funktion kommt der SOD auch eine erhebliche Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion zu. So vermindert SOD die Produktion von Peroxynitrit und verlängert dadurch die Stabilität des Signalmoleküls Stickstoffmonoxyd. Auch dem Produkt der SOD, Wasserstoffperoxyd, wird mittlerweile eine bedeutende Funktion in intrazellulären Signalvorgängen zugewiesen [176]. Sattler *et al.* haben beschrieben, dass nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren die intrazelluläre Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies anstieg [177]. Zudem konnte gezeigt werden, dass extrazellulär verabreichtes H₂O₂ den Phosphorylierungsstatus von Signalmolekülen verändern kann. Der Wirkungsmechanismus ist dabei vermutlich folgender: verschiedene Tyrosinphosphata-

sen sind sehr oxidationsempfindlich, da sie ein Cystein mit einer Thiolgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms besitzen. Wird die Funktion der Phosphatasen durch oxidative Sauerstoffspezies herabgesetzt, überwiegt die Aktivität der Kinasen, sodass sich das Phosphorylierungsmuster ändert. Dies hat vielfältige zelluläre Reaktionen zur Folge. Extrazellulär verabreichtes H_2O_2 induzierte nicht nur die Phosphorylierung von Proteinen, sondern auch die Expression des Transkriptionsfaktors c-Fos, einen Zellzyklusübergang von G_1 nach S, und Zellmigration. Damit konnten allein durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxyd Mechanismen ausgelöst werden, die ansonsten durch Wachstumsfaktoren wie z. B. GM-CSF vermittelt werden.

Übertragen auf die oben beschriebene Beobachtung, dass stromale MS-5 Zellen die sekretierte Variante der SOD ins umgebende Medium abgeben, und angenommen, dass dies einen positiven Effekt auf die frühen Vorläufer hat, kann man von zwei Wirkmechanismen ausgehen:

1. Die im Stroma eingebetteten HSPC werden vor reaktiven, zellschädigenden Sauerstoffmolekülen geschützt. O_2^- entsteht durch Reduktion von O_2 , entweder aufgrund von ionisierender Strahlung, oder enzymatisch im Zuge einer Makrophagenvermittelten Immunantwort. Makrophagen sind Bestandteil des Stromas.
2. SOD setzt O_2^- zu H_2O_2 um und generiert dadurch ein Signalmolekül, welches in hämatopoietischen Zellen in die Signalkaskade eingreift und verschiedene physiologische Reaktionen auslösen kann. Die Reaktion: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

In dieser Arbeit und der daran angeschlossenen Diplomarbeit [130] konnte zum ersten mal ein direkter Zusammenhang zwischen der Sekretion der SOD durch MS-5 Zellen und deren biologische Wirkung auf frühe Vorläuferzellen gezeigt werden (s. u.). Dies eröffnete die Spekulation, inwieweit teure Cytokine zur Kultivierung von HSPC durch Supplementierung mit SOD bzw. H_2O_2 ersetzt werden können.

Die These, dass SOD einen positiven Einfluss auf die Vermehrung von HSPC besitzt, wurde verifiziert, indem das Enzym gezielt in verschiedenen, physiologisch relevanten Konzentrationen zu gewöhnlichen Suspensionskulturen supplementiert wurde.

Medien-Supplementierung mit SOD

SOD wurde in PBS gelöst und in Konzentrationen von 1ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL und 50ng/mL zu Suspensionskulturen zugesetzt [178], welche zusätzlich die üblichen

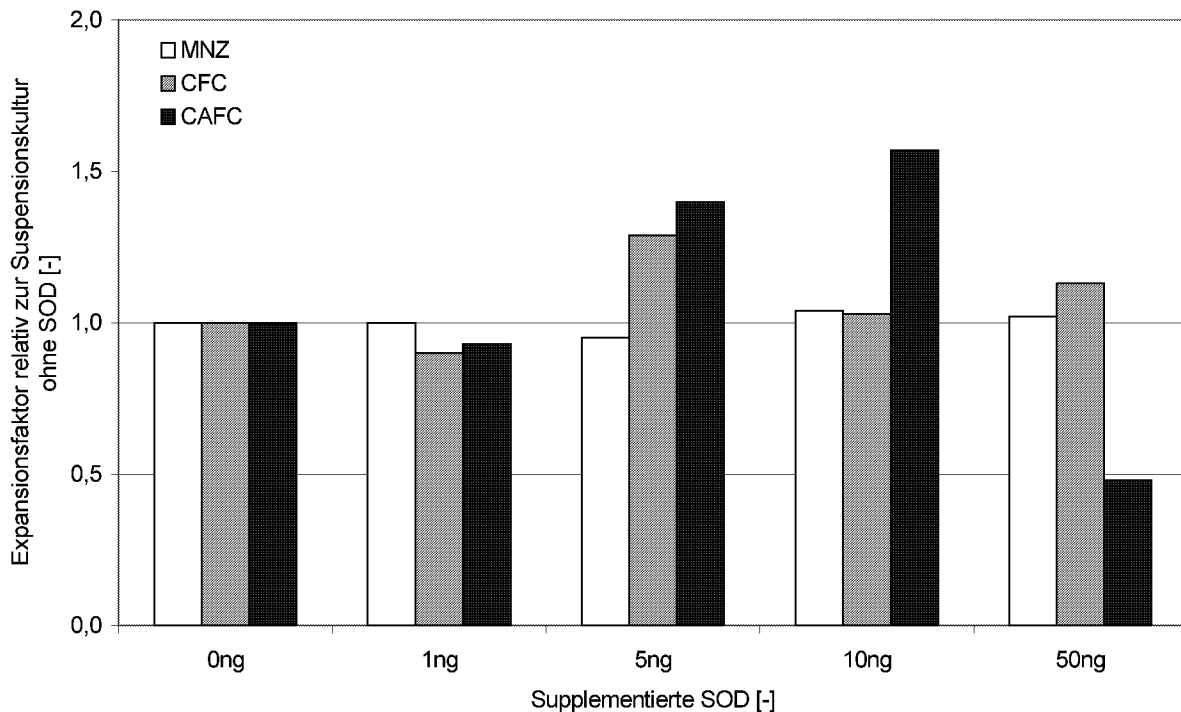


Abbildung VI-26: Mediensupplementierung mit unterschiedlichen Mengen des Enzyms SOD

Cytokine enthielten. Die nachfolgende Analyse des Wachstums und der Qualität der Zellen ergab, dass eine Konzentration von 1ng/mL keinen Effekt auf die Zellen hatte (siehe Abbildung VI-26). Die Expansionsdaten der betrachteten Zellpopulationen, MNZ, CFC und CAFC, entsprachen denen der Kontrolle ohne Enzym. Dieses Bild ändert sich in den Ansätzen mit 5 bzw. 10ng SOD pro Milliliter Medium. In beiden Fällen ist die Expansion der frühen Vorläuferzellen (CAFC) gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht (relative Expansionen mit 5ng/mL: Faktor 1,4; mit 10ng/mL: Faktor 1,6). Das Enzym SOD scheint demnach seine positive Wirkung besonders im Hinblick auf die wichtigen frühen Vorläuferzellen zu entfalten. Die Anzahl der CFC konnte nur im Ansatz mit 5ng/mL erhöht werden (relativ um Faktor 1,3). In den übrigen Ansätzen veränderten sich die Expansionen der MNZ und CFC relativ zur Kontrolle kaum. Auffällig ist, dass sich die höchste hier eingesetzte SOD-Konzentration von 50ng/mL offensichtlich negativ auf die CAFC auswirkt, da deren Expansion auf die Hälfte des Kontrollwertes zurückfällt. Offensichtlich existiert eine Optimumkonzentration für SOD, deren Unterschreitung keinen Einfluss auf die Zellen hat. Wird der Wert jedoch überschritten, kehrt sich die ansonsten förderliche Wirkung auf CAFC in ihr Gegenteil um. Auch hier bleiben MNZ und CFC relativ unbeeindruckt von der Wirkung des Enzyms.

Dieser Versuch lieferte den Nachweis, dass es möglich ist, mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode stromale Proteine zu identifizieren, die in den entsprechenden Konzentrationen einen deutlich positiven Effekt auf die Expansion besonders der frühen Vorläufer ausüben. Die Idee, anhand von SCM, welche sich in ihrer Wirkung auf HSPC unterschieden, gezielt Unterschiede im Proteinsekretionsmuster sichtbar zu machen, konnte verwirklicht werden. Die anschließende gezielte Betrachtung der Proteine, die differentiell sekretiert wurden, führte zur Identifizierung mindestens eines Proteins, welches, isoliert supplementiert, den positiven Effekt des SCM widerspiegeln konnte.

Cathepsin L

Cathepsin L, eine lysosomale Cystein Endopeptidase, gehört zur Familie der Papain Proteinasen [179]. Substrate des als Procathepsin L sekretierten Enzyms sind u. a. Elastin, Collagen, Fibronectin, und Laminin, es scheint also eine Rolle bei der Umbildung der Extrazellulärmatrix zu spielen. Aufgrund dieser Eigenschaften wird Cathepsin L eine Bedeutung bei der Entstehung von Arthritis und Osteoporose zugeschrieben, sowie bei der Metastasierung von Tumorzellen. Immortalisierte und transformierte Fibroblasten exprimieren und sekretieren größere Mengen des Enzyms, verglichen mit primären Zellen [180]. Cathepsin L hat ebenfalls einen kritischen Anteil an der MHC II vermittelten Antigenpräsentation und der Selektion von CD4⁺ T-Zellen im Thymus [181]. Ebenso scheint die lysosomale Form des Enzyms entscheidend an der Vermittlung von Apoptose, induziert durch oxidativen Stress, beteiligt zu sein [182]. Nachgewiesen wurde diese Funktion für Cathepsin D, die L-Variante des Enzyms scheint jedoch ähnlichen Mechanismen zu folgen.

Im Zusammenhang mit einer wachstumsfördernden Aktivität des Moleküle auf HSPC wäre es denkbar, dass die Umbildung der ECM durch Fibroblasten gesteuert und den jeweiligen Ansprüchen der hämatopoietischen Zellen angepasst würde.

Malat-Dehydrogenase

Die Malat-Dehydrogenase ist ein Enzym des Citrat-Zyklus. Sie katalysiert die Umwandlung von Malat zu Oxalacetat unter Bildung von NADH₂. Die Detektion von Malat-Dehydrogenase in Stroma konditioniertem Medium lässt sich nur dadurch erklären, dass einige stromale Zellen lysiert wurden und so das Enzym aus den Mitochondrien freigesetzt werden konnte. Für die Steigerung der HSPC Expansion scheint dieses Molekül keine Rolle zu spielen.

Galectin-1

Galectin-1 gehört zu einer in der Evolution hochkonservierten Familie von Lectinen, deren gemeinsames Kennzeichen eine Glykobindungsstelle ist, das CRD-Motiv (*C*arbohydrate *R*ecognition *D*omain). Die CRD besteht aus fünf bis sechs β -Faltblättern und erkennt die Basisstruktur von N-Acetyllactosaminen [Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc]. Glykoproteine, die Polylaktosaminsequenzen tragen, werden mit hoher Affinität von Lectinen gebunden. Bisher sind 13 verschiedene Galectine bekannt, wobei Galectin-1 und -3 die bestuntersuchten Vertreter sind. Galectin-1 ist ubiquitär in den verschiedenen Geweben exprimiert und liegt als Monomer (monovalent) oder Homodimer (bivalent) vor. Seine Funktion übt es hauptsächlich im peripheren und zentralen Immunsystem aus. Obwohl es als intrazelluläres Protein gebildet wird und kein Sekretionssignal besitzt, ist es überwiegend im Extrazellulärraum aktiv. Wahrscheinlich akkumuliert das Proteine an der Cytoplasmamembran und wird schließlich, in Vesikeln verpackt, aus der Zelle geschleust.

Die physiologische Funktion der Galectine ist sehr vielfältig und z. T. antagonistisch. Sie spielen eine Rolle bei der Zelladhäsion, der Regulation des Zellwachstums, sind immunmodulatorisch, induzieren Apoptose, beeinflussen Entzündungsprozesse, die Embryogenese und Reproduktion, und scheinen für die Metastasierung von Tumoren verantwortlich zu sein. Von besonderem Interesse im Hinblick auf die Hämatopoiese, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit Galectinen erwähnt wurde, sind pro- und anti-adhäsive Funktionen von Galectin-1. Sie vermitteln die Bindung zwischen Oberflächenglykoproteinen bzw. Integrinen, und Komponenten der ECM, wie Fibronectin und Laminin. Durch Quervernetzung von glykosylierten Oberflächenmolekülen können sie allerdings auch zum Ablösen der Zellen von ECM-Komponenten beitragen, da die Wechselwirkung zwischen ECM und Oberflächenmolekül aufgehoben wird. Dieser Effekt ist abhängig von der Galectin-Konzentration und dem jeweiligen Glykosylierungsstatus der Bindungspartner. Bivalentes Galectin-1 vermittelt Zell-Zell und Zell-ECM Kontakte, wohingegen monovalentes Galectin-1 durch Bindung an ECM-Komponenten bzw. Integrine deren gegenseitige Bindung sterisch verhindert. Ein zellulärer Rezeptor für Galectine ist CD45 [183-186].

Es ist also vorstellbar, dass stromale Fibroblasten Migrationsprozesse, die bei der Reifung von hämatopoietischen Zellen im Knochenmark eine entscheidende Rolle spielen, durch die Produktion von Galectinen regulieren. Unreife HSPC werden im Knochenmark mittels Adhäsion an ECM-Komponenten zurückgehalten und sind somit den dort stattfindenden regulatorischen Prozessen unterworfen. Reife Blutzellen müssen in den Blutkreislauf entlassen werden, um dort ihrer spezifischen Funktion nachzukommen. Denkbar ist, dass die

durch hohe Galectin-Konzentrationen vermittelte Quervernetzung von Oberflächenmolekülen auf einzelnen Zellen zum Ablösen von ECM-Komponenten beiträgt, und Laminin und/oder Fibronectin nicht länger gebunden werden.

VI.2.2. Kurzzusammenfassung und Diskussion II

Meines Wissens ist dies die erste Arbeit, die erfolgreich versucht hat, Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit der SCM zweier stromaler Zellen, SI/SI und MS-5, auf proteinbiochemischer Ebene zu analysieren. Es ist ebenfalls zum ersten Mal eine Analyse in proteinfreiem Ausgangsmedium durchgeführt worden, was eine aufwendige Aufreinigung des Mediums unnötig machte, da keine Serum-Bestandteile oder andere Proteine zugegeben wurden. Nach einer Auftrennung des Proteingemische mittels 2D-Gelelektrophorese konnten die eindeutigen Unterschiede im Sekretionsmuster der beiden untersuchten Zelllinien interessanterweise mit nachweisbaren Unterschieden in der Qualität der HSPC, die in den jeweiligen SCM kultiviert wurden, korreliert werden. Schließlich ist es gelungen, vier Proteine mittels MALDI-TOF MS zu identifizieren, welche ausschließlich von der Zelllinie sekretiert wurden, deren SCM für die Expansion der HSPC besser geeignet war, die MS-5. Diese Zelllinie ist schon vielfach untersucht worden, ihre wachstumsfördernde Aktivität konnte bisher jedoch nur beschrieben, nicht aber ursächlich analysiert werden.

1995 stellten Kobari *et al.* fest, dass die wachstumsfördernde Wirkung der bereits 1989 etablierten murinen Fibroblasten Zelllinie MS-5 nicht auf die Expression bis dahin bekannter Cytokine zurückzuführen sei [145]. Sie verglichen mRNA Expressionen verschiedener Cytokine in unterstützenden und nicht unterstützenden Zelllinien, konnten jedoch in dieser Hinsicht keinen Unterschied feststellen. Zwei Jahr später wiesen Nishi *et al.* den Faktoren SCF und G-CSF die entscheidende Rolle bei der unterstützenden Wirkung der MS-5 Zelllinie zu [144].

Eines der isolierten und identifizierten Proteine, die Cu/Zn-Superoxyd Dismutase, wurde in verschiedenen Konzentrationen zu cytokinhaltigen Suspensionskulturen zugesetzt. Der positive Effekt war insbesondere im Hinblick auf die frühen Vorläuferzellen deutlich ausgeprägt, sodass man von der SOD als neuem, vielversprechenden Wachstumsfaktor für die Expansion insbesondere früher hämatopoietischer Vorläuferzellen sprechen kann.

Die angewandten Methoden und etablierten Protokolle erlauben eine relativ schnelle, reproduzierbare und verlässliche Analyse der produzierten SCM. Die Optimierung der im

vorherigen Kapitel untersuchten Parameter zur Herstellung von SCM stellte sich erneut als sehr lohnend heraus, da sie auf Kulturen in proteinfreien Medien übertragbar sind.

Mit diesem Teilprojekt wurde ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung der stromalen Wirkmechanismen geleistet. Bereits bekannten Proteinen wie der SOD konnte nachweislich eine völlig neue Bedeutung im Rahmen der Stammzellbiologie zugeschrieben werden.

VII. MEMBRAN-SEPARIERTE CO-KULTIVIERUNG

VII.1. MINI-MEMBRANREAKTOR

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Untersuchungen zu Stroma-konditioniertem Medium haben klar gezeigt, dass noch weitere, bedeutende Faktoren von Stromalen Zellen produziert werden, deren Natur und Funktion bisher nicht bekannt ist. Demnach können sie den Zellen in einer definierten Suspensionskultur nicht zugute kommen. Die Verwendung von SCM zur Kultivierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen kann diesen Mangel aufheben, denn theoretisch sind im SCM alle wesentlichen löslichen Faktoren enthalten. Allerdings fehlt hier natürlich dennoch die Möglichkeit der Kommunikation über Zell-Zell und Zell-ECM Komponenten.

Eingangs in Kapitel III ist bereits kurz dargelegt worden, warum die Membran-separierte Co-Kultur eine sinnvolle Alternative zur direkten Co-Kultur darstellt. Wenn man sich nochmals die Komplexität und Vielfalt der regulatorischen Mechanismen innerhalb des Knochenmark-Mikromilieus vergegenwärtigt, wird klar, dass die Membran-separierte Co-Kultur einen Großteil der Stroma-vermittelten, unterstützenden Wirkung zur Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen widerspiegelt. Dazu gehören sekretierte Wachstumsfaktoren, Komponenten der Extrazellulärmatrix, und verschiedene Formen der direkten Zell-Zell und Zell-ECM Kommunikation. Diesbezüglich unterscheidet sich die Membran-separierte Co-Kultur deutlich von der isolierten Suspensionskultur, denn in diesen Ansätzen profitieren die HSPC lediglich von ausgewählten, der Kultur zugesetzten Wachstumsfaktoren.

Der direkten Co-Kultur ist die Membran-separierte Co-Kultur in vielerlei Hinsicht vergleichbar, denn sie gestattet das gesamte Spektrum der regulatorischen Mechanismen. Durch den relativ engen räumlichen Kontakt der HSPC zu Stromalen Zellen auf der gegenüberliegenden Membranseite kann es zu einer Akkumulation von förderlichen Substanzen kommen. So werden schneller wirksame Schwellenwertkonzentrationen erreicht, die verfügbare Dosis liegt höher und wird nicht durch das umgebende Medium verdünnt. Die Diffusionsstrecken der gelösten Stoffe zwischen den Zellen ist erheblich verkürzt.

Ein besonderer Vorteil der Membran-Separation ist es auch, dass der Kontakt der HSPC zu Stromalen Zellen nur lokal, d. h. begrenzt auf kleine Poren in der Membran, stattfinden kann. Ansonsten sind die HSPC von Stromalen Zellen durch die Membran separiert und können getrennt voneinander inokuliert bzw. geerntet werden. Dieser Aspekt ist für eine potentielle klinische Anwendung des Kultursystems von großer Bedeutung, da das Trans-

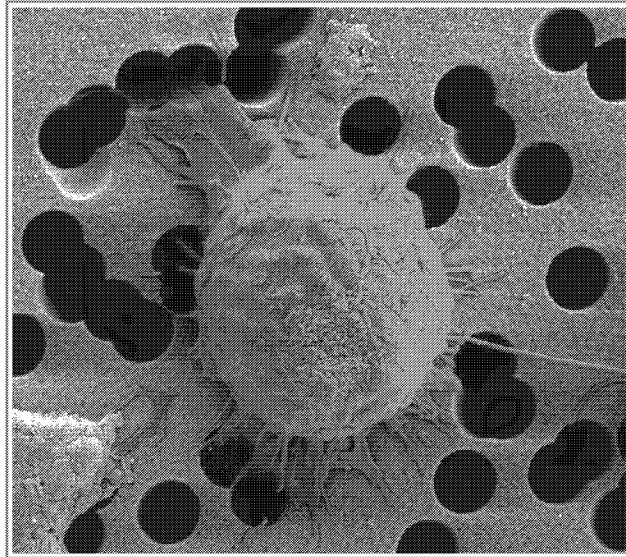


Abbildung VII-1: REM-Aufnahme einer hämatopoietischen Zelle im direkten Kontakt zu einer stromalen Zelle, dessen Ausläufer die Poren der Membran im MMR durchdringen. Der Porendurchmesser beträgt 1,0µm.

plantat frei von murinen stromalen Zellen sein muss, um eine Xenotransplantation und daraus resultierende Komplikationen wie z. B. die Übertragung von Viren über Artgrenzen hinweg zu vermeiden.

Mithilfe der Membran-separierten Co-Kultur sollte es demnach möglich sein, biologisch ähnlich gute Effekte zu erzielen, wie sie bereits im Rahmen einer direkten Co-Kultur nachgewiesen wurden. Der entscheidende Vorteil ist, dass der Kontakt zwischen den Zellen relativ einfach aufgehoben werden kann, um die HSPC ohne stromale „Kontaminanten“ zu ernten.

Abbildung VII-1 zeigt einleitend die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer hämatopoietischen Zelle, aufliegend auf der porösen Membran und im direkten Kontakt zu einem stromalen Ausläufer, welcher von der gegenüberliegenden Seite durch die Poren der Membran dringt. Der oben ausgeführte theoretische Wirkmechanismus tritt also tatsächlich nachweislich ein. Andere Gruppen konnten bereits feststellen, dass die sichtbaren Filopodien der HSPC durch SDF-1 und SCF induziert werden können [187], und dass etliche Adhäsionsfaktoren, die bei der Zellmigration eine Rolle spielen, auf diesen Zellausläufer exprimiert werden (Integrin α - und β -Untereinheiten, L-Selektin) [188].

Im Folgenden wird der technische Aufbau eines Mini-Membranreaktors (MMR) und die biologische Leistungsfähigkeit dieses Systems beschrieben.

VII.1.1. Technischer Aufbau des Mini-Membranreaktors

Da ein System, welches es erlaubt, eine Membran beidseitig sowohl mit Suspensions- als auch mit adhären wachsenden Zellen zu bestücken, kommerziell nicht erhältlich ist, musste es zuerst entwickelt werden. Zu Beginn einer jeden Neuentwicklung ist es notwendig, viele verschiedene Parameter zu testen und eventuell Veränderungen vorzunehmen. So ist es sinnvoll, ein miniaturisiertes Testsystem mit geringem Volumen und kleiner Membranfläche einzusetzen, um den Material- und Probenverbrauch zu minimieren, die Medienkosten gering zu halten und eine gleichzeitige Bearbeitung mehrerer Ansätze zu ermöglichen. Das aus diesen Überlegungen heraus entwickelte System des Mini-Membranreaktors (MMR) leitet sich vom Aufbau des Miniatur-Schlaufenreaktors ab [128]:

In die Edelstahlhalterung des Reaktors wird ein zugeschnittener Membranfilter zwischen zwei PTFE-Ringen platziert und mit einem Silikonring fixiert (siehe Anhang B-1). Diese Konstruktion wird in die Vertiefung einer handelsüblichen 12-Loch Gewebekulturplatte eingesetzt, sodass zwölf Paralleluntersuchungen in einer Platte durchgeführt werden können. Da es problemlos möglich ist, den Reaktor innerhalb der Vertiefung zu wenden, lassen sich relativ bequem Zellen auf beiden Seiten der Membran kultivieren.

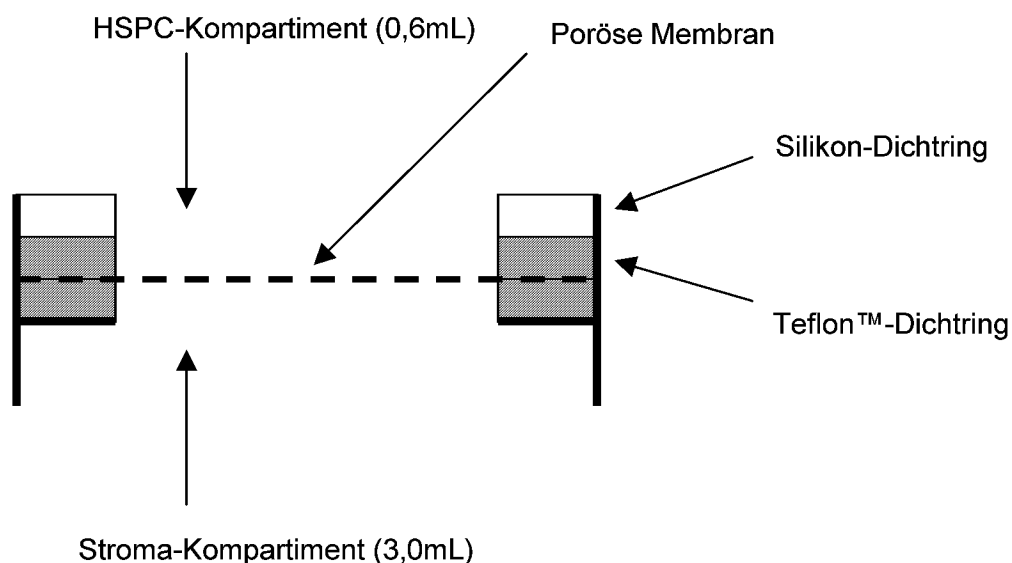


Abbildung VII-2: Schematische Darstellung des Mini-Membranreaktoreinsatzes

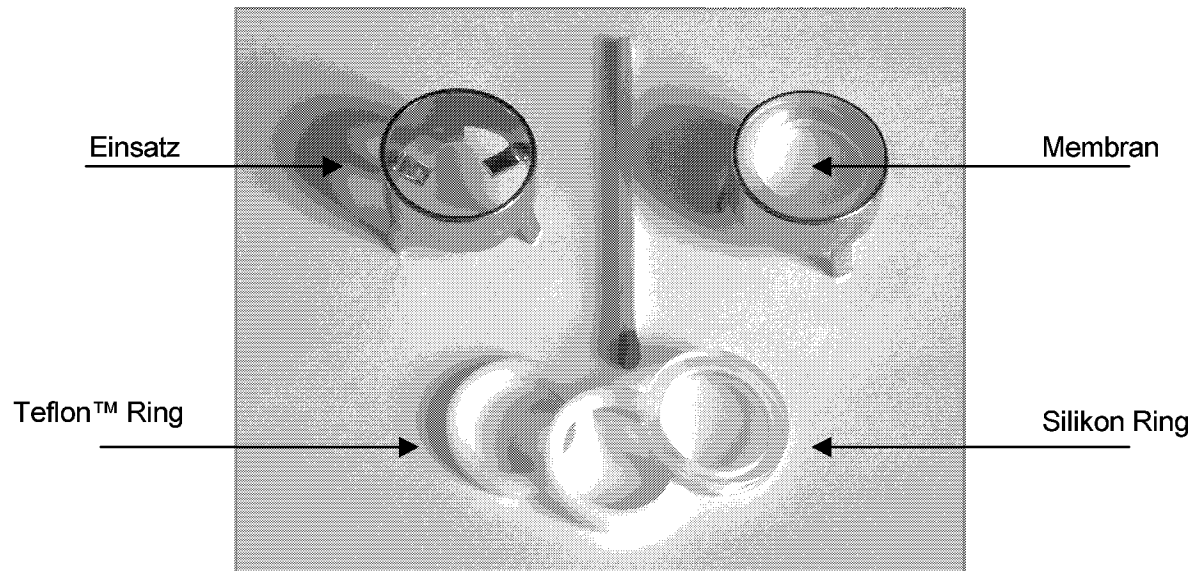


Abbildung VII-3: Fotografie der einzelnen MMR-Bestandteile



Abbildung VII-4: Fotografie einer Gewebekulturplatte mit darin enthaltenen Mini-Membranreaktoren

Es werden zunächst die stromalen Zellen auf der späteren Membran-Unterseite über Nacht adhärirt. Der Einsatz wird danach gedreht, sodass die Zellen quasi kopfüber an der Membran haften. Zelluläre Ausläufer können nun die Poren der Membran durchdringen und erreichen die HSPC, die auf die Oberseite der Membran inokuliert werden (vergleiche Abbildung VII-1).

Die beiden Abbildungen VII-3 und VII-4 zeigen eine Gewebekulturplatte und darin eingesetzte MMRs in unterschiedlichen Stadien des Zusammenbaus, sowie den detaillierten Aufbau des MMR-Einsatzes.

Tabelle VII-1 stellt die Kenngrößen des MMR im Überblick dar. Für den überwiegenden Teil der unten beschriebenen Versuche wurde eine PE-Membran verwendet. Die Standard-Membran hatte eine Porengröße von $1,0\mu\text{m}$, $2,0\text{E}+07$ Poren / cm^2 Membranfläche, und eine nominelle Dicke von $11\mu\text{m}$.

Tabelle VII-1: Kenngrößen des Mini-Membranreaktors

Parameter	
Membranmaterial	PE oder PC, unlaminiert
Membranfläche	$2,5\text{cm}^2$
Membrandicke	$9,0$ bis $11,0\mu\text{m}$
Porengröße	$0,4\mu\text{m}$, $1,0\mu\text{m}$ und $3,0\mu\text{m}$
Porendichte	$1,0\text{E}+08$, $2,0\text{E}+07$ und $2,0\text{E}+06$ Poren/ cm^2
Gesamtvolumen	$3,6\text{mL}$
Volumen des HSPC-Kompartimentes	$0,6\text{mL}$
Volumen des Stroma-Kompartimentes	$3,0\text{mL}$

In Abbildung VII-5 A ist eine sich teilende hämatopoietische Zelle, aufliegend auf der porösen Membran im MMR, abgebildet. In Abbildung VII-5 B wird ein konfluenter Zellrasen aus stromalen Zellen dargestellt. Das Stroma haftet problemlos auf der Membran. Diese beiden Aufnahmen stehen beispielhaft für etliche REM-Aufnahmen, die zur Kontrolle der Membran-separierten Co-Kulturen angefertigt wurden.

Im Sinne der technischen Umsetzung der natürlichen Gegebenheiten des Knochenmarks begegnet die Membran-separierte Co-Kultur ähnlichen Problemen, wie sie bereits für die Verwendung des SCM beschrieben wurden. In biologischer Hinsicht sollte die Membran-separierte Co-Kultur der Verwendung Stroma konditionierten Mediums überlegen sein.

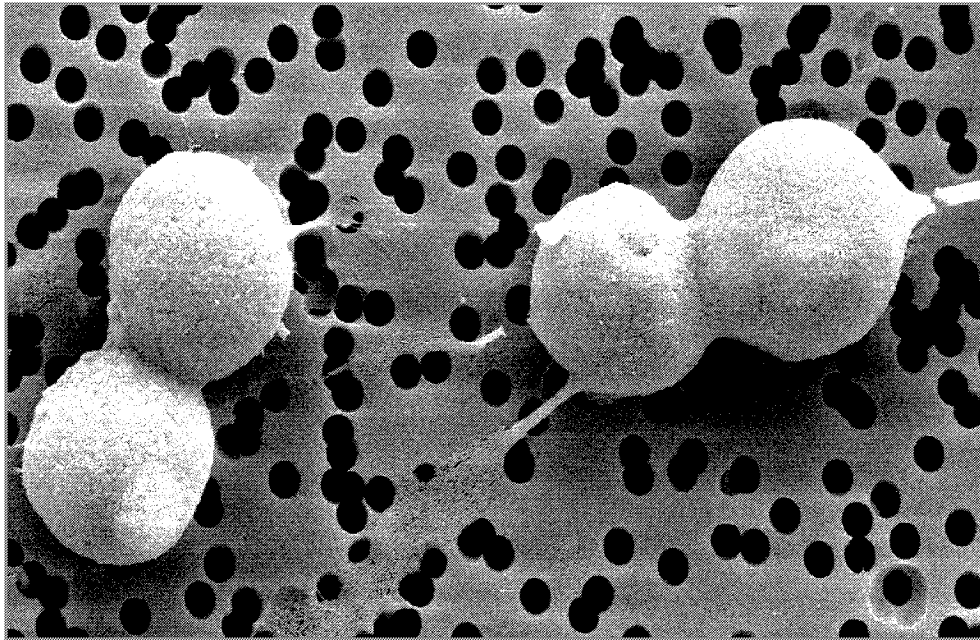
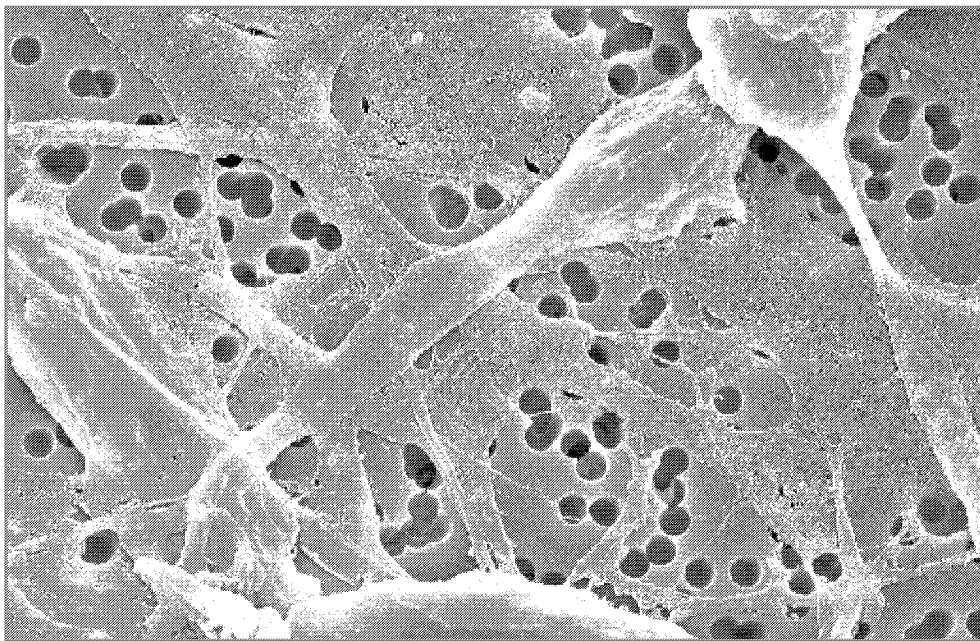
A**B**

Abbildung VII-5: REM-Aufnahmen von Zellen auf einer porösen 1,0µm PE-Membran. A: Hämatopoietische Zelle, noch nicht abgeschlossene Cytokinese B: Stromale Zellen, miteinander quervernetzt

VII.1.2. Etablierung der Kultivierungsstrategie im MMR

Im Folgenden werden erste Schritte zur Charakterisierung und Optimierung des Mini-Membranreaktors beschrieben. Die entsprechend etablierten Parameter wurden später, falls sinnvoll und realisierbar, auf ein System größeren Maßstabs übertragen.

Zellernte und Wiederfindungsraten

Der Aufbau des Miniatur-Membranreaktors, besonders die Fixierung der Membran zwischen den PTFE-Halteringen, ist im Hinblick auf die Zellernte nicht ideal gestaltet. Zur Zellernte wird der Einsatz in die leere Vertiefung einer neuen Gewebekulturplatte überführt. Hierbei strömt gelegentlich ein Teil des oberen Medienvolumens an den Halteringen vorbei in die ursprüngliche Vertiefung. Daher kommt es zu Zellverlusten bei der Ernte.

In einem ersten Vorversuch wurden mithilfe der myeloiden Zelllinie KG-1 Wiederfindungsraten nach kurzer Kulturdauer ermittelt. KG-1 wachsen, wie auch die HSPC, in Suspension, und liegen lediglich locker auf der Membranoberfläche auf. Beide Zelltypen besitzen einen vergleichbaren Zelldurchmesser (KG-1: ca. 9,5-12µm; HSPC: ca. 5-12µm), die Ergebnisse sind also übertragbar. Es wurden jeweils 2,0E+05 und 4,0E+05 Zellen in einer Vertiefung mit und ohne Membraneinsatz inokuliert. Nach 3,5h wurden die Zellen geerntet und gezählt. Die Wiederfindungsraten lagen in allen vier Fällen bei 100%, bedeutende Unterschiede zwischen den Ansätzen konnten nicht festgestellt werden. Demnach scheint das Ablösen der Zellen nach kurzer Inkubationszeit technisch kein Problem zu sein.

Ein etwas anderes Bild zeigt sich bei der Betrachtung von KG-1 Wiederfindungsraten, wenn die Zellen über den üblichen Zeitraum von 168h im MMR kultiviert wurden.

Das Zusammensetzen eines Mini-Membranreaktors aus seinen einzelnen Bestandteile bedurfte offenbar der Optimierung, denn anfangs gelangten bis zu 42% der kultivierten Zellen von der Membran auf den Boden der Zellkulturplatte. Abbildung VII-6 verdeutlicht anhand von drei unabhängigen Experimenten (Ansatz A-C), dass der Anteil der zum Zeitpunkt der Zellernte auf dem Boden der Kulturplatte befindlichen Zellen verringert werden konnte (Plattenboden-Fraktion). Ebenfalls dargestellt ist der Anteil an Zellen, der durch das Abspülen der Membran während der Ernte auf den Boden der Platte gelangte (Spülmedium-Fraktion). Es fällt auf, dass besonders bei hohen Zelldichten der Anteil an Zellen, der während der Kultur verloren geht, größer ist. Dagegen bleibt ein durch das Spülen verursachter Verlust relativ konstant bei ca. 5-15%. Insgesamt konnte der Zellverlust von

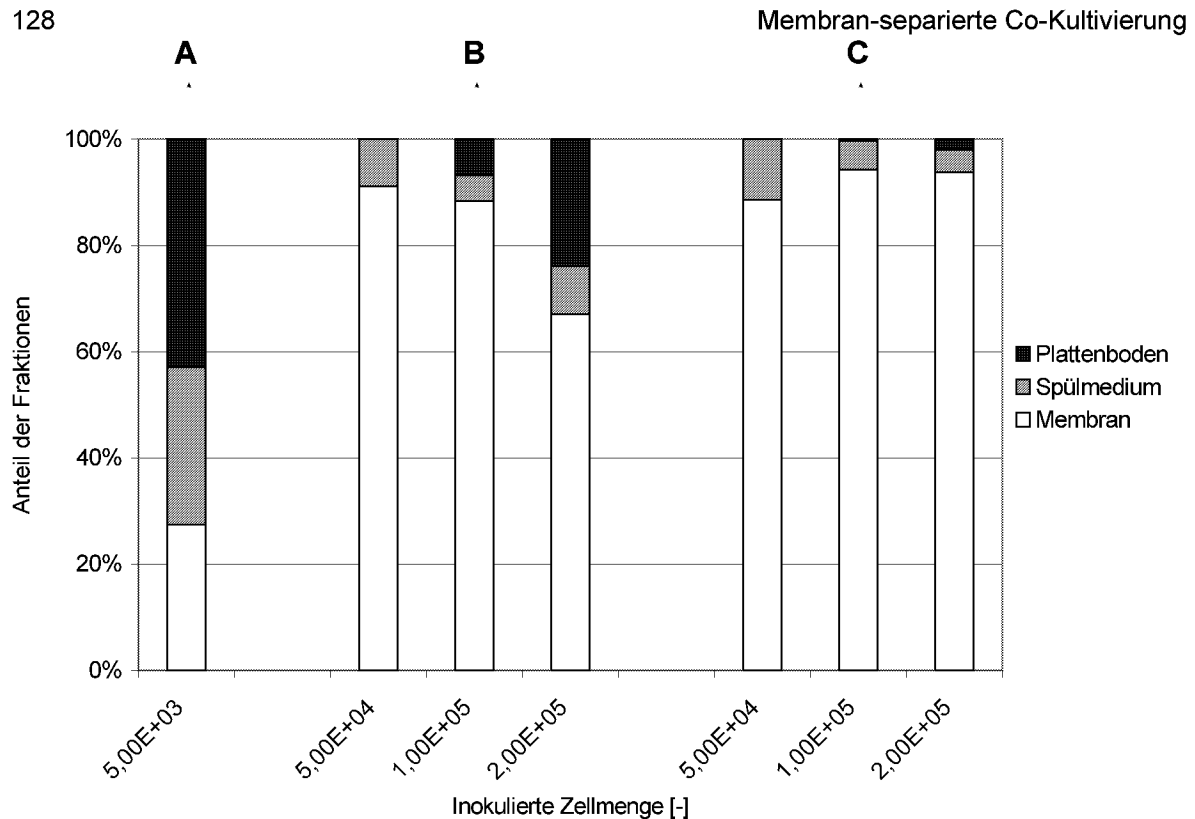


Abbildung VII-6: Anteile der Zellfraktionen nach 168h, ermittelt in drei unabhängigen Versuchen A-C

über 40% auf unter 20%, in manchen Fällen (wie auch hier gezeigt) auf unter 10% verringert werden.

- Es ist in diesem Zusammenhang sehr wichtig festzustellen, dass nach der Abernte von im MMR kultivierten hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen lediglich die Zellen, welche zum Zeitpunkt des Versuchsendes auf der Membran auflagern, zur Beurteilung in biologischen Assays eingesetzt wurden. Es wurde so verfahren, um gezielt nur diejenigen Zellen zu betrachten, die durch den Kontakt zu stromalen Zellen beeinflusst wurden bzw. durch die räumliche Nähe zum Stroma einer höheren Dosis an förderlichen Faktoren ausgesetzt waren. Die so ermittelten CFC- und CAFC-Frequenzen wurden zudem lediglich auf die geringere Zellzahl, also abzüglich der bereits auf dem Plattenboden befindlichen Zellen, bezogen. Daher sind die gezeigten Expansionsergebnisse der CFC und CAFC stets und z. T. deutlich (um bis zu 20%) unterbewertet.

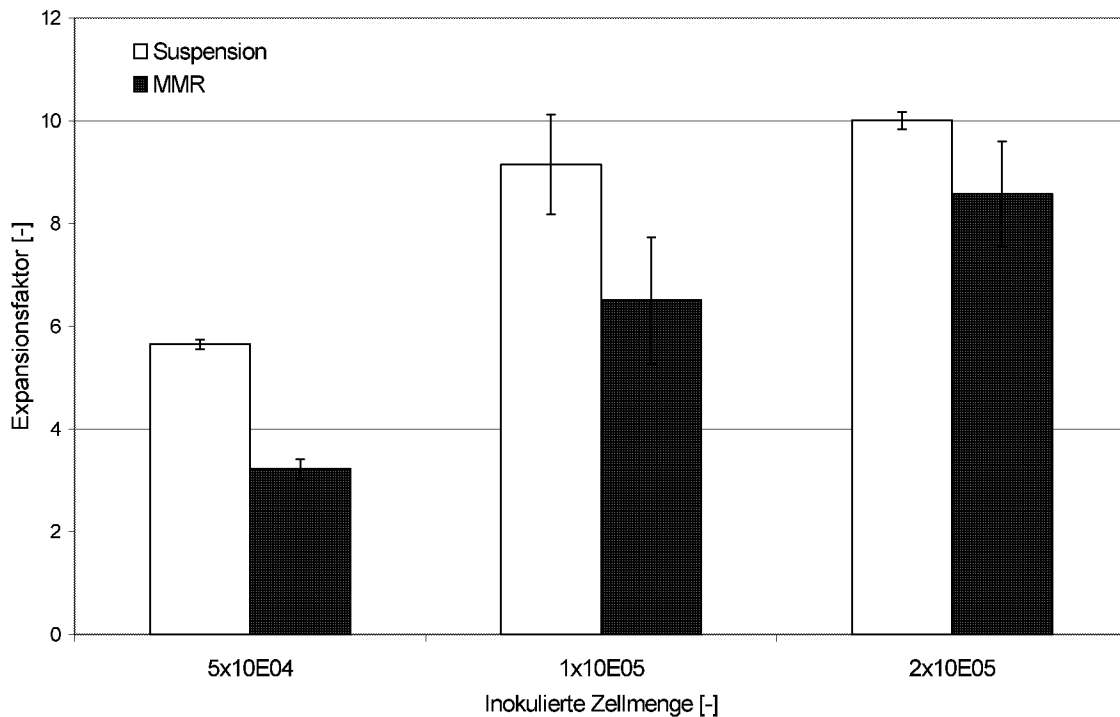


Abbildung VII-7: KG-1-Expansionsfaktoren in Suspension und im MMR, in Abhängigkeit von der eingesetzten Zelldichte

In einem weiteren, unabhängigen Versuch wurden Expansionsfaktoren der KG-1 nach 120-stündiger Kultur in Ansätzen mit (= MMR) und ohne (= Suspension) Membraneinsatz ermittelt, wobei die Inokulumsdichte der Zellen variiert wurde. Das Kulturvolumen betrug jeweils 3,6mL.

Die ermittelten Expansionsfaktoren der Zellen (Abbildung VII-7) unterscheiden sich deutlich zwischen den Ansätzen, auch unter Berücksichtigung der Zellverluste. Wurden sie im Mini-Membranreaktor kultiviert, so lagen die Expansionsraten im Ansatz mit niedriger Zelldichte bei lediglich 57% der Suspensionskultur ohne Einsatz. Bei höheren Zelldichten stieg der Wert auf 71-86%. Die Expansionsraten lagen insgesamt bei Zellen höherer Dichte am höchsten. Das war zu erwarten, da die Mindestzellkonzentration für KG-1 bei ca. $2,0 \times 10^5 \text{ c/mL}$ liegt, und die hier eingesetzte Höchstkonzentration nur $5,6 \times 10^4 \text{ c/mL}$ betrug. Ist eine kritische Zelldichte unterschritten, proliferieren die Zellen wesentlich langsamer, da ihnen stimulierende Signale von Nachbarzellen fehlen. Dennoch scheint dies keine ausreichende Erklärung für das schlechtere Abschneiden des Mini-Membranreaktors zu sein, denn hier liegen die Zellen aufgrund der kleineren Oberfläche ($2,5 \text{ cm}^2$ vs. $3,8 \text{ cm}^2$) weniger vereinzelt als auf dem Boden der Gewebekulturplatte. Demnach ist ein anderer Faktor für die Wachstumsinhibierung im Vergleich zur Suspensionskultur verantwortlich. Auch die

leicht verminderte Vitalität der Zellen nach 120h Kultur im MMR (siehe Tabelle VII-2) deutet eher auf einen negativen Einfluss des verwendeten Membranmaterials hin. Dieser soll im Folgenden untersucht werden.

Tabelle VII-2: Vergleich der Zellvitalitäten bei unterschiedlichen Ausgangszellmengen in Systemen mit und ohne Membraneinsatz

Kultursystem	5,0E+04	1,0E+05	2,0E+05
Suspension	96%	91%	95%
MMR	84%	89%	89%

Die Wahl eines geeigneten Membranmaterials

Ein entscheidender Dreh- und Angelpunkt der Systementwicklung ist die Wahl des verwendeten Materials. Edelstahl, Silikon und PTFE sind im MMR enthalten und stellen in der Zellkulturtechnik häufig verwendete Werkstoffe dar, deren ungünstiger Einfluss auf die Kultur von stromalen und hämatopoietischen Zellen in der Praxis in tolerablen Grenzen liegt.

Als Membranmaterial für den MMR standen PC und PE zur Verfügung. Beide Materialien sind als dünne, unlaminierte und autoklavierbare Filter lieferbar, aus denen sich die benötigten Membranstücke ausschneiden lassen. Die Membranen sollten eine gewisse Dicke nicht überschreiten, um das Durchdringen der stromalen Zellausläufer noch zu ermöglichen. Oftmals sind diese dünnen Membranen auf einer Seite mit einem Stützvlies verstärkt, um ihrer Handhabbarkeit und Festigkeit zu verbessern. Dies kam für eine Anwendung im MMR nicht infrage, da auf beiden Seiten der Membran Zellen unter gleichen Bedingungen wachsen sollten.

In einem ersten Versuch wurde der Einfluss der beiden Materialien im Kontakt zu HSPC analysiert. Zu diesem Zweck wurden Filter ausgeschnitten, die in ihrer Fläche den Filtern des kommerziell erhältlichen Transwell-Systems (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) entsprachen (0,9 cm²). Zusätzlich wurden Membranen des Typs PE-LD (LD=geringe Porendichte, 1,6E+06 Poren/cm²) aus dem Transwell-System gelöst. Die Filter wurden in einer Standard-Kultur zusammen mit HSPC kultiviert, wobei nicht zwangsläufig für alle Zellen gleichermaßen ein direkter Kontakt zum Material bestehen musste, da die Membranfilter z. T. aufschwammen. Abbildung VII-8 zeigt, dass PC in diesem Fall keinen Einfluss auf die Kultur der HSPC hat. Im Gegensatz dazu wirkt sich die Anwesenheit der PE-Membran negativ auf die Expansion aller untersuchten Zellpopulati-

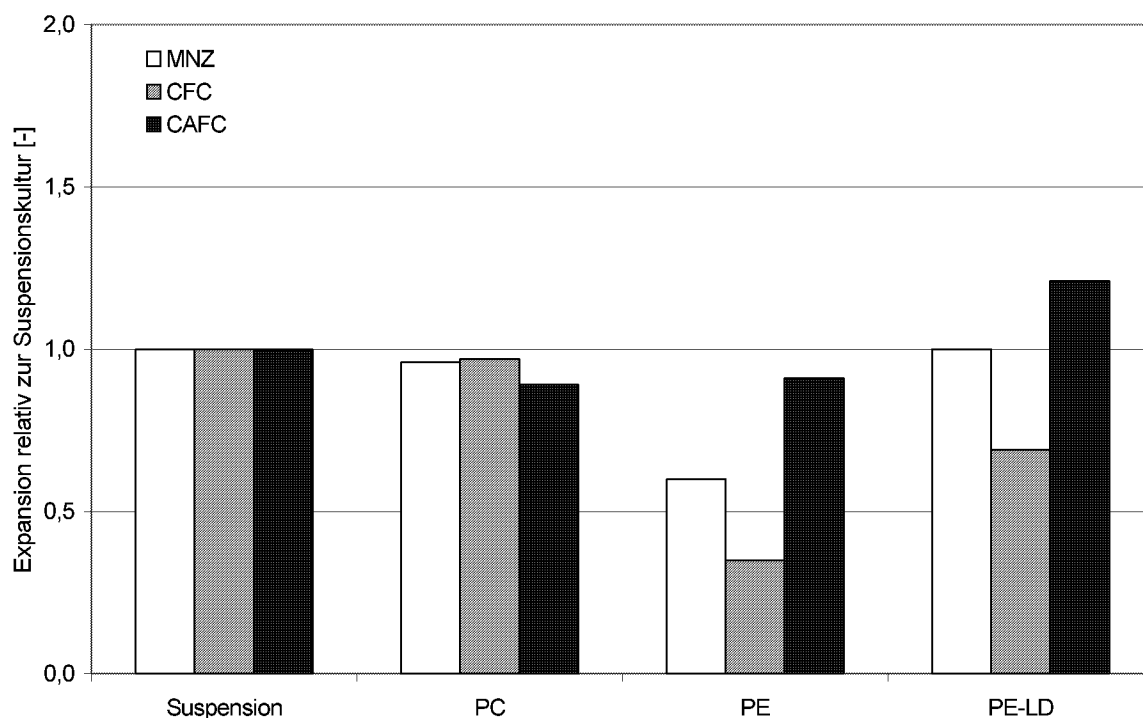


Abbildung VII-8: Toxizitätstest mit unterschiedlichen Membranmaterialien in Suspensionskultur

onen aus. Dieser Effekt lässt sich für die PE-LD Membran des Transwell-Systems nur im bezug auf die CFC beobachten. Offensichtlich ist nicht nur die Art des untersuchten Materials, sondern auch seine Verarbeitung von Bedeutung für die Zellkultur.

Tabelle VII-3: Expansionen in der Referenzkultur

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	25 ($\pm 2,4$)
CFC	8,2 ($\pm 1,8$)
CAFC	3,2

Hier können, wie bereits für die Collagen-Träger beschrieben, mehrer Mechanismen wirksam sein: das Material selbst hat einen schädigenden Einfluss auf die Zellen, es könnte schädliche Substanzen an das Medium abgeben, oder es entfernt für die Expansion benötigte Substanzen durch Bindung aus dem Medium.

In einem nachfolgenden Versuch wurden HSPC direkt in MMRs kultiviert, die entweder

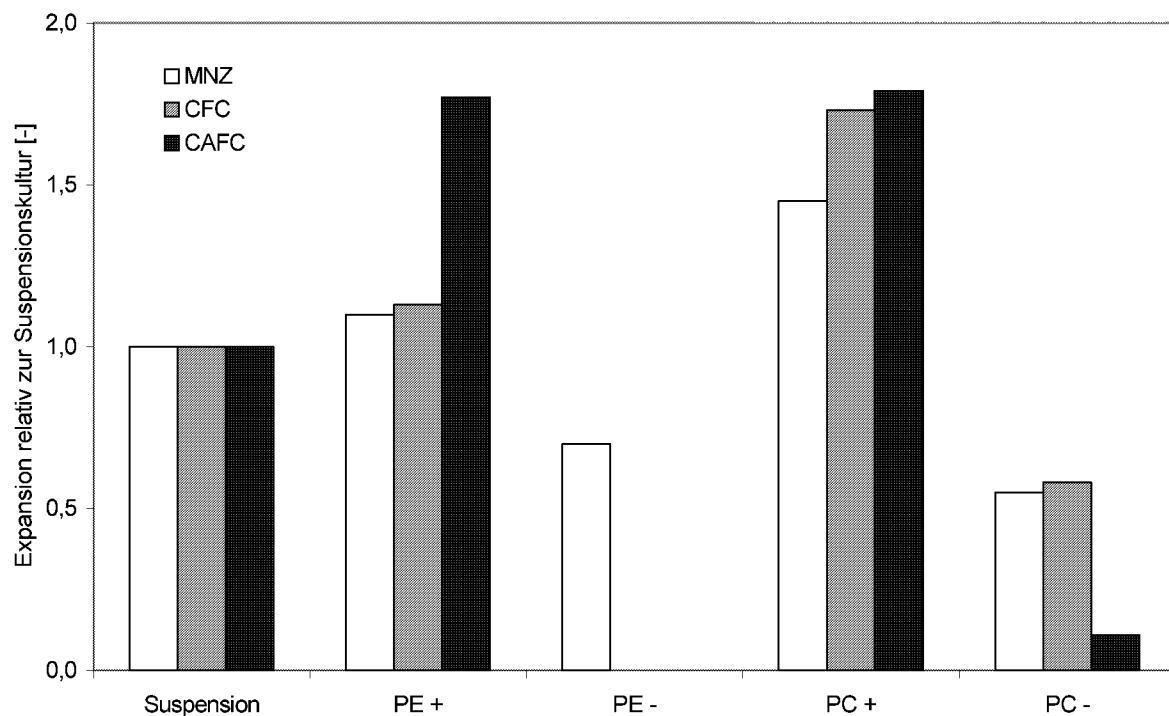


Abbildung VII-9: Relative Expansion der MNZ in MMR mit PC/PE Membran, jeweils +/- Stromma (von PE - wurden keine Assays angelegt)

mit PC- oder PE-Membranen bestückt waren, also in jedem Fall ein direkter Kontakt zum Material bestand. Zusätzlich war die eine Hälfte der MMRs auf ihrer Unterseite mit stromalen Zellen der Zelllinie M2-10B4 mod. beschichtet. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, ob die Anwesenheit stromaler Zellen den negativen Einfluss des Materials maskieren oder sogar überkompensieren kann.

Tabelle VII-4: Expansionen in der Referenzkultur

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	20 ($\pm 1,7$)
CFC	8,8 ($\pm 1,6$)
CAFC	2,6

Das Diagramm zeigt, dass beide Membranmaterialien für sich einen eindeutig negativen Einfluss auf die Expansion der MNZ haben. Allerdings wird dieser durch die Wirkung der stromalen Zellen kompensiert. Denn sobald stromale Zellen in der Kultur anwesend sind, werden Expansionsraten der MNZ erreicht, die über den Werten der Suspensionskontrolle liegen. Ein sehr ähnliches Bild ergibt sich für die Expansionen der Kolonie-bildenden Zellen und frühen Vorläufer. Vergleicht man die Expansionen der CAFC in den beiden An-

sätzen mit Stroma, so fällt auf, dass hier der Materialeinfluss keine Rolle mehr spielt. Lediglich auf Basis der MNZ und CFC sind Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Membranmaterialien zu erkennen. Die höhere Expansion der MNZ im MMR mit PC führt dabei nicht zu einer proportional ansteigenden CAFC Menge, sondern erreicht denselben Wert wie auch die Kultur im MMR mit PE-Membran. Wird die Kultur der HSPC nicht von Stromalen Zellen unterstützt, wirkt sich der Materialeinfluss in beiden Fällen äußerst negativ aus, die Zellen verlieren deutlich an Proliferationspotential und weisen eine schlechtere Qualität auf (Frequenz der CAFC in MMR aus PC ohne Stroma: 0,3%). Obwohl die PC-Membran bei der Betrachtung der Ergebnisse etwas besser abschneidet, ist aus Gründen der Handhabbarkeit und vor allem der Verfügbarkeit die PE-Membran in allen weiteren Versuchen eingesetzt worden. Bei beiden Membranen handelt es sich um unlaminierte Spezialanfertigungen. Die PC-Membran wurde aus den USA bezogen. Lieferzeiten von drei Monaten erwiesen sich jedoch als nicht kompatibel mit den durchzuführenden Experimenten.

Allgemein wurde gezeigt, dass das System des MMR einer Suspensionskultur klar überlegen ist. Dies betrifft sowohl die Menge als auch die Qualität der kultivierten hämatopoietischen Zellen.

In der Abbildung VII-9 liegen die relativen Expansionen der MNZ in Ansätzen mit stromaler Unterstützung bei Faktor 1,1 (PE) bzw. Faktor 1,5 (PC). Nun muss berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um Zellen handelt, die zum Zeitpunkt der Ernte auf der Membran auflagen. Da jedoch das Zusammensetzen des MMR, besonders unter Verwendung der sehr dünnen PC-Membran, nicht immer optimal gelang, rutschten einige inokulierte Zellen an den Halteringen vorbei ins untere Kompartiment (s. o.). Wurde nun der Anteil dieser Zellen ebenfalls bestimmt und zu den übrigen Zellen hinzugezählt, so ergaben sich wesentlich höhere Expansionsfaktoren, wobei der tendenzielle positive Einfluss des Stromas sogar noch deutlicher ausfiel. Die Expansionen der CFC und CAFC erhöhten sich entsprechend.

Tabelle VII-5: Relative Expansionen im MMR unter Berücksichtigung aller Zellen

Ansatz	Relativer Expansionsfaktor der MNZ
PE plus Stroma	1,4
PE ohne Stroma	0,8
PC plus Stroma	2,2
PC ohne Stroma	0,8

Es hat sich herausgestellt, dass hier die Zellverluste in Ansätzen mit PE-Membran bei 17% ($\pm$ 3%), also im Durchschnitt, lagen. Durch Verwendung der dünneren PC-Membranen stieg dieser Anteil sogar auf 32% ($\pm$ 2%) an.

In keinem Fall konnten stromale Zellen im HSPC-Kompartiment detektiert werden.

Die Wahl der geeigneten Porengröße

Die Porengröße der Membran stellt einen besonders kritischen Aspekt der Membran-separierten Co-Kultur dar. Sie sollte ausreichend klein sein, damit eine Trennung der beiden Zelltypen, Stroma und hämatopoietische Zellen, gewährleistet ist. Der Durchmesser der Poren darf andererseits nicht zu klein gewählt werden, um noch ein Durchdringen der stromalen Zellausläufer durch die Membran zu ermöglichen. Rasterelektronenmikroskopische Bilder, die von repräsentativen Membranausschnitten aufgenommen wurden, erlauben einen direkten Blick auf die Membran und darauf haftende Zellen (vergleiche Abbildung VII-10). Die gezeigten Aufnahmen verdeutlichen anschaulich, dass eine Porengröße von 0,4 μ m zu klein ist, um stromalen Ausläufern die Passage durch die Membran zu ermöglichen. Der Durchmesser der Poren ist nur knapp halb so groß wie der des im Bild sichtbaren Zellarmes. An dieser Stelle soll deswegen kurz kritisch erwähnt sein, dass die von Hotta et al. gemachten Beobachtungen bezüglich einer unterstützenden Funktion stromaler Zellen nicht auf einen direkten Kontakt dieser Zellen mit HSPC zurückgeführt werden können. Wie später näher erläutert wird, sind Versuche zur Membran-separierten Co-Kultur mithilfe des Transwell-Systems durchgeführt worden, dessen Porengröße lediglich 0,4 μ m betrug [189].

Betrachtet man jetzt die Bilder der 3,0 μ m Poren, so lässt sich leicht erkennen, dass in diesem Fall die stromale Zelle vollständig durch die Pore gelangt. Dieser Durchmesser ist daher zu groß, die Zellen werden nicht ausreichend separiert. Es wurden zusätzlich Aufnahmen von Membranen mit 0,1 μ m und 5,0 μ m Poren gemacht, die jedoch nicht gezeigt sind.

Poren mit einem Durchmesser von 1,0 μ m erwiesen sich als ideal - der große Zellkörper des Stromas wird zurückgehalten, und nur lange, dünne Zellausläufer reichen durch die Poren auf die gegenüberliegende Membranseite, wo sie an die hämatopoietischen Zellen anheften (Abbildung VII-1).

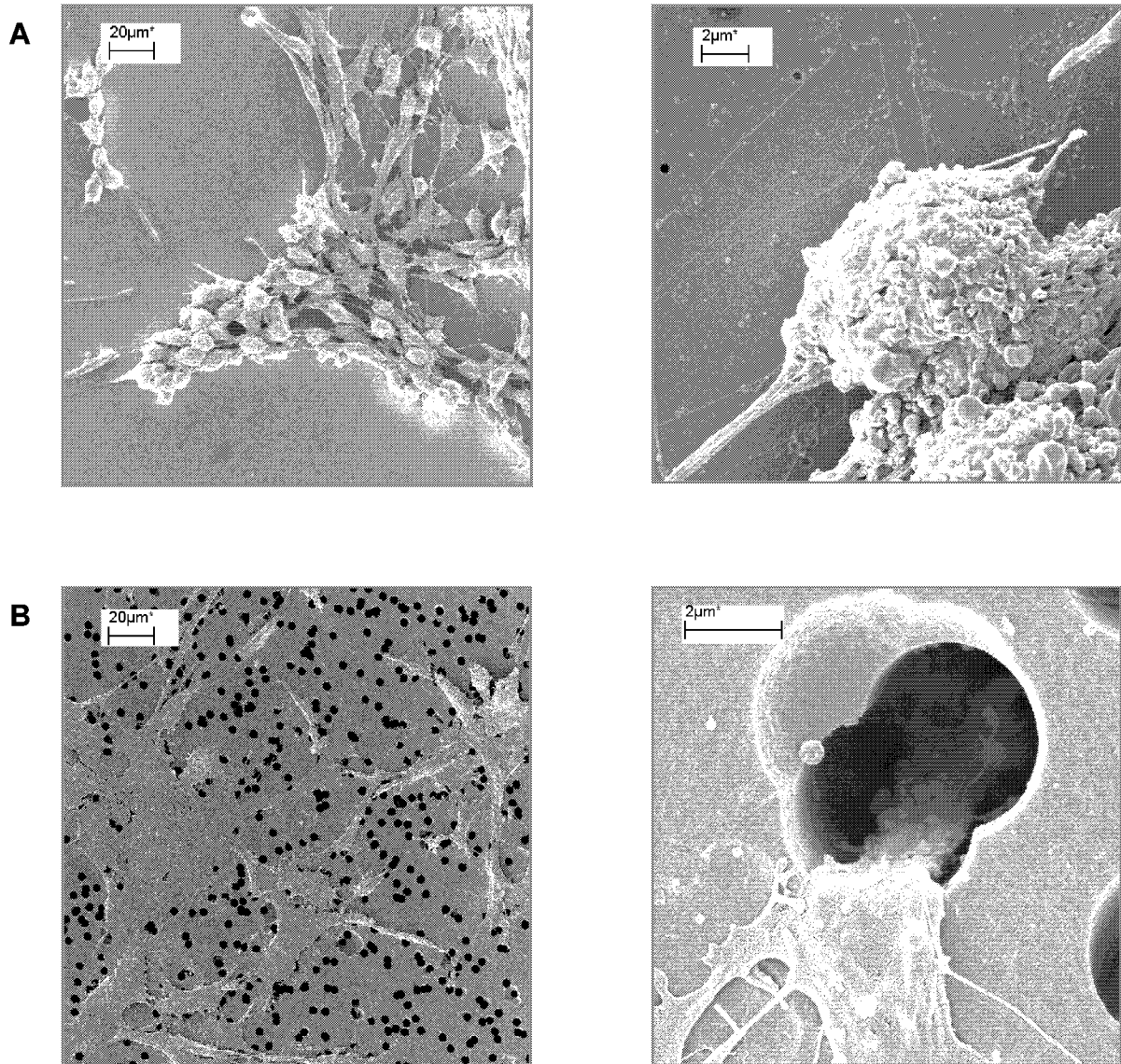


Abbildung VII-10: Vergleich verschiedener Porengrößen A: 0,4 μm Pore B: 3,0 μm Pore

Die Poren der Membran entstehen durch Teilchenbeschuss beispielsweise in einem Cyclotron Beschleuniger. An der Austrittsstelle entstehende Membranfetzen werden weggeätzt, um die Oberfläche zu glätten. Da der Einschusswinkel nicht immer 90° beträgt, können sich die Löcher an der Einschussstelle überschneiden. Allerdings führt dies nicht zu einer Vergrößerung des maximalen Innendurchmessers der Poren, optisch durch REM-Aufnahmen belegt (siehe Abbildung VII-11). Auf der Oberfläche der Membran sind die Konturen von drei nebeneinander liegenden, sich leicht überschneidenden Einschussstellen sichtbar. Im Innern der Membran weichen die Porenkanäle voneinander ab, sodass der Porendurchmesser nicht vergrößert wird.

Zudem wird von Herstellerseite der maximale Porendurchmesser mithilfe des *bubble-point*

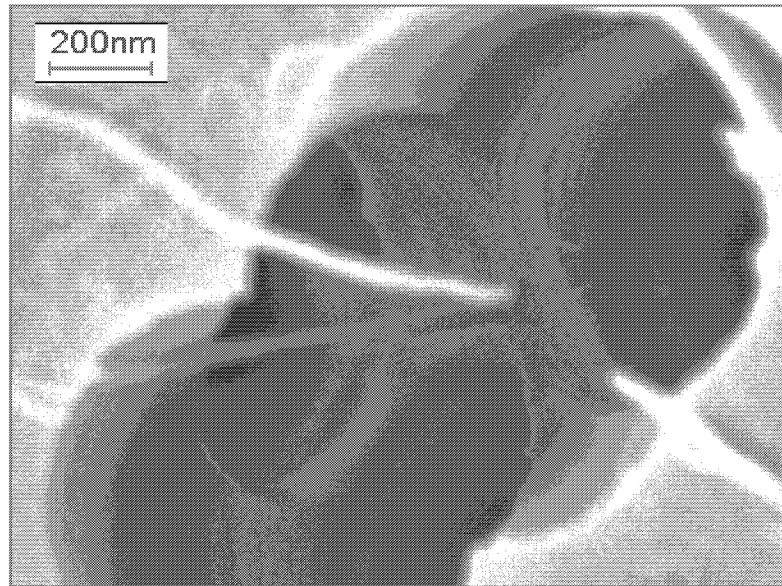


Abbildung VII-11: In die Tiefe fokussierte REM-Aufnahme dreier sich überschneidender Poren, Porendurchmesser 1,0µm

Tests ermittelt.

Stromale Zellen im MMR

Eine geeignete Stroma-Inokulumsdichte wurde mikroskopisch anhand der bewachsenen Membranfläche bestimmt. Dazu wurden Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen auf Membranfilter aufgebracht, über Nacht inkubiert und schließlich mit Neutralrot (Vitalfarbstoff) gefärbt. Die Filter wurden anschließend fotografiert, und die Auswertung ergab, dass eine Konzentration von $5,0E+04$ bis $1,0E+05$ Zellen pro Filter ausreicht, um die Fläche ca. semi-konfluent zu bedecken. Dies entspricht einem Verhältnis von 10:1 bzw. 20:1 zur eingesetzten HSPC-Menge.

VII.1.3. Kulturvarianten

Bevor die Kultur von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen im Mini-Membranreaktor optimiert werden konnte, mussten die oben erläuterten wesentlichen Grundvoraussetzungen des Systems erfüllt sein. Die hämatopoietische Zelle KG-1 eignete sich gut zur Etablierung der generellen Kulturtechnik und Verbesserung der Zellernte. Mithilfe rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde die optimale Porengröße von 1,0µm ermittelt. Verschiedene Materialtests lieferten den Hinweis, dass sowohl PE- als auch PC-Membranen einen negativen Einfluss auf hämatopoietische Zellen besitzen. Dieser kann jedoch durch stromale Zellen maskiert und überkompensiert werden. Zudem

konnte gezeigt werden, dass stromale Zellen problemlos auch kopfüber an der porösen Membran haften bleiben.

Nachdem also die grundlegenden technische Voraussetzungen erfüllt waren, wurde unter Verwendung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen die Eignung des Mini-Membranreaktors im Hinblick auf die Vermehrung und Qualität dieser Zellen detaillierter analysiert.

Die Zelllinie der Wahl

Bereits im Rahmen der Untersuchungen zu Stroma konditionierten Medien konnte ein erheblicher Einfluss der jeweils verwendeten stromalen Zelllinie festgestellt werden. Besonders eindrucksvoll äußerte sich der Unterschied zwischen MS-5 und SI/SI, deren SCM sich sichtbar und nachweislich in der Art und Menge der enthaltenen Proteine unterschieden. Daher sollte ermittelt werden, welche der drei zur Verfügung stehenden Zelllinien für die Kultur im MMR-System besonders gut geeignet ist. Denn hier ist nicht nur die Art und Menge der sekretierten Proteine von Bedeutung, sondern es spielen auch Zell-Zell und Zell-ECM Wechselwirkung eine entscheidende Rolle für die Unterstützung der HSPC-Expansion.

Tabelle VII-6: Expansionen in der Referenzkultur, Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	45 ($\pm$ 35)
CFC	18 ($\pm$ 9,9)
CAFC	6 ($\pm$ 3,7)

Die Unterseiten der MMRs wurden mit M2-10B4 mod., MS-5 oder SI/SI beschichtet und für einen Zeitraum von 168h mit HSPC kultiviert. Abbildung VII-12 zeigt die gemittelten relativen Expansionsfaktoren von drei unabhängigen Versuchsansätzen. In Tabelle VII-6 sind die gemittelten Expansionen der drei entsprechenden Suspensionskulturen zusammengefasst.

Es lässt sich der Trend erkennen, dass die Zelllinie M2-10B4 mod. die Expansion aller drei untersuchten Populationen am besten unterstützt. Besonders deutlich fällt der Unterschied im Bezug auf die CFC aus (M2-10B4 mod.: Faktor 1,53; MS-5: Faktor 1,24; SI/SI: Faktor 1,06). Tendenziell gilt dies auch für die MNZ. Dagegen unterscheiden sich die

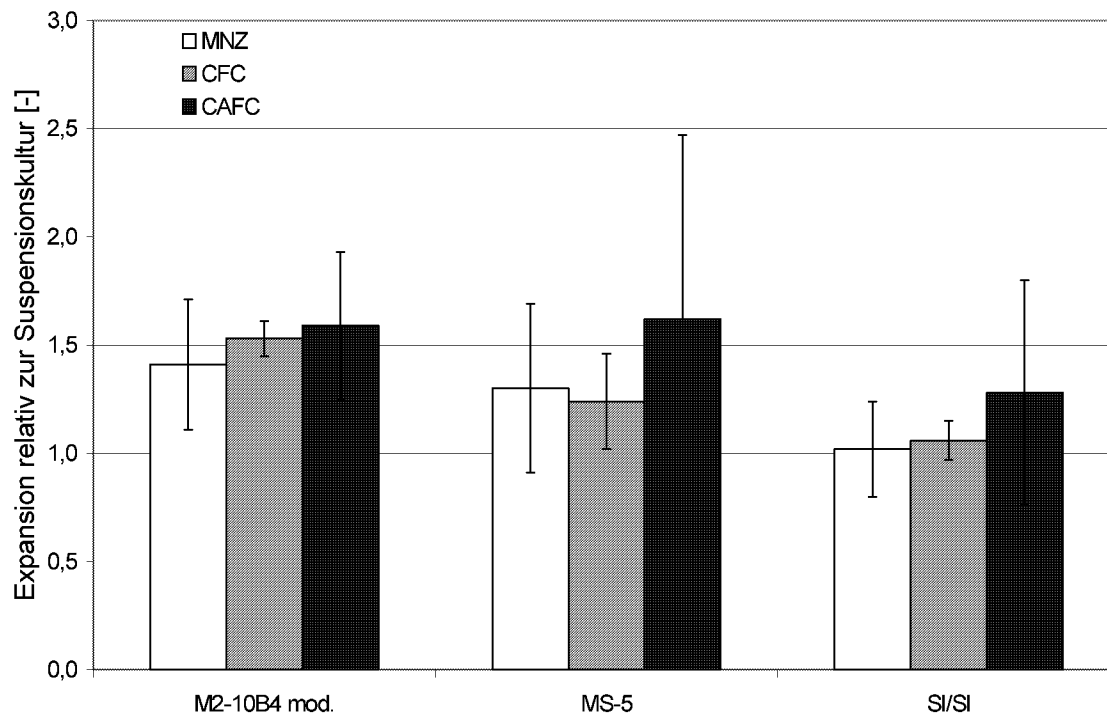


Abbildung VII-12: Relative Expansionen der betrachteten Subpopulationen in MMR mit unterschiedlichen stromalen Zellen

CAFC-Expansionen in Kulturen mit M2-10B4 mod. und MS-5 nicht voneinander und liefern in beiden Fällen deutlich positive Ergebnisse. Die Werte der MS-5 Kultur schwanken jedoch stark. Die frühen Vorläuferzellen können durch die Unterstützung der M2-10B4 mod. und der MS-5 im Mittel um 50% gegenüber der herkömmlichen Suspensionskultur vermehrt werden. Erneut schneidet die Zelllinie SI/SI im Vergleich zu den übrigen schlechter ab.

Insgesamt kann, auch in anbetracht der in Abbildung VII-8 dargestellten Ergebnisse, festgehalten werden, dass der Mini-Membranreaktor einer Suspensionskultur deutlich überlegen ist. Mithilfe des MMR ist es in obigem Versuch gelungen, die Expansion der besonders wichtigen CAFC im Mittel um Faktor 1,6 gegenüber der Suspensionskultur zu vermehren. Übertragen auf die mittlere in dieser Arbeit erreichte Expansion der CAFC in Suspensionskultur, Faktor 7,1 (siehe Abbildung V-1), erzielt man im MMR eine effektive Expansion um Faktor 11,4. Auch die MNZ und CFC konnten deutlich gegenüber der Suspensionskultur zulegen.

Analysen zur Medienversorgung im MMR

Betrachtet man den Aufbau des MMR, und besonders das geringe Medienvolumen, welches den HSPC in ihrem Kompartiment direkt zur Verfügung steht, so könnte man vermuten, dass die Zellen bezüglich der Medienversorgung limitiert sind. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden die im Folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt. In allen Fällen wurde Stroma der Zelllinie M2-10B4 mod. eingesetzt.

Einfluss der Konvektion

Wie bereits oben beschrieben, ist der Medienverbrauch durch stromale Zellen nicht unerheblich. Da die HSPC im oberen Kompartiment in einem Maximalvolumen von 600µL kultiviert werden, sollte analysiert werden, ob durch konvektive Medienversorgung die Qualität der Kultur verbessert werden kann. Zu diesem Zweck wurde ein Magnetrührfisch auf dem Plattenboden platziert und die gesamte Gewebekulturplatte auf einer Magnetrührerplatte im Brutschrank kultiviert. Durch die Drehung des Rührers entsteht eine Schlaufenströmung, die allerdings nur bei einem Gesamtvolumen von 4mL wirksam werden kann. Bei einem Füllstand von 3,6mL existiert keine Medienverbindung zwischen Stroma- und HSPC-Kompartiment oberhalb des MMR-Randes. Der Medienaustausch kann in diesem Fall, bei einem Volumen von 3,6mL, lediglich über die Membran erfolgen.

Tabelle VII-7: Expansionen in der Referenzkultur

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	41 ($\pm 2,0$)
CFC	30 ($\pm 3,3$)
CAFC	3,2

Abbildung VII-13 verdeutlicht, dass durch Anlegen einer Strömung (gerührt A und B) die Expansion der untersuchten Populationen im Vergleich zur statischen Kultur nicht verbessert werden kann. Besonders die frühen Vorläufer scheinen vielmehr eine statische Kultur zu bevorzugen, denn deren relative Expansionsraten unterscheiden sich erheblich voneinander. Vergleicht man den gerührten Ansatz A mit dem ungerührten, statischen Ansatz (beide mit einem Volumen von 3,6mL Medium), so sind die MNZ- und CFC-Expansionen vergleichbar, die CAFC expandieren im statischen, ungerührten System eindeutig besser.

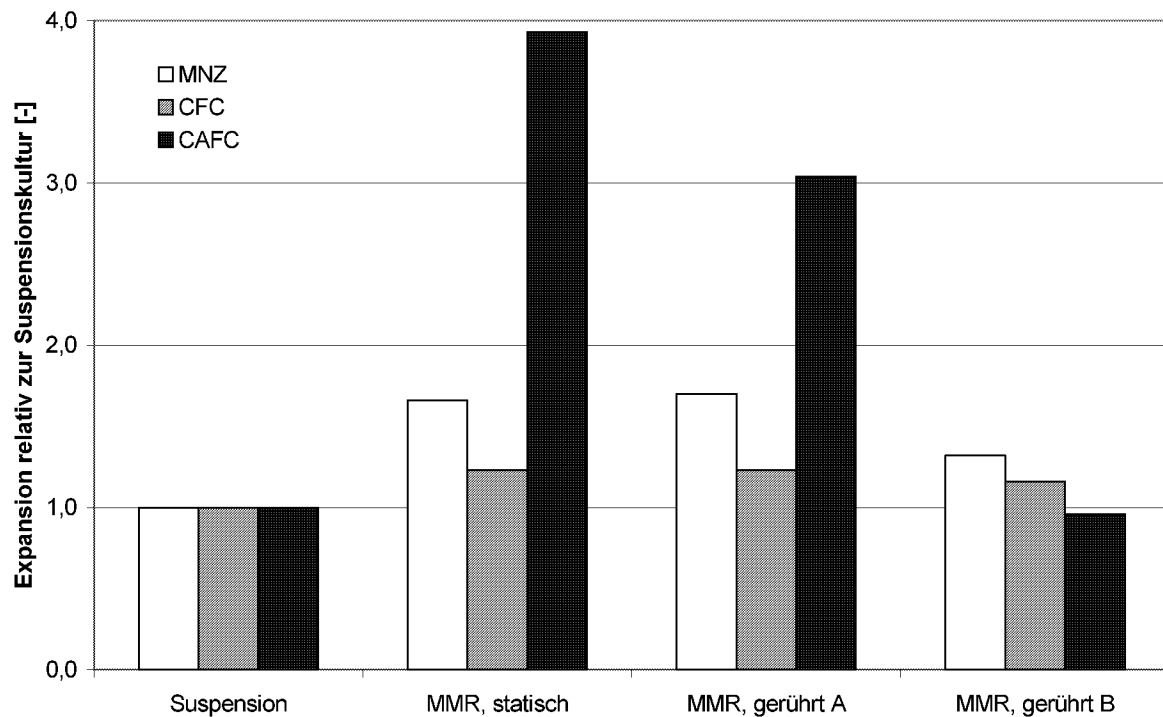


Abbildung VII–13: MMR statisch bzw. gerührt (A: 3,6mL Medienvolumen; B: 4,0mL Medienvolumen)

Betrachtet man dagegen die beiden gerührten Systeme (A: 3,6mL; B: 4,0mL Medium), so fällt auf, dass die nur bei höherem Medienfüllstand wirksame Schlaufenströmung einen sehr negativen Einfluss auf die Qualität der kultivierten Zellen hat. Dies spiegelt sich nicht nur in den Expansionsfaktoren, sondern auch in der verminderten Frequenz der CAFC wider (A: 1,76%; B: 0,72%), ist also unabhängig von der analysierten Zellmenge.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Sauerstoffversorgung im ungerührten System ausreichend hoch ist und der Sauerstoffeintrag durch Rühren der Kultur nicht erhöht werden muss. Im Gegenteil, besonders die im bezug auf den Sauerstoffeintrag effektivere Schlaufenströmung scheint sich auf die Menge und Qualität der Zellen negativ auszuwirken.

In den drei betrachteten MMR-Kulturvarianten ist der Zellverlust relativ hoch und liegt jeweils bei ca. 35%. Das bedeutet, dass die relativen Expansionsfaktoren unter Berücksichtigung der auf dem Plattenboden befindlichen Zellen real größer sind (relative Expansion der MNZ statisch: 2,5; gerührt A: 2,6; gerührt B: 2,0), die Verhältnisse jedoch etwa gleich bleiben.

Im Vergleich zur Abbildung VII-12 liegen die relativen Expansionen, besonders die der frühen Vorläufer, wesentlich höher. Dieses Ergebnis macht nochmals klar, dass es sich bei den HSPC um Proben mit hoher natürlicher Variation handelt. Daher sollten hauptsächlich Ergebnisse innerhalb eines Versuches verglichen werden, da nur in diesem Fall dieselbe Zellprobe betrachtet wird.

Fütterungsstrategien

Bei den oben dargestellten Versuchen handelt es sich um ungefütterte Kulturen. Daher sollte nun der Einfluss der Fütterung auf die Expansion und Qualität der Zellen untersucht werden. Durch das Zufüttern von frischem Medium und dem Entfernen eines Teils des verbrauchten Mediums werden einerseits frische Nährstoffe zugeführt, auf der anderen Seite werden Stoffwechselendprodukte hauptsächlich der stromalen Zellen verdünnt. Man muss allerdings auch bedenken, dass ebenfalls die stromalen, sekretierten Faktoren verdünnt werden. Dieser Aspekt wurde bereits im Zusammenhang mit SCM diskutiert.

Die Zellen wurden täglich, jeden zweiten Tag, einmalig an Tag 5 (120h), oder überhaupt nicht gefüttert. Es wurde jeweils ein Volumen von 800µL des Stroma-Kompartiments ausgetauscht (ca. 22% des Gesamtvolumens). Das HSPC-Kompartiment blieb unverändert, sodass frische Nährstoffe zwangsläufig durch Diffusion über die Membran zu den hämatopoietischen Zellen gelangen mussten.

Eine solche Fütterungsstrategie wird verbreitet auch von anderen Gruppen verfolgt und ist ausreichend für die Bedürfnisse der HSPC. Daher sollte zunächst die gängige Praxis angewandt und charakterisiert werden, bevor evtl. kontinuierliche Systeme entwickelt werden.

In Abbildung VII-14 ist zunächst der Anteil der zum Zeitpunkt der Zellernte auf dem Plattenboden befindlichen Zellen dargestellt. Dieser Anteil ist bei den täglich gefütterten Kulturen mit ca. 65% sehr hoch und lässt darauf schließen, dass durch den Medienwechsel im äußeren Kompartiment hämatopoietische Zellen von der Membran rutschen. Der Anteil dieser Zellen verringert sich mit abnehmender Fütterungsfrequenz auf lediglich ca. 15% in der ungefütterten Kultur. Da die Anteile der Zellen auf dem Plattenboden in diesem Versuch z. T. sehr hoch sind, wurden sie zur Bilanzierung der Expansionsfaktoren mit berücksichtigt. Die Frequenz der Vorläufer und frühen Vorläufer bezieht sich allerdings wie üblich nur auf Zellen, die zum Zeitpunkt der Zellernte auf der Membran auflagen.

Abbildung VII-15 zeigt die Expansionsfaktoren aller untersuchten Populationen der Ansätze mit unterschiedlichen Fütterungsstrategien. Es fällt auf, dass die MNZ-Expansion mit zunehmender Fütterungsfrequenz zunimmt, die Zellen also durch die Zufuhr von frischem Medium und die Verminderung der Stoffwechselendprodukte profitieren. Im Vergleich zum ungefütterten Ansatz expandieren die täglich gefütterten mononukleären Zellen um ca. 60% stärker.

Etwas anders stellt sich das Bild der CFC-Expansion dar. Hier liegt die Expansion mit Faktor 26 im täglich gefütterten Ansatz am niedrigsten und ist in den anderen Ansätzen mit Faktor 28-30 kaum verändert. Die Unterschiede sind aber insgesamt wesentlich weniger prägnant, verglichen mit den MNZ-Expansionen.

Wiederum ein anderes Bild liefert die Expansion der frühen Vorläufer. Hier werden die besten Ergebnisse im ungefütterten Ansatz mit Faktor 17 erreicht. Auch die Frequenz der CAFC steigt mit abnehmender Fütterungsrate an und liegt im ungefütterten Ansatz um 100% über der täglichen Versorgung mit frischem Medium (vergleiche Tabelle VII-8). Daraus lässt sich schließen, dass die frühen Vorläufer eher von der Akkumulation stromaler Faktoren als von frischen Medienkomponenten profitieren. Täglich gefütterte Zellen neigen offensichtlich zur Ausdifferenzierung, da der Anteil früher Vorläuferzellen hier verhältnismäßig niedrig ist. Ein weiterer Aspekt ist sicherlich, analog zum oben dargestellten Strömungsversuch, dass frühe Vorläufer eine statische, unmanipulierte Kultur bevorzugen.

Tabelle VII-8: CAFC-Frequenzen der Kulturen mit unterschiedlichen Fütterungsstrategien

täglich	2-täglich	Tag 5 (120h)	ungefütterter
2,1%	2,1%	2,4%	4,4%

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse des Fütterungsversuches die bereits im Zusammenhang mit den SCM gemachten Beobachtungen, dass insbesondere die CAFC von der Anreicherung positiv wirkender, stromaler Faktoren profitieren. Sie sind gegenüber niedrigeren Nährstoffkonzentrationen bzw. entsprechend erhöhten Konzentrationen von Stoffwechselendprodukten wesentlich weniger sensitiv als die Gesamtheit der mononukleären Zellen. Diese These wird durch die in Abbildung VI-13 dargestellten Daten unterstützt. Hier führte die 50%ige Verdünnung des Stroma konditionierten Mediums mit frischem X-Vivo 10 auch zu einer eindeutigen Abnahme der

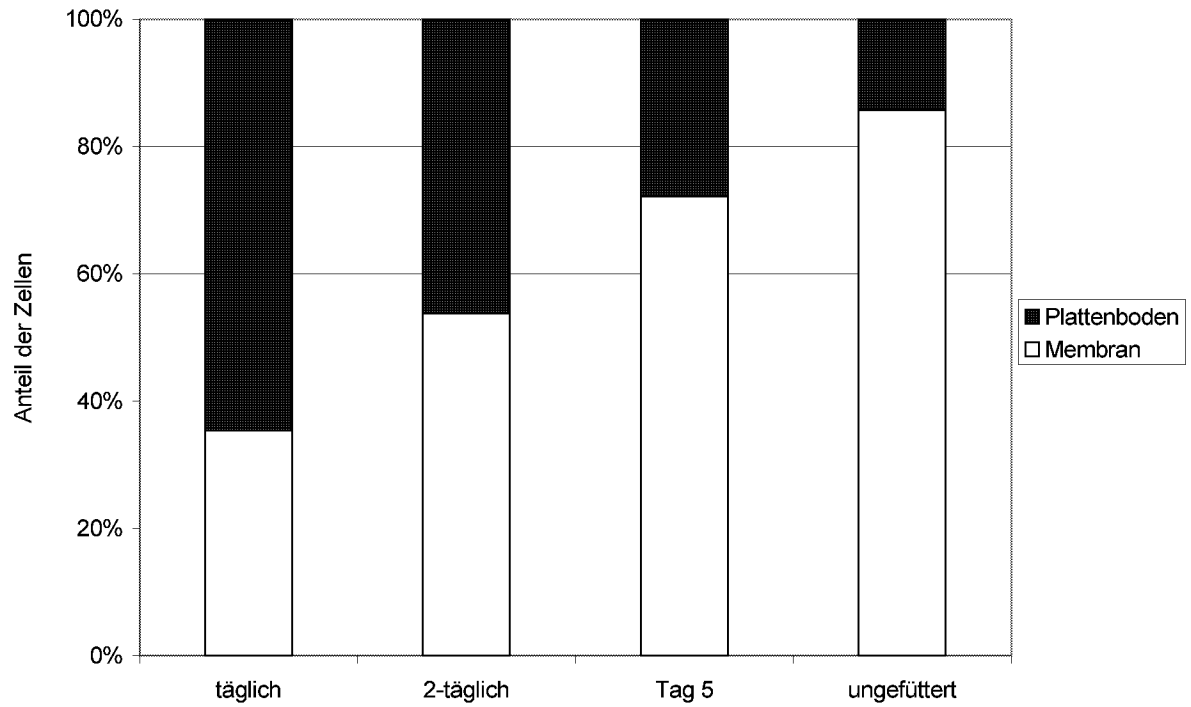


Abbildung VII–14: Anteile der Zellen auf der Membran bzw. dem Plattenboden

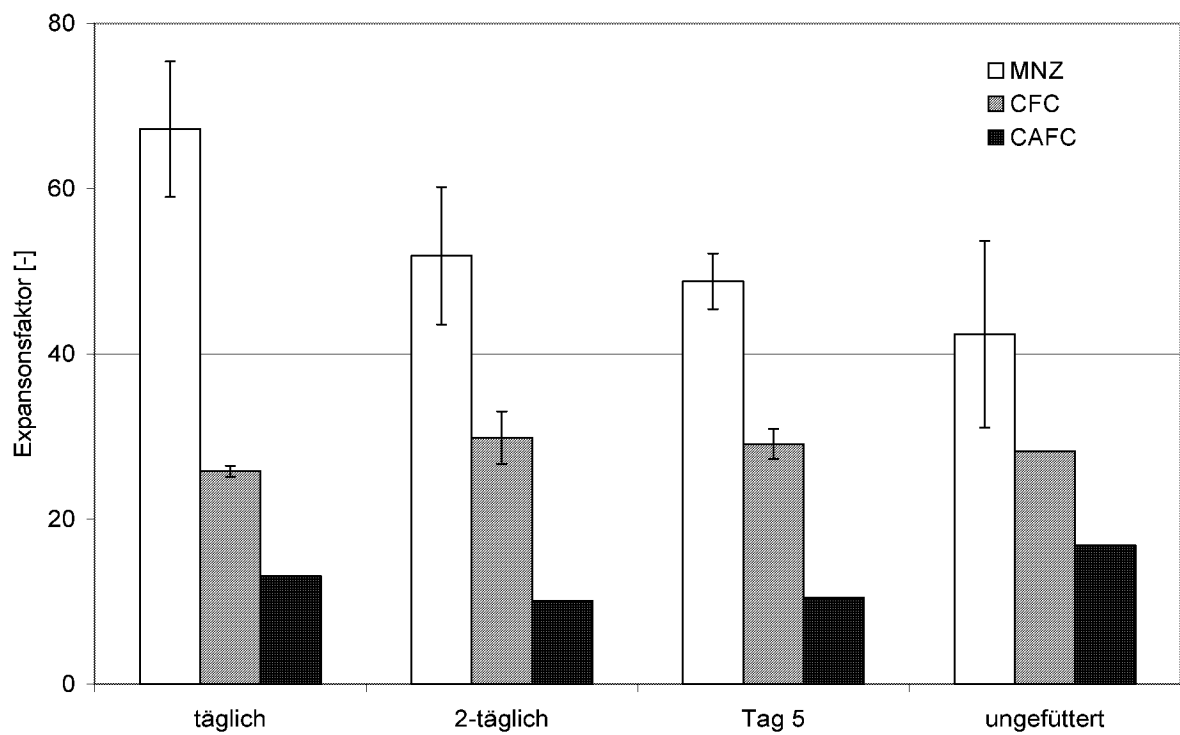


Abbildung VII–15: Expansionen der MNZ, CFC und CAFC in Abhängigkeit von der verfolgten Fütterungsstrategie

CAFC um ca. 50%, verglichen mit der Kultur in 100%igem SCM. Die MNZ und CFC wiesen diesen Effekt nicht auf.

Betrachtet man die in Tabelle VII-9 dargestellten Werte der Glukose- und Laktatkonzentration, wird anschaulich, wie gering der Medienverbrauch durch die hämatopoietischen Zellen ist, und dass die Zellen zu keinem Zeitpunkt der Kultur unterversorgt waren oder durch Laktat inhibiert wurden. Denn selbst im ungefütterten Ansatz lag die Laktatkonzentration bei lediglich 5,4mmol/L, die Glukosekonzentration hat sich kaum, auf 21mmol/L reduziert.

Tabelle VII-9: Über den Zeitraum der Kultur (168h) gemittelte Konzentration der Medienkomponenten

Medienkomponente [mmol/L]	täglich	2-täglich	Tag 5	ungefüttert
Glukose	24 ($\pm 0,3$)	22 ($\pm 1,1$)	22 ($\pm 0,1$)	21 (± 0)
Laktat	1,7 ($\pm 0,9$)	2,7 ($\pm 1,1$)	3,6 ($\pm 0,3$)	5,4 (± 0)

Es scheint also, dass hauptsächlich die Akkumulation stromaler Faktoren für die Qualität der HSPC verantwortlich ist. Warum die MNZ deutlich besser proliferieren, wenn das Medium täglich anteilig ausgetauscht wird, geht aus den Mediendaten nicht hervor. Denn die Differenz der Daten zwischen täglicher bzw. fehlender Fütterung ist minimal. Auch die nicht gezeigten Konzentrationen für Glutamin sind sehr ähnlich (tägliche Fütterung: $2,95 \pm 0,13$; ungefüttert: $2,11 \pm 0,0$).

Die maximal erzielte Zelldichte

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass die im MMR für eine Dauer von 168 Stunden kultivierten HSPC nicht zwangsläufig limitiert sind. Im Folgenden wird daher eine Batch-Kultur beschrieben, deren Kultivierungsdauer von 168 auf 288 Stunden ausgedehnt wurde. Dargestellt sind die Zellzahlen im MMR im Vergleich zur Suspensionskultur ohne MMR-Einsatz.

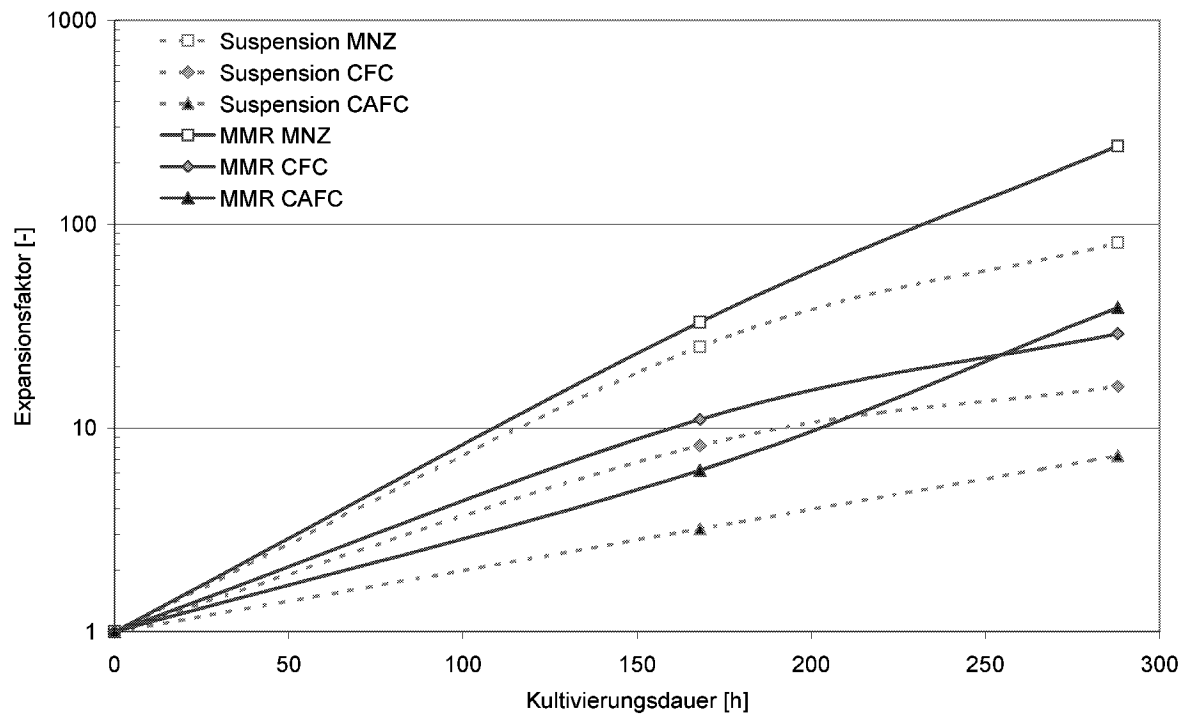


Abbildung VII-16: Expansionsfaktoren der untersuchten Zellpopulationen in Suspensionskultur (gestrichelte Linie) oder kultiviert im MMR (durchgezogene Linie)

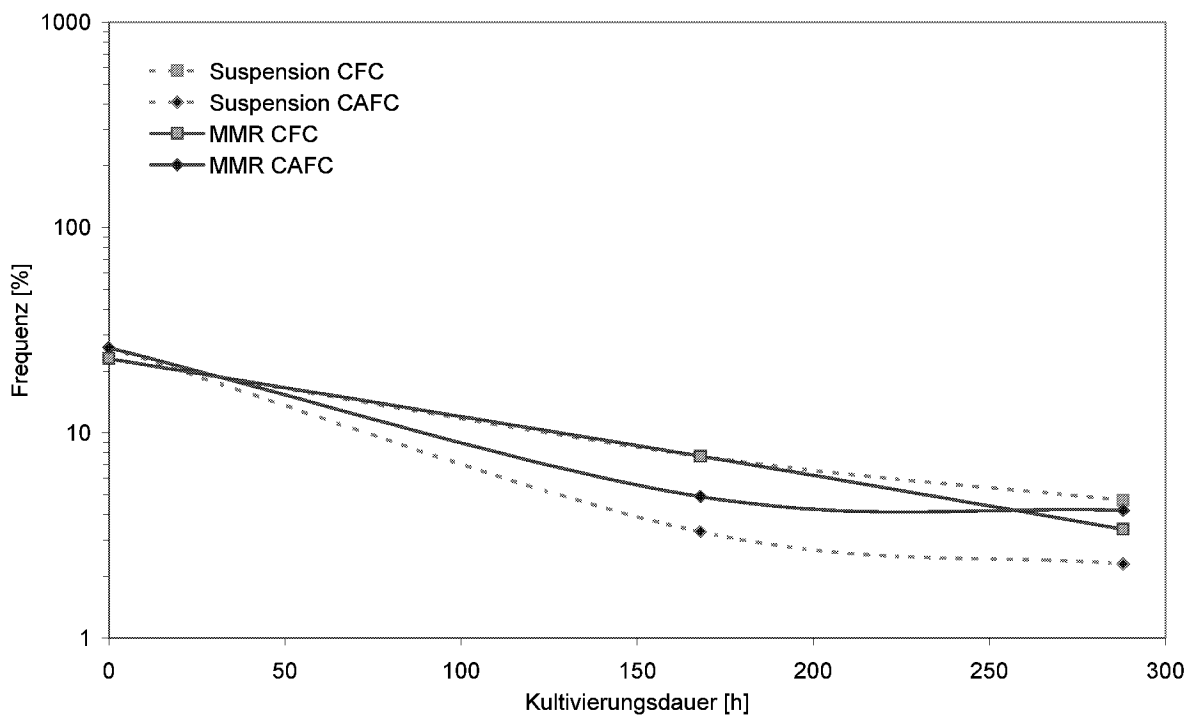


Abbildung VII-17: Frequenzen der CFC und CAFC in Suspensionskultur (gestrichelte Linie) oder kultiviert im MMR (durchgezogene Linie)

Tabelle VII-10: Expansionen in der Referenzkultur nach 168 Stunden

Zellpopulation	Expansionsfaktor
MNZ	25 ($\pm$ 2,4)
CFC	8,2 ($\pm$ 1,8)
CAFC	3,2

Am Ende der Kultur, nach 288h, betrug die Zellzahl im MMR 1,2E+06c (Expansionsfaktor 242). In einem vorhergehenden Experiment konnte eine Zellzahl von 1,4E+06c bereits nach 240h erreicht werden (Expansionsfaktor 273, nicht gezeigt). Die Zellzahl in der Suspensionskultur lag nach 288h bei lediglich 4,1E+05c (Expansionsfaktor 81). Es muss beachtet werden, dass das Gesamtmedienvolumen in der Suspensionskultur in diesem Fall lediglich 1mL betrug, verglichen mit 3,6mL im MMR. Allerdings befindet sich in der Suspensionskultur kein zweiter Verbraucher in Form von stromalen Zellen, die jedoch im MMR mit der Standardzellzahl von 5,0E+05c/MMR vorliegen.

Die CFC expandierten im MMR schlechter als in der Suspensionskultur (Faktor 16 und 29). Die frühen Vorläufer konnten hingegen wieder erheblich von der Anwesenheit stromaler Faktoren profitieren und expandierten im MMR deutlich stärker, verglichen mit der Stroma freien Suspensionskultur (Faktor 39 vs. 7,3).

Die Werte in Tabelle VII-11 zeigen relative Expansionsfaktoren bezogen auf die Suspensionskultur nach 168 Stunden. Es wird verdeutlicht, dass besonders die frühen Vorläuferzellen in der zeitlich verlängerten MMR-Kultur vermehrt werden konnten (relativer Expansionsfaktor 12,3 im MMR nach 288h gegenüber der Suspension nach 168h; lediglich relativer Faktor 2,3 in Suspension nach 288h). Auch die CFC im MMR konnten um Faktor 3,5 gegenüber der Suspensionskultur nach 168h vermehrt werden (lediglich Faktor 2,0 in Suspension nach 288h).

Tabelle VII-11: Relative Expansionsfaktoren im Vergleich zur Suspensionskultur nach 168h

Zellpopulation	Suspension 168h	MMR 168h	Suspension 288h	MMR 288h
MNZ	1,00	1,3	3,2	9,7
CFC	1,00	1,3	2,0	3,5
CAFC	1,00	1,9	2,3	12,3

Die Expansion der MNZ ist im MMR nach im Vergleich zur Suspension nach 288h um 300% angestiegen. Die Expansion der frühen Vorläufer fällt also mit einem Anstieg der Expansion von über 500% klar überproportional aus. Nochmals wird hier die Überlegenheit der Membran-separierten Co-Kultur insbesondere im Hinblick auf die Expansion der CAFC unterstrichen.

Auch die Frequenzen der CAFC lagen in der MMR-Kultur über den Werten der Suspension und nahmen gegen Ende der Kultur nicht wesentlich ab. Die CFC-Frequenzen blieben hingegen hinter denen in Suspension zurück.

VII.1.4. Der NOD/SCID Maus-Repopulierungsversuch

Mithilfe eines NOD/SCID Maus-Repopulierungsversuches sollte ermittelt werden, inwieweit HSPC, die im MMR expandiert wurden, noch zur Rekonstituierung eines hämatopoietischen Systems in der Lage sind. Der Phänotyp einer homozygoten SCID-Maus, gekreuzt auf einen NOD-Hintergrund, entspricht im Wesentlichen dem des humanen schweren Immundefektes. Hier ist die Hämatopoiese gestört, und es werden keine funktionalen T- und B-Lymphozyten gebildet. Lediglich eine basale angeborene Immunität, vermittelt durch NK-Zellen (*Natural Killer*), ist nachweisbar. Da das stromale Mikromilieu der Mäuse nicht beeinträchtigt ist, können humane hämatopoietische Zellen nach Injektion das Knochenmark der Tiere besiedeln (*homing*) und funktionale Blutzellen produzieren. Die NOD/SCID Maus dient somit als Modellsystem, um das *engraftment* Potential *ex vivo* expandierter hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen zu analysieren und dieses später auf eine klinische Anwendung zu übertragen.

Zwar fehlen der Maus die Systeme der erworbenen Immunität, dennoch ist ein Teil der angeborenen Immunität in Form von NK-Zellen aktiv. Diese Abwehrzellen verhindern die Reifung von T-Zellen des humanen Xenografts im Thymus. Aus diesem Grund können nach Verabreichung hämatopoietischer Zellen in diese Maus kaum noch T-Zellen humanen Ursprungs detektiert werden. Der Anteil humaner B-Lymphozyten ist wesentlich höher. Im Grunde können fast ausschließlich B-Lymphozyten als Zellen humanen Ursprungs detektiert werden (s.u.).

Es sollten insgesamt drei verschiedene Kultivierungsansätze betrachtet werden, eine Suspensionskultur ohne stromale Unterstützung, und zwei MMR Ansätze mit M2-10B4 mod. oder MS-5. Für jeden Ansatz waren fünf Mäuse vorgesehen, und pro Maus sollten $5,0E+04$ Zellen vermehrt werden.

Praktische Durchführung:

Eine Gruppe von Mäusen wurde mit nicht expandierten Zellen transplantiert. Die übrigen Zellen wurden wie bereits beschrieben kultiviert (siehe Kapitel IV.5). Die Expansionen der Zellen lagen nach 168h Kulturdauer bei Faktor 69 (Suspension), 61 (MMR mit M2-10B4 mod.) und 33 (MMR mit MS-5). In folgenden Konzentrationen wurden den Mäusen die Zellen verabreicht:

- Suspension: $3,4E+06$ c/Maus
- MMR M2-10B4 mod.: $3,0E+06$ c/Maus
- MMR MS-5: $1,6E+06$ c/Maus

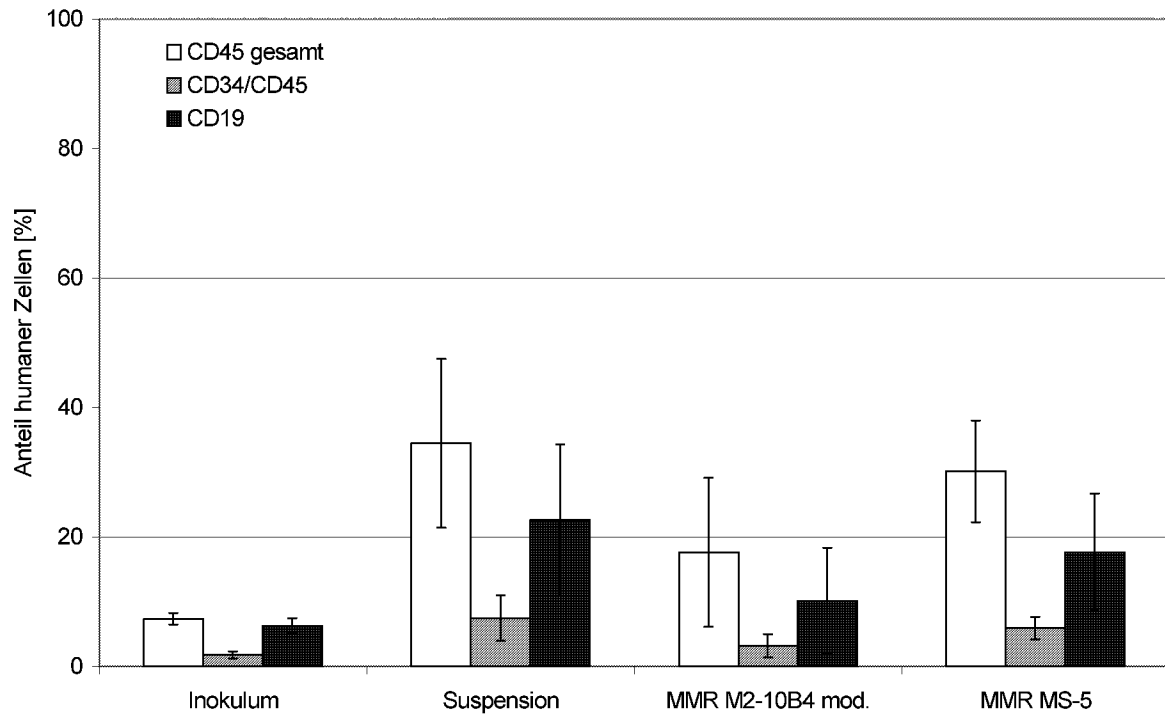
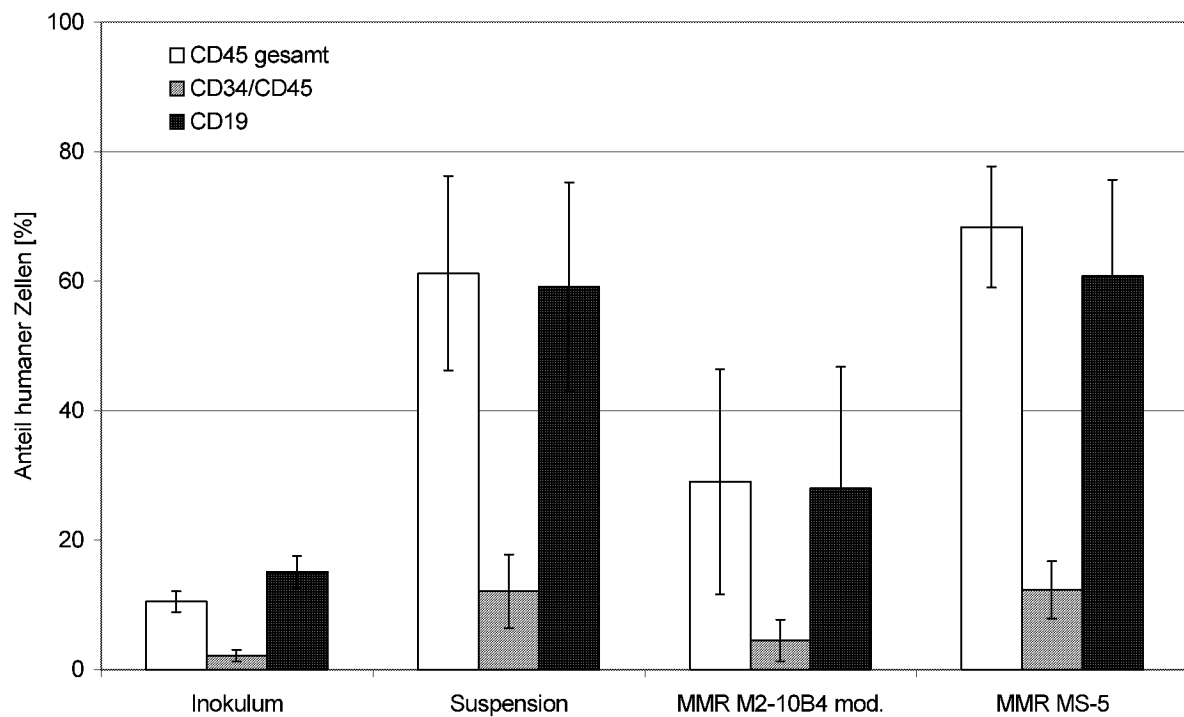
Nach jeweils sechs Wochen wurden die Mäuse getötet, Milz, Knochenmark und peripheres Blut entnommen und hinsichtlich der Expression humaner Oberflächenmarker analysiert.

Tabelle VII-12: Anteil humaner Zellpopulationen ($CD45^+$ gesamt, $CD34^+/CD38^-$, $CD19^+$) im peripheren Blut [%]

	$CD45^+$ gesamt	$CD34^+/CD45^+$	$CD19^+$
Inokulum	$3,1 \pm 2,5$	$0,6 \pm 0,4$	$3,5 \pm 1,4$
Suspension	$12 \pm 2,7$	0	$10 \pm 2,5$
MMR M2-10B4 mod.	$2,4 \pm 0,6$	0	$2,2 \pm 0,8$
MMR MS-5	$6,2 \pm 2,5$	0	$5,5 \pm 2,3$

Tabelle VII-13: Anteil humaner Zellpopulationen ($CD45^+$ gesamt, $CD34^+/CD38^-$, $CD19^+$) in der Milz [%]

	$CD45^+$ gesamt	$CD34^+/CD45^+$	$CD19^+$
Inokulum	$1,0 \pm 0,6$	nd	nd
Suspension	$3,1 \pm 1,0$	nd	nd
MMR M2-10B4 mod.	$0,7 \pm 0,4$	nd	nd
MMR MS-5	$3,4 \pm 2,3$	nd	nd

**Abbildung VII–18:** Anteil humaner Zellen im Knochenmark (Gesamtpopulation)**Abbildung VII–19:** Anteil humaner Zellen im Knochenmark (lymphoide Zellen)

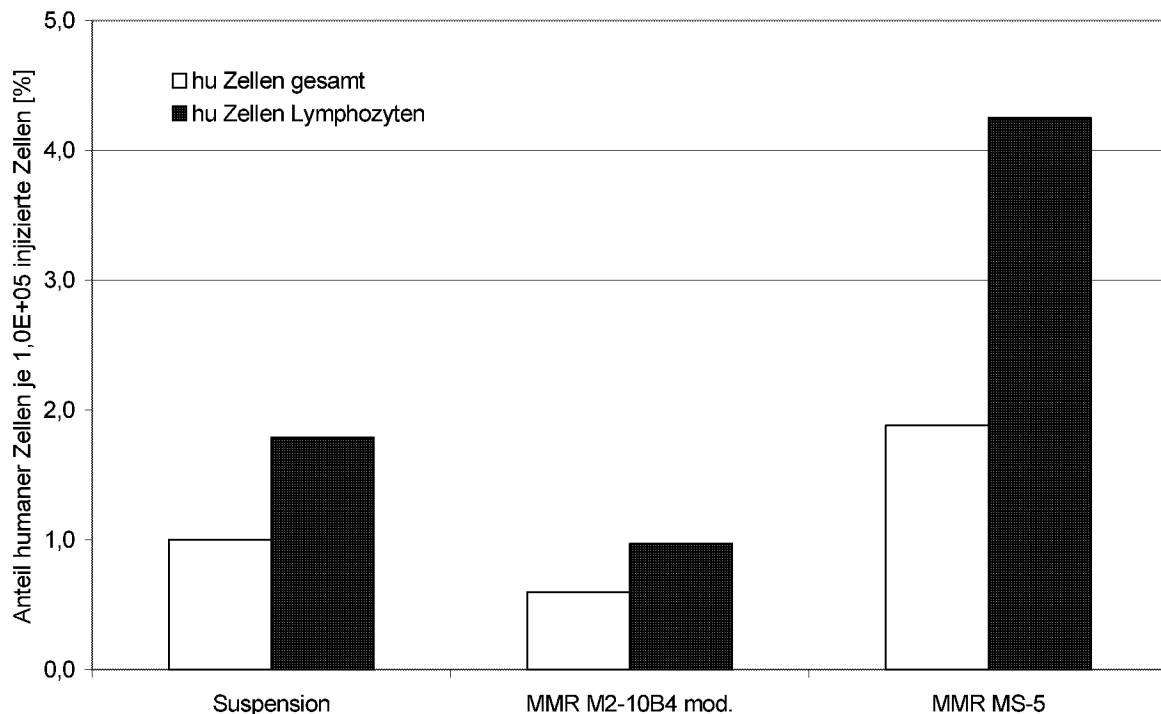


Abbildung VII–20: Prozentualer Anteil humaner Zellen je 1,0E+05 injizierter Zellen der unterschiedlichen Kulturansätze

Der Anteil humaner Lymphozyten im peripheren Blut und der Milz ist sehr gering (vergleiche Tabelle VII-12 und VII-13). Ein anderes Bild zeigt sich bei der Betrachtung humaner Zellen im Knochenmark (Abbildungen VII-18 und VII-19).

Im bezug auf die Gesamtheit der Zellen im Knochenmark sind nach der Kultivierung in Suspension rund 35% der verabreichten Zellen humanen Ursprungs, bzw. 18% (MMR M2-10B4 mod.) und 30% (MMR MS-5). Ein Großteil dieser Zellen sind B-Zellen. Der Anteil der CD34⁺/CD45⁺-Zellen schwankt zwischen 7,5% und 3,2%. Die Summe der CD34/CD45-positiven und der CD45/CD19-positiven Zellen ist größer als die Gesamtmenge der CD45-positiven Zellen. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz liegt in der relativ hohen Messungenauigkeit der FACS-Analyse begründet.

Verglichen mit den Daten der Inokulumsprobe hat der Anteil humaner Zellen zugenommen. Allerdings muss dabei die deutlich größere Zellmenge berücksichtigt werden, die nach der Kultivierung pro Maus injiziert wurde.

Abbildung VII-20 zeigt, wie hoch der jeweilige Anteil humaner, expandierter Zellen in den Mäusen je 1,0E+05 injizierter Zellen war. Dadurch wird das Potential der Zellen, die im

MMR mit MS-5 kultiviert wurden, besonders klar herausgestellt. Bei gleicher Zellmenge konnten hier ca. 4,3% humane Zellen (Lymphozyten) detektiert werden, wohingegen der Anteil der humanen Suspensionszellen bei lediglich 1,8 lag. Die Werte der im MMR mit M2-10B4 mod. expandierten Zellen liegen noch niedriger. Im Vergleich der Kultursysteme schneidet also der Mini-Membranreaktor mit MS-5 stromalen Zellen am besten ab. Allerdings ist ein eindeutiger Qualitätsverlust durch die Kultivierung festzustellen (vergleiche Abschnitt IV.1), denn die prozentualen Anteile humaner nicht expandierter Zellen liegen je $1,0E+005$ injizierter Zellen bei 14% (Gesamtpopulation) bzw. 22% (lymphoide Zellen).

Die Ergebnisse der biologischen Assays und FACS-Analyse lauten wie folgt:

Tabelle VII-14: Frequenz- und Expansionsdaten von CFC und CAFC vor und nach der Kultivierung

	CFC		CAFC	
	Frequenz [%]	Expansion [-]	Frequenz [%]	Expansion [-]
Inokulum	33		8,4	
Suspension	12	25	3,0	24
MMR M2-10B4 mod.	10	19	4,4	32
MMR MS-5	16	17	1,7	6,7

Tabelle VII-15: Expression der Oberflächenmarker vor und nach der Expansion [%]

	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	CD34 ⁺ /CD38 ⁺	CD34 ⁺ /CD45 ⁺	CD34 ⁺ /CXCR4 ⁺
Inokulum	22	71	95	46
Suspension	12	2	12	13
MMR M2-10B4 mod.	8	2	7	10
MMR MS-5	15	5	11	17

Auffällig ist, dass die Repopulierungsfähigkeit der im MMR mit MS-5 expandierten Zellen nicht mit hohen CFC oder CAFC Frequenzen korreliert. Im Gegenteil scheint die deutliche Expansion dieser Populationen in den beiden anderen Ansätzen einen Verlust der Zellqualität im Hinblick auf den Anteil humaner Zellen im NOD/SCID Mausmodell zu bewirken. Denn es bedarf verhältnismäßig mehr Zellen, wenn diese durch die Kultivierungsstra-

tegie deutlich (MNZ um Faktor 69 und 61, CFC um Faktor 25 und 19, CAFC um Faktor 24 und 32) expandiert wurden. Die Unterschiede in der Expression von bestimmten Oberflächenmarkern expandierter Zellen sind nur schwach ausgeprägt und liegen im Rahmen der Messgenauigkeit. In jedem Fall beeinflusst die Kultivierung der Zellen deren Qualität, gemessen an CFC und CAFC Frequenzen und dem Expressionsprofil der Oberflächenmarker, negativ. Diese Beobachtung belegt, dass die Proliferation der Zellen unmittelbar an ihre Differenzierung gekoppelt ist.

VII.1.5. Kurzzusammenfassung und Diskussion III

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte System des Mini-Membranreaktors hervorragend zur Kultivierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen geeignet ist. Das Prinzip der Membran-separierten Co-Kultur von HSPC mit stromalen Zelllinien erwies sich als biologisch sehr sinnvoll. Die hämatopoietischen Zellen konnten nachweislich deutlich von der Anwesenheit stromaler Zellen bzw. ihrer Produkte profitieren. Ein geeigneteres Membranmaterial könnte sogar zu einer weiteren Steigerung der entsprechenden Expansionsraten der Zellen führen, da sich dessen Einfluss bislang noch negativ auf die Expansion der Zellen auswirkt.

Es konnte gezeigt werden, dass das Konzept des MMR den anfangs genannten Anforderungen der Membran-separierten Co-Kultur entspricht:

- Die verschiedenen Zelltypen können problemlos von beiden Seiten der Membran inkuliert werden.
- Es ist möglich, HSPC ohne kontaminierende stromale Zellen zu ernten.
- Das System bedarf keiner Manipulation (Rühren, Medienwechsel) während der Kultur, die Zellen sind nicht unterversorgt. Im Gegenteil scheint sich die Akkumulation stromaler Faktoren günstig auf die Expansion früher Vorläufer auszuwirken.
- Hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen können über einen Zeitraum von mindestens 288 Stunden kultiviert werden, ohne dass der positive Effekt der Co-Kultur verringert wird.

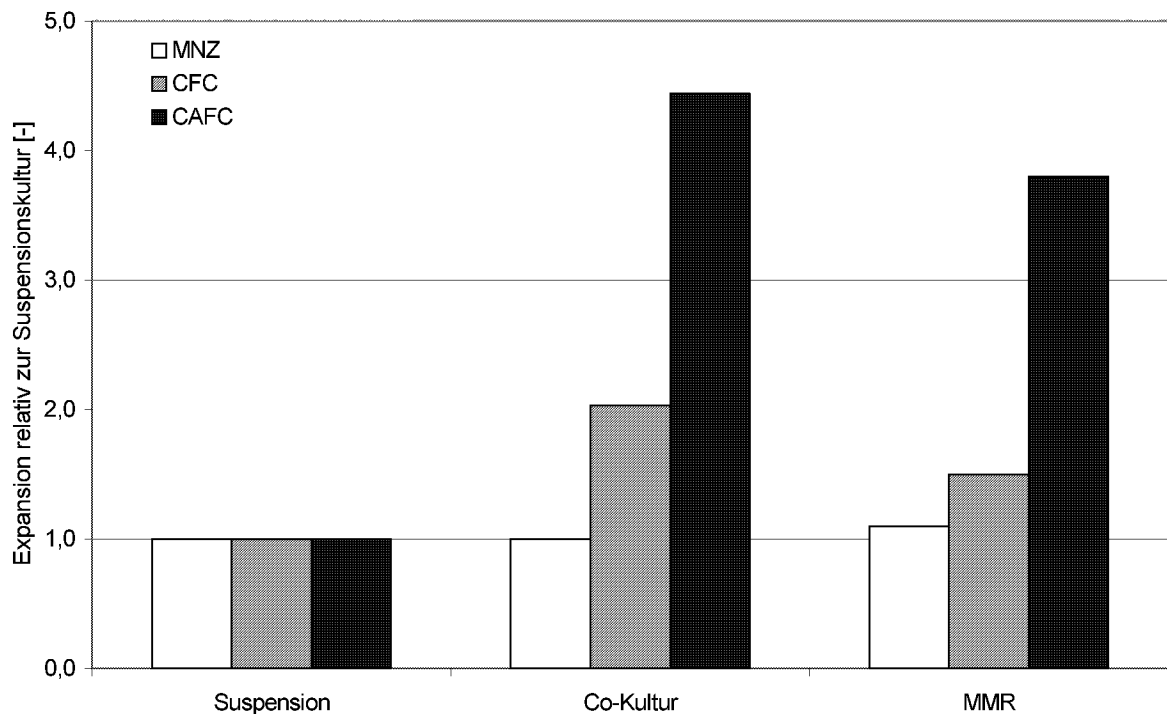


Abbildung VII–21: Vergleich der Expansionen in verschiedenen Kultursystemen

- Insbesondere die wichtigen frühen Vorläuferzellen scheinen von der Co-Kultivierung mit stromalen Zellen zu profitieren.

In Abbildung VII-21 sind drei Varianten zur Kultivierung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen in einem direkten Vergleichsexperiment einander gegenüber gestellt. Die relativen Expansionen der betrachteten Populationen beziehen sich auf die Referenz-Suspensionskultur. Die Membran-separierte Co-Kultur reiht sich hervorragend in die Gruppe der Kultursysteme mit stromaler Beteiligung ein und liefert ähnlich gute Expansionsdaten wie eine direkte Co-Kultur. Auffällig ist vor allem die Bedeutung des Stromas im Hinblick auf frühe Vorläuferzellen. Hier können beide Kulturen die Anzahl, aber auch die Qualität der Zellen gegenüber der Suspension erheblich steigern. Die Expansion der mononukleären Zellen unterscheidet sich hingegen kaum.

Diese Ergebnisse belegen, dass sämtliche relevanten Aspekte der Stroma-unterstützten Kultur im MMR aktiv sind und sich die biologische Bedeutung des MMR mit der einer direkten Co-Kultur vergleichen lassen.

Betrachtet man jetzt die Frequenzen der CFC und CAFC (vergleiche Tabelle VII-16), also den tatsächlichen Anteil der Vorläufer und führen Vorläufer innerhalb der expandierten Zellpopulation, so liefert nur die Co-Kultur bessere Werte als die MMR-Kultur. Die Frequenz dieser Zellen ist ein direktes Maß der Kulturqualität, da es, wie schon mehrfach

erwähnt, nicht um die reine Vermehrung der Zellmenge geht. Die Zellen sollen vielmehr unter Erhalt ihrer Qualität expandiert werden, da sie nur in diesem Fall für eine eventuelle Transplantation von Bedeutung sind.

Tabelle VII-16: Frequenzen der CFC und CAFC in verschiedenen Kultursystemen (in %)

Population	Suspension	Co-Kultur	MMR
CFC	7,1	14	9,4
CAFC	2,9	13	10

Auch in der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf die förderliche Wirkung des direkten Kontaktes hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen zu stromalen Zellen. Wird der direkte Kontakt unterbrochen, z. B. durch Kultivierung im Transwell-System oder durch Verwendung von SCM, geht ein Teil der unterstützenden Wirkung verloren [190-192].

Im Folgenden werden kurz die Ergebnisse des Miniatur-Schlaufenreaktors mit denen des Mini-Membranreaktors [129] (technische Daten der Systeme siehe Anhang B) verglichen. Dabei soll nicht detailliert auf die jeweiligen Unterschiede der beiden Systeme eingegangen werden. Es sei lediglich bemerkt, dass zur Kultivierung im Miniatur-Schlaufenreaktor ein stark serumhaltiges Medium eingesetzt wurde (IMDM + 12,5% FCS und 12,5% HS). Die Cytokin-Kombination ist identisch, wobei das serumhaltige Medium zusätzlich 100ng/mL des Antikörpers α -TGF β enthielt. Da die Probenahmen aus dem MMR nach 288h, ansonsten jedoch nach 240h und 336h erfolgte, werden die Daten des Miniatur-Schlaufenreaktors entsprechend gemittelt. Die tatsächlichen Expansionsfaktoren nach 240h und 336h sind in Klammern dargestellt.

Tabelle VII-17: Vergleich zweier Kultursysteme, Expansion nach 288h

Population	Mini-Membranreaktor	Miniatur-Schlaufenreaktor
MNZ	242	296 (Faktor 137 und 454)
CFC	29	18 (Faktor 26 und 10)
CAFC	39	4,4 (Faktor 4,4 und 4,5)

Der Mini-Membranreaktor ist dem Miniatur-Schlaufenreaktor im Hinblick auf die Vermehrung der Vorläuferzellen und CAFC deutlich überlegen, nämlich um 160% im Fall der CFC, und sogar um 870% bezogen auf die frühen Vorläuferzellen (vergleiche Abbildung VII-22). Der Unterschied der MNZ-Expansionen fällt nicht so stark ins Gewicht. Hier liefert

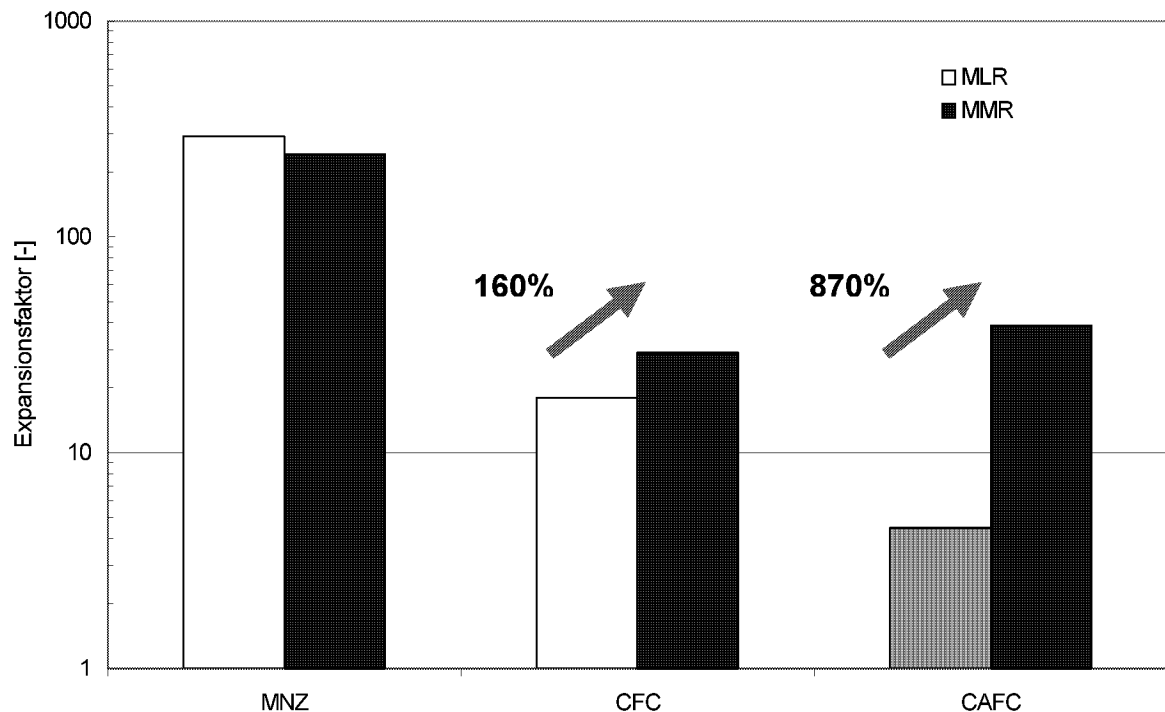


Abbildung VII-22: Vergleich der Expansionen im Mini-Membranreaktor (MMR) und Miniatur-Schlaufenreaktor (MLR, *miniaturized loop bioreactor*)

der MMR ca. 80% der Werte des Miniatur-Schlaufenreaktors. Dies bedeutet, dass die Frequenz der CFC und CAFC im Mini-Membranreaktor sehr viel höher sein muss als im Miniatur-Schlaufenreaktor.

Betrachtet man zusätzlich Expansionsdaten im Festbettreaktor [129] (siehe Anhang B), der in einem Versuch mit dem serumfreien Medium X-Vivo 10 anstelle des serumhaltigen Mediums betrieben wurde (das Inokulieren der Zellen erfolgte noch in serumhaltigem Medium, welches mit zunehmender Prozesszeit von insgesamt 336h ausgetauscht wurde) [129], so wird der enorme Einfluss der Serumkomponenten auf die Qualität der Kultur deutlich. Wie im Miniatur-Schlaufenreaktor, wurde auch hier die stromale Zelllinie SI/SI zur Co-Kultur verwendet. Die maximale MNZ-Expansionsrate lag lediglich bei Faktor 11 (nach 336h), die max. CFC-Expansion bei Faktor 4 (nach 240h), nahm dann aber wieder ab. Die max. Expansion der CAFC lag bei Faktor 8,7 nach 168h und konnte nicht weiter gesteigert werden. Diese Werte unterscheiden sich deutlich von den oben gezeigten des Miniatur-Schlaufenreaktors. Für stark serumhaltige Kulturen konnte hingegen die Parallelität der beiden Systeme, Miniatur-Schlaufenreaktor und Festbettreaktor, nachgewiesen werden.

Wie oben bereits kurz angedeutet, hat sich ebenfalls eine japanische Arbeitsgruppe mit

der Membran-separierten Co-Kultur befasst [189]. Zu diesem Zweck wurde das kommerziell erhältliche Transwell-System so umfunktioniert, dass es möglich war, Zellen von beiden Seiten der Membran zu kultivieren. Da jedoch Membranen mit einem Porendurchmesser von lediglich 0,45µm zum Einsatz kamen, ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass die stromalen Zellen einen direkten Kontakt zu HSPC hatten. Unter Verwendung der murinen Zelllinie HESS-5 in einer fünftägigen, serumfreien „quasi Membran-separierten Co-Kultur“ wurde ein Expansionsfaktor der mononukleären Zellen von 17 erzielt. CFC expandierten um Faktor 33, den CAFC vergleichbare Zellen expandierten um Faktor 25 (Ausgangspopulation für diesen Assay waren allerdings CD34⁺-Zellen, nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, die gesamte Bandbreite der expandierten Zellen). Es liegt nahe, zu vermuten, dass der positive biologische Effekt dieses Kultursystems eher in der guten Qualität der verwendeten stromalen Zelllinie begründet ist, und dass dieser Effekt allein auf lösliche Faktoren und nicht auf Zell-Zell Kontakte zurückzuführen ist. Leider ist die Zelllinie HESS-5 nicht für andere Gruppen verfügbar.

An dieser Stelle soll nun der NOD/SCID Versuch kritisch diskutiert werden. Bei der Betrachtung der gezeigten Ergebnisse muss bedacht werden, dass es sich um ein Modellsystem handelt, mit allen damit verbundenen Unzulänglichkeiten. Die Idee, die hinter diesem Mausmodell steckt, ist, dass man einem komplexen Gesamtorganismus hämatopoietische Zellen verabreicht, deren Ansiedlungseffizienz im Knochenmark und schließlich die resultierende Produktion funktionaler, reifer Blutzellen analysiert. Um die Abstoßung allogener Zellen zu verhindern, ist das Immunsystem der Mäuse schwer geschädigt.

Dass die Ergebnisse eines solchen Tiermodells nicht 1 zu 1 übertragbar sind auf humane Patienten zeigt sich schon an der Tatsache, dass humane T-Zellen in diesen Mäusen nicht ausreifen. Mittlerweile existiert ein verändertes Maussystem, dessen NK-Aktivität durch einen Antikörper gegen die IL-2Rβ Kette unterdrückt werden konnte [193].

Besonderes kritisch haben sich Ballen *et al.* mit Variablen beschäftigt, die die Ansiedlung humaner HSPC aus Nabelschnurblut in NOD/SCID Mäusen beeinflussen, und sie stellen die Frage nach der grundsätzlichen Eignung des Modells [25]. Neben der Bestrahlungsdosis, der Zelldosis, dem Alter und Geschlecht der Mäuse hatte auch die Qualität der Nabelschnurblutprobe selbst einen großen Einfluss auf den Ausgang des Experimentes. So lieferten verschiedene Proben unterschiedliche Ergebnisse, aber auch schon eine Probe, verteilt auf unterschiedliche Mäuse, ergab sehr variable Ergebnisse.

Neben diesen existieren noch weitere Parameter, diesmal auf zellulärer Ebene, die die Resultate des Tierexperimentes beeinflussen. Dazu gehören der Zellzyklusstatus der Zellen, die Expression von Adhäsionsmolekülen wie z. B. Integrinen [93, 194], und die Stärke der Expression des Oberflächenrezeptors CXCR4 [93, 98, 99, 195-200]. Allerdings wider-

sprechen sich die Aussagen der verschiedenen Gruppen, und eine endgültige Feststellung der Bedeutung der analysierten Parameter steht aus. Insbesondere die Beobachtung, dass humane $CD34^+/CXCR4^-$ -Zellen intrazelluläre CXCR4-Speicher besitzen, hat dazu geführt, dass bisherige Untersuchungen in einem neuen Licht betrachtet werden müssen [201]. Auch die Quelle der Zellen, Knochenmark, peripheres Blut und Nabelschnurblut, beeinflusst die Effizienz des *homing*.

Ein Vergleich mit anderen Experimenten ist aus den oben genannten Gründen schwierig. Daher sollen nur die Ergebnisse dieser Arbeit betrachtet werden. Insgesamt ist die Ansiedlung der humanen Zellen, kultiviert im MMR, mit 60-70% sehr effektiv. Die MS-5 scheint die Qualität der Zellen besser zu unterstützen als die M2-10B4 mod. Die im Bereich der Lymphozyten detektierten humanen Zellen sind quasi fast ausschließlich B-Zellen, entsprechend der Expression des CD19 Oberflächenantigens. Erfreulich ist der relativ hohe Anteil an $CD34^+/CD38^-$ -Zellen von über 10% der Zellen, die im MMR mit MS-5 kultiviert wurden. Diese Zellen sind nach der Kultivierung mit M2-10B4 mod. deutlich reduziert.

Besonders sollte hervorgehoben werden, dass die Ansiedlungseffizienz im Knochenmark der Maus pro $1,0E+05$ humaner expandierte Zellen besonders hoch ist, wenn die Zellen zuvor im Mini-Membranreaktor mit MS-5 kultiviert wurden. Sowohl der Anteil humaner Zellen insgesamt als auch der der Lymphozyten liegt hier bei über 4%. Im Gegensatz dazu sind nicht einmal 2% der Zellen humanen Ursprungs, wenn sie zuvor in Suspension ohne stromale Unterstützung kultiviert wurden.

Da die Expansion der Zellen im Ansatz mit MS-5 leider unerwartet gering ausgefallen ist, wäre es wünschenswert, weitere Tierversuche durchzuführen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Systeme zu erreichen. Denkbar sind auch Untersuchungen mittels limitierender Verdünnung der HSPC, oder sekundäre Transplantationen der humanen Zellen. Die oben vorgestellten Ergebnisse lassen es lohnend erscheinen, das miniaturisierte System des Membranreaktors auf einen größeren Maßstab zu übertragen. Bei der Prozessentwicklung sollte darauf geachtet werden, dass nicht nur eine optimale Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff von Bedeutung ist. Auch die Anreicherung stromaler Faktoren muss gewährleistet sein, um ideale Bedingungen zur Vermehrung früher Vorläuferzellen zu etablieren. Die Arbeiten zu diesem Thema sind im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

VII.2. MEMBRANREAKTOR

VII.2.1. Technische Aspekte

Geht man von einer mittleren Menge von $5,0E+06$ CD34⁺ Zellen pro Nabelschnurblutprobe aus, so müssen diese Zellen mindestens um Faktor 28 vermehrt werden, um einem 70kg Patienten ca. $2,0E+06$ CD34⁺ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht verabreichen zu können. Die Zellen sollten zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nicht gepoolt werden, sodass die Expansion einer einzigen Nabelschnurblutprobe theoretisch ausreichen muss, um einen Patienten erfolgreich zu transplantieren. Um die Zellen einer einzigen zur Verfügung stehende Nabelschnurblutprobe insgesamt kultivieren zu können, muss das bisherige Testsystem des Membranreaktor in seinen Abmessungen angepasst werden.

Die Maßstabsvergrößerung des erfolgreichen Mini-Membranreaktors zieht eine ganze Reihe wichtiger Veränderungen mit sich, die auf die Bedürfnisse und Anforderungen der HSPC abgestimmt werden müssen. Grundsätzlich bleibt das Schema der Membrantrennung erhalten.

Einleitend vorangestellt werden hier einige Aspekte der Kultivierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen und die Grundvoraussetzungen und technischen Bedingungen zur Nachahmung der natürlichen Umgebung dieser Zellen *in vitro*.

Als Ursprungsmodell des vergrößerten Membranreaktors diente der Optisep™ Filterhalter (Fa. membraPure, Bodenheim). Dieses System wurde so umkonstruiert, dass es den Anforderungen eines Bioreaktors zur Kultivierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen entsprach (technische Zeichnung siehe Anhang B).

Zunächst bedeutet die Verwendung des neuen Membranreaktors eine Vergrößerung der Membranfläche von $2,5\text{cm}^2$ auf 215cm^2 . Daraus resultiert, dass nunmehr nicht $2,0E+03$ gepoolte CD34⁺-Zellen pro cm^2 Membranfläche eingesetzt werden, sondern die Gesamtheit einer einzigen Nabelschnurblutprobe, also im Mittel ca. $2,3E+04$ Zellen/ cm^2 . Entscheidend ist, dass das Medienvolumen lediglich von $3,6\text{mL}$ auf ca. 50mL erhöht wurde, entsprechend einer mittleren Inokulumsdichte von $1,0E+05\text{c/mL}$ vs. ca. $1,4E+03\text{c/mL}$ im MMR. Dadurch konnte das Verhältnis von Volumen zu Membranfläche erheblich verbessert werden. Dieses sollte möglichst gering sein. Zum einen werden so Medienkosten reduziert, zum anderen können akkumulierte stromale Faktoren schneller wirksame Konzentrationen erreichen.

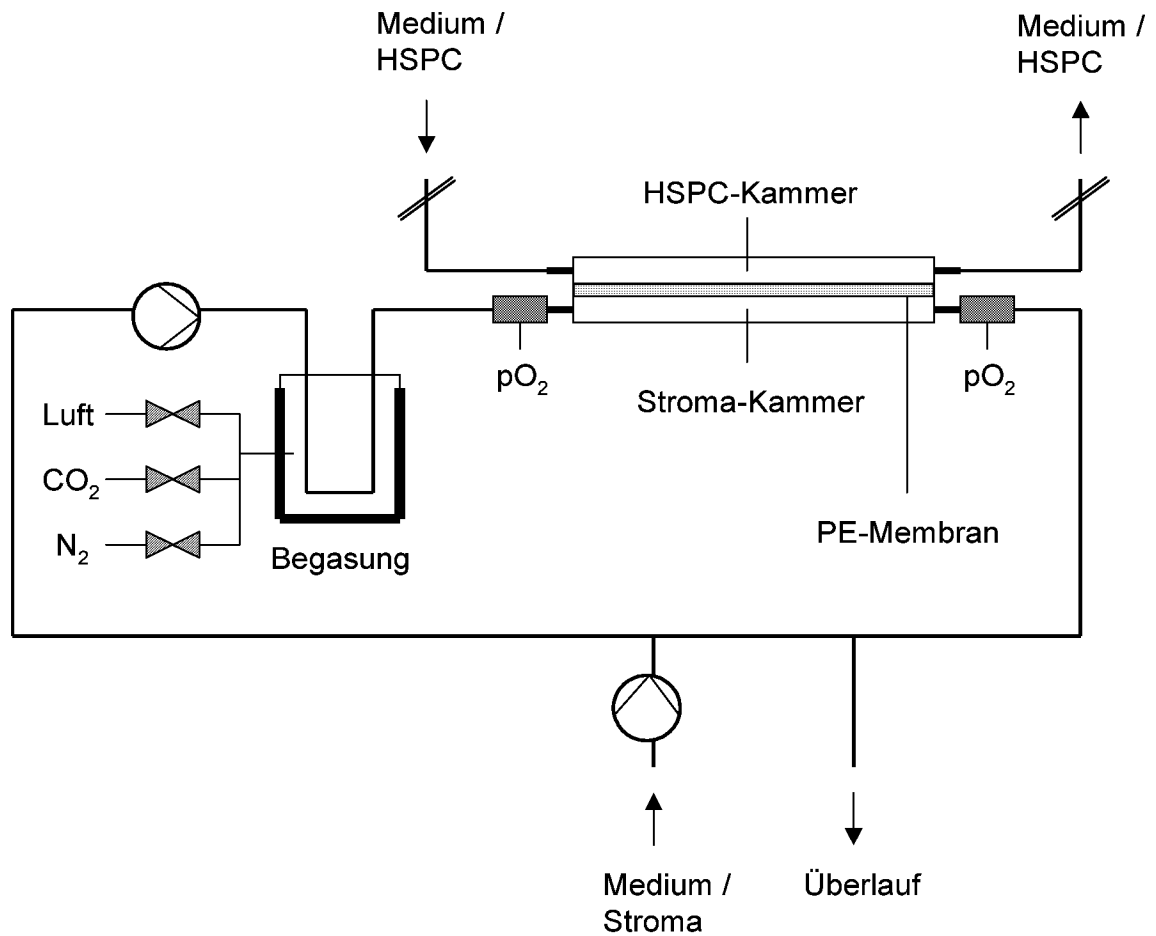


Abbildung VII–23: Fließschema des Membran-Bioreaktors

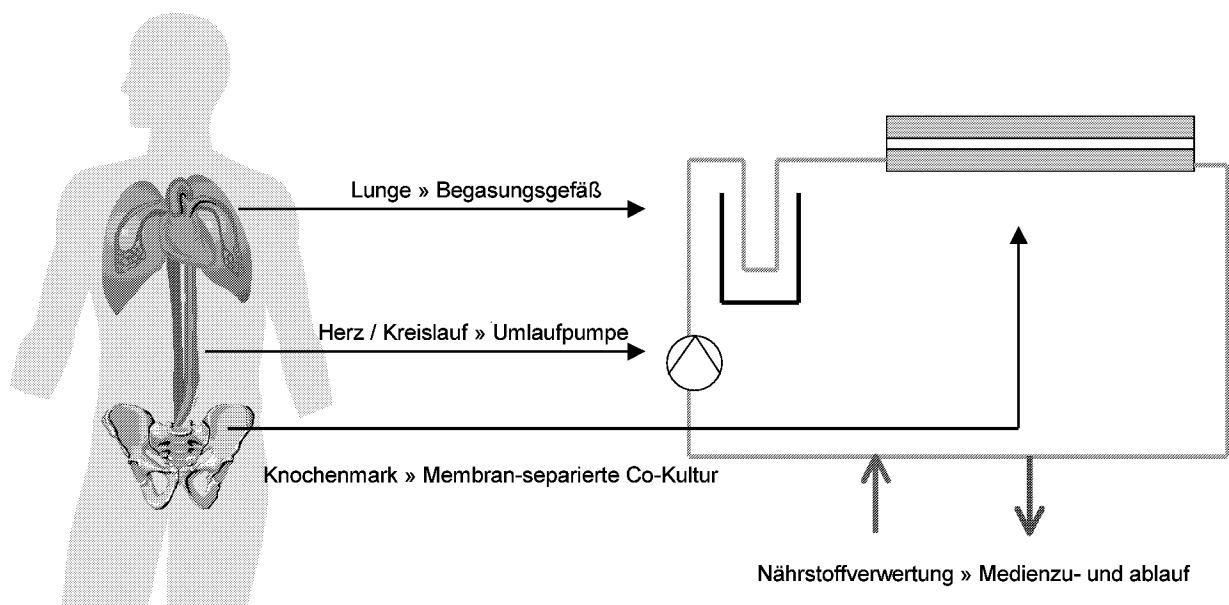


Abbildung VII–24: Analogie Mensch – Bioreaktor

Abbildung VII-23 zeigt ein Fließschema des Membranreaktors mit dem Kammersystem, der externen Begasungseinheit, den Sauerstoffsonden und den entsprechenden Medienzu- bzw. abläufen. In Abbildung VII-24 ist eine Analogie des entwickelten Reaktorsystems zur Physiologie des menschlichen Körpers dargestellt. Die Lunge entspricht dem Begasungsgefäß, die Aufgaben des Herz/Kreislaufsystems übernimmt eine peristaltische Pumpe bzw. das Medienschlauchsystem, das Knochenmark wird durch die Membran-separierte Co-Kultur imitiert, und die Nährstoffzufuhr und Ausscheidung der Metabolite geschieht durch den Medienzu- und ablauf.

Eine Besonderheit der Kultur von primären HSPC aus der Nabelschnur ist deren geringe Anzahl. Daraus resultiert, dass die Reaktorgröße entsprechend klein gewählt sein muss, um eine zu starke Vereinzelung der Zellen zu verhindern. Daher bietet sich eine flache Geometrie des Reaktors an. Die Membran wird, aufliegend auf einem Dichtring, zwischen zwei Kunststoffplatten fixiert. Durch die Nuten an den Innenwandungen der Platten und der relativen Dicke des Dichtringes entsteht jeweils eine schmale Kammer auf beiden Seiten der Membran. So kann das Volumen innerhalb des Reaktors gering gehalten werden.

Allerdings ergibt sich die Notwendigkeit, die Begasung des Mediums in den externen Umlauf zu verlagern und damit das Volumen zu erhöhen. Kleine Schlauchdurchmesser halten diesen Negativeffekt in einem erträglichen Rahmen.

Eine peristaltische Pumpe sorgt für einen konstanten Medienumlauf, und auch die Medienversorgung durch einen kontinuierlichen Zustrom an frischem Medium wird durch eine Pumpe reguliert. Verbrauchtes Medium wird aus dem System verdrängt.

Da die stromalen Zellen auf natürliche Art und Weise an der Membran haften und die suspendierten hämatopoietischen Zellen durch die poröse Membran zurückgehalten werden, erreicht man relativ unkompliziert eine Verweilzeit-Entkopplung von Biomasse und Medium.

Untersuchungen im MMR System haben gezeigt, dass hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen, insbesondere die frühen Vorläuferzellen CAFC, eine statische und ungefütterte Kultur bevorzugen. Um diesen Aspekt zu berücksichtigen, erfolgt die Perfusion des Reaktors ausschließlich in der Stroma-Kammer. Die HSPC werden rein diffusiv versorgt. Dadurch soll erreicht werden, dass zum einen die empfindlichen hämatopoietischen Zellen keiner Scherbelastung ausgesetzt werden. Zu anderen gelangt frisches Medium zunächst an den Hauptverbraucher des Systems, die stromalen Zellen. Stromale lösliche Faktoren können an der Membran akkumulieren bzw. in die Kammer der HSPC diffundieren.

Ursprungsmodell und Veränderungen

Das Ursprungsmodell des Membranreaktors wurde vielfältig verändert und optimiert:

- Zunächst wurde aus einem Vierkammersystem eine Zweikammersystem, bestehend aus zwei Kunststoffplatten und einem Dichtring.
- Das verwendete Material der Reaktorplatten wurde entsprechend den gegebenen Anforderungen und Materialeigenschaften ausgewählt (siehe unten).
- Um den Anpressdruck der Platten zu erhöhen und damit die Dichtigkeit des Systems zu optimieren, wurden zusätzliche Durchgangsbohrungen zur Verschraubung der Platten angebracht.
- Die Medienzu- und Ablaufrinnen wurden verbreitert, um den Medienstrom über die Membran zu optimieren und die Bildung von Todzonen zu vermeiden (siehe Anhang).

Materialauswahl

Ein wesentlicher und besonders kritischer Aspekt der Bioreaktor-Konzipierung ist die Auswahl des verwendeten Materials, da dieses verschiedene Bedingungen erfüllen muss. Die für die Materialauswahl zugrunde gelegten technischen und biologischen Anforderungen sind in Tabelle VII-18 zusammengefasst.

Die in Frage kommenden Halbzeuge sollten sich unter Berücksichtigung der oben angegebenen Anforderungen bearbeiten und verformen lassen. Die Kunststoffe sollten in Form von gegossenem oder extrudiertem Plattenmaterial lieferbar sein, wobei die Abmessung des Halbzeuges ca. 200x200mm mit einer Mindestplattendicke von 15mm betragen sollte. Dünnere Platten würden durch die seitliche Anbringung der Medienzuläufe instabil und bruchempfindlich werden. Das Material sollte zudem thermisch beständig, chemisch und biologisch inert sein, sodass es dampfsterilisierbar ist, vom umgebenden Nährmedium nicht angegriffen wird und keine toxischen Substanzen an die kultivierten Zellen abgibt. Hilfs- und Zusatzstoffe zur Bearbeitung und Veredelung der Materialien (z. B. Weichmacher, Stabilisatoren, Gleit- und Flammschutzmittel) sollten nicht migrieren. Bei den Kunststoffen sollte der verbleibende Monomeranteil extrem gering sein, da dieser für die Toxizität von Kunststoffen von entscheidender Bedeutung ist. Zudem wäre es von Vorteil, wenn es sich um ein transparentes Material handelte, um eine optische Kontrolle der Kultur zu

ermöglichen.

Tabelle VII-18: Anforderungen an Werkstoffe zur Konstruktion eines Bioreaktors

Anforderung	Begründung
Langzeitige Erhitzung auf 121°C	Dampfsterilisation
Biologisch unbedenklich	direkter Oberflächenkontakt mit Zellmaterial und Kulturmedien
Transparenz	Sichtkontrolle der Kultur (Medienfarbe und -trübung, Luftblasen)
Spanabhebende Bearbeitung	dünnlumige Strömungsrillen
Plattenhalbzeug (ca. 200x200mm)	Reaktorgeometrie
Plattendicke mind. 15mm	Seitlich angebrachte Bohrung für Medienzu- und ablauf
geringes spezifisches Gewicht	Handhabbarkeit
geeigneter Wärmeausdehnungskoeffizient	Stabilität während der Dampfsterilisation
Bruch-unempfindlich	Belastbarkeit, Bearbeitung
Spannungsriß-unempfindlich	Belastbarkeit, Bearbeitung

Die Kunststoffe Teflon™ (PTFE), Plexiglas® (PMMA) und Tekapeek (PEEK) kommen aus unterschiedlichen Gründen für die Konstruktion eines Bioreaktors nicht infrage. So ist PTFE bei Erwärmung nicht formstabil, es ist nicht transparent und weist eine hohe Schmelzviskosität auf. PMMA ist glasklar, allerdings dabei sehr spröde und mit einer Formbeständigkeitstemperatur von 90-105°C nicht autoklavierbar. PEEK ist zwar formbeständig bis 155°C, jedoch wenig UV-beständig und nicht transparent.

Rührkessel und Spinner werden im Allgemeinen aus Glas gefertigt. Es ist autoklavierbar, chemisch beständig, transparent und in der Formgebung relativ flexibel. Glas ist jedoch für die oben beschriebene Reaktorgeometrie ungeeignet. Es ist zu Bruchempfindlich und würde die angelegte Pressspannung nicht tolerieren. Zudem ließen sich die Strömungsrillen nur mit großem Aufwand fertigen.

Edelstahl ist ein besonders belastbarer und flexibel umformbarer Werkstoff. Wäre er transparent und weniger kostspielig in der Anschaffung und Bearbeitung, wäre dieser Werkstoff die beste Wahl zur Konstruktion des Membran-Bioreaktors.

Die Auswahl an geeigneten Materialien zur Herstellung des Bioreaktors beschränkt sich aufgrund der unten angegebenen Kriterien auf Polycarbonat (PC) und Polysulfon (PSU). Die für ihre Verarbeitung zum Bioreaktor wesentlichen Eigenschaften sind in Tabelle VII-20 zusammengefasst.

Tabelle VII-19: Materialanforderungen zur Konstruktion eines Bioreaktors und deren Erfüllung durch verschiedene Werkstoffe (+ = gut; o =neutral; - = schlecht; ? = nicht bekannt)

Anforderung	PTFE	PMMA	PEEK	PC	PSU	Glas	Edelstahl
Erhitzung auf 121°C (langzeitig)	+	-	+	+	+	+	+
Biologisch unbedenklich	o	o	o	o/-	o/-	o	o
Transparenz	-	+	-	+	o	+	-
Spanabhebende Bearbeitung	-	o	+	+	+	-	+
Plattenhalbzeug (ca. 200x200mm)	+	+	+	+	+	+	+
Plattendicke (mind. 15mm)	+	+	+	o	+	+	+
geringe Dichte (g/cm ³)	+ (2,2)	+ (1,2)	+ (1,3)	+ (1,2)	+	?	- (7,85)
					(1,3)		
Bruchempfindlichkeit	+	+	+	+	+	-	+
Spannungsrissempfindlichkeit	+	-	+	-	+	o	+
Kosten (Material und Bearbeitung)	?	?	?	o	o	-	-

Beide Materialien werden zu Produkten verarbeitet, deren Einsatzgebiete im Bereich der Lebensmittelindustrie und Medizintechnik liegen. Die Verwendbarkeit von PC in der Zellkultur in Form von Membranfiltern wurde bereits in einem vorhergehenden Kapitel beschrieben. Grundsätzlich sind demnach beide Kunststoffe zur Verarbeitung zum Bioreaktor geeignet. Miller *et al.* haben bereits 1996 den Einfluss der beiden Werkstoffe auf die Expansion von PB CD34⁺ Zellen untersucht und festgestellt, dass sowohl der direkte Kontakt als auch die Konditionierung des Mediums mit diesen Substanzen einen deutlich negativen Einfluss auf die Zellen ausübt. Sie expandierten weniger als halb so gut im Vergleich zur Kontrolle mit Polystyrol, wobei PC schlechter abschnitt als PSU [202]. Allerdings lagen die Gesamtexpansionen der Kontrolle so niedrig, dass die Ergebnisse nicht zwangsläufig übertragbar sein müssen. Zudem lagen die Expansionen noch eindeutig

oberhalb des Ansatzes mit Glas, PTFE oder Edelstahl. Lediglich Perfluor-Alkoxyalkan (PFA) lieferte vergleichbare Expansionen wie die Kontrolle mit Polystyrol (PS).

Tabelle VII-20: Spezifikation der verwendeten Kunststoffe

	PC	PSU
Handelsname	Macrolon	Tecason S
Hersteller	Bayer AG	Ensinger GmbH
Halbzeug	12mm und 15mm Platten	20mm Platten
Kunststofftyp	amorpher Thermoplast	amorpher Thermoplast
optische Eigenschaft	transparent, glasklar	transluzent, bernsteinfarben
Spannungsrissempfindlichkeit	groß	gering
Gebrauchstemperatur (°C)		
- kurzzeitig	150	180
- langfristig	130	160
Steifigkeit	hoch	hoch
Festigkeit	hoch	hoch
Kerbempfindlichkeit	groß	groß
chemische Beständigkeit	begrenzt	gut
Einsatzgebiete (Auswahl)	Sicherheitsverbundglas, Trinkwasserbehälter, Milch- flaschen	medizinische Geräte, Mol- kereinlagen, Filtrations- membrane

Obwohl die spanlose Formgebung, wie z. B. Schweißen, Kleben oder Bohren für Kunststoffe das werkstoffgerechte Verfahren ist, ist eine spanabhebende Bearbeitung erforderlich, wenn hohe Anforderungen an die Maßgenauigkeit gestellt werden. Dies ist der Fall für die Strömungsrillenbreite und -tiefe der inneren Plattenwandung, da eine optimale Überströmung der Membran gewährleistet werden soll. Es sind jedoch bei der spanenden Bearbeitung Besonderheiten der Kunststoffe zu berücksichtigen, die andere Materialien wie z. B. Holz oder Metall nicht aufweisen:

- Die niedrige Wärmeleitfähigkeit des Materials (ca. 0,1 – 0,4 W/m*K) fördert die Erwärmung bei der Bearbeitung.
- Bei Erwärmung erweichen Thermoplaste und neigen dann zum Schmieren. Deshalb sollten kleine Spanquerschnitte, kleine Spanwinkel (1-5°) und hohe Schnittgeschwindigkeiten (bis zu 250-300m/min) bei guter Kühlung verwendet werden.

- Schmier- und Flüssigkühlmittel können zur Spannungsrissbildung führen, daher sollte mit Pressluft oder reinem Wasser gekühlt werden.
- Halbzeuge können Eigenspannungen aufweisen, deren inneres Gleichgewicht durch die Bearbeitung gestört werden kann. Verzug und Rissbildung kann durch Tempern vor und während der Verarbeitung vermieden werden.

Medienanschlüsse

Es stellte sich heraus, dass der Anschluss des Medienumlaufs an den Reaktor kein triviales Problem ist.

Das Anbringen der Edelstahl-Medienzu- und Ablaufstutzen könnte theoretisch auf verschiedene Weise gestaltet werden:

Eine elegante Lösung wäre das Angießen entsprechender Kunststoff- oder Edelstahlrohre an eine Durchgangsbohrung, sodass die Medienschläuche einfach aufgeschoben werden könnten. Diese Bearbeitungstechnik stand jedoch nicht zur Verfügung.

Alternativ könnte ein thermisch belastbarer Industrieklebstoff zur Befestigung der Medienstutzen verwendet werden. Da kein biologisch unbedenkliches Produkt ausfindig gemacht werden konnte, schied diese Variante ebenfalls aus.

Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Verschraubung eines Metallrohres mit Außengewinde unter Verwendung eines Dichtringes. Dabei wäre zu beachten:

- Für die Verschraubung thermoplastischer Kunststoffe eignen sich besonders spezielle selbstformende Schrauben, die in gewindelose Bohrungen eingebracht werden. Die Einschraubtiefe sollte das 1,7 bis 2,2-fache des Schraubendurchmessers nicht überschreiten. Der Flankenwinkel sollte sehr spitz sein (ca. 30°).

Das in der Werkstatt des Forschungszentrums Jülich angebrachte Außengewinde des Rohrstücks konnte diese Spezialanforderungen nicht erfüllen, sodass eine Gewindebohrung in die Platte eingebracht werden musste, um eine Verschraubung zu ermöglichen. Grundsätzlich sind Gewindebohrungen in Kunststoffplatten nicht zu empfehlen, da die spitzen Einkerbungen die Polymerstruktur schädigen können und schließlich zu Spannungsrissen führen. Bezogen auf ein M6 Gewinde betrüge die empfohlene max. Einschraub- bzw. Gewindetiefe 13,2 mm. Die Tiefe der Bohrung beträgt insgesamt mind. 30mm.

- Der im Vergleich zu metallischen Konstruktionswerkstoffen hohe lineare Wärme-

ausdehnungskoeffizient der Kunststoffe kann zu Schwierigkeiten bei der Verbindung der beiden unterschiedlichen Werkstoffe führen (Bimetalleffekt).

Diese Problematik muss insbesondere bei Verschraubungen berücksichtigt werden, da es ansonsten zu Rissbildung kommen kann. Da die Materialdicke um die seitlich angebrachte Medienzu- und Ablaufbohrung nur 4,5 bis 5,0mm beträgt, können kleine Haarrisse schnell zur Undichtigkeit des Systems führen.

Gelöst wurde die Anbringung der Medienversorgung durch das Einführen einer Metallhülse in eine gewindelose Lochbohrung. Die Metallhülse wird nach außen durch zwei O-Ringe abgedichtet. Eine innen liegende Gewindebohrung ermöglicht es, ein Metallrohr einzuschrauben. Dieses wird mit Hilfe eines Dichtringes gegen die Hülse abgedichtet, und Schläuche zur Medienversorgung können auf das Metallrohr geschoben werden. Zur Entfernung der Versorgungsleitung wird das Rohrstück aus dem Gewinde der Metallhülse gedreht, ohne dass dabei der umgebende Kunststoff mechanisch belastet wird. Der Kontakt zwischen Metallhülse und Kunststoffplatte ist plan, sodass keine Drehspannung auftritt. Dies vermindert die Gefahr von Spannungsrissen.

Die Begasung des Membranreaktors

Aufgrund der Geometrie des Reaktors mussten nicht nur die Begasung selbst, sondern auch die Sonden zur Messung der Gaszusammensetzung des Mediums in die Peripherie verlagert werden. An das entsprechende O₂-Meßsystem wurden folgende Anforderungen gestellt:

- Durchflusszelle, die in den Medienumlauf eingebaut werden kann
- geringes Probevolumen
- möglichst nicht-verbrauchende Messung
- mindestens zwei Messpunkte (vor und hinter dem Reaktor)
- Luer-Lock Anschlüsse zum Anbringen der Medienschläuche
- autoklavierbar
- wenig Drift
- einfache Handhabung
- verwertbares Messsignal (Software), übersichtliche Darstellung
- genaue Messung in relevanten Bereichen (0-100% Luftsättigung)
- flexible Messintervalle

Diese Anforderungen wurden von der Durchflusszelle der Fa. PreSens, Regensburg, erfüllt.

Die Messung der Sauerstoffkonzentration erfolgt in diesem System nach dem Prinzip des *dynamic quenching*. Ein Lumineszenz Indikatormolekül absorbiert Licht, wird angeregt und emittiert selbst Licht, dessen Strahlungsintensität gemessen wird. Kommt es zu einer Kollision mit einem Sauerstoffmolekül, so wird der Anregungszustand auf dieses Molekül übertragen, und die Strahlungsemission nimmt entsprechend der Sauerstoffkonzentration ab. Die Sonden können einfach mithilfe von Luft-gesättigtem Wasser bzw. einer Na₂SO₃-gesättigten Lösung kalibriert werden.

In einem ersten Versuch wurde ermittelt, inwieweit die verwendeten Marprene™-Schläuche tatsächlich gasdicht sind. Dazu wurde Wasser diffusiv über einen dünnwandigen Silikonschlauch im Begasungsgefäß des Festbettreaktors (Länge des Begasungsschlauches: 20cm) Luft begast. Unmittelbar hinter dem Begasungsgefäß, und in variablem Abstand dazu, wurde jeweils eine Sonde platziert. Es stellte sich heraus, dass die Marprene™-Schläuche selbst bei einer Wanddicke von 2,4mm nicht gasdicht sind und ein Schlauch von 30cm Länge trotz konstanter Begasung einen messbaren Gasaustausch mit der Umgebung erlaubt. Die Messwerte weichen um bis zu 4% von der Vorgabe ab.

Da die Eichung der Durchflusszellen sehr genau und schnell erfolgen kann, konnte festgestellt werden, dass das Begasungsgefäß des Festbettreaktors für eine Anwendung mit dem Membranreaktor nicht optimal konzipiert ist. Bei einer konstanten Umpumprate von 1mL/min war es nicht möglich, die gewünschten Luftsättigungswerte innerhalb tolerabler Zeitgrenzen einzustellen. Die Luftsättigung konnte insgesamt nicht unter 20% gedrosselt werden, und das System erwies sich als sehr träge. Wurde hingegen der Schlauch um das 5-fache verlängert und damit die Austauschfläche entsprechend vergrößert, so konnten schnell die gewünschten Werte eingestellt werden, das Begasungssystem reagierte bei gleicher Pumprate dynamisch und flexibel.

Nach Erreichen des Gleichgewichtswertes wurde von Luft- auf Stickstoffbegasung umgestellt, und umgekehrt (Zeitpunkt gekennzeichnet durch einen Stern).

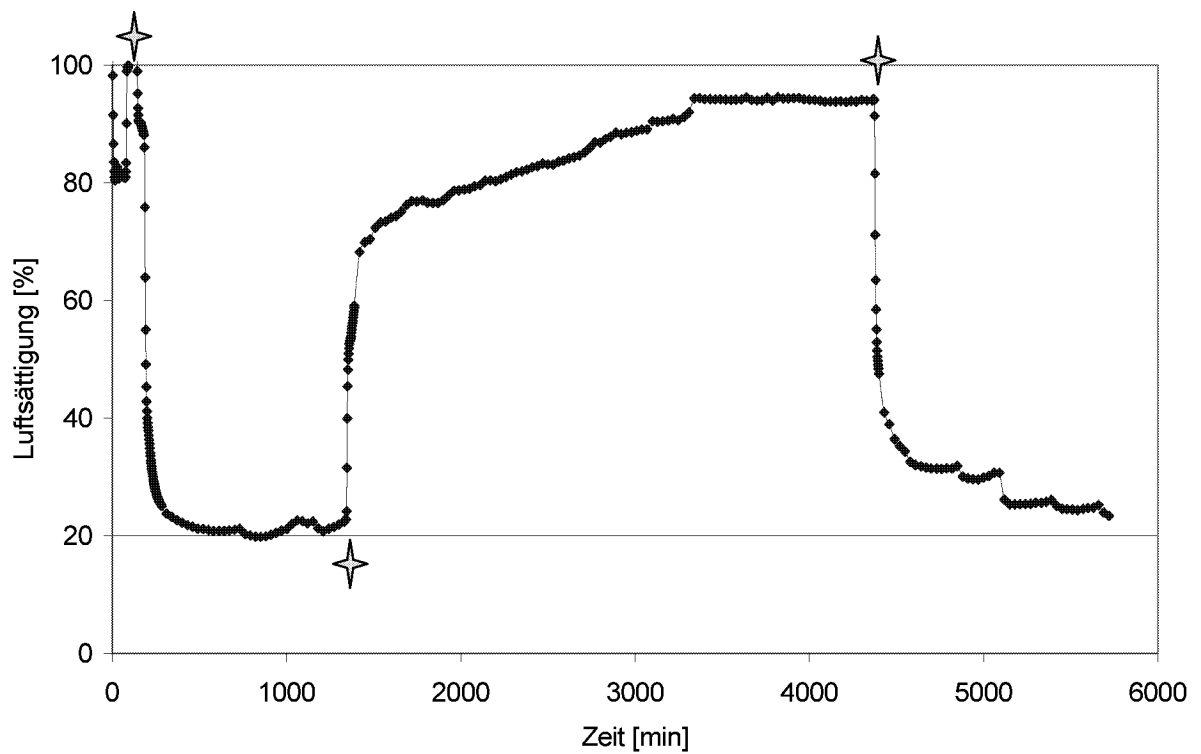


Abbildung VII-25: Luftsättigungskurve bei Begasung mit einem Begasungsschlauch der Länge 20 cm

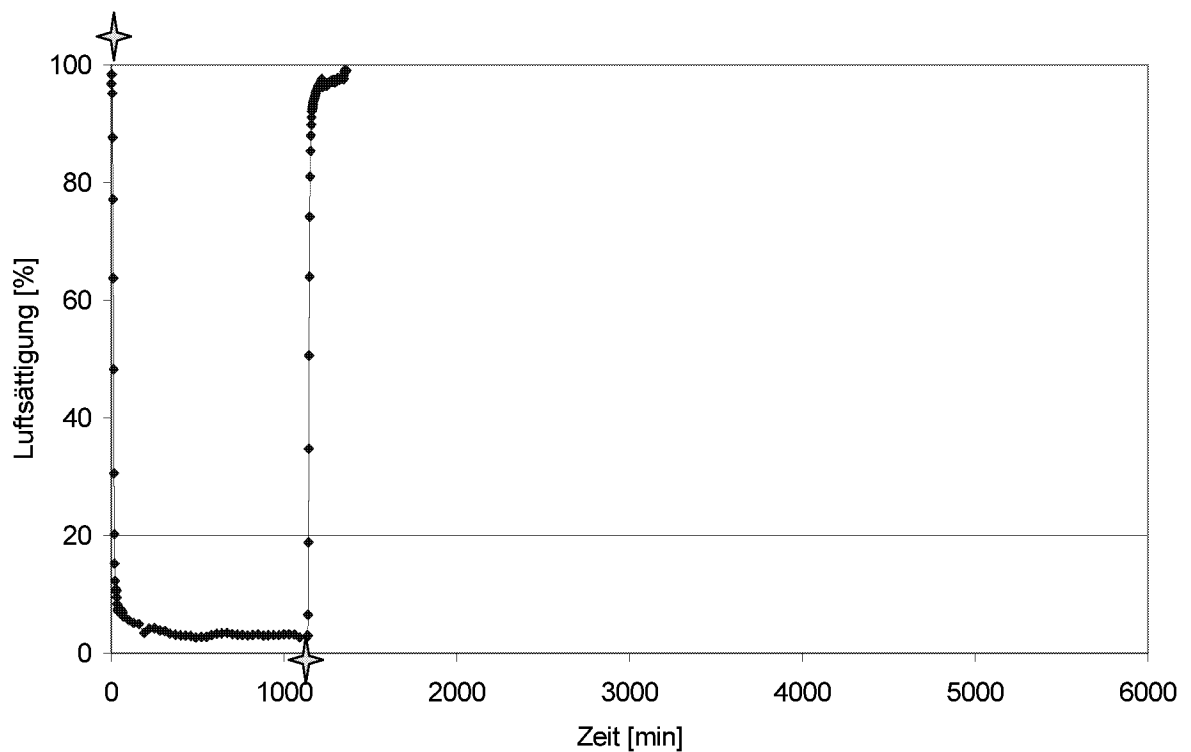


Abbildung VII-26: Luftsättigungskurve bei Begasung mit einem Begasungsschlauch der Länge 100 cm

Verteilung der Suspensionszellen im Reaktor

Um über die Gesamtfläche der Membran möglichst einheitliche Bedingungen für die hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen hinsichtlich der stromalen Unterstützung gewährleisten zu können, sollte die Verteilung der Suspensionszellen auf der Membran gleichmäßig sein. Eine Untersuchung der räumlichen Verteilung der Zellen hat die Notwendigkeit gezeigt, den Medienstrom innerhalb des Systems zu optimieren.

Die inokulierten Zellen wurden nach ca. 30 Stunden, ohne dass das System perfundiert oder begast wurde, durch speziell angefertigte Probenahmelöcher in der oberen Reaktorplatte abgeerntet.

Es stellte sich heraus, dass insbesondere im Bereich der Probenahmelöcher Nummer 7, 10, 11 und 12 relativ zu den übrigen Punkten weniger Zellen auf der Membran auflagen. Daraus lässt sich schließen, dass das Medium und damit die darin suspendierten Zellen nicht optimal über der Membran verteilt wurden. Durch Verbreitern der Medienzu- und Ablaufrinnen von 3,2mm auf 5mm konnte dieses Problem behoben werden (s. u.).

Die durch die Verbreiterung der Medienzu- und Ablaufrinnen optimierte Medienverteilung über die Membranfläche wurde optisch untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine mit Bromphenolblau gefärbte Lösung mit einer Pumprate von 1mL/min in den glasklaren PC-Reaktor eingeleitet. Die Verteilung der Farblösung im Reaktor wurde alle 30 Sekunden fotografisch festgehalten. Der Medieneinstrom erfolgte gleichförmig von der Medienzu-laufseite, diagonal über die Membran hinweg, zum Medienauslass (Daten nicht gezeigt). Todzonen, besonders im Bereich der kritischen Probenahmelöcher 7, 10, 11 und 12, wurden nicht detektiert.

VII.2.2. Biologische Aspekte

Stroma-Haftung bei hohen Pumpraten

Grundsätzlich erfolgt das Inokulieren des Stromas am Tag -1 der Fermentation. Die Zellen werden in einem geeigneten Volumen in die Stroma-Kammer des Reaktors gespült. Anschließend wird der Reaktor so platziert, dass die Zellen über Nacht auf der Membran adhären können. Am nächsten Tag wird der Reaktor gewendet, sodass die stromalen Zellen nun, analog zum MMR, kopfüber an der Membran haften.

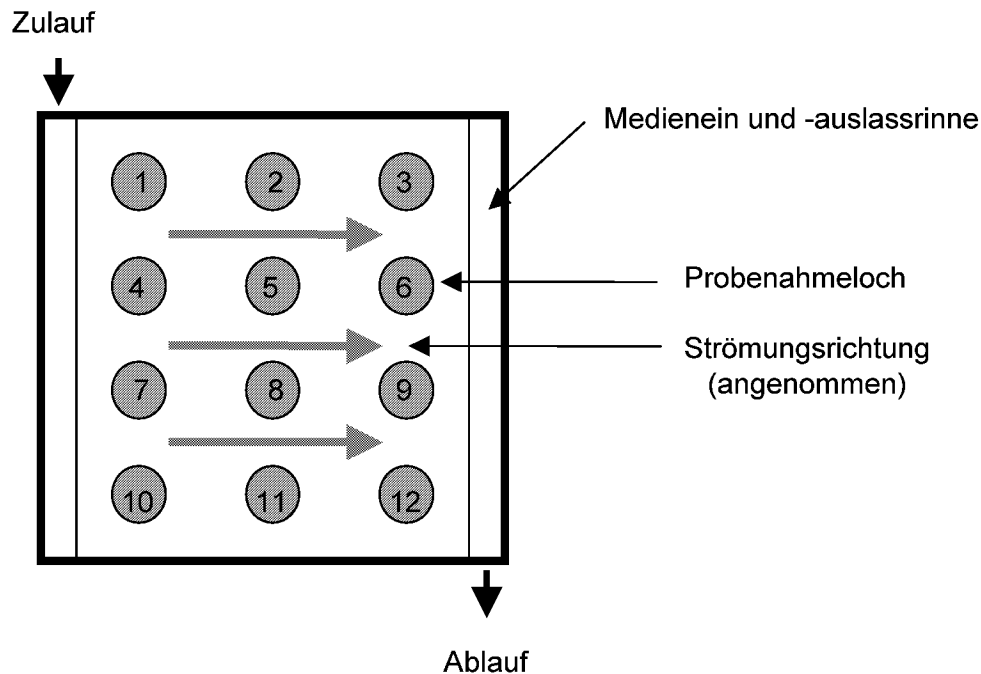


Abbildung VII–27: Schematische Darstellung der Medienströmung und Probenahmelöcher

Die Effizienz der Stroma-Haftung wurde untersucht, indem nach erfolgter Anheftung die Stroma-Kammer mit Medium bei ansteigender Pumprate durchströmt wurde. In einem Vorlauf (0,4mL/min) wurden für 10 Minuten sämtliche nicht angehefteten Zellen ausgespült. Die Menge betrug ca. 2% des gesamten Inokulums. Anschließend wurde die Kammer mit 0,4mL/min, 1,0mL/min, 2,5mL/min und 4mL/min durchströmt. Dabei wurde jeweils für einen Zeitraum von 60 Minuten alle 15 Minuten für zwei Minuten eine Probe genommen und ausgewertet. Insgesamt wurden nochmals ca. zwei Prozent der Zellen ausgespült, und es stellte sich heraus, dass selbst bei hohen Pumpraten die Haftung der Zellen sehr gut ist. Daraus resultiert, dass die Pumprate je nach der entsprechenden Anforderung in einem großen Bereich variiert werden kann. Ein Ablösen der stromalen Zellen muss dabei nicht befürchtet werden.

Kultivierung

Nachdem einige Schritte der Kultivierung im Membranreaktor zuvor mithilfe der myeloiden Zelllinie KG-1 erprobt und etabliert worden waren (z. B. das Inokulieren, die Begasung, Zellernte), wurden $1,2 \times 10^7$ hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen einer einzigen, nicht gepoolten Nabelschnurblutprobe im PC Membranreaktor entsprechend der Anweisung in Anhang C kultiviert. Zusätzlich wurden $1,2 \times 10^8$ bestrahlte Zellen der stromalen Zelllinie M2-10B4 mod. eingesetzt. Die Versorgung der Zellen über den Me-

dienzulauf erfolgte ausschließlich innerhalb des stromalen Kompartimentes. Dadurch sollte verhindert werden, dass HSPC von der Membran aufgewirbelt werden und so zum einen von stromalen Zellausläufern gelöst werden. Die Bedeutung der Adhäsion für die Qualität der Zellkultur und die Schädigungen, welche durch Scherstress verursacht werden können, sind bereits ausführlich von Koller *et al.* erläutert worden [79]. Zum anderen wurden die hämatopoietischen Zellen automatisch in ihrem Kompartiment zurückgehalten und nicht versehentlich aus dem Reaktor ausgespült. Da die Versorgung der HSPC in der oberen, nicht perfundierten Kammer ausschließlich diffusiv erfolgen kann, wurde berechnet, wie hoch der Sauerstoffgehalt innerhalb der unteren Kammer mindestens sein muss, um noch eine Luftsättigung von 5%pO₂ in der oberen Kammer garantieren zu können.

Dabei wurden folgende Annahmen und Werte zugrunde gelegt (vergleiche Anhang D):

Für einen 70kg schweren Patienten müssen ca. 2,8E+08 hämatopoietische Zellen zur Verfügung stehen (4,0E+06c/kg Körpergewicht). Nimmt man den bekannten Sauerstoffverbrauch der BHK (*baby hamster kidney*) Zellen an, so verbrauchen die HSPC 6,44E-10kg/s Sauerstoff. Der Diffusionskoeffizient des Sauerstoffs beträgt 3,34E-09m²/s. Dabei muss eine Strecke über die Membran, resultierend aus der Dicke des stromalen Zellraums und der Membran selbst, von 1,5E-5m zurückgelegt werden. Die dafür zur Verfügung stehende Lochfläche der Membran beträgt 1,7E-03m². Bei einer Fermentationstemperatur von 37°C beträgt die Sauerstoffkonzentration für die gewünschte Luftsättigung von 5% 3,35E-04kg/m³.

Durch Einsetzen der Werte in folgende Gleichungen

$$j_{O_2} = (D/\delta) * (c_{oben} - c_{unten})$$

$$q_{O_2} = j_{O_2} * F_{Loch} \leftrightarrow j_{O_2} = q_{O_2} / F_{Loch}$$

$$c_{unten} = \{(q_{O_2} * \delta) / (F_{Loch} * D)\} + c_{oben}$$

mit

j = flächenspezifischer Massentransport [kg/m²*s]

D = Diffusionskoeffizient [m²/s]

δ = Diffusionsstrecke [m]

c = O₂-Konzentration

q_{O_2} = O₂-Verbrauch [kg/Zelle*s]

F_{Loch} = Lochfläche der Membran [m²]

ergibt sich eine Mindestsauerstoffkonzentration von ca. 30% Luftsättigung in der unteren, perfundierten Kammer. Dieser Wert sollte am Medienablauf gemessen werden, um sicherzugehen, dass auch die Zellen, welche vom Medienzulauf am weitesten entfernt liegen, nicht unterversorgt sind.

Nach einer 168-stündigen Kulturdauer wurden die Zellen in drei Fraktionen geerntet (siehe Tabelle VII-21 und Anhang C). Dabei stellte sich heraus, dass es nicht möglich war, die Zellen zu quantifizieren, da sie lediglich als zusammenhängender Zellverband gewonnen werden konnten. Die Inkubation mit einer EDTA-Lösung konnte die Zellen zwar von der Membran lösen, sie aber nicht dissoziieren.

Tabelle VII-21: Vitalität und Anteil an CD34⁺ Zellen innerhalb der drei Fraktionen

Fraktion	Vitalität [%]	CD34 ⁺ [%]
1 (Medium)	58	36
2 (PBS)	80	42
3 (EDTA-Lösung)	100	34

Es fällt auf, dass tote Zellen dazu neigen, sich von der Membran und den Ausläufern des stromalen Zellen zu lösen. Sie befinden sich in Suspension im Membranreaktor und werden mit der ersten Fraktion ausgespült. Die Vitalität ist am höchsten bei denjenigen Zellen, die bis zum Ende der Kultur fest auf der Membran und dem Stroma haften, also erst durch Einwirken der EDTA-Lösung abgelöst und ausgespült werden können.

Erstaunlich und erfreulich ist der sehr hohe Anteil an CD34-positiven Zellen nach der Kultur. Er liegt in diesem Fall zwischen über 30 und 42%, üblich sind im MMR oder auch nach Kultur in Suspension ca. 10-12% CD34-positive Zellen.

Einen Hinweis darauf, dass die Zellen bis zum Ende der Kulturdauer proliferierten, liefert der konstante Sauerstoffverbrauch der Zellen. Da die stromalen Zellen bestrahlt waren, sich also nicht mehr teilen konnten, sollte der Verbrauch des Sauerstoffes hauptsächlich von den expandierenden hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen ausgehen. Begast wurde das Medium mit konstant 41% Luftsättigung, gemessen am Reaktoreingang. Abbildung VII-27 zeigt den Verlauf der Messkurve am Medienablauf.

Die Begasung und der Medienein- und Umlauf wurden zugeschaltet, nachdem sowohl die stromalen Zellen als auch die HSPC inokuliert worden waren. Zu Beginn der Messung fällt der gemessene Wert stark ab, um dann, bei konstanter Pumprate und Begasung, kontinuierlich abzunehmen. Die Luftsättigung sank am Ende der Kultur nach 168h auf unter

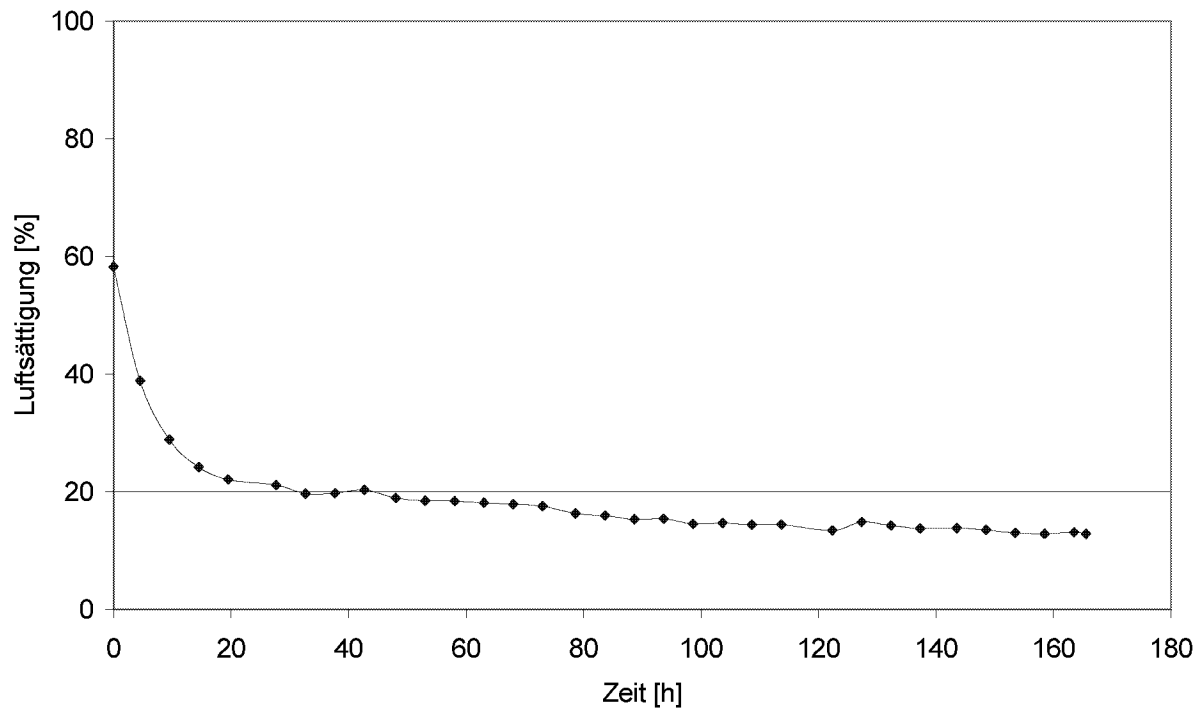


Abbildung VII–28: Verlauf der Luftsättigungskurve, gemessen am Medienablauf

13% ab. Das bedeutet, dass innerhalb des Reaktors ein relativ großes Gefälle der Sauerstoffkonzentration vorherrscht, ausgehend von ca. 41% am Medieneinlass und abnehmend bis auf 13% am Medienausslass. Die Zellen sind also je nach Position im Reaktor sehr unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt.

Zuvor wurde berechnet, dass in der unteren Kammer eine Sauerstoffkonzentration von mindestens 30% Luftsättigung vorliegen muss, um in der oberen Kammer 5% Luftsättigung zu gewährleisten. Mit lediglich 13% wird dieser Wert deutlich unterschritten. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die angenommenen Werte einen großen Sicherheitsfaktor enthalten. Der Sauerstoffverbrauch der HSPC liegt mit Sicherheit weit unter den Werten der Zelllinie BHK, da diese ein völlig anderes proliferatives Verhalten zeigen. Die hohe Vitalität der Zellen deutet ebenfalls darauf hin, dass sie nicht Sauerstoff limitiert waren.

VII.2.3. Kurzzusammenfassung und Diskussion IV

Technisch betrachtet, bietet der Membranreaktor sämtliche Voraussetzungen für eine Kultivierung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen:

- Die Zellen sind ausreichend versorgt.

Die Medienversorgung, entsprechend einem halben Medienwechsel pro Tag, ist völlig ausreichend, da die metabolischen Raten der kultivierten hämatopoietischen Zellen im Vergleich zu anderen Zellkulturen sehr niedrig sind. Stoffwechselaktivere stromale Zellen werden grundsätzlich vor ihrem Einsatz in der Kultur durch Bestrahlung wachstumsarrestiert, um ihren Stoffwechsel zu minimieren. Der Volumenstrom des Medienzulaufes ist also unkritisch. Aus vorgenannten Gründen ist auf eine pH-Wert Messung verzichtet worden, da eine starke Anreicherung mit Stoffwechselendprodukten, hauptsächlich Laktat, und die daraus resultierende Ansäuerung des Mediums nicht befürchtet werden muss. Außerdem hätte der zusätzlich Einbau einer pH-Sonde zur Folge, dass das Gesamtvolumen des Systems sich merklich erhöhen würde, da bisher noch keine Durchflusszellen analog der Sauerstoffsonde verfügbar sind.

- Das Vorhandensein von Todzonen konnte optisch ausgeschlossen werden.

Auch optisch, unter Zuhilfenahme einer Bromphenolblau gefärbten Lösung, konnte ausgeschlossen werden, dass innerhalb der Reaktorkammer Kurzschluss-Strömungen auftreten. Theoretisch ist demnach eine homogene Versorgung der Zellen schon bei niedrigen Umpumpraten (hier 1,0mL/min) gewährleistet.

- Die Sauerstoffversorgung der Zellen ist gewährleistet.

Die Daten der Sauerstoffmessung haben gezeigt, dass es möglich ist, die Zellen durch diffusives Begasen des Mediums außerhalb des Bioreaktorraumes mit ausreichenden Mengen Sauerstoff zu versorgen. Allerdings kommt es dabei zu einer Gradientenbildung der Sauerstoffkonzentration über die Membranfläche und somit zu unerwünschten, inhomogenen Kulturbedingungen. Dieses Problem kann durch Erhöhen des Volumenstroms des Medienumlaufs vermindert werden. Zuvor muss jedoch das Adhäsionsverhalten der stromalen Zellen bei höheren Pumpraten untersucht werden. Theoretisch wird die Adhäsion ausreichend sein, da bei den bisherigen Pumpraten nur ein minimaler Zellverlust festgestellt werden konnte (s. o.). Eine Anpassung der Gaszusammensetzung innerhalb des Begasungsgefäßes an die Kulturbedingungen ist nur eingeschränkt möglich, da eine zu hohe Sauerstoffkonzentration am Medieneinlauf vermieden werden muss, um Zellschädigungen zu verhindern. Der Sauerstoffgradient sollte daher lediglich durch Erhöhen des Umlaufvolumenstroms minimiert werden.

Die Dynamik und Effizienz des Begasungsgefäßes konnte durch Verlängern des Begasungsschlauches erheblich verbessert werden, sodass nun schnell die gewünschte Luftsättigungsrate eingestellt werden kann.

- Stromale konnten von hämatopoietischen Zellen dauerhaft getrennt werden.

Das Membran-separierte Zweikammersystem erwies sich als erfolgreich, da nach mikroskopischer Untersuchung keinerlei stromale Zellen innerhalb der abgeernteten HSPC-Fraktionen detektiert werden konnten.

Die Bedeutung der Perfusion für die Qualität einer HSPC-Kultur in verschiedenen Bioreaktorsystemen ist vielfach bestätigt worden [203-206]. Man sollte dabei jedoch nicht nur die optimale Versorgung der Zellen berücksichtigen. Denn die Akkumulation gelöster, stromaler Faktoren im Medium hat sich als kritischer Parameter für die Qualität der kultivierten HSPC herausgestellt. Die Theorie zur kritischen Schwellenwertkonzentration von Botenstoffen ist bereits im vorhergehenden Kapitel ausführlich vorgestellt worden. Im Hinblick auf den sehr hohen Anteil an CD34-positiven, vitalen Zellen deutet die daraus abgeleitete gute Qualität der HSPC darauf hin, dass in biologischer Hinsicht die Bedingungen innerhalb des Membranreaktors sehr gut sind und der unterstützende Einfluss der stromalen Zellen ausreicht.

VII.2.4. Kritische Schlussbemerkungen zum Thema klinische Relevanz

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und charakterisierte Membran-Bioreaktor ist für eine klinische Anwendung ungeeignet. Für diese Einschätzung gibt es mehrere Gründe. Ein offensichtlicher Grund ist, dass die verwendeten Materialien, Substanzen und die Prozessführung nicht den Anforderungen nach cGMP entsprechen. Hinzu kommt, dass der gesamte Aufbau des Reaktors und seine Bedienung bzw. Regelung nicht den Gegebenheiten des Klinikalltages entsprechen. Der Aufbau und die Betreuung des Prozesses und der Umgang mit den Zellen ist sehr aufwendig und bedarf der detaillierten Einweisung. Ein besonders kritischer Punkt ist die Rückgewinnung der expandierten hämatopoietischen Zellen. Diese stellte sich selbst unter Laborbedingungen als kaum praktikabel heraus, da die Zellen zur Verklumpung neigen.

Das System des Membran-Bioreaktors bedarf in dieser Hinsicht der verfahrenstechnischen Optimierung, um es auch unter Berücksichtigung der technischen Gesichtspunkte in der Klinik nutzbar zu machen. Denn seine biologische Leistungsfähigkeit und Überlegenheit konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden.

Daher bin ich fest davon überzeugt, dass die vorgestellten Ergebnisse einen Beitrag zur klinisch relevanten Kultivierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen leisten.

Denn das System der Membran-separierten Co-Kultur ist dem der etablierten Suspensionskulturen eindeutig überlegen.

Betrachtet man zum Vergleich ein System der Konkurrenz, das Aastrom Replicell™ Modul der Firma Aastrom Biosciences, Inc., so ist dessen Leistungsfähigkeit sehr begrenzt. Dennoch wurde dieses System bereits mehrfach in klinischen Studien eingesetzt [<http://www.aastrom.com/html/ctupdate.html>].

Nach einer Kulturdauer von 288h können MNZ aus Nabelschnurblut lediglich um Faktor 3,1 expandiert werden, CFU-GM expandieren 30-fach. NOD/SCID repopulierende Zellen konnten nach der Kultivierung im Aastrom Replicell™, allerdings leider ohne Angabe der Effizienz, nachgewiesen werden [207].

Eine spanische Gruppe hat untersucht, inwieweit expandierte hämatopoietische Zellen aus der Nabelschnur tatsächlich zur Wiederherstellung eines geschädigten hämatopoietischen Systems in Patienten beitragen können. Es konnten keinerlei Hinweise auf eine Beteiligung festgestellt werden [110]. Für ihre Untersuchungen verwendeten sie zwei Spenden unterschiedlicher Herkunft. Eine Probe wurde für 144h unter Verwendung von vier Cytokinen *ex vivo* expandiert. Schließlich wurden die kultivierten und auch die unmanipulierten Zellen der zweiten Probe gleichzeitig transplantiert. Es konnte keine Beteiligung der expandierten Zellen an zirkulierenden Granulozyten festgestellt werden. DNA der expandierten Zellen konnte nur zu einem frühen Zeitpunkt, nach 240h und 288h nach der Transplantation, in Zellen des Knochenmarks und im peripheren Blut nachgewiesen werden. Kultivierte Zellen haben in diesem Fall erwiesenermaßen nicht zur Wiederherstellung des hämatopoietischen Systems beigetragen und konnten auch keine kurzfristige Bereitstellung von Immunzellen bewirken. Allerdings waren die unmanipulierten Proben, bezogen auf ihre HLA-Übereinstimmung mit dem Empfänger, besser geeignet als die expandierten Zellen.

Dieses Ergebnis zeigt die Problematik des gesamten Gebietes auf. Zwar wird intensiv daran geforscht und gearbeitet, die Kulturbedingungen *in vitro* zu optimieren. Aber die entscheidenden Kriterien für den Erfolg einer Kultivierung werden falsch gewählt. Denn nur, wenn es zum ersten Mal gelingt, mithilfe expandierter hämatopoietischer Zellen aus der Nabelschnur tatsächlich und nachweisbar einen erwachsenen Patienten zu therapieren, kann von einem Erfolg gesprochen werden. Bisher liefert die Forschung nur Anhaltspunkte, wie dieses Ziel erreicht werden könnte. Lebhaft diskutierte Expansionsraten, Vitalitäten, Ergebnisse der vielen biologischen Assays und unterschiedlichen Tiermodelle sollten nicht darüber hinweg täuschen, dass im Grunde noch keine Erfolge vorzuweisen sind, die auch nur einem Patienten geholfen hätten. Mit dieser recht drastischen Einschätzung

der Lage möchte ich darauf hinweisen, dass es vieler, sehr vieler Entwicklungsschritte bedarf, um einen echten und nachhaltigen Beitrag im klinischen Alltag zu leisten. Noch klafft eine zu große Lücke zwischen Forschung und Anwendung. Und jede allzu optimistische Verbreitung von Erfolgen wird zwangsläufig zu einer Erwartungshaltung führen, der wir nicht gerecht werden können.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Der zuvor gemachten kritischen Schlussbemerkungen zum Thema klinische Relevanz möchte ich an dieser Stelle etwas die Schärfe nehmen. Es war nie meine Aufgabe und auch nicht mein Ziel, ein System zu entwickeln, welches 1 zu 1 in den Ablauf einer klinischen Therapie eingefügt werden kann. Vielmehr habe ich versucht, durch sinnvollen Einsatz biologischer und biotechnologischer Techniken ein Reaktorsystem zu entwickeln, welches den *in vivo* Kulturbedingungen möglichst nahe kommt. Das Verständnis von biologischen Regulationsprozessen diente mir als Grundlage für die Konzeption und Entwicklung der Membran-separierten Co-Kultur. Leitgedanke war dabei stets, dass das natürliche System perfekt ist, dessen Nachbau also konsequenterweise die bestmöglichen Ergebnisse liefern würde.

Das erste Viertel der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Vielzahl und Varianz stromaler sekretierter Faktoren. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der biologischen Wirkung dieser Faktoren, die in Form von Stroma konditionierten Medien untersucht wurden. Zu diesem Zweck wurden Kulturbedingungen definiert, die zur Produktion und Gewinnung geeigneter SCM führten. Es ist gelungen, speziell die Expansion der wertvollen frühen Vorläuferzellen anzutreiben. Qualitative Unterschiede der SCM, zum einen bedingt durch Variationen der Kulturbedingungen, wie z. B. die Dauer der Konditionierung oder die eingesetzte Zellzahl, aber auch Unterschiede zwischen den drei untersuchten stromalen Zelllinien selbst, haben zu den Arbeiten übergeleitet, die im zweiten Viertel dieser Arbeit beschrieben werden.

Um den beobachteten Einflüssen der unterschiedlichen Stroma konditionierten Medien eine stoffliche Identität zu geben, wurde ein neues Verfahren zur Identifizierung von Proteinen, die unmittelbar aus SCM Proben isoliert wurden, entwickelt. Dies wurde möglich durch die Verwendung eines Protein freien Basismediums. Darin enthaltene, von stromalen Zellen sekretierte Proteine konnten gelelektrophoretisch getrennt und visualisiert werden. Eine sich daran anschließende massenspektrometrische Analyse erlaubte die Identifizierung interessanter Proteine, die differentiell exprimiert wurden. Mithilfe eines Supplementierungsversuches konnte bewiesen werden, dass ein auf diese Art charakterisiertes Protein einen stimulierenden Einfluss auf die Expansion der frühen Vorläuferzellen besitzt.

Im ersten Abschnitt des zweiten Ergebnisteils der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung und Charakterisierung eines innovativen Bioreaktorkonzeptes zur Kultivierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen beschrieben. Die Idee ist, stromale und hämatopoietische Zellen mittels einer dünnen, porösen Membran räumlich zu trennen, aber dennoch sämtliche Mechanismen der Regulation und Signaltransduktion zu ermöglichen. Dadurch soll das natürliche Mikromilieu der Hämatopoiese, das Knochenmark, bestmöglich imitiert werden und entsprechend zu einer erheblichen Steigerung der Effizienz und Qualität der Kultivierung führen. Durch die Optimierung verschiedener Parameter ist es gelungen, eine deutliche Expansionssteigerung besonders der frühen Vorläufer zu erzielen und bisherige Systeme weit zu übertreffen. Es konnte auch gezeigt werden, dass der theoretische Mechanismus der stromalen Unterstützung über die Membran hinweg tatsächlich wirksam ist. Ein theoretisches Konzept wurde also nachweislich und erfolgreich realisiert.

Nachdem sich der Erfolg im kleinen Maßstab so klar abgezeichnet hat, folgt im letzten Teil der Arbeit das *up-scaling* der Membran-separierten Co-Kultur, um auch klinisch relevante Zellmengen fermentieren zu können. Zu diesem Zweck wurde ein Membran-Reaktor entwickelt, bestehend aus zwei geschlossenen, durch die Membran separierten Kammern, die jeweils über eine eigene Medienversorgung verfügen. Die Perfusion des Systems erfolgt im unteren Kompartiment, worin sich die stromalen Zellen befinden. Es ist gelungen, ein für die besonderen technischen Anforderungen geeignetes Material zur Konstruktion des Reaktorgefäßes zu ermitteln. Ausgehend von einem nicht für die Zellkultur geeigneten System konnten Veränderungen und wesentliche Verbesserungen eingeführt werden, sodass der für eine doch sehr spezielle Anwendung konzipierte und entwickelte Reaktor nun problemlos zu Versuchszwecken verwendet werden kann. Um ihn auch in der Klinik einsetzen zu können, ist jedoch eine weitere Optimierung notwendig.

IX. AUSBLICK

Theoretisch:

Auf Basis der zuvor vorgestellten Daten und Ergebnisse bietet sich nun die Gelegenheit, einen spekulativen Ausblick zu wagen.

Wohin wird die Entwicklung der Zellkulturtechnik, speziell der Stammzellkultur, führen? Obwohl die Experimente dieser Arbeit unter Verwendung von adulten Stammzellen durchgeführt wurden, sollte nicht übersehen werden, dass die Forschung auf dem Gebiet der embryonalen Stammzellen stark forciert wird. Beide Ansätze geraten in eine Art Konkurrenzsituation und müssen nun ihr jeweiliges Potential unter Beweis stellen. Ich möchte mich nicht zu einem moralischen Richter über eine ethisch konforme Gewinnung von biologischem Material aufschwingen. Vielmehr bin ich der Meinung, dass sowohl adulte als auch embryonale Stammzellen ihre Berechtigung in der Forschung haben, nur in jeweils unterschiedlichen Bereichen. Solange die Problematik des therapeutischen Klonens nicht geklärt ist, werden embryonale Stammzellen kaum Anwendung in medizinischen Indikationen finden.

Welches Bild wird sich uns in Zukunft bieten? Gewebeersatz aus dem Labor, vollständige Organe auf Bestellung? Ist der Gedanke gefährlich, oder nur ungewohnt? Und spielt die Herkunft der Zellen dabei eine Rolle, wenn man doch Menschenleben retten könnte? Unsere ethisch-moralischen Werte lassen uns vor der Einstellung, dass alles, was machbar ist, auch getan werden sollte, zurückschrecken. Sobald die Folgen des Handelns nicht mehr absehbar sind, steigt das Risiko, wird die Konsequenz unberechenbar und vor allem unkontrollierbar.

Wer vermag zu beurteilen, wann die medizinische Notwendigkeit Vorrang hat vor moralischen Grundsätzen? Und was tun, wenn sich die Moral von Nation zu Nation unterscheidet? Darf es Ausnahmen geben? Und wer ist entscheidungsbefugt?

Ich bin fest davon überzeugt, dass die Forschung an so heiklen Themen wie das der Stammzellen nicht aufgehalten werden kann. Besonders aus diesem Grund ist es absolut notwendig, eine offene und vor allem sachliche Diskussion zu führen, die sich nicht auf einige wenige besonders lautstark agierende Gruppen der Gesellschaft beschränken darf. Auch sollten in diesem Zusammenhang unbedingt nationale und kulturelle Grenzen fallen. Denn die Auswirkungen der neuen Technologien werden nicht an diesen Grenzen Halt

machen. Technische Errungenschaften und deren Chancen und Risiken sind schon lange kein isoliert zu betrachtendes Thema mehr. Analog gilt: nur, wenn Werte von einer breiten gesellschaftlichen Basis etabliert und geachtet werden, haben sie die Macht, unerwünschte und vielleicht sogar gefährliche Entwicklungen zu verhindern. Darum muss der geistige unbedingt mit dem technisch-wissenschaftlichen Fortschritt mithalten. Dies wird nur gelingen, wenn sich alle Beteiligten ihrer Verantwortung bekennen und ihren Beitrag zur Weiterentwicklung der Gesellschaft leisten. Nichts und niemand ist allein in der Lage zu beurteilen, was gut und was schlecht ist.

Praktisch:

Im Hinblick auf die proteinfreien Stroma konditionierten Medien wäre es interessant, nicht nur Gesamtproteinmengen im SCM zu bestimmen, sondern auch die jeweiligen untersuchten Faktoren zu quantifizieren. Auch eine dynamische Betrachtung der Sekretionsmuster, analog der Konditionierungsdauer von 72, 120 oder 168 Stunden, wäre hilfreich, um die Kinetik der Proteinexpression bzw. -sekretion zu analysieren.

Es muss bedacht werden, dass es sich bei den untersuchten stromalen Fibroblasten um Zelllinien handelt, deren Expressionsmuster sich sicherlich klar von primären Knochenmarkkulturen unterscheiden. Daher wäre auch eine Untersuchung der sekretierten Proteine von frisch isolierten Knochenmarkzellen oder Endothel der Nabelschnur von Interesse, um der Natur noch näher auf die Spur zu kommen.

Wie bereits oben erwähnt, katalysiert die Superoxyd Dismutase die Umwandlung des Superoxydanions ($O_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxyd, einem intrazellulären *second messenger* Moleküle. Wird zu einer Kultur, die SOD enthält, ebenfalls das Enzym Katalase gegeben, so sollte das entstandene Wasserstoffperoxyd zu Wasser und molekularem Sauerstoff umgesetzt werden. Könnte nun gezeigt werden, dass die positive Wirkung der SOD durch die Umwandlung des H_2O_2 aufgehoben werden kann, hätte man einen konkreten Hinweis auf den Wirkmechanismus der SOD.

In diesem Zusammenhang sollte die bisher nur theoretische Bedeutung von Cathepsin L und Galectin-1 für die Kultivierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen ebenfalls experimentell verifiziert werden.

Eine Optimierung der Membran-separierten Co-Kultivierung wäre sicherlich durch den Einsatz eines geeigneteren Membranmaterials zu verwirklichen. Zusätzlich könnte eine Beschichtung der Membran mit Komponenten der Extrazellulärmatrix einen positiven Effekt hervorrufen und evtl. die Haftung der Suspensionszellen verbessern.

Der Aufbau des Membranreaktors müsste dergestalt verändert werden, dass die Abernte der kultivierten HSPC einfacher und effizienter möglich wird. Auch wäre es wünschenswert, eine Vorrichtung zur regelmäßigen Probenahme zu implementieren, um den Verlauf der Kultur zu überprüfen. Im Rahmen einer klinischen Anwendung wäre zu überlegen, ob der Reaktor nicht möglicherweise als steriler Einweg-Artikel hergestellt werden könnte, wobei die Membran stabil eingegossen würde.

X. LITERATURVERZEICHNIS

1. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
2. Weissman, I.L., D.J. Anderson, and F. Gage, *Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 387-403.
3. Potten, C.S. and M. Loeffler, *Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt*. Development, 1990. **110**(4): p. 1001-20.
4. Yoder, M.C., *Introduction: spatial origin of murine hematopoietic stem cells*. Blood, 2001. **98**(1): p. 3-5.
5. Becker, A., McCulloch, E., and Till, J., *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. **197**: p. 452-454.
6. Till, J.E., and McCulloch, E.A., *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiat. Res., 1961. **14**: p. 1419-1430.
7. Wu, A., Till, J., Siminovitch, L., and McCulloch, E., *Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system*. J. Exp. Med., 1968. **127**: p. 455-467.
8. Bonnet, D., *Haematopoietic stem cells*. J Pathol, 2002. **197**(4): p. 430-40.
9. Fuchs, E. and J.A. Segre, *Stem cells: a new lease on life*. Cell, 2000. **100**(1): p. 143-55.
10. Metcalf, D., *Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct?* Ann N Y Acad Sci, 1999. **872**: p. 289-303; discussion 303-4.
11. Blau, H.M., T.R. Brazelton, and J.M. Weimann, *The evolving concept of a stem cell: entity or function?* Cell, 2001. **105**(7): p. 829-41.
12. Civin, C.I., 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. 157-65.
13. Berenson, R.J., et al., *Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons*. J Clin Invest, 1988. **81**(3): p. 951-5.
14. Osawa, M., et al., *Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34- low/negative hematopoietic stem cell*. Science, 1996. **273**(5272): p. 242-5.
15. Zanjani, E.D., et al., *Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells*. Exp Hematol, 1998. **26**(4): p. 353-60.

16. Goodell, M.A., *Introduction: Focus on hematology. CD34(+) or CD34(-): does it really matter? [comment]*. Blood, 1999. **94**(8): p. 2545-7.
17. Sato, T., J.H. Laver, and M. Ogawa, *Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells [see comments]*. Blood, 1999. **94**(8): p. 2548-54.
18. Matsuoka, S., et al., *CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages*. Blood, 2001. **97**(2): p. 419-25.
19. Ziegler, B.L., et al., *KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells*. Science, 1999. **285**(5433): p. 1553-8.
20. Bhatia, M., *AC133 expression in human stem cells*. Leukemia, 2001. **15**(11): p. 1685-8.
21. Goodell, M.A., et al., *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1797-806.
22. Verfaillie, C.M., R. Ploemacher, J. Di Persio, R. Sutherland, S. Serke, H. Johnsen, S. Noga and R. Negrin, *Assays to determine hematopoietic stem cell content in blood or marrow grafts*. Cytotherapy, 1999. **1**(1): p. 41-49.
23. Breems, D.A., et al., *Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay*. Leukemia, 1994. **8**(7): p. 1095-104.
24. Punzel, M., et al., *The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro*. Blood, 1999. **93**(11): p. 3750-6.
25. Ballen, K.K., et al., *Variables to predict engraftment of umbilical cord blood into immunodeficient mice: usefulness of the non-obese diabetic--severe combined immunodeficient assay*. Br J Haematol, 2001. **114**(1): p. 211-8.
26. Zon, L.I., *Developmental biology of hematopoiesis*. Blood, 1995. **86**(8): p. 2876-91.
27. Gilbert, S.F., *Developmental Biology*, ed. F. Edition. 1997.
28. Stryer, L., *Biochemie*. 1994.
29. Marshall, C.J. and A.J. Thrasher, *The embryonic origins of human haematopoiesis*. Br J Haematol, 2001. **112**(4): p. 838-50.
30. Pereira, R.F., et al., *Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4857-61.
31. Gritti, A., et al., *Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor*. J Neurosci, 1996. **16**(3): p. 1091-100.
32. Ferrari, G., et al., *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1528-30.

33. Gussoni, E., et al., *Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation*. Nature, 1999. **401**(6751): p. 390-4.
34. Bjornson, C.R., et al., *Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo*. Science, 1999. **283**(5401): p. 534-7.
35. Clarke, D.L., et al., *Generalized potential of adult neural stem cells*. Science, 2000. **288**(5471): p. 1660-3.
36. Brazelton, T.R., et al., *From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice [In Process Citation]*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1775-9.
37. Mezey, E., et al., *Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow [In Process Citation]*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1779-82.
38. Theise, N.D., et al., *Liver from bone marrow in humans*. Hepatology, 2000. **32**(1): p. 11-6.
39. Krause, D.S., et al., *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell*. Cell, 2001. **105**(3): p. 369-77.
40. Alison, M.R., et al., *Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells*. Nature, 2000. **406**(6793): p. 257.
41. Morshead, C.M., et al., *Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 268-73.
42. Lemischka, I., *A few thoughts about the plasticity of stem cells*. Exp Hematol, 2002. **30**(8): p. 848-52.
43. Anderson, D.J., F.H. Gage, and I.L. Weissman, *Can stem cells cross lineage boundaries?* Nat Med, 2001. **7**(4): p. 393-5.
44. Dexter, T.M., M.A. Moore, and A.P. Sheridan, *Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras in vitro*. J Exp Med, 1977. **145**(6): p. 1612-6.
45. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
46. Roberts, R., et al., *Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis*. Nature, 1988. **332**(6162): p. 376-8.
47. Lichtman, M.A., *The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review*. Exp Hematol, 1981. **9**(4): p. 391-410.
48. Krauss, G., *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. 1997.
49. Snow, J.W., et al., *STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells*. Blood, 2002. **99**(1): p.

- 95-101.
50. Rane, S.G. and E.P. Reddy, *JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis*. *Oncogene*, 2002. **21**(21): p. 3334-58.
 51. Heldin, C.H., *Signal transduction: multiple pathways, multiple options for therapy*. *Stem Cells*, 2001. **19**(4): p. 295-303.
 52. Zhu, J. and S.G. Emerson, *Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment*. *Oncogene*, 2002. **21**(21): p. 3295-313.
 53. Majka, M., et al., *Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner*. *Blood*, 2001. **97**(10): p. 3075-85.
 54. Maekawa, T. and T. Ishii, *Chemokine/receptor dynamics in the regulation of hematopoiesis*. *Intern Med*, 2000. **39**(2): p. 90-100.
 55. Rollins, B.J., *Chemokines*. *Blood*, 1997. **90**(3): p. 909-28.
 56. Liesveld, J.L., et al., *Response of human cd34+ cells to cxc, cc, and cx3c chemokines: implications for cell migration and activation*. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001. **10**(5): p. 643-55.
 57. Ogawa, M. and T. Matsunaga, *Humoral regulation of hematopoietic stem cells*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **872**: p. 17-23; discussion 23-4.
 58. Whetton, A.D. and E. Spooner, *Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells*. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(6): p. 721-6.
 59. Lotem, J. and L. Sachs, *Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia*. *Oncogene*, 2002. **21**(21): p. 3284-94.
 60. Ginsburg, H.a.S., L., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993. **31**: p. 1-40.
 61. Plutznik, D.H., und Sachs, L., *J. Cell Comp. Physiol.*, 1965. **66**: p. 319-324.
 62. Ichikawa, Y., D.H. Pluznik, and L. Sachs, *In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1966. **56**(2): p. 488-95.
 63. Woodward, T.A., et al., *Further studies on growth factor production by the TC-1 stromal cell line: pre-B stimulating activity*. *Blood*, 1990. **75**(11): p. 2130-6.
 64. Lyman, S.D., et al., *Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells*. *Cell*, 1993. **75**(6): p. 1157-67.
 65. Kaushansky, K., *Thrombopoietin: basic biology, clinical promise*. *Int J Hematol*, 1995. **62**(1): p. 7-15.

66. Zandstra, P.W., D.A. Lauffenburger, and C.J. Eaves, *A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis*. Blood, 2000. **96**(4): p. 1215-1222.
67. Schneider, E., et al., *Characterization of murine hematopoietic progenitor subsets involved in interleukin-3-induced interleukin-6 production*. Blood, 1991. **78**(2): p. 329-38.
68. Gerber, H.P., et al., *VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 954-8.
69. Behringer, D., et al., *Cytokine and chemokine production by CD34+ haemopoietic progenitor cells: detection in single cells*. Br J Haematol, 1997. **97**(1): p. 9-14.
70. Zeng, H., et al., *Receptor specificity in the self-renewal and differentiation of primary multipotential hemopoietic cells*. Blood, 2001. **98**(2): p. 328-34.
71. Zon, L.I., *Self-renewal versus differentiation, a job for the mighty morphogens*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 142-3.
72. Zandstra, P.W., et al., *Ontogeny-associated changes in the cytokine responses of primitive human haemopoietic cells*. Br J Haematol, 1998. **101**(4): p. 770-8.
73. Cancelas, J.A., et al., *Connexin-43 gap junctions are involved in multiconnexin-expressing stromal support of hemopoietic progenitors and stem cells*. Blood, 2000. **96**(2): p. 498-505.
74. Rosendaal, M., Krenacs T, *Regulatory Pathways in Blood-forming Tissue with Particular Reference to Gap Junctional Communication*. Pathology Oncology Research, 2000. **6**(4).
75. Becker, P.S., et al., *Adhesion receptor expression by hematopoietic cell lines and murine progenitors: modulation by cytokines and cell cycle status*. Exp Hematol, 1999. **27**(3): p. 533-41.
76. Gigant, C., et al., *Quantitative Expression of Adhesion Molecules on Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Peripheral Blood, Bone Marrow, and Cord Blood CD34+ Cells*. J Hematother Stem Cell Res, 2001. **10**(6): p. 807-14.
77. Altankov, G. and V. Serafimov-Dimitrov, *Adhesive properties of blood cells*. Haematologia, 1990. **23**(4): p. 239-48.
78. McCarthy, J.B., B. Vachhani, and J. Iida, *Cell adhesion to collagenous matrices*. Biopolymers, 1996. **40**(4): p. 371-81.
79. Koller, M.R. and E.T. Papoutsakis, *Cell adhesion in animal cell culture: physiological and fluid-mechanical implications*. Bioprocess Technol, 1995. **20**: p. 61-110.
80. Watt, S., *Adhesion Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells*. British Journal of Haematology, 2001. **112**: p. 541-557.

81. Simmons, P.J., J.P. Levesque, and A.C. Zannettino, *Adhesion molecules in haemopoiesis*. Baillieres Clin Haematol, 1997. **10**(3): p. 485-505.
82. Greenberg, A.W., W.G. Kerr, and D.A. Hammer, *Relationship between selectin-mediated rolling of hematopoietic stem and progenitor cells and progression in hematopoietic development*. Blood, 2000. **95**(2): p. 478-86.
83. Robinson, S.D., et al., *Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11452-7.
84. Strobel, E.S., et al., *Adhesion and migration are differentially regulated in hematopoietic progenitor cells by cytokines and extracellular matrix*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3524-32.
85. Kapur, R., et al., *Cross-talk between alpha(4)beta(1)/alpha(5)beta(1) and c-Kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-activated protein kinase, and Akt signaling pathways*. Blood, 2001. **97**(7): p. 1975-81.
86. Levesque, J.P. and P.J. Simmons, *Cytoskeleton and integrin-mediated adhesion signaling in human CD34+ hemopoietic progenitor cells*. Exp Hematol, 1999. **27**(4): p. 579-86.
87. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, ed. Auflage. 2000.
88. Schofield, K.P., J.T. Gallagher, and G. David, *Expression of proteoglycan core proteins in human bone marrow stroma*. Biochem J, 1999. **343 Pt 3**: p. 663-8.
89. Drzeniek, Z., et al., *Proteoglycan synthesis in haematopoietic cells: isolation and characterization of heparan sulphate proteoglycans expressed by the bone-marrow stromal cell line MS-5*. Biochem J, 1997. **327**(Pt 2): p. 473-80.
90. Amara, A., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 23916-25.
91. Janowska-Wieczorek, A., et al., *Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines [In Process Citation]*. Exp Hematol, 2000. **28**(11): p. 1274-85.
92. Voermans, C., P.B. van Hennik, and C.E. van Der Schoot, *Homing of human hematopoietic stem and progenitor cells: new insights, new challenges?* J Hematother Stem Cell Res, 2001. **10**(6): p. 725-38.
93. Peled, A., et al., *The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3289-96.

94. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 111-20.
95. Mohle, R., et al., *The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4523-30.
96. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment*. Blood, 1998. **91**(1): p. 100-10.
97. Jo, D.Y., et al., *Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1*. J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 101-11.
98. Peled, A., et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*. Science, 1999. **283**(5403): p. 845-8.
99. Glimm, H., I.H. Oh, and C.J. Eaves, *Human hematopoietic stem cells stimulated to proliferate in vitro lose engraftment potential during their S/G(2)/M transit and do not reenter G(0) [In Process Citation]*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4185-93.
100. Thomas, E.D. and R. Storb, *Technique for human marrow grafting*. Blood, 1970. **36**(4): p. 507-15.
101. Buckner, C.D., et al., *Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia*. Blood, 1970. **35**(6): p. 741-50.
102. Korbling, M., et al., *Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia*. Exp Hematol, 1981. **9**(6): p. 684-90.
103. Welte, K., et al., *Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years*. Blood, 1996. **88**(6): p. 1907-29.
104. Korbling, M., P. Anderlini, and T.A. Hematology, *Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?* Blood, 2001. **98**(10): p. 2900-8.
105. Moller, A.K., et al., *Recruitment of CD34+ Cells During Large-Volume Leukapheresis*. J Hematother Stem Cell Res, 2001. **10**(6): p. 837-53.
106. Broxmeyer, H.E., et al., *Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3828-32.
107. Gluckman, E., 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. 1174-8.

108. Barker, J.N. and J.E. Wagner, *Umbilical cord blood transplantation: current state of the art*. Curr Opin Oncol, 2002. **14**(2): p. 160-4.
109. Wagner, J.E., et al., *Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1611-8.
110. Fernandez, M.N., et al., *Cord blood transplants: early recovery of neutrophils from co-transplanted sibling haploidentical progenitor cells and lack of engraftment of cultured cord blood cells, as ascertained by analysis of DNA polymorphisms*. Bone Marrow Transplant, 2001. **28**(4): p. 355-63.
111. Madrigal, J.A., et al., *Does cord blood transplantation result in lower graft-versus-host disease? It takes more than two to tango*. Hum Immunol, 1997. **56**(1-2): p. 1-5.
112. Ballen, K., et al., *Current status of cord blood banking and transplantation in the United States and Europe*. Biol Blood Marrow Transplant, 2001. **7**(12): p. 635-45.
113. Chabannon, C., et al., *Ex vivo expansion of human hematopoietic progenitors and cells to support high-dose chemoradiation therapy: five years of clinical experience*. Cytokines Cell Mol Ther, 2000. **6**(2): p. 97-108.
114. Schindhelm, K., Nordon, R (editors), *Ex Vivo Cell Therapy*. 1999.
115. Cairo, M.S. and J.E. Wagner, *Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation*. Blood, 1997. **90**(12): p. 4665-78.
116. Gluckman, E., *Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation [In Process Citation]*. Exp Hematol, 2000. **28**(11): p. 1197-205.
117. Globerson, A., *Hematopoietic stem cells and aging*. Exp Gerontol, 1999. **34**(2): p. 137-46.
118. Engelhardt, M., et al., *Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells*. Blood, 1997. **90**(1): p. 182-93.
119. Stollorz, V., *Wenn Heilung den Tod bringen kann*, in *Frankfurter Allgemeine Sonntagszeitung*. 2002: Frankfurt. p. 57.
120. Halene, S. and D.B. Kohn, *Gene therapy using hematopoietic stem cells: Sisyphus approaches the crest*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(9): p. 1259-67.
121. McAdams, T.A., et al., *Hematopoietic cell culture therapies (Part II): Clinical aspects and applications*. Trends Biotechnol, 1996. **14**(10): p. 388-96.
122. Priller, J., et al., *Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1356-61.

123. Gordijn, B., Olthuis, H., *Ethische Fragen zur Stammzelltransplantation aus Nabelschnurblut*. Ethik in der Medizin, 2000. **12**: p. 16-29.
124. Rath, M., *Haftungsrechtliche Anforderungen*. Transkript, 2001. **3**: p. 48-49.
125. Chabannon, C., et al., *Production of ex vivo expanded hematopoietic cells and progenitors in a closed bioreactor, starting with a small volume marrow collection: A feasibility study in patients with poor-risk breast cancer and receiving high-doses of cyclophosphamide*. Int J Oncol, 1999. **15**(3): p. 511-8.
126. Chabannon, C., et al., *The role of autologous hematopoietic progenitor and cell reinfusion for intensive chemotherapy in women with poor-prognosis breast cancer. Clinical studies with ex-vivo expanded cells produced with the Aastrom Replicell technology*. Hematol Cell Ther, 1999. **41**(2): p. 78-81.
127. Holyoake, T.L., et al., *CD34 positive PBPC expanded ex vivo may not provide durable engraftment following myeloablative chemoradiotherapy regimens*. Bone Marrow Transplant, 1997. **19**(11): p. 1095-101.
128. Schmidt, S., *Verfahrenstechnik für die Kultivierung hämatopoietischer Zellen*, in *Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie 2*. 2000, RWTH Aachen: Jülich.
129. Jelinek, N., *Kokultivierung hämatopoietischer Zellen - Kokultur im Festbettreaktor*, in *Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie 2*. 2001, RWTH Aachen: Jülich.
130. Kokerbeck, D., *Untersuchungen zum Einfluss stroma-sekretierter Faktoren auf die Proliferation hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen - Konditionierungsparameter und Identifizierung von Proteinen -*, in *Institut für Biotechnologie 2, FZ Jülich*. 2002, FH Aachen, Abteilung Jülich: Jülich.
131. Scheffold, A., Thiel, A., Radbruch, A., *Immunomagnetische Zellsortierung - erweitertes Spektrum durch neue Parameter*. Biospektrum, 1996. **5**: p. 30-33.
132. Eaves, C.a.L., K., *Atlas of human hematopoietic colonies*. Vol. 1. 1995, Vancouver, BC: StemCell technologies Inc. 41.
133. Hogge, D.E., et al., *Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3765-73.
134. al-Rubeai, M. and A.N. Emery, *Flow cytometry in animal culture*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(5): p. 572-4, 577-9.
135. Keeney, *Stem cell enumeration by flow cytometry: current concepts and recent developments in CD34+ cell enumeration*. Cytotherapy, 2000. **2**(5): p. 395-402.

136. Patestos, N.P., M. Fauth, and B.J. Radola, *Fast and sensitive protein staining with colloidal acid violet 17 following isoelectric focusing in carrier ampholyte generated and immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 1988. **9**(9): p. 488-96.
137. Srour, E.F., et al., *Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells: are we there yet? [see comments]*. J Hematother, 1999. **8**(2): p. 93-102.
138. Loeuillet, C., et al., *Distinct hematopoietic support by two human stromal cell lines*. Exp Hematol, 2001. **29**(6): p. 736-45.
139. Shih, C.C., 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. 1957-66.
140. Koller, M.R., et al., *Direct contact between CD34⁺lin⁻ cells and stroma induces a soluble activity that specifically increases primitive hematopoietic cell production*. Exp Hematol, 1999. **27**(4): p. 734-41.
141. Miller, J.S., V. McCullar, and C.M. Verfaillie, *Ex vivo culture of CD34⁺/Lin⁻/DR⁻ cells in stroma-derived soluble factors, interleukin-3, and macrophage inflammatory protein-1alpha maintains not only myeloid but also lymphoid progenitors in a novel switch culture assay*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4516-22.
142. Breems, D.A., E.A. Blokland, and R.E. Ploemacher, *Stroma-conditioned media improve expansion of human primitive hematopoietic stem cells and progenitor cells*. Leukemia, 1997. **11**(1): p. 142-50.
143. Itoh, K., et al., *Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow*. Exp Hematol, 1989. **17**(2): p. 145-53.
144. Nishi, N., et al., *In vitro long-term culture of human primitive hematopoietic cells supported by murine stromal cell line MS-5*. Leukemia, 1997. **11 Suppl 3**: p. 468-73.
145. Kobari, L., et al., *Hematopoietic-promoting activity of the murine stromal cell line MS-5 is not related to the expression of the major hematopoietic cytokines*. J Cell Physiol, 1995. **163**(2): p. 295-304.
146. Roy, V. and C.M. Verfaillie, *Soluble factor(s) produced by adult bone marrow stroma inhibit in vitro proliferation and differentiation of fetal liver BFU-E by inducing apoptosis*. J Clin Invest, 1997. **100**(4): p. 912-20.
147. Han, W., Q. Ye, and M.A. Moore, *A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells*. Blood, 2000. **95**(5): p. 1616-25.
148. Tordjman, R., et al., *Neuropilin-1 is expressed on bone marrow stromal cells: a novel interaction with hematopoietic cells?* Blood, 1999. **94**(7): p. 2301-9.
149. Guerriero, A., et al., *Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3444-55.

150. Rougier, F., F. Dupuis, and Y. Denizot, *Human bone marrow fibroblasts--an overview of their characterization, proliferation and inflammatory mediator production*. Hematol Cell Ther, 1996. **38**(3): p. 241-6.
151. Rougier, F., et al., *IL-6 and IL-8 production by human bone marrow stromal cells*. Cytokine, 1998. **10**(2): p. 93-7.
152. Tulin, E.E., et al., *Genetic approach and phenotype-based complementation screening for identification of stroma cell-derived proteins involved in cell proliferation*. Exp Cell Res, 2002. **272**(1): p. 23-31.
153. Dormady, S.P., et al., *Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment*. J Hematother Stem Cell Res, 2001. **10**(1): p. 125-40.
154. Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur*. 2000, Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag.
155. Mobest, D., R. Mertelsmann, and R. Henschler, *Serum-free ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic progenitor cells*. Biotechnol Bioeng, 1998. **60**(3): p. 341-7.
156. Sutherland, H.J., et al., *Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro*. Blood, 1989. **74**(5): p. 1563-70.
157. Lemoine, F.M., et al., *Partial characterization of a novel stromal cell-derived pre-B-cell growth factor active on normal and immortalized pre-B cells*. Exp Hematol, 1988. **16**(8): p. 718-26.
158. Oostendorp, R.A., et al., *Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1183-9.
159. Majumdar, M.K., et al., *Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells*. J Cell Physiol, 1998. **176**(1): p. 57-66.
160. Gupta, P., et al., *Human CD34(+) bone marrow cells regulate stromal production of interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor and increase the colony-stimulating activity of stroma*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3724-33.
161. Hermouet, S., I. Corre, and E. Lippert, *Interleukin-8 and other agonists of Gi2 proteins: autocrine paracrine growth factors for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factors*. Leuk Lymphoma, 2000. **38**(1-2): p. 39-48.
162. Zandstra, P.W., et al., *Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4698-703.

163. Kohler, T., et al., *Defining optimum conditions for the ex vivo expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor enrichment, interference with feeder layers, early-acting cytokines and agitation of culture vessels*. Stem Cells, 1999. **17**(1): p. 19-24.
164. Querol, S., et al., *Direct immunomagnetic method for CD34+ cell selection from cryopreserved cord blood grafts for ex vivo expansion protocols*. Transfusion, 2000. **40**(6): p. 625-31.
165. Ladd, A.C., et al., *Orderly process of sequential cytokine stimulation is required for activation and maximal proliferation of primitive human bone marrow CD34+ hematopoietic progenitor cells residing in G0*. Blood, 1997. **90**(2): p. 658-68.
166. Ramsfjell, V., et al., *Distinct requirements for optimal growth and In vitro expansion of human CD34(+)CD38(-) bone marrow long-term culture-initiating cells (LTC-IC), extended LTC-IC, and murine in vivo long-term reconstituting stem cells*. Blood, 1999. **94**(12): p. 4093-102.
167. Seow, T.K., et al., *Two-dimensional electrophoresis map of the human hepatocellular carcinoma cell line, HCC-M, and identification of the separated proteins by mass spectrometry*. Electrophoresis, 2000. **21**(9): p. 1787-813. [pii].
168. Seow, T.K., et al., *Proteomic investigation of metabolic shift in mammalian cell culture*. Biotechnol Prog, 2001. **17**(6): p. 1137-44.
169. Balland, A., et al., *Characterization of the isoforms of PIXY321, a granulocyte-macrophage-colony stimulating factor-interleukin-3 fusion protein, separated by preparative isoelectric focusing on immobilized pH gradients*. J Chromatogr A, 1999. **846**(1-2): p. 143-56.
170. Schratzenholz, A.H., *Methoden der Proteomforschung*. 2001.
171. Alberts, B., Bray, D, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Watson, JD, *Molecular biology of the cell*. 3rd ed, ed. I. Garland Publishing. 1994, New York & London.
172. Thommes, J., et al., *The influence of dissolved oxygen tension on the metabolic activity of an immobilized hybridoma population*. Cytotechnology, 1993. **13**(1): p. 29-39.
173. Choe, L., Lee, KH, *A comparison of three commercially available isoelectric focusing units for proteome analysis: The Multiphor, the IPGphor and the Protean IEF cell*. Electrophoresis, 2000. **21**: p. 993-1000.
174. Yamada, H., et al., *Extracellular superoxide dismutase and glomerular mesangial cells: its production and regulation*. FEBS Lett, 2002. **519**(1-3): p. 77-81.
175. Mondola, P., et al., *Presence of CuZn superoxide dismutase in human serum lipoproteins*. FEBS Lett, 2000. **467**(1): p. 57-60.

176. Finkel, T., *Oxygen radicals and signaling*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 248-53.
177. Sattler, M., et al., *Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species*. Blood, 1999. **93**(9): p. 2928-35.
178. Adachi, T., et al., *Heparin-stimulated expression of extracellular-superoxide dismutase in human fibroblasts*. Atherosclerosis, 2001. **159**(2): p. 307-12.
179. Ishido, K. and E. Kominami, *Gene regulation and extracellular functions of pro-cathepsin L*. Biol Chem, 1998. **379**(2): p. 131-5.
180. Dilakyan, E.A., et al., *Expression of cathepsin L and its endogenous inhibitors in immortal and transformed fibroblasts*. Clin Chim Acta, 2001. **309**(1): p. 37-43.
181. Nakagawa, T., et al., *Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus*. Science, 1998. **280**(5362): p. 450-3.
182. Kagedal, K., U. Johansson, and K. Ollinger, *The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress*. Faseb J, 2001. **15**(9): p. 1592-4.
183. Rabinovich, G.A., *Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy*. Cell Death Differ, 1999. **6**(8): p. 711-21.
184. Rabinovich, G.A., et al., *Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?* Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 313-20.
185. Rabinovich, G.A., N. Rubinstein, and L. Fainboim, *Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(5): p. 741-52.
186. Wells, V. and L. Mallucci, *Molecular expression of the negative growth factor murine beta-galactoside binding protein (mGBP)*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1121**(3): p. 239-44.
187. Frimberger, A.E., et al., *The fleet feet of haematopoietic stem cells: rapid motility, interaction and proteopodia*. Br J Haematol, 2001. **112**(3): p. 644-54.
188. Holloway, W., et al., *Key adhesion molecules are present on long podia extended by hematopoietic cells*. Cytometry, 1999. **37**(3): p. 171-7.
189. Kawada, H., et al., *Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system*. Exp Hematol, 1999. **27**(5): p. 904-15.
190. Bennaceur-Griscelli, A., et al., *Murine stromal cells counteract the loss of long-term culture-initiating cell potential induced by cytokines in CD34(+)CD38(low/neg) human bone marrow cells*. Blood, 1999. **94**(2): p. 529-38.
191. Kanai, M., et al., *Stromal cell-dependent ex vivo expansion of human cord blood progenitors and augmentation of transplantable stem cell activity*. Bone Marrow

- Transplant, 2000. **26**(8): p. 837-44.
192. Breems, D.A., et al., *Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells*. Blood, 1998. **91**(1): p. 111-7.
193. Kerre, T.C., et al., *Adapted NOD/SCID model supports development of phenotypically and functionally mature T cells from human umbilical cord blood CD34(+) cells*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1620-6.
194. Papayannopoulou, T., et al., *Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2403-11.
195. Kollet, O., et al., *Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-)/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3283-91.
196. Wilpshaar, J., et al., *Similar repopulating capacity of mitotically active and resting umbilical cord blood CD34(+) cells in NOD/SCID mice*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2100-7.
197. Cashman, J., et al., *Stromal-derived factor 1 inhibits the cycling of very primitive human hematopoietic cells in vitro and in NOD/SCID mice*. Blood, 2002. **99**(3): p. 792-9.
198. Glimm, H., et al., *Ex vivo treatment of proliferating human cord blood stem cells with stroma-derived factor-1 enhances their ability to engraft NOD/SCID mice*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3454-7.
199. Jetmore, A., et al., *Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34(+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1585-93.
200. Plett, P.A., et al., *Treatment of circulating CD34(+) cells with SDF-1alpha or anti-CXCR4 antibody enhances migration and NOD/SCID repopulating potential*. Exp Hematol, 2002. **30**(9): p. 1061-9.
201. Kollet, O., et al., *Human CD34(+)CXCR4(-) sorted cells harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2778-86.
202. Laluppa, J.A., et al., *Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells*. J Biomed Mater Res, 1997. **36**(3): p. 347-59.
203. Minuth, W.W., et al., *Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering*. J Biomater Sci Polym Ed, 2000. **11**(5): p. 495-522.

204. Glowacki, J., S. Mizuno, and J.S. Greenberger, *Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture*. Cell Transplant, 1998. **7**(3): p. 319-26.
205. Horner, M., et al., *Transport in a grooved perfusion flat-bed bioreactor for cell therapy applications*. Biotechnol Prog, 1998. **14**(5): p. 689-98.
206. Koller, M.R., et al., *Expansion of primitive human hematopoietic progenitors in a perfusion bioreactor system with IL-3, IL-6, and stem cell factor*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(3): p. 358-63.
207. Mandalam, R.K. and A.K. Smith, *Ex vivo expansion of bone marrow and cord blood cells to produce stem and progenitor cells for hematopoietic reconstitution*. Mil Med, 2002. **167**(2 Suppl): p. 78-81.

ANHANG A SPEKTREN DER MITTELS MALDI-TOF MS IDENTIFIZIERTEN PROTEINE

Darstellung der MS Spektren identifizierter Proteine

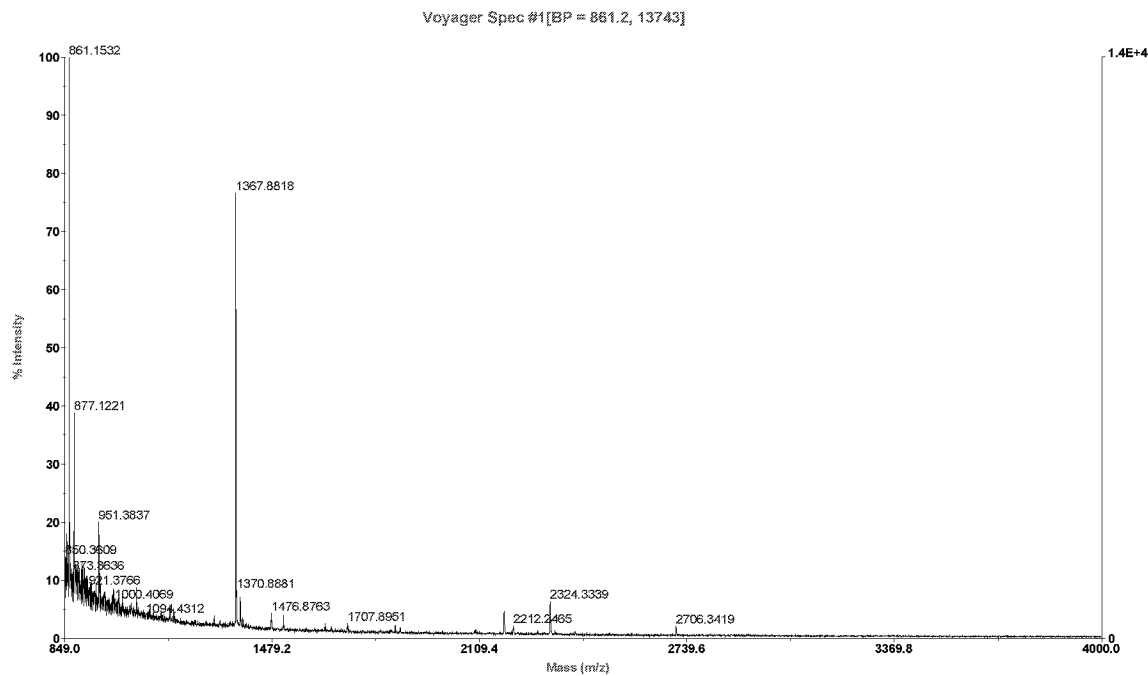


Abbildung A–1: Cu/Zn-SOD

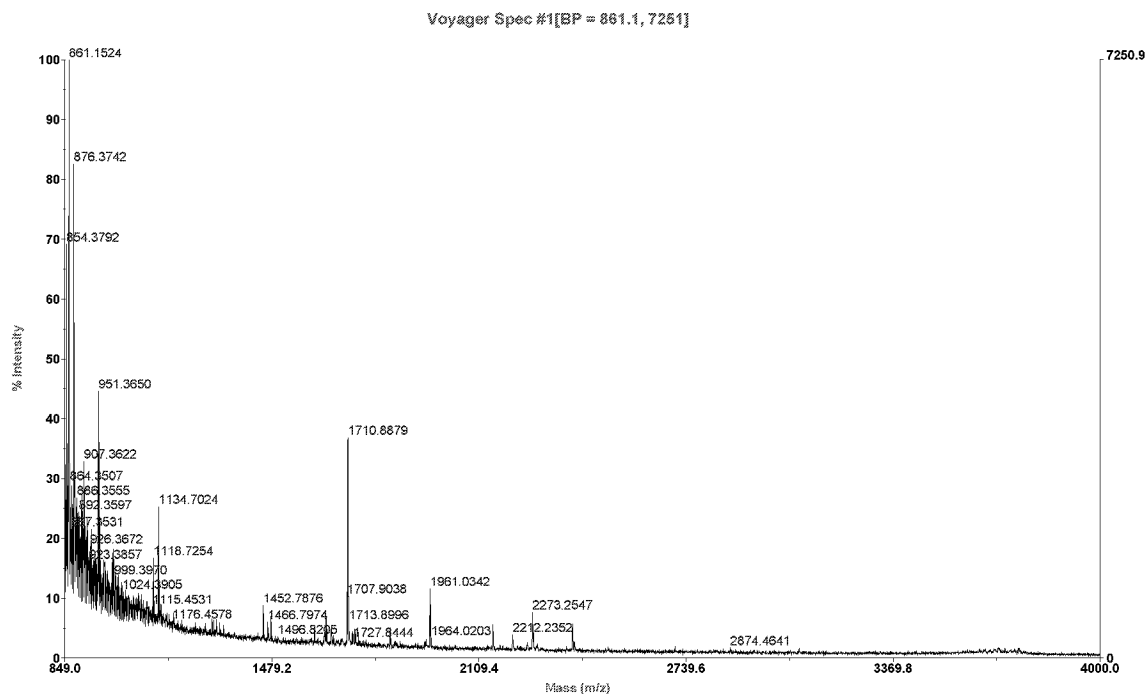


Abbildung A–2: Cathepsin-L

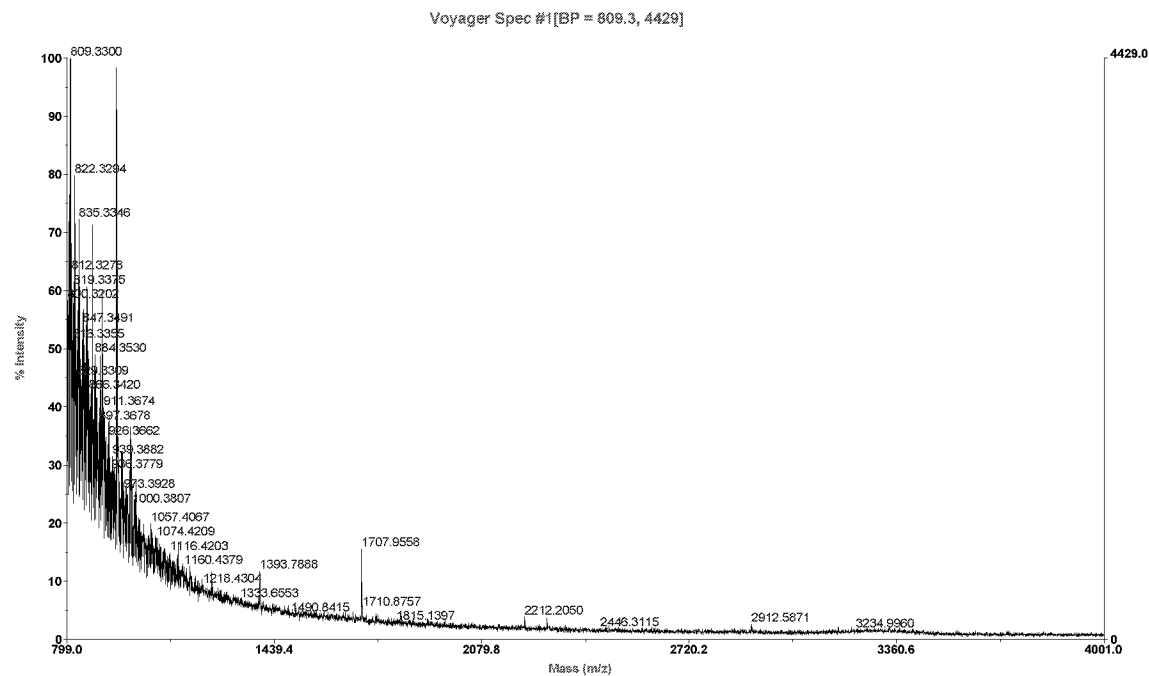


Abbildung A–3: Malatdehydrogenase

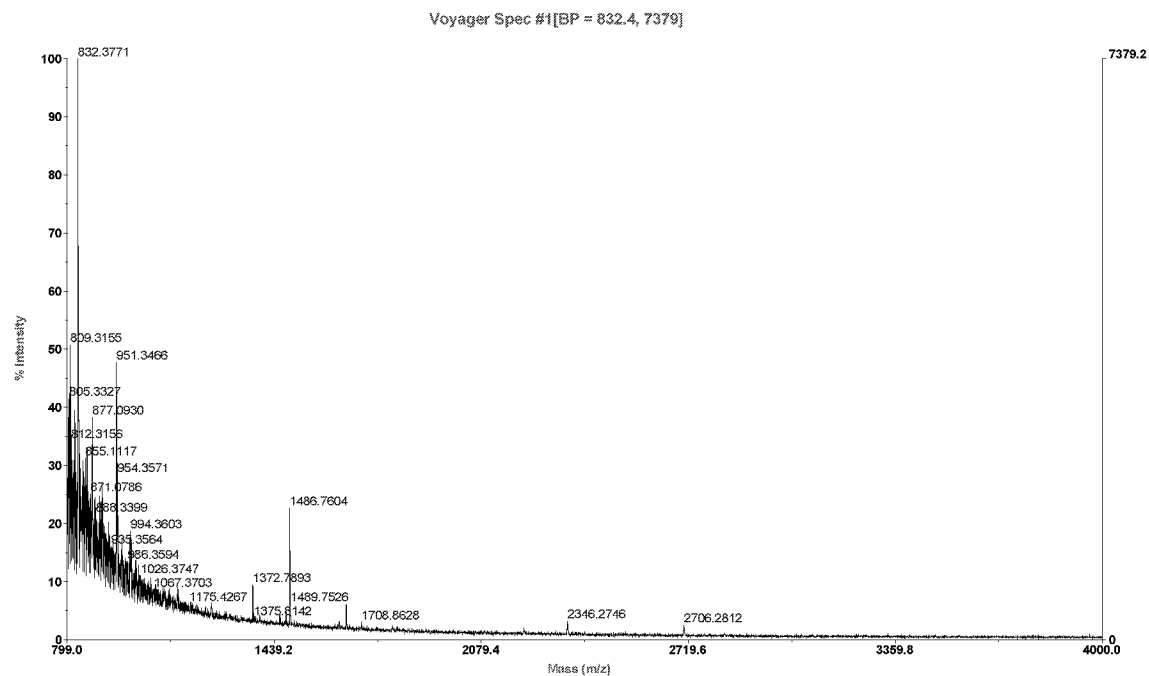


Abbildung A–4: Galectin-1

ANHANG B TECHNISCHE DATEN DER BIOREAKTOREN

Der Mini-Membranreaktor

Tabelle B-1: Kenngrößen des optimierten Mini-Membranreaktors

Parameter	
Reaktormaterial	Edelstahl
Membranmaterial	PE
Membranfläche	2,5cm ²
Membrandicke	10µm
Porengröße	1,0µm
Porendichte	2,0E+07 Poren/cm ²
Gesamtvolumen	3,6mL
Medium	X-Vivo 10

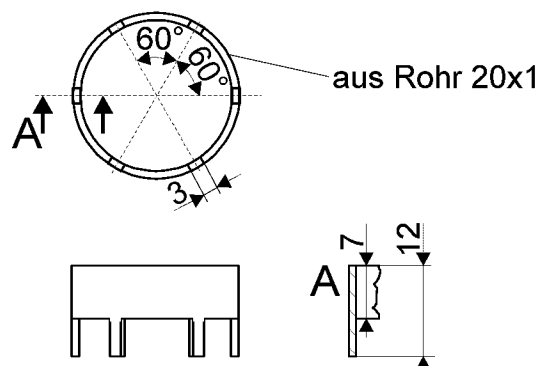


Abbildung B-1: Einsatz des Mini-Membranreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMoTi 17 12 12 2, Werkstoffnummer: 1.4571)

Der Miniatur-Schlaufenreaktor

Tabelle B-2: Kenngrößen des Miniatur-Schlaufenreaktors

Parameter	
Reaktormaterial	Edelstahl
Trägermaterial	Rinderkollagen

Trägerschüttung	1mL
Trägergröße (Durchmesser)	400-700µm
Porengröße	40-50µm
Medienvolumen	4,0mL
Medium	IMDM + 12,5%FCS + 12,5% HS

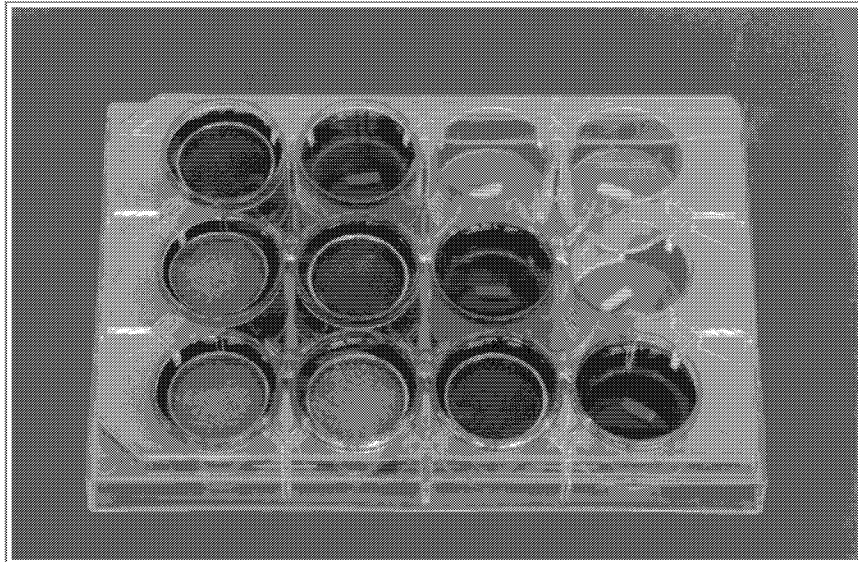


Abbildung B-2: Aufbau des Miniatur-Schlaufenreaktors

Der Membranreaktor

Tabelle B-3: Kenngrößen des Membranreaktors

Parameter	
Reaktormaterial	PC oder PSU
Membraneigenschaften	s. Tabelle B-1
Membranfläche	215cm ²
Gesamtvolumen	50mL
Medium	X-Vivo 10

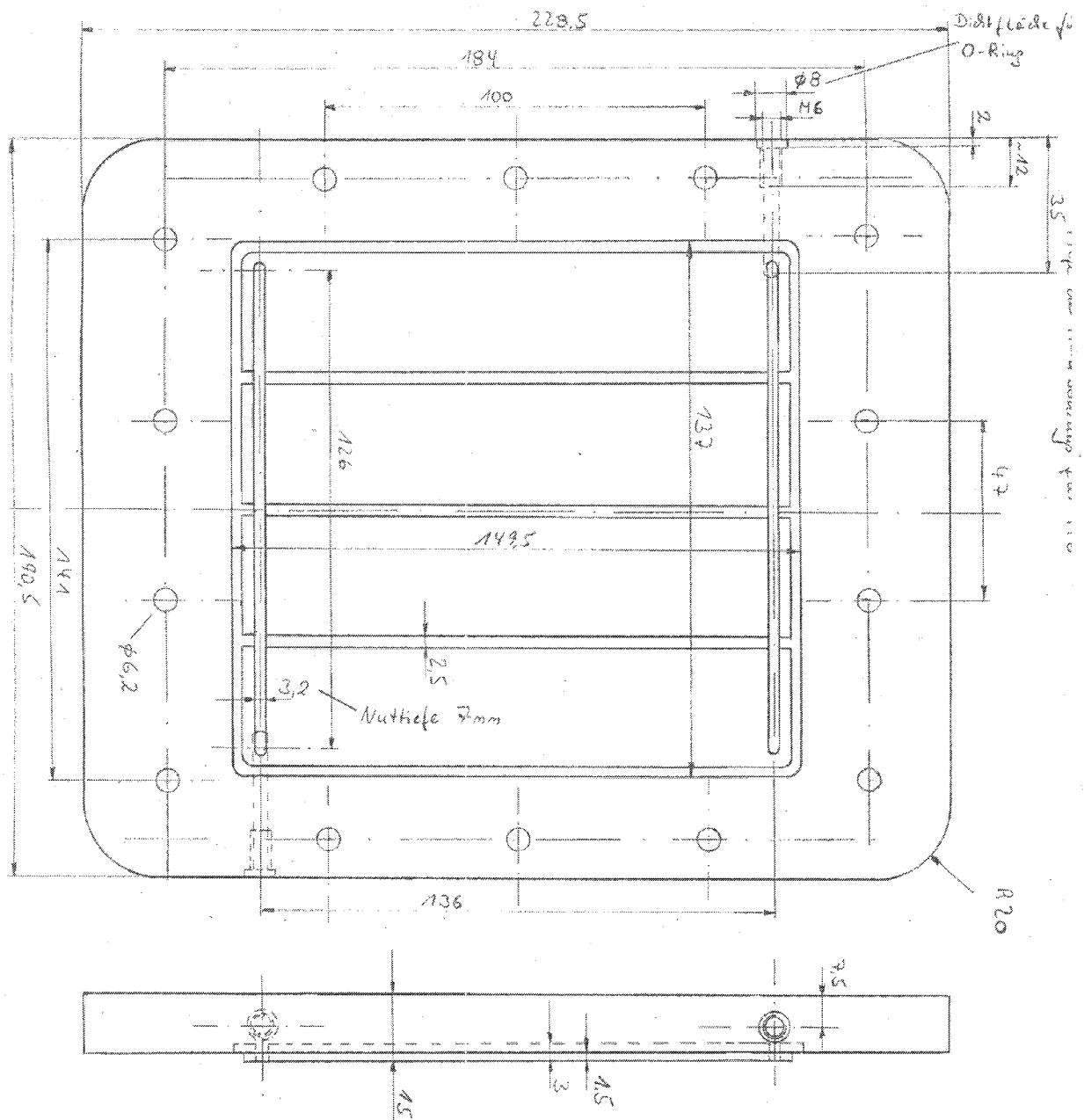


Abbildung B–3: Obere Platte des Membran-Bioreaktors (Werkstoff PC oder PSU)

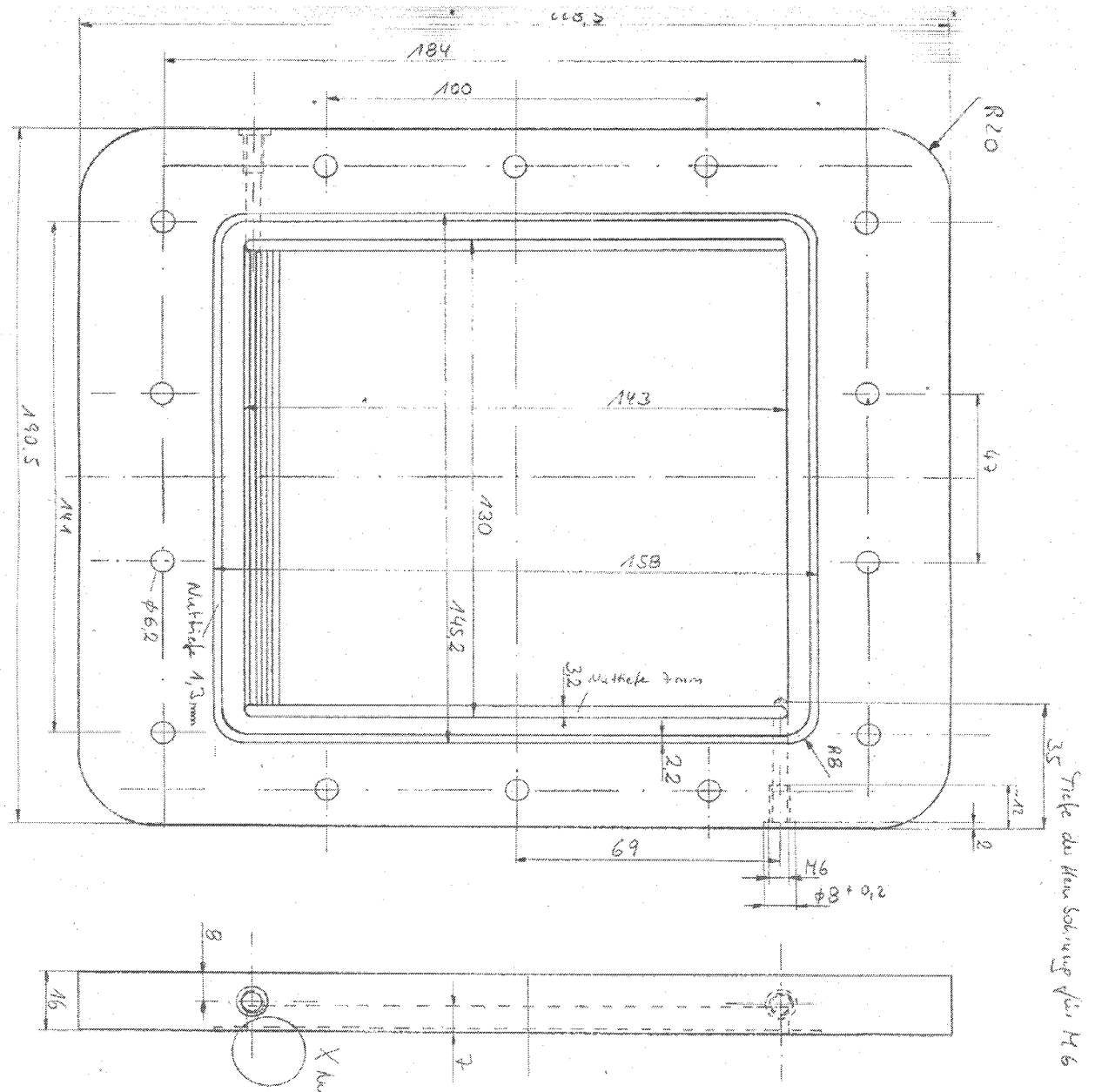
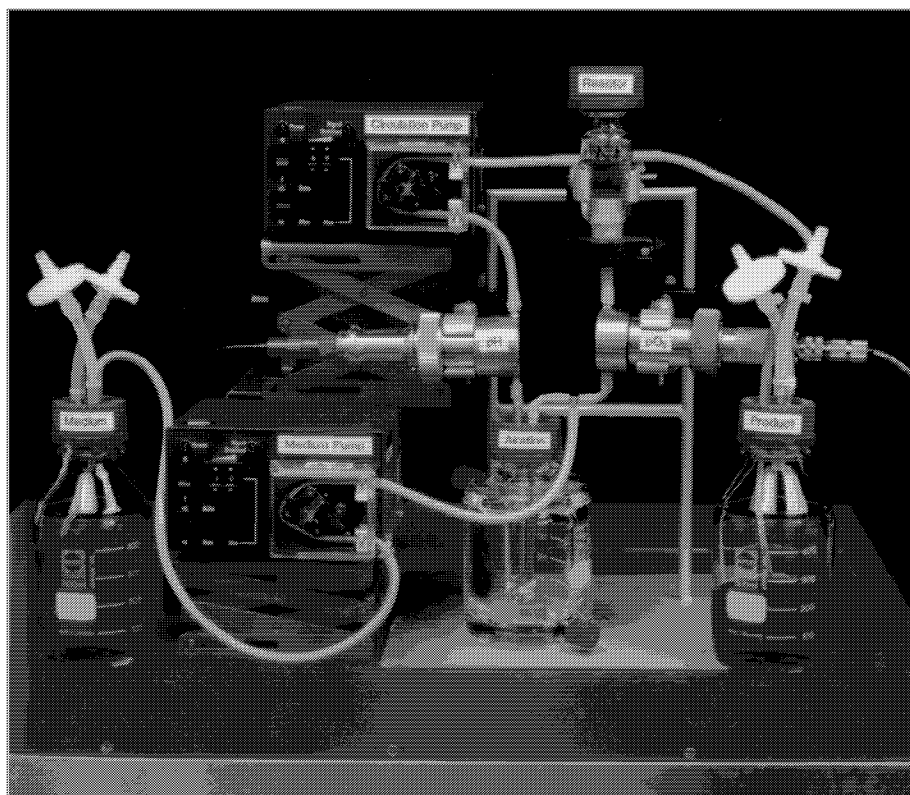


Abbildung B-4: Untere Platte des Membran-Bioreaktors (Werkstoff PC oder PSU)

Der Festbettreaktor**Tabelle B-4:** Kenngrößen des Festbettreaktors

Parameter	
Reaktormaterial	Glas
Trägereigenschaften	s. Tabelle B-2
Trägerschüttung	10mL
Gesamtvolumen	28mL
Medium	IMDM + 12,5mLFCS + 12,5mLHS

**Abbildung B-5:** Aufbau des Festbettreaktor

ANHANG C STANDBETRIEBSANWEISUNG DES MEMBRAN-REAKTORS

Ziel

Diese Standardbetriebsanweisung legt den Aufbau, den betrieb sowie die Sterilisation und Reinigung des perfundierten Membran-Bioreaktors zur Kultivierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut fest.

Geltungsbereich

Dieser Abschnitt muss an den jeweiligen Betrieb angepasst ausgefüllt werden.

Verantwortlichkeiten

Dieser Abschnitt muss an den jeweiligen Betrieb angepasst ausgefüllt werden.

Allgemeines

Baugruppen des Bioreaktors

- Reaktor (bestehend aus Reaktorgehäuse aus PC oder PSU, Dichtring und Membran)
- Zulaufpumpe
- Ablaufpumpe
- Medienvorlageflasche mit Verbindungsschlauch
- Medienablaufflasche mit Verbindungsschlauch
- Inokulumsflasche Stroma mit Verbindungsschlauch
- Inokulumsflasche HSPC mit Verbindungsschlauch
- Begasungsgefäß mit Sterilfilter und Verbindungsschlauch
- Gasversorgungseinheit (bestehend aus Steuereinheit für die Gasmischung, Massendurchflussventile für N₂, CO₂ und Druckluft, Gasflaschen für N₂ und CO₂, Druckluftkompressor)

Tabelle C-1: Verwendete Bauteile

Bauteil	Hersteller
Reaktorgehäuse	Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich
pO ₂ -Sonde	PreSens Presicion Sensing GmbH, Regensburg
pO ₂ - Verstärker	PreSens Presicion Sensing GmbH, Re-

	gensburg
Glasfaserkabel	PreSens Presicion Sensing GmbH, Regensburg
Schlauchpumpen	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Massendurchflussventile	Brooks Instrument, Veenendaal, NL
Steuereinheit für Massendurchflussventile	Brooks Instrument, Veenendaal, NL (?)
Druckluftkompressor	JUN-AIR Deutschland, Ahrensburg
Glasflaschen, Deckel und Dichtungen	Schott Glaswerke, Mainz
Glasflaschen Einsätze	Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich
Sterilfilter	Gelman Sciences, Dreieich
Schlauchverbinder	Carl Roth, Karlsruhe
Pumpenschläuche	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Silikonschlauch	BIW Isolierstoffe, Ennepetal
Teflonschlauch	Bohlender, Lauda
Kabelbinder	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle C-2: Verwendete Materialien

Material	Hersteller
X-Vivo 10	Bio Whittaker, Maryland, USA
FL	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
IL-3	Forschungszentrum Jülich, Jülich
SCF	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
TPO	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA

Detaillierte Arbeitsanweisung

Alle Arbeiten sind nach den geltenden Vorschriften in einer gentechnischen Anlage Sicherheitsstufe 1 durchzuführen. Bei Arbeiten unter der Sterilbank sind Kittel und Handschuhe zu tragen. Die Bedienung von Gasflaschen, Druckluftkompressor, Massendurchflussventilen, Steuereinheit für die Gasmischung, pO₂-Verstärker, Zulaufpumpe und Ablaufpumpe erfolgt nach den Anleitungen der Hersteller.

Montage und Aufbau des Bioreaktors

Vor Montage des Bioreaktors sind alle Bauteile auf Sauberkeit zu prüfen und eventuell mit 70% Ethanol rückstandsfrei zu säubern. Die Platten des Reaktors sind auf das Vorhan-

densein von Spannungsrissen und Materialtrübungen zu überprüfen. Die Membran ist auf das Vorhandensein von Rissen und/oder Löchern zu prüfen.

Der Dichtring wird in den dafür vorgesehenen Nuten der oberen Reaktorplatte (= HSPC-Kammer) platziert. Die passgenau ausgeschnittene Membran wird glatt auf den Dichtring gelegt. Darauf wird die untere Reaktorplatte platziert und über die 16 Durchgangsbohrungen verschraubt. Vorsicht, Schrauben nicht zu fest anziehen!

Die Sauerstoffsonden sind vor Gebrauch nach Angaben des Herstellers zu kalibrieren.

Der Aufbau des Reaktors erfolgt wie folgt:

- An die obere (HSPC-) Kammer werden je eine Inokulums- und eine Abfallflasche über Silikonschläuche angeschlossen.
- An die untere Kammer wird ein Medienkreislauf angeschlossen. Darin eingebunden sind das Begasungsgefäß (knapp vor dem Medieneinlass in den Reaktor, gasdurchlässiger Silikonschlauch), eine Stroma-Inokulumsflasche (zwischen Begasung und Reaktor), eine O₂-Sonde (unmittelbar vor dem Reaktor), eine weitere Sonde (unmittelbar hinter dem Reaktor), Medienz- und Ablaufschläuche mit entsprechenden Gefäßen, eine Schlauchpumpe (vor dem Begasungsgefäß, mittleres Lumen), und eine weitere Schlauchpumpe für den Medienzustrom (dünnlumiger Schlauch). Alle nicht näher bezeichneten Schlauchverbindungen werden mit Marpreneschläuchen ausgeführt.
- Die Schlauchverbindungen sind mit Kabelbindern zu sichern.

Sterilisation

- Vor der Sterilisation ist das Reaktorsystem vollständig zu montieren.
- Alle Gefäße und die Reaktorkammer sind mit etwas Wasser zu befüllen.
- Ein Druckausgleich der Gefäße ist durch Sterilfilter zu gewährleisten.
- Sterilfilter und Sonden sind mit Alufolie abzudecken.
- Die Befestigungsschrauben des Reaktors und die Gefäßdeckel sind leicht anzudrehen.
- Es ist darauf zu achten, dass die Schläuche nicht blockiert sind und sämtliche Schlauchklemmen entfernt wurden.
- Die Sterilisation erfolgt bei 121°C und 1,2 bar für 60 Minuten.

Inokulieren und Anfahren des Bioreaktors

- Deckel und Schrauben sind nach dem Autoklavieren und erfolgter Abkühlung des Systems anzudrehen.

- Aus dem Reaktor ist sämtliches Wasser zu entfernen.
- Unter der Sterilbank ist die Medienvorlageflasche mit 300mL Cytokin-haltigem X-Vivo 10 zu befüllen.
- Die Schlauchverbindungen der HSPC-Kammer sind durch Klemmen zu verschließen.
- Die Kammer und der Medienkreislauf sind mit Medium vollständig zu befüllen.
- Die leere Stroma-Inokulumsflasche ist steril durch eine Flasche, welche die gewünschte Stromazellmenge in 25mL Medium enthält, auszutauschen.
- Bis auf die Medienvorlage- und Abfallflaschen werden sämtliche Komponenten im Wärmeschrank platziert.
- Das Inokulieren erfolgt durch Einlaufen der Zellsuspension von unten in die aufrecht gestellte Kammer.
- Nach erfolgtem Inokulieren sind sämtlich Schlauchverbindungen zu verschließen.
- Die Kammer wird flach auf einem Laborboy platziert, sodass die stromalen Zellen auf der Membran aufliegen und über nacht adhärieren können.
- Die Kammer wird nach erfolgter Anheftung der stromalen Zellen umgedreht, und die HSPC werden in die obere Kammer eingeleitet.
- Ein Begasungsschlauch wird an einen Sterilfilter des Begasungsgefäßes angeschlossen.
- Das Glasfaserkabel wird auf die vor dem Reaktor liegende Sonde geschraubt, und die Begasung wird auf 40% Luftsättigung am Reaktoreingang eingestellt. Nach stabiler Einstellung des Wertes erfolgt die weitere Messung am Reaktorausgang (Messintervall 30 Minuten).
- Die Pumprate des Medienumlaufs wird auf 1mL/min eingestellt, die des Medienzulaufes auf einen Wert, der einem halben Medienwechsel pro Tag entspricht (ca. 0,02mL/min); die entsprechenden Schlauchverbindungen werden geöffnet.
- Der Wärmeschrank ist auf 37°C zu temperieren.

Betrieb des Bioreaktors

Der Betrieb des Bioreaktors erfolgt innerhalb eines Wärmeschrankes. Eine Wanne ist unter dem Reaktor platziert, um eventuell das gesamte Volumen des Reaktors inklusive aller anhängenden Schläuche und Flaschen aufzufangen.

Sämtliche Arbeiten, die ein Öffnen des Systems erfordern, müssen steril unter einer Sterilbank erfolgen.

Während des Betriebes einzuhaltende Parameterbereiche

- p_{O_2} zwischen 40% (Reaktoreingang) und ca. 15% (Reaktorausgang) Luftsättigung; p_{O_2} -Differenz möglichst gering halten
- Temperatur des Reaktors (entsprechend der Temperatur des Wärmeschrankes): 37-38°C
- Vordruck vor dem Massendurchflussventil: 1,5 – 1,7bar
- Medienumlauf nicht über 4mL/min (bzw. zuvor Haftung der stromalen Zellen überprüfen)

Tägliche Wartung

- Optische Kontrolle der Dichtigkeit aller Anschlüsse und Schläuche
- Kontrolle der Pumpenfunktion
- Kontrolle der Medien- und Abfallflasche
- Kontrolle der Temperatur des Wärmeschrankes
- Kontrolle der Lüfterfunktion des Wärmeschrankes
- Ablesen des p_{O_2} -Wertes
- Mindestens 10-minütige Messung des Sauerstoffwertes am Reaktoreingang (Messintervall 2 Minuten)

Steuerung des Medienzulaufs und des Medienablaufs

Der medienzu- und Ablauf wird während des Reaktorbetriebes nicht verändert.

Steuerung der Medienpumprate und Begasung

Die Medienpumprate kann je nach Bedarf zwischen 1,0mL/min und 4,0mL/min eingestellt werden, um hauptsächlich die Versorgung der Zellen zu verbessern. Generell sollte die Begasung des Systems und die Pumprate entsprechend der Sauerstoffmesswerte an Reaktorein- und Ausgang erfolgen. Dabei sind schnelle Umpumpraten (über 4mL/min), hoher Sauerstoffkonzentrationen (über 40% Luftsättigung) und große Differenzen der Sauerstoffwerte zwischen Reaktorein- und Ausgang zu vermeiden.

Abernte der Zellen

Die kultivierten HSPC werden geerntet, indem das gesamte Reaktorvolumen an einer Seite der HSPC-Kammer abgelassen und in eine sterilen Gefäß aufgefangen wird. Es folgt ein Spülschritt mit reichlich sterilem PBS, das ebenfalls separat aufgefangen wird. Anschließend werden ca. 25mL EDTA-Lösung (Cell Dissociation Solution, Sigma) in den Reaktor gefüllt und für 10-12 min. bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird ebenfalls anschlie-

ßend aufgefangen. Somit erhält man drei Zellfraktionen, die separat aufkonzentriert und analysiert werden (Zellzahl, Zellvitalität, FACS-Analytik und biologische Assays).

Sterilisation und Reinigung des Bioreaktors

Nach dem betrieb wird der Reaktor und die angeschlossenen Flaschen erneut wie beschrieben sterilisiert, dann abgebaut und die Einzelteile werden gründlich mit 70% Ethanol gereinigt. Die Membran wird in den biologisch aktiven Abfall entsorgt.

Dokumentation

Die Betriebseinstellung und sämtliche vorgenommenen Veränderungen müssen mit Angabe des Datums und der Uhrzeit schriftlich protokolliert werden. Die Aufzeichnung der Sauerstoffkonzentration erfolgt automatisch und sollte nach Beendigung der Kultivierung auf einem Datenträger gespeichert werden.

ANHANG D HERLEITUNG DES MINDESTSAUERSTOFFBEDARFS

Herleitung des Mindestsauerstoffbedarfs:

Gleichung 1:

$$j_{O_2} = (D/\delta) * (C_{oben} - C_{unten})$$

Gleichung 2:

$$q_{O_2} = j_{O_2} * F_{Loch} \leftrightarrow j_{O_2} = q_{O_2} / F_{Loch}$$

Gleichung 3:

$$C_{unten} = \{(q_{O_2} * \delta) / (F_{Loch} * D)\} + C_{oben}$$

→ 2,036E-03 kg/m³

→ 30,4% Luftsättigung

In die Gleichungen einzusetzende Werte:

D: 3,34E-09m²/s

δ: Membran + Stroma = 1,5E-05m

Membranfläche: 215cm²

Lochdurchmesser: 1μm

Lochfläche: 17cm² (1,7E-03m²)

5% Luftsättigung oben: 3,35E-04kg/m³ Sauerstoff

q_{O₂}: 2,3E-18 [kg/Zelle*s] (BHK)

Zellmenge: 2,8E+08

Getroffene Annahmen:

- Da für den Sauerstoffverbrauch der HSPC keine Daten vorliegen, wurde alternativ der Verbrauch der Zelllinie BHK zugrundegelegt.
- Der pO₂ im HSPC-Kompartiment sollte analog der Verhältnisse mindestens 5% betragen. Die Versorgung war rein diffusiv.

- Der Sauerstoffverbrauch der stromalen Zellen wurde vernachlässigt. Statt dessen wurde der pO_2 am Reaktorausgang gemessen und zur manuellen Regelung der Begasung herangezogen.
- Es wurde ferner angenommen, dass die Poren der Membran geöffnet und dadurch vollständig Gas-durchlässig waren.

ANHANG E HERSTELLERNACHWEISE

Herstellernachweis der verwendeten Chemikalien und Geräte:

Tabelle E-1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Biosolve B.V., Valkanswaard, NL
Albumin, human	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Casyton	Schärfe System, Reutlingen
Cell dissociation solution	Sigma
CHAPS	Amersham Biosciences, Freiburg
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
α -Cyano-2-hydroxymethylsäure	Merck, Darmstadt
Demecolcine Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
D-Glukose	SIGMA, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Fluka Chemie, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Amersham Biosciences, Freiburg
Dodecylsulfat Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Erythrosin B	Serva, Heidelberg
Essigsäure (96%)	Riedel-de-Haen, Seelze
Ethanol	Werner Hofman, Düsseldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
FACS-Lysing solution	Beckman Coulter,
FACS-Puffer	BD PharMingen, Heidelberg
Ficoll	Biochrom, Berlin
Formaldehyd (37%)	Merk, Darmstadt
Geneticin	Life Technologies, Karlsruhe
Gentamicin	Life Technologies, Karlsruhe
Glycerin (87%)	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Amersham Biosciences, Freiburg
Hygromycin B	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Iodacetamid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Kaliumchlorid	Fluka Chemie, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie, Deisenhofen
Kristallviolett	Serva, Heidelberg
L-Glutamat	Serva, Heidelberg
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
L-Laktat	Fluka, Buchs, CH
Methanol	Merck, Darmstadt
MethoCult	CellSystems, St. Katharinen
Natriumbenzoat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Biochrom, Berlin
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
N-Glykosidase F	BioLabs, Frankfurt a.M.
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Fluka, Buchs, CH
Transferrin, human	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypsin (Sequencing Grade Modified)	Promega, Mannheim
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Violet 17	Serva, Heidelberg

Tabelle E-2: Cytokine

Cytokin	Hersteller
FL	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
IL-3	Forschungszentrum Jülich, Jülich
SCF	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
TPO	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA

Tabelle E-3: Antikörper

Antikörper	Hersteller
α -hu-CD19 PE	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD34 PE	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD45 FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CXCR4 PE	BD PharMingen, Heidelberg
α -mouse-IgG1 β FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -mouse-IgG β PE	BD PharMingen, Heidelberg

Tabelle E-4: Zellkulturmedien und Seren

Bezeichnung	Hersteller
Iscove's Modified Dulbecco's Medium	Life Technologies, Karlsruhe
MC-Medium (MethoCult GF H 4434)	CellSystems, St. Katharinen
X-Vivo 10	BioWhittaker, Taufkirchen
proCHO4-CDM	BioWhittaker, Taufkirchen
SMIF 6	Life Technologies, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Karlsruhe
Pferdeserum (HS)	Boehringer Mannheim, Mannheim

Tabelle E-5: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Deckel für Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Deckeldichtungen für Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Druckluftkompressor	JUN-AIR Deutschland, Ahrensburg
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresekammer 1D	Invitrogen, Karlsruhe
Elektrophoresekammer 2D	Amersham Biosciences, Freiburg
Einfrierbox für Cryoröhrchen	Nalgene, Wiebaden
Einmalsterilfilter	Pall Deutschland, Dreieich
Einsätze für Deckel und Glasflaschen	Forschungszentrum Jülich, Jülich

Finn-Pipetten	Labsystems, Helsinki, Finnland
Fluorometer, Wallac Victor ²	PerkinElmer Life Sciences, Bad Wildbach
Gammacell 40 Bestrahlungsanlage	Gammaster B.V., Ede, NL
Gewebekulturflaschen	Greiner, Solingen
Gewebekulturplatten	BD, Heidelberg
Gewebekulturschalen	Greiner, Solingen
Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Glukose Analysator, Ebio compact	Eppendorf, Hamburg
Glutamin/Glutamat Analysator	YSI, Yellow Springs, OH, USA
IEF-Apparaturen	Amersham Biosciences, Freiburg
Invertmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Kabelbinder	Carl Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Düren
Laborwaagen	Sartorius, Göttingen
Laktat Analysator	YSI, Yellow Springs, OH, USA
Laminar-Flow Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Magnetic Cell Separator, VarioMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührantrieb	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Magnetrührstab	neoLab Migge, Heidelberg
MALDI-TOF MS	Applied Biosystems, Weiterstadt
Massendurchflussventile	Brooks Instrument, Veenendaal, NL
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Membranreaktor	Forschungszentrum Jülich, Jülich
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
Mikroträger aus Collagen	Cellex Biosciences, Minneapolis, MN, USA
Mikroträger aus Glas	Schott Glaswerke, Mainz
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wiesbaden
Osmometer, Osmomat O 30	Gonotec, Berlin
Partikelzählgerät, CASY1	Schärfe System, Reutlingen
pH-Meter	Metrohm, Filderstadt
Pipettenspitzen	Greiner, Solingen
pO ₂ -Sonde	PreSens Precision Sensing, Regensburg
pO ₂ -Kabel	PreSens Precision Sensing, Regensburg
pO ₂ -Verstärker	PreSens Precision Sensing, Regensburg
Pumpenschläuche, Marprene™	Watson-Marlow, Rommerskirchen

Reaktionsgefäße (Eppis)	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlagen, RO-80 und Milli-Q	Millipore, Eschborn
Scanner	Hewlett-Packard, Böblingen
Schlauchpumpen	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Schlauchverbinder	Carl Roth, Karlsruhe
Schüttler	Janke & Kunkel, Staufen
Silikonschlauch	BIW Isolierstoffe, Ennepetal
Steuereinheit für Massendurchflussventile	Brooks Instrument, Veenendaal, NL
Stickstofftank	Messer Griesheim, Krefeld
Tischzentrifuge, Biofuge B	Heraeus Instruments, Hanau
Tischzentrifuge	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
Teflonschlauch	Bohlender, Lauda
Transwell Insert und Gewebekulturplatte	Becton Dickinson, Heidelberg
Vivaspin (Filtrationsmodul)	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Solingen
ZipTic _{C18} -Pipettenspitzen	Millipore, Eschborn

Tabelle E-6: Sonstiges

Bezeichnung	Hersteller
MACS-CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-Trennsäulen (RS ⁺ /VS ⁺)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
BCA-Protein-Assay Kit	Pierce, Bonn
Protein-MW-Standard (212-2/3kDa)	BioLabs, Frankfurt a.M.
Protein-MW-Standard (250-4kDa)	Invitrogen, Karlsruhe
Sequazyme Peptide Mass Standards Kit	PerSepive Biosystems
SilverQuest Silver Staining Kit	Invitrogen, Karlsruhe

DANKSAGUNG

Mein erster und herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. Wandrey für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, der keine Wünsche offen ließ.

Herrn Prof. Herzog möchte ich vielmals für die Übernahme des Co-Referates und sein Interesse an meiner Forschungsarbeit danken.

Herrn Dr. Thomas Noll möchte ich sehr herzlich danken für seine beständige Bereitschaft, wissenschaftliche Herausforderungen zu diskutieren. Die Zusammenarbeit hat mir viel gegeben. ¡Muchas gracias, hombre!

Ohne die hervorragende Unterstützung durch die Werkstätten und technischen Betrieb des FZ Jülich wäre diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen. Herrn Ruhrig und Herrn Milz möchte ich ganz besonders herzlich für ihren technischen Beistand und die vielen guten Ideen danken.

Auch Frau Cornelia Herfurth möchte ich danken. Conny, Du weißt, wofür...

Mein Dank gebührt natürlich ebenfalls Frau Pam Veggian und Frau Dorte Kokerbeck, die durch ihre Motivation, ihren Einsatz und sehr guten experimentellen Arbeiten wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. War schön mit Euch!

Liebe Mitarbeiter der Zellkulturtechnik, Ihr seid eine ganz besondere Truppe. Danke für die viele wissenschaftliche, technische, moralische, menschliche,... Hilfe. Lachen hält gesund.

Ich danke den Moderatoren des WDR 2. Ihr habt etliche Stunden im Labor bereichert.

Jetzt wird's schwierig. Denn ich kann nicht einzeln aufzählen, wem ich an dieser Stelle noch danken möchte. Leev lück, dat wor en superjeile Zick.

Herzlichen Dank an Kirsten und Reinhard Dillmann für Unterstützung und Opposition.

An dieser Stelle möchte ich eine Lanze für die Institution Familie brechen.

Liese und Lin, Ihr seid eh die Besten vom Feinsten. Sois azules, con antenas. Danke.

Micha, Deine Kraft, Geduld und Zuversicht reichen zum Glück für zwei. Ich danke Dir für so vieles.

Gabilein und Achim, ganz, ganz herzlichen Dank.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4111
Februar 2004
ISSN 0944-2952