



Institut für Biotechnologie

***Kultivierung hämatopoietischer Zellen –
Kokultur im Festbettreaktor***

Nanni Jelinek

Kultivierung hämatopoietischer Zellen – Kokultur im Festbettreaktor

Nanni Jelinek

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3863
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie; Jül-3863
D 82 (Diss., Aachen, RWTH, 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-52 20 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung:

Die *ex vivo* Expansion hämatopoietischer Zellen ist eine bedeutende Technologie mit einem breiten Spektrum klinischer Applikationen. In dieser Arbeit wurde als Kultivierungskonzept die *ex vivo* Simulation des menschlichen Knochenmarks gewählt, die technisch durch die Kokultur hämatopoietischer und stromaler Zellen im Festbettreaktor realisiert wurde. Dabei werden die Zellen auf porösen Collagen-Trägern immobilisiert. Als Screeningsystem wurde der Miniatur-Schlaufenreaktor etabliert. Für die Versorgung mit Primärmaterial war der Aufbau einer Zellbank (CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut) erforderlich. In vorbereitenden Untersuchungen wurden zwei stromale Zelllinien charakterisiert und die Zellernte der hämatopoietischen Zellen durch enzymatische Lyse der Träger etabliert. Die Optimierung verschiedener, für die immobilisierte Kokultur relevanter Parameter erfolgte im Miniatur-Schlaufenreaktor, wobei die mononukleären Zellen (MNC) bis zu 454fach, die koloniebildenden Zellen (CFC) bis zu 26fach und die Cobblestone-Area-Forming-Cells (CAFC) bis zu 18fach expandiert wurden. Im immobilisierten System konnte selbst die Population der SCID-Maus repopulierenden Zellen (SRC) erhalten werden, die im parallel betriebenen Suspensionssystem nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Das zeigt, dass die Kokultur in Bezug auf Unterstützung und Vermehrung der frühen Vorläuferzellen der Suspensionskultur überlegen ist. Auf Basis der Optimierung im Miniatur-Schlaufenreaktor konnten die hämatopoietischen Zellen auch im Festbettreaktor erfolgreich expandiert werden, wobei die Kokultur mit der Stromazelllinie SI/SI und den Standardzytokinen (IL-3, TPO, SCF und FL) zu den besten Resultaten führte. So konnten die MNC maximal 103fach, die CFU-GM 114fach und die CAFC 15fach expandiert werden. Diese Expansionsdaten entsprechen einem medizinischen Maßstab, wodurch die klinische Relevanz dieser Ergebnisse belegt ist.

Abstract:

The *ex vivo* expansion of hematopoietic cells is an important technique for many medical applications. The cultivation concept in this study was the *ex vivo* simulation of the human bone marrow by co-culture of hematopoietic and stromal cells in a fixed-bed bioreactor. Thereby the cells are immobilized on macroporous collagen microcarriers. A miniaturized loop-reactor was established for screening purposes. For the full supply with primary CD34⁺-cells a cord blood bank was built up. In preliminary investigations two stromal cell lines were characterized and the harvest of immobilized cells established by enzymatic lysis of the carriers. The relevant parameters for the co-culture were optimized in the miniaturized loop-reactor. In this system the mononuclear cells (MNC) were expanded up to 454 fold, the colony-forming-cells (CFC) up to 26 fold and the cobblestone-area-forming cells (CAFC) up to 18 fold. In this system the SCID-mouse repopulating cells (SRC) were maintained in contrast to a parallel cultivation in a suspension system. This demonstrates the positive effect of the stromal based, immobilized culture compared to the suspension culture of this cells. Based on the optimization in the screening system the hematopoietic cells were successfully expanded in the fixed-bed bioreactor. The co-culture with the stromal cell line SI/SI and the cytokines IL-3, TPO, SCF and FL led to the best results. In this system the MNC were expanded maximal 103 fold, the CFU-GM 114 fold and the CAFC 15 fold. These data correspond the medical yardstick demonstrating the clinical relevance of the results presented in this study.

Danksagung

„However, successful *ex vivo* expansion has evaded and frustrated scientists for a number of years.“ Srouf (1999). Um so schöner ist es, am Ziel der Arbeit denen zu danken, die einen wesentlichen Beitrag dazu geleistet haben.

Mein Dank gilt:

- Herrn Professor Dr. rer. nat. Christian Wandrey für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die Übernahme des Hauptreferates
- Herrn Professor Dr.-Ing. Winfried Hartmeier für die Übernahme des Korreferates
- Herrn Professor Dr. rer. nat. Manfred Biselli für die faszinierende Aufgabenstellung und die Betreuung
- Herrn Dipl.-Ing. Sebastian Schmidt für die großartige und effektive Kooperation
- Frau Dr. rer. nat. Petra Meißner und Herrn Dr. rer. hum. biol. Stefan Thoma für die Einführung in das weite Gebiet der Hämatologie und Diskussionen
- Frau Cornelia Herfurth für >10⁶ Hände, die sie mir während der Arbeit gereicht hat
- Herrn Stephan Wenkel, Herrn Dipl.-Chem. Hermann Bohnenkamp und Frau Clarissa Nehlich für ihre hilfreiche Arbeit als Praktikanten
- Herrn Dr. rer. nat. K.-Peter Stahmann, Herrn Dipl.-Biol. Thomas Schlösser, Frau Dipl.-Biol. Tina Fischbach für die geduldige Einführung in die Welt der PCR
- Herrn Dr. med. Dartsch und den Hebammen des St. Elisabeth-Krankenhauses Jülich für die Sammlung und Bereitstellung des für diese Arbeit existenziellen Primärmaterials
- Allen Mitarbeitern der Werkstätten für die Schaffung des technisch perfekten Umfelds
- Herrn Siegfried Peters und Herrn H.-P. Bochem für die Fotos bzw. REM-Aufnahmen
- Der Firma MainGen, Herrn Dr. rer.-nat. Bernd Schröder und Frau Dipl.-Biol. Tanja Roßmanith für die Unterstützung der Arbeit
- Allen, die sich so viel Mühe mit dem Korrekturlesen meiner Arbeit gemacht haben
- Herrn Norbert Sturm für seine unendliche Geduld in jeder Phase der Arbeit, stundenlange Telefonate und seine immer liebevolle Unterstützung
- Und besonders meinen Eltern für ihre Liebe, ihr immer mitfühlendes Interesse und die großartige Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN UND WARENZEICHEN	IX
1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHER HINTERGRUND	3
2.1. DIE HÄMATOPOESE	3
2.2. ORT UND REGULATION DER HÄMATOPOESE	12
2.3. KLINISCHE ANWENDUNG HÄMATOPOIETISCHER ZELLEN	22
2.4. KULTIVIERUNG HÄMATOPOIETISCHER ZELLEN	27
3. MATERIAL UND METHODEN	35
3.1. ARBEITEN MIT PRIMÄREN ZELLEN.....	35
3.2. ZELLINIEN	38
3.3. MEDIEN	39
3.4. ZYTOKINE UND ANTIKÖRPER	41
3.5. KULTURSYSTEME	41
3.6. TRÄGER.....	47
3.7. ZELLANALYTIK	49
3.8. MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYTIK	55
3.9. MEDIENANALYTIK.....	58
4. GRUNDLEGENDE VORUNTERSUCHUNGEN.....	61
4.1. ETABLIERUNG EINER ZELLBANK VON CD34 ⁺ -ZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT.....	61
4.2. CHARAKTERISIERUNG DER STROMALEN ZELLINIEN	66
4.3. IMMOBILISIERUNGSVERSUCHE IM MINIATUR-SCHLAUFENREAKTOR	74
4.4. VORUNTERSUCHUNGEN ZUR KULTIVIERUNG HÄMATOPOIETISCHER ZELLEN	84
4.5. ETABLIERUNG DER ZELLERNTEN VON COLLAGEN-TRÄGERN	89
5. EINSATZ VON PRIMÄREM STROMA.....	97
5.1. KULTIVIERUNG VON PRIMÄREM STROMA	97
5.2. KOKULTUR VON HÄMATOPOIETISCHEN ZELLEN MIT PRIMÄREM STROMA	103
5.3. DISKUSSION	109

6. KOKULTUR IM MINIATUR-SCHLAUFENREAKTOR.....	113
6.1. OPTIMIERUNG DER KOKULTUR IM MINIATUR-SCHLAUFENREAKTOR	113
6.2. VERGLEICH DER KOKULTUR MIT DER STROMAFREIEN KULTIVIERUNG	124
6.3. VERGLEICH DER KOKULTUR MIT SUSPENSIONSKULTUR.....	129
6.4. DISKUSSION	133
7. KOKULTUR IM FESTBETTREAKTOR.....	137
7.1. VERGLEICH DER KULTIVIERUNG STROMALER ZELLINIEN IM FESTBETTREAKTOR	137
7.2. VERGLEICH STROMALER ZELLINIEN ZUR KOKULTUR IM FESTBETTREAKTOR.....	141
7.3. EINSATZ VON SERUMFREIEM MEDIUM IM FESTBETTREAKTOR	147
7.4. VERGLEICH DES SCREENING- UND DES PRODUKTIONSSYSTEMS	149
7.5. BILDICHE DARSTELLUNG DER KOKULTUR	150
7.6. DISKUSSION	153
8. SCHLUSSFOLGERUNGEN	157
8.1. ENTWICKLUNG DER KOKULTUR IM FESTBETTREAKTOR	157
8.2. VERGLEICH DER KOKULTUR IM FESTBETTREAKTOR MIT ANDEREN SYSTEMEN	158
8.3. KLINISCHE RELEVANZ DER KOKULTUR IM FESTBETTREAKTOR	160
9. AUSBLICK.....	163
10. ZUSAMMENFASSUNG.....	165
LITERATURVERZEICHNIS	167
ANHANG	187

Abkürzungen

ADA	Adenosin Deaminase
ATCC	American Type Culture Collection
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
bp	Basen Paare
BSA	Bovines Serum-Albumin
c	Zelle
CAFC	Cobblestone-Area-Forming Cells
CB	Cord Blood
CD	Cluster of Differentiation
CFC	Colony Forming Cells
CFU-BA	Colony Forming Unit-Basophile Granulozyten
CFU-E	Colony Forming Unit-Erythrocyte
CFU-E	Colony Forming Unit-Eosinophile Granulozyten
CFU-G	Colony Forming Unit-Granulocyte
CFU-G/M	Colony Forming Unit-Granulocyte/Makrophage
CFU-GEMM	Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Makrophage Megakaryocyte
CFU-M	Colony Forming Unit-Macrophage
CFU-Meg	Colony Forming Unit-Megakaryocyte
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
ELTC	Extended Long-Term Cultures
EPO	Erythropoietin
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	Flt-3 Ligand
Flt	Fetal Liver Tyrosinkinase
FSC	forward scatter
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Monocyte-Colony Stimulatig Factor
GVHD	Graft-Versus-Host-Disease
GVL	Graft-Versus-Leukemia
Gy	Gray
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	High performance liquid chromatography
HS	horse serum
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
L	Liter
LDA	Limiting Dilution Analysis
LFA	Leukocyte Function Associated molecule
LTC	Long-Term Culture (Medium)
LTC-IC	Long-Term Culture-Initiating Cells

m	milli
mAb	monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic Cell Sorting
MC	Methylcellulose
ML-IC	Myeloid-Lymphoid-Initiating Cells
MNC	Mononukleäre Zellen
mod.	modifiziert
n	nano bzw. Anzahl der Versuche
NK	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphat-Bufferd Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
P-LTC	Primary Long-Term Culture (Medium)
REM	Rasterelektronenmikroskop
SCID	Severe Combined Immuno-Deficiency
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Natriumdodecylphosphat
Sl	Steel (Genlocus von SCF)
SRC	Scid Repopulating Cell
SSC	sidewards scatter
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TPO	Thrombopoietin
UV	Ultra Violettes Licht
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA	Very Late Antigen

Warenzeichen

Bezeichnung	Inhaber
CASY	Schärfe System GmbH, Reutlingen
MACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Marprene	Watson-Marlow Ltd., Falmouth, UK
Replicell	Aastrom Biosciences, Inc., Ann Arbor, MI, USA
Teflon	E. I. du Pont de Nemours and Company, WA, USA

1. Einleitung

„Alles Leben ist an die Zelle gebunden, und die Zelle ist nicht bloß das Gefäß des Lebens, sie ist selbst der lebende Teil.“ (Rudolf Virchow).

Seit 1907 das erste Mal gezeigt wurde, dass Gewebe von Tieren *ex vivo*, also außerhalb des Körpers, am Leben erhalten werden können (Harrison, 1907), ist die Entwicklung der Zellkultur eng mit medizinischen Fragestellungen verbunden.

Die erste kommerzielle Anwendung von tierischen Zellkulturen war die Produktion von Viren, die heute noch im großen Maßstab als Impfstoffe eingesetzt werden. Weiterhin stehen Proteine mit potentiell therapeutischem Nutzen im Vordergrund, die von tierischen Zellen sekretiert werden, wie z.B. der Blutgerinnungsfaktor VIII. Nicht zuletzt ist in der Produktion von monoklonalen Antikörpern, die in der Diagnostik und Therapie eingesetzt werden, durch Hybridomzellen ein weites Anwendungsgebiet der Zellkultur zu sehen (Primrose, 1990).

Alle diese Produkte sind von Zellen sekretierte Proteine, die in löslicher Form klinische Anwendung finden. Eine neue Kategorie von Medikamenten stellen in vielfältigen medizinischen Gebieten die Zellen selbst dar, wie z.B. in einer Gentherapie, bei Transplantationen nach einer Hochdosis-Chemotherapie oder bei einer adoptiven Immuntherapie (Nordon und Schindhelm, 1996). Dabei sind häufig blutbildende Zellen, also die Zellen des hämatopoietischen Systems (aus dem Griechischen *haima* = Blut und *poiesis* = Produktion), die Ansatzpunkte der Therapien, was vor allem durch die Bedeutung der Blutzellen für die immunologische Abwehr des menschlichen Organismus begründet ist.

Ein neuer, schnell wachsender Teil der Biotechnologie ist der Versuch, funktionelle lebende humane Gewebe *ex vivo* aufzubauen. Diese Bemühungen können als logische Weiterentwicklung der Verwendung reiner Kulturen einzelner Zelltypen gesehen werden, die zur Produktion der sekretierten Proteine eingesetzt werden (Palsson et al., 1993). Das Nachahmen von verschiedenen Geweben erfordert komplexe Systeme, die die Entwicklung und Kultivierung gemischter Zellpopulationen unterstützen. In diesem als „tissue engineering“ bezeichneten Bereich stellt der Aufbau eines künstlichen hämatopoietischen Systems sowohl aufgrund der hohen Komplexität der Hämatopoiese als auch in Bezug auf die signifikanten klinischen Indikationen eine besondere Herausforderung dar.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. Die Hämatopoiese

Die Hämatopoiese beruht auf einer Hierarchie von Zellen, an deren Anfang eine Population pluripotenter (= viele Möglichkeiten in sich tragend), hämatopoietischer Stammzellen steht (Abbildung 2-1). Von dieser Stammzelle ausgehend entwickeln sich über verschiedenste Zwischenstufen alle reifen Blutzellen, die die vielfältigen Aufgaben des Blutgewebes erfüllen. Dieses System zeichnet sich durch eine extreme Komplexität aus. Die Faktoren, die die Entwicklung des Blutes beeinflussen, reichen von verschiedenartigsten Zelltypen über lösliche Substanzen bis hin zu Reaktionen, die nur über direkten Zell-Zellkontakt entstehen. Auch wenn viele Details der Hämatopoiese mittlerweile entschlüsselt sind, ist das Gesamtsystem immer noch unverstanden.

2.1.1. Die hämatopoietische Stammzelle

Das Konzept der pluripotenten, hämatopoietischen Stammzelle wurde 1924 von Maximow eingeführt. Er postulierte, dass alle reifen Blutzellen von einer einzigen Klasse Vorläuferzellen abstammen. Bis heute gibt es allerdings keine Methode, die hämatopoietischen Stammzellen direkt nachzuweisen, da die Haupteigenschaften dieser Zellen Fähigkeiten sind, die sie in der Zukunft entwickeln können. Um diese analysieren zu können, muss die Zelle aus ihrer natürlichen Umgebung genommen werden, wodurch sie unvermeidlich verändert wird. Daraus resultiert ein eingeschränktes Spektrum ihrer möglichen Reaktionen (Potten und Loeffler, 1990).

Nach einer Definition von Potten und Loeffler (1990) können die Eigenschaften einer Stammzelle wie folgt zusammengefasst werden: A) Fähigkeit zur Proliferation, B) Fähigkeit der Selbsterhaltung, C) Produktion großer Zahl weiter differenzierter und funktionaler Vorläuferzellen, D) Regenerierung des Gewebes nach Verletzung und E) Flexibilität in der Verwendung dieser Optionen. Übertragen auf die Hämatopoiese bedeutet das, dass pluripotente, hämatopoietische Stammzellen eine Population darstellen, die neben der Selbsterneuerung die Möglichkeit hat, in alle Blutzelllinien zu differenzieren (Müller-Sieburg und Deryugina, 1995). Dadurch ist die konstante Produktion von reifen Blutzellen gewährleistet (Lemischka, 1997). Mehr als 90% der hämatopoietischen Stammzellen befinden sich allerdings im G₀-Stadium, das heißt, sie sind nicht im Zellzyklus (Strauss et al., 1991). Diese Strategie dient dazu, die genetische Stabilität dieser Zell-Population zu erhalten. Bei

jeder Teilung besteht die Gefahr von Mutationen, die im Verlauf von vielen Teilungen akkumulieren würden und somit zu Defekten führen könnten (Lajtha, 1979).

Bei einer Verletzung des Gewebes, z.B. durch Blutverlust, ist eine erhöhte Produktion von Zellen erforderlich. Dabei muss das Gleichgewicht zwischen Differenzierung und Selbsterneuerung der Stammzellen erhalten bleiben. Unabhängig vom Zellbedarf differenzieren nur maximal 40% der Stammzellen aus, damit diese Population ebenfalls wieder regeneriert werden kann (Lajtha, 1979). Die replikative Lebensspanne einer Stammzelle ist proportional zu der Lebensdauer des Herkunftsorganismus (Lansdorp, 1997).

2.1.2. Das hämatopoietische System

Der Stammbaum des hämatopoietischen Systems, basierend auf der pluripotenten Stammzelle, ist vereinfacht in Abbildung 2-1 dargestellt. Der erste entscheidende Differenzierungsschritt führt von der Stammzelle zu den myeloiden (= knochenmarkähnlichen) bzw. lymphoiden (= lymphozytenähnlichen) Stammzellen.

Aus den linienspezifischen Stammzellen entstehen weiterspezialisierte Vorläuferzellen, die auch Progenitoren genannt werden. Aus diesen gehen schließlich die reifen Blutzellen hervor. In der lymphoiden Linie stehen die T- und B-Lymphozyten und die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) am Ende der Entwicklung. Die myeloide Reihe verzweigt sich vielfältiger und bringt über diverse Zwischenstadien alle übrigen Blutzellen hervor: Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen.

Im Verlauf der Blutbildung nimmt demnach von der Stammzelle ausgehend die Pluripotenz ab, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sinkt, und die Zellen werden zunehmend aktiviert (Lemischka, 1997). Diese Entwicklung ist ein fließender Prozess, der durch die Differenzierungsstufen in Abbildung 2-1 nur angedeutet ist. Die verschiedenen Vorläuferzelltypen entsprechen Zellen, die durch spezielle biologische Assays nachgewiesen werden können (Kapitel 2.1.3.).

Die wesentlichen zellulären Vorgänge bei der Hämatopoiese sind Proliferation und Differenzierung. Die Proliferation dient auf der Ebene der Stammzellen der Selbsterneuerung, wobei sich diese Teilungen sehr langsam vollziehen. Die festgelegten Vorläuferzellen dagegen teilen sich zwar schnell, dafür aber nicht unbegrenzt häufig (Reems und Torok-Storb, 1995; Reddy et al., 1997). Als Differenzierung wird der Vorgang bezeichnet, bei dem sich eine Zelle zu einer offensichtlich spezialisierteren Zelle umwandelt (Alberts et al., 1997).

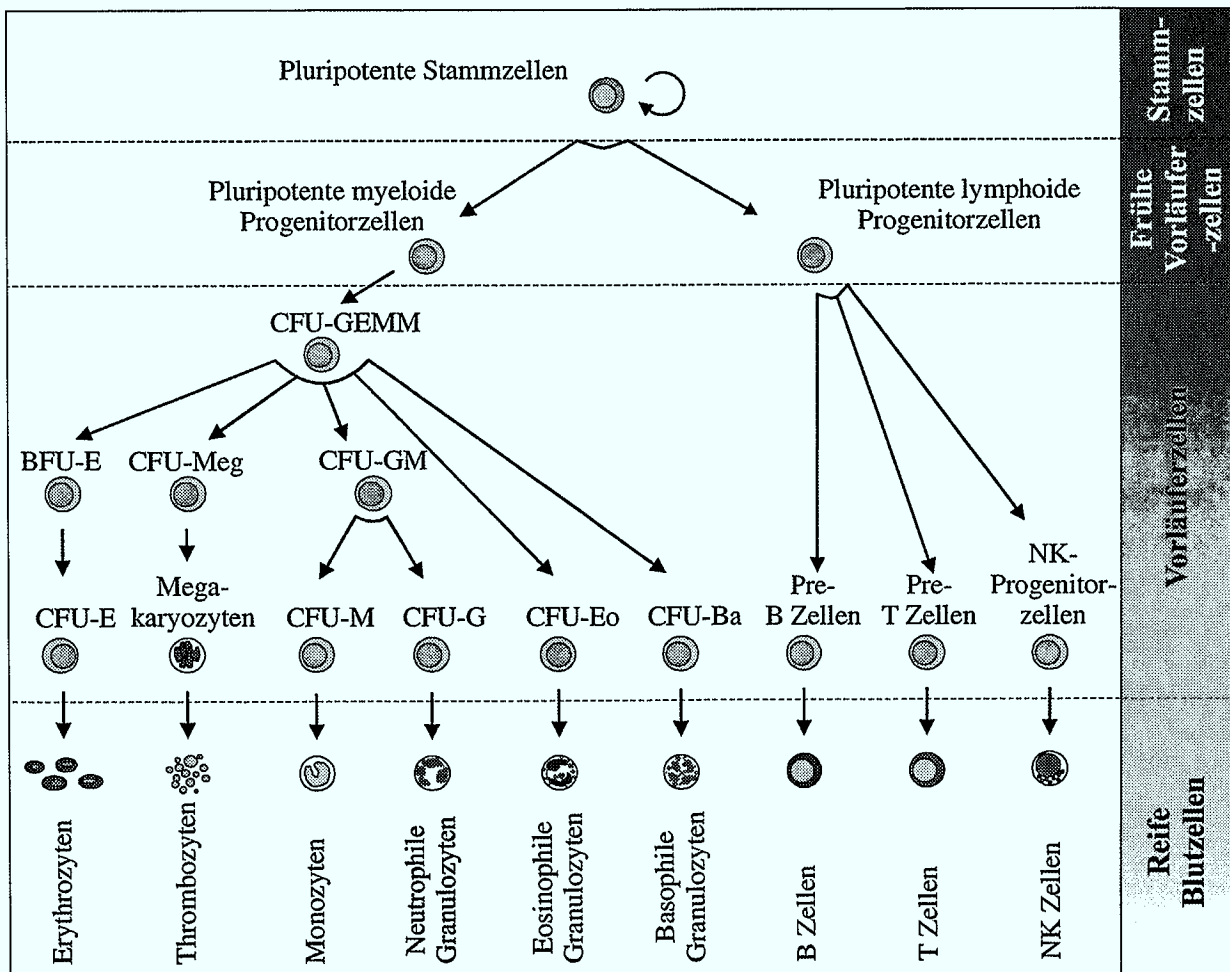


Abbildung 2-1: Das hämatopoietische System (CFU = colony forming unit, BFU = burst forming unit, E = Erythrozyten, Meg = Megakaryozyten, G = Granulozyten, M = Monozyten/Makrophagen, Eo = Eosinophil, Ba = Basophil, NK = Natürliche Killerzellen)

Das Blut hat im menschlichen Organismus viele Funktionen, die unmittelbar mit seinen Bestandteilen im Zusammenhang stehen. Die Funktionen der Blutzellen lassen sich in die Kategorien Immunabwehr, Transport und Blutgerinnung einteilen. Die weißen Blutzellen der myeloiden und lymphoiden Reihe werden als Leukozyten zusammengefasst und sind die wesentlichen zellulären Komponenten der Immunabwehr. Die Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sind Zelltypen, die die unspezifische, angeborene Immunität vermitteln. Die spezifische, antigenvermittelte Immunität basiert dagegen auf den B- und T-Lymphozyten. Die Erythrozyten übernehmen den Transport von Atemgasen zwischen der Lunge und den Geweben. Die Blutgerinnung wird durch die Thrombozyten eingeleitet (Faller, 1995; Janeway et al., 1999).

2.1.3. Detektion hämatopoietischer Zellen

Detektion über Oberflächenmoleküle

Die hämatopoietischen Zellen differenzieren in verschiedenen Stufen, die sich durch das Auftauchen oder den Verlust von spezifischen phänotypischen Eigenschaften auszeichnen. Dabei werden für das jeweilige Entwicklungsstadium charakteristische Oberflächenmoleküle exprimiert. Solche Strukturen auf der Zelloberfläche werden nach der CD-Nomenklatur (clusters of differentiation) benannt. Diese Klassifizierung beruht auf der Unterscheidung von Oberflächenmolekülen über spezifische monoklonale Antikörper (Singer et al., 1994; Shaw, 1994). Reife Blutzellen können zusätzlich auch über ihre Morphologie unterschieden werden. Das wichtigste Oberflächenmolekül, das im hämatopoietischen System die pluripotenten Stammzellen bis hin zu Vorläuferzellen exprimieren, ist CD34. Der erste monoklonale Antikörper gegen CD34 wurde von einer Hybridomzelle produziert, die aus einer mit der hämatopoietischen Zelllinie KG-1a immunisierten Maus isoliert wurde (Civin et al., 1984). Außer auf hämatopoietischen Zellen ist dieses Molekül auch auf Endothelzellen und embryonalen Fibroblasten gefunden worden (Krause et al., 1996). CD34 ist ein hochglykosyliertes Transmembranprotein mit einem Gewicht von 90-120 kDa, das der Sialomucin-Familie angehört (Krause et al., 1996). Im Knochenmark, dem Ort der Hämatopoiese (Kapitel 2.2.2.), sind 1,7% der Zellen CD34 positiv (McAdams et al., 1996 c). In der Population der CD34⁺-Zellen sind sowohl koloniebildende Zellen, LTC-IC (Long-Term Culture-Initiating Cells) als auch Maus-repopulierende Zellen angereichert (Krause et al., 1996; Hogan et al., 1997), was die Bedeutung dieses Markers für die Detektion der Stamm- und Vorläuferzellen verdeutlicht. Auf das Konzept der erwähnten Assays wird später in diesem Kapitel eingegangen. Die Funktion von CD34 während der Hämatopoiese ist nicht vollständig geklärt. Liganden für CD34 sind E- und L-Selektin, die auf Endothelzellen exprimiert werden (Barclay et al., 1997), was neben anderen Untersuchungen auf eine Funktion als Adhäsionsmolekül schließen lässt (Raffi et al., 1994). Durch die Induktion der Differenzierung wird die mRNA für CD34 herunter reguliert (Krause et al., 1996), was eine grundlegende Bedeutung von CD34 für die Entwicklung der hämatopoietischen Zellen beweist.

Neuere Untersuchungen stellen CD34 als Stammzellmarker in Frage. So konnte 1998 mehrfach gezeigt werden, dass CD34⁻-Zellen, die keine Marker reiferer Stadien aufweisen, ebenfalls bestrahlte, immundefiziente Mäuse repopulieren können (Bathia et al., 1998; Zanjani et al., 1998). Andere Arbeiten konnten dieses Verhalten nicht belegen (Fujisaki et al.,

1999; Kim et al., 1999). Basierend auf den Untersuchungen von Sato und Mitarbeitern (1999) stellte Goodell (1999) die Theorie auf, dass es eine kleine Population ruhender Stammzellen gibt, die $CD34^-$ sind und durch Aktivierung $CD34$ exprimieren (Abbildung 2-2). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess reversibel ist (Sato et al., 1999; Nakamura et al., 1999).

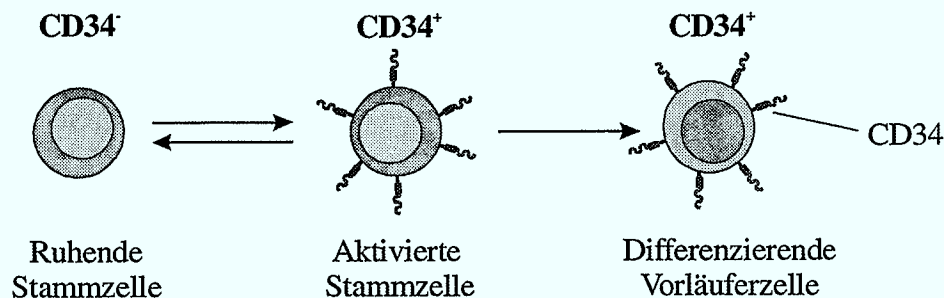


Abbildung 2-2: Modell der $CD34$ Expression der hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark (nach Goodell, 1999)

Die durchflusszytometrische Charakterisierung der hämatopoietischen Zellen erfolgt noch über weitere Oberflächenmarker, die unter Angabe ihrer Funktion in Tabelle 2-1 zusammengefasst sind. Neben diesen Markern wird auch noch HLA-DR (human leukocyte antigen) gemessen, das auch als Haupthistokompatibilitätskomplex II bezeichnet wird. Dieses Molekül ist an der Antigenerkennung von $CD4^+$ -T-Lymphozyten beteiligt.

Tabelle 2-1: Oberflächenmarker, die der Charakterisierung hämatopoietischer Zellen dienen (Barclay et al., 1997; nur die wichtigsten Funktionen und Bezeichnungen genannt)

CD-Nomenklatur	Andere Bezeichnungen	Funktion
CD33	—	Bindung an Sialoglycokonjugate, vermittelt Zell-Zell Adhäsion
CD38	T10	NAD Glykohydrolase
CD45	L-CA (leucocyte common antigen)	Signalvermittlung über Antigen-rezeptoren, Phosphatase
CD90	Thy-1	Unbekannt, vermutlich zelluläre Erkennung und Adhäsion
CD117	c-kit	Rezeptor für das Zytokin SCF (stem cell factor)
CD135	FLT3 (fetal liver tyrosinkinase 3)	Rezeptor für das Zytokin FLT3 Ligand, Rezeptortyrosinkinase

Die Expression der verschiedenen Oberflächenmoleküle auf Stamm- und Vorläuferzellen ist stark vereinfacht in Abbildung 2-3 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der exprimierten Oberflächenmarker mit zunehmender Reife der Zellen ansteigt. Die ruhende Stammzelle zeichnet sich demnach dadurch aus, dass sie sehr wenig Oberflächenmoleküle trägt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nicht nur die Anwesenheit eines Moleküls, sondern auch die Häufigkeit der Expression eine wesentliche Rolle spielt. So ist c-kit auf ruhenden

Stammzellen nur sehr schwach exprimiert, wohingegen bei aktivierten Stammzellen die Expression dieses Markers sehr hoch ist (Lyman und Jacobsen, 1998). Im Gegensatz dazu wiesen Sakabe und Mitarbeiter nach (1998), dass in $CD34^+$, $c-kit^-$ Zellen vor allem LTC-IC angereichert waren, die zwischen der aktivierten Stammzelle und der CFU-GEMM einzuordnen ist.

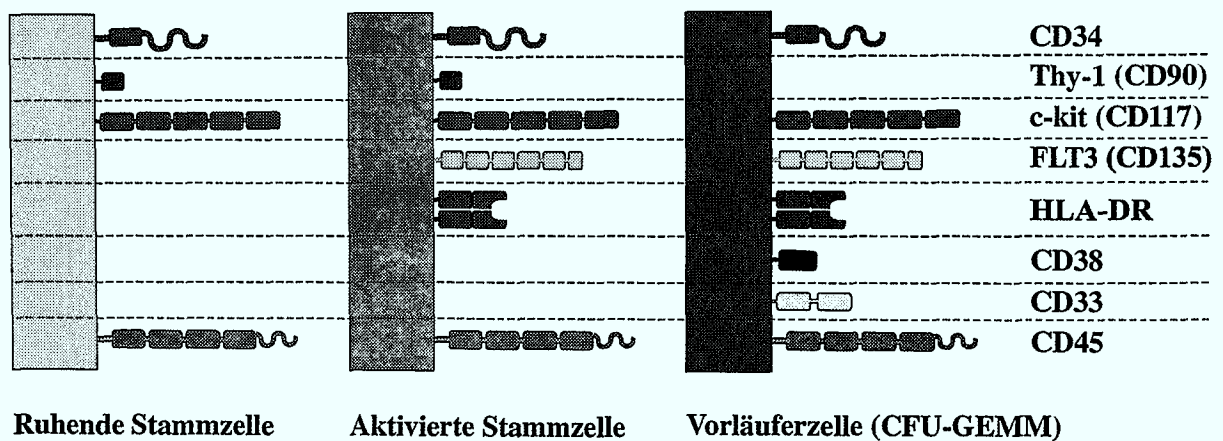


Abbildung 2-3: Vergleich der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf Stamm- und Vorläuferzellen

Die Expression von Thy-1 auf Zellen, die den hämatopoietischen Stammzellen nahekommen, ist vielfach beschrieben (Baum et al., 1992; Craig et al., 1993; Murray et al., 1995). CD38 wird zwar nicht von Stammzellen exprimiert, spielt aber für die Myelopoiese eine entscheidende Rolle (Todisco et al., 2000).

Weitere Oberflächenproteine, die als Stammzellmarker angesehen werden, sind AC133 (Miraglia et al., 1997; Yin et al., 1997) und KDR bzw. VEGF-Rezeptor 2 (= Vascular Endothelial Growth Factor) (Ziegler et al., 1999). Gallacher und Mitarbeiter haben gezeigt (2000), dass $CD34^+$, $AC133^+$ Zellen immundefiziente Mäuse repopulieren konnten. Das würde dafür sprechen, dass AC133 ein noch früherer Marker als CD34 ist bzw., übertragen auf das Modell von Goodell, auch auf ruhenden Stammzellen exprimiert wird. Ein weiteres Oberflächenmolekül, das für hämatopoietische Zellen bedeutend ist, ist CXCR4, der Rezeptor des Chemokines SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor-1). CXCR4 scheint eine besondere Rolle beim Einnisten der hämatopoietischen Zellen ins Knochenmark zu haben, da es die Migration durch Endothelzellen vermittelt (Möhle et al., 1998; Peled et al., 1999). An der Generierung und Expansion früher Vorläuferzellen ist CXCR4 ebenfalls beteiligt (Kawabata et al., 1999).

Detektion über biologische Assays

Dorrell und Mitarbeiter (2000) expandierten Zellen, die phänotypisch Stammzellen ähnlich sind ($CD34^+$, $CD38^-$), aber nicht alle in Mäusen als solche nachgewiesen werden konnten. Das zeigt deutlich, dass der Phänotyp und die Funktion der Zellen nicht unbedingt übereinstimmen, und somit funktionelle biologische Assays zur Analytik der Zellen erforderlich sind.

Die Art der funktionellen biologischen Assays ist sehr vielfältig, aber die Methoden lassen sich in 2 Kategorien einteilen: Die *ex vivo* und die *in vivo* Assays. In Abbildung 2-4 sind verschiedene dieser Assays in Bezug auf die Stellung der detektierten Zellen innerhalb des hämatopoietischen Systems zusammengefasst.

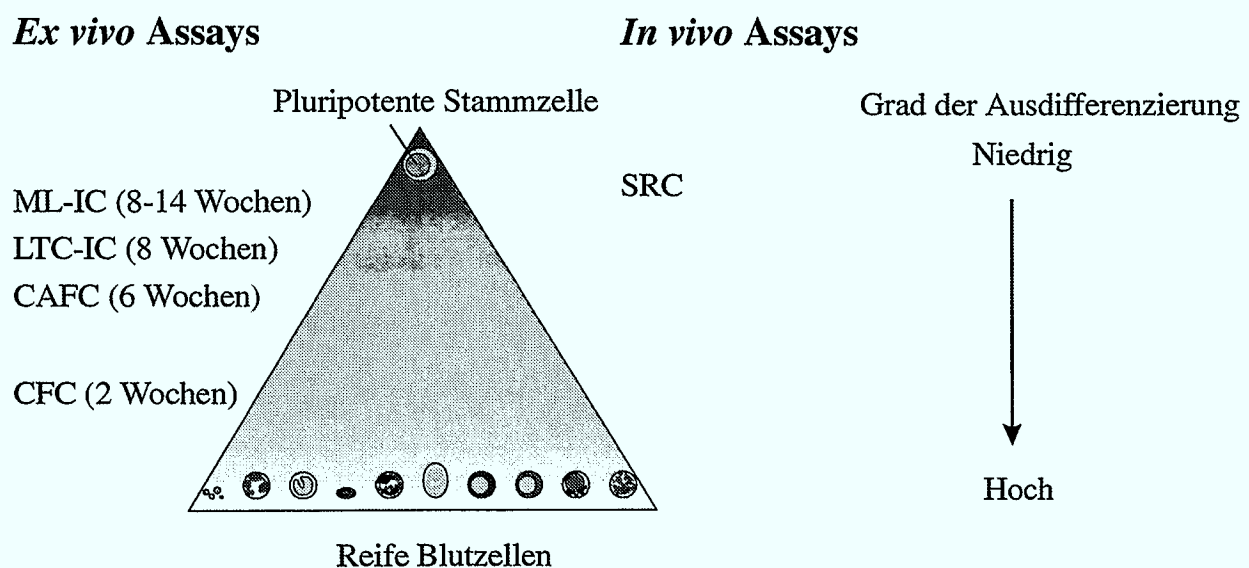


Abbildung 2-4: Hierarchie der Zellen im hämatopoietischen System und der verschiedenen funktionellen Assays zur Detektion (nach Graham und Wright, 1997)

Die *ex vivo* Assays gliedern sich in 2 Klassen: Quantitative klonogene Assays und Assays von Zellen, die hämatopoietische Proliferation und Differenzierung auf stromalen Kulturen initiieren.

Die sogenannten „colony forming cell assays“ (CFC = colony forming cells, Kolonie-bildende Zelle oder auch CFU = colony forming units, Kolonie-bildende Einheit) basieren darauf, dass Vorläuferzellen eines bestimmten Reifegrads in semisoliden Medien innerhalb von 2 Wochen Kolonien reifer Zellen bilden, deren Morphologie und Zelltypen dem Potenzial der Vorläuferzelle entsprechen. So entstehen aus der Progenitorzelle CFU-GEMM Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Megakaryozyten, aus einer CFU-G dagegen nur Granulozyten (Arseniev und Griesel, 1998). Die Stellung der verschiedenen CFC im

hämatopoietischen System ist in Abbildung 2-1 dargestellt. Die ersten dieser Kurzzeitkulturen wurden noch in Anwesenheit stromaler Zellen durchgeführt (Ichikawa et al., 1966), wohingegen heute rekombinante Zytokine die Entwicklung der verschiedenen Kolonien unterstützen.

Im Gegensatz zu den CFC-Assays werden in stromahaltigen Langzeitkulturen Zellen nachgewiesen, die noch eine extensive Kapazität zur Selbsterneuerung haben. Nach 4 Wochen sind die CFC in diesen Kulturen ausdifferenziert und sterben ab. Die Zellen, die dann noch nachzuweisen sind, repräsentieren primitive Vorläuferzellen. Im Cobblestone-Area-Forming Cells-Assay (CAFC, Kopfsteinpflaster bildende Zellen) werden nach 6 Wochen Kokultur die Zellen ausgezählt, die in der Gewebekulturplatte einen dichten, kopfsteinpflasterähnlichen Zellrasen ausbilden und dadurch ihre Fähigkeit zur Langzeitproliferation beweisen (Breems et al., 1994). Der Long-Term Culture-Initiating Cells (LTC-IC)-Assay ist eine Erweiterung des CAFC-Assays um eine zweiwöchige Kultivierung in zytokinhaltigem, semisolidem Medium. Dadurch werden die Zellen nachgewiesen, die nach der Langzeitkultur noch die Kapazität haben, Kolonien auszubilden (Sutherland und Eaves, 1994). Die Quantifizierung solcher Assays erfolgt über eine limitierende Verdünnungsreihe (LDA = limiting dilution assay) (Weaver et al., 1997). Die Frequenz der LTC-IC und CAFC ist stark von der verwendeten Stromazelle für die Kokultur abhängig (Bertolini et al., 1997). In Abbildung 2-4 sind die CAFC etwas ausdifferenzierter als die LTC-IC, aber in eigenen Untersuchungen konnte kein Unterschied zwischen der Frequenz der CAFC und LTC-IC unter den gegebenen Kulturbedingungen festgestellt werden. Durch eine Verlängerung der Kulturdauer auf bis zu 14 Wochen wird in sogenannten Extended Long-Term Cultures (ELTC) versucht, noch unreifere Zellen nachzuweisen (Ploemacher, 1997; Ramsfjell et al., 1999).

Die beschriebenen Langzeitassays sind in ihrer Aussagekraft eingeschränkt, da nur der Nachweis der myeloiden Zelllinien in Kultur erfolgt. Vor kurzem wurde eine neue *ex vivo* Methode, der ML-IC-Assay (Myeloid-Lymphoid-Initiating Cells) entwickelt, der sowohl die Entwicklung myeloider als auch lymphoider Zellen nachweist (Punzel et al., 1999). Diese Methode beruht auf einer Erweiterung der Kulturdauer und der Kombination verschiedener Kulturbedingungen.

Die stromahaltigen *ex vivo* Assays basieren auf einer Annäherung an die *in vivo* Bedingungen im Knochenmark, weshalb die logische Weiterentwicklung die Detektion hämatopoietischer Zellen in verschiedenen Tiermodellen ist.

Das am meisten verwendete Tiermodell ist die Transplantation humaner hämatopoietischer Zellen in immundefiziente Mäuse, vor allem in Tiere, die den SCID-Defekt (Severe Combined Immuno-Deficiency) tragen (Baum et al., 1992; Lapidot et al., 1992). In das Knochenmark der Mäuse eingesiedelte humane hämatopoietische Stammzellen proliferieren in den zuvor bestrahlten SCID-Mäusen und differenzieren in alle Vorläufer- und reifen Blutzellen aus. Humane Zellen, die in den Mäusen die Hämatopoiese rekonstituieren, werden als SCID Repopulating Cells (SRC) bezeichnet. Da viele vor allem auf die Stammzellen wirkende Zytokine nicht Spezies-spezifisch sind (Müller-Sieburg und Deryugina, 1995), ist die Entwicklung der humanen Zellen möglich. Allerdings wird die Effizienz des Einnistens und der Erhalt der humanen Zellen in der Maus durch Kotransplantation humaner Stromazellen (Dao et al., 1997) oder Fibroblasten aus der Ratte, die genetisch zur Produktion von humanen Zytokinen verändert wurden (Goan et al., 1996), verbessert. Weiterhin erwies sich die Injektion humaner Zytokine als hilfreich für den Erhalt der SRC (Cashman und Eaves, 1999). Die Quantifizierung der SRC erfolgt über LDA (Conneally et al., 1997). Es reicht allerdings eine SRC aus, um eine Maus zu repopulieren (Bhatia et al., 1997). Allgemein betrachtet sind die SRC aber eine relativ heterogene Population, die sich während einer *ex vivo* Expansion unter bestimmten Kulturbedingungen zu verändern scheint (Bhatia et al., 1998; Blundell et al., 1999; Güenchea et al., 1999).

Neben den Mausmodellen werden auch Schafe (Almeida-Porada et al., 1996; Sutherland et al., 1996; Shimizu et al., 1998) und Affen (Dunbar et al., 1996; Brandt et al., 1999) eingesetzt. Welcher der verwendeten Assays das am besten geeignete System zur Detektion der Stammzellen ist, ist bis heute umstritten, wobei die *in vivo* Assays im Vordergrund stehen (Verfaillie, 2000).

2.1.4. Produktivität des hämatopoietischen Systems

Das Knochenmark ist in seiner Gesamtheit eines der aktivsten und größten Organe des menschlichen Körpers. Täglich werden von einem erwachsenen Menschen 100 bis 400 Milliarden reife Blutzellen produziert (Emerson und Taichmann, 1995; Ogawa et al., 1993). Die Lebensdauer der einzelnen Blutzellen ist vom Zelltyp abhängig, umfasst aber allgemein eine relativ kurze Zeitspanne. In Tabelle 2-2 sind beispielhaft die Lebensdauer, Konzentration im Blut und die Produktivität für 3 verschiedene Blutzelltypen zusammengefasst. Die hohe Produktionsrate basiert notwendigerweise auf der geringen Lebensspanne der Blutzellen (Metcalf und Moore, 1971). Unter Stressbedingungen, einer Verletzung oder Infektion, kann die Produktion der Erythrozyten um Faktor 20-30, der Granulozyten um Faktor 20 und der Thrombozyten um Faktor 3 gesteigert werden, was die flexible Anpassung des

hämatopoietischen Systems an äußere Umstände demonstriert (Emerson und Taichmann, 1995).

Tabelle 2-2: Konzentration, Lebensdauer und Produktion einiger reifer Blutzellen (nach Alberts et al., 1997; Smith und Yee, 1992; Strengers und van Aken, 1996)

Zelltyp	Konzentration im Blut [c/mL]	Lebensdauer	Produktivität [c/min]
Neutrophile Granulozyten	$5 \cdot 10^6$	6-9 Stunden	$4,9 \cdot 10^7$
Thrombozyten	$3 \cdot 10^8$	5-10 Tage	$3 \cdot 10^7$ bis $1,2 \cdot 10^8$
Erythrozyten	$5 \cdot 10^9$	4 Monate	$1,2 \cdot 10^8$

Der durchschnittliche Differenzierungsprozess einer Stammzelle zu den reifen Blutzellen umfasst 23 Teilungen (Schmidt, 2000). Das bedeutet, dass aus einer Stammzelle bis zu 10^7 reife Blutzellen entstehen können. Aus einer einzelnen CFC werden innerhalb von 2 Wochen über 10^5 terminal ausdifferenzierte Zellen, was ca. 13 Teilungen entspricht (Eaves und Lambie, 1995). Während der Erythropoiese erfolgen von der BFU-E noch 11 Teilungen bis zu den reifen Erythrozyten (Alberts et al., 1997). Young und Mitarbeiter wiesen nach (1995), dass sich aus einer $CD34^+$ -Zelle (ohne Blutzelllinien spezifische Marker) bis zu $2 \cdot 10^4$ Vorläuferzellen (Blasten) entwickeln, was ca. 14-15 Teilungen entspricht.

2.2. Ort und Regulation der Hämatopoiese

2.2.1. Entwicklungsbiologie der Hämatopoiese

Die hämatopoietischen Stammzellen sind mesodermalen Ursprungs. Im Verlauf der Embryonalentwicklung unterscheidet man die primitive und die definitive Hämatopoiese. Die Zellen der primitiven Hämatopoiese sind nur im Embryo zu finden (bis Woche 12) und gehen nach Abschluss dieser Entwicklungsstufen in Apoptose. Diese frühe Blutbildung findet hauptsächlich extraembryonal im Dottersack statt, wobei die embryonalen Stammzellen im Gegensatz zu den fötalen und adulten Stammzellen überwiegend im Zellzyklus sind. Im Fötus (ab Woche 12) erfolgt nur noch die definitive Hämatopoiese, aus der schließlich auch die adulten Stammzellen hervorgehen. Die Stammzellen sind während der fötalen Hämatopoiese in der Leber und in der Milz lokalisiert (Zon, 1995; Evans, 1997). Beim Fötus sind aber auch im Blutkreislauf zirkulierende Progenitorzellen nachgewiesen worden (Campagnoli et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Anteil an $CD34^+$ -Zellen im fötalen Blut bis zur Geburt kontinuierlich sinkt (Engel et al., 1999). Das Vorkommen von CFU-G in Nabelschnurblut ist aber schon 1974 von Knudtzon beschrieben worden. Während der

Embryogenese beginnt dann die Einwanderung der hämatopoietischen Zellen in das blutbildende Organ des erwachsenen Menschen, das Knochenmark (Stark, 1975).

2.2.2. Struktur des Knochenmarks

Die Hämatopoiese findet nach der Geburt und im erwachsenen Menschen im Knochenmark statt. Während im Kindesalter die Blutbildung noch im Mark sämtlicher Knochen erfolgt, hat das Mark der meisten Röhrenknochen bis zum Alter von etwa 20 Jahren diese Funktion verloren. Es hat sich zu inaktivem, gelbem Knochenmark umgewandelt, dessen Färbung von seinem Fettgehalt herrührt (Faller und Schünke, 1995). Der hämatopoietisch aktive Teil ist das rote Knochenmark, das beim erwachsenen Menschen ca. 50% des Gesamtmarks ausmacht. Mit seinen 1,5 L Volumen macht das Knochenmark ungefähr 5% des Körpergewichtes aus. Da das Blutvolumen ca. 5 L beträgt, werden aus 1 mL Knochenmark ca. 3,5 mL Blut gebildet (von Keyserlingk, 1978). Das rote Knochenmark kommt beim Erwachsenen in den platten und kleinen Knochen der überwiegend oberen Extremitäten vor (z.B. Becken, Rippen, Wirbel und Schädel). Wenn dieses Knochenmark z.B. krankheitsbedingt zerstört wird, kann sich die Produktion der Blutzellen manchmal wieder in die fötalen Bildungsstätten Milz und Leber verlagern (Faller und Schünke, 1995; Greenberger, 1991).

Die Struktur des Knochenmarks ist in Abbildung 2-5 anhand eines schematischen Knochenquerschnitts verdeutlicht. Die festen Bestandteile des Knochens bilden durch kleine Bälkchen (Trabekel) eine dreidimensionale Struktur, die sich durch viele, kleine Hohlräume auszeichnet, die Spongiosa. In diesen Hohlräumen befindet sich das rote Knochenmark (Wilkins, 1992).

Die nutritive Versorgung des Knochenmarks erfolgt über Arteriolen, die in verschiedenen Sinus enden. Die Sinus sind weitlumige elastische Gefäße, die ein hexagonales Hohlraumsystem aufbauen und ein einheitliches Netzwerk bilden (von Keyserlingk, 1978). Die Wände des Sinus bestehen aus einschichtigen Endothelzellen. Die Übergänge von den Sinus zu den Venen sind fließend, sodass eine Abgrenzung nicht unbedingt möglich ist (von Heyden, 1978; Lichtman, 1981).

Die Struktur des Knochenmarks besteht aus dem Parenchym, das das blutzellbildende Gewebe umfasst, und aus dem Stroma. Das Stroma stellt das Gerüst des Knochenmarks dar. Es besteht aus ortsständigen Zellen, einer Proteinmatrix und verschiedenen Fasern und steht mit dem Blutgefäßsystem in Verbindung (von Keyserlingk, 1978).

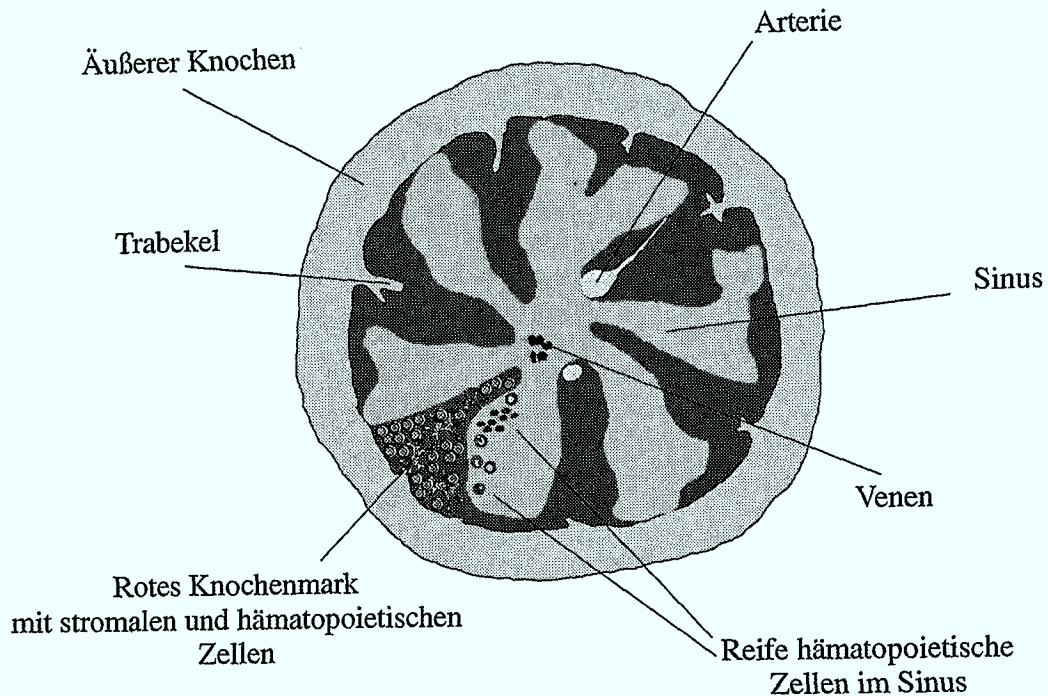


Abbildung 2-5: Struktur des Knochenmarks (Knochenquerschnitt)

Die Blutbildung erfolgt demnach im Knochenmark, wo die Vorläuferzellen in einer Dichte von $3\text{-}9 \cdot 10^8$ c/mL Knochenmark zu finden sind (Emerson und Taichman, 1995). Die Stammzellen sind in der Nähe des kompakten Knochens lokalisiert, während sich die Vorläuferzellen mit zunehmender Differenzierung dem Sinus nähern. Die reifen Blutzellen gelangen in den Blutsinus und über die ableitenden Gefäße in den Blutkreislauf. Dabei spielen Proteasen eine Rolle, die von reifen Zellen nach Zytokininduktion produziert werden und die Basalmembran abdauen (Janowska-Wieczorek et al., 1999).

2.2.3. Funktion des Stromas

Hämatopoietische Progenitoren proliferieren in definierten Zonen des Knochenmarks. So konnte gezeigt werden, dass sich erythroide oder myeloide Progenitoren an spezifische Makrophagen im Stroma anlagern und dort vermehren (Sadahira et al., 1990; Crocker et al., 1988). Daher wird postuliert, dass auch ein Mikroenvironment bzw. diskrete Nischen für die Stammzellreplikation existieren (Dainiak, 1991). Im Knochenmark gibt es weniger als 10^6 Stammzellen (Emerson und Taichman, 1995). Da die Frequenz dieser Zellen so niedrig ist, ist auch die Frequenz dieser spezifischen Nischen gering (Wineman et al., 1996; Lemischka, 1997).

Diese Nischen werden aus verschiedenen stromalen Zellen und deren Produkten aufgebaut. Zu den stromalen Zellen zählen Retikulumzellen, Makrophagen, Adipozyten und Endothelzellen (Allen und Dexter, 1984; Mayani et al., 1992). Weissman beschreibt das Mikromilieu der Hämatopoiese als Gradient verschiedener Typen von stromalen Zellen, von der jede mit einer spezifischen Subpopulation interagiert (1994). Dieses Konzept beginnt bei Stromazellnischen für die ruhenden Stammzellen und reicht bis zu den reifen Blutzellen, die schließlich in den Sinus entlassen werden.

Den Hauptzelltyp im Stroma stellen die Retikulumzellen dar, die in adventiale Zellen und Fibroblasten unterteilt werden können. Die adventialen Zellen sind auf der abluminalen Seite um den venösen Sinus angesiedelt und vermitteln die Migration der reifen Zellen in den Blutkreislauf. Fibroblasten sind dagegen im Mark lokalisiert und meist in engem Kontakt mit hämatopoietischen Zellen. Die zweithäufigsten Zelltypen sind Makrophagen, die ebenfalls direkt an der Entwicklung hämatopoietischer Zellen beteiligt sind. Die Endothelzellen scheinen in erster Linie als Barriere zwischen den hämatopoietischen Vorläuferzellen und dem Blutkreislauf zu dienen. In neueren Untersuchungen konnte allerdings auch gezeigt werden, dass spezifische Endothelzellen hämatopoietische Zellen in den Zellzyklus bringen können, was für weitere Funktionen dieses Zelltyps spricht (Brandt et al., 1999). Die Rolle der Adipozyten (= Fettzellen) in der Hämatopoiese ist bis heute unklar, allerdings wird eine Beteiligung an der Granulopoiese vermutet. Weiterhin sind am hämatopoietischen Microenvironment akzessorische Zellen wie T-Lymphozyten und Monozyten beteiligt, die Zytokine produzieren.

Wie bereits erwähnt, ist auch die Produktion von spezifischen Proteinen und anderen Molekülen an dem Aufbau der speziellen Nischen von großer Bedeutung. Zu diesen Substanzen zählen einerseits die Zytokine, die in Kapitel 2.2.5. näher erläutert werden, und andererseits die Komponenten der sogenannten Extrazellulärmatrix, die in Kapitel 2.2.4. ausführlicher diskutiert werden. Die prinzipiellen Wirkungsmechanismen zwischen stromalen und hämatopoietischen Zellen sind in Abbildung 2-6 zusammengestellt.

Die sehr einfach scheinende Strukturierung der Wechselwirkungen ist *in vivo* allerdings viel komplexer als hier dargestellt. So wirken Zytokine auch dadurch, dass sie in der Extrazellulärmatrix angereichert werden oder sich direkt als transmembrane Proteine auf der Zelloberfläche befinden (z.B. Stem Cell Factor, Broudy, 1997).

Der Aspekt des Zell-Zellkontaktes ist sehr vielseitig. Die einfachsten Mechanismen sind Interaktionen von Adhäsionsmolekülen und ihren spezifischen Rezeptoren. Es sind aber auch verschiedene Arten der transmembranen Kommunikation zwischen den Zellen beschrieben.

So konnte eine Beteiligung von gap junctions zwischen stromalen und blutbildenden Zellen (Dainiak, 1991; Rosendaal et al., 1997) und Ionenkanälen (Shirihai et al., 1998) an der Regulation der Hämatopoiese nachgewiesen werden.

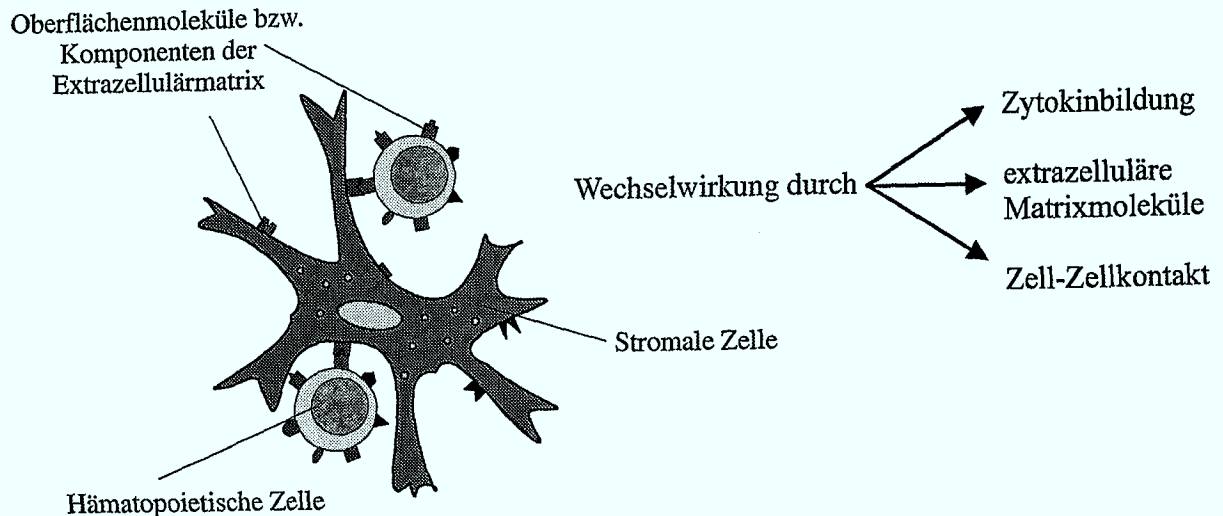


Abbildung 2-6: Wechselwirkungen zwischen stromalen und hämatopoietischen Zellen

Weiterhin wird eine sogenannte two way communication (Kommunikation in 2 Richtungen) zwischen stromalen und hämatopoietischen Zellen vermutet, bei der erst durch Zellkontakt die Stromazelle zur Produktion spezifischer Proteine angeregt wird, wie es für Osteoblasten und myeloide Zelllinien beschrieben ist (Koller et al., 1999; Barillé et al., 1995).

Neben den biologischen Komponenten spielen physikalische Parameter eine Rolle. So wird z.B. die Granulopoiese auch durch pH- und pO_2 -Gradienten im Knochenmark gesteuert, wobei die Expression des Rezeptors für den Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) durch den pH-Wert reguliert wird (Hevehan et al., 2000).

2.2.4. Die Extrazellulärmatrix und Adhäsion

Die Extrazellulärmatrix (EZM) ist ein komplexes und vielseitiges Netzwerk aus verschiedenen Komponenten, das im Knochenmark von den stromalen Zellen gebildet wird. Der Aufbau und die Funktion ist vielfach beschrieben und soll hier kurz zusammengefasst werden, wobei nur die wesentlichen Aspekte erläutert werden (Verfaillie et al., 1994; Simmons et al., 1994; Klein, 1995; Fernandez und Minguell, 1996 a).

Es sind über 20 Adhäsionsrezeptoren auf Progenitorzellen bekannt (Verfaillie, 1998), die mit den stromalen Zellen oder der EZM interagieren. Die wichtigsten Adhäsionsmechanismen sind in Abbildung 2-7 schematisch dargestellt. Die Funktion von CD34 als Adhäsionsmolekül ist bereits in Kapitel 2.1.3. beschrieben worden, und der Mechanismus zwischen c-kit und SCF wird im folgenden Kapitel behandelt.

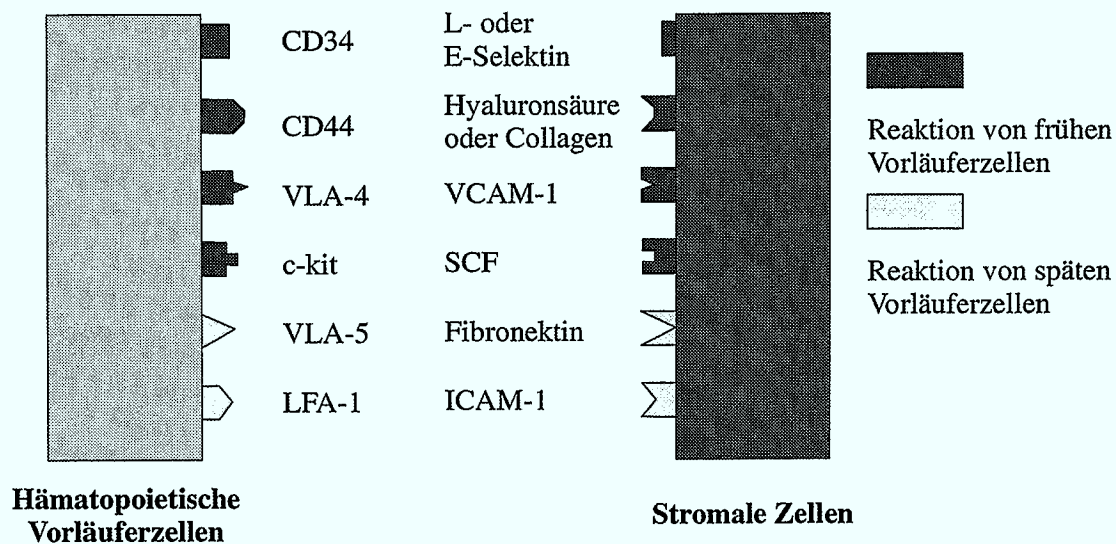


Abbildung 2-7: Adhäsionsmoleküle für die Interaktion von hämatopoietischen und stromalen Zellen (nach Gunji und Suda, 1995)

Während der Hämatopoiese verändern die Zellen mit zunehmendem Reifegrad ihre adhäsiven Eigenschaften, wodurch sie ihren jeweiligen Nischen angepasst sind (Gordon et al., 1996). Das erfolgt sowohl durch die Modulation des Expressionsmusters der Adhäsionsmoleküle (Gunji und Suda, 1995) als auch durch unterschiedliche Affinität der Rezeptoren je nach Reifegrad, wie es für VLA-4 (Very Late Antigen) beschrieben ist (Kronenwett et al., 1999). Die reifen Zellen haben viele ihrer adhäsiven Eigenschaften verloren und wandern so in den Blutkreislauf ein.

Die Wechselwirkungen zwischen Zytokinen und EZM sind sehr komplex, vernetzt und nur zu einem Bruchteil verstanden. So wird durch Adhäsion die Antwort von Progenitoren auf Zytokine, aber auch die Produktion von Zytokinen von stromalen und akzessorischen Zellen verändert (Long et al., 1992; Khaldoyanidi et al., 1999). Auf der anderen Seite wird durch Zytokine auch die Adhäsion moduliert, indem die Rezeptor-Expression der Progenitoren und die Produktion von Komponenten der EZM unter Zytokineinfluss reguliert werden (Conget und Minguell, 1995; Becker et al., 1999). Im Folgenden werden kurz die verschiedenen Komponenten der EZM und ihre Interaktionen mit hämatopoietischen Zellen vorgestellt.

Von den verschiedenen Typen der Collagen-Familie werden die Typen I bis VII im Knochenmark synthetisiert (Waterhouse et al., 1986; Klein et al., 1995; Fernández und Minguell, 1996 b). Die dabei am meisten vorkommenden Arten sind Typ I, II und III, die durch ihre fibrilläre Struktur das Rückgrat der EZM bilden, sowie Typ IV, der als Netzwerk zusammen mit Laminin am Aufbau der Basalmembran beteiligt ist (van der Rest und Garrone, 1991). Die Bindung an Collagen erfolgt überwiegend durch das Oberflächenmolekül

CD44, aber auch über β 1-Integrine (McCarthy et al., 1996). Für einige Progenitoren ist beschrieben worden, dass sie an Collagen Typ I binden (Koenigsmann et al., 1992).

Die Bedeutung von Fibronectin, einem fibrillären Glykoprotein, liegt darin, dass es Bindungsdomänen für Zellen und Komponenten der EZM (Proteoglycane und Collagen) besitzt. Dadurch können gleichzeitig Zellen und EZM gebunden und somit vernetzt werden. Die Zelladhäsion erfolgt überwiegend über VLA-5, aber auch über VLA-4, die beide zu den β 1-Integrinen gehören. Im Knochenmark wird Fibronectin durch Endothelzellen und Fibroblasten produziert. Die Bindung der Fibronectin-Rezeptoren auf Progenitoren durch Antikörper führt zu einer Inhibierung der Proliferation, wobei dieser Effekt durch erhöhte Zytokin-Konzentrationen überdeckt wird (Hurley et al., 1995 und 1997; Jiang et al., 2000). Die Adhäsion an Fibronectin führt aber auch zu einem Erhalt der regenerativen Fähigkeiten von *ex vivo* kultivierten Stamm- und Vorläuferzellen (Dao et al., 1998).

Ein weiteres Protein der Extrazellulärmatrix ist Hemonectin, das bisher nur im Knochenmark nachgewiesen wurde (Verfaillie et al., 1994) und an das überwiegend myeloide Vorläuferzellen binden. Es scheint vor allem für die Granulopoiese von Bedeutung zu sein (Campbell et al., 1987; Peters et al., 1990). Wenn Hemonectin nicht exprimiert wird, können Progenitorzellen nicht an stromale Zellen binden (Anklersaria et al., 1991).

Thrombospondin, das von Thrombozyten, Endothelzellen und Fibroblasten produziert wird, weist wie Fibronectin Bindungsdomänen für Komponenten der EZM und Zelloberflächen-Rezeptoren auf. Besonders frühe Progenitoren binden an Thrombospondin, während reifere Zellen, z.B. Erythrozyten, diese Eigenschaft verlieren (Long und Dixit, 1990).

Die Grundsubstanz (Matrix) der EZM wird durch Proteoglykane gebildet, die zu 5% aus Proteinen und 95% aus Polysacchariden, den sogenannten Glykosaminoglycanen (GAG) bestehen (Stryer, 1990). Eine wichtige Funktion der GAG ist die Bindung von Zytokinen, wie sie für IL-3 (Gordon et al., 1987), GM-CSF (Roberts et al., 1988), bFGF (Rapraeger et al., 1991) und MIP-1 α (Tanaka et al., 1993) beschrieben ist. Durch die Aufkonzentrierung von Zytokinen entstehen selektive Kompartimente im Knochenmark, in denen durch Induktion oder Inhibierung die Entwicklung der Hämatopoiese reguliert wird. Die wichtigsten GAG im Knochenmark sind Hyaluronsäure, Chondroitin-, Heparin- und Heparansulfat. Hyaluronsäure, die überwiegend an CD44 auf den Progenitorzellen bindet, fungiert als Adhäsionsmolekül und ist an der Regulation der Hämatopoiese beteiligt (Miyake et al., 1990; Ghaffari et al., 1997; Khaldoyanidi et al., 1999). Heparansulfat spielt eine bedeutende Rolle bei der Unterstützung der frühen hämatopoietischen Vorläuferzellen (Gupta et al., 1996, 1998 und

2000). Heparin- und Chondroitinsulfat fördern *ex vivo* besonders den Erhalt der CD34⁺-Zellen (Madihally et al., 1999).

2.2.5. Regulation über Zytokine

Die Rolle der Zytokine im Verlauf der Hämatopoiese ist mehrfach angesprochen worden. Der Begriff „Zytokine“ umfasst eine weite Gruppe von Peptiden, die von Zellen unterschiedlicher Gewebe synthetisiert werden. Meistens handelt es sich um sekretierte Proteine, aber einige liegen parallel auch in membrangebundener Form vor, wie z.B. der Stem Cell Factor (SCF) (Toksoz et al., 1992).

Im Knochenmark werden die Zytokine überwiegend von den stromalen Zellen, aber auch von akzessorischen und hämatopoietischen Zellen produziert (Linenberger et al., 1995; Lisovsky et al., 1996; Guerriero et al., 1997). Über Membranrezeptoren üben Zytokine selektive und spezifische Signalwirkungen aus, wobei schon Konzentrationen im nano- bis pikomolaren Bereich wirksam sind. Die Signalwirkung der Zytokine kann je nach Konzentration oder Zielzelle sowohl aktivierend als auch inhibierend sein. Dabei werden in den Zielzellen die Prozesse des Wachstums, der Differenzierung, der Adhäsion und der Effektorfunktion durch die Zytokine reguliert (Henschler und Mertelsmann, 1993). Das Überleben von hämatopoietischen Progenitoren ist absolut abhängig von Zytokinen, da die Zellen in ihrer Abwesenheit in Apoptose gehen (Cottner et al., 1994; Keller et al., 1995).

Zytokine haben oft überlappende Wirkungsspektren und wirken synergistisch, wie es z.B. für Interleukin-3 (IL-3) und Interleukin-6 (IL-6) (Koller et al., 1992 a), FLT3 (FL) und Thrombopoietin (TPO) (Petzer et al., 1996) oder SCF (Broudy, 1997) beschrieben ist.

Für die *ex vivo* Kultivierung hämatopoietischer Zellen sind Zytokine unbedingt erforderlich. Während in früheren Kultivierungsansätzen oft ein breites Spektrum an Zytokinen eingesetzt worden ist, ist die Anzahl der Zytokine in neueren Veröffentlichungen reduziert. Dabei wird vielfach eine Kombination aus IL-3, SCF, TPO und FL bzw. nur ein Teil dieser Proteine eingesetzt (Petzer et al., 1996; Piacibello et al., 1997; Murray et al., 1999; Ramsfjell et al., 1999). Aufgrund dieser Datenlage und auf Basis von Voruntersuchungen (Koschmieder, 1998) wurden im Rahmen dieser Arbeit diese Zytokine in Kombination mit einem Antikörper gegen Transforming Growth Factor β (TGF β) verwendet. Eine Beschreibung der wichtigsten Eigenschaften dieser Zytokine ist in Tabelle 2-3 zu finden.

Tabelle 2-3: Wichtigste Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Zytokine

	Interleukin-3 (IL-3)	Stem Cell Factor (SCF)	Thrombopoietin (TPO)	FLT3-Ligand (FL)
Weitere Namen	multi-CSF	c-kit Ligand, Mast cell growth factor	Megakaryocyte growth and development factor	—
Größe	28 kDa	22 kDa	28 kDa	30 kDa
Herkunft	T-Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Monozyten	Stromale Zellen im Knochenmark	Stromale Zellen im Knochenmark	Stromale Zellen im Knochenmark
Zielzellen	Stammzellen, myeloide und erythroide Vorläuferzellen	Stammzellen, myeloide Vorläuferzellen, Mastzellen	Progenitorzellen, Thrombopoiese bis zu Thrombozyten	Stammzellen, myeloide Vorläuferzellen

Die Zytokinrezeptoren müssen mindestens zwei wichtige Funktionen erfüllen, einerseits die spezifische Bindung des zugehörigen Liganden mit hoher Affinität und andererseits die Vermittlung des extrazellulären Signals durch die Zellmembran ins Zytoplasma. Die Spezifität der Bindung wird durch die dreidimensionale Struktur gewährleistet, die durch die besondere Faltung der extrazellulären Domänen aufgebaut wird. Die Signalweiterleitung erfolgt in Form einer intrazellulären Phosphorylierung von Tyrosinresten, an die die verschiedensten Wege der Signalkaskaden anschließen (Krauss, 1997).

Neben membranassoziierten Rezeptoren gibt es für einige Zytokine parallel auch lösliche Rezeptoren, u.a. für IL-6, SCF und TPO. Die Wirkungsmechanismen sind dabei abhängig vom Rezeptortyp verschieden und reichen von kompetitiver Hemmung über die Stabilisierung des Zytokins bis hin zur Verstärkung des Ligandensignals über den membranständigen Rezeptor (Engelmann et al., 1993; Heany und Golde, 1996).

Die Struktur der Rezeptoren der vier in dieser Arbeit verwendeten Zytokine ist in Abbildung 2-8 schematisch dargestellt. Die Rezeptoren für SCF und FL gehören der Immunglobulinähnlichen Rezeptorfamilie an und sind Tyrosinkinase-Rezeptoren. Hier erfolgt die Signalvermittlung über die Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase. Die Rezeptoren von IL-3 und TPO entstammen der Hämatopoietin-Rezeptorfamilie, in der die Signalübertragung über assoziierte Tyrosinkinasen vermittelt wird, die nicht Teil des Rezeptorproteins sind (Grell et al., 1993; Krauss, 1997; Barclay et al., 1997).

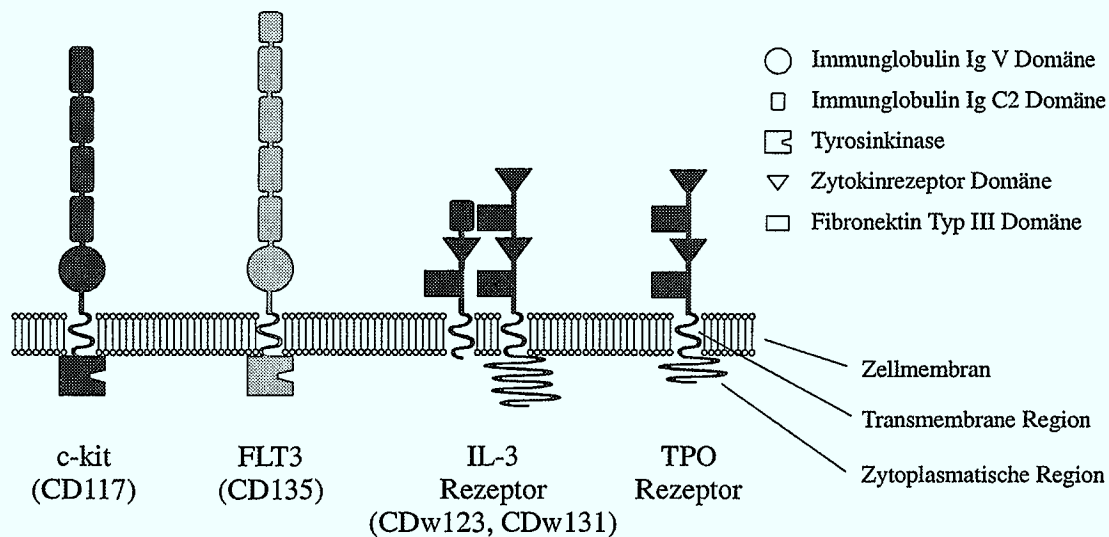


Abbildung 2-8: Zytokinrezeptoren von SCF, FL, IL-3 und TPO (nach Barclay et al., 1997)

Weitere Zytokine, die positiv oder negativ an der Regulation der Hämatopoiese beteiligt sind, sind in Tabelle 2-4 zusammengefasst. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden hier nur die wichtigsten Funktionen gezeigt.

Tabelle 2-4: Weitere Zytokine, die an der Regulation der Hämatopoiese beteiligt sind (nach McAdams et al., 1995)

Positive Faktoren	
Name	Hauptfunktion
Interleukin-1	Verstärkung der Immunantwort durch Zytokininduktion
Interleukin-6	Aktivierung der Stammzellen und der Hämatopoiese
Interleukin-11	Megakaryopoiese, Differenzierung der Stammzellen
Granulocyte-CSF	Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten, Stammzellmobilisierung
Granulocyte macrophage-CSF	Differenzierung früher Progenitorzellen
Macrophage-CSF	Überlebens- und Aktivierungsfaktor für Monozyten und Makrophagen
Erythropoietin	Regulation der Erythropoiese
Negative Faktoren	
Name	Hauptfunktion
Macrophage inflammatory protein 1 α	Inhibierung der Differenzierung
Transforming growth factor β	Inhibitor früher und später Progenitoren
Tumor necrosis factor α	Positive und negative Aktion auf myeloide Progenitoren

In dieser Tabelle ist auch TGF β als negativer Faktor beschrieben, der von stromalen Zellen produziert wird. Durch dieses Zytokin wird der SCF-Rezeptor auf den Progenitorzellen herunterreguliert, wodurch diese Zellen inhibiert werden (Moses und Serra, 1996). Dabei inhibiert TGF β vor allem die LTC-IC und primitiven Vorläuferzellen (Cashmann et al.,

1999). Aus diesen Gründen wurde TGF β in den Versuchen dieser Arbeit durch einen Antikörper abgefangen.

Die Übertragung aller Zytokine mit ihren Wirkungen in den hämatopoietischen Stammbaum ist wegen der hohen Komplexität und den synergistischen bzw. überlappenden Funktionen der Zytokine kaum möglich. Zudem ist die Hämatopoiese ein fließender Prozess, der sich auch durch fließende Veränderungen im Zytokinrezeptor-Muster der verschiedenen Zellen auszeichnet. Dabei zeigen schon graduelle Unterschiede in der Expression einen starken Einfluss auf die Entwicklung der individuellen Zellen (Debili et al., 1995; Lyman und Jacobsen, 1998; Xiao et al., 1999). Der Verlauf der Rezeptorexpression für SCF und FL in der frühen Hämatopoiese ist in Abbildung 2-3 zu verfolgen.

Die genaue Regulation der Hämatopoiese ist bis heute nicht vollständig geklärt. So werden in der neueren Literatur einige Zytokine beschrieben, die die Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen unterstützen und bisher noch nicht oft in Kultivierungen eingesetzt wurden. Darunter fallen die bereits erwähnten Zytokine SDF-1 (Möhle et al., 1998; Kawabata et al., 1999; Hodohara et al., 2000; Lataillade et al., 2000) und VEGF 2 (Eichmann et al., 1997; Ziegler et al., 1999) sowie der Stem Cell Growth Factor (SCGF) (Hiraoka et al., 1997). Vor allem in Stromakulturen werden noch weitere lösliche Faktoren gefunden, wie z.B. der Stem Cell Expansion Promoting Factor (SCEPF) (Shih et al., 2000) oder ein noch nicht näher charakterisierter Faktor, der 1999 von Koller und Mitarbeitern beschrieben wurde. Neben den natürlich vorkommenden Zytokinen werden auch künstliche Faktoren z.B. durch Fusion von Zytokinen oder Zytokinen und ihren löslichen Rezeptoren eingesetzt. PIXY 321 ist ein Zytokin, das aus IL-3 und GM-CSF konstruiert wurde (Curtis et al., 1991; McAlister et al., 1992). Das sogenannte Hyper-IL-6 ist ein Hybrid aus IL-6 und seinem löslichen Rezeptor und zeigte eine stark synergistische Wirkung mit den bisher verwendeten Zytokinen (Fischer et al., 1996; Peters et al., 1998; Rappold et al., 1999). Ein weiteres Beispiel ist das vor kurzem beschriebene Myelopietin, das einen konstruierten Antagonisten für die IL-3- und G-CSF Rezeptoren darstellt (MacVittie et al., 2000).

2.3. Klinische Anwendung hämatopoietischer Zellen

2.3.1. Anwendung

Sowohl hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen als auch reife Blutzellen haben ein breites Anwendungspotenzial in der Medizin. Die wesentlichen potenziellen Applikationen dieser Zellen sind in Abbildung 2-9 zusammengefasst. Dabei ist sowohl der Einsatz von

unmanipulierten als auch von *ex vivo* expandierten blutbildenden Zellen denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit sollen nur die wichtigsten Anwendungsbereiche, die Transplantation und die Gentherapie, erläutert werden.

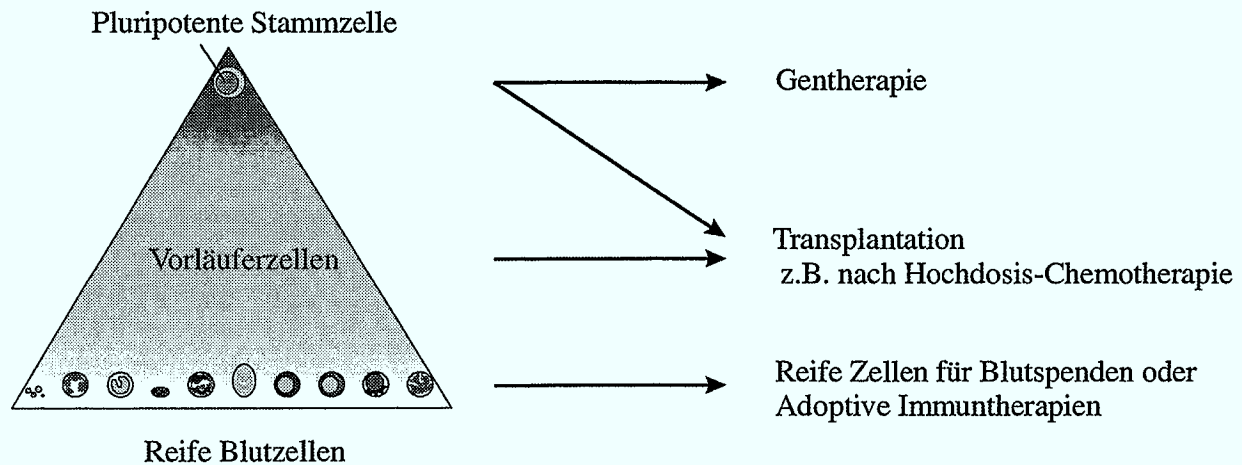


Abbildung 2-9: Potenzielle Applikationen von *ex vivo* expandierten hämatopoietischen Zellen (nach McAdams et al., 1996 c)

Transplantation

Bei einer Krebserkrankung werden oft Hochdosis-Chemotherapien und/oder Strahlenbehandlungen eingesetzt, die auf schnell teilende Zellen eine toxische Wirkung haben. Neben der Reduktion der Krebszellen werden dadurch auch die Zellen des hämatopoietischen Systems angegriffen. Daher ist nach einer solchen Behandlung eine Transplantation hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen erforderlich, um die Rekonstitution des Patienten zu gewährleisten. Die häufigsten Anwendungsgebiete sind hämatologische Krankheiten sowie solide Tumore. Auch bei Autoimmunkrankheiten kann nach starker immunsuppressiver Behandlung eine Stammzelltransplantation erforderlich sein (Burt et al., 1998).

Prinzipiell werden zwei Typen von Transplantationen unterschieden: Die Fremdspende einer verwandten oder nicht verwandten Person (allogen), wobei die Zellen möglichst identisch in den human leukocyte antigens (HLA) sein müssen, oder die Eigenspende (autolog). Die allogene Spende hat den Vorteil, dass keine Krebszellen enthalten sein können und die Zellen nicht durch chemotherapeutische Behandlungen geschädigt sind. Im Gegensatz dazu ist aber auch das Risiko der Graft versus host disease (GVHD) gegeben, bei der die T-Lymphozyten des Spenders die Gewebe des Patienten angreifen, was zum Tod führen kann. Im Gegensatz dazu ist auch ein positiver Effekt der Donor-T-Lymphozyten beschrieben, der Graft versus

Leukemia-Effekt (GVL). Dabei greifen T-Lymphozyten des Spenders Tumorzellen im Patienten an. Ein anderes Problem bei Transplantationen ist der Mangel an neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten, die sogenannte Neutropenie bzw. Thrombopenie, wodurch ein verstärktes Infektions- und Blutungsrisiko herrscht. Durch die Transplantation von Progenitorzellen wird dieser Mangel aufgehoben. Allerdings ist für die vollständige Rekonstitution (Long term engraftment) die Transplantation von Stammzellen absolut erforderlich. Daher muss auch nach einer *ex vivo* Kultur ein Anteil an Stammzellen in der Spende gewährleistet sein.

Vor allem bei autologen Spenden ist das Risiko gegeben, dass sie mit Tumorzellen verunreinigt sind. Deshalb sind verschiedene Methoden des Purgings (Reinigung) entwickelt worden. Da die meisten Tumorzellen das Oberflächenmolekül CD34 nicht exprimieren, ist durch die Selektion der CD34⁺-Zellen eine Reinigung möglich (Lebkowski et al., 1992; Roots-Weiß et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch durch eine Kultivierung der Anteil der Tumorzellen selektiv reduziert wird (Spyridonidis et al., 1998; Lundell et al., 1998). Die Selektion von CD34⁺-Zellen führt aber auch zu Zellverlusten und kann eventuell akzessorische Zellen abtrennen, die positiv auf das Engraftment wirken (McAdams et al., 1996 c). Allerdings ist auch eine reduzierte GVHD durch die Verwendung von CD34⁺-Zellen beschrieben (Boccaccio, 1999).

Nachdem in ersten Versuchen, expandierte hämatopoietische Zellen zu transplantieren, gezeigt worden ist, dass die Zellen keine Toxizität aufweisen (Brugger et al., 1995; Alcorn et al., 1996), wird mittlerweile häufig bei Transplantationen 10-20% der Spende expandiert und zusammen mit den restlichen unmanipulierten Zellen dem Patienten injiziert (Denning-Kendall et al., 1998; Kogler et al., 1999 b). Dadurch wird die Rekonstitution beschleunigt, eventuelle Komplikationen durch Probleme bei der *ex vivo* Expansion umgangen und das Risiko vermieden, Stammzellen durch die Kultivierung zu verlieren.

Gentherapie

Hämatopoietische Stammzellen sind ein ideales Ziel für Gentherapien, da sie einfach zu isolieren sind und die Lebenszeit eines Individuums überdauern. Durch die Produktion von Vorläuferzellen und reifen Blutzellen werden die Modifikationen vervielfacht und verbreitet. Die genetisch veränderten Zielmoleküle reichen dabei von Enzymen (z.B. Adenosin-Deaminase (ADA)) über RNA (antisense-Oligonukleotide), bis hin zu Zytokinen und anderen Regulatoren. Ziele der genetischen Veränderung sind dabei z.B. Aufhebung eines Gendefekts,

Verstärkung von Effektorfunktionen oder Induktion einer Resistenz gegen Viren oder Chemotherapeutika (Krauss, 1995; Nordon und Schindhelm, 1996; Nikol und Höfling, 1996). Es werden verschiedene Strategien des DNA-Transfers eingesetzt. Einerseits kann die reine DNA oder gebunden an Liposomen verwendet werden, wobei diese Methoden eine geringe Integrationseffizienz aufweisen und Liposomen zudem für einige Zellen zytotoxisch sein können. Andererseits kann der DNA-Transfer durch virale Vektorsysteme erfolgen. Dabei werden u.a. retrovirale und adenovirale Systeme unterschieden. Für einen retroviralen Gentransfer ist es erforderlich, dass die Zielzellen im Zellzyklus sind. Durch die Stimulierung der hämatopoietischen Stammzellen während einer *ex vivo* Kultivierung ist demnach eine Verbesserung der Transduktionseffizienz gewährleistet (Krauss, 1995). Adenoviren machen die genetische Modifikation von ruhenden Zellen möglich (McAdams et al., 1996 c), wobei auch in dieser Situation eine Amplifikation der Zellen *ex vivo* für die Therapie von Vorteil ist.

2.3.2. Herkunft der hämatopoietischen Zellen

Es gibt drei verschiedene Quellen, hämatopoietische Stammzellen zu erhalten: Knochenmark, mobilisiertes peripheres Blut und Nabelschnurvenenblut. Der Schwerpunkt liegt hier auf dem Nabelschnurblut.

Knochenmark (KM)

Spenderzellen, die aus dem Knochenmark, dem Ort der Hämatopoiese, stammen, enthalten neben den hämatopoietischen auch stromale Zellen. Die sogenannten Knochenmarkaspirate werden über eine Punktion erhalten, einem relativ aufwendigen Eingriff unter Vollnarkose. Die meisten allogenen Transplantationen werden mit Knochenmark durchgeführt, da der Einfluss einer Stammzellmobilisierung auf einen gesunden Spender nicht bekannt ist und eine erhöhte Gefahr einer GVHD durch die hohe Konzentration der T-Lymphozyten im peripheren Blut gegeben ist (Rowlings, 1999).

Peripheres Blut (PB)

Stamm- und Vorläuferzellen haben die Fähigkeit, als Folge einer Chemotherapie oder einer Zytokindosierung mit G-CSF, GM-CSF oder SCF aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf zu gelangen (McAdams et al., 1996 c; Bearman, 1997). Dieser Prozess wird als Mobilisierung bezeichnet und ist reversibel, da sich die Zellen schnell wieder im Knochenmark ansiedeln. Aus dem peripheren Blut können die Zellen durch eine Leukapherese geerntet werden. Dabei wird das Blut während der Entnahme durch Zentrifugation in verschiedene Komponenten

aufgetrennt. Die Fraktionen, die nicht Teil der Spende sind (Erythrozyten und Plasma) werden dem Spender wieder zugeführt. Die Fraktion der Leukozyten, die die Stammzellen enthält, wird dann als Leukaphereseprodukt für die Transplantation eingesetzt. Da mit dieser Methode relativ wenig Zellen erhalten werden können, muss die Prozedur durchschnittlich 3 mal wiederholt werden.

Die meisten autologen Transplantationen werden mit PB durchgeführt, da der Eingriff für den Patienten weniger belastend ist (Rowlings, 1999). Im Vergleich zu KM und Nabelschnurblut ist eine schnellere Rekonstitution des hämatopoietischen Systems nach einer Transplantation beschrieben (To et al., 1997).

Nabelschnurblut (cord blood, CB)

Seit Gluckman und Mitarbeiter 1989 die erste erfolgreiche Nabelschnurbluttransplantation beschrieben haben, sind bis heute mehr als 1000 allogene Transplantationen mit Zellen aus Nabelschnurblut (CB) erfolgt. Dabei waren über 90% der Patienten Kinder (Kogler et al., 1999 a).

CB zeigt gegenüber den vorher beschriebenen Quellen viele Vorteile. Es ist leicht zugänglich, und es ist kein Eingriff bei der Mutter oder dem Kind erforderlich. Weiterhin ist das Kontaminationsrisiko der Spende mit viralen Pathogenen sehr gering.

Im CB ist ein höherer Anteil hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen (CFC, SRC) als in KM (Wang et al., 1997; Kim et al., 1999) enthalten, die zudem noch ein besseres Proliferationspotential als PB und KM aufweisen (Liu et al., 1999).

Die Zellen im CB unterscheiden sich sowohl physiologisch als auch phänotypisch von Zellen aus KM oder PB (Hao et al., 1995; Mills et al., 1996). Die T-Lymphozyten sind noch naiv und toleranter gegenüber Alloantigenen (Fremdantigenen), weshalb bei Transplantationen viel seltener und in schwächerer Form eine GVHD auftritt. Eine Erklärung ist, dass die MNC aus CB viele inflammatorische Zytokine, die für die Entzündungsprozesse verantwortlich sind, auf deutlich niedrigerem Niveau bilden als im KM (Han und Hodge, 1999). Andere Zytokine, wie z.B. SCF und TPO, werden dagegen 2 bis 4fach so stark synthetisiert als im KM (Cairo und Wagner, 1997).

Der wesentliche Nachteil einer Nabelschnurblutspende liegt in der geringen und begrenzten Zellzahl. Die Anzahl der geernteten Zellen reicht bislang nur für die Transplantation von Kindern aus (Cairo und Wagner, 1997). Eine wichtige Anwendung der *ex vivo* Kultivierung hämatopoietischer Zellen ist demnach die Expansion des Stammzell- und Progenitor-Pools aus Nabelschnurblut, um diese Quelle auch für erwachsene Patienten zugänglich zu machen

(Werte siehe Kapitel 8.3.). Weiterhin wurde eine langsamere Rekonstitution des hämatopoietischen Systems als bei KM- und PB-Transplantationen beobachtet, die aber durch die zusätzliche Gabe expandierter Zellen behoben werden kann (Kogler et al., 1999 b).

2.4. Kultivierung hämatopoietischer Zellen

Die wichtigsten Ziele einer *ex vivo* Expansion hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen sind mehrfach angesprochen worden und werden hier noch einmal kurz zusammengefasst:

- Purgung: Reinigung eines Transplantates von Tumorzellen
- Verbesserung des Engraftments nach einer Transplantation
- Zugänglichkeit von Nabelschnurblut für erwachsene Patienten
- Gentherapeutische Ansätze

Hämatopoietische Zellen, die wie beschrieben *in vivo* einer sehr komplexen Regulation der Proliferation und Differenzierung unterliegen, stellen an die Entwicklung von spezifischen Kultursystemen besonders hohe Anforderungen. Die verschiedenen Ansätze sind in diesem Kapitel erläutert.

2.4.1. Bedeutung der stromahaltigen Kultur

Nachdem 1951 das erste Mal das hämatopoietische System einer mit tödlicher Dosis bestrahlten Maus mit dem Knochenmark einer anderen Maus rekonstituiert worden ist (Lorenz et al., 1951), konnte gezeigt werden, dass dies auch mit einem einzelnen, *ex vivo* generierten Zellklon möglich ist (Ford et al., 1956). Das erste Kultursystem zur Produktion muriner hämatopoietischer Zellen ist 1977 beschrieben worden (Dexter et al., 1977 a und 1977 b). Da viele der heute eingesetzten Zytokine noch nicht bekannt waren und rekombinante Proteine nicht zur Verfügung standen, war eine Kokultur mit stromalen Zellen des Knochenmarks unumgänglich. Nachdem die Bedeutung von Hydrocortison für die Kultivierung hämatopoietischer Zellen erkannt worden ist (Greenberger, 1978), konnte das Kulturprinzip auch auf humane Knochenmarkzellen übertragen werden (Gartner und Kapplan, 1980). In diesen Systemen konnten die Zellen der myeloiden Reihe erhalten werden, wohingegen die lymphoiden Zellen nicht unterstützt wurden. Dies gelang erstmals 1984 in einer murinen Knochenmarkkultur, wo im Gegensatz zur „Dexter-Kultur“ weniger Serum und kein Hydrocortison eingesetzt wurde (Whitlock et al., 1984).

Bis heute sind viele verschiedene Kultivierungsstrategien entwickelt worden. Dabei gibt es zwei grundlegend unterschiedliche Richtungen, die stromahaltige und -freie Kultur (Abbildung 2-10). Bei der stromafreien Kultur muss die Regulation der hämatopoietischen

Zellen über die Supplementierung mit Zytokinen erfolgen, wobei die idealen Bedingungen für den Erhalt der Stammzellen bis heute nicht bekannt sind. Die einzigen erfolgreichen stromafreien Langzeitkulturen gelangen Piacibello und Mitarbeitern (1997, 1998 a, 1998 b, 1999), die in einem Zeitraum von 6 Monaten z.B. eine über 10^5 -fache Vermehrung der CFU-GM nachwiesen. Diese in Gewebekulturplatten erzielten Ergebnisse sind von keiner anderen Arbeitsgruppe reproduziert worden. Der lange Zeitraum, in dem diese Zellmenge produziert wurde, ist zudem für eine klinische Anwendung irrelevant.

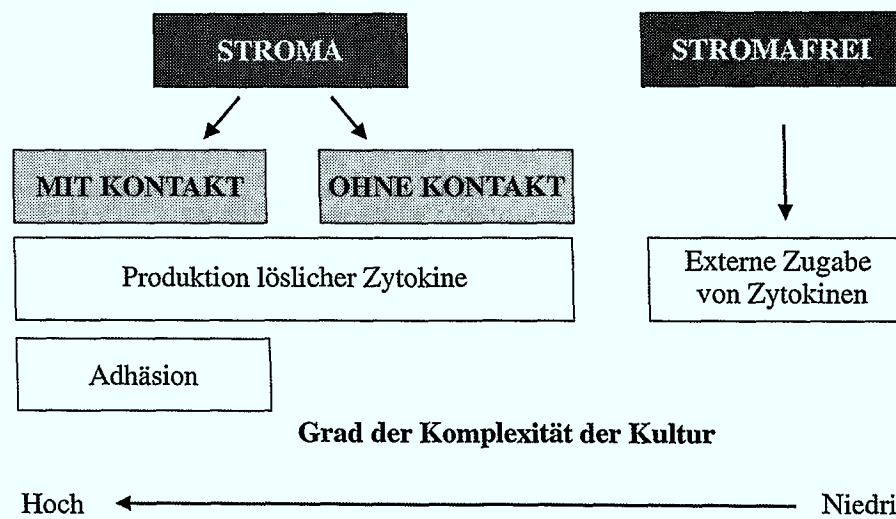


Abbildung 2-10: Verschiedene Kulturstrategien für hämatopoietische Zellen

Die Stromakultur ist ein Überbegriff, der die Kultivierungen mit oder ohne direkten Kontakt mit stromalen Zellen umfasst. Eine Kultur ohne Kontakt kann die Verwendung von konditionierten Medien bedeuten, die alle von stromalen Zellen produzierten löslichen Bestandteile enthalten, oder eine gleichzeitige Kultur hämatopoietischer und stromaler Zellen mit einer räumlichen Trennung z.B. durch eine Membran. Auch bei der Kultur mit direktem Kontakt spielen die löslichen Zytokine eine wesentliche Rolle. Zusätzlich erfolgt eine vielfältige Regulation der zellulären Prozesse durch die Adhäsion (Kapitel 2.2.4.). Bei einer Kokultur mit Kontakt ist es erforderlich, die stromalen Zellen zur Wachstumsarretierung zu bestrahlen, damit sie nicht die hämatopoietischen Zellen überwachsen.

Die Komplexität der verschiedenen Kulturstrategien nimmt vom stromafreien Ansatz bis hin zur direkten Kokultur stark zu, was zu wesentlich höheren Anforderungen an die Prozesskontrolle, Analytik und Zellernte eines Kultursystems für die Kokultur führt. Der wesentliche Vorteil dieser Strategie liegt allerdings darin, dass die natürliche Umgebung der hämatopoietischen Zellen simuliert wird und dadurch die besten Voraussetzungen für den Erhalt und die Expansion der Stamm- und Vorläuferzellen geschaffen sind. Die Bedeutung

der Stromakultur wird nicht zuletzt dadurch deutlich, dass alle Langzeitassays zur *ex vivo* Detektion der Stammzellen auf stromaler Basis durchgeführt werden (Kapitel 2.1.3.).

Die Notwendigkeit des Stromakontaktes wird kontrovers diskutiert (Verfaillie, 1992; Verfaillie und Catanzaro, 1996; Breems et al., 1998 b; Bennaceur-Griscelli et al., 1999; Köhler et al., 1999). Die wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen liegen in der Art der stromalen Zellen und dem Medium bzw. den zugegebenen Zytokinen. Die Ergebnisse einer Kultivierung hängen demnach stark von diesen Faktoren ab. In Tabelle 2-5 sind die wichtigsten stromalen Zelllinien zusammengestellt, deren Verwendung in neueren Veröffentlichungen beschrieben ist.

Neben den Zelllinien wird vielfach auch Stroma aus humanem Knochenmark zur Kultivierung hämatopoietischer Zellen eingesetzt (Koller et al., 1992 a, 1992 b, 1993 b und 1999; Rappold et al., 1999; Köhler et al., 1999).

Tabelle 2-5: Zusammenstellung wichtiger stromaler Zelllinien

Stroma	Ursprung	Kultur	Referenzen
AC6.21	murin	Kontakt und konditioniertes Medium	Shih et al., 1999 und 2000
FBMD-1	murin	Kontakt und konditioniertes Medium	Breems et al., 1997 und 1998 a und 1998 b
HESS-5	murin	Kontakt	Tsuji et al., 1999; Nakamura et al., 1999; Kawada et al., 1999
L87/4, L88/5	human	Kontakt und konditioniertes Medium	Thalmeier et al., 1994; Breems et al., 1997
MS-5	murin	Kontakt	Bennaceur-Griscelli et al., 1999; Tordjman et al., 1999; Nishi et al., 1997
M2-10B4	murin	Kontakt	Lemoine et al., 1988; Sutherland et al., 1991; Meissner et al., 1999
M2-10B4mod., SI/SI	murin	Kontakt	Hogge et al., 1996; Sutherland et al., 1993

Bei Betrachtung der Tabelle 2-5 fällt auf, dass die verwendeten Zelllinien überwiegend murinen Ursprungs sind. Bisher gibt es kaum humane Zelllinien, die den Anforderungen einer Kokultur, wie einer guten Unterstützung der Hämatopoiese und Erhalt der Adhärenz nach Bestrahlung, gerecht werden. Die Bestrahlung der in der Tabelle genannten L87/4 und L88/5 ist sehr unsicher. Diese Stromazellen führen zudem noch zu einer verstärkten Ausdifferenzierung der hämatopoietischen Zellen (Bertolini et al., 1997). Humane Zelllinien weisen im Gegensatz zu murinen meist eine eingeschränkte Fähigkeit zur Proliferation auf. Eine genetische Transformation führt oft zu einem veränderten Zytokinmuster oder zu einer Veränderung der EZM-Struktur, die zu einer verringerten Adhäsion führen kann (Deryugina

und Müller-Sieburg, 1993). Weiterhin ist die Regulation der Seneszenz, der Zellalterung, bei humanen Zellen viel komplexer reguliert als in murinen, weshalb diese Schranken auch schwerer überwunden werden können (Goldstein, 1990).

Eine prinzipielle Schwierigkeit, eine die Hämatopoiese unterstützende stromale Zelllinie zu erhalten, liegt darin, dass im Knochenmark die Stammzellnischen und damit die entsprechenden stromalen Zellen in sehr geringer Frequenz vorkommen.

2.4.2. Kultursysteme für hämatopoietische Zellen

Die meisten Experimente mit hämatopoietischen Zellen werden statisch, also nicht gerührt, in Gewebekulturplatten (Hogge et al., 1996; Piacibello et al., 1997) oder Kultur-Beuteln durchgeführt (Lemoli et al., 1992; Purdy et al., 1995; Giarratana et al., 1998), also in sehr einfachen und unkontrollierten Systemen.

Für stromafreie Suspensionskulturen sind eine Reihe von verschiedenen gerührten Systemen entwickelt und eingesetzt worden, wie Spinner (Zandstra et al., 1994; Kögler et al., 1998; Collins et al., 1998 b; Schmidt, 2000) und kontrollierte Suspensionsreaktoren (Kim et al., 1998; Collins et al., 1998 a; De Léon et al., 1998; Schmidt, 2000).

Aufgrund des Themas dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt dieses Kapitels auf den stromahaltigen Kultursystemen. Wenn in einem solchen System kein Medienwechsel durchgeführt wird, erreichen der pH-Wert und die Konzentrationen von Nährstoffen und metabolischen Nebenprodukten Werte außerhalb der physiologischen Grenzen (Koller und Palsson, 1993). Der Einsatz von konzentrierten Medien mit gleicher Zytokinkonzentration ist vorstellbar, allerdings muss dabei die Löslichkeit der Substanzen und die Osmolalität beachtet werden. Weiterhin werden dadurch auch die Konzentration der Stoffwechselprodukte (z.B. Laktat) ansteigen, was einen negativen Einfluss auf die Zellen ausüben kann (Patel et al., 2000).

Durch Erhöhung der Frequenz des Medienwechsels werden die Medienlimitierungen aufgehoben (Schwartz et al., 1991; Koller et al., 1993 a; Koller et al., 1993 b). Da zudem nachgewiesen wurde, dass durch die Gabe von frischem, serumhaltigem Medium die Vorläuferzellen in den Zellzyklus gebracht werden (Toksoz et al., 1980; Cashman et al., 1985), wurden verschiedene Konzepte kontinuierlich perfundierter Kultursysteme entwickelt. In einfachen Kultursystemen wie Gewebekulturflaschen oder -platten, die nicht kontinuierlich betrieben werden können, erfolgt eine manuelle, intermittierende Ergänzung des Mediums. Die Frequenz des Medienwechsels kann an die Verweilzeiten eines kontinuierlichen Betriebs angenähert werden. Ein halber Medienwechsel pro Tag in einer Gewebekulturplatte entspricht annähernd einer Verweilzeit von 48 h im kontinuierlich betriebenen Reaktor. Der wesentliche

Unterschied liegt darin, dass bei einem manuellen Medienwechsel die Edukt- und Produktkonzentrationen schwanken (Beispiel Abbildung 6-5), wohingegen bei einer kontinuierlichen Kultivierung im stationären Zustand die Konzentrationen konstant sind (Beispiel Abbildung 7-6).

Wie bereits beschrieben, dienen stromahaltige Kulturen der Simulation des Knochenmarks, um die Verständnislücken der Regulation der Hämatopoiese durch das Stroma zu überwinden. Ein wichtiger Aspekt im Knochenmark ist die hohe Zelldichte in einer dreidimensionalen Struktur, weshalb auf vielfältige Art versucht wird, diese *ex vivo* nachzuahmen. Dabei werden überwiegend Konzepte der Immobilisierung verfolgt, bei denen Nylongewebe (Naughton et al., 1987, 1990, 1991 und 1992) und Mikroträger eingesetzt werden (Wang und Wu, 1992; Sardonini und Wu, 1993; Zandstra et al., 1994; Wang et al., 1994 und 1995; Highfill et al., 1995; Schröder, 1997; Meissner et al., 1999; Glowacki et al., 1998; Bagley et al., 1999). Weiterhin wurde auch eine Mikroverkapselung in Alginat verwendet (Levee et al., 1994).

Der in dieser Arbeit verwendete Festbettreaktor basiert auf den Arbeiten von Schröder (1997) und wurde von Schmidt (2000) weiterentwickelt. Das genaue Prinzip ist in Kapitel 3.5.2. erläutert. In Abbildung 2-11 ist der Reaktor im Vergleich zum menschlichen Organismus dargestellt, um die Parallelen zwischen der *in vivo* und *ex vivo* Hämatopoiese zu verdeutlichen. Das Festbett, das aus makroporösen Collagen-Trägern aufgebaut ist, simuliert das Knochenmark. Die Träger bieten den stromalen und hämatopoietischen Zellen eine dreidimensionale Umgebung, die der Struktur im Knochenmark ähnelt. Da Collagen auch ein wichtiger Bestandteil der Extrazellulärmatrix ist, ist auch im Material eine Parallele zum Knochenmark zu sehen. Die Versorgung der Zellen wird durch den Medienumlauf und die kontinuierliche Medienzufuhr gewährleistet, was dem Blutkreislauf im Menschen entspricht. Die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und der Abtransport des Kohlendioxids, die „Atmung“ des Reaktors, erfolgt über ein speziell konstruiertes Begasungsgefäß.

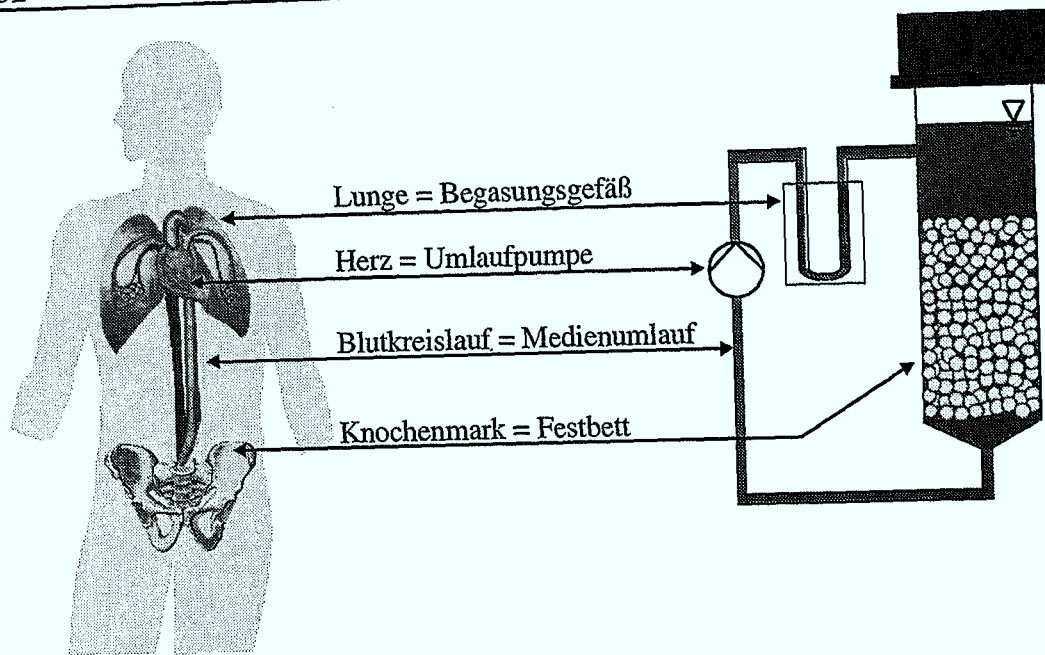


Abbildung 2-11: Der Festbettreaktor als Simulation des menschlichen Organismus

Die wichtigsten Kultursysteme, die in der Literatur für die Kokultivierung hämatopoietischer und stromaler Zellen beschrieben worden sind, sind in Tabelle 2-6 zusammengefasst.

Die Flachbetttechnik ist heute am weitesten entwickelt und wurde unter dem Namen AastromReplicell kommerzialisiert (Aastrom Bioscience, Inc., Ann Arbor, MI, USA). In diesem System sind die Zellen auf einer zweidimensionalen Oberfläche immobilisiert und werden kontinuierlich mit Medium überströmt. Der ursprüngliche Reaktor wurde so weiterentwickelt, dass er auch für stromafreie Kulturen eingesetzt werden kann (Sandstrom et al., 1995 und 1996; Koller et al., 1998 b). In verschiedenen klinischen Studien zur Transplantation nach einer Hochdosis-Chemotherapie wurde dieses kontinuierlich perfundierte System bereits eingesetzt (Bachier et al., 1999; Chabannon et al., 1999 a). Dabei konnten keine Unverträglichkeiten der expandierten Zellen als Transplantat festgestellt werden. Eine starke Expansion der Stamm- und Vorläuferzellen wurde nicht beobachtet (Chabannon et al., 1999 b).

Tabelle 2-6: Zusammenstellung verschiedener Systeme für die Kokultur hämatopoietischer Zellen

Reaktorsystem	Referenz
Spinner	Sardonini und Wu, 1993; Zandstra et al., 1994
Airliftreaktor	Sardonini und Wu, 1993; Highfill et al., 1995
Hohlfaser-Modul	Sardonini und Wu, 1993
Festbettreaktor	Schröder, 1997; Meissner et al., 1999; Schmidt, 2000
Flachbettreaktor	u.a. Koller, 1993 b; Palsson et al., 1993; van Zant et al., 1994

2.4.3. Rahmenbedingungen für Kultivierungsparameter

Die Rahmenbedingungen für einige Parameter der Kultivierung hämatopoietischer Zellen sind speziell untersucht worden. Daher werden die Effekte der Osmolalität, des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdruckes hier kurz zusammengefasst. Der Einfluss von verschiedenen Materialien ist von Schmidt (2000) ausgiebig untersucht und diskutiert worden. Die Auswirkungen verschiedener Zelldichten und Fütterungsstrategien auf die hämatopoietischen Zellen sind sehr von den speziellen Gegebenheiten einer Kultur, wie dem Typ der stromalen Zellen und dem Kultursystem abhängig. Daher ist die Untersuchung dieser Aspekte ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit (Kapitel 6) und wird hier nicht separat behandelt.

Im Gegensatz zu anderen tierischen Zellen sind nicht nur die Effekte der Kulturparameter auf Vitalität, Wachstum und Produktivität, sondern auch auf die Ausdifferenzierung in die verschiedenen Blutzelllinien und die Ansprüche der verschiedenen Reifestadien zu berücksichtigen. Daher ist es bei einer Kultivierung hämatopoietischer Zellen sehr wichtig, die Zielpopulation der Expansion zu definieren und die für diese Population optimalen Bedingungen einzustellen.

Osmolalität

Ein wichtiger Parameter bei der Kultivierung ist die Osmolalität des Mediums. Die Osmolalität (Osmol bezogen auf die Masse des Lösungsmittels) ist in der Zellkultur von großer Bedeutung, da sie einen starken Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat. Dabei ist zu beachten, dass der optimale Wert für jeden Zelltyp unterschiedlich sein kann. Der physiologische Wert für Blut liegt bei 0,3 Osmol/kg (Waymouth, 1970). Für die Kultivierung hämatopoietischer Zellen konnte ein Optimum von 0,31-0,32 Osmol/kg ermittelt werden (Schmidt, 2000), wobei die Werte für die erythroiden Vorläufer höher liegen als für die CFU-G/M. Da sich im Knochenmark verschiedene Nischen ausbilden, ist anzunehmen, dass in jedem spezifischen Kompartiment die für die jeweilige Progenitorzelle optimalen Bedingungen herrschen.

pH-Wert

Untersuchungen über den pH-Wert zeigen, dass wie bei der Osmolalität für verschiedene Progenitorzellen verschiedene Optima zu finden sind. So wurde für die Kultivierung von CFU-G/M ein optimaler Bereich von pH 7,2 bis 7,4 ermittelt, wobei das Optimum bei einem pH-Wert von 7,35 lag (McAdams et al., 1996 a und 1996 b). Für die erythroide Differenzierung wurde ein optimaler Wert von 7,6 gefunden, wohingegen bei einem pH unter

7,1 die erythroiden Progenitoren noch vital sind und die Differenzierung inhibiert ist (McAdams et al., 1998 und 1996 b). Wie bereits in Kapitel 2.2.3. beschrieben, ist bekannt, dass die Regulation der Hämatopoiese auch durch pH-Gradienten im Knochenmark gesteuert wird (Hevehan et al., 2000).

Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) spielt sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* eine wichtige Rolle, da ein wichtiger Regulationsmechanismus der Hämatopoiese der pO_2 -Gradient im Knochenmark ist. Es ist mehrfach beschrieben worden, dass ein Sauerstoffpartialdruck von 25% Luftsättigung vor allem die Kultivierung früher Vorläuferzellen unterstützt (Smith und Broxmeyer, 1986; Koller et al., 1992 a, 1992 b und 1992 c). Für diesen Effekt sind verschiedene Ursachen ermittelt worden. So konnte gezeigt werden, dass bei niedrigerem pO_2 myeloide Zellen weniger O_2^- und H_2O_2 produzieren und somit die oxidative Schädigung der Zellen reduziert wird (Meagher et al., 1988). Weiterhin weisen BFU-E bei niedrigem pO_2 eine höhere Affinität zu EPO (Rich, 1982) und Makrophagenvorläuferzellen eine höhere Affinität zu M-CSF (Broxmeyer et al., 1990) auf. Während diese Effekte vermutlich auf einer veränderten Expression oder Affinität der Zytokinrezeptoren beruhen, ist auch ein Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Produktion von Zytokinen durch Makrophagen beschrieben (Rich, 1986).

3. Material und Methoden

3.1. Arbeiten mit primären Zellen

3.1.1. CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurvenenblut

Die humanen hämatopoietischen Zellen, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, stammten aus Nabelschnurvenenblut. Das Blut von gesunden, vollentwickelten Neugeborenen wurde mit dem Einverständnis der Mutter nach der Geburt aus der abgeklemmten und schließlich durchtrennten Nabelschnur steril entnommen. Die Blutentnahme erfolgt durch einfaches Ausstreichen der Nabelschnur in ein Zentrifugenröhrchen, in das 1 mL einer Heparin-PBS-Lösung vorgelegt wird. Diese Lösung enthält neben Heparin zusätzlich Theophyllin und Adenosin, um die Adhäsion der Thrombozyten an die Mononukleären Zellen (MNC) zu verhindern (Thoma et al., 1994). Durch eine solche Anlagerung würde die Aufreinigung und Charakterisierung der MNC gestört. Für die Aufarbeitung wurde nur Blut eingesetzt, das maximal 24 h alt war und ein Volumen von 20 mL nicht unterschritt. Von den Vollblutproben und den aufgereinigten Subpopulationen wurden jeweils Steriltests angelegt.

Aufreinigung der Mononukleären Zellen (MNC)

Im ersten Aufarbeitungsschritt werden aus dem heparinisierten Nabelschnurblut, das mit PBS (mit Adenosin und Theophyllin) im Verhältnis 1:3 verdünnt wurde, die MNC über Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. Dabei werden zuerst 20 mL Ficoll, ein Trennmedium mit definierter Dichte von 1,077 g/mL, vorgelegt und vorsichtig mit maximal 30 mL des Blut/PBS-Gemisches überschichtet. Nach 30minütiger Zentrifugation (400 x g, 20°C) bildet sich ein Gradient aus. Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine höhere Dichte als das Trennmedium und sedimentieren als dunkelrotes Pellet, während die MNC in einer dünnen, weißen Bande (buffy coat) über dem Trennmedium zu finden sind. Oberhalb dieser Bande befindet sich das gelbliche Blutplasma, das noch Thrombozyten enthält. Die obere Plasmaphase wird bis zur MNC-Bande verworfen und dann die MNC abgezogen. Nach zwei Waschschritten mit PBS und Aufnahme der MNC in 1 mL PBS werden 2 mL einer Bovinen Serum-Albumin (BSA)-Lösung mit der Zellsuspension überschichtet und abzentrifugiert (200 x g, 10 min, 20°C). Dieses sogenannte BSA-Kissen dient der Abtrennung noch vorhandener Thrombozyten in der Zellsuspension, da sie eine geringere Dichte als die MNC haben und nicht durch die Zentrifugation im Pellet angereichert werden (Thoma et al.,

1994). Nach Wiederholung dieses Schrittes werden die Zellen in 1 mL Puffer aufgenommen und können als MNC kultiviert, zu CD34⁺-Zellen aufgereinigt oder kryokonserviert werden.

Isolierung der CD34⁺-Zellen

Die Magnetische Hochgradienten-Separationsmethode (MACS) basiert auf der Kombination von immunologischen Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Antigen und einer physikalischen Separation über ein Magnetfeld. Antikörper, die an kolloidale, magnetische Partikel (Durchmesser 50 nm) gebunden sind, markieren Oberflächenmoleküle spezifischer Zellen und werden in solchen Konzentrationen eingesetzt, dass die Bindung im Sättigungsbereich liegt. Die kolloidalen Partikel und damit die gebundenen Zellen werden magnetisch in einer Trennsäule festgehalten und die restlichen Zellen ausgespült. Die Trennsäule ist mit einer ferromagnetischen Matrix gepackt und wird in einer magnetischen Halterung positioniert. Durch die Matrix wird der Gradient des Magnetfeldes erhöht, was zur Anziehung und Bindung der durch die geringe Größe schwach magnetischen Partikel führt (Miltyi et al., 1990; Scheffold et al., 1996). Durch Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld verlieren die Partikel ihre Magnetisierung, und die Zellen können ausgespült werden.

Es gibt zwei Strategien zur Zell-Separation: Positiv- und Negativselektion. Bei der Positivselektion werden Zellen mit dem gewünschten Oberflächenmolekül über einen spezifischen Antikörper markiert und dadurch aus der Zellsuspension isoliert. Werden demgegenüber alle Zellen markiert und im Magnetfeld zurückgehalten, die das gesuchte Merkmal nicht tragen, spricht man von Negativselektion oder Depletion. Dann befindet sich die Zellpopulation mit dem gewünschten Charakteristikum im ersten Eluat der Säule. Die Positivselektion setzt voraus, dass es gegen das gewünschte Merkmal einen monoklonalen selektiven Antikörper gibt und eine Antigen-Antikörperreaktion keinen negativen Einfluss auf die Zielpopulation ausübt, wie es z.B. für die Bindung von anti-CD4 Antikörpern an CD4⁺-Lymphozyten beschrieben ist (Howie et al., 1994). Für die Positivselektion werden zwei verschiedene Strategien der Markierung eingesetzt: direkte und indirekte Markierung. Die direkte Markierung zeichnet sich dadurch aus, dass die magnetischen Partikel direkt an den Antikörper gegen das gesuchte Merkmal gebunden sind. Bei der indirekten Markierung wird zunächst ein Antikörper gegen das gewünschte Antigen eingesetzt, an den z.B. Haptene gekoppelt sind (Abbildung 3-1). Die magnetischen Partikel sind an einen zweiten Antikörper gebunden, der die Haptene als Antigen erkennt und bindet. Diese Art der Markierung dient dazu, das magnetische Signal zu verstärken, um Zellen mit schwach exprimierten Oberflächenmarkern, wie CD34, mit guter Spezifität und Ausbeute aufzureinigen zu können.

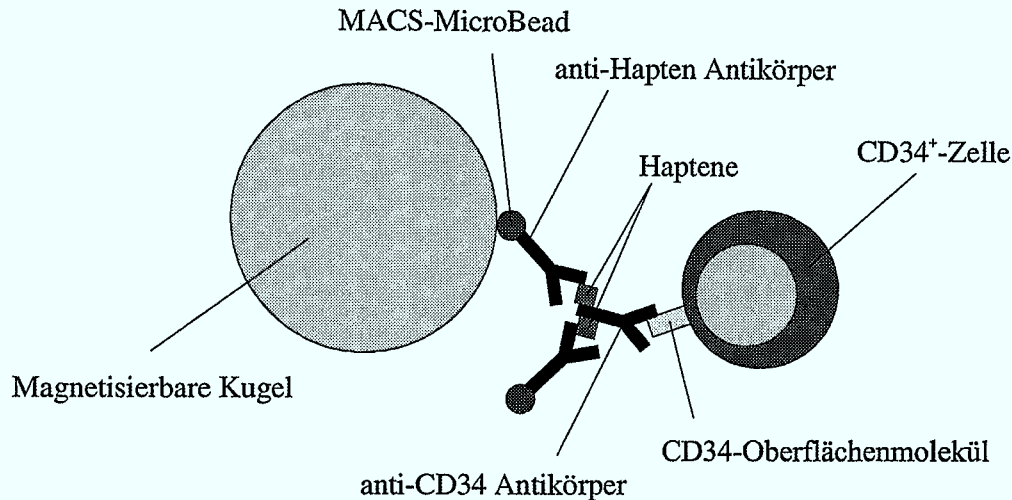


Abbildung 3-1: Indirekte MACS-Markierung von CD34⁺-Zellen

Zur Isolierung der CD34⁺-Zellen wurde das CD34 Progenitor Cell Isolation Kit eingesetzt (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), das auf dem Prinzip der indirekten Markierung basiert. Für CD34 sind drei verschiedene Epitope beschrieben, die sich in ihrer Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber verschiedenen Enzymen unterscheiden (Greaves et al., 1995). Es ist bei einer Aufreinigung mit MACS darauf zu achten, dass der Antikörper, der zur Selektion verwendet wird, nicht das gleiche Epitop erkennt wie der für die durchflusszytometrische Analyse (Kapitel 3.7.2.). Der im Kit enthaltene Hapten konjugierte anti-CD34 Antikörper entstammt dem Klon QBEND/10 und erkennt das Epitop Klasse II, während der für die Durchflusszytometrie eingesetzte Antikörper (Klon 581) an das Klasse III Epitop bindet. Die Aufreinigung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei zwei Säulen nacheinander verwendet wurden.

Kryokonservierung

Die Versuche mit hämatopoietischen Zellen wurden mit kryokonservierten Proben durchgeführt. Die aufgereinigten Zellen werden zur Lagerung nach einer Zentrifugation (200 x g, 10 min, 20°C) in 1 mL FBS mit 10% DMSO aufgenommen und in einem Einfriergefäß mit einer Einfrierrate von 1°C/min bei -80°C eingefroren. Durch Änderungen der Kryoprotektiva und der Einfrierraten konnte keine Verbesserung der Ausbeute und Vitalität der Zellen nach dem Auftauen erzielt werden (Pasch et al., 1999). Nach 24 h werden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt. Für Zellen aus Knochenmark und Nabelschnurblut konnte nachgewiesen werden, dass nach 33 Jahren Lagerung in flüssigem Stickstoff noch über 80% der Zellen vital sind und die volle biologische Aktivität aufweisen (Sumida et al., 1999).

Zum Auftauen werden die Proben zuerst im Wasserbad (37°C) erwärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu erkennen ist. Anschließend erfolgt die Zugabe des Auftaumediums (IMDM, 10% FBS) nach dem in Tabelle 3-1 beschriebenen Protokoll.

Tabelle 3-1: Zugabe von Frischmedium zum schonenden Auftauen hämatopoietischer Zellen

Zeitpunkt nach dem Auftauen [min]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Medienmenge [mL/mL Zellsuspension]	0,1	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75

3.1.2. Primäres Stroma aus Knochenmark

Die stromalen Zellen wurden am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main aus dem Knochenmark eines gesunden Spenders isoliert. Nach Isolierung der MNC (Kapitel 3.1.1.) und einer zweistündigen Plastikadhärenz werden die nicht adhärennten Zellen durch mehrfaches Waschen mit Medium entfernt. Zur Kultivierung wird dem Medium der Wachstumsfaktor basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, 2 ng/mL) zugegeben und wöchentlich ein halber Medienwechsel durchgeführt. Nach 3-4 Wochen sind die stromalen Zellen konfluent und können passagiert werden. Dazu wird der Zellrasen nach einem Waschschrift mit PBS mit Trypsin nach einer Inkubation bei 37°C abgelöst. Anschließend werden die Zellen in serumhaltiges Medium aufgenommen, um das Trypsin zu inhibieren. Nach Bestimmung der Zellzahl können sie verdünnt und wieder in Kultur genommen werden (Dooley et al., 1995; Oostendorp et al., 1997). Die Kryokonservierung erfolgt wie bei CD34⁺-Zellen (Kapitel 3.1.1.) mit einem vereinfachten Auftauprotokoll. Dabei werden die Zellen mit dem Einfriermedium in frisches Medium überführt. Nach Adhärenz der Zellen wird das Medium vollständig entfernt und durch frisches ersetzt.

3.2. Zelllinien

3.2.1. Hämatopoietische Zelllinie KG-1

Die humane kontinuierliche Zelllinie KG-1 wurde aus dem Knochenmarkaspirat eines 59jährigen, weißen Mannes etabliert. Der Patient litt zunächst an einer Erythroleukämie, die sich zu einer akuten myeloischen Leukämie weiterentwickelte (Koeffler und Golde, 1978). Diese Zelllinie stammt von einer frühen myeloiden Vorläuferzelle ab. Besondere Merkmale sind, dass sie den Oberflächenmarker für frühe hämatopoietische Zellen trägt (CD34), aber nicht zytokinabhängig ist, wie z.B. die humane Zelllinie Mo7e (Avanzi et al., 1988). Diese Eigenschaften machen sie zu einer idealen Modellzelllinie für Versuche, bei denen der

Einsatz von Primärmaterial durch zu hohe Mengen benötigten Zellmaterials oder große Medienvolumina eingeschränkt ist. Weiterhin werden unter anderem CD33, CD45 (Pasternak und Pasternak, 1994), CD38, CDw123 und HLA-DR exprimiert. KG-1 wächst in Suspension (IMDM, 10% FBS), wobei eine minimale Zelldichte von $2 \cdot 10^5$ c/mL erforderlich ist. Das Einfrieren der Zellen erfolgt wie für MNC (Kapitel 3.1.1.). Nach dem Auftauen wird durch Zentrifugation (10 min, 200 x g) das Einfriermedium entfernt, und die Zellen können in frisches Medium aufgenommen werden.

KG-1 ist über die American Type Culture Collection (ATCC) (Nummer: CCL-246) erhältlich.

3.2.2. Stromale Zelllinien

Es sind drei murine, stromale Zelllinien (M2-10B4, M2-10B4 mod., SI/SI; mod. = modifiziert) für die Kokultur eingesetzt worden (Kapitel 2.4.1.).

Als Medium wird IMDM mit 10% FBS verwendet. Für die Kultivierung ist eine Zelldichte von mindestens $2 \cdot 10^3$ c/cm² einzusetzen. Wenn die Zellen konfluent gewachsen sind (bis zu $2 \cdot 10^5$ c/cm²), werden sie mit Trypsin in Suspension gebracht (Kapitel 3.1.2.) und verdünnt wieder in Kultur genommen. Für die Stammhaltung ist die Verdünnung von bis zu 1:50 möglich, während für eine schnelle Expansion die Zellen geringer verdünnt wird (z.B. 1:3). Da die beiden Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI gentechnisch verändert sind, ist es erforderlich, diese Modifikationen, an die Antibiotikaresistenzen gekoppelt sind, durch den Einsatz von antibiotikahaltigen Selektionsmedien (Zusammensetzung siehe Anhang) bei jeder zweiten Passage stabil in den Zellen zu erhalten (Hogge et al., 1996).

Die Kryokonservierung erfolgt wie bei primärem Stroma (Kapitel 3.1.2.). Nach dem Auftauen der modifizierten Zellen wird Medium ohne Antibiotika eingesetzt und erst nach der 3. Passage die Kultivierung in Selektionsmedium begonnen. Die Zelllinien können ca. 6 Monate in Kultur gehalten werden. Dann wird eine kryokonservierte Probe neu in Kultur genommen. Zum Einsatz von stromalen Zelllinien in der Kokultur mit hämatopoietischen Zellen ist die radioaktive Bestrahlung des Stromas mit 80 Gy zur Wachstumsarretierung erforderlich.

Die stromale Zelllinie M2-10B4 ist über die ATCC (CRL-1972) erhältlich und die beiden modifizierten stromalen Zelllinien stammen von der Firma CellSystems (St. Katharinen).

3.3. Medien

Die Basalmedien, Seren und sonstigen Medienbestandteile, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind kommerziell erhältlich und wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die

Lagerung von Medien, die zur Stammhaltung benötigt werden oder in der Vorlageflasche an einen Reaktor angeschlossen sind, erfolgt bei 4°C.

3.3.1. Kulturmedien

Es sind verschiedene Medien für die stromahaltige und stromafreie Kultivierung von hämatopoetischen Zellen eingesetzt worden, die serumhaltig oder serumfrei sind (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Übersicht über die eingesetzten Medien

Medium	Fötales Rinderserum	Pferdeserum	Basalmedium	Anwendung
LTC	12,5%	12,5%	IMDM	Stromazelllinien, hämatopoietische Zellen
P-LTC	12,5%	12,5%	McCoy's 5a	Primäres Stroma, hämatopoietische Zellen
X-Vivo 10	-	-	X-Vivo 10	Stromazelllinien, primäres Stroma, hämatopoietische Zellen

Als Standard wurde das LTC-Medium eingesetzt. Das dafür verwendete Basalmedium Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Aminosäuren, Vitaminen und D-Glukose aus. McCoy's 5a hat deutlich niedrigere Konzentrationen dieser Komponenten und wird deshalb mit vielen Substanzen supplementiert (Anhang). X-Vivo 10 ist ein Medium, das serumfrei verwendet wird und speziell für die humane Zellkultur entwickelt wurde. Die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt, aber eigene Messungen ergaben, dass die Aminosäuren dem Basalmedium IMDM entsprechen.

3.3.2. Serum

Der flüssige Bestandteil des Blutes, der ca. 55% des Gesamtblutes ausmacht, wird als Plasma bezeichnet. Aus dem Plasma, das in der Zellkultur eingesetzt wird, sind die zellulären Bestandteile abgetrennt und gerinnungshemmende Mittel beigelegt. Als Serum wird der flüssige Bestandteil nach Gerinnung des Blutes bezeichnet. Durch die Gerinnung werden die korpuskulären Bestandteile (Zellen) und einige molekulare Substanzen (v.a. Fibrinogen) aus der Flüssigkeit entzogen (Hildbrandt, 1994).

Es wurde Fötales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS) und Pferdeserum (horse serum, HS) eingesetzt. Seren beinhalten Substanzen, die auf das Zellwachstum einen positiven Effekt ausüben. Serumhaltiges Medium bringt auch Nachteile mit sich, weil es nicht eindeutig definiert ist und die Zusammensetzung je nach Charge qualitativ und quantitativ schwanken kann. Da nicht alle Komponenten bekannt sind, können z.B. durch unerkannte Wachstumsfaktoren die Zellen unkontrolliert und unerwünscht stimuliert oder inhibiert

werden (Lindl und Bauer, 1994). In eigenen Messungen konnte eine hohe Konzentration für Laktat (16,3 mM in FBS und 5,5 mM in HS) ermittelt werden. Aus diesen Gründen ist es für eine klinische Anwendung von Vorteil, wenn sie mit serumfreiem Medium durchführbar ist. In den meisten Protokollen zur Kokultur stromaler und hämatopoietischer Zellen wird aber nicht auf Serum verzichtet, da es wichtige Faktoren für die Zelladhäsion zur Verfügung stellt. Wenn bei der Benutzung von Seren ein Chargenwechsel erfolgt, ist es erforderlich, verschiedene Chargen gegeneinander zu testen und mit dem vorher eingesetzten Serum zu vergleichen. Für HS ist eine Variation zwischen verschiedenen Chargen, gemessen am proliferativen Einfluss auf CFU-GM, von 20% und für FBS sogar von über 40% nachgewiesen worden (Koller et al., 1998 a).

3.4. Zytokine und Antikörper

Die eingesetzten humanen Zytokine werden alle von rekombinanten Mikroorganismen produziert. Die verwendete Standard-Zytokinkombination ist in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Tabelle 3-3: Standard Zytokin- bzw. Antikörperkombination zur Kokultur

Zytokin bzw. Antikörper	Konzentration	Hersteller
IL-3	10 ng/mL	Sandoz, Nürnberg
TPO	20 ng/mL	CellSystems, St. Katharinen
FL	50 ng/mL	CellSystems, St. Katharinen
SCF	50 ng/mL	CellSystems, St. Katharinen
anti-TGFβ	100 ng/mL	R&D Systems, Wiesbaden

Für die Kultivierung von primärem Stroma wurde der Wachstumsfaktor bFGF eingesetzt, der von der GBF in Braunschweig zur Verfügung gestellt wurde.

Die lyophilisierten Zytokine und Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers gelöst und in 0,5 mL Aliquots bei -20°C gelagert. Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.5. Kultursysteme

3.5.1. Gewebekulturgefäße

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Stammhaltung und Expansion der Zelllinien Gewebekulturflaschen (25 cm² und 75 cm² Oberfläche) verwendet, die mit maximal 10 bzw. 30 mL Medium gefüllt wurden.

Für die MC-Assays (Kapitel 2.1.3. und 3.7.3.) wurden 35 mm Gewebekulturschalen eingesetzt, von denen jeweils 2 in eine 94 mm Gewebekulturschale gesetzt wurden. Sie enthielt zusätzlich ein kleines Gefäß mit sterilem Wasser, um Verdunstungseffekte

auszuschließen. Die Langzeit-Assays (CAFC und LTC-IC, Kapitel 2.1.3. und 3.7.3.) wurden in Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Für Screeningversuche im kleinen Maßstab und als Basis des Miniatur-Schlaufenreaktors sind Platten mit 12 Vertiefungen eingesetzt worden. Eine Alternative zu solchen Systemen ist ein Kultur-Beutel aus Teflon, in den Zellen über eine Spritze inokuliert werden können.

Die Begasung dieser Systeme erfolgt diffusiv über die Medienoberfläche im Brutschrank.

3.5.2. Der Festbettreaktor

Der prinzipielle Aufbau des Festbettreaktors ist in Abbildung 3-2 dargestellt. Der Kultivierungsraum des Reaktors besteht aus einer Glasröhre, die am unteren Ende mit einem Flansch versehen ist, in den ein Haltesieb eingeklemmt wird. Zusammen mit diesem Sieb ist eine zweite Lage aus einem Kunststoffgewebe (Quadratmaschengewebe, Maschenweite 40 μm) festgespannt. Auf dieser zweilagigen Haltevorrichtung bilden die Mikroträger in einer Kugelschüttung das Festbett, ohne in den Umlauf gelangen zu können.

Das Festbett wird durch eine peristaltische Pumpe im externen Umlauf mit Medium durchströmt. Die Perfusion des Reaktors erfolgt durch kontinuierliches Einleiten von Frischmedium in den Umlauf. Oben an der Reaktorröhre wird durch einen Überlauf das verbrauchte Medium abgeführt. Das Umlaufverhältnis U (Volumenstrom im Zulauf bezogen auf den Volumenstrom im Umlauf) beträgt bei der üblichen Betriebsweise für hämatopoietische Zellen ca. 0,001, was dem Verhalten eines idealen Rührkessels entspricht ($U > 0,5$). Daher ist eine Kurzschlussströmung von frischem Medium direkt aus dem Umlauf in den Überlauf auf einen sehr geringen Wert reduziert. Weiterhin sind in den Umlauf die Messtechnik (pH- und pO_2 -Sonde) und ein spezielles Begasungsgefäß integriert. In diesem Gefäß erfolgt die Begasung diffusiv über dünnwandige Silikonschläuche. Die übrigen Leitungen sind aus Maprene-Schläuchen gefertigt, die keine Diffusion über die Schlauchwand zulassen. Dadurch wird gewährleistet, dass die Begasung ausschließlich kontrolliert über das Begasungsgefäß erfolgt, und dass ein Ausgasen über die Leitungen im Umlauf verhindert wird.

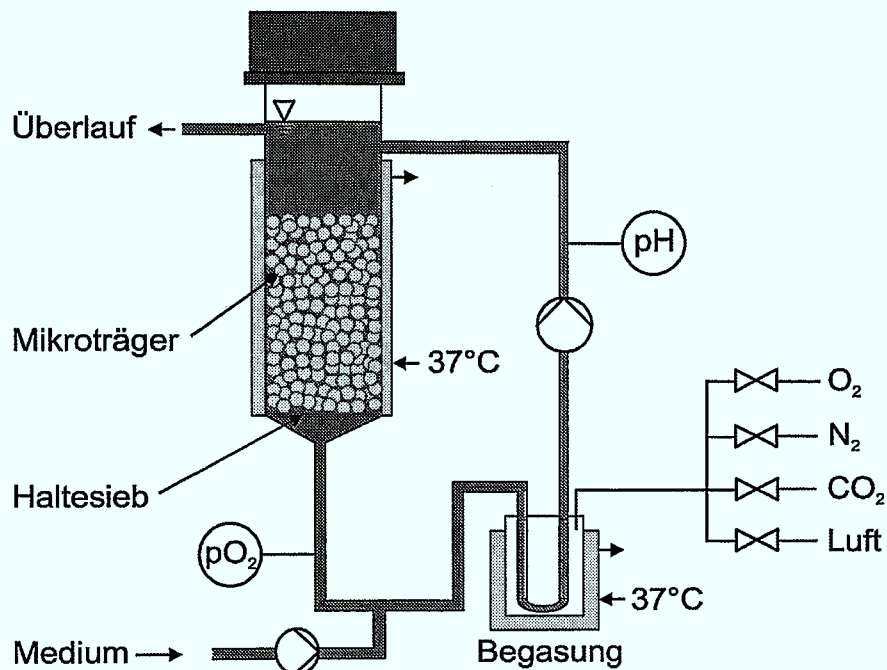


Abbildung 3-2: Der Festbettreaktor

Dieser Festbettreaktor zeichnet sich besonders durch das günstige Verhältnis von Gesamtvolumen (28 mL) zum Trägerschüttvolumen (10 mL) von 2,8 aus. Das hat den Vorteil, dass das Volumen an zytokinhaltigem Medium möglichst gering gehalten werden kann, was unter finanziellen Aspekten eine wesentliche Rolle spielt. Weiterhin werden so vom Stroma produzierte Wachstumsfaktoren stärker aufkonzentriert, wodurch eine bessere Stimulierung der hämatopoietischen Zellen gewährleistet ist.

Dieses System wird vor seinem Gebrauch autoklaviert und mindestens 24 h mit antibiotikafreiem Kulturmedium unter Kulturbedingungen einem Steriltest unterzogen. Die Träger werden im Kulturmedium im Brutschrank auf ihre Sterilität getestet. Nach dem Steriltest wird das Medium im Reaktor durch frisches ersetzt, die Träger in den Reaktor überführt und die Kultivierung gestartet. Die Mess-Elektroden werden vor dem Start der Kultur nach den Angaben des Herstellers kalibriert. Bei der pH-Einstab-Messkette erfolgt die Kalibrierung vor dem Sterilisieren und bei der amperometrischen Sauerstoff-Elektrode, die nach dem Clark-Prinzip funktioniert, während des Steriltests. zeigt den Aufbau des Festbettreaktors. Die Durchflussraten sind jeweils bei den einzelnen Versuchen in Kapitel 5 und 7 angegeben.

Das Inokulum wird in einem kleinen Medienvolumen (2 mL) aufgenommen und mit einer Glaspipette im Festbett verteilt. Die Probenahme erfolgt ebenfalls mit einer Glaspipette, wobei zuerst 2 mL Medium und anschließend ungefähr 1 mL Träger zur Analyse aus dem Reaktor entnommen werden.

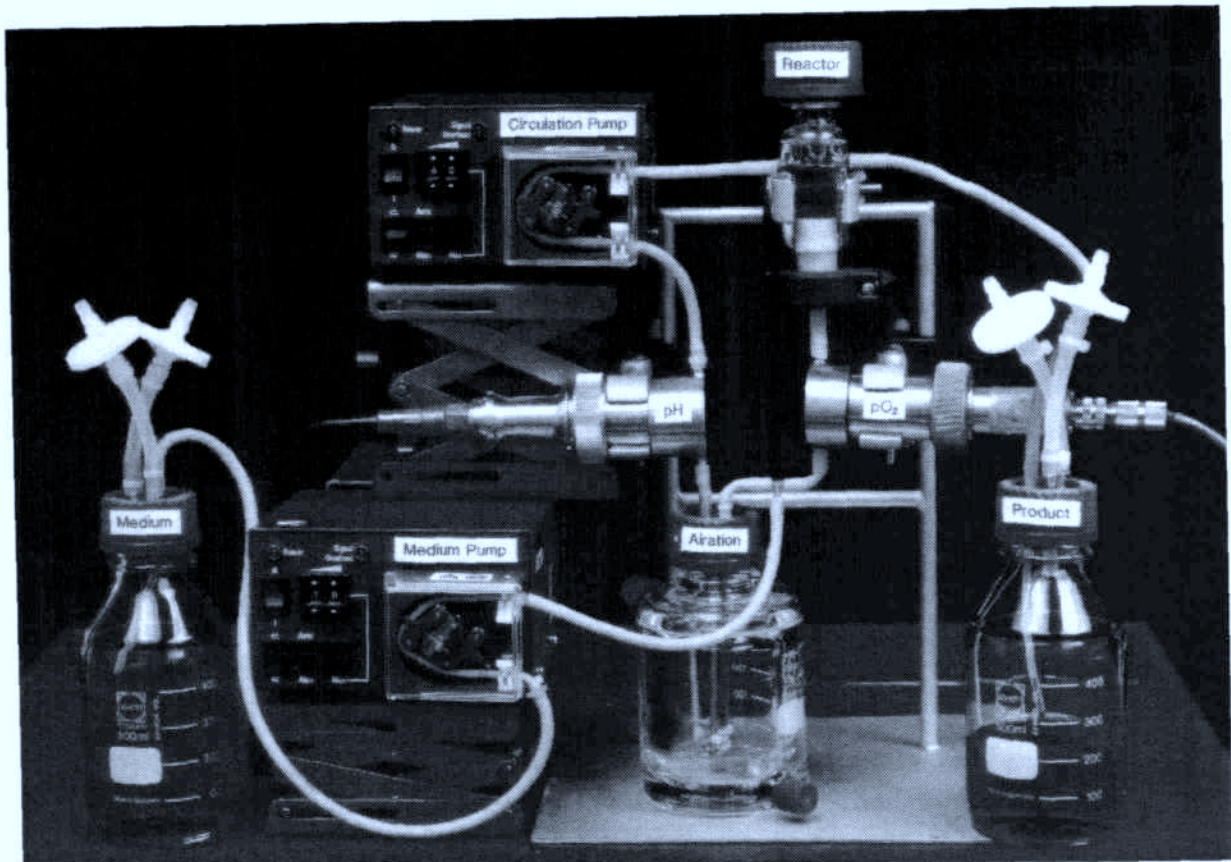


Abbildung 3-3: Aufbau des Festbettreaktors

3.5.3. Der Miniatur-Schlaufenreaktor

Zwei Aspekte bei der Kultivierung blutbildender Zellen schränken das experimentelle Arbeiten ein, einerseits die geringe Zellzahl pro Blutspende und andererseits die Spendervariabilität. Der Festbettreaktor ist mit einem Trägerschüttvolumen von 10 mL auf die Kultivierung der Zellen aus einer Spende ausgelegt und eignet sich daher nicht für das Testen verschiedener Parameter. Aus diesem Grund wurde ein neues miniaturisiertes System entwickelt, das vergleichbare Bedingungen wie der Festbettreaktor bietet, um mit einer möglichst geringen Zellzahl vergleichende Untersuchungen im immobilisierten, dreidimensionalen System zu ermöglichen, der Miniatur-Schlaufenreaktor. Das Grundprinzip ist Abbildung 3-4 dargestellt.

In einem Einsatz aus rostfreiem Edelstahl liegen die Mikroträger mit einem Schüttvolumen von 1 mL als Festbett auf einem Sieb. Dieses Haltesieb weist einen gebördelten Rand auf, wodurch es beim Einlegen in den Einsatz festgeklemmt wird und am Rand gegen das Durchfallen von Trägern abgedichtet ist. Der Einsatz, der mit drei Stützen versehen ist, ist so dimensioniert, dass er in die Vertiefung einer handelsüblichen Gewebekulturplatte mit 12 Vertiefungen passt. Am Boden der Vertiefung liegt ein Magnetrührstab (7 x 2 x 2 mm), durch den das Medium in einer schlaufenförmigen Strömung bewegt wird. So wird das Festbett

kontinuierlich mit Medium durchströmt, wodurch Medien- und Sauerstofflimitierungen im Inneren der Schüttung vermieden werden. Abbildung 3-5 zeigt (von links nach rechts) die Träger, das Haltesieb, den Edelstahlinsert und den Magnetrührstab.

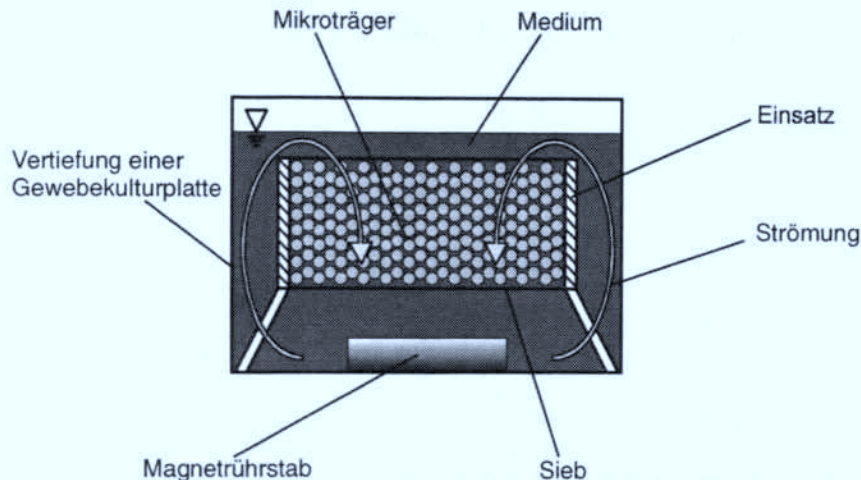


Abbildung 3-4: Aufbau des Miniatur-Schlaufenreaktors (Querschnitt)

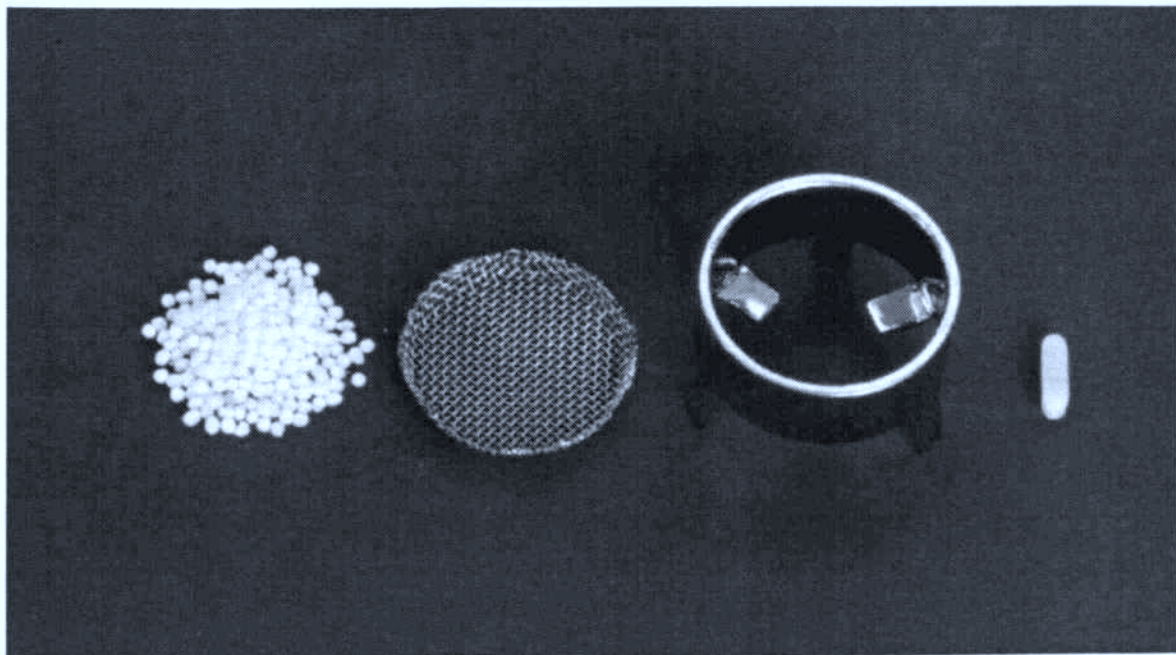


Abbildung 3-5: Komponenten der Edelstahlinserte für den Miniatur-Schlaufenreaktor

Der Antrieb des Magnetrührstabes erfolgt durch einen Magnetrührer mit 12 Rührstellen. Auf diesem Rührer wird eine Gewebekulturplatte, in der alle Vertiefungen mit Miniatur-Schlaufenreaktoren besetzt sind, im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Der Magnetrühr-Antrieb funktioniert elektromagnetisch, was zu einer starken Wärmeentwicklung führt. Aus diesem Grund wurde eine dünne, doppelwandige Platte entwickelt, die zwischen Rührantrieb

und Gewebekulturplatte positioniert wird. Durch diese Platte wird aus einem externen Wasserbad Wasser mit einer Temperatur von 37°C geleitet, wodurch der Miniatur-Schlaufenreaktor thermisch vom Rührantrieb entkoppelt ist. Da die Zwischenplatte nur eine Bauhöhe von 9 mm aufweist, ist die Wirkung der magnetischen Antriebskräfte nicht beeinträchtigt. Der Aufbau des Miniatur-Schlaufenreaktors mit Zwischenplatte ist in Abbildung 3-6 aufgezeigt.

Alle Komponenten, die in die Vertiefungen der Gewebekulturplatte einzusetzen sind, werden vor dem Gebrauch einzeln autoklaviert. Mit einer sterilen Pinzette wird zuerst der Magnetrührstab und dann der Einsatz in die Vertiefung gesetzt. Danach werden die Vertiefungen mit 4 mL Medium aufgefüllt und abschließend 1 mL Mikroträger in jeden Einsatz pipettiert. Nach einem Sterilttest unter Kulturbedingungen über mindestens 24 h können die Zellen inokuliert werden. Die Zelldichte im eingesetzten Inokulum sollte nicht zu hoch sein, da durch Flüssigkeitstropfen, die sich außen an der Pipette befinden, die Zahl der inokulierten Zellen stark variieren kann (Kapitel 4.3.).

In Abbildung 3-7 ist der schrittweise Aufbau der Miniatur-Schlaufenreaktoren fotografisch dargestellt. Wenn während der Kultivierung ein Medien austausch erforderlich sein sollte, kann dieser steril mit einer Pipette oder bei größeren Volumina mit einer Kanüle erfolgen.

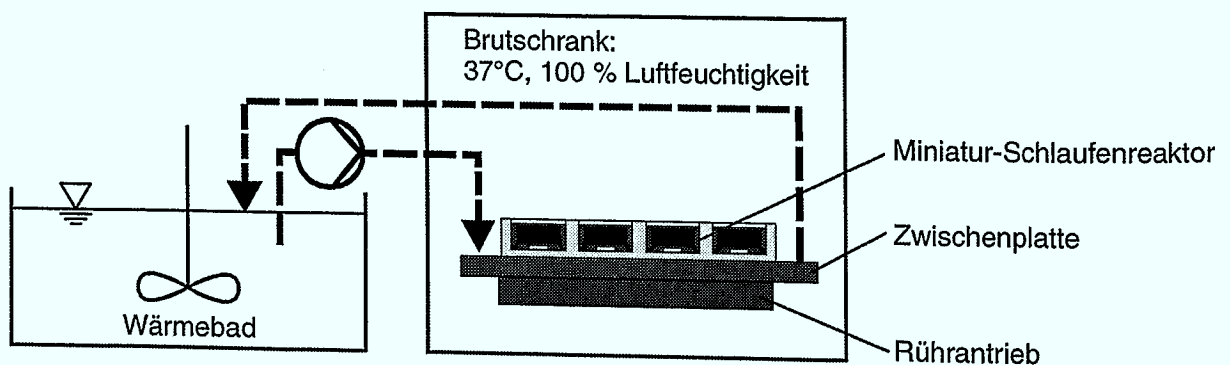


Abbildung 3-6: Aufbau des Miniatur-Schlaufenreaktors mit Zwischenplatte

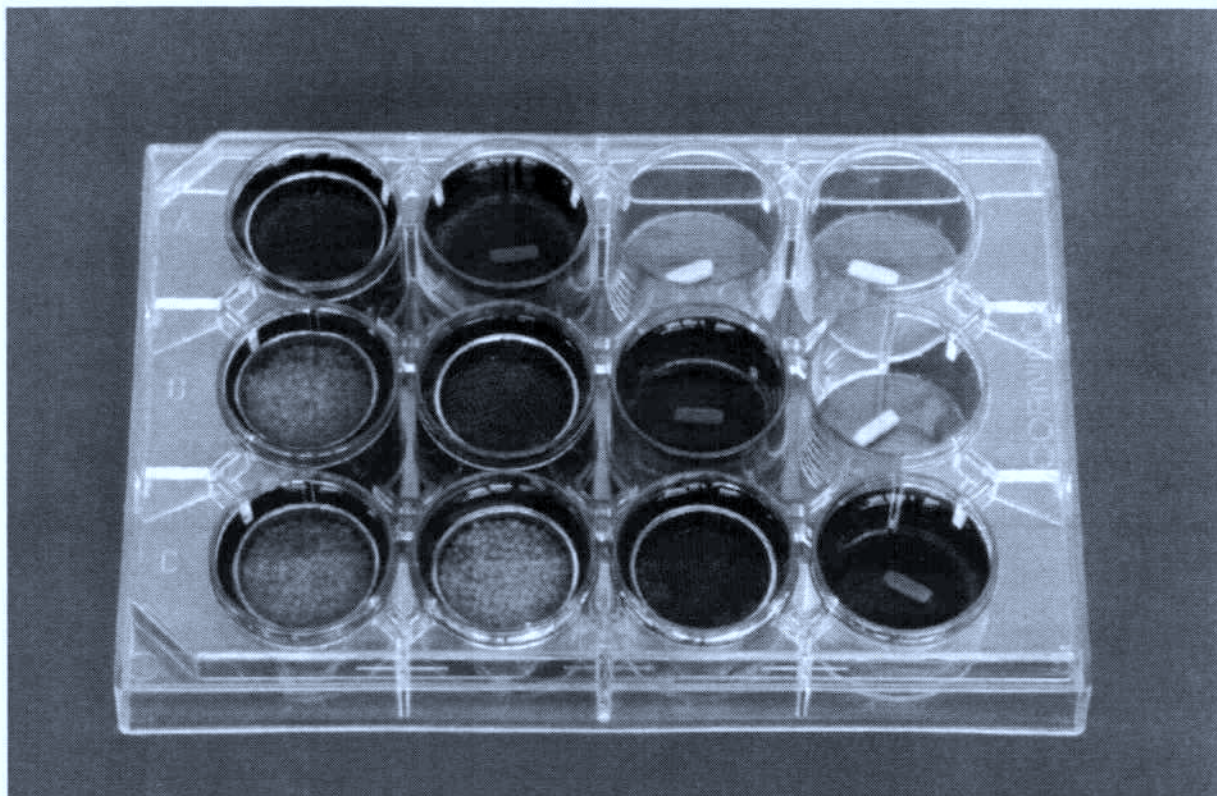


Abbildung 3-7: Aufbau einer Gewebekulturplatte mit 12 Miniatur-Schlaufenreaktoren

Zur Ernte der Träger wird der Einsatz mit einer sterilen Pinzette aus der 12-Loch-Platte entnommen und jeweils in ein Zentrifugenröhrchen überführt, das 5 ml steriles PBS enthält. Durch Schwenken des Einsatzes im PBS gelangen die Träger ohne große Scherbeanspruchung in die Flüssigkeit und stehen für weitere Analysen zur Verfügung.

3.6. Träger

3.6.1. Trägermaterial

In dieser Arbeit ist überwiegend mit makroporösen Mikroträgern aus Collagen gearbeitet worden, die mit kleinen Metallpartikeln beschwert sind. Im Vergleich dazu wurden Glas-Träger, sogenannte Siran-Träger, eingesetzt. Die Eigenschaften der verschiedenen Träger sind in Tabelle 3-4 gegenübergestellt.

Die Collagen-Träger wurden steril in PBS geliefert (Cellex, Minneapolis, USA), während die Siran-Träger autoklaviert wurden.

Tabelle 3-4: Vergleich der Eigenschaften von Collagen- und Siran-Trägern

Eigenschaft	Collagen-Träger	Quelle	Siran-Träger	Quelle
Material	Collagen Typ I (Rind)	Angabe des Herstellers	Borosilikatglas mit Gelatine beschichtet	Lüllau, 1992
Durchmesser	400 - 700 μm	Angabe des Herstellers	200 - 600 μm	Lüllau, 1992
Porosität	0,85	Cahn, 1990	0,49	Hambach, 1994
Porengröße	50 μm	Angabe des Herstellers	20 - 120 μm	Lüllau, 1992
Spezifische Dichte	1,7 g/mL	Cahn, 1990	1,5 g/mL	Hambach, 1994
Spezifische Oberfläche	0,32 m ² /g Träger	Angabe des Herstellers	0,22 m ² /g Träger	Lüllau, 1992

3.6.2. Zellernte

Zellen, die auf Siran-Trägern gewachsen sind, werden nach einem Waschschrift mit Trypsin abgelöst (15 min, 37°C). Zur Kontrolle der Zellzahl wird ein Teil der Träger nicht lysiert, sondern einer Kernfärbung mit Kristallviolett unterzogen.

Collagen-Träger, die mit Zellen besiedelt sind, werden durch Collagenase Typ I aufgelöst. Dazu werden die Träger zunächst mit PBS gewaschen. Da in der Waschlösung noch Zellen sein können, wird sie nicht verworfen. Nach Zugabe von 1 mL steriler Collagenase-Lösung erfolgt eine Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) bis die Träger vollständig lysiert sind. Der zellhaltige Überstand wird abgezogen und die verbliebenen Stahlpartikel mit PBS gewaschen, bis der Überstand klar ist. Das Trägerlysat und alle Waschlösungen werden vereinigt, zentrifugiert (200 x g, 15 min) und in einem geeigneten Volumen (0,5 - 2 mL) aufgenommen. Nun kann die Analytik der Zellen erfolgen. Die Stahlpartikel werden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (60°C) und ausgewogen. Um eventuell verbliebene Zellen nachzuweisen, können die Partikel noch mit Kristallviolett überschichtet und nach der Auswertung getrocknet und gewogen werden. Die Berechnung der Zellkonzentration ist im Anhang beschrieben.

3.6.3. Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen

Von einer Trägerprobe, die für eine REM Aufnahme präpariert werden soll, wird zuerst Medium entfernt. Dann wird zur Fixierung der Zellen 1 mL 2,5%iges Glutardialdehyd zugegeben und die Probe vorsichtig geschwenkt. Nach mindestens eintägiger Inkubation bei 20°C erfolgen zuerst zwei Waschschriffe mit PBS. Anschließend wird die Probe jeweils 1 h in 40%igem, 60%igem, 80%igem und schließlich 100%igem Aceton gelagert, um der Probe alle

wässrigen Bestandteile zu entziehen. Es ist wichtig, dass die Trägerprobe nicht trocken wird. So vorbereitet wird die Probe einer Kritischen Punkttrocknung unterzogen, vergoldet und schließlich mit einem Elektronenmikroskop betrachtet und fotografiert.

3.7. Zellanalytik

3.7.1. Zellzahl und Vitalität

Zellen in Suspension

Die Zellzahlbestimmung erfolgte meist in einer Zählkammer (Hämozytometer) mit einer Einteilung nach Neubauer unter dem Phasenkontrastmikroskop. Die Untersuchung der Vitalität beruht auf der unterschiedlichen Aufnahme bestimmter Farbstoffe durch lebende und tote Zellen. Trypanblau oder Erythrosin B werden nur von toten Zellen aufgenommen, da durch den Verlust der Membranintegrität die Aufnahmebarriere fehlt.

Eine weitere Methode ist der Einsatz elektronischer Zählgeräte, z.B. dem CASY-1 Partikelzählgerät. Dieses Gerät arbeitet nach dem Widerstandsmessprinzip, bei dem die Zellen in einer isotonen Elektrolytlösung durch eine Messkapillare geführt werden. An diese ist über zwei Platinelektroden eine elektrische Spannung angelegt. Zellen, die die Messkapillare passieren, erzeugen durch die Widerstandsänderung elektrische Pulse, die der Anzahl der Zellen entsprechen. Durch Kombination der Widerstandsmessung mit einer Pulsflächenanalyse kann die Größenverteilung der Zellen dargestellt werden, da die Pulsfläche proportional zum Zellvolumen ist. Die Größenverteilung ist für jeden Zelltyp charakteristisch und ermöglicht eine Quantifizierung von toten und vitalen Zellen (Lindl und Bauer, 1994). Durch den Verlust der Membranintegrität bei toten Zellen wird der Puls durch den Zellkern ausgelöst, und die Zellen werden kleiner dargestellt. In Tabelle 3-5 sind die Messgrenzen für die Zelltypen dieser Arbeit angegeben.

Tabelle 3-5: Messgrenzen bei der elektronischen Zellzahlbestimmung verschiedener Zelltypen

Zelltyp	Untere Messgrenze [μm]	Obere Messgrenze [μm]
MNC	4,80	30
CD34 ⁺ -Zellen	6,00	30
Zelllinie KG-1	9,15	30
Zelllinie M2-10B4 mod.	12,00	30
Zelllinie SI/SI	10,20	30

Immobilisierte Zellen

Neben der Zellzahlbestimmung nach einer Trägerlyse mit Collagenase (Kapitel 3.6.2.) ist eine andere Methode eingesetzt worden. Die immobilisierten Zellen werden mit einer Lösung behandelt, die zur Lyse der Zellen Citrat und zur Färbung der Zellkerne Kristallviolett enthält. Die gefärbten Zellkerne befinden sich dann in Suspension und können ausgezählt werden. Aussagen über die Vitalität sind mit dieser Methode nicht möglich, aber man geht davon aus, dass sich auf den Trägern lebende Zellen befinden, wohingegen tote Zellen leicht abgespült werden. Apoptotische Zellen werden mit dieser Methode nicht erfasst, weil sie einschließlich des Zellkerns und der Organellen in sogenannte apoptotische Körperchen fragmentieren.

In ein ausgewogenes Zentrifugenröhrchen werden ca. 0,5 ml Träger gegeben, der Überstand abgenommen und das Feuchtgewicht der Probe bestimmt. Nach Zugabe von 1 mL Kristallviolett wird durch kräftiges Schütteln der Farbstoff gleichmäßig verteilt. Nach einer Inkubation von mindestens 24 h bei 37°C wird die Zahl der Kerne im Hämozytometer bestimmt. Anschließend werden die Träger ca. 48 h bei 60°C getrocknet und dann ausgewogen. Die Berechnung der Zelldichte ist im Anhang erläutert.

Neutralrot ist ein Farbstoff, der nur lebende Zellen anfärbt, und wird in den Lysosomen akkumuliert. Da diese Aufnahme stoffwechselaktive Zellen erfordert, erfolgt die Färbung der Zellen während einer zweistündigen Inkubation bei 37°C, wobei das für die jeweiligen Zellen übliche Medium mit zugesetztem Farbstoff verwendet wird. Es ist nicht möglich, über diese Methode genaue Zahlen für immobilisierte lebende Zellen zu erhalten, aber sie dient der optischen Kontrolle, ob und wie dicht die Träger bewachsen sind.

3.7.2. Durchflusszytometrische Analytik

Die Durchflusszytometrie dient der Untersuchung der unterschiedlichsten Parameter von Zellen. Diese reichen von der Größe, Granularität, Vitalität und spezifischen Oberflächenmolekülen, über den DNA- bzw. RNA-Gehalt und Zellzyklus, bis hin zu Eigenschaften, die den physiologischen Zustand der Zelle beschreiben. Darunter fallen z.B. der Nachweis intrazellulärer Zytokine (Al-Rubeai et al., 1993).

Außer der Zellgröße und -granularität werden alle genannten Eigenschaften nach dem gleichen Prinzip detektiert: Substanzen, die durch einen Laser (488 nm) zur Emission von Licht, je nach Molekül, verschiedener Wellenlänge angeregt werden, markieren direkt oder indirekt Bestandteile der Zelle, die für das Merkmal charakteristisch sind. Die Intensität des emittierten Lichts wird durch Fotodetektoren gemessen und ist proportional zur Ausprägung des untersuchten Kennzeichens. Durch unspezifische Bindungen der markierenden

Substanzen oder durch natürliche Fluoreszenz kann die Messung beeinträchtigt werden, weshalb parallel zu den Proben immer eine Negativkontrolle untersucht wird.

Im Durchflusszytometer wird die markierte Zellsuspension durch eine Kapillare geführt, die einen Strahl feiner Tropfen erzeugt, in denen jeweils nur eine einzige Zelle enthalten ist. Die Zellen passieren in der Messzelle den Laserstrahl, was zu einem für jede Zelle typischen Streulichtmuster führt und die Markierungssubstanzen zur Emission anregt. Die Vorwärtstreuung des Lichts (forward scatter, FSC) dient als Maß für die Größe der Zellen und die Seitwärtstreuung (sidewards scatter, SSC) für die Granularität.

Die Phänotypisierung der Zellen erfolgt über ihre spezifischen Oberflächenantigene. Dabei werden gegen diese Antigene monoklonale Antikörper (mAb) eingesetzt, an die die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein Isothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) gekoppelt sind. Wenn ein Marker nur schwach exprimiert wird, wie CD34, oder nur ein Antikörper mit schlechter Affinität zur Verfügung steht, sollte PE als Farbstoff verwendet werden. PE ist stabiler als FITC und hat eine höhere Intensität. Als Negativkontrolle dienen Antikörper, die den gleichen Isotyp wie die spezifischen Antikörper aufweisen, aber keine Strukturen der humanen Zellen erkennen können, z.B. eine Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger*.

Die zu untersuchenden Proben (mindestens $1 \cdot 10^5$ Zellen), werden abzentrifugiert (10 min, 200 x g), und die Zellen anschließend in 100 µl PBS aufgenommen. Die Standard-Färbung von CD34⁺-Zellen erfolgt mit 5 µl des anti-CD34-PE mAb und der gleichen Menge des anti-CD45-FITC mAb. Parallel wird ein Ansatz mit jeweils 5 µl eines Maus IgG1-FITC bzw. -PE als Negativkontrolle vorbereitet. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C und zweimaligem Waschen mit PBS sind die Proben fertig zur Analyse. Andere Oberflächenmoleküle werden nach dem gleichen Protokoll gefärbt.

Während der Messung im Durchflusszytometer werden die Daten aller Fotodetektoren gespeichert und können entweder in Form von Histogrammen oder sogenannten Dot Plots verfolgt werden. In einem Histogramm wird die Intensität eines Signals gegen die Zellzahl aufgetragen (Abbildung 3-8, C) und in einem Dot Plot (Abbildung 3-8, A, B, D) zwei Signale gegeneinander.

Wenn die Anzahl der Zellen ausreichend ist, werden während der Messung 10.000 Zellen detektiert und die Signale gespeichert. Die Auswertung der Messung ist für eine CD45-FITC/CD34-PE Färbung von frisch aufgetauten CD34⁺-Zellen, die von 5 Spendern gepoolt worden sind, exemplarisch in Abbildung 3-8 dargestellt. Im ersten Schritt wird im FSC/SSC-Plot (A) die distinkte Region der lebenden Zellen als eine Region definiert (R1). Bei der Betrachtung der Fluoreszenzen werden nur Zellen aus dieser Region berücksichtigt.

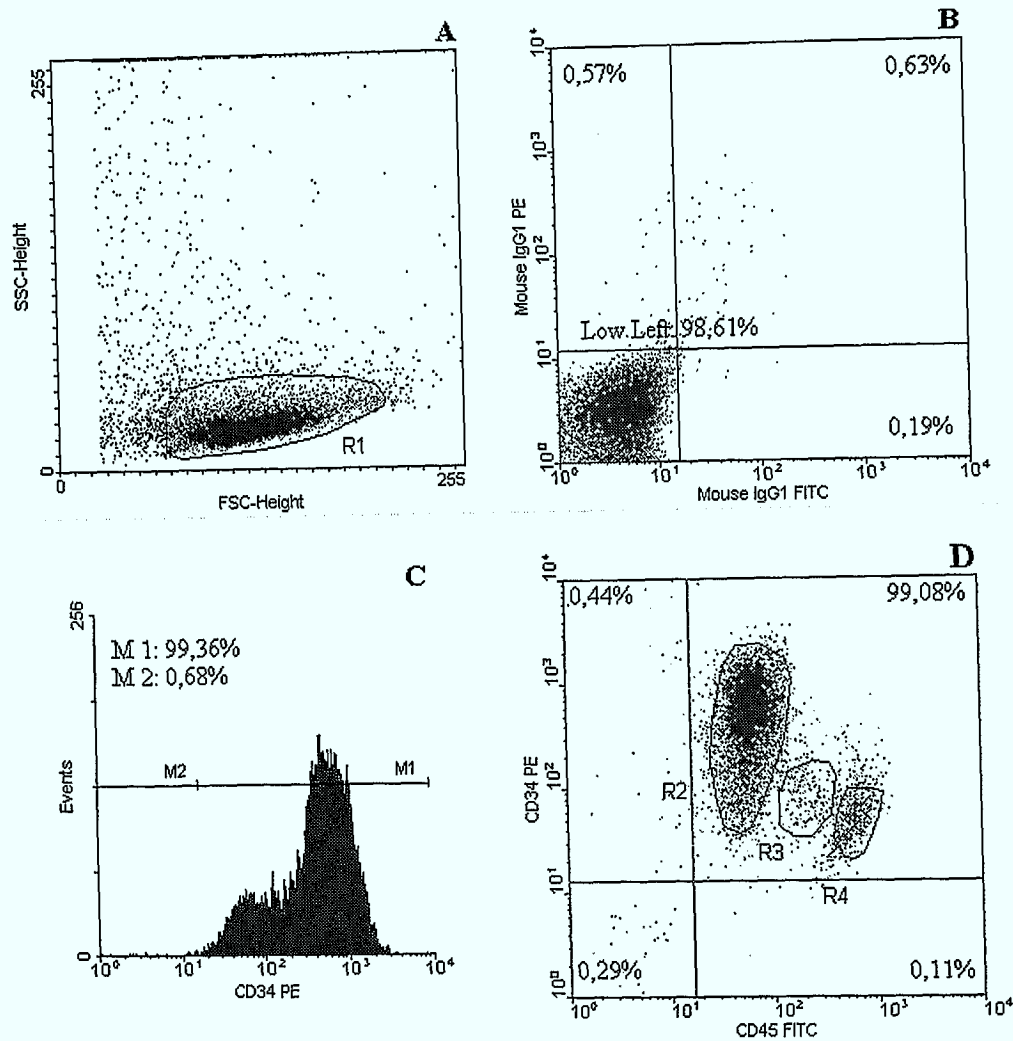


Abbildung 3-8: FACS-Messung von CD34⁺-Zellen (A: Zellgröße (FSC/SSC), B: Negativkontrolle (R1), C: CD34-PE-Färbung (R1), D: CD45-FITC/CD34-PE-Färbung (R1))

Im Plot der Negativkontrolle (B) kann nun durch das Setzen eines Quadranten die Autofluoreszenz der Zellen als linker, unterer Quadrant definiert werden, da alle Zellen in dieser Probe kein positives Fluoreszenz-Signal aufweisen sollen. Dieser Quadrant wird in den Plot der positiv gefärbten Zellen kopiert (D). Über die statistische Auswertung der einzelnen Quadranten kann die Zellpopulation definiert werden. In diesem Beispiel sind 99,08% der Zellen sowohl für CD45 als auch für CD34 positiv. Man kann allerdings drei verschiedene Populationen (R2-R4) erkennen, die sich in der unterschiedlichen Ausprägung der beiden Merkmale unterscheiden. Das ist auf die Variabilität des Spendermaterials zurückzuführen. Betrachtet man nur die Zellen von einem Spender, erhält man auch nur eine Population. Das Signal von CD34-PE ist in C noch einmal als Histogramm dargestellt.

In Tabelle 3-6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zur Durchflussanalytik zusammengefasst. Alle eingesetzten Antikörper stammen von der Firma BD-Pharmingen, Heidelberg.

Tabelle 3-6: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Antigen	Antikörper	Konjugat	Antigen
anti-CD33	FITC	human	anti-CD45	PE	human
anti-CD34	PE	human	anti-CD45	FITC	murin
anti-CD34	FITC	human	anti-CD90	PE	human
anti-CD38	FITC	human	anti-CD117	FITC	human
anti-CD45	FITC	human	anti-HLA-DR	FITC	human

3.7.3. Biologische Assays

Methylzellulose-Assay (MC-Assay)

Um den Anteil der koloniebildenden Zellen im Kulturansatz zu ermitteln, wird ein colony forming cell-Assay in Methylzellulose durchgeführt (Kapitel 2.1.3.).

Das semisolid Medium Methylzellulose-Medium enthält die humanen Wachstumsfaktoren IL-3 (10 ng/mL), GM-CSF (10 ng/mL), SCF (50 ng/mL) und Erythropoietin (3 U/mL), die die Ausdifferenzierung fördern. Die Koloniebildungsfähigkeit ist vom Grad der Ausdifferenzierung der Zellen in Kultur abhängig. Da dieser während der Kulturdauer zunimmt, ist es erforderlich, die im Assay eingesetzte Zellzahl zu erhöhen. Von frisch aufgetauten CD34⁺-Zellen oder Zellen nach einem Tag in Kultur werden 150 c/Ansatz eingesetzt, nach 4 Tagen 250, nach 7 Tagen 300, nach 10 und 14 Tagen 500 Zellen. Die Zellen für einen Versuchsansatz werden in 100 µL IMDM resuspendiert und vollständig in 1 mL MC-Medium überführt. Anschließend werden die Zellen in einer 35 mm-Gewebekulturschale im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) für 2 Wochen inkubiert. Die Kolonien, die sich nach dieser Zeit entwickelt haben, werden anhand der Form und Farbe der Kolonie und der Morphologie der einzelnen Zellen unter einem Invertmikroskop typisiert und ausgezählt. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurden die MC-Assays grundsätzlich im Zweifach- und für das Inokulum im Dreifach-Ansatz durchgeführt.

Cobblestone-Area-Forming Cells (CAFC)-Assay

Der CAFC-Assay dient der Detektion sehr früher hämatopoietischer Zellen (Kapitel 2.1.3.), die mit Hilfe einer begrenzenden Verdünnungsreihe (limiting dilution analysis = LDA) in stromahaltigen Langzeitkulturen quantifiziert werden. Dabei werden die Zellen in 6 verschiedenen Verdünnungsstufen jeweils als 10fach Replikat kultiviert und anschließend auf der Basis von statistischen Berechnungen ausgewertet (Sutherland und Eaves, 1994).

Als Stroma werden die in Kapitel 2.4.1. und 3.2.2. beschriebenen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI eingesetzt. Diese Zellen werden zunächst zur Wachstumsarretierung mit 80 Gy bestrahlt. Je Zelltyp werden $6 \cdot 10^3$ Zellen in 100 μ L LTC-Medium resuspendiert und in die Vertiefung einer Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen überführt. Das Medium enthält zusätzlich 1% Penicillin/Streptomycin. Die hämatopoietischen Zellen werden 24 h später inokuliert. Dazu wird eine Verdünnungsreihe in 6 verschiedenen Konzentrationsstufen angesetzt, die der Formel $x = b \cdot 3^{n-1}$ folgen, wobei x die Zellzahl pro Verdünnungsstufe, b die Basis-Zahl der niedrigsten Verdünnung und n die Nummer des Verdünnungsschrittes ist.

Für aufgetaute CD34⁺-Zellen oder Zellen nach einem Tag in Kultur ist die Basis-Zahl 1, d.h. es wird in der höchsten Verdünnung nur 1 Zelle pro Vertiefung eingesetzt. An den Tagen 4 und 7 wird die Zahl auf 5 erhöht und für die Tage 10 und 14 auf 10, da die Zellen mit zunehmender Kulturdauer ausdifferenzieren. Die Zellen werden in 100 μ L LTC-Medium inokuliert, wodurch sich das Gesamtvolumen auf 200 μ L erhöht. Die Platten werden 6 Wochen im Brutschrank bei einem halben Medienwechsel pro Woche (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Dann werden die Platten ausgewertet, wobei die Anzahl der positiven Vertiefungen gezählt wird. Eine Vertiefung gilt dann als positiv, wenn mindestens 6 der charakteristischen Cobblestone-Zellen in einem Cluster gruppiert sind (Arseniev und Griesel, 1998).

Long-Term Culture-Initiating Cells (LTC-IC)-Assay

Der Long-Term Culture-Initiating Cells (LTC-IC)-Assay dient ebenfalls der Detektion sehr früher hämatopoietischer Vorläuferzellen (Kapitel 2.1.3.). Im Prinzip basiert er auf dem CAFC-Assay, der nach der Kulturdauer von 6 Wochen um einen MC-Assay erweitert wird. Dazu wird das Medium nach einem Zentrifugationsschritt entfernt und jede Vertiefung mit 100 μ L MC-Medium überschichtet. Nach weiteren 2 Wochen Kultur im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) werden dann die positiven Vertiefungen ausgezählt, die mindestens eine Zellkolonie aufweisen. Die Auswertung erfolgt äquivalent zum CAFC-Assay.

Immundefiziente Mäuse

Mit Hilfe von immundefizienten Mäusen, den sogenannten NOD/SCID-Mäusen (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) können noch frühere hämatopoietische Zellen als die LTC-IC nachgewiesen werden (Kapitel 2.1.3.).

Dazu werden weibliche Mäuse, die 6 bis 8 Wochen alt sind, mit einer subletalen Dosis von 2 Gy bestrahlt. Innerhalb von 3 bis 5 h werden humane hämatopoietische Zellen durch die Schwanzvene injiziert. Nach 24 h wird als Ko-Transplantat eine Fibroblasten Zelllinie, die

aus einer Ratte etabliert wurde, subcutan gespritzt. Diese Zelllinie ist gentechnisch so verändert, dass sie humanes IL-3 exprimiert, wodurch der Engraftment-Prozess verbessert wird. Sechs bzw. sieben Wochen nach der Transplantation werden die Mäuse getötet und die Zellen des Knochenmarks durchflusszytometrisch oder über PCR auf den Anteil humaner Zellen analysiert. Ein monoklonaler Antikörper gegen den murinen CD45-Oberflächenmarker grenzt die murinen von den humanen Zellen ab (Goan et al., 1996; Möbest et al., 1999).

Die Repopulierungsversuche dieser Arbeit wurden kommerziell bei der Firma EPO-GmbH, Berlin durchgeführt. Für jede Probe wurden 2 - 4 Mäuse transplantiert. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe mit bestrahlten, aber nicht transplantierten Mäusen parallel zu den transplantierten Tieren gehalten.

3.8. Molekularbiologische Analytik

In dieser Arbeit wurde das Knochenmark der SCID-Mäuse molekularbiologisch untersucht. Dazu wurde eine PCR zur Detektion von humaner α -Satelliten-DNA in der genomischen DNA der Knochenmarkszellen nach der 6. Woche durchgeführt.

3.8.1. Isolierung und Aufreinigung genomischer DNA

Im ersten Schritt der DNA-Isolierung müssen die Zellen aufgeschlossen werden. Dazu werden sie abzentrifugiert und das Pellet in 200 μ L des PCR-Lyse-Puffers (Anhang) aufgenommen. Durch eine 1 ½-stündige Inkubation bei 56°C erfolgt die Lyse der Zellen. Verbliebene Zelltrümmer reichern sich nach einer Zentrifugation (21.000 x g, 4°C) im Pellet an und werden so entfernt. Der wässrige Überstand, der die DNA enthält, wird mit sterilem Wasser auf 400 μ L aufgefüllt und anschließend zur Entfernung von Proteinen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI)-Extraktion unterzogen. 400 μ L der PCI-Lösung (Anhang) werden zur DNA gegeben und der Ansatz zentrifugiert. Nach dem Abziehen des wässrigen Überstandes wird dieser wiederholt mit der PCI-Lösung behandelt und abzentrifugiert (5 min, 21.000 x g, 4°C). Im dritten Schritt wird die DNA im Überstand mit 400 μ L Chloroform versetzt, um überschüssiges Phenol zu entfernen, und wiederum abzentrifugiert (5 min, 21.000 x g, 4°C). Die DNA liegt nun im wässrigen Überstand. Die photometrische Konzentrationsbestimmung basiert darauf, dass Nukleinsäuren bei UV-Licht ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen. Eine Lösung mit 50 μ g/mL doppelsträngiger DNA besitzt unter definierten Bedingungen einen Absorptionswert (Optische Dichte, OD) von 1. Dieser Wert dient der Konzentrations-Berechnung der Lösung. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei 280 nm. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption

bei 260 und 280 nm lässt sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,8 (Lottspeich und Zorbas, 1998).

3.8.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine enzymatische *in vitro* Reaktion zur Amplifikation von spezifischen DNA Fragmenten. Eine wichtige Voraussetzung ist, dass die Sequenzinformation von den 5' und 3' Enden der zu amplifizierenden Region bekannt sein muss. Für eine PCR werden 2 zu diesen Sequenzen komplementäre Oligonukleotide (Primer) benötigt, die die spezifische Region flankieren und dabei an die gegenüberliegenden Stränge der DNA-Vorlage (Template) hybridisieren.

Der Ablauf einer PCR ist in Abbildung 3-9 dargestellt. In jedem Reaktionsansatz sind die Template-DNA, die beiden Primer, die DNA-Polymerase und Nukleotide enthalten. Im ersten Schritt wird die Doppelstrang-DNA durch Inkubation bei einer hohen Temperatur (94°C) denaturiert, sodass die beiden Stränge einzeln in Lösung vorliegen. Die anschließende Amplifikation beruht auf der Wiederholung von 3 Schritten: Anlagerung der Primer, Primer-Verlängerung und Denaturierung (20-40 Zyklen).

Im ersten Zyklus entstehen neue Fragmente, die länger als die zu amplifizierende Region sind, die sogenannten „long products“, weil die DNA-Synthese nicht automatisch abgebrochen wird. Da diese „long products“ aber im nächsten Zyklus wiederum als Template dienen, entsteht das diskrete „short product“. Nur dieses vermehrt sich exponentiell mit jeder Runde der Amplifikation, wohingegen das „long product“ linear amplifiziert wird, da die Menge der Original Template-DNA konstant bleibt. Am Ende liegt das „short product“ in 10^4 - 10^8 fach höherer Konzentration vor. Aus diesem Grund ist in der Abbildung 3-9 nur die Produktion des „short products“ dargestellt.

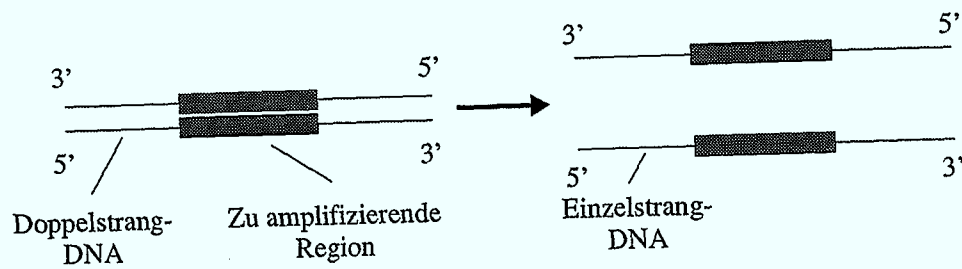
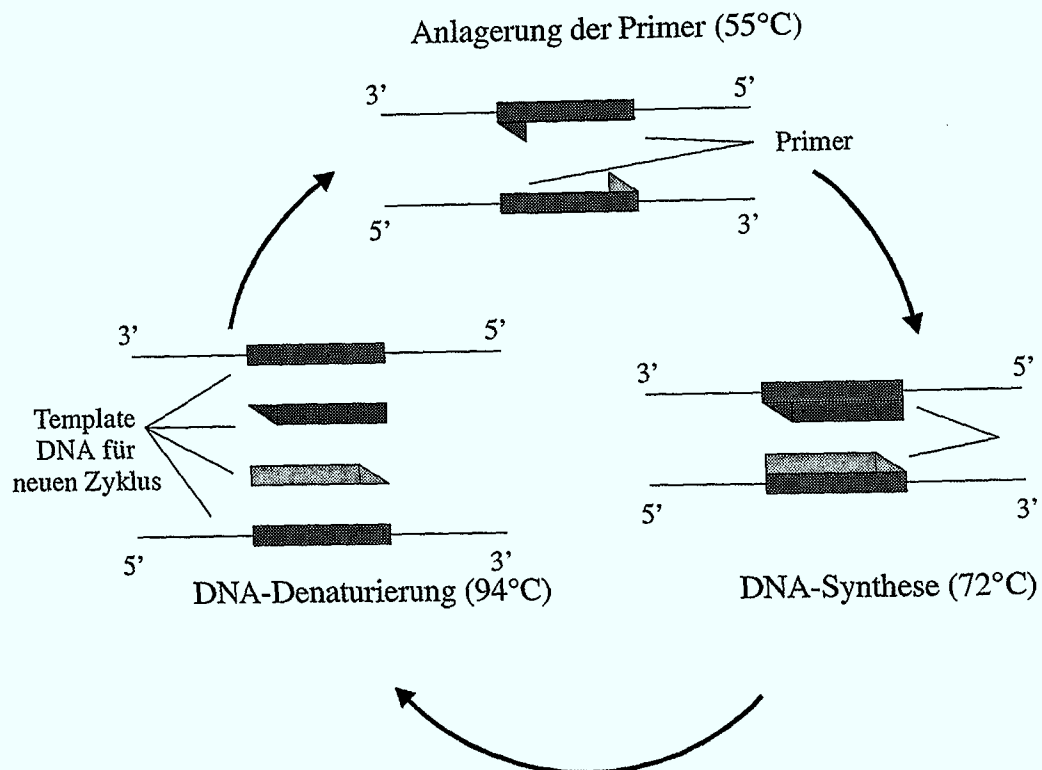
Nach der Denaturierung der Original-Template-DNA lagern sich die Primer an die DNA an, was durch Absenken der Temperatur auf einen Wert zwischen 45-60°C erfolgt. Da die Oligonukleotide im Überschuss sind, wird die Ausbildung des Primer-Template-Komplexes der Reassoziaton der einzelnen Template-Stränge vorgezogen. Die DNA-Synthese wird durch die Erhöhung der Temperatur auf 72°C durch eine spezifische DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase katalysiert. Dieses Enzym wurde aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und zeichnet sich durch das besonders hohe Temperatur-Optimum von 72°C und eine relativ hohe Stabilität bei 95°C aus. Weiterhin ist es wichtig, dass zwischen den vier verwendeten Nukleotiden ein Gleichgewicht herrscht, da sonst eine fehlerhafte DNA-Synthese zum Abbruch der PCR-Reaktion führen kann. Im dritten Schritt des Zyklus wird die Temperatur wieder auf 94°C hochgeregelt, wodurch die vorliegende Doppelstrang-

DNA wieder denaturiert wird. Da jeder Primer zu einem der neu synthetisierten Stränge komplementär ist, kann jeder neue Strang in den folgenden Zyklen als Template-DNA dienen (Schillberg und Fischer, 1994).

Für die Amplifikation der humanen α -Satelliten-DNA, die auf dem Chromosom 17 liegt (Lokus D17Z1), wurden die Primer 17 α 1 und 17 α 2 eingesetzt (Warburton et al., 1991; Struktur siehe Anhang). Das PCR-Produkt weist eine Größe von 850 bp auf. Das genaue Protokoll ist im Anhang beschrieben. Als Positivkontrolle wird DNA von MNC aus Nabelschnurblut eingesetzt, wobei zwischen 10 und 50 ng pro Ansatz ausreichend sind. Die DNA der Zellen aus dem Knochenmark der Kontrollmäuse ohne humanes Transplantat dienen als Negativkontrolle. Sowohl von dieser als auch von der DNA aus den transplantierten Mäusen werden 1-2 μ g pro Ansatz verwendet. Die Reaktionsansätze werden dann mit PCR-Öl überschichtet und in den PCR-Block überführt. Die PCR erfolgt nach dem Prinzip der „Hot Start“-Methode. Das bedeutet, dass die Taq-Polymerase erst nach dem Aufheizen der Probe auf 94°C zugegeben wird, um unspezifische Amplifikationen vor den eigentlichen Zyklen zu vermeiden.

3.8.3. Gelelektrophorese

Zur Detektion der PCR-Produkte wird ein 1-2%iges Agarosegel mit TAE-Puffer (Anhang) angesetzt. Als Längenmarker dient der DNA-Standard, der aus einem Gemisch von doppelsträngigen DNA-Fragmenten besteht. Diese decken in 100 bp Abständen den Größenbereich von 100-1500 bp ab, die bei der elektrophoretischen Auftrennung ein regelmäßiges Bandenmuster ergeben. Nach dem Auftragen der Proben (Protokoll siehe Anhang) auf das Gel werden als Laufbedingungen 100 V Spannung über einen Zeitraum von ca. 2 h angelegt. Danach erfolgt zuerst die zehnminütige Färbung der DNA im Gel mit Ethidiumbromid. Diese Substanz interkaliert in die DNA, die dadurch unter UV-Licht sichtbar wird. Anschließend erfolgt die Entfärbung über einen Zeitraum von 15-20 min, wonach das Gel unter UV-Licht fotografiert werden kann.

Erster Schritt: Denaturierung der Template-DNA (94°C)**Zweiter Schritt: Amplifikation****Abbildung 3-9:** Darstellung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**3.9. Medienanalytik**

Vor der Durchführung einer Medienanalytik müssen zellhaltige Proben abzentrifugiert werden, damit die Messungen nicht gestört und die Geräte nicht kontaminiert werden.

3.9.1. Glukose

Die Glukose-Konzentration wird mit einem automatischen Analysator, der nach einem enzymatisch-amperometrischen Messprinzip arbeitet, bestimmt. Die enzymatische Komponente stellt eine auf einer Membran immobilisierte Glukoseoxidase dar, die α -D-Glukose zu Glukonsäure oxidiert. Bei dieser Reaktion entsteht Wasserstoffperoxid, das amperometrisch durch eine Platinelektrode gemessen wird. Der dabei detektierte Strom

verhält sich proportional zur Glukose-Konzentration. Proben werden durch das Vermischen von 20 bis 40 μL der zu untersuchenden Lösung mit 1 mL Puffer vor der Messung verdünnt.

3.9.2. Glutamin und Glutamat

Die Glutamin- und Glutamat-Konzentrationen werden nach dem gleichen Messprinzip wie Glukose in einem automatischen Analysator ermittelt, wobei zwei Enzyme auf unterschiedlichen Membranen immobilisiert sind. Das erste Enzym, Glutaminase, oxidiert Glutamin zu Glutamat und Ammoniak. Glutamatoxidase, das zweite Enzym, oxidiert Glutamat zu α -Ketoglutarat, Ammoniak und Wasserstoffperoxid. Letzteres wird wie beschrieben amperometrisch gemessen. Die Differenz zwischen den Signalen der beiden Messsonden wird vom Gerät automatisch erkannt und berechnet, sodass die Konzentration beider Metabolite parallel ermittelt werden kann.

3.9.3. Laktat

Die Messung der Laktat-Konzentration wird ebenfalls mit einem enzymatisch-amperometrisch arbeitenden Analysator durchgeführt. Laktat wird durch eine immobilisierte Laktatoxidase zu Pyruvat oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid entsteht, das wie beschrieben detektiert wird.

3.9.4. Osmolalität

Die Bestimmung der Osmolalität erfolgt mit Hilfe eines Gefrierpunktosmometers, das zuerst die Medienprobe auf eine Temperatur unterhalb ihres Gefrierpunktes abkühlt. Mit einem künstlichen Eiskristall wird dann die Kristallisation ausgelöst, wodurch die Temperatur der Lösung auf ihren Gefrierpunkt ansteigt. Durch den Anteil der gelösten Substanzen sinkt der Gefrierpunkt der Lösung im Vergleich zu dem des reinen Lösungsmittels. Über die Differenz der beiden Temperaturen wird die Osmolalität in Osmol/kg bestimmt.

3.9.5. Aminosäuren

Die Aufnahme des gesamten Aminosäurespektrums einer Probe erfolgte mithilfe einer Aminosäure-HPLC, deren Messbereich zwischen 10 und 100 μM liegt. Bei dieser Methode werden die Aminosäuren im ersten Schritt mit o-Phtaldialdehyd derivatisiert und laufen anschließend über eine Reversed-Phase-Chromatographie-Säule. Die Aminosäuren binden an das Säulenmaterial und werden dann nacheinander eluiert. Das gebundene Derivat wird über die Fluoreszenz nach Anregung bei 280 nm mit einer Emission bei 455 nm detektiert. Die Steuerung und Aufnahme des Chromatogramms erfolgt über einen PC.

Proteine in den Medienproben müssen vor der Messung mit Trichloressigsäure gefällt und durch Zentrifugation abgetrennt werden. Der anschließend mit NaOH neutralisierte Überstand sollte so verdünnt werden, dass die Aminosäurekonzentrationen im Messbereich der HPLC liegen.

3.9.6. Zytokine

Die Konzentrationen der vier Standard-Zytokine (Tabelle 3.3.) sind mittels ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) bestimmt worden. Das Prinzip dieses Assays basiert auf der quantitativen Sandwich-Enzym-Immunotechnik. Auf dem Boden einer Mikrotiterplatte ist ein muriner monoklonaler Antikörper gegen das jeweilige Zytokin immobilisiert, an den im ersten Schritt die Zytokine aus der Probe oder dem Standard binden. Nach einem Waschschrift zum Entfernen des ungebundenen Substrats wird ein zweiter Antikörper gegen das Zytokin aufgetragen und bildet ebenfalls einen Antigen-Antikörper-Komplex. An den zweiten Antikörper ist eine Peroxidase aus Meerrettich gebunden, die im folgenden Schritt durch Oxidation des zugesetzten Chromogens eine Farbreaktion katalysiert. Die fotometrisch gemessene Farbentwicklung ist proportional zur Menge des gebundenen Zytokins im ersten Schritt des ELISA. Im Vergleich zu einer Standard-Eichreihe kann dann die Zytokinkonzentration im Medium berechnet werden. Die Durchführung des Assays erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

4. Grundlegende Voruntersuchungen

4.1. Etablierung einer Zellbank von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut

Die wichtigste Voraussetzung für Arbeiten mit Primärmaterial ist die Versorgung mit Zellen. Durch die Kooperation mit Dr. Dartsch, Jülich, konnte der Zugang zu Nabelschnurblut gewährleistet werden. Da eine umfangreiche Planung für Versuche mit hämatopoietischen Zellen erforderlich ist, ist es sinnvoll, unabhängig vom Erhalt frischer Spenden zu sein, was durch den Aufbau einer Zellbank mit kryokonservierten Proben erreicht werden kann. Erst durch den Zugang zu einer Zellbank ist es möglich, gleichzeitig Experimente mit Zellen verschiedener Spender durchzuführen. Bei der Verwendung von frischem Material aus Jülich ist die Wahrscheinlichkeit, mehr als 2 Proben pro Tag zu erhalten, sehr gering. Weiterhin kann durch einwöchige Steriltests das Kontaminationsrisiko der Versuche verringert werden. In dieser Arbeit ist eine Zellbank im Forschungsmaßstab aufgebaut worden.

4.1.1. Aufbau der Zellbank und Isolierung der CD34⁺-Zellen

In einem Zeitraum von ca. 17 Monaten wurden 212 Nabelschnurblutspenden gesammelt und aufgearbeitet, was einer durchschnittlichen Anzahl von 2,9 Proben pro Woche entspricht. Das Volumen pro Probe betrug 30 ± 9 mL. Die zeitliche Differenz zwischen Geburt und Beginn der Aufreinigung lag bei 13 ± 11 h. Aus allen Proben wurden zuerst die MNC isoliert. Durchflusszytometrische Analysen ergaben einen CD34-Anteil von $1,0 \pm 0,6\%$ der MNC im Nabelschnurblut. Die durchschnittliche Zahl der isolierten MNC betrug $7,2 \cdot 10^6$ c/mL Blut und der CD34⁺-Zellen $8,0 \cdot 10^4$ c/mL Blut (Abbildung 4-1). Bei der Aufreinigung der ersten 121 Proben waren 10,4% bakteriell kontaminiert. Durch ein verbessertes Protokoll und die Erhöhung des Sicherheitsstandards im Labor konnte die Kontaminationsrate der später gewonnenen 94 Proben auf 0,9% gesenkt werden. Eine mögliche Kontamination mit mütterlichen Zellen ist nicht untersucht worden.

Nach der Isolierung der MNC wurden aus 75% der Proben die CD34⁺-Zellen mithilfe der MACS-Technologie isoliert (Kapitel 3.1.1.). Die Aufreinigung erfolgte über je 2 Säulen, um die Reinheit der Zellpopulation zu erhöhen. In Abbildung 4-2 ist der CD34-Anteil in den verschiedenen Fraktionen aufgetragen.

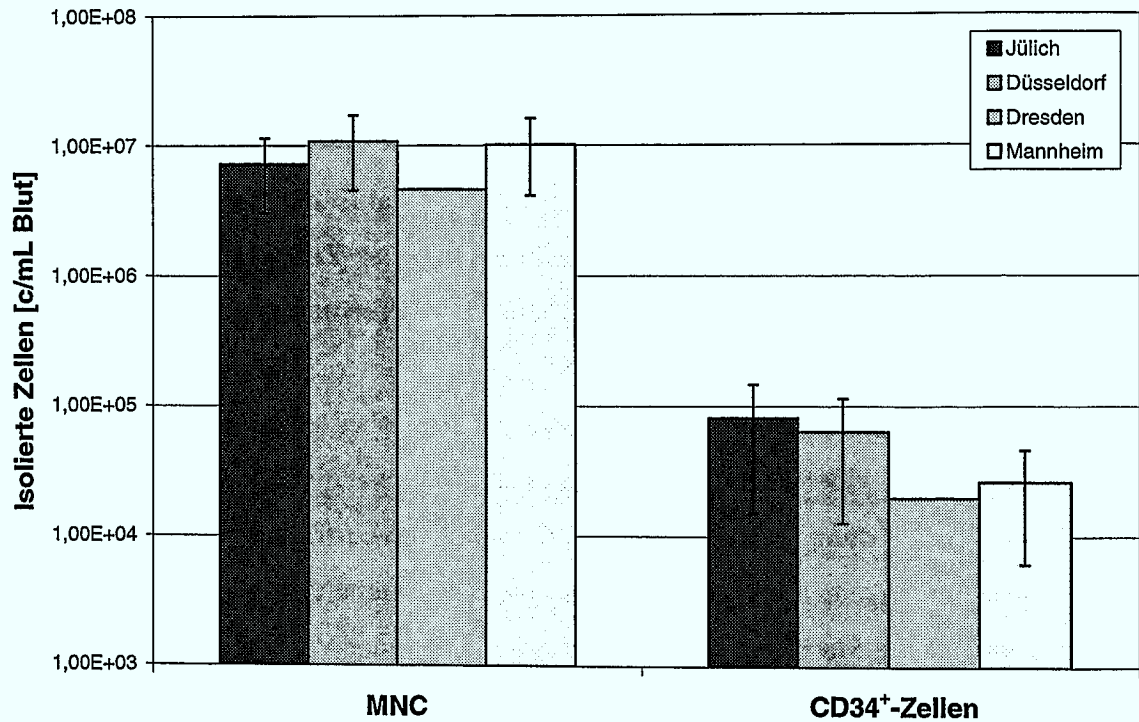


Abbildung 4-1: Vergleich der isolierten Zellen in Jülich und den Nabelschnurblutbanken in Düsseldorf (Somville et al., 1996), Dresden (Petzold et al., 1999) und Mannheim (Eichler et al., 1999)

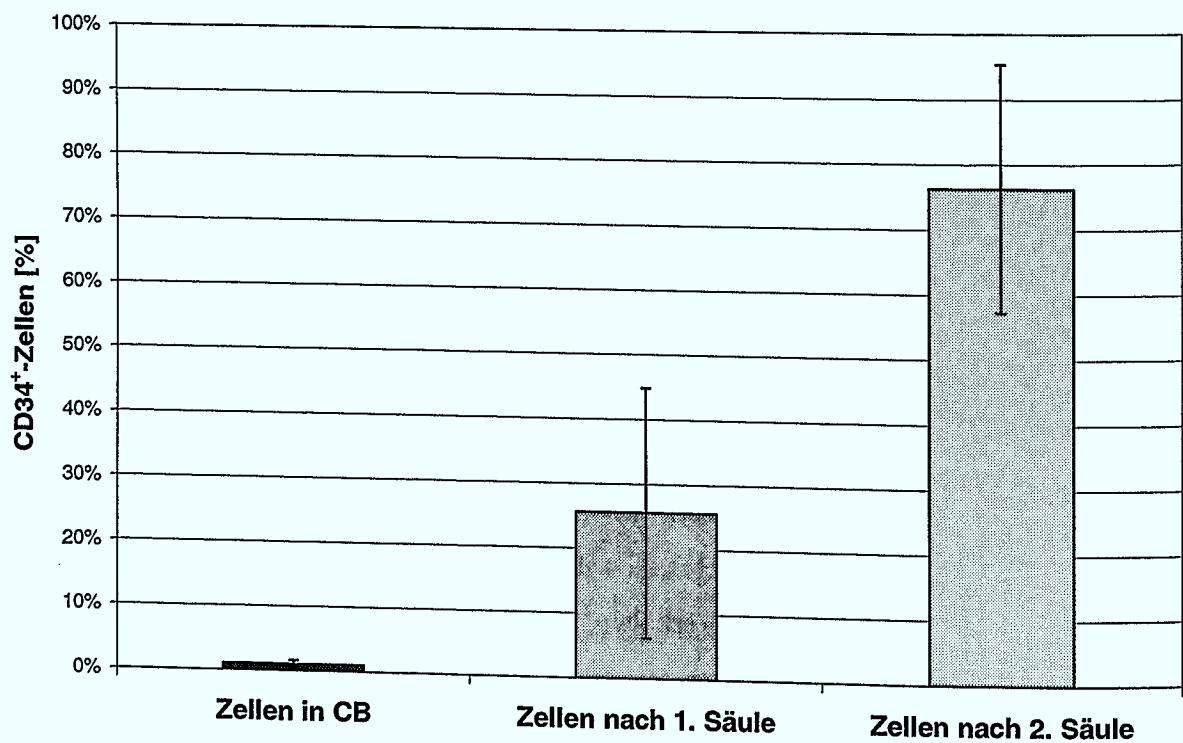


Abbildung 4-2: Aufreinigung von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurvenenblut über MACS

Die CD34⁺-Zellen im Nabelschnurblut (1,0%) sind nach der ersten Säule auf $25,6 \pm 19,3\%$ aufkonzentriert worden. Nach der zweiten Säule wurde eine Reinheit von $76,3 \pm 19,0\%$ CD34⁺-Zellen erzielt. Bezogen auf die CD34⁺-Zellen in den MNC konnte eine Ausbeute von $43,2 \pm 25,4\%$ und eine Anreicherung um den Faktor 883 ermittelt werden. In den Negativfraktionen der 1. und 2. Säule wurden noch 0,7% bzw. 5,7% CD34⁺-Zellen detektiert. Eine Bilanzierung ist nicht möglich, da die Zellzahlermittlung aller Fraktionen den Aufwand einer Aufreinigung unverhältnismäßig steigern würde.

Ein wichtiger Aspekt bei dem Aufbau einer Zellbank ist der zeitliche Ablauf der Aufreinigung. Bei professionellen Zellbanken schwankt die Zeitspanne zwischen Geburt und Aufreinigung zwischen 12 h (Somville et al., 1996), 36 h (Petzold et al., 1999) und 48 h (Eichler et al., 1999). Aufgrund der Datenbasis ist der Zusammenhang zwischen dieser Zeitspanne und der Aufreinigung untersucht worden (Abbildung 4-3), wobei die Daten jeweils einer Stunde gemittelt worden sind.

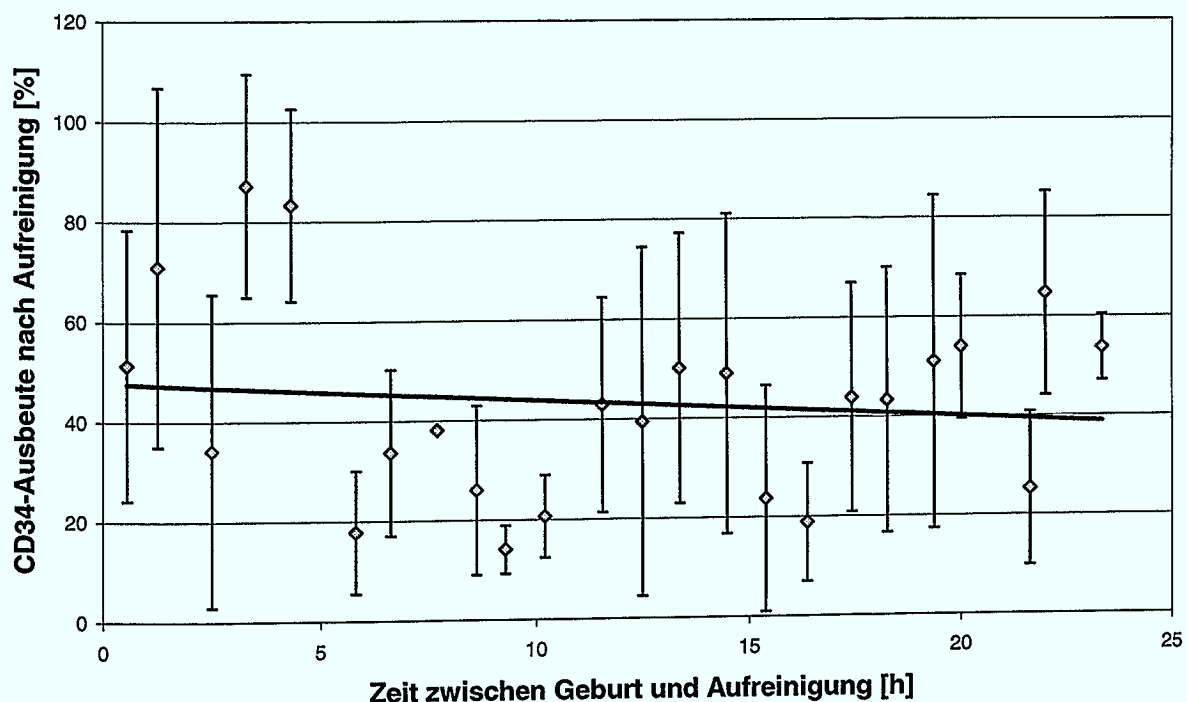


Abbildung 4-3: Abhängigkeit der CD34-Ausbeute von Zeit zwischen Geburt und Aufreinigung

Die Werte schwanken sehr stark, was, wie bereits beschrieben, überwiegend in der Spendervariabilität begründet ist. Trotz der Variabilität ist der Trend zu erkennen, dass die Ausbeute nach einer Zeitdifferenz größer als 5 h sinkt. Es konnte kein Einfluss der Zeitdifferenz auf die Reinheit der CD34⁺-Zellen oder den Anteil der CD34⁺-Zellen in den Negativfraktionen festgestellt werden. Vier Proben sind länger als 24 h gelagert worden (39,

42, 46 und 78 h). Bei einer dieser Proben konnte eine Ausbeute von nur 40% erzielt werden, und bei den drei anderen lag sie sogar unter 30%.

4.1.2. Effekte der Kryokonservierung

Bei 13 verschiedenen Versuchen, die mit Zellen von insgesamt 33 Spendern durchgeführt wurden, sind Effekte der Kryokonservierung auf die CD34⁺-Zellen untersucht worden. Dabei konnte beobachtet werden, dass die CD34-Konzentration vor dem Einfrieren ($64 \pm 17\%$) wesentlich niedriger war als nach dem Auftauen ($93 \pm 5\%$). Dieser Effekt ist unabhängig von der CD34-Konzentration der eingefrorenen Zellen (Abbildung 4-4). Die Ausbeute der MNC betrug $56 \pm 17\%$. Durch den Aufkonzentrierungs-Effekt liegt die Ausbeute für die CD34⁺-Zellen mit $88,3 \pm 40\%$ wesentlich höher. Die Vitalität der Zellen lag weit über 95%.

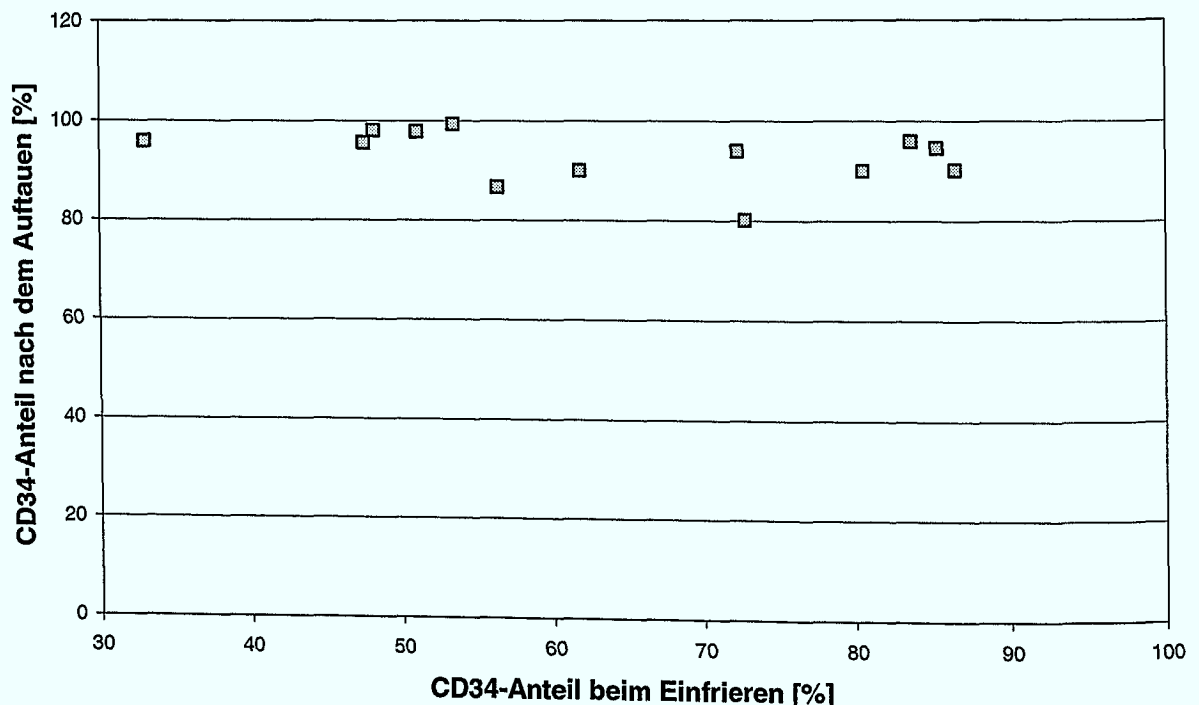


Abbildung 4-4: Aufreinigungseffekt der CD34⁺-Zellen durch Kryokonservierung

4.1.3. Diskussion

Es wurde eine Zellbank für den Laborbetrieb aufgebaut, die von der Aufreinigungs-Effizienz mit spezialisierten Nabelschnurblutbanken in Düsseldorf (Somville et al., 1996), Dresden (Petzold et al., 1999) und Mannheim (Eichler et al., 1999) vergleichbar ist (Abbildung 4-1). Der Anteil der CD34⁺-Zellen im Nabelschnurblut war in Düsseldorf mit $0,58 \pm 0,47\%$ relativ niedrig, woraus sich die geringere Anzahl isolierter CD34⁺-Zellen bei höherer Anzahl der

MNC ergibt. Die Angaben über den Anteil von CD34⁺-Zellen im Nabelschnurblut schwanken je nach Spender sehr stark von 0,02% bis 1,43% (Saeland et al., 1992; Hao et al., 1995). Diese Werte entsprechen den Daten, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt worden sind. Neben der Spendervariabilität ist der Reifegrad der Zellen und somit der CD34-Anteil stark vom Stadium der Schwangerschaft und somit vom Zeitpunkt der Entbindung abhängig (Engel et al., 1999). Trotz der im Vergleich zu Zellbanken vereinfachten Prozessierung ist die Kontaminationsrate gleich niedrig (1-17,6% (Somville et al., 1996); 8,2% (Petzold et al., 1999); 10,4% (Eichler et al., 1999)).

Auch die Aufreinigungseffizienz der CD34⁺-Zellen ist mit Literaturdaten vergleichbar. De Wynter et al. (1995) hat CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut isoliert und eine Reinheit von 73,8% erzielt. Die Ausbeute liegt mit 86,1% höher als bei den hier beschriebenen Aufreinigungen. Eine Ursache könnte in der unterschiedlichen Prozessierung der Zellen liegen. Für die Aufreinigung von CD34⁺-Zellen aus mobilisiertem PB sind ähnliche Werte ermittelt worden (Reinheit: 74%, Ausbeute: 60% und Aufkonzentrierung: 320fach) (Papadimitriou et al., 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Ausbeute der CD34⁺-Zellen und der zeitlichen Differenz zwischen Geburt und Aufreinigung besteht, weshalb diese Differenz so gering wie möglich gehalten werden sollte. Bertolini und Mitarbeiter (1995) haben beschrieben, dass eine Lagerung über 12 h zu einer deutlichen Reduktion der Isolierungs-Effizienz von CFC aus Nabelschnurblut führt, was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die Zellen während der Lagerung teilweise absterben oder apoptotisch werden und somit zu einer Verunreinigung der Proben führen. Weiterhin sind Anlagerungen von Thrombozyten an die MNC denkbar, was die Aufreinigung stören könnte.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Kryokonservierung keinen negativen Effekt auf die CD34⁺-Zellen ausübt, sondern sogar bei einer guten Ausbeute diese Population selektiv durch den Einfrier- und Auftauprozess angereichert wird. Der ermittelte Wert für die CD34-Ausbeute nach dem Auftauen ist gut mit Literaturdaten für CD34⁺-Zellen aus peripherem Blut ($76 \pm 12\%$) vergleichbar (Dazey et al., 1999). Der Effekt der Selektion der CD34⁺-Zellen ist in dieser Form bisher nicht beschrieben. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch die Zugabe des DMSO beim Einfrieren die stoffwechselaktiveren reifen Blutzellen die toxische Substanz stärker aufnehmen und geschädigt werden.

4.2. Charakterisierung der stromalen Zelllinien

Für die Kokultivierung der hämatopoietischen Zellen sind die beiden murinen stromalen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI eingesetzt worden (Kapitel 3.2.2.). Für die Optimierung einer Prozessführung ist es erforderlich, die Zelllinien bezüglich Wachstum, Medienverbrauch und Zytokinproduktion zu charakterisieren.

4.2.1. Charakterisierung der unbestrahlten stromalen Zelllinien

In ersten Versuchen sind unbestrahlte Zellen von M2-10B4 mod. und SI/SI in Gewebekulturflaschen untersucht worden. Dazu wurden Wachstumskurven unter den in Tabelle 4-1 beschriebenen Kulturbedingungen aufgenommen.

Tabelle 4-1: Kulturparameter der Wachstumskurven der murinen stromalen Zelllinien

Zellen:	Stromale Zelllinie M2-10B4 mod. Stromale Zelllinie SI/SI
Inokulum:	$4 \cdot 10^3$ Zellen/cm ²
Kultur-Medien:	IMDM, 10% FBS Selektionsmedium, jeweils 10 mL
Kulturdauer:	9 Tage
Anzahl der Versuche:	n = 3
Probenahme:	Täglich

Dabei ist das Wachstum der Zellen in IMDM 10% FBS und in dem für jede Zelllinie spezifischen, antibiotikahaltigem Selektionsmedium (Anhang) verglichen worden. Die wesentlichen Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Ergebnisse der Wachstumskurven der murinen stromalen Zelllinien

Zelllinie:	M2-10B4 mod.	M2-10B4 mod.	SI/SI	SI/SI
Medium:	IMDM 10% FBS	Selektions- medium	IMDM 10% FBS	Selektions- medium
$\mu_{\max}$ [1/h]:	$0,041 \pm 0,001$ Tag 2-4	$0,037 \pm 0,004$ Tag 2-4	$0,050 \pm 0,001$ Tag 2-4	$0,056 \pm 0,003$ Tag 4
Zellen/cm ² am Tag 5:	$1,9 \cdot 10^5$ $\pm 6 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^5$ $\pm 7 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^5$ $\pm 2 \cdot 10^3$	$8,7 \cdot 10^4$ $\pm 9 \cdot 10^3$
max. zellspezifische Glukoseverbrauchsrate [mmol/(10 ⁶ c·d)]:	$0,030 \pm 0,003$	$0,026 \pm 0,002$	$0,092 \pm 0,003$	$0,095 \pm 0,004$

Die Selektionsmedien üben im Vergleich zu IMDM 10% FBS für beide Zelllinien keinen negativen Einfluss auf die maximalen Wachstumsraten aus. M2-10B4 mod. erreicht die maximale Wachstumsrate an den Tagen 2 bis 4. Die Zelllinie SI/SI weist in IMDM 10% FBS

ebenfalls ein maximales Wachstum an den Tagen 2 bis 4 auf und im Selektionsmedium nur am Tag 4. Anschließend sinken die Wachstumsraten in allen Versuchen drastisch ab und erreichen zwischen Tag 6 und 8 den Nullwert, was das Erreichen der stationären Phase anzeigt. Ein Vergleich zwischen den beiden Zelllinien zeigt, dass SI/SI eine höhere maximale Wachstumsrate als M2-10B4 mod. aufweist. Die Zelldichten, die am Tag 5 erzielt wurden, sind für M2-10B4 mod. ebenfalls nicht vom Medium beeinflusst, wohingegen der Wert für SI/SI in Selektionsmedium deutlich niedriger liegt als in IMDM 10% FBS, was den Ergebnissen für die maximalen Wachstumsraten entspricht. Die Selektionsmedien haben für beide Zelllinien keinen negativen Effekt auf die maximalen zellspezifischen Glukoseverbrauchsrate. Eine Gegenüberstellung der Werte zwischen den Zelllinien zeigt, dass SI/SI eine dreifach höhere Verbrauchsrate als M2-10B4 mod. aufweist.

In einem weiteren Versuch ist der Einsatz serumfreier Medien zur Kultivierung der stromalen Zelllinien untersucht worden, da die Verwendung von Seren in einer klinischen Anwendung vermieden werden sollte (Kapitel 3.3.2.). Die Versuchsbedingungen sind Tabelle 4-3 zu entnehmen.

In diesem Versuch wurde neben IMDM 10% FBS, dem Medium, das zur Stammhaltung eingesetzt wird, das Basalmedium ohne Serum und das serumfreie Medium X-Vivo 10 eingesetzt. Um Effekte durch eine eventuell schlechtere Adhäsion in serumfreien Medien auszuschließen, wurden in einem Ansatz die Zellen einen Tag serumhaltig kultiviert und anschließend das Medium mit X-Vivo 10 ausgetauscht.

Tabelle 4-3: Parameter der Untersuchungen zum Einsatz von serumfreiem Medium bei der Kultivierung stromaler Zelllinien

Zellen:	Stromale Zelllinie M2-10B4 mod. Stromale Zelllinie SI/SI
Inokulum:	$2 \cdot 10^3$ Zellen/cm ²
Kultur-Medien:	IMDM IMDM 10% FBS X-Vivo 10 Inokulum: IMDM 10% FBS, ab Tag 1: X-Vivo 10, je 10 mL
Anzahl der Versuche:	n = 3
Kulturdauer:	7 Tage

Es konnte nach einem Tag in allen Ansätzen eine gute Adhäsion der Zellen beobachtet werden. Die Adhärenz verschlechterte sich im Verlauf der Kulturdauer nur bei den Zellen, die im Basalmedium kultiviert wurden. Das serumfreie Medium X-Vivo 10 unterstützte die

Adhäsion gleichermaßen wie das serumhaltige Medium. Die Expansionsdaten der stromalen Zellen nach 7 Tagen sind in Abbildung 4-5 dargestellt.

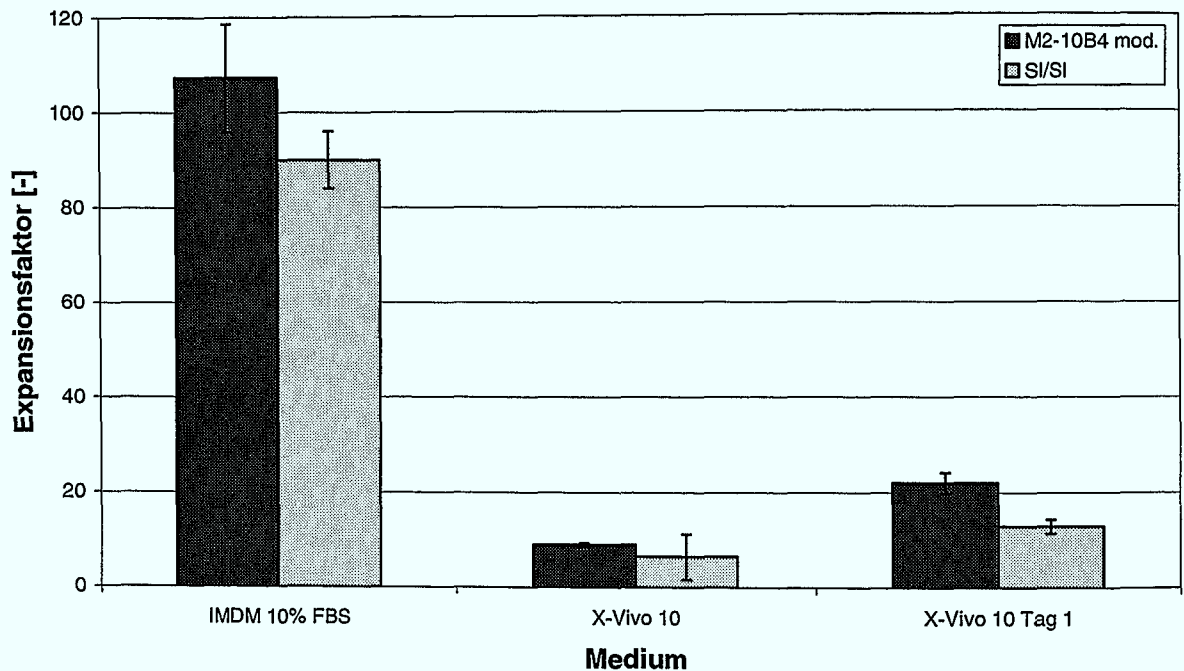


Abbildung 4-5: Vergleich der Kultivierung der stromalen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI in serumfreien und serumhaltigen Medien (n = 3)

Der Vergleich der Expansion des Stromas zeigt, dass für beide untersuchten Zelllinien eine gute Expansion nur mit Serum erzielt werden kann. In den Ansätzen, die IMDM als Medium enthielten, wurden am Tag 7 keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen. Durch die Adhäsion der Zellen mit serumhaltigem Medium und die anschließende Kultivierung mit X-Vivo10 konnte die Expansion von beiden Zelllinien im Vergleich zum Ansatz mit Serum verdoppelt werden. Dieser Wert entspricht 20,5% der Expansion mit Serum für die Zelllinie M2-10B4 mod. und 14% für SI/SI, was die Notwendigkeit der Verwendung von FBS verdeutlicht.

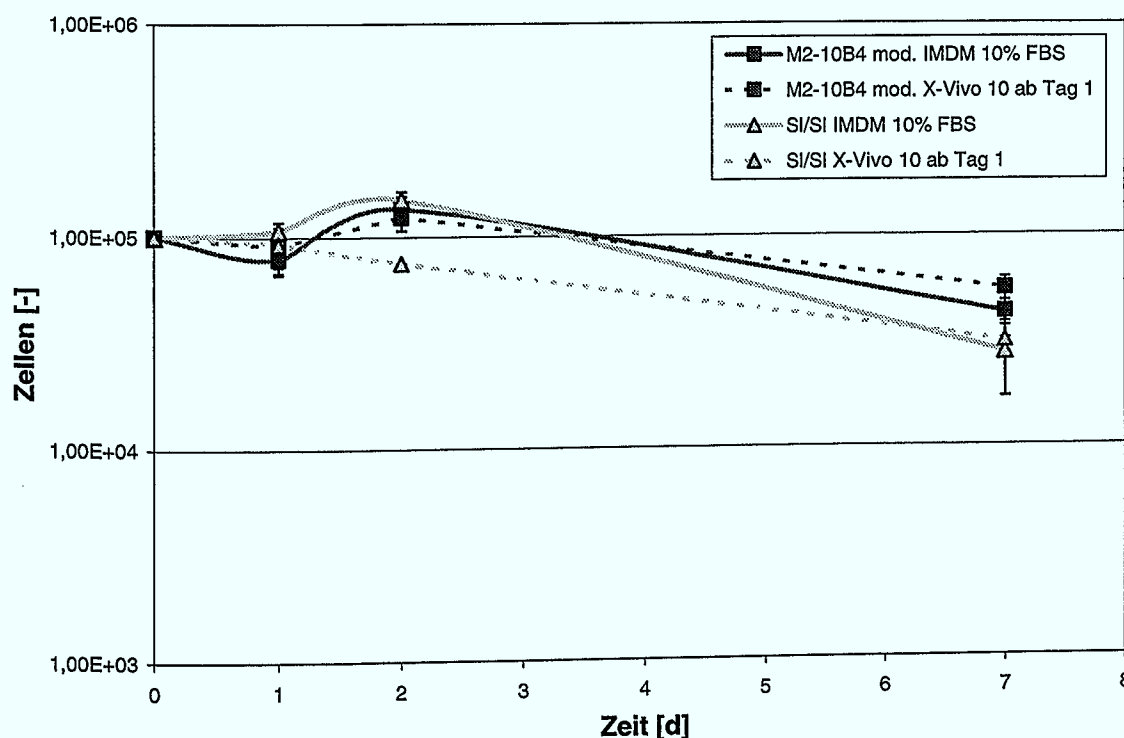
4.2.2. Charakterisierung der bestrahlten stromalen Zelllinien

Die Kokultivierung hämatopoietischer Zellen erfolgte mit bestrahlten und somit wachstumsarretierten stromalen Zellen. Aus diesem Grund ist das Verhalten der beiden murinen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI nach Bestrahlung mit 80 Gy untersucht worden. Die bestrahlten Zellen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen in Gewebekulturflaschen kultiviert. Als Medium diente in der ersten Versuchsreihe IMDM 10% FBS. In der zweiten wurden die Zellen mit serumhaltigem Medium 1 Tag kultiviert, bevor das Medium abgezogen und durch X-Vivo 10 ausgetauscht wurde. Die Kulturparameter sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst.

Tabelle 4-4: Parameter der Untersuchungen zum Einsatz von serumfreiem Medium bei der Kultivierung bestrahlter, stromaler Zelllinien

Zellen:	Stromale Zelllinie M2-10B4 mod. (mit 80 Gy bestrahlt) Stromale Zelllinie SI/SI (mit 80 Gy bestrahlt)
Inokulum:	$4 \cdot 10^3$ Zellen/cm ² , je 5 mL Medium
Kultur-Medien:	A: IMDM 10% FBS B: Inokulum: IMDM 10% FBS, ab Tag 1: X-Vivo 10
Kulturdauer:	7 Tage
Anzahl der Versuche:	n = 2, pro Probenahme
Probenahmen:	Tag 1, 2, 7

In Abbildung 4-6 ist die Entwicklung der Zellzahlen über die Kulturdauer dargestellt. Der Verlauf ist unabhängig vom Medium für die jeweilige Zelllinie identisch. Bis Tag 2 bleibt die Zellzahl konstant und nimmt dann bis zum Tag 7 ab. Dabei sind von der Zelllinie M2-10B4 mod. nur noch $49 \pm 10\%$ der inokulierten Zellen am Tag 7 zu finden und $29 \pm 7\%$ von SI/SI. Die Vitalität der Zellen am Tag 7 war mit 72-89% niedrig.

**Abbildung 4-6:** Vergleich der Kultivierung der bestrahlten stromalen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI in serumfreiem und serumhaltigem Medium (n = 2)

Mikroskopisch betrachtet sahen die Zellen, die in X-Vivo 10 kultiviert worden sind, vitaler aus als die im serumhaltigem Medium, was an der stärkeren Ausspreitung und der transparenten Morphologie der Zellen im serumfreien Medium zu erkennen war.

In Abbildung 4-7 sind die Verbrauchsrate von Glukose, Glutamin und Glutamat in den verschiedenen Versuchsansätzen am Tag 7 dargestellt. Beide Zelllinien zeigen einen deutlichen Unterschied in den Glukoseverbrauchsrate in Abhängigkeit vom Serum, wobei in den serumfreien Ansätzen diese Rate wesentlich niedriger als im serumhaltigen Medium ist. Dieser Effekt ist für Glutamin im Rahmen der Fehlergenauigkeit nur andeutungsweise zu erkennen.

Die Zelllinie SI/SI weist im Vergleich zu M2-10B4 mod. eine höhere Glukoseverbrauchsrate auf. Der Glutaminverbrauch ist bei beiden Zelllinien identisch. Glutamat wird von beiden Zelllinien produziert, wobei der Wert für serumhaltiges Medium identisch ist. Durch X-Vivo 10 wird die Glutamatproduktion der SI/SI auf 30% der Rate im serumhaltigen Medium reduziert, wohingegen die für M2-10B4 mod. auf 180% gesteigert wird. Die Produktion von Laktat ist bei beiden Zelllinien identisch (serumhaltig: 0,07 mmol/(10⁶c·d), nur 69% davon serumfrei). Bei der Betrachtung der Laktat-Konzentration ist zu berücksichtigen, dass bereits im Serum Laktat vorhanden ist (Kapitel 3.3.2.). Dadurch ist der Wert im serumhaltigen Medium mit 8,3 mmol/L nach 7 Tagen Kultur höher als in X-Vivo 10 (3,7-4,4 mmol/L).

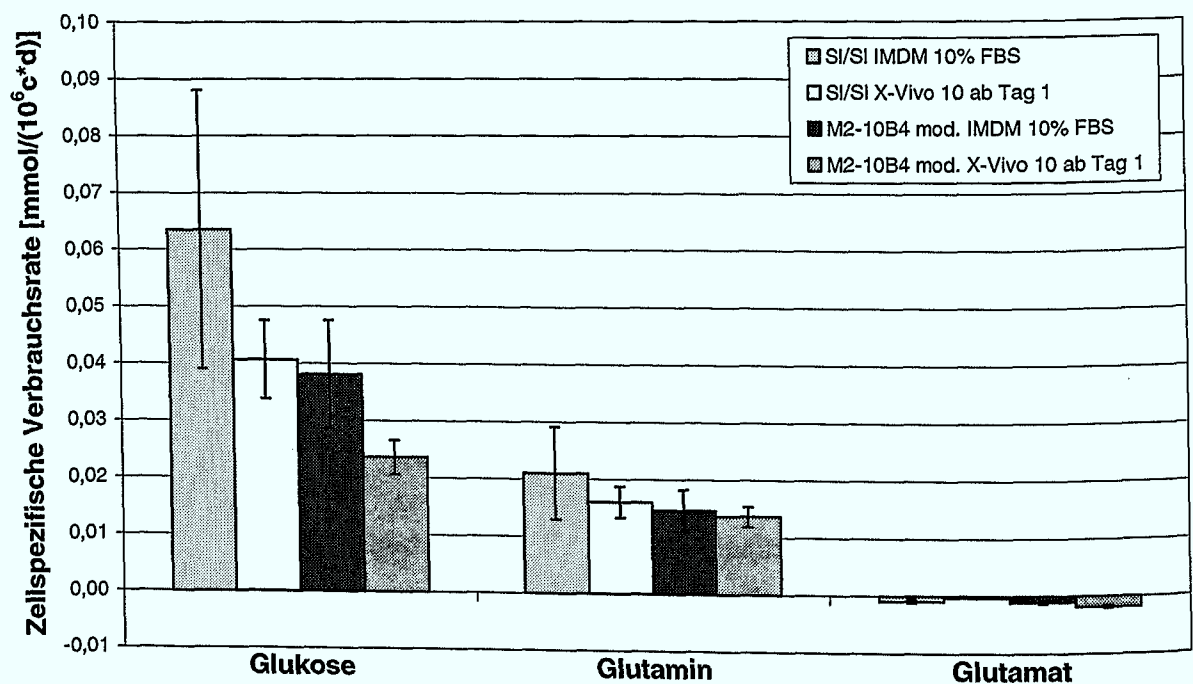


Abbildung 4-7: Vergleich der Verbrauchsrate verschiedener Substanzen der bestrahlten Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI in Abhängigkeit vom Medium (Tag 7)

Für die bestrahlten stromalen Zellen M2-10B4 mod. und SI/SI sind die Produktionsraten für die humanen Zytokine IL-3, SCF, TPO und FL unter verschiedenen Versuchsbedingungen ermittelt worden. Die Versuchsparameter sind in Tabelle 4-5 dargestellt.

Zur Kontrolle ist die Zytokinkonzentration in den serumhaltigen Medien bestimmt worden, wobei keines der getesteten Zytokine gefunden werden konnte. Die Zytokine TPO und FL wurden auch in keinem der Versuchsansätze detektiert.

Tabelle 4-5: Parameter zur Bestimmung der Zytokinproduktionsraten der bestrahlten stromalen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI, A und B sind unabhängige Versuche

Zellen:	Stromale Zelllinie M2-10B4 mod. (mit 80 Gy bestrahlt)	
	Stromale Zelllinie SI/SI (mit 80 Gy bestrahlt)	
	A	B
Inokulum:	$1 \cdot 10^5$ Zellen in 5 mL	$5 \cdot 10^4$ Zellen in 1 mL
Kultur-Medien:	IMDM 10% FBS	LTC-Medium
	X-Vivo 10	
Anzahl der Versuche:	n = 2	n = 2
Kulturdauer:	1 Tag	7 Tage
Untere Nachweisgrenze der Zytokine:	0,07 ng/mL	0,02 ng/mL

Die zellspezifischen SCF-Produktionsraten in den verschiedenen Versuchen sind in Abbildung 4-8 zusammengefasst.

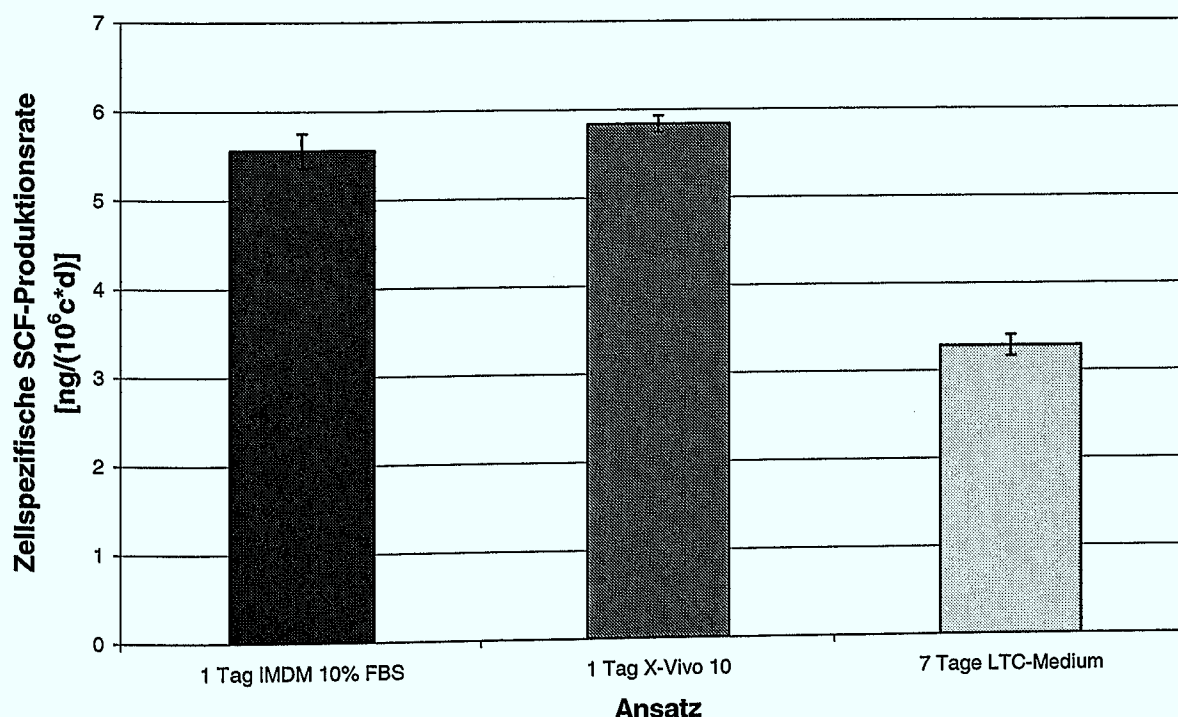


Abbildung 4-8: Zellspezifische SCF-Produktion von SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) in Abhängigkeit von der Kulturdauer und dem Medium

Für die Zelllinie M2-10B4 mod. konnte nur im Versuch über 7 Tage eine IL-3-Produktion nachgewiesen werden. Es wurde eine IL-3-Konzentration von 1,37 ng/mL gemessen, was einer zellspezifischen Produktionsrate von $5,51 \pm 0,48$ ng/(10⁶c·d) entspricht. Die IL-3-

Produktion nach einem Tag lag unter der Nachweisgrenze des Zytokins. Eine SCF-Produktion konnte nicht ermittelt werden. Die IL-3-Konzentration bei der Zelllinie SI/SI lag in allen Versuchsansätzen unter der Nachweisgrenze, wohingegen SCF sehr gut detektiert werden konnte. In Abbildung 4-8 ist zu erkennen, dass unabhängig vom Serum gleiche Produktionsraten nach einem Tag in Kultur erzielt worden sind. Im Gegensatz dazu ist diese Rate nach 7 Tagen im serumhaltigen Medium mit 58% des Wertes von Tag 1 deutlich niedriger. Die Zytokin-Produktion nach 7 Tagen im serumfreien Medium wurde nicht ermittelt

4.2.3. Diskussion

In diesem Kapitel werden die für die stromalen Zelllinien ermittelten Charakteristika in Bezug auf Wachstums- und Verbrauchsdaten, Zytokinproduktion und Bestrahlung im Vergleich zu anderen Stromazelllinien und primären Zellen diskutiert.

In Wachstumskurven der stromalen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI sind die Wachstums- und Glukoseverbrauchsdaten ermittelt worden, wobei insbesondere der Einfluss der spezifischen Selektionsmedien untersucht wurde (Kapitel 4.2.1.). Es konnte kein negativer Effekt durch das Selektionsmedium auf die Zelllinie M2-10B4 mod. nachgewiesen werden. Die Zelllinie SI/SI reagierte allerdings relativ sensitiv auf das Selektionsmedium, was sich durch deutlich geringeres Wachstum ausdrückte. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Versuchen mit M2-10B4 mod. und SI/SI lag darin, dass das Inokulum für die Wachstumskurve von M2-10B4 mod. bereits in Selektionsmedium kultiviert wurde, während das für SI/SI aus IMDM 10% FBS stammte. Es ist daher wahrscheinlich, dass das geringere Wachstum im Selektionsmedium durch eine verlängerte lag-Phase durch den Selektionsdruck der Antibiotika begründet ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die maximale Wachstumsrate in beiden Medien identisch ist, aber im Selektionsmedium erst zwei Tage später erreicht wird. Weiterhin sind die maximalen zellspezifischen Glukoseverbrauchsdaten in beiden Medien übereinstimmend, was auf eine ähnliche Stoffwechselaktivität schließen lässt. Die Wachstumsdaten beider Zelllinien sind im Vergleich zu den humanen stromalen Zelllinien L87/4 und L88/5 und zu primären Stromazellen deutlich höher (Tabelle 4-6).

Die Substratverbrauchsdaten liegen bei beiden murinen stromalen Zelllinien wesentlich höher als bei primären CD34⁺-Zellen in stromafreier Kultur (Tabelle 4-7). Aus diesem Grund sind im Rahmen einer Prozessführung die Verbrauchsdaten des Stromas die entscheidenden Parameter für Fütterungsstrategien.

Tabelle 4-6: Wachstums- und Produktionsraten humaner Stromazelllinien und primären Stromas

Zellen	Wachstumsrate [1/h]	Zellspezifische SCF- Produktionsrate [ng/(10 ⁶ c·d)]	Referenz
L87/4	0,025	0,026	Schröder (1997)
L88/5	0,017	0,021	Krafczyk (1996)
Primäres Stroma	0,010 ohne bFGF 0,018 mit bFGF	n.b.	Dooley et al. (1995)

Tabelle 4-7: Zellspezifische Verbrauchsdaten primärer CD34⁺-Zellen in ungefütterter Kultur

Maximale zellspezifische Verbrauchsrate [mmol/(10 ⁶ c·d)]	Glukose	Glutamin	Glutamat	Laktat
Primäre CD34 ⁺ -Zellen in 7 Tagen Kultur	2,31·10 ⁻³	9,73·10 ⁻⁵	-1,54·10 ⁻⁶	-4,08·10 ⁻³

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass serumfreies Medium eine gute Adhäsion der Zellen ermöglicht, aber die Expansion der Zellen nicht fördert. Die Adhäsion der Zellen in serumhaltigem Medium und die anschließende Kultivierung in serumfreiem Medium führte zu einem positiven Effekt im Vergleich zur Kultivierung mit X-Vivo 10. Da die Adhäsion der Zellen nicht durch das serumfreie Medium beeinträchtigt ist, ist die stärkere Expansion auf den stimulierenden Effekt des Serums innerhalb der ersten 24 h zurückzuführen. Ein Einfluss von Serumresten kann ausgeschlossen werden, da die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen worden sind. Schröder (1997) wies für die humanen Stroma-Zelllinien L87/4 und L88/5 ebenfalls negative Effekte von serumfreiem Medium nach, wobei dort weder Adhäsion noch Wachstum der Zellen erzielt werden konnten.

Die Bestrahlung der Zellen führte bei beiden stromalen Zelllinien zu einer Reduktion der Zellzahl und Vitalität im Verlauf einer Kultivierung über 7 Tage (Kapitel 4.2.2.), wobei sich SI/SI als sensibler erwies. Die Glukoseverbrauchsrate der M2-10B4 mod. wird durch die Bestrahlung nicht verändert, wohingegen die Rate der SI/SI im Vergleich zu unbestrahlten Zellen auf 70% absinkt. Serumfreies Medium ist für bestrahlte stromale Zellen gut geeignet, da die Adhäsion gleichermaßen erfolgt und die Zytokinproduktionsraten unbeeinflusst bleiben. Für die humane stromale Zelllinie L87/4 ist beschrieben, dass durch erhöhte Serumkonzentrationen die Zytokine GM-CSF und G-CSF verstärkt produziert werden, die Zytokine M-CSF und SCF unbeeinflusst bleiben und TGF- β verringert gebildet wird (Schröder, 1997). Der Effekt auf die SCF-Produktion ist demnach auch für andere Zelllinien bekannt.

Hogge und Mitarbeiter (1996) haben die beiden murinen stromalen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI genetisch verändert. Sie erzielten Zytokin-Konzentrationen im Medium von 4 ng/mL IL-3 bei M2-10B4 mod. und 1 ng/mL IL-3 bzw. 4 ng/mL SCF bei SI/SI. Die in dieser Arbeit bestimmten Zytokin-Produktionsraten können nicht direkt mit diesen

Literaturdaten verglichen werden, da weder Zellzahlen noch Kulturdauer oder Volumina angegeben werden. Für die Zelllinie SI/SI konnte hier keine IL-3-Produktion nachgewiesen werden. Wenn das Verhältnis zwischen der Produktion der beiden Zytokine aus der Literatur eingerechnet wird, liegt die IL-3-Konzentration für den Versuch über 1 Tag mit 0,02 ng/mL deutlich unter der Nachweisgrenze. Für die Zelllinie M2-10B4 mod. ist IL-3 nur nach 7 Tagen nachgewiesen worden. Wenn der Wert dieser Produktionsrate auf den Versuch, der über 1 Tag lief, bezogen wird, liegt die Zytokin-Konzentration ebenfalls deutlich unter der Nachweisgrenze.

Im Vergleich zur humanen Stromazelllinie L87/4 ist die zellspezifische SCF-Produktionsrate von SI/SI bis zum Faktor 226 größer (Schröder, 1997). Für primäre Stromazellen aus Knochenmark sind nach 14tägiger Kultur SCF-Konzentrationen von 0,009-0,23 ng/mL ermittelt worden (Guerriero et al., 1997). Angaben über die SCF-Konzentration im Blutserum schwanken zwischen 0,98 ng/mL (Produktinformation Quantikin®-ELISA, R&D Systems, Wiesbaden) und $3,3 \pm 1,1$ ng/mL (Langley et al., 1993). In den hier beschriebenen Versuchen konnten SCF-Konzentrationen von 0,09 ng/mL nach 1 Tag und 0,733 ng/mL nach 7 Tagen mit der Zelllinie SI/SI erreicht werden. Diese Werte liegen deutlich über den Konzentrationen einer Kultur mit primärem Stroma, sind aber etwas niedriger als die Angaben für Blutserum. Der Vergleich mit den Zytokinkonzentrationen im Blut ist allerdings nur bedingt aussagekräftig, da im Knochenmark durch die spezielle Struktur verschiedene Mikromilieus vorliegen, die sich stark im Zytokingehalt unterscheiden können.

4.3. Immobilisierungsversuche im Miniatur-Schlaufenreaktor

Die Immobilisierung der Zellen auf den Mikroträgern ist der erste wichtige Schritt einer Kultivierung in trägergestützten Systemen. Bei einer Kokultur stromaler und hämatopoietischer Zellen werden die stromalen Zellen zuerst immobilisiert, damit sie durch das Ausbilden der Extrazellulärmatrix eine stabile Unterlage ausbilden. Die hämatopoietischen Zellen binden an diese Matrix und die Adhäsionsmoleküle des Stromas. Die Versuche zur Immobilisierung der Zellen wurden im Miniatur-Schlaufenreaktor durchgeführt, dessen Handhabung dabei etabliert worden ist.

4.3.1. Parallelität der Miniatur-Schlaufenreaktoren

Die wichtigste Voraussetzung für die Anwendung des Miniatur-Schlaufenreaktors ist die Parallelität der Kulturbedingungen und Ergebnisse innerhalb einer mit Miniatur-Schlaufenreaktoren vollbesetzten Gewebekulturplatte. Der Nachweis der Parallelität erfolgte

über einen Versuch, in dem die gleichmäßige Immobilisierung von stromalen Zellen auf Siran-Trägern untersucht worden ist. Die Kulturparameter sind in Tabelle 4-8 aufgeführt.

Tabelle 4-8: Parameter zur Untersuchung der Parallelität im Miniatur-Schlaufenreaktor

Zellen:	Stromale Zelllinie M2-10B4 (bestrahlt mit 80 Gy)
Träger:	Siran-Träger, $0,452 \pm 0,027$ g/Reaktor
Inokulum:	$1 \cdot 10^7$ c/Reaktor
Medium:	3 mL RPMI + 10% FBS
Anzahl der Versuche:	n = 12
Kulturdauer:	24 h

In diesem Versuch wurden 12 Miniatur-Schlaufenreaktoren, die Siran-Träger enthielten, gleichmäßig mit der stromalen Zelllinie M2-10B4 inokuliert. Dabei wurden aus einer Zellsuspension von $2 \cdot 10^7$ c/mL 500 μ L in jeden Reaktor überführt. Nach 24stündiger Kultivierung wurden die Reaktoren abgeerntet und die Zellzahl bestimmt. Die vergleichenden Werte der immobilisierten Zellen und der berechnete Mittelwert der 12 Ansätze sind in Abbildung 4-9 dargestellt.

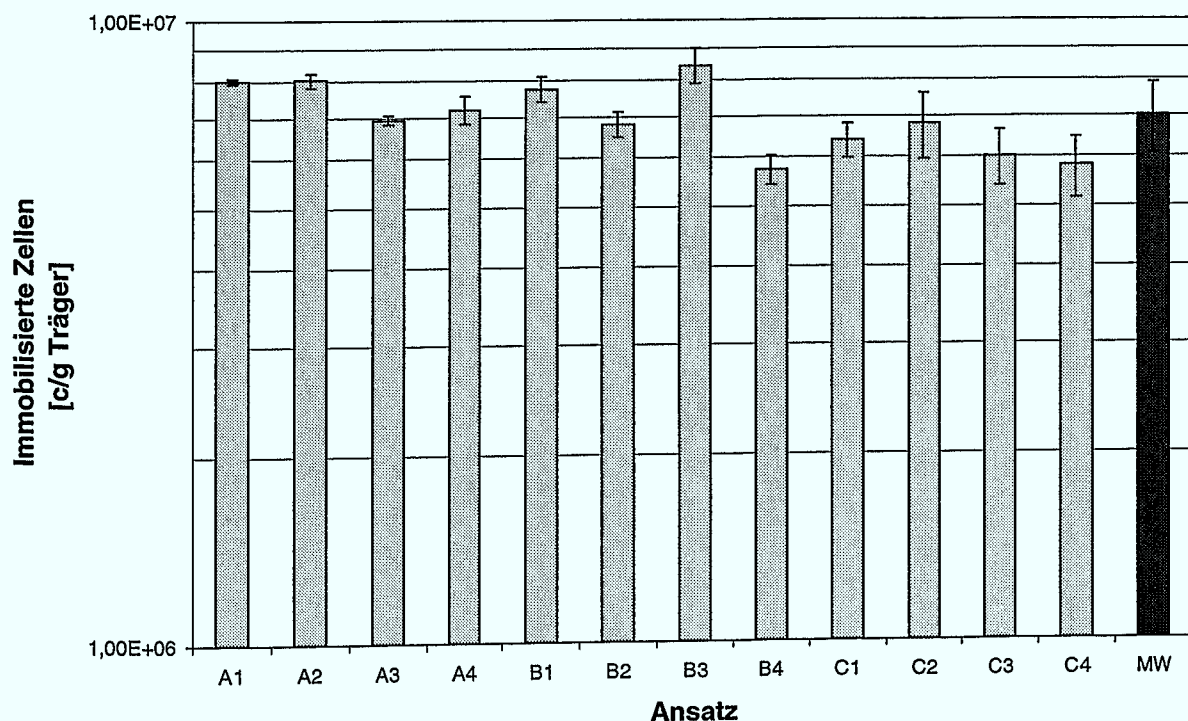


Abbildung 4-9 : Vergleich der Parallelität der Immobilisierung in 12 Miniatur-Schlaufenreaktoren (Mittelwert (MW) der Ansätze)

Das Ergebnis zeigt, dass die Parallelität der einzelnen Ansätze gewährleistet ist, was durch den Vergleich mit dem Mittelwert unterstützt wird. Dabei ist zu berücksichtigen, dass ein Teil

des Fehlers auf der im Vergleich zu Mittelwert um 6% variierenden Trägermenge pro Reaktor basiert. Außerdem ist eine Zellzählung mit der Neubauerkammer ebenfalls mit einem Fehler von 6% behaftet. Die Zellsuspension, die zum Inokulieren eingesetzt wurde, war mit $2 \cdot 10^7$ c/mL hoch konzentriert. Kleine Tropfen, die sich außen an der Pipette befinden können, variieren unter Umständen die inokulierte Zellzahl. Es empfiehlt sich daher, gering konzentrierte Zellsuspensionen einzusetzen und das Volumen des Inokulums zu erhöhen.

In diesem Versuch wurde eine durchschnittliche Immobilisierungsrate von $31,5 \pm 3,9\%$ erzielt. Weiterhin ist der Anteil der Zellen, die sich noch in Suspension befanden oder die sich bei der Zellernte ablösten und in die Waschlösung gelangten, bestimmt worden. Es konnten nur $0,4 \pm 0,38\%$ der inokulierten Zellen im Medium und $0,96 \pm 0,27\%$ in PBS nachgewiesen werden, weshalb diese Betrachtung bei weiteren Immobilisierungsversuchen für stromale Zellen vernachlässigt werden kann. Einige Zellen adhärieren am Boden der Gewebekulturplatte, sind aber zahlenmäßig zu vernachlässigen. Es muss davon ausgegangen werden, dass die restlichen Zellen durch den Rührer zerstört worden sind. Die eingesetzte Zellzahl pro Miniatur-Schlaufenreaktor erwies sich für eine Kokultivierung mit hämatopoietischen Zellen als ungeeignet. Bei dieser Zelldichte wurde bereits nach der kurzen Kulturdauer von 24 h das Medium sehr stark angesäuert und die Glukose-Konzentration auf 4,4 mmol/L reduziert, was 41% des unverbrauchten Mediums entspricht. Auf den Prozess der Immobilisierung hat dieser Medienverbrauch keinen Einfluss, wohingegen bei einer Kokultivierung bereits mehrfach ein Medienaustausch erforderlich wäre, um Limitierungen auszuschließen.

4.3.2. Vergleich von Collagen- und Siran-Trägern

Die verschiedenen Träger sind im Kapitel 3.6.1. beschrieben und verglichen worden. Die Eignung der Träger für eine Kokultur wurde experimentell durch einen Vergleich des Immobilisierungsverhaltens der stromalen Zelllinie M2-10B4 auf den beiden Trägertypen untersucht. Die Kulturparameter sind in Tabelle 4-9 zusammengefasst.

Tabelle 4-9: Parameter zur Untersuchung der verschiedenen Trägermaterialien

Zellen:	Stromale Zelllinie M2-10B4 (bestrahlt mit 80 Gy)
Träger:	Siran-Träger, $0,531 \pm 0,05$ g/Reaktor Collagen-Träger, $0,343 \pm 0,07$ g/Reaktor Collagen-Träger, $0,173 \pm 0,02$ g/Reaktor
Inokulum:	4 verschiedene Zellzahlen: $5 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^7$ c/Reaktor
Medium:	4 mL RPMI 1640 10% FBS
Anzahl der Versuche:	n = 3
Kulturdauer:	24 h

Es wurden drei unabhängige Versuche mit jeweils 12 Miniatur-Schlaufenreaktoren durchgeführt, wobei zwei mit Collagen- und einer mit Siran-Trägern erfolgte. Jede Zellkonzentration wurde in Dreifachbestimmung getestet.

In Abbildung 4-10 sind die Ergebnisse des Trägervergleichs dargestellt. Es zeichnet sich, unabhängig vom Trägermaterial, deutlich eine lineare Abhängigkeit zwischen der inokulierten und der immobilisierten Zellzahl ab. Das bedeutet, dass in dem Bereich der eingesetzten Zellzahlen noch keine Sättigung der Trägeroberfläche zu verzeichnen ist. Der Vergleich der beiden Trägermaterialien zeigt, dass die Immobilisierung der stromalen Zellen auf den Collagen-Trägern mit 53% signifikant höher ist als auf den Siran-Trägern (37%).

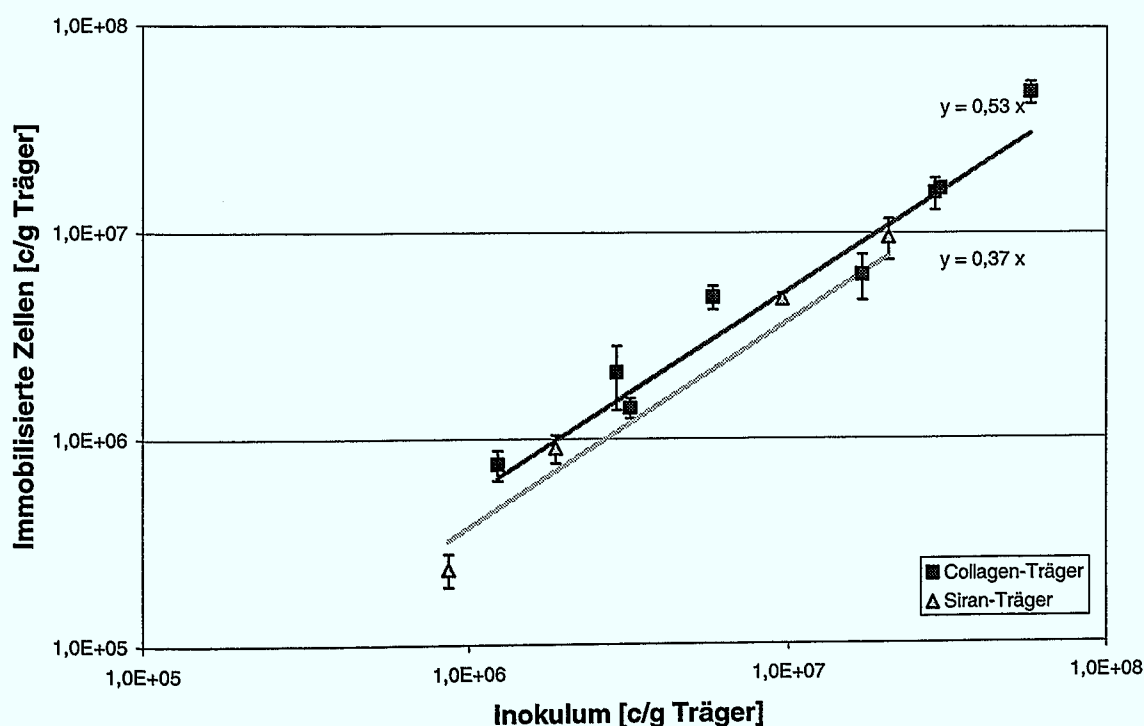


Abbildung 4-10: Vergleich verschiedener Trägermaterialien, Immobilisierung der stromalen Zelllinie M2-10B4

Weiterhin zeigt dieser Versuch, dass mit diesem Reaktorsystem eine gute Reproduktion von Messdaten gewährleistet ist. Die Werte innerhalb der Dreifachbestimmung sind nahezu identisch und zwischen den 2 unabhängigen Versuchen mit Collagen-Trägern sehr gut vergleichbar.

4.3.3. Vergleich der Immobilisierung muriner stromaler Zelllinien

Für eine Kokultur stromaler und hämatopoietischer Zellen kann es erforderlich sein, dass zwei verschiedene Zelllinien als stromale Komponente dienen, da durch die Kombination ihrer Eigenschaften eine bessere Unterstützung der Hämatopoiese möglich ist. Dabei kann das

Verhältnis der stromalen Zelltypen zueinander einen wesentlichen Einfluss haben. Im immobilisierten System ist zu berücksichtigen, dass durch unterschiedliche Adhäsion der Zelltypen das Verhältnis auf den Trägern verändert wird. In diesem Versuch ist das Immobilisierungsverhalten der stromalen Zelllinien untersucht worden. Die Daten für M2-10B4 stammen aus Kapitel 4.3.2.. Die Kulturparameter für M2-10B4 mod. und SI/SI sind in Tabelle 4-10 zusammengefasst. Abbildung 4-11 zeigt die Immobilisierung der Zelllinien in Abhängigkeit von der Inokulumsdichte.

Tabelle 4-10: Parameter zum Vergleich der Immobilisierung verschiedener stromaler Zelllinien

Zellen:	Stromale Zelllinie M2-10B4 mod (bestrahlt mit 80 Gy)
	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy)
Träger:	Collagen-Träger
	M2-10B4 mod. Versuch 1: $0,383 \pm 0,069$ g/Reaktor
	M2-10B4 mod. Versuch 2: $0,403 \pm 0,052$ g/Reaktor
	SI/SI Versuch 1: $0,402 \pm 0,073$ g/Reaktor
	SI/SI Versuch 2: $0,552 \pm 0,074$ g/Reaktor
Inokulum:	je 4 verschiedene Zellzahlen: $1 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^6$ c/Reaktor
Anzahl der Versuche:	n = 3
Medium:	4 mL RPMI 1640 10% FBS
Kulturdauer:	24 h

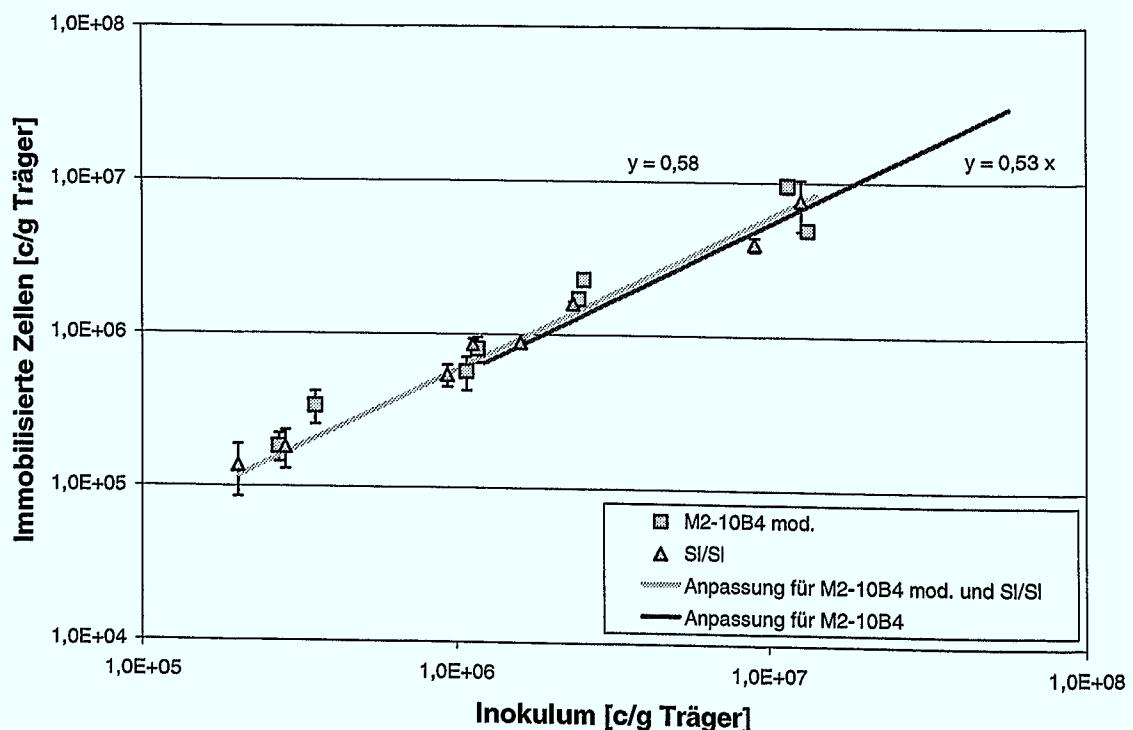


Abbildung 4-11: Vergleich der Immobilisierung verschiedener stromaler Zelllinien (M2-10B4, M2-10B4 mod. und SI/SI)

Es ist kein Unterschied zwischen dem Immobilisierungsverhalten von M2-10B4 mod. und SI/SI zu erkennen, weshalb eine grafische Anpassung für die gesamten Daten erfolgen konnte. Die mittlere Immobilisierungsrate betrug 58%, womit sie etwas über der Rate der nicht modifizierten M2-10B4 (53%) liegt.

Wenn die beiden murinen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI gemeinsam in einer Kokultur eingesetzt werden, kann aus diesem Ergebnis abgeleitet werden, dass beim Inokulieren das Verhältnis zwischen ihnen verwendet werden kann, das auch auf den Trägern vorliegen soll.

4.3.4. Immobilisierungsverhalten hämatopoietischer Zellen in Kokultur

Vergleich der Immobilisierung der Zelllinie KG-1 und primärer CD34⁺-Zellen

Die Zelllinie KG-1 dient als Modell für das Verhalten von primären CD34⁺-Zellen (Kapitel 3.2.1.). Das Immobilisierungsverhalten dieser Zelllinie ist mit dem primärer CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut verglichen worden. Dabei wurden drei verschiedene Zellzahl-Verhältnisse zwischen den inokulierten hämatopoietischen Zellen und der murinen Stromazelllinie SI/SI (1:2, 1:5 und 1:10) eingesetzt, um zusätzlich den Einfluss der Zelldichte zu untersuchen. Der Versuch wurde mit einer konstanten stromalen Zelldichte durchgeführt, um einen Effekt durch den Medienverbrauch auszuschließen. Die Kulturbedingungen sind in Tabelle 4-11 zusammengefasst.

Tabelle 4-11: Parameter zum Vergleich der Immobilisierung von KG-1 und primären CD34⁺-Zellen im Miniatur-Schlaufenreaktor

Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Hämatopoietische Zelllinie KG-1
Träger:	Primäre CD34 ⁺ -Zellen, Zellen von 3 Spendern gepoolt
Inokulum:	Collagen-Träger, 0,420 ± 0,44 g/Reaktor SI/SI: 5·10 ⁵ c/Reaktor KG-1, primäre CD34 ⁺ -Zellen: 5·10 ⁴ , 1·10 ⁵ und 2,5·10 ⁵ c/Reaktor
Anzahl der Versuche:	n = 2
Medium:	4 ml LTC-Medium
Kulturdauer:	48 h für SI/SI und 24 h für CD34 ⁺ -Zellen bzw. KG-1

Das Ergebnis ist in Abbildung 4-12 dargestellt, wobei für jede Zelldichte die Immobilisierungsrate der hämatopoietischen Zelllinie KG-1 relativ zu der Immobilisierung der primären Zellen aufgetragen ist. Die mittlere Immobilisierungsrate der primären CD34⁺-Zellen betrug unabhängig vom Verhältnis zu den stromalen Zellen ca. 93%. Die Immobilisierung der KG-1 scheint etwas stärker zu sein als die der primären Zellen, aber im Rahmen der Fehlergenauigkeit konnten die gleichen Immobilisierungsraten erzielt werden.

Die Zahl der immobilisierten Zellen setzt sich aus den durch die Trägerlyse erhaltenen Zellen und aus denen, die bei der Trägerernte in die Waschlösung gelangt sind, zusammen. Diese Zellsuspensionen wurden vereinigt, durch Zentrifugation aufkonzentriert und anschließend ausgezählt. Im Medium der Miniatur-Schlaufenreaktoren wurden nur $0,73 \pm 0,7\%$ der Zellen des Inokulums nachgewiesen, wobei kein Unterschied zwischen der Zelllinie und dem Primärmaterial zu erkennen war.

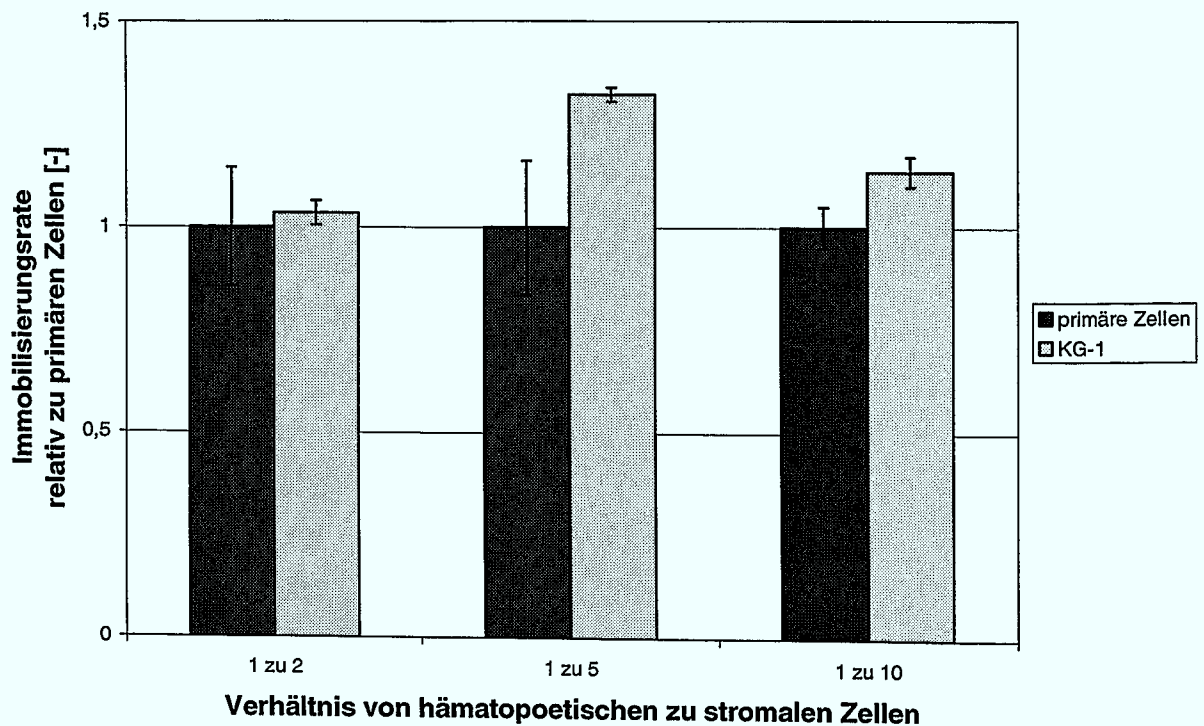


Abbildung 4-12: Vergleich der Immobilisierung der Zelllinie KG-1 und primärer CD34⁺-Zellen

Ein interessanter Effekt zeigte sich bei der Immobilisierung der primären CD34⁺-Zellen. Das Inokulum wies eine CD34-Reinheit von 86,6% auf, wohingegen nach der Zellernte der CD34-Anteil der immobilisierten Zellen $92 \pm 1,7\%$ betrug. Es scheint eine Aufkonzentrierung der CD34⁺-Zellen durch die Adhäsion an die stromale Matrix erfolgt zu sein.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt eine gute Vergleichbarkeit des Immobilisierungsverhaltens von KG-1 mit Primärmaterial. Dadurch ist die Übertragbarkeit von Immobilisierungsstudien im Festbettreaktor, die aufgrund des hohen Zellbedarfs mit der Zelllinie KG-1 durchgeführt wurden, auf primäre CD34⁺-Zellen gewährleistet (Schmidt, 2000).

Immobilisierung der Zelllinie KG-1 in Abhängigkeit von der stromalen Zelldichte

Ein wesentlicher Parameter der Kokultur ist das optimale Verhältnis der hämatopoietischen zu den stromalen Zellen. Neben der Funktion der Zytokinproduktion ist eine weitere

bedeutende Aufgabe des Stromas, die Immobilisierung der hämatopoietischen Zellen durch die Interaktion von Adhäsionsmolekülen und der Extrazellulärmatrix zu gewährleisten. In diesem Versuch ist eine konstante Zellzahl von KG-1 eingesetzt worden, die jeweils in Dreifachbestimmung auf vier verschiedene Zelldichten der stromalen Zelllinie M2-10B4 immobilisiert wurden. Die Kulturparameter sind in Tabelle 4-12 aufgeführt. Das Ergebnis zeigt eine Zunahme der Immobilisierungsrate mit steigender Stromadichte (Abbildung 4-13).

Tabelle 4-12: Parameter zur Untersuchung der Immobilisierung der KG-1 in Abhängigkeit von stromalen Zellen

Zellen:	Stromale Zelllinie M2-10B4 (bestrahlt mit 80 Gy) Hämatopoietische Zelllinie KG-1
Träger:	Collagen-Träger, $0,296 \pm 0,059$ g/Reaktor
Inokulum:	M2-10B4: $5 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^7$ c/Reaktor KG-1: $5 \cdot 10^5$ c/Reaktor
Anzahl der Versuche:	n = 3
Medium:	4 mL RPMI 1640 10% FBS
Kulturdauer:	30 h für M2-10B4 und 24 h für KG-1

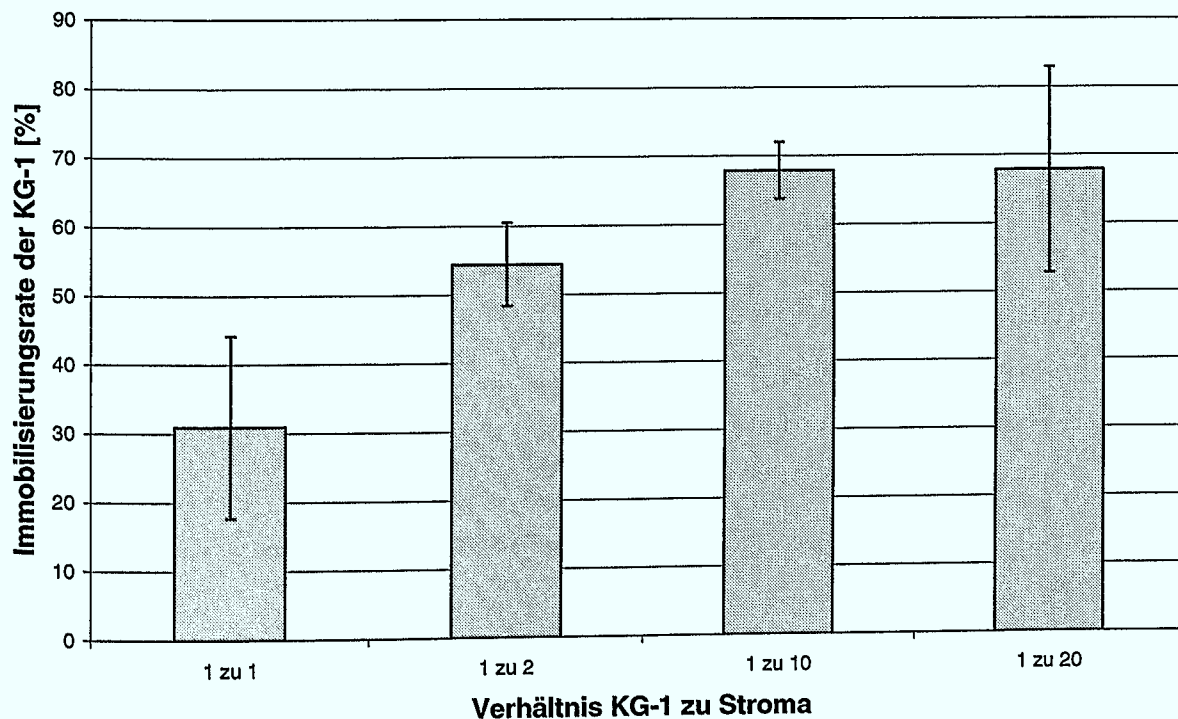


Abbildung 4-13: Immobilisierungsrate der Zelllinie KG-1 in Abhängigkeit der Anzahl stromaler Zellen (M2-10B4)

Durch die Erhöhung der Zellzahlverhältnisse von KG-1 zu den stromalen Zellen von 1:10 auf 1:20 konnte keine weitere Steigerung der Immobilisierung erzielt werden. Bei diesen Zelldichten ist eine Sättigung erreicht. Es wurde eine maximale Immobilisierungsrate der KG-

1 von $68 \pm 15\%$ nachgewiesen. Zellen, die in der Waschlösung nach der Zellernte zu finden waren, sind nicht in die Immobilisierung eingerechnet worden. Im Gegensatz zu den stromalen Zellen (Kapitel 4.3.2.) ist dieser Wert allerdings mit $10,8 \pm 4,3\%$ der inokulierten Zellen relativ hoch. Dieser Effekt kann durch die geringere adhäsive Kraft der hämatopoietischen verglichen mit den stromalen Zellen begründet werden. Im Medium dagegen wurden nur $1,9 \pm 1\%$ der inokulierten Zellen gefunden. Das beweist, dass die in der Waschlösung gefundenen Zellen nicht aus verbliebenem Medium zwischen den Trägern stammen, sondern sich von den Trägern abgelöst haben.

Ein Vergleich dieses Versuchs mit den ersten Ergebnissen dieses Kapitels, wo eine Immobilisierungsrate für hämatopoietische Zellen von $92,9 \pm 20,9\%$ erreicht wurde, zeigt, dass der hier erreichte Wert deutlich niedriger liegt. Wenn die Zellen, die in der Waschlösung vorlagen, mit berechnet werden, ändert sich die Differenz nicht wesentlich. Dieser Unterschied kann durch die geringere Inokulumdifferenz zwischen stromalen und hämatopoietischen Zellen begründet sein (6 h gegenüber 24 h), wodurch die Extrazellulärmatrix unterschiedlich stark aufgebaut ist. Weiterhin ist in diesem Versuch ein anderes Medium, das nur 10% FBS im Vergleich zu 12,5% FBS und 12,5% HS enthielt, eingesetzt worden. Da Serum einen positiven Effekt auf die Adhäsion ausübt, könnte die Steigerung der Immobilisierung dadurch bewirkt worden sein. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist die Verwendung einer anderen stromalen Zelllinie, die sich in der Art der Unterstützung der Immobilisierung unterscheiden kann. Da SI/SI nur eine um 5% höhere Immobilisierungsrate als M2-10B4 aufweist, kann der Effekt nicht aus einer wesentlich höheren Zelldichte resultieren. Demnach scheint die Zelllinie SI/SI eine bessere Immobilisierung der hämatopoietischen Zellen zu ermöglichen als die M2-10B4.

4.3.5. Diskussion

Das Immobilisierungsverhalten von stromalen und hämatopoetischen Zellen wird in diesem Kapitel diskutiert und in Zusammenhang mit verschiedenen Trägermaterialien gestellt.

Die in Kapitel 4.3.1. dargestellten Ergebnisse zeigen die Vergleichbarkeit von 12 parallel betriebenen Miniatur-Schlaufenreaktoren. Weiterhin wurde in allen Immobilisierungsversuchen eine sehr gute Reproduktion der Daten erzielt. Damit hat sich der Miniatur-Schlaufenreaktor als geeignetes System für vergleichende Untersuchungen erwiesen.

Die Wahl der Mikroträger, die für die Kokultur eingesetzt werden, muss unter mehreren Aspekten erfolgen, die neben der Immobilisierung auch den Einfluss des Materials, das Verhalten während der Kultivierung und die Zellernte beinhalten. In Kapitel 4.3.2. konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung der stromalen Zellen auf Collagen-Trägern besser

ist als auf Siran-Trägern. Dadurch ist bei gleichem Inokulum die Zelldichte auf den Siran-Trägern geringer. Das kann die Immobilisierung der hämatopoietischen Zellen negativ beeinflussen und während der Kultivierung zu einer geringeren Produktion stimulierender Faktoren durch das Stroma führen. Weiterhin ist der Anteil der besiedelten Oberfläche auf den Siran-Trägern geringer und damit mehr Fläche des Werkstoffes Glas einem direkten Kontakt zugänglich. Es wurde nachgewiesen, dass Glas keinen negativen Einfluss auf stromale Zellen ausübt, wohingegen sowohl direkter als auch indirekter Kontakt zu einer verringerten Expansion von CD34⁺-Zellen und CFC führt (Schmidt, 2000). Aus diesen Gründen sind Siran-Träger für die Kokultur stromaler und hämatopoietischer Zellen unter dem Aspekt der Immobilisierung und Kultivierung nicht geeignet.

Der Miniatur-Schlaufenreaktor dient als System für vergleichende Untersuchungen im kleinen Maßstab, die auf den Festbettreaktor übertragen werden sollen. Aus fünf verschiedenen Fermentationen im Festbettreaktor (Kapitel 7) konnte eine Immobilisierungsrate der modifizierten Zelllinien SI/SI und M2-10B4 mod. von $58,5 \pm 15,4\%$ auf Collagen-Trägern ermittelt werden. Dieser Wert ist identisch mit der im Miniatur-Schlaufenreaktor erzielten Rate (Kapitel 4.3.3.), was für eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse spricht und damit die Eignung des Screening-Systems beweist.

Ein Vergleich der beschriebenen Immobilisierungsversuche mit Literaturdaten erweist sich als schwierig, da Kultursysteme, Zellen oder Träger variieren. So kann für Siran-Träger nur ein Vergleich mit primären Stromazellen im Wirbelschichtreaktor gezogen werden. Bei den diesen Versuchen konnten 60% des primären Stromas in Wirbelschicht auf den Trägern immobilisiert werden (Meissner et al., 1999; Schröder, 1997). Dieser Wert liegt deutlich über der Immobilisierungsrate für die Zelllinie M2-10B4. Mikroskopische Beobachtungen in Gewebekulturflaschen belegen, dass primäres Stroma eine stärkere und schnellere Adhäsion als M2-10B4 aufweist, was eine Ursache für das unterschiedliche Verhalten sein kann. Weiterhin ist der negative Einfluss des Trägermaterials auf die Immobilisierung der M2-10B4 nachgewiesen worden (Kapitel 4.3.2.). Andere vergleichende Untersuchungen der Immobilisierung auf Collagen- und Siran-Trägern wurden ebenfalls mit einer murinen, strikt adhären Zellenlinie (C127-CAT18) durchgeführt (Lüllau, 1992). Diese Versuche erfolgten in Schüttelkolben. Dabei wurden für Collagen-Träger Immobilisierungsraten von ca. 40% und für Siran-Träger von ca. 55% ermittelt. Die Gründe für das schlechtere Anheften an Collagen-Träger als an Siran-Träger sind in der Arbeit nicht diskutiert.

Die Eignung der Zelllinie KG-1 als Modell für hämatopoietische Zellen ist für das Immobilisierungsverhalten in Kapitel 4.3.4. nachgewiesen worden. Da die Adhäsion der

hämatopoietischen Zellen über spezifische Oberflächenmoleküle erfolgt, kann ein Vergleich der Expression dieser Moleküle auf KG-1 im Vergleich zum Primärmaterial dieses Verhalten erklären. Die Adhäsion und Interaktion zwischen den stromalen Zellen, der Extrazellulärmatrix und den hämatopoietischen Zellen erfolgt überwiegend über die Oberflächenmoleküle VLA-4 und -5. Weiterhin spielt CD44 (Bindung an Collagen und Hyaluronsäure) eine wesentliche Rolle (Kapitel 2.2.4.). Es ist nachgewiesen worden, dass diese Oberflächenmoleküle sowohl von primären CD34⁺-Zellen als auch von KG-1 exprimiert werden (Pasternak und Pasternak, 1994; Turner et al., 1998; Gunji und Suda, 1995; Simmons et al., 1999). Weiterhin sind besondere Strukturen der Zellen, die mit für die Adhäsion verantwortlich sind, sowohl für KG-1a als auch für primäre Zellen aus Nabelschnurblut von Francis und Mitarbeitern beschrieben worden (1998). Sie konnten bis zu 330 µm lange Pseudopodien nachweisen, die ebenfalls die Oberflächenmoleküle CD34 und CD44 tragen und an Fibronektin und Collagen IV binden.

Für KG-1 konnte eine maximale Immobilisierungsrate von $68 \pm 15\%$ auf der murinen Stromazelllinie M2-10B4 erzielt werden (Kapitel 4.3.4.). In einer vergleichenden Studie zur Adhäsion verschiedener hämatopoietischer Zelllinien ermittelten Turner und Mitarbeiter (1998) in Gewebekulturplatten eine Immobilisierung der KG-1a von $76 \pm 8\%$ auf M2-10B4. Die Immobilisierung im Miniatur-Schlaufenreaktor ist demnach sehr gut mit der in einem zweidimensionalen System vergleichbar.

Bei der Immobilisierung der primären Zellen konnte eine leichte Aufkonzentrierung der CD34⁺-Zellen durch die Adhäsion erzielt werden (Kapitel 4.3.4.). Eine mögliche Begründung ist darin zu sehen, dass vor allem frühe Vorläuferzellen im Vergleich zu ausdifferenzierten Zellen eine relativ starke Anheftung an eine stromale Schicht aufweisen (Coulombel et al., 1983) und somit eine selektive Adhäsion der Progenitorzellen erfolgt.

4.4. Voruntersuchungen zur Kultivierung hämatopoietischer Zellen

4.4.1. Stabilität der Zytokine

Die Messung von Zytokin-Konzentrationen in Kulturüberständen erfolgte aus Gründen der Praktikabilität in Proben, die nach der Probenahme eingefroren worden sind. Daher ist es erforderlich nachzuweisen, dass durch den Einfrier- und Auftauprozess kein negativer Einfluss auf die Ergebnisse der ELISA ausgeübt wird. Dazu wurden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zytokine IL-3, TPO, SCF und FL in der Standardkombination in LTC-Medium vorgelegt, die eine Hälfte der Probe bei -80°C über 2 h eingefroren und die andere

im Vergleich dazu bei 4°C gelagert. Anschließend wurde die Probe wieder aufgetaut, und es erfolgte die Messung der Zytokin-Konzentrationen. Dabei konnte kein Konzentrations-Unterschied zwischen der eingefrorenen und der bei 4°C gelagerten Probe ermittelt werden. Damit ist ausgeschlossen, dass durch das Einfrieren von Kulturüberständen die Messung der Zytokin-Konzentrationen negativ beeinflusst wird. Dieses Ergebnis kann nicht ohne Einschränkungen auf serumfreie Medien übertragen werden, da eventuell die Stabilität der Zytokine durch Serumproteine gefördert wird. Es ist allerdings für das Zytokin IL-2 nachgewiesen worden, dass durch Einfrieren in PBS ohne Zusätze und das anschließende Auftauen kein negativer Effekt auf die Messung der Zytokin-Konzentration ausgeübt wird (Gätgens, 2000). Da IL-2 ein besonders instabiles Zytokin ist, kann davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine in serumfreiem Medium ebenfalls nicht durch das Einfrieren geschädigt werden.

Ein anderer Aspekt beim Einsatz von Zytokinen ist ihre Stabilität im Verlauf einer Kultivierung. Dazu wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem a) nur Medium, b) nur Stroma, c) nur CD34⁺-Zellen und d) Stroma und CD34⁺-Zellen in Kokultur bei 37°C kultiviert wurden. Die genauen Versuchsparemeter sind in Tabelle 4-13 zusammengefasst.

Tabelle 4-13: Parameter zur Untersuchung der Zytokinstabilität unter verschiedenen Bedingungen

Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (mit 80 Gy bestrahlt) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 4 verschiedene Spender
Inokulum:	SI/SI: 5·10 ⁴ Zellen/mL Primäre CD34 ⁺ -Zellen: 4,8·10 ³ Zellen/mL
Anzahl der Versuche:	n = 3
Kultur-Medien:	LTC-Medium, 1 mL je Vertiefung einer Gewebekulturschale
Zytokine:	Standardzytokinkombination ohne SCF
Kulturdauer:	7 Tage

Der Ansatz, in dem zytokinhaltiges Medium ohne Zellen 7 Tage im Brutschrank inkubiert worden ist, dient der Bestimmung der Zerfallsraten der verschiedenen Zytokine. Diese sind zusammen mit der Wiederfindungsrate in Tabelle 4-14 aufgelistet. Es ist deutlich zu erkennen, dass FL das stabilste der untersuchten Zytokine ist. IL-3 weist eine um Faktor 12 und TPO eine um Faktor 150 höhere Zerfallsrate als FL auf.

Tabelle 4-14: Zytokinzerfallsraten nach 7tägiger Kultur in LTC-Medium

Zytokin	Zerfallsrate [ng/d]	Wiederfindungsrate am Tag 7 [%]
FL	0,006 ± 0,0002	99,9
IL-3	0,072 ± 0,007	91,3
TPO	0,899 ± 0,003	66,2

Diese Zerfallsraten sind in die Berechnung der zellspezifischen Zytokinverbrauchsrate für das Stroma, die CD34⁺-Zellen und die Zellen in Kokultur einbezogen worden. Die Zytokinverbrauchsrate sind in Abbildung 4-14 dargestellt. Neben den Verbrauchsrate aus den Versuchsansätzen ist ein berechneter Wert für die Kokultur angegeben. Dieser setzt sich aus der Summe der Verbrauchsrate von Stroma und CD34⁺-Zellen unter Berücksichtigung des Zellzahl-Verhältnisses zusammen.

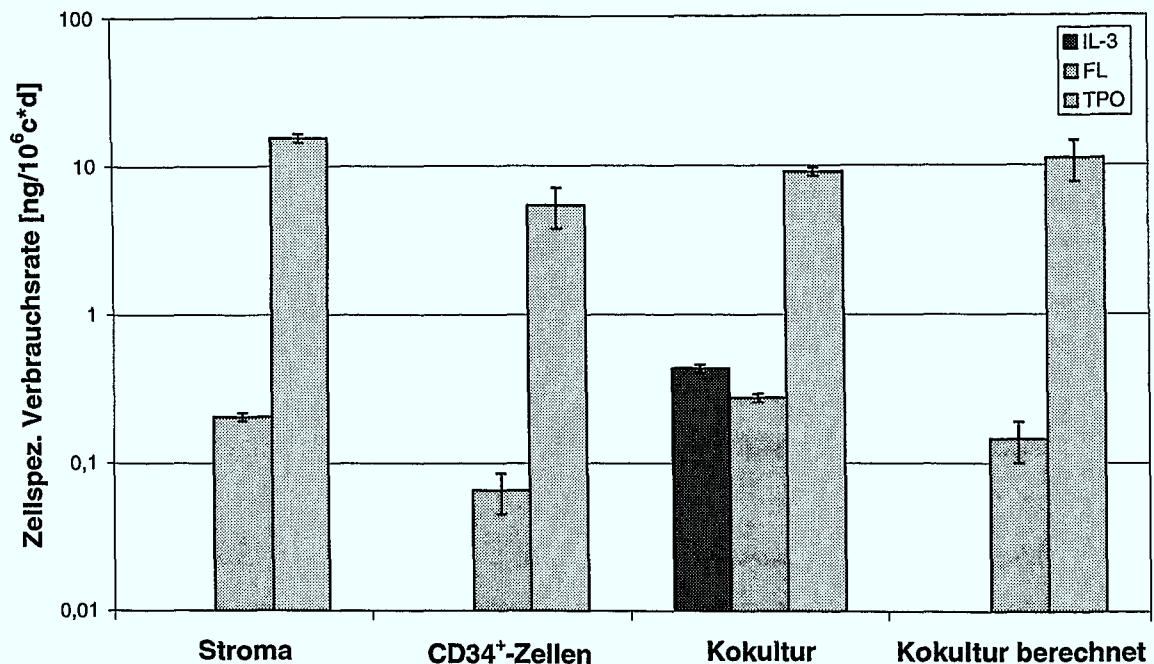


Abbildung 4-14: Vergleich der zellspezifischen Zytokin-Verbrauchsrate über 7 Tage; der berechnete Wert für die Kokultur ergibt sich aus der Summierung der Verbrauchsrate von 1. und 2. unter Berücksichtigung der Zellzahl-Verhältnisse

In den Ansätzen mit Stroma bzw. mit CD34⁺-Zellen konnte keine IL-3 Verbrauchsrate berechnet werden. Der IL-3 Verbrauch war in diesen Ansätzen identisch mit dem Zerfall. Durch die Kokultur ist der IL-3 Verbrauch deutlich erhöht. Vermutlich werden die primären Zellen durch das Stroma so stimuliert, dass sie dieses Zytokin verbrauchen. Die IL-3-Konzentration war in dem hier beschriebenen Versuch in der Kokultur auf 86,8% des Ausgangswertes reduziert. Koller et al. (1993 a) haben Zytokin-Konzentrationen einer statischen Kokultur von Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut mit primärem Stroma ermittelt. In dem Versuch konnten nach 7 Tagen ebenfalls noch 85% der eingesetzten IL-3-Konzentration nachgewiesen werden. Dadurch ist eine Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse mit anderen Stromazellen nachgewiesen.

Die zellspezifische FL-Verbrauchsrate des Stromas ist um Faktor 3 höher als die der CD34⁺-Zellen. In der Kokultur ist die Verbrauchsrate doppelt so hoch wie die, die aus den Einzelkomponenten errechnet ist. Demnach ist für FL, wie schon für IL-3 beschrieben, eine Stimulierung der CD34⁺-Zellen durch das Stroma zu erhöhtem Zytokinverbrauch zu beobachten. TPO wird wie FL von der stromalen Zelllinie um Faktor 2,8 mehr verbraucht als von den CD34⁺-Zellen. Der Stimulierungseffekt durch das Stroma auf den TPO Verbrauch ist allerdings nicht zu beobachten. Der für die Kokultur bestimmte Wert für die Verbrauchsrate stimmt mit der Summe der Einzelkomponenten überein.

Die Rezeptoren der Zytokine TPO und FL sind nur auf hämatopoietischen Vorläuferzellen vorhanden (Debili et al., 1995; Small et al., 1994; Lyman und Jacobsen, 1998). Das bedeutet, dass der Zytokinverbrauch des Stromas nicht durch Rezeptorbindung und Internalisierung des Zytokin-Rezeptor-Komplexes verursacht werden kann. Eine mögliche Bindung der Zytokine an die gebildete Extrazellulärmatrix des Stromas (Kapitel 2.2.4.) könnte das Absinken der Zytokin-Konzentration erklären.

4.4.2. Gleichzeitige Kultivierung hämatopoietischer Zellen verschiedener Spender

Ein wesentliche Schwierigkeit bei der Auswertung von Experimenten mit Primärmaterial ist die vom Spender abhängige Variabilität der Zellen und damit der Versuchsergebnisse. Neben dem Einsatz von einem in den Versuchsbedingungen konstanten Standard ist auch das Vereinigen von Zellen verschiedener Proben eine Möglichkeit die Variabilität auszugleichen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das gleichzeitige Kultivieren hämatopoietischer Zellen verschiedener Spender einen Einfluss auf die Expansion der verschiedenen Zellpopulationen hat. Die Kulturparameter sind in Tabelle 4-15 aufgeführt.

Tabelle 4-15: Versuchsparameter zur gleichzeitigen Kultivierung von Zellen verschiedener Spender

Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 3 verschiedene Spender
Inokulum:	SI/SI: $5 \cdot 10^4$ c/Vertiefung einer Gewebekulturplatte CD34 ⁺ -Zellen: $5 \cdot 10^3$ c/ Vertiefung einer Gewebekulturplatte
Anzahl der Versuche:	n = 2
Medium:	Je 1 mL LTC-Medium
Zytokine:	Standard Zytokinkombination (Kapitel 3.4.)
Kulturdauer:	8 Tage für SI/SI, 7 Tage für CD34 ⁺ -Zellen

In diesem Versuch wurden die Zellen jedes Spenders jeweils einzeln kultiviert und einmal ein Gemisch der Zellen, wobei die Anteile der einzelnen Spender gleich gehalten wurden. Die MNC aus den drei verschiedenen Einzelversuchen sind um den Faktor $51,8 \pm 27$ expandiert,

wohingegen sich die MNC der gemischten Zellen um Faktor $39 \pm 2,8$ vermehrt haben. Dieser Wert erscheint deutlich niedriger, liegt aber im Rahmen der Fehlergenauigkeit. Zwischen den einzelnen Spendern ist demnach eine Variabilität mit einer Standardabweichung von 52,9% beobachtet worden. Für MNC aus Knochenmark ist eine Variabilität der Expansion von 57,8% beschrieben (Sardonini und Wu, 1993). Die gravierenden spenderabhängigen Unterschiede in der Proliferation sind daher unabhängig von der Herkunft der hämatopoietischen Zellen. Die Expansion der früheren Subpopulationen der CFC und CAFC ist in Abbildung 4-15 vergleichend dargestellt.

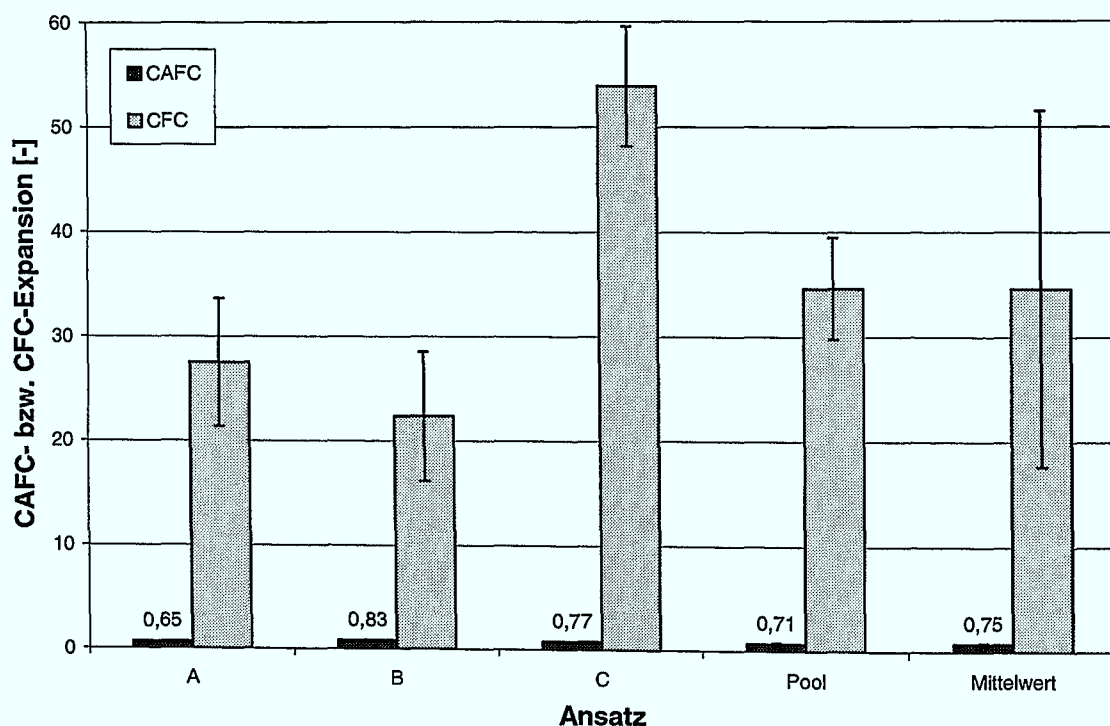


Abbildung 4-15: Vergleich der Expansion von CFC und CAFC von einzelnen Spenderzellen und dem Gemisch der drei Spender

In dieser Grafik ist neben den Expansionsfaktoren der Einzelversuche und dem Ansatz mit den gemischten Zellen auch der Mittelwert der einzelnen Experimente aufgetragen. Die Vermengung dreier Proben übt demnach keinen negativen Effekt auf die Expansion der verschiedenen Subpopulationen der CFC und CAFC aus.

Wenn Spenderzellen mit unterschiedlichen MHC-Typen zusammen kultiviert werden, könnten durch zytotoxische T-Lymphozyten des einen Spenders andere Zellen mit dem fremden MHC abgetötet werden (Janeway et al., 1999). In den durchgeführten Versuchen wurden aufgereinigte $CD34^+$ -Zellen verwendet, die zwar lymphohämatopoietische Stammzellen, aber keine reifen T-Zellen enthalten (Ogawa, 1993). Durch die

Kulturbedingungen und insbesondere die eingesetzten Zytokine werden spezifisch myeloide Vorläuferzellen unterstützt. Die Generierung von reifen T-Zellen würde andere Zytokine (v.a. IL-7, IL-12) und eine Kokultur mit Stroma, das aus dem Thymus isoliert worden ist, erfordern (Freedman et al., 1996). Immunologische Abstoßungsreaktionen sollten demnach unter den gegebenen Kulturbedingungen nicht vorliegen.

4.5. Etablierung der Zellernte von Collagen-Trägern

Das Produkt einer Fermentation hämatopoietischer Zellen sind die Zellen, weshalb ihrer Ernte eine besondere Bedeutung zukommt. Die Kokultur erfolgt im Festbettreaktor, wo die Zellen auf Collagen-Trägern immobilisiert sind. Zur Zellernte werden die Träger enzymatisch aufgelöst, wonach die Zellen in Suspension vorliegen. Dabei ist es wichtig, den Einfluss der Trägerlyse auf die Zellen zu untersuchen, um negative Effekte ausschließen zu können.

4.5.1. Lyse unbewachsener Träger

In ersten Versuchen wurde die Abbaukinetik von nicht besiedelten Collagen-Trägern bei unterschiedlichen Collagenase-Konzentrationen untersucht. Dabei wurden je 0,5 mL Träger und 1 mL Enzymlösung bei einer Temperatur von 37°C eingesetzt. Die Enzym-Konzentration variierte von 0,25 bis 2 mg/mL. Bei der niedrigsten Konzentration erfolgte die Trägerlyse in 15 min und bei der höchsten in 5 min. Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, dass die für die Zellen physiologische Temperatur von 37°C für die Trägerlyse gut geeignet ist.

Nach der Lyse der Träger sind noch kleine Partikel ($< 2 \mu\text{m}$) in Suspension, die nicht weiter von der Collagenase abgebaut werden. Es wurde geprüft, ob diese Partikel die Analytik der Zellen beeinträchtigen. Für diese Untersuchung wurden frisch aufgetaute Zellen von drei verschiedenen Spendern in MC- und CAFC-Assays mit Zusatz drei verschiedener Partikel-Konzentrationen analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass selbst die maximale Partikelmenge, die dem Lysat eines sehr schwach besiedelten Trägers ($1 \cdot 10^4$ c/mL Träger) entspricht, keinen negativen Einfluss auf die Ergebnisse der Assays ausübt. Weiterhin wurde der Einfluss des Trägerlysates auf immundefiziente Mäuse untersucht. Dazu wurden 3 mL Träger vollständig lysiert und das Lysat auf 5 Mäuse verteilt. Die größte Gefahr, dass durch die Partikel eine Embolie ausgelöst wird, wäre kurz nach der Injektion zu erwarten. Die Mäuse zeigten aber keine Reaktion auf die injizierten Partikel.

4.5.2. Einfluss von Collagenase auf Stroma

Um den Einfluss der Collagenase auf Stroma zu untersuchen, wurden die stromalen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI verwendet. Die Versuchsbedingungen sind in Tabelle 4-16

zusammengefasst. Die Parameter wurden unter Berücksichtigung der Anforderungen an die Trägerlyse bei einer Probenahme aus dem Festbettreaktor gewählt. Die Auswirkungen der enzymatischen Behandlung auf das Stroma ist in Abbildung 4-16 als Einfluss auf die Vitalität der Zellen dargestellt.

Tabelle 4-16: Parameter zur Untersuchung des Collagenase-Einflusses auf Stroma

Zellen:	Stromale Zelllinie M2-10B4 mod. (bestrahlt mit 80 Gy) Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy)
Collagenase:	2 mg/mL in PBS
Inokulum:	$5 \cdot 10^5$ Zellen/mL pro Vertiefung einer Gewebekulturplatte mit 12 Vertiefungen
Anzahl der Versuche:	n = 6
Kultur-Medium:	1 mL RPMI 1640 10% FBS
Kulturdauer:	24 h h h hfjfdklsajfdklas
Collagenase-Wirkung:	30 min und 120 min bei 37°C
Kontrolle:	PBS, anschließend Zellen mit Trypsin abgelöst

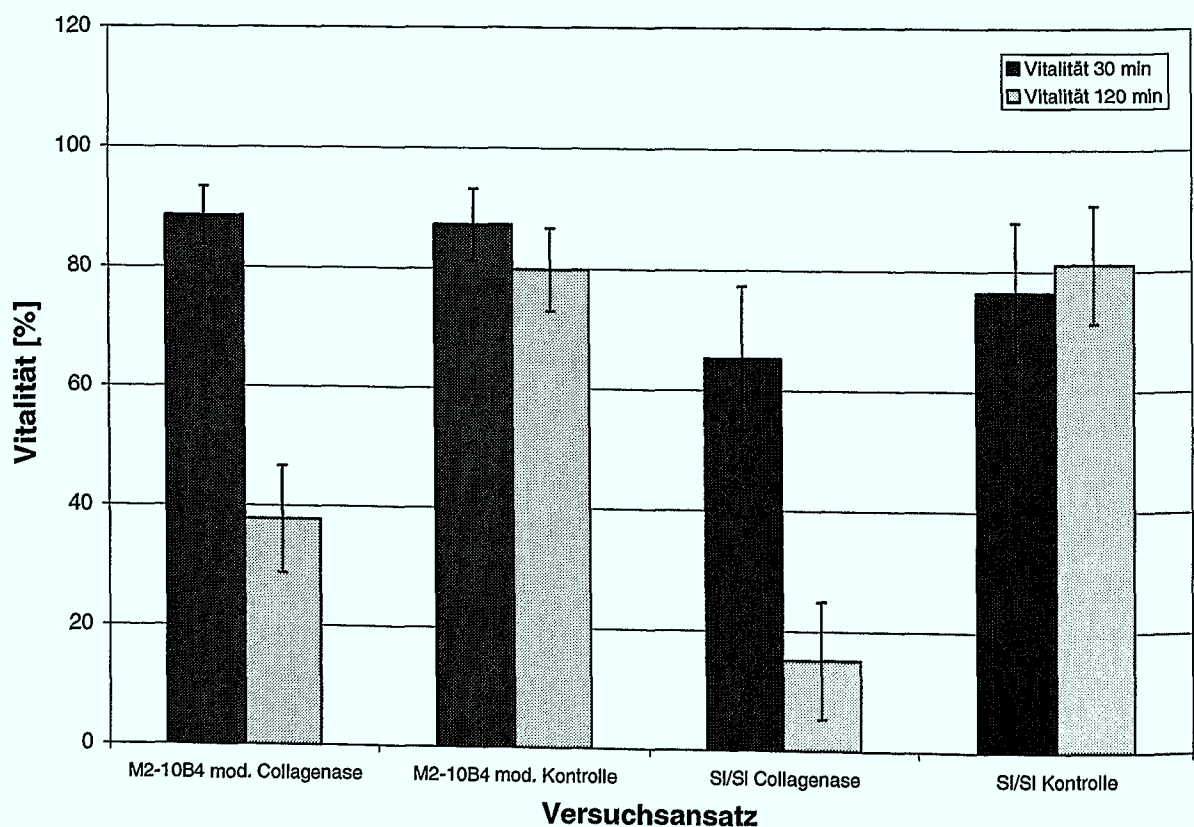


Abbildung 4-16: Einfluss von Collagenase auf die Vitalität der stromalen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI (je mit 80 Gy bestrahlt)

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zelllinie M2-10B4 mod. unter allen Bedingungen stabiler ist als die SI/SI. Nach 30 min ist kein negativer Einfluss der Collagenase im Vergleich

zur Kontrolle auf M2-10B4 mod. zu erkennen, wohingegen die Vitalität der SI/SI bereits um 11% in Bezug auf den Ansatz mit PBS gesunken ist. Für beide Zelllinien ist eine zeitabhängige Toxizität der Collagenase zu erkennen, da die Vitalität nach 2 h enzymatischer Behandlung nur noch 47,5% der Kontrolle für M2-10B4 mod. und 18,5% für SI/SI betrug.

4.5.3. Einfluss von Collagenase auf hämatopoietische Zellen

Wie bereits beschrieben, sind die Zellen das Produkt einer Kultivierung hämatopoietischer Zellen im Festbettreaktor. Daher muss gewährleistet sein, dass durch die Zellernte mittels Collagenase keine negativen Effekte auf das Primärmaterial ausgeübt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde einerseits der Einfluss des Enzyms auf charakteristische Oberflächenmarker und andererseits auf die biologische Aktivität der CD34⁺-Zellen untersucht. Die Versuchsparameter sind in Tabelle 4-17 aufgeführt.

Es ist bekannt, dass Collagenase einige Oberflächenmoleküle von Lymphozyten angreift (Abuzakouk et al., 1996). Daher muss für die Zellernte der immobilisierten hämatopoietischen Zellen mittels Collagenase ausgeschlossen werden, dass die Merkmale, die der Charakterisierung dieser Zellen dienen, abgebaut werden. Der Einfluss von Collagenase ist für acht verschiedene Oberflächenmoleküle untersucht worden, die der Charakterisierung primärer hämatopoietischer Zellen dienen (CD33, CD34, CD38, CD45, CD90, CD117, CDw123, HLA-DR, genauere Beschreibung Kapitel 2.1.3. und 2.2.5.).

Tabelle 4-17: Parameter zur Untersuchung des Collagenase-Einflusses auf hämatopoietische Zellen

Zellen:	Hämatopoietische Zelllinie KG-1 Primäre CD34 ⁺ -Zellen nach 7tägiger Kultivierung in X-Vivo 10
Collagenase:	2 mg/mL in PBS
Inokulum:	1·10 ⁶ Zellen/mL
Anzahl der Versuche:	n = 4
Collagenase-Wirkung:	30 min und 120 min bei 37°C
Kontrolle:	PBS

Der enzymatische Effekt ist für die meisten Oberflächenmarker mit der Zelllinie KG-1 nachgewiesen worden. Die Untersuchung der Marker, die nicht von KG-1 exprimiert werden (c-kit (CD117) und Thy-1 (CD90)), erfolgte mit Primärmaterial. Im Versuchsaufbau wurden die Zellen in 1 mL Collagenaselösung aufgenommen, 30 bzw. 120 min inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem die Zellen in PBS resuspendiert waren.

Für die Oberflächenmarker CD33, CD34, CD38, CD45, CD90 und HLA-DR konnte kein negativer Effekt durch die Behandlung mit Collagenase nachgewiesen werden. CDw123, die

α -Kette des IL-3 Rezeptors, konnte nach 30 min Inkubation mit Collagenase noch zu 100% im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Die Zelllinie KG-1 zeigte eine durchschnittliche Expression des Markers von 91,4%. Dieser Wert wurde nach Verlängerung der Inkubation (120 min) auf 93,6% der Kontrolle reduziert. Die Expression eines weiteren Zytokinrezeptors, c-kit (CD117), dessen Ligand SCF ist, wurde nach zweistündiger Inkubation mit Collagenase auf 83,9% des Kontrollwertes verringert (Abbildung 4-17). Die Untersuchung mit Primärmaterial wurde mit Zellen von zwei verschiedenen Spendern durchgeführt. CD117 wurde beim ersten Spender von 91% und beim zweiten von 61% der Zellen exprimiert.

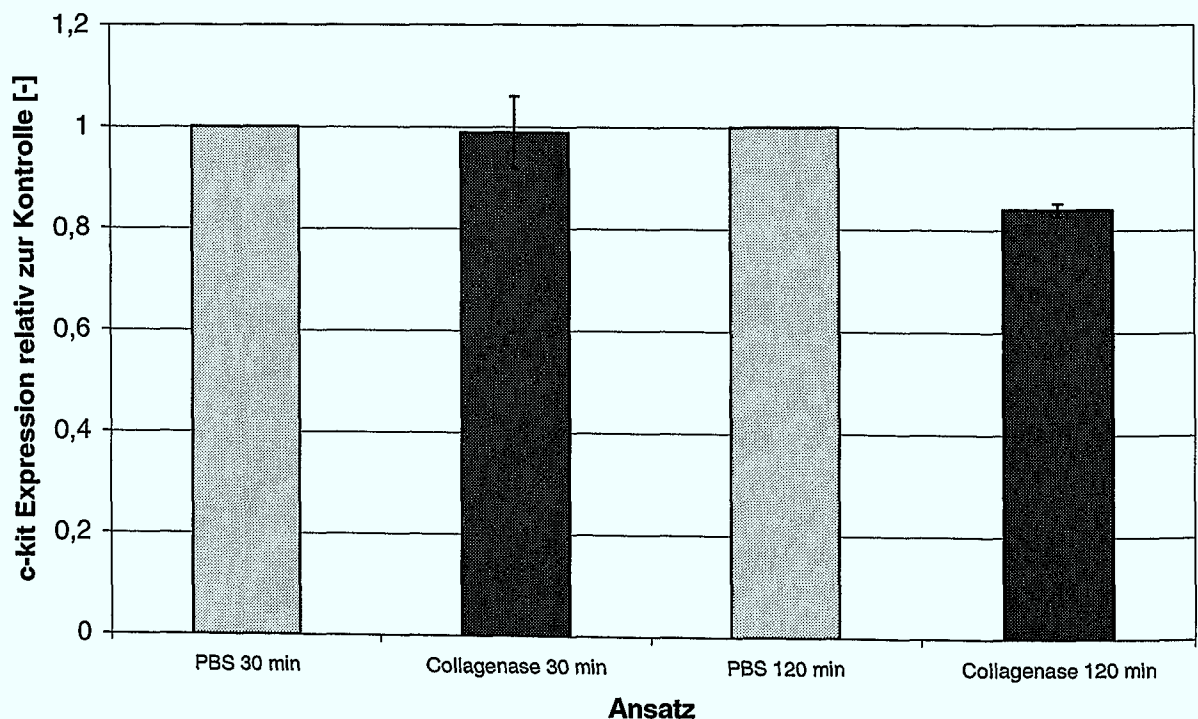


Abbildung 4-17: Einfluss der Collagenase auf die Expression des Zytokinrezeptors c-kit

In Abbildung 4-18 ist die durchflusszytometrische Analyse von zwei Versuchsansätzen gezeigt. Im linken Plot (A) sind die Zellen dargestellt, die 2 h mit PBS behandelt wurden, und im rechten (B) die Zellen, die 2 h mit Collagenase inkubiert worden sind. Der Anteil der Zellen, die c-kit exprimieren (Summe der oberen Quadranten) ist mit 91% im Ansatz mit PBS deutlich höher als in dem mit Collagenase (72,05%). Die Expression des CD34-Moleküls (Summe der rechten Quadranten) ist dagegen in beiden Ansätzen nahezu identisch (7,36% in A und 8,12% in B).

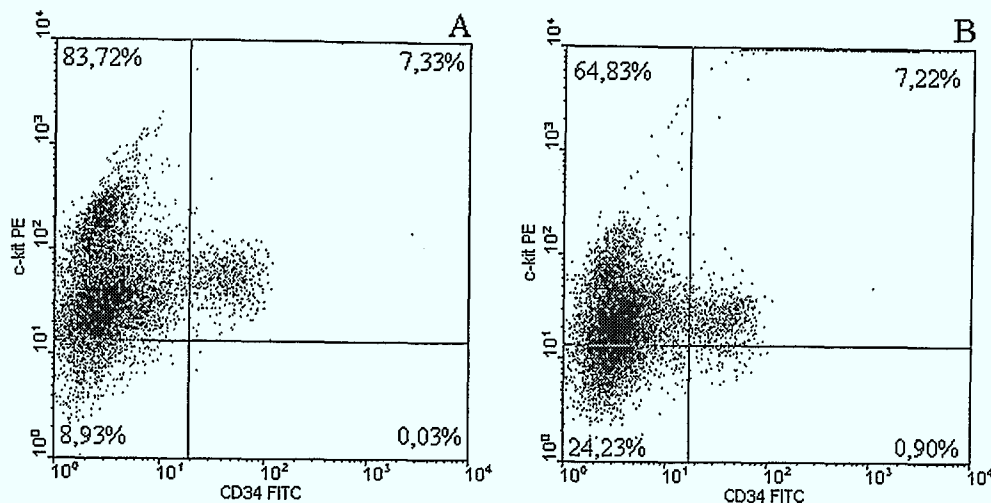


Abbildung 4-18: Einfluss von Collagenase auf die Expression der Oberflächenmarker c-kit und CD34 auf primären CD34⁺-Zellen nach einwöchiger Kultivierung (A: 2 h PBS, B: 2 h Collagenase)

Hämatopoietische Zellen werden nicht nur über Oberflächenmarker, sondern auch durch spezielle Assays (Kapitel 2.1.3.) charakterisiert. Die Untersuchung des Enzym-Einflusses auf diese Assays ist besonders wichtig, da nicht nur die Analytik, sondern auch bei einer klinischen Anwendung dieser Methode die Qualität des Transplantats beeinträchtigt wäre.

Die Untersuchungen der mit Collagenase behandelten Zellen im MC-Assay zeigen, dass der Anteil der CFC nach 30 min Enzymbehandlung auf 77% der Kontrolle reduziert wurde (Abbildung 4-19). Dieser Effekt wurde durch die Verlängerung der Inkubationszeit auf 2 h deutlich verstärkt (34% der Kontrolle). Der Anteil der CFC im Kontrollansatz betrug $17,3 \pm 0,9\%$. Bei einer Lagerung in PBS (37°C) über den Zeitraum von 2 h trat ebenfalls eine Reduktion der CFC auf 83% der Kontrolle auf. Der Effekt der Collagenase nach 2 h ist daher mit dem Einfluss des PBS überlagert. Bezogen auf den Kontrollwert ist der CFC-Anteil mit $40,7 \pm 30\%$ ebenfalls noch deutlich reduziert.

Der Effekt von Collagenase auf die früheren Vorläuferzellen (CAFC) ist nicht so stark wie auf die CFC (Abbildung 4-20). Nach 30minütiger Enzym-Inkubation ist kein negativer Effekt zu erkennen. Der Anteil der CAFC im Kontroll-Ansatz betrug $2,4 \pm 0,5\%$. Die verlängerte Inkubation auf 2 h zeigt, dass die CAFC in PBS auf 80% der Kontrolle reduziert wurden. In Bezug auf die 30 min Kontrolle ist der Effekt nach 2 h Collagenase-Behandlung mit einer Reduktion der CAFC auf 74% relativ stark. Wenn aber der Vergleich mit den 2 h in PBS gelagerten Zellen gezogen wird, ist unter Berücksichtigung der Standardabweichung kein negativer Einfluss der Collagenase mehr zu erkennen (92% der 2 h Kontrolle). Bei diesen Ergebnissen sind relativ große Fehler zu beobachten, die durch die verschiedenen Spender und die Variabilität im Assay begründet ist (Jelinek et al., 1999).

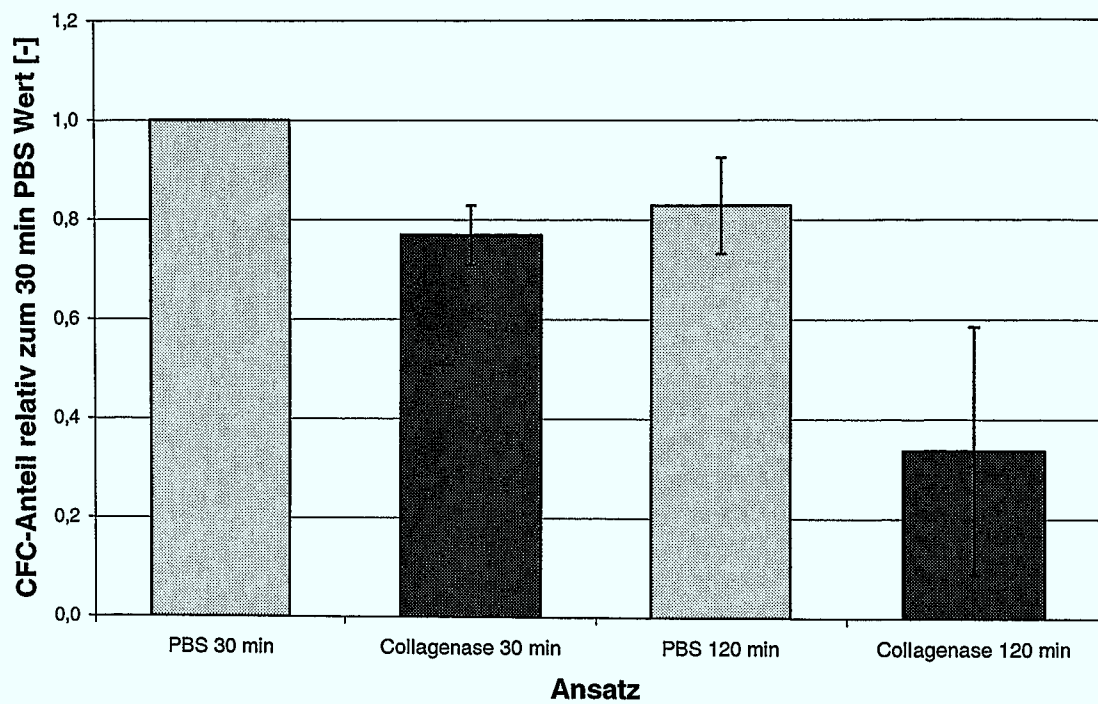


Abbildung 4-19: Einfluss von Collagenase auf CFC (n = 4)

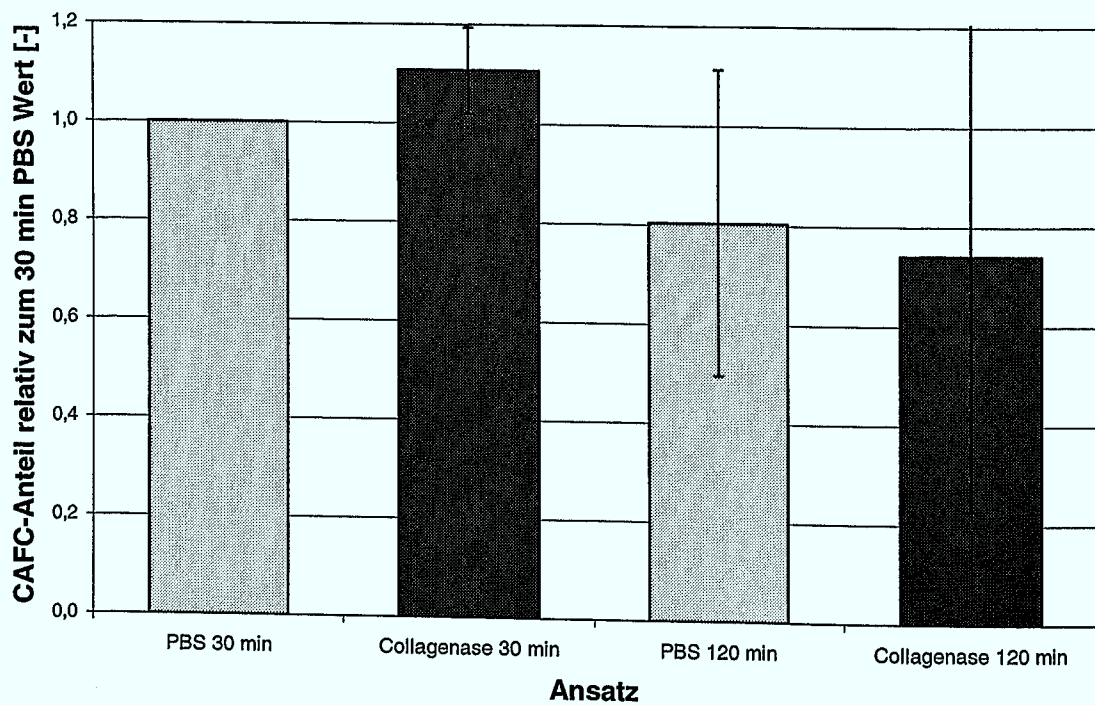


Abbildung 4-20: Einfluss von Collagenase auf CAFC (n = 4)

4.5.4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Collagen-Träger gut unter physiologischen Bedingungen mittels Collagenase lysieren lassen und das Lysat keinen negativen Effekt auf die hämatopoietischen Zellen ausübt.

Die stromalen Zelllinien, die einer Behandlung mit Collagenase unterzogen wurden, sind stark durch das Enzym geschädigt worden, wobei die Zelllinie SI/SI sensibler als M2-10B4 mod. ist. Bereits in Kapitel 4.2.3. ist die größere Sensitivität der SI/SI nach einer Bestrahlung mit 80 Gy beschrieben worden. Da das Stroma nicht das Produkt einer Kokultivierung hämatopoietischer und stromaler Zellen im Festbettreaktor ist, kann dieses Ergebnis nicht als Ausschlusskriterium für die Zellernte über eine Trägerlyse mit Collagenase betrachtet werden. Die starke Reaktion muss aber bei einer Bilanzierung der Zelldichten auf Collagen-Trägern nach der Trägerlyse berücksichtigt werden.

Die Untersuchungen des Collagenase-Einflusses auf hämatopoietische Zellen zeigten, dass die Expression der meisten der untersuchten Oberflächenmarker nicht beeinträchtigt werden. Für CD34 ist durch eine starke O-Glykosylierung eine relativ starke Resistenz gegenüber Proteasen beschrieben (Krause et al., 1996). Eine geringe Reduktion der Expression durch Collagenase ist für die α -Kette des IL-3 Rezeptors (CDw123) nachgewiesen worden, wohingegen ein stark negativer Effekt auf den SCF-Rezeptor (CD117) beobachtet wurde. Die Minderung der Rezeptor-Expression ist ein zeitabhängiger Effekt, der nach 30 minütiger Inkubation der Zellen noch nicht detektierbar war.

Weiterhin ist im Verlauf dieser Arbeit der Einfluss der Collagenase auf die frühen Vorläuferzellen analysiert worden. Dabei stellte sich heraus, dass die CFC wesentlich empfindlicher auf die enzymatische Behandlung reagierten als die CAFC. Eine mögliche Erklärung ist, dass die reiferen CFC stoffwechselaktiver sind als die CAFC und daher eine eventuelle Schädigung stärkere Wirkung zeigten. Der MC-Assay dauert 2 Wochen, was im Vergleich zu dem Langzeitassay der CAFC von 6 Wochen ein relativ kurzer Zeitraum ist. Zellen, die durch die Collagenase geschädigt sind, haben demnach weniger Zeit sich von der Prozedur zu erholen. Weiterhin ist nachgewiesen worden, dass die Expression zweier Zytokinrezeptoren durch lange Einwirkzeiten des Enzyms eingeschränkt wird. Dadurch ist eine verringerte Signalwirkung durch die Bindung der Liganden denkbar. Besonders für die CFC könnte dieser Mechanismus eine Ursache des negativen Effektes sein, da das MC-Medium mit den Liganden der beeinflussten Rezeptoren, IL-3 und SCF, supplementiert ist. Das Medium für den CAFC-Assay enthält keine zugesetzten Zytokine, sondern nur sehr geringe Konzentrationen an SCF und IL-3, die durch die stromalen Zellen produziert werden.

Dadurch wird der dosisabhängige, stimulatorische Effekt dieser Substanzen deutlich niedriger sein als im MC-Medium. Da negative Effekte auf zwei Typen von Zytokinrezeptoren beobachtet worden sind, ist es nicht auszuschließen, dass weitere Zytokinrezeptoren oder andere Oberflächenmarker, die in dieser Arbeit nicht untersucht worden sind, ebenfalls beeinträchtigt werden. Weiterhin ist das Auslösen des programmierten Zelltodes (Apoptose) durch den enzymatischen Angriff denkbar.

Die Versuche, die in diesem Kapitel beschrieben sind, wurden unter extremen Bedingungen in Bezug auf die Einwirkzeit und das Verhältnis der Zellen zu dem Enzym durchgeführt. Es zeigte sich im Verlauf vieler Fermentationen, dass die Dauer der Trägerlyse sehr stark von der stromalen Zellkonzentration und der Kulturdauer abhängig ist. Zu Beginn einer Kultivierung bei einem Inokulum von $1 \cdot 10^5$ Zellen/mL Träger ist die Lyse nach ca. 20 min erfolgt, wobei nach einer 14tägigen Kulturdauer durch den Aufbau der Extrazellulärmatrix und die Erhöhung der Zelldichte die Lyse bis zu einer Stunde dauern kann. Der Extremwert einer zweistündigen Behandlung ist demnach für die Anwendung nicht erforderlich, wodurch auch die damit verbundene Schädigung der Zellen nicht zu erwarten ist.

Collagenase ist ein Enzym, das für die Dissoziation von Geweben eingesetzt wird und im Vergleich zu Trypsin weniger zellschädigend ist (Lindl und Bauer, 1994). In einer anderen Untersuchung (Coulombel et al., 1983) wurde kein negativer Einfluss von Collagenase auf hämatopoietische Zellen nachgewiesen. Im Vergleich zu den hier beschriebenen Versuchen wurde das gleiche Verhältnis von Enzym zu den Zellen bei einer längeren Inkubation (3 h) eingesetzt. Das Zellmaterial bestand aus MNC aus frischem humanem Knochenmarkaspirat. Im Unterschied zu den Arbeiten von Coulombel wurden hier nur $CD34^+$ -Zellen bzw. die $CD34^+$ -Zelllinie KG-1 eingesetzt. In MNC aus Knochenmark ist auch primäres Stroma enthalten, was eine schützende Wirkung auf die hämatopoietischen Zellen ausüben kann.

Weiterhin ist in dieser Arbeit der Einfluss von Collagenase auf verschiedene Einzelkomponenten (unbewachsene Träger, stromale Zelllinien, KG-1 bzw. primäre $CD34^+$ -Zellen) untersucht worden. Bei Betrachtung der Zellernte von dicht besiedelten Collagen-Trägern mittels Collagenase bieten sich dem Enzym nicht nur die hämatopoietischen Zellen, sondern auch die stromalen Zellen, die durch sie aufgebaute Extrazellulärmatrix und vor allem das Trägermaterial Collagen als Substrat an. Das bedeutet, dass das Verhältnis von Enzym zu hämatopoietischen Zellen in der Anwendung einer Trägerlyse nach Kultivierung im Festbettreaktor um einige Größenordnungen geringer ist, als in den beschriebenen Versuchen. Zusammen mit der relativ kurzen erforderlichen Inkubationszeit sind keine negativen Effekte der Zellernte hämatopoietischer Zellen über die enzymatische Lyse der Träger zu erwarten.

5. Einsatz von primärem Stroma

Der Einsatz von primärem Stroma zur Kokultur mit humanen hämatopoietischen Zellen ist in vielen Arbeitsgruppen etabliert (Kapitel 2.4.1.). Im Rahmen dieser Arbeit ist untersucht worden, ob die neu entwickelten Reaktorsysteme für die Kultivierung von primärem Stroma geeignet sind und welchen Einfluss diese Zellen auf die Kokultur mit hämatopoietischen Zellen aus Nabelschnurblut haben.

5.1. Kultivierung von primärem Stroma

In ersten Versuchen wurde primäres Stroma in Gewebekulturplatten und im Festbettreaktor unter Einsatz verschiedener Stimuli kultiviert. Da stromale Zellen im Vergleich zu hämatopoietischen höhere Substrat-Verbrauchsraten aufweisen, muss das Verhalten des Stromas untersucht und bewertet werden, um die Rahmenbedingungen für die Kokultur ermitteln zu können.

5.1.1. Kultivierung in Gewebekulturplatten

Primäres Stroma, das, wie unter Kapitel 3.1.2. beschrieben, isoliert und kultiviert worden ist, zeigt ein schnelleres Wachstum, wenn dem Medium das Zytokin bFGF zugesetzt worden ist (Dooley et al., 1995). Durch dieses Zytokin wird die Wachstumsrate erhöht, die Lebensdauer der Zellen, definiert als Anzahl der Teilungen, kann dagegen nicht verlängert werden (Goldstein, 1990).

Im Rahmen dieser Arbeit ist untersucht worden, welchen Einfluss die Zelldichte und das Zytokin bFGF auf die Kultivierung von primärem Stroma ausübt. Die Kulturparameter sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst. Abbildung 5-1 zeigt, wie sich die durchschnittliche Wachstumsrate der Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Zelldichte und des Zytokins verändert.

Tabelle 5-1: Kulturparameter zur Untersuchung des Einflusses von Zelldichte und bFGF auf die Kultivierung von primärem Stroma

Zellen:	Primäres Stroma
Inokulum:	$1,43 \cdot 10^2$; $2,86 \cdot 10^2$; $1,43 \cdot 10^3$; $2,86 \cdot 10^3$; $7,14 \cdot 10^3$; $1,43 \cdot 10^4$ Zellen/cm ² , Gewebekulturplatte mit 12 Vertiefungen
Kultur-Medien:	P-LTC, mit und ohne 10 ng bFGF/mL
Anzahl der Versuche:	n = 2
Kulturdauer:	7 Tage

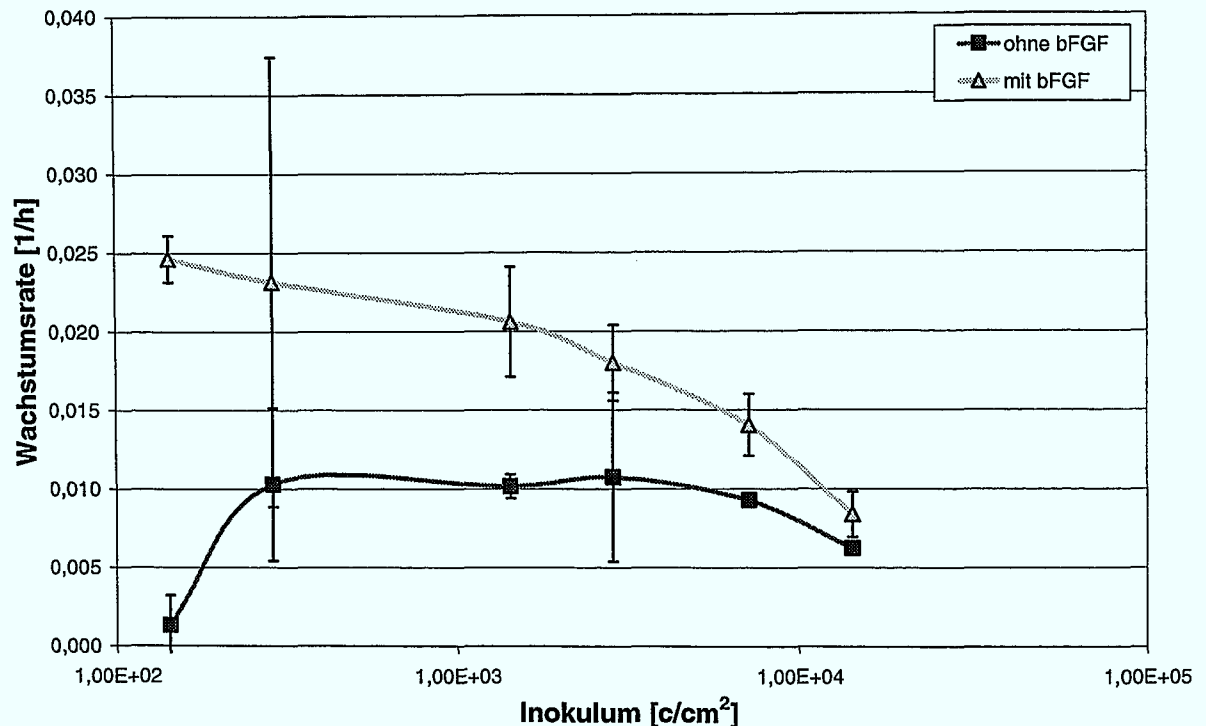


Abbildung 5-1: Untersuchung des Einflusses von Zelldichte und bFGF auf die Kultivierung von primärem Stroma

In Abbildung 5-1 ist deutlich zu erkennen, dass mit bFGF höhere Wachstumsraten als ohne das Zytokin erzielt werden können. Die maximale Wachstumsrate mit bFGF wurde bei einem Inokulum von $1,43 \cdot 10^2 \text{ c/cm}^2$ erreicht. Bei dieser Zelldichte konnte nach 7 Tagen mit $8,9 \cdot 10^3 \text{ c/cm}^2$ allerdings noch keine konfluente Zellschicht beobachtet werden. Bei den drei höchsten inokulierten Zelldichten waren die Zellen am Tag 7 konfluent ($7 \cdot 10^4 \text{ c/cm}^2$). Die Wachstumsraten in den Versuchen ohne bFGF sind mit Ausnahme der geringsten inokulierten Zelldichte unabhängig vom Inokulum. In keinem der Ansätze konnte eine konfluente Zellschicht nach Ende der Kulturdauer nachgewiesen werden. Die maximale Zelldichte betrug bei der höchsten inokulierten Zellzahl $4 \cdot 10^4 \text{ c/cm}^2$ am Tag 7.

Die Stimulierung erfolgte in diesem Versuch mit 10 ng/mL bFGF. In einem weiteren Experiment konnte schon mit 2 ng/mL bFGF nach 7 Tagen eine konfluente Zellschicht erzielt werden. Niedrigere Zytokin-Konzentrationen stimulierten die Zellen ebenfalls zu gesteigertem Wachstum im Vergleich zu dem Ansatz ohne bFGF, aber die Zellen erreichten keine Konfluenz.

Für eine Kokultur mit unbestrahltem primärem Stroma ist zu gewährleisten, dass die stromalen Zellen nicht durch die Zytokine, die die hämatopoietischen Zellen stimulieren sollen, zum Wachstum angeregt werden. Deshalb ist der Einfluss der Standard-Zytokinkombination auf das primäre Stroma untersucht worden. Es konnte nachgewiesen

werden, dass durch die Standard-Zytokine kein Einfluss auf das Wachstum der stromalen Zellen ausgeübt wird.

Für den in Tabelle 5-1 beschriebenen Versuch sind für die Ansätze bei einer Zelldichte von $7,14 \cdot 10^3 \text{ c/cm}^2$ mit und ohne bFGF die Zytokin-Konzentrationen von IL-3, SCF, TPO und FL bestimmt worden. Außer SCF konnte kein Zytokin nachgewiesen werden. Die SCF-Konzentrationen und -Produktionsraten sind in Tabelle 5-2 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass durch bFGF die SCF-Produktion verstärkt wird, was durch die höhere Zytokin-Konzentration und besonders durch die um Faktor 1,4 höhere zellspezifische Produktionsrate belegt wird.

Tabelle 5-2: SCF-Produktion von primärem Stroma in Abhängigkeit von bFGF

Versuchsansatz	SCF-Konzentration [ng/mL]	Zellspezifische SCF-Produktionsrate [ng/($10^6 \text{ c} \cdot \text{d}$)]
mit bFGF	$0,404 \pm 0,004$	$0,569 \pm 0,01$
ohne bFGF	$0,167 \pm 0,011$	$0,395 \pm 0,03$

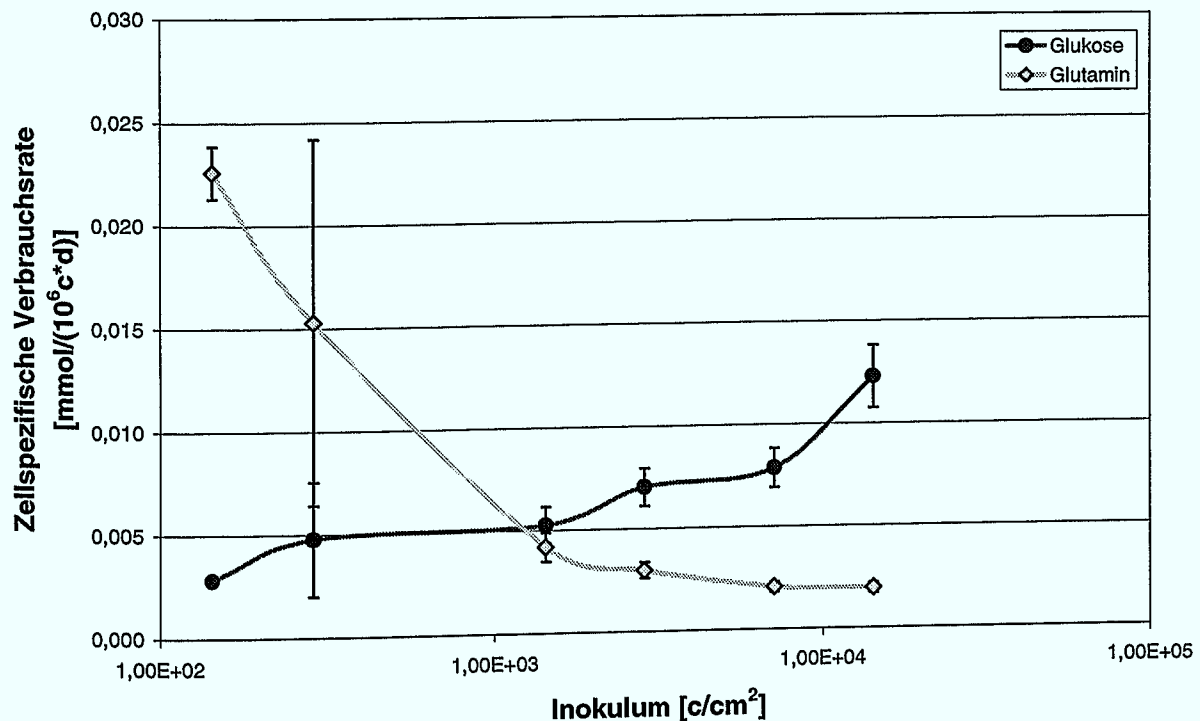


Abbildung 5-2: Zellspezifische Verbrauchsrate von mit bFGF stimuliertem primärem Stroma in Abhängigkeit von der Zelldichte

Weiterhin ist der Medienverbrauch der mit bFGF stimulierten Zellen aus dem in Tabelle 5-1 dargestellten Versuch analysiert worden. Dabei ist zu beobachten, dass mit zunehmender Zelldichte der zellspezifische Glutaminverbrauch sinkt, während der Glukoseverbrauch steigt

(Abbildung 5-2). Diese Werte stellen den durchschnittlichen Verbrauch über den gesamten Kultivierungszeitraum dar. Dabei ist in den verschiedenen Ansätzen, wenn überhaupt, zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Konfluenz erreicht worden, was auch durch das Absinken der Wachstumsraten belegt werden kann (Abbildung 5-1). Demnach erfolgt eine Umstellung des Stoffwechsels von Glutamin im exponentiellen Wachstum auf Glukose in der stationären Phase.

5.1.2. Kultivierung im Festbettreaktor

Die Eignung des Festbettreaktors zur Kultivierung von primärem Stroma auf Collagen-Trägern ist in zwei Reaktorläufen getestet worden. Dabei wurden im ersten Versuch die Zellen mit bFGF stimuliert, im zweiten nicht. Da bei der ersten Kultivierung sehr hohe Medienzulaufzeiten eingestellt werden mussten (Abbildung 5-4), sind im zweiten Versuch um Faktor 5 weniger Zellen inokuliert worden. Die wesentlichen Kulturparameter sind in Tabelle 5-3 zusammengefasst.

Tabelle 5-3: Kulturparameter der Kultivierung von primärem Stroma im Festbettreaktor mit und ohne bFGF

	Reaktor mit bFGF	Reaktor ohne bFGF
Zellen:	Primäres Stroma	Primäres Stroma
Inokulum:	$9,94 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
Träger:	4,805 g	3,540 g
Medium:	P-LTC mit 10 ng/mL bFGF	P-LTC
Kulturdauer:	21 Tage	15 Tage
Medienzulauf:	Ab Tag 1	Ab Tag 2

Der Verlauf der Kultivierungen ist in Abbildung 5-3 gezeigt. Nach dem Inokulieren der Zellen wurde bei den Reaktoren der Medienumlauf angestellt, um die gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten und die Ausbildung von Sauerstoff- oder Nährstoffgradienten zu vermeiden. Über einen Zeitraum von 1 bzw. 2 Tagen wurden die Festbettreaktoren in der Batch-Fahrweise betrieben, damit keine noch in Suspension befindlichen Zellen aus dem System ausgewaschen werden. In beiden Versuchen konnten ca. 65% der inokulierten Zellen immobilisiert werden. Ein wesentlicher Unterschied in den beiden Reaktorläufen lag darin, dass ohne bFGF eine relativ lange lag-Phase von 5 Tagen zu beobachten war, nach der die Zellen exponentiell zu wachsen begannen. Durch das bFGF wurden die Zellen von Beginn der Kultivierung an zum Wachstum angeregt. Die maximalen Wachstumsraten waren unter beiden Bedingungen mit 0,006 1/h gleich hoch, wurden aber mit

bFGF schon zwischen den Tagen 4 bis 7 erzielt und ohne das Zytokin erst am Tag 15. Im Medium konnten zu keinem Zeitpunkt Zellen nachgewiesen werden.

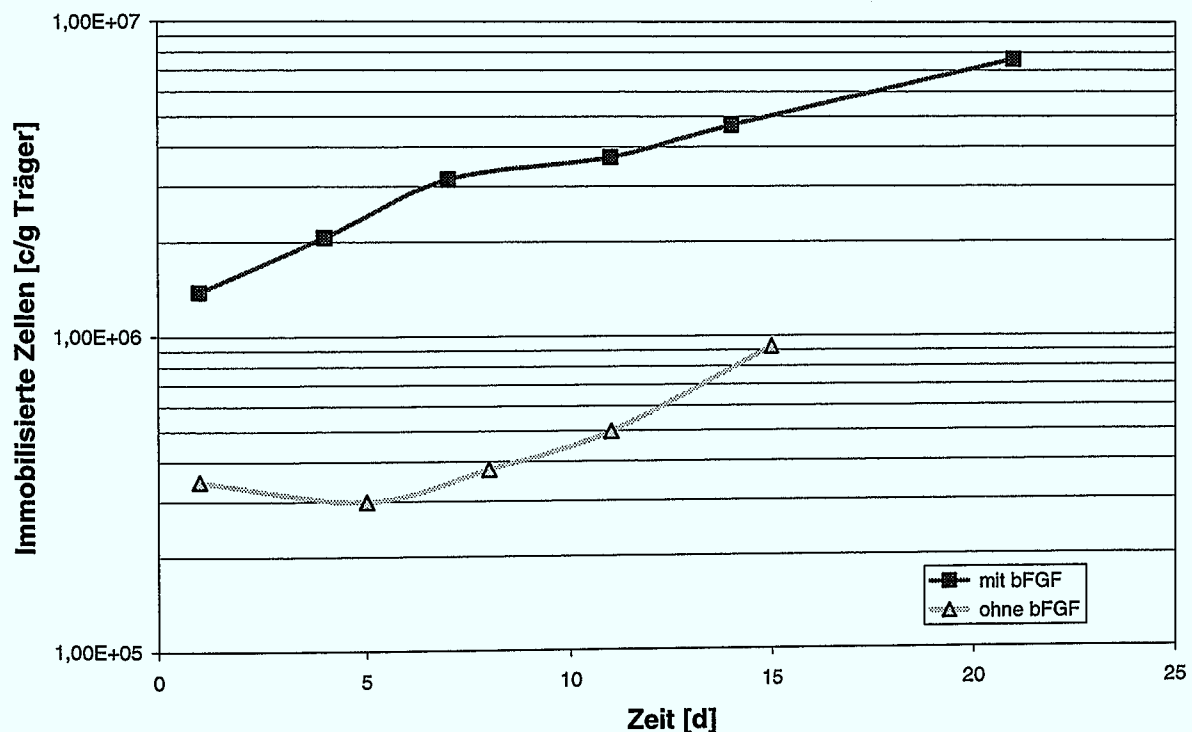


Abbildung 5-3: Verlauf der Zahl immobilisierter Zellen während der Kultivierung von primärem Stroma im Festbettreaktor mit und ohne bFGF

Der Festbettreaktor, in dem das Stroma mit bFGF kultiviert wurde, ist ab der Probenahme am ersten Tag perfundiert worden. In Abbildung 5-4 sind die zellspezifischen Glukose-Verbrauchsrate und der Volumenstrom im Verlauf der Kultivierung dargestellt. Nach einem Tag der Kultur ohne Medienzufuhr lag die Glukose-Konzentration bei 8,4 mmol/L. Der Reaktor ist anschließend über 3 Tage mit einer spezifischen Durchflussrate von 0,58 d⁻¹ perfundiert worden. Trotz dieser Fütterung lag die Glukose-Konzentration am Tag 4 bei nur 1,95 mmol/L, weshalb der Volumenstrom erhöht worden ist. Am Tag 7 wurden 4,3 mmol/L Glukose gemessen, was 37% des Ausgangsmediums entspricht. Aus diesem Grund ist der Volumenstrom noch einmal erhöht worden, wodurch die Verweilzeit im Reaktor nur 0,48 d betrug. Da bei dieser Perfusionsrate ca. 60% der Glukose vom P-LTC-Medium vorlag, wurde sie wieder reduziert, um den Verbrauch an zytokinhaltigem Medium einzuschränken. Ein Vergleich zwischen der zellspezifischen Glukose-Verbrauchsrate und dem Volumenstrom im Verlauf der Kultivierung zeigt, dass durch die erhöhte Perfusion auch der Glukose-Verbrauch der Zellen steigt. Die Glutamin-Konzentration lag zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung über 60% des Ausgangswertes. Die maximale Laktat-Konzentration wurde mit 20 mmol/L am Tag

7 ermittelt. Alle Aminosäuren lagen über 50% des Ausgangsmediums, weshalb Limitierungen ausgeschlossen werden können.

Aufgrund der sehr hohen Durchflussraten in diesem ersten Versuch wurde wie beschrieben die Zellzahl für die Kultivierung von primärem Stroma ohne bFGF um den Faktor 5 reduziert. Nach einer zweitägigen Kultivierung ohne Medienzufuhr wurden noch 9 mmol/L Glukose nachgewiesen. Die anschließende Perfusion mit einer spezifischen Durchflussrate von $0,95 \text{ d}^{-1}$ gewährleistete über die gesamte Kulturdauer eine Glukose-Konzentration von mindestens 80% des Ausgangsmediums. Die zellspezifischen Glukose-Verbrauchsrate lagen in ähnlichen Bereichen wie bei der Kultivierung von primärem Stroma mit bFGF.

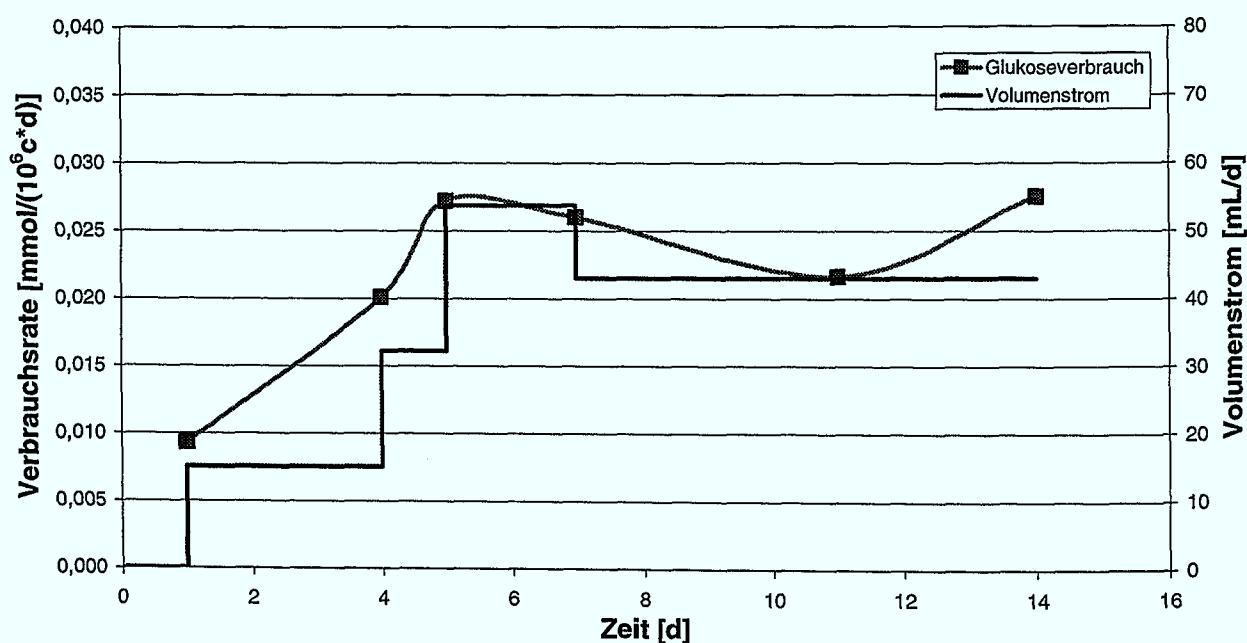


Abbildung 5-4: Verlauf der zellspezifischen Glukose-Verbrauchsrate und des Volumenstroms während der Kultivierung von primärem Stroma mit bFGF im Festbettreaktor

Für den Reaktorlauf, der mit bFGF supplementiert worden ist, wurden die Zytokinkonzentrationen von IL-3, SCF, TPO und FL am Tag 1 und Tag 14 gemessen. Außer SCF konnte kein Zytokin nachgewiesen werden. Die Daten für die SCF-Produktion sind in Tabelle 5-4 zusammengefasst. Die zellspezifische Zytokinproduktion blieb unabhängig von der Perfusion des Reaktors konstant.

Tabelle 5-4: SCF-Produktion von primärem Stroma im Festbettreaktor (mit bFGF)

Versuchsansatz	SCF-Konzentration [ng/mL]	Zellspezifische SCF-Produktionsrate [ng/(10 ⁶ c·d)]
Tag 1	0,106	0,298 ± 0,01
Tag 14	0,112	0,314 ± 0,01

5.2. Kokultur von hämatopoietischen Zellen mit primärem Stroma

In diesem Kapitel wird die Kokultur von hämatopoietischen und primären Stromazellen zuerst in dem einfachen Kultursystem der Gewebekulturplatte behandelt, wobei der Einfluss von stromalen Zellen, Zytokinen und Medien untersucht worden ist. Anschließend ist eine Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor beschrieben, wodurch der mögliche Einsatz von primärem Stroma in diesem neuen Kultursystem bewiesen werden sollte.

5.2.1. Kokultur in Gewebekulturplatten

Das primäre Stroma wurde zunächst auf seine Fähigkeit untersucht, hämatopoietische Zellen in ihrer Expansion zu unterstützen. Dabei wurde ein Ansatz nur mit stromalen und hämatopoietischen Zellen ohne supplementierte Zytokine mit einem, der die Standard-Zytokinkombination enthielt, verglichen. Die Kulturparameter sind in Tabelle 5-5 aufgeführt.

Tabelle 5-5: Kulturparameter zur Untersuchung der Kokultur mit primärem Stroma in Abhängigkeit von Zytokinen

Zellen:	Primäres Stroma Primäre CD34 ⁺ -Zellen, Zellen von 3 Spendern vereinigt
Inokulum:	Stroma: 1,85·10 ⁵ c/Vertiefung einer Gewebekulturplatte CD34 ⁺ -Zellen: 5·10 ³ c/ Vertiefung einer Gewebekulturplatte
Anzahl der Versuche:	n = 2
Kultur-Medien:	P-LTC, mit und ohne Standard-Zytokinkombination
Kulturdauer:	7 Tage

Abbildung 5-5 stellt die Expansion der MNC und der CD34⁺-Zellen in den verschiedenen Versuchsansätzen dar. Die Betrachtung der Expansionsdaten ohne Zytokine zeigt, dass mit primärem Stroma sowohl eine Expansion der MNC als auch der CD34⁺-Zellen erzielt werden konnte. Der zusätzliche Einsatz von Zytokinen führte zu einer um Faktor 8,5 erhöhten MNC-Expansion und einer 3,2fach höheren Expansion der CD34⁺-Zellen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Anteil der CD34⁺-Zellen im Ansatz ohne Zytokine mit 30% am Tag 7 wesentlich höher lag als im Ansatz mit der Standard-Zytokinkombination (11%). Demnach findet in dem Ansatz nur mit primärem Stroma eine geringere Ausdifferenzierung der Zellen

statt, wobei aber schlechtere Expansionsdaten für die frühen CD34⁺-Zellen erzielt werden als mit dem Zytokinsupplement.

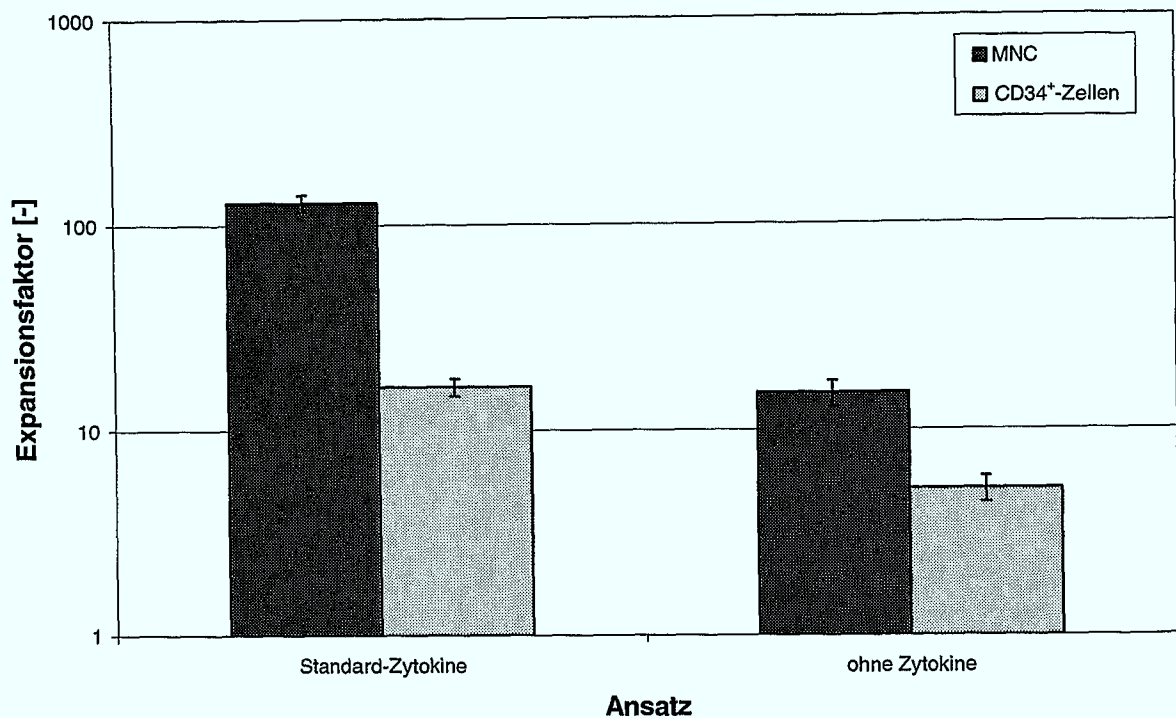


Abbildung 5-5: Expansion verschiedener Populationen in Kokultur mit primärem Stroma in Abhängigkeit von Zytokinen (Tag 7)

In weiteren Versuchen ist der Einsatz verschiedener Medien (LTC, P-LTC und X-Vivo 10) bei der Kokultivierung von hämatopoietischen Zellen und primärem Stroma verglichen worden. Die Kulturparameter entsprechen der Tabelle 5-5 mit den Unterschieden, dass $1 \cdot 10^4$ CD34⁺-Zellen pro Versuch eingesetzt worden sind und alle Ansätze die Standard-Zytokinkombination enthielten. Abbildung 5-6 stellt die Expansion der MNC und CFC in den verschiedenen Medien dar. Die höchsten Expansionsdaten für beide Zellpopulationen konnten mit dem serumfreien Medium X-Vivo 10 erzielt werden. Im Vergleich zum LTC-Medium ist die Expansion der MNC um Faktor 2,3 höher und die CFC werden um Faktor 2 stärker vermehrt. Die Expansion der MNC in X-Vivo 10 ist mit der im P-LTC-Medium vergleichbar, aber der Wert für die CFC ist doppelt so hoch. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Medien zeigt sich in der Konzentration der verschiedenen koloniebildenden Zellen (Tabelle 5-6). Die Ausdifferenzierung ist im P-LTC Medium am stärksten, da alle Populationen der koloniebildenden Zellen die niedrigsten Konzentrationen aufweisen. Der Anteil der CFU-G/M ist im LTC-Medium am höchsten. Besonders auffällig ist, dass im serumfreien Medium der Anteil der BFU-E um den Faktor 3,4 größer ist als in den serumhaltigen Ansätzen.

Bei diesem Versuch ist im Ansatz mit dem P-LTC Medium die Konzentration der Zytokine IL-3, SCF, FL und TPO gemessen worden. Die daraus berechneten zellspezifischen Zytokin-Verbrauchsraten sind in Tabelle 5-7 zusammengestellt.

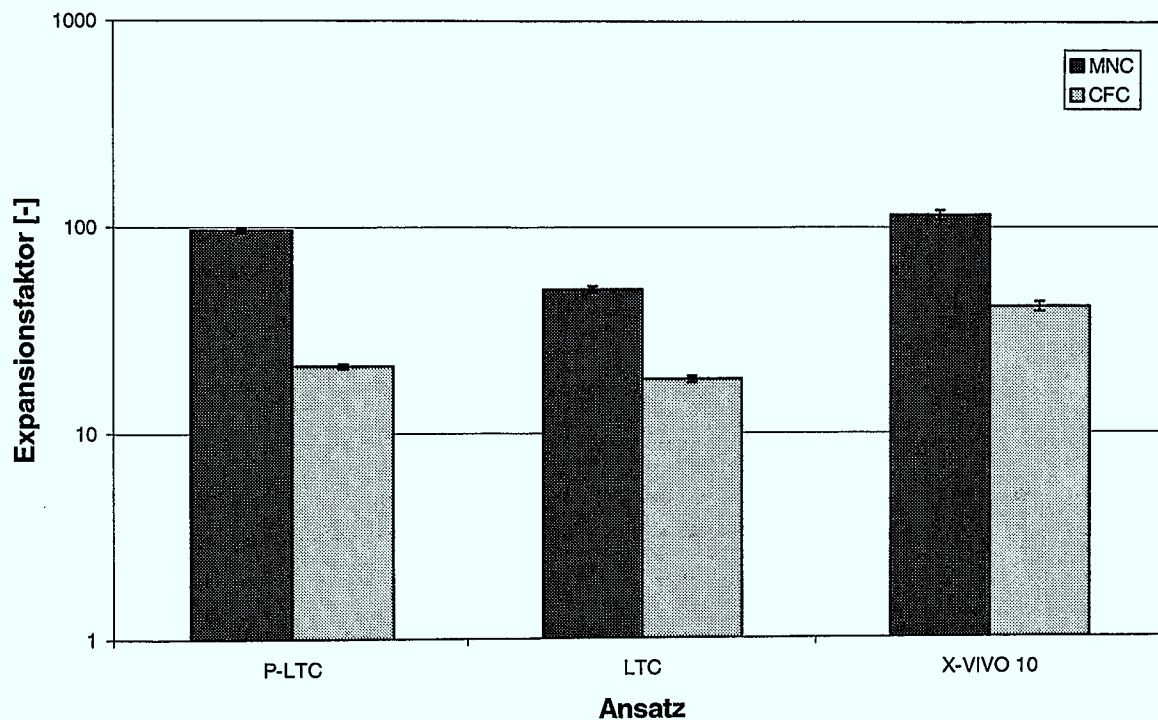


Abbildung 5-6: Vergleich verschiedener Medien zur Kokultivierung hämatopoietischer Zellen mit primärem Stroma (n = 2, Tag 7)

Tabelle 5-6: Vergleich der Konzentration koloniebildender Zellen in einer Kokultur hämatopoietischer Zellen mit primärem Stroma in Abhängigkeit vom Medium

Medium	CFC [%]	CFU-G/M [%]	BFU-E [%]
P-LTC	10,7	9,00	1,50
LTC	17,8	16,17	1,67
X-Vivo 10	17,5	11,83	5,50

Tabelle 5-7: Zellspezifische Zytokin-Verbrauchsraten einer Kokultur hämatopoietischer Zellen mit primärem Stroma (P-LTC-Medium)

	IL-3	SCF	FL	TPO
Zellspezifische Zytokinverbrauchsrate [ng/(10 ⁶ c·d)]	6,1 ± 0,3	31,9 ± 1,0	9,6 ± 0,3	8,7 ± 3,3

Der Einfluss von primärem Stroma ist mit dem der murinen stromalen Zelllinie SI/SI und einem stromafreien Ansatz verglichen worden. Die Kulturparameter sind in Tabelle 5-8 zusammengefasst. Abbildung 5-7 zeigt die Expansionsdaten der MNC, CFC und CAFC in den verschiedenen Ansätzen.

Tabelle 5-8: Parameter zur Untersuchung des Einflusses von Stromazellen auf die Kultivierung hämatopoietischer Zellen

Zellen:	Primäres Stroma Murine stromale Zelllinie SI/SI (mit 80 Gy bestrahlt) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, Zellen von 2 Spendern vereinigt
Inokulum:	Stroma: $5 \cdot 10^4$ c/Vertiefung einer Gewebekulturplatte CD34 ⁺ -Zellen: $5 \cdot 10^3$ c/ Vertiefung einer Gewebekulturplatte
Anzahl der Versuche:	n = 2
Kultur-Medien:	P-LTC, Standard-Zytokinkombination
Kulturdauer:	7 Tage

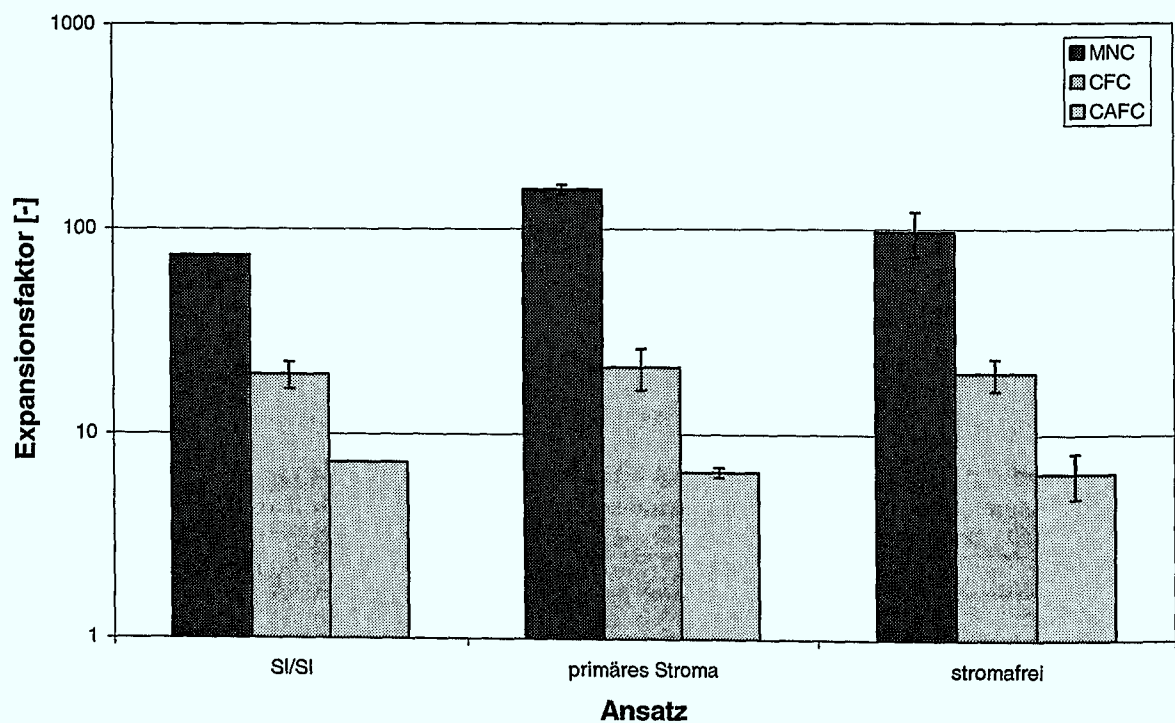


Abbildung 5-7: Einfluss von primärem Stroma und der stromalen Zelllinie SI/SI auf die Kultivierung hämatopoietischer Zellen im Vergleich zu einem stromafreien Ansatz

Ein Vergleich zwischen dem primären Stroma und der stromalen Zelllinie zeigt, dass mit primärem Stroma die MNC um Faktor 2 besser expandiert werden, aber die Populationen CFC und CAFC im gleichen Maß vermehrt werden wie mit SI/SI. Das ist dadurch zu erklären, dass die Konzentration der CFC und CAFC im Ansatz mit primärem Stroma deutlich niedriger ist, als im Ansatz mit SI/SI ($7 \pm 2\%$ CFC und $0,69\%$ CAFC für primäres Stroma und $14 \pm 2\%$

CFC und 1,63% CAFC für SI/SI). Bei der stromafreien Kultivierung der hämatopoietischen Zellen wurden die Zellpopulationen der CFC und CAFC im gleichen Maß wie mit SI/SI expandiert, aber auch in dem Ansatz war der Anteil der Vorläuferzellen niedriger ($11 \pm 2\%$ CFC und 1,1% CAFC).

5.2.2. Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor

In einer Kultivierung im Miniatur-Schlaufenreaktor ist einerseits der Einfluss verschiedener Zelldichten des Inokulums und andererseits der Einfluss verschiedener Verhältnisse von stromalen zu CD34⁺-Zellen untersucht worden. Dabei wurde P-LTC Medium mit der Standard-Zytokinkombination verwendet. Die Menge der Träger betrug pro Reaktor $0,301 \pm 0,053$ g. Die verschiedenen Zellzahlen und -verhältnisse sind in Tabelle 5-9 aufgelistet. Die Kulturdauer betrug 7 Tage.

Tabelle 5-9: Eingesetzte Zellzahlen zur Untersuchung der Zelldichte und des Zellzahlverhältnisses bei der Kokultur mit primärem Stroma im Miniatur-Schlaufenreaktor

Ansatz	Stroma	CD34 ⁺ -Zellen, Zellen von 3 Spendern vereinigt	Verhältnis CD34 ⁺ -Zellen : Stroma
A	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	1:5
B	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$	1:5
C	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	1:5
D	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$	1:5
E	$5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$	1:2
F	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	1:10

In Abbildung 5-8 ist die Expansion der MNC und CFC in Abhängigkeit von der Inokulumsdichte dargestellt (Ansatz A bis D), wobei das Verhältnis zwischen den stromalen und CD34⁺-Zellen konstant gehalten wurde. Ein Vergleich zwischen dem höchsten (A) und dem niedrigsten Inokulum (D) zeigt, dass sowohl die MNC als auch die CFC bei der höheren Zelldichte um Faktor 5 besser expandiert werden.

Die Untersuchung der verschiedenen Verhältnisse zwischen Stroma und hämatopoietischen Zellen fand bei gleicher Stroma-Konzentration ($5 \cdot 10^4$ c/Reaktor) statt, um den Gesamt-Substratverbrauch und die -Zytokinproduktion dieser Zellen in allen Ansätzen konstant zu halten (Ansatz C, E, F). Abbildung 5-9 stellt die Expansion der MNC und der CFC unter den genannten Bedingungen dar. Es ist unabhängig von dem Verhältnis der stromalen zu CD34⁺-Zellen eine vergleichbare Expansion der CFC zu beobachten, wohingegen die MNC-Expansion bei einem Verhältnis CD34⁺-Zelle : Stroma von 1:10 am höchsten ist.

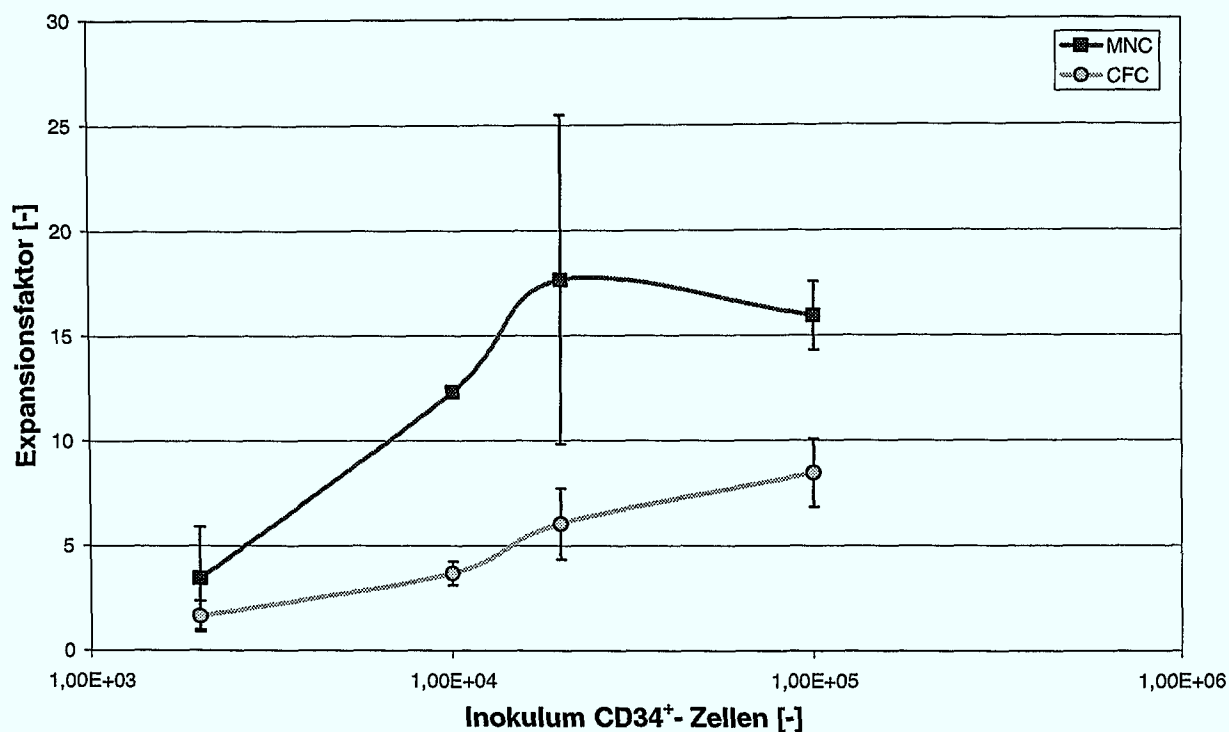


Abbildung 5-8: Einfluss des Inokulums auf die Expansion hämatopoietischer Zellen

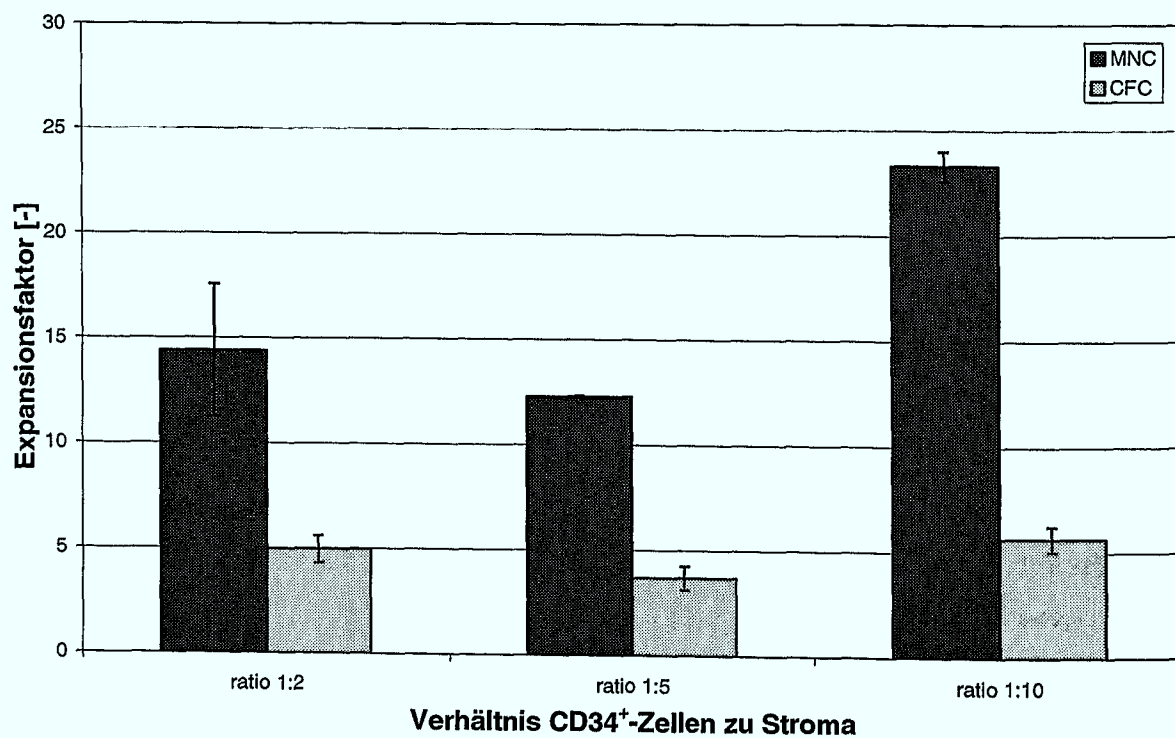


Abbildung 5-9: Einfluss des Verhältnisses von CD34⁺-Zellen zu primärem Stroma auf die Expansion hämatopoietischer Zellen

Die Medienanalytik zeigte, dass Substratlimitierungen in allen Ansätzen ausgeschlossen werden können. Die minimale Glukose-Konzentration betrug 6,3 mmol/L, und als niedrigste Glutamin-Konzentration wurden 1,18 mmol/L gemessen.

5.3. Diskussion

Bei der Kultivierung von primärem Stroma in Gewebekulturplatten ohne bFGF wurden Wachstumsraten von maximal 0,01 1/h erzielt. Dieser Wert ist gut mit Daten aus der Literatur für primäres Stroma (0,0099 1/h; Dooley et al., 1995) und für Fibroblasten aus fötalem Gewebe (0,0123 1/h; Hayflick und Moorhead, 1961) vergleichbar. Dooley und Mitarbeiter (1995) haben ebenfalls primäres Stroma mit bFGF (2 ng/mL) stimuliert und dadurch eine Erhöhung der Wachstumsrate auf 0,018 1/h erzielt, was im Vergleich zu dem in dieser Arbeit erzielten Wert von 0,025 1/h etwas niedriger liegt. Eine mögliche Erklärung ist die geringere Zytokin-Konzentration.

In der Arbeit von Dooley ist darüber hinaus eine Stimulierung von primärem Stroma durch Epidermal Growth Factor (EGF) beschrieben, wodurch ein noch schnelleres Wachstum der Zellen erzielt werden konnte. EGF ist in dieser Arbeit nicht verwendet worden.

Hayflick und Moorhead haben bereits 1961 nachgewiesen, dass frisch aus primärem Gewebe isolierte Zellen nur eine begrenzte Lebensdauer haben. So konnten die Zellen nur über eine Kulturdauer von 50 ± 10 Passagen bei einer Verdünnung von je 1:2 gehalten werden, was einem Zeitraum von $6,6 \pm 1,3$ Monaten entsprach. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main isoliert und in Kultur genommen. Genaue Daten für diesen Zeitraum der Kultivierung sind nicht bekannt. Nach dem Auftauen konnten die Zellen im Rahmen dieser Arbeit noch über 10 Generationen gehalten werden, bis sie das Wachstum eingestellt haben.

Die maximale Zelldichte, die mit primärem Stroma erreicht wurde, ist mit $7 \cdot 10^4$ c/cm² deutlich geringer als die für die murinen Stromazelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI ($2 \cdot 10^5$ c/cm²). Es ist denkbar, dass das primäre Material sensitiver auf die Kontaktinhibierung reagiert als die Zelllinien.

Bei Messungen der Zytokin-Konzentrationen konnte in den Versuchen dieser Arbeit nur SCF gefunden werden (Kapitel 5.1.1. und 5.1.2.). Durch das Zytokin bFGF wurde eine Steigerung der zellspezifischen SCF-Produktion erreicht. Die konstitutive Produktion von SCF durch stromale Zellen aus Knochenmark ist in der Literatur beschrieben (Heinrich et al., 1992; Linenberger et al., 1995). Der Einfluss von bFGF auf die Zytokinexpression ist ebenfalls untersucht worden (Dooley et al., 1995), wobei im Gegensatz zu dieser Arbeit kein

Unterschied in der SCF-Konzentration beobachtet werden konnte. Für die Zytokine IL-1, IL-6, GM-CSF und G-CSF ist ebenfalls keine Veränderung der Produktion durch bFGF beobachtet worden. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass stromale Zellen aus Knochenmark TPO (Guerriero et al., 1997) und FL (Lisovsky et al., 1996) produzieren. Vermutlich sind in den Versuchen dieser Arbeit die beiden Zytokine in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze gebildet worden. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass von Lisovsky und Mitarbeitern die FL-Produktion nur über PCR und intrazelluläre Zytokinmessungen bewiesen worden ist. Weiterhin konnte Guerriero eine durchschnittliche TPO-Konzentration von nur 32 pg/mL nach 14 Tagen Kulturdauer nachweisen, wobei große Schwankungen je nach Experiment zu verzeichnen waren (16-106 pg/mL).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Festbettreaktor zur Kultivierung von primärem Stroma auf Collagen-Trägern ein geeignetes System ist. Ein Nachteil lag allerdings darin, dass mit zunehmender Kulturdauer die Träger sehr stark verklumpten und eine Trägerlyse mittels Collagenase dadurch über 2 h dauerte. Ein schädigender Einfluss auf die hämatopoietischen Zellen ist durch diese Prozedur nicht mehr auszuschließen (Kapitel 4.5.). Der stimulierende Einfluss von bFGF ist auch in diesem System nachgewiesen worden. Im Vergleich zur Gewebekulturplatte wurden aber niedrigere Wachstumsraten erzielt. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass die stromalen Zellen im Reaktor schon länger in Kultur waren als die Zellen in den Versuchen der Gewebekulturplatte. In dem Zeitraum, in dem der Reaktorlauf mit bFGF durchgeführt wurde, ist das parallel in den Gewebekulturflaschen kultivierte Stroma ebenfalls deutlich langsamer gewachsen als noch einige Passagen zuvor.

Der zellspezifische Glukoseverbrauch während der Kultivierung im Festbettreaktor mit bFGF stieg durch die erhöhte Perfusion an. Dieser Effekt ist schon in Gewebekulturplatten für primäres Stroma beschrieben worden (Caldwell et al., 1991). Dabei wurde nachgewiesen, dass dieses Verhalten unabhängig vom Serumfluss ist, sondern auf das Basalmedium zurückzuführen ist. Es wurde diskutiert, ob außer Glutamin eine andere Aminosäure für die gestiegene metabolische Aktivität verantwortlich ist. Die Analytik des Aminosäurespektrums in dieser Arbeit ergab keinen Hinweis darauf. Weiterhin wurde der Einfluss der Perfusion auf die GM-CSF-Produktion untersucht und gezeigt, dass durch erhöhte Perfusionsraten die Zytokin-Produktion gesteigert wird (Caldwell, 1991). Im Festbettreaktor konnte dieser Effekt für das Zytokin SCF nicht nachgewiesen werden. SCF wird aber im Gegensatz zu GM-CSF konstitutiv exprimiert, was diesen Effekt erklären kann. Die

Zytokinproduktionsraten im Festbettreaktor lagen etwas niedriger als in den Gewebekulturplatten, was auch am Alter der Zellen gelegen haben kann.

Die stromalen Zellen aus Knochenmark sind auch in der Kokultur mit primären CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut eingesetzt worden. Dabei zeigte sich, dass ohne zusätzliche Stimulierung bereits eine Expansion der MNC und CFC erzielt werden kann, die durch Zusatz des Zytokinstandards aber wesentlich verbessert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Kokultur mit primärem Stroma auch in serumfreiem Medium sehr gut möglich ist, wodurch besonders die BFU-E unterstützt werden. Das P-LTC-Medium, das zur Kultivierung von primärem Stroma eingesetzt wird, eignet sich von den drei getesteten Medien am wenigsten zur Expansion der CFC. Ein Vergleich der zellspezifischen Verbrauchsdaten von TPO, IL-3 und FL zeigt, dass sie in einer Kokultur mit primärem Stroma für TPO gleich hoch ist wie mit der murinen stromalen Zelllinie SI/SI. Allerdings liegt dieser Wert beim primären Stroma für IL-3 um Faktor 14 und für FL um Faktor 35 höher als für SI/SI (Kapitel 4.4.1.).

Die Expansion der CAFC ist für einen stromafreien Ansatz im Vergleich zu einem Versuch mit primärem Stroma und einem mit der Zelllinie SI/SI untersucht worden. Dabei zeigte sich deutlich, dass in Kokultur mit primärem Stroma die Zellen am weitesten ausdifferenzierten. Die höchste Konzentration der CAFC konnte in Kokultur mit SI/SI erzielt werden.

Der neu entwickelte Miniatur-Schlaufenreaktor ist gut für die Kokultur von hämatopoietischen Zellen mit primärem Stroma geeignet. Es wurde in einem vergleichenden Versuch die Verwendung verschiedener Inokulumsdichten und Zellzahlverhältnisse zwischen Stroma und CD34⁺-Zellen untersucht, um die Rahmenbedingungen für eine Kokultur im Festbettreaktor festlegen zu können. Es zeigte sich, dass in dem getesteten Bereich eine Erhöhung der Zelldichte zu verbessertem Wachstum der MNC und der CFC führte. Durch ein Verhältnis der CD34⁺-Zellen zu Stroma von 1:10 konnte eine höhere Expansion der MNC erzielt werden als mit einem von 1:5 oder 1:2, aber die Vermehrung der CFC wurde durch die Änderung des Verhältnisses nicht beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass durch das primäre Stroma im Vergleich zur Zelllinie SI/SI eine stärkere Ausdifferenzierung der hämatopoietischen Zellen verursacht wird. Weiterhin sind sehr hohe Zytokinverbrauchsraten ermittelt worden, durch die eine stärkere Supplementierung des Mediums mit Zytokinen erforderlich würde. Die Kultur von primärem Stroma im Festbettreaktor zeigte außerdem, dass im Verlauf der Kulturdauer das Festbett sehr stark verklumpt, was einerseits die gleichmäßige Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen verschlechtert und andererseits die Zellernte stark behindert. Aus

diesen Gründen ist keine Kokultur von hämatopoietischen Zellen mit primärem Stroma im Festbettreaktor durchgeführt worden.

Der Einsatz von primärem Stroma bei der Kultivierung von hämatopoietischen Zellen ist auch prinzipiell in Frage zu stellen. Diese Zellen sind nur in geringem Maße verfügbar und haben eine begrenzte Lebensdauer. Zudem ist ihr Wachstum sehr langsam, was einen experimentellen Ansatz in der Klinik erschweren würde. Die Eigenschaften zur Unterstützung der Hämatopoiese nehmen im Verlauf der Alterung des Stromas ab (Mauch et al., 1982). Weiterhin ist auch mit einer relativ hohen Spendervariabilität zu rechnen.

Die Verwendung von autologem Knochenmark als Basis für die Kokultur ist ebenfalls kritisch zu betrachten. So ist z.B. bei einigen Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie nachgewiesen worden, dass ein Defekt im Stroma mit für die Krankheit verantwortlich ist (Verfaillie et al., 1994). Da für viele hämatologische Erkrankungen die genauen Entstehungsmechanismen und die Rolle des Knochenmarks nicht bekannt sind, ist in solchen Fällen von der Verwendung des autologen Materials abzusehen. Weiterhin ist von Galotto und Mitarbeitern (1999) nachgewiesen worden, dass als Folge einer Hoch-Dosis-Chemotherapie in Kombination mit Radiotherapie das Knochenmarkstroma der Patienten irreversibel geschädigt wird. Die Entnahme von Knochenmark eines solchen Patienten ist daher sowohl mit Blick auf die Gesundheit des Patienten als auch in Bezug auf die Fähigkeit dieser Zellen die Hämatopoiese zu unterstützen, nicht zu empfehlen.

6. Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor

Bei der Kokultivierung von hämatopoietischen und stromalen Zellen muss ein Gleichgewicht zwischen der positiven Unterstützung der Hämatopoiese und den Einflüssen des Medien- und Sauerstoffverbrauchs durch das Stroma eingestellt werden. In dieser Arbeit sind verschiedene Parameter, die auf die Kultivierung Einfluss nehmen können, im Miniatur-Schlaufenreaktor untersucht worden. Die murine stromale Zelllinie SL/SL wird in diesen Versuchen als Modell eingesetzt, wobei die Vorgehensweise allgemeingültig ist und als Basis für die Optimierung jeder Kokultur von stromalen und hämatopoietischen Zellen dienen sollte.

Im Anschluss an die Optimierung verschiedener Parameter wird eine Kultivierung mit und ohne Stroma im Miniatur-Schlaufenreaktor und ein Systemvergleich mit einem etablierten Suspensionssystem beschrieben.

6.1. Optimierung der Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor

6.1.1. Einfluss der Inokulationsstrategie

Ein Parameter der Kokultur von hämatopoietischen und stromalen Zellen ist die Vorgehensweise beim Inokulieren der Zellen. Es stellt sich die Frage, wie groß die Zeitdifferenz zwischen dem Inokulum des Stromas und der CD34⁺-Zellen sein muss, damit eine optimale Unterstützung der Hämatopoiese erfolgt. Ein wichtiger Aspekt ist dabei der Aufbau der Extrazellulärmatrix, die einen wesentlichen Einfluss auf die Adhäsion der hämatopoietischen Zellen ausübt. Es wurde untersucht, welchen Einfluss verschiedene Strategien des Inokulums auf die Expansion der hämatopoietischen Zellen ausüben. Als minimale Zeitdifferenz wurden die stromalen und CD34⁺-Zellen gleichzeitig und maximal mit einem Abstand von einer Woche inokuliert. Um den Effekt einer unterschiedlichen Konditionierung des Mediums durch das Stroma mit Wachstumsfaktoren oder des Nährstoffverbrauchs auszuschließen, wurde beim Inokulieren der CD34⁺-Zellen das verbrauchte Medium durch frisches, zytokinhaltiges ausgewechselt. Die Kulturparameter sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst. Die Zellzahlen nach der 7tägigen Kultivierung sind für die MNC und die CFC in Abbildung 6-1 dargestellt.

Es zeigte sich, dass schon bei einer Zeitdifferenz von 7,5 h zwischen Inokulum der stromalen und der CD34⁺-Zellen eine Steigerung der Expansion von MNC und CFC im Vergleich zum gleichzeitigen Inokulieren zu beobachten ist. Eine Verlängerung der Zeitdifferenz auf 23,5 h führte noch zu einer geringen Verbesserung dieses Effektes. Eine längerfristige Kultivierung des Stromas vor dem Inokulum der CD34⁺-Zellen konnte keine wesentliche Verbesserung der

Expansion der hämatopoietischen Zellen bewirken. Diese zeitlichen Effekte sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass erst durch das Stroma die Extrazellulärmatrix aufgebaut werden muss, damit die hämatopoietischen Zellen besser immobilisieren können und somit eine größere adhärenzte Ausgangspopulation vorliegt. Nach 23,5 h scheint demnach das Optimum für die Immobilisierung erreicht zu sein.

Tabelle 6-1: Parameter der Untersuchung der Inokulumsstrategie für die Kokultur

Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 2 verschiedene Spender
Inokulum:	5·10 ⁴ stromale Zellen/Reaktor 2,5·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor
Träger:	Collagen-Träger, 0,276 ± 0,070 g/Reaktor
Kultur-Medium:	LTC, Standardzytokinkombination
Fütterung:	Medienwechsel vor CD34 ⁺ -Inokulum
Anzahl der Versuche:	n = 2
Kulturdauer:	7 bis 14 Tage für Stroma, 7 Tage für CD34 ⁺ -Zellen

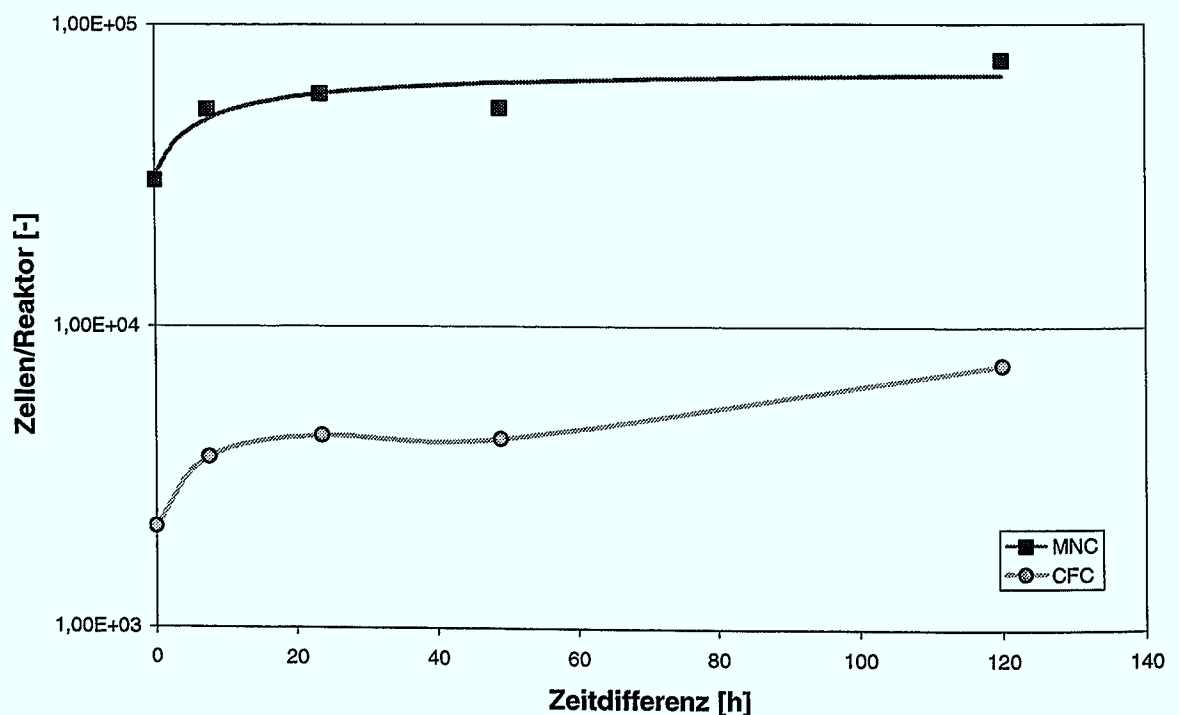


Abbildung 6-1: Einfluss der Zeitdifferenz zwischen Inokulum der stromalen und CD34⁺-Zellen auf die Kultivierung hämatopoietischer Zellen

Die Vermehrung der hämatopoietischen Zellen in diesem Versuch war sehr gering. Sowohl die Zelldichte als auch das Verhältnis zum Stroma lagen in einem Bereich, in dem eine bessere Expansion erwartet werden konnte. Die Zellkonzentrationen wurden in diesem Versuch so gewählt, dass keine Fütterung während der Kultivierung erforderlich war. Eine

Medienlimitierung kann ausgeschlossen werden, da eine minimale Glukose-Konzentration von 17 mmol/L am Tag 7 gemessen wurde.

6.1.2. Einfluss der Zelldichte auf den Trägern

Die Zelldichte auf den Trägern ist ein wesentlicher Parameter bei der Kultivierung immobilisierter Zellen. Eine hohe Dichte führt zu einem starken absoluten Medienverbrauch. In Systemen, in denen kein Medienwechsel durchgeführt wird, kann das zu Nährstoff-Limitierungen oder Metabolit-Inhibierungen führen. Ein perfundiertes System erfordert unter diesen Bedingungen sehr hohe Durchflussraten mit zytokinhaltigem Medium. Wenn die Zelldichte auf den Trägern zu niedrig ist, kann das zum Verlust der Vitalität führen. Die Zellen sind auf Faktoren angewiesen, die autokrin, d.h. von ihnen selbst produziert werden. Bei zu geringer Zelldichte ist die Konzentration dieser Faktoren zu niedrig und die Zellen sterben ab.

Im Rahmen dieser Arbeit sind fünf verschiedene Zell-Konzentrationen für die Kokultivierung verglichen worden. Das Verhältnis der primären CD34⁺-Zellen zum Stroma wurde dabei konstant gehalten. Die Versuchsparameter sind in Tabelle 6-2 aufgelistet. Da die Zelldichte des Stromas um Faktor 25 in den Ansätzen variierte, und das Medium vor allem durch die stromalen Zellen verbraucht wird (Kapitel 4.2.3.), wurden alle Versuchsansätze täglich mit einem Medienvolumen gefüttert, das proportional zur inokulierten Zellzahl war. Im Ansatz mit der höchsten Zelldichte entsprach diese Menge einem halben Medienwechsel pro Tag (2 mL/d) und somit während der Kulturdauer von 7 Tagen dem 3fachen Reaktorvolumen.

Tabelle 6-2: Parameter der Untersuchung der Trägerzelldichte

Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy)
	Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 3 verschiedene Spender
Inokulum:	1·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor
	2,5·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor
	5·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor
	1·10 ⁵ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor
	1,5·10 ⁵ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor
	je Ansatz 1:2 stromale Zellen
Träger:	Collagen-Träger, 0,409 ± 0,054 g/Reaktor
Kultur-Medium:	LTC, Standardzytokinkombination
Fütterung:	2,67 mL/10 ⁶ inokulierten Zellen täglich
Anzahl der Versuche:	n = 2
Kulturdauer:	8 Tage für Stroma, 7 Tage für CD34 ⁺ -Zellen

Die Expansionsdaten für die MNC, CFC und CAFC sind in Abbildung 6-2 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Expansion der MNC in dem untersuchten Bereich von der Zelldichte unbeeinflusst bleibt. Die CFC-Vermehrung ist nur bei der geringsten Zelldichte reduziert.

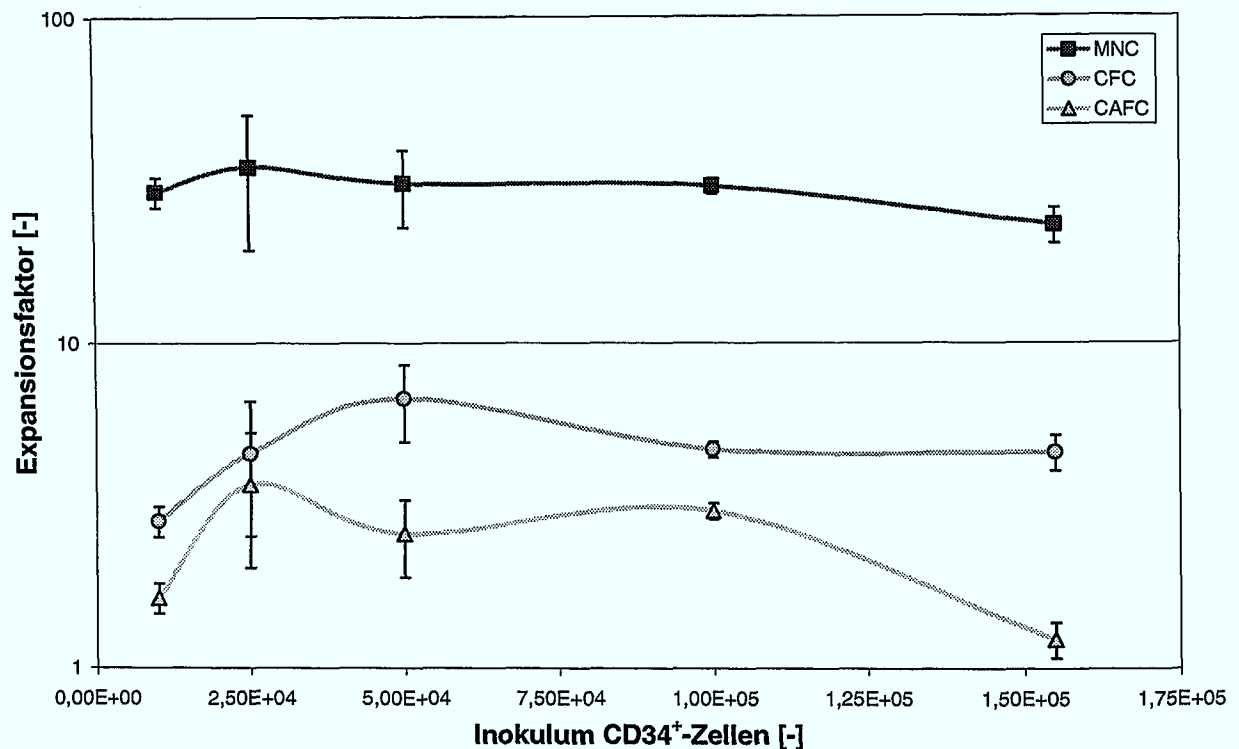


Abbildung 6-2: Einfluss der Zelldichte auf die Expansion hämatopoietischer Zellen

Bei diesem Versuch konnten die sehr unreifen CAFC in allen Ansätzen expandiert werden (Abbildung 6-2). Die Vermehrung der CAFC war sowohl bei der minimalen als auch bei der maximalen Zellkonzentration um Faktor 2,2 bzw. 3 geringer als die maximale Expansion. Der für die CFC und CAFC beobachtete negative Einfluss bestimmter Zelldichten ist nicht auf eine Medienlimitierung zurückzuführen, da die minimal gemessene Glukose-Konzentration 11 mmol/L (57% des Ausgangsmediums) betrug und die niedrigste Glutamin-Konzentration 1,4 mmol/L (49% des Ausgangsmediums).

6.1.3. Einfluss des Verhältnisses von CD34⁺-Zellen zu Stroma

Ein weiterer wesentlicher Aspekt bei der Kokultur ist das Verhältnis von CD34⁺-Zellen zu stromalen Zellen. Die stromalen Zellen beeinflussen die Hämatopoiese sowohl über die Produktion von löslichen Zytokinen und der Extrazellulärmatrix als auch durch die Expression membrangebundener Zytokine oder Adhäsionsmoleküle. Durch die Veränderung der Zellzahlverhältnisse werden die synergistischen Effekte dieser Faktoren optimiert. Im

immobilisierten, perfundierten System ist zusätzlich die Adhäsion der Zellen und somit deren Rückhaltung im Reaktor von erheblicher Bedeutung.

In dem hier beschriebenen Versuch wurden verschiedene Konzentrationen von CD34⁺-Zellen zu einer konstanten Zahl stromaler Zellen inokuliert. Aufgrund der hohen Stromakonzentration erfolgte täglich ein Medienwechsel von 1 mL. So wurde über die Kulturdauer das 1,5fache Reaktorvolumen ausgetauscht. Die Parameter des Versuches sind in Tabelle 6-3 zusammengestellt.

Tabelle 6-3: Parameter der Untersuchung des Verhältnisses von CD34⁺-Zellen zu Stroma

Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 3 verschiedene Spender
Inokulum:	2,5·10 ⁵ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor (1:2) 1·10 ⁵ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor (1:5) 5·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor (1:10) (Verhältnis CD34 ⁺ -Zelle:Stroma)
Träger:	Collagen-Träger, 0,541 ± 0,106 g/Reaktor
Kultur-Medium:	LTC, Standardzytokinkombination
Fütterung:	1 mL/pro Tag
Anzahl der Versuche:	n = 2
Kulturdauer:	8 Tage für Stroma, 7 Tage für CD34 ⁺ -Zellen

In Abbildung 6-3 ist die Expansion der verschiedenen Subpopulationen MNC, CFC und CAFC im Verhältnis zur Expansion der Zellen bei einem Verhältnis von 1:10 zum Stroma aufgetragen.

Die MNC wurden in diesem Ansatz (1:10) 19fach vermehrt, die CFC um Faktor 10,6 und die CAFC konnten noch zu einem Anteil von 23% des Inokulums nachgewiesen werden. Eine Erhöhung des Zahlen-Verhältnisses von CD34⁺- zu stromalen Zellen auf 1:10 führte zu einer deutlich verbesserten Expansion bzw. Erhaltung aller Subpopulationen. Dabei war vor allem für die CAFC eine stufenweise Steigerung der Expansionsdaten vom niedrigsten Zell-Verhältnis zum höchsten zu beobachten.

Durch die Medienwechsel waren die Zellen zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung nährstofflimitiert. Die Glukose- und Glutamin-Konzentrationen waren minimal auf 50% des Ausgangsmediums reduziert. Die maximal gemessene Laktat-Konzentration lag bei 16,6 mmol/L.

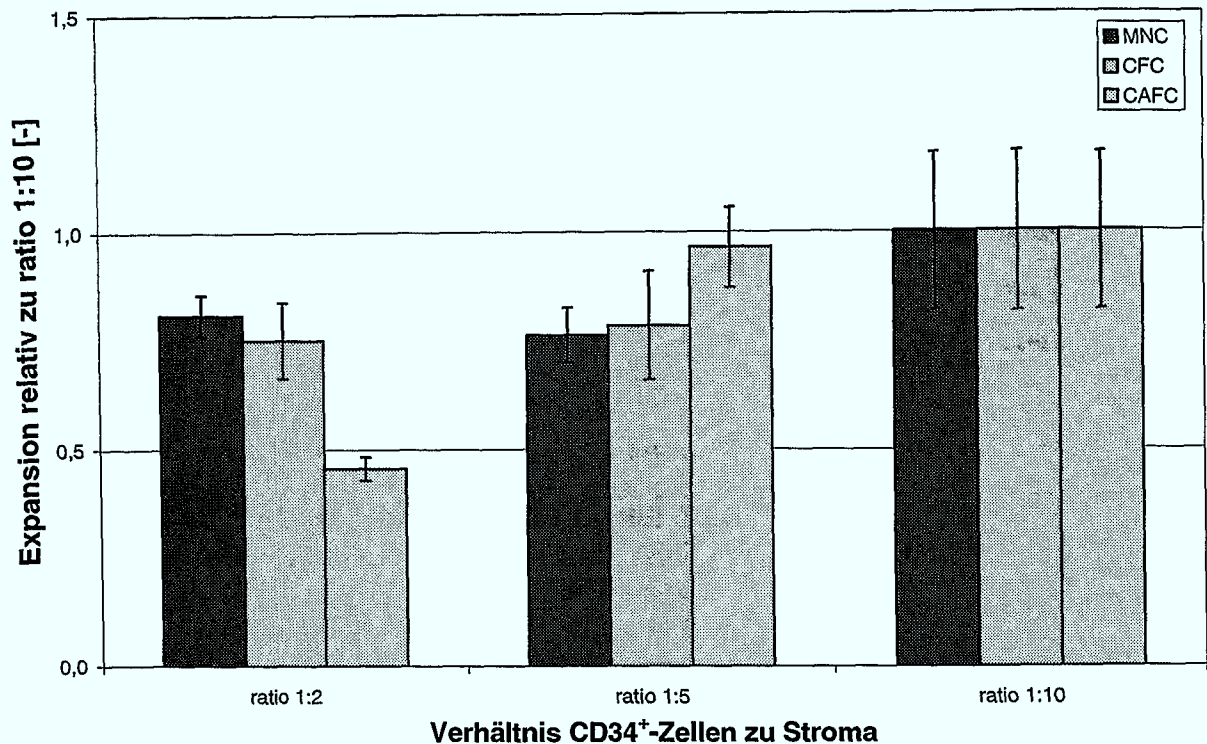


Abbildung 6-3: Einfluss des Verhältnisses von CD34⁺-Zellen zu Stroma auf die Kultivierung hämatopoietischer Zellen

6.1.4. Einfluss verschiedener Fütterungsstrategien

Wie bereits in der Einleitung dieses Kapitels erläutert wurde, muss bei der Kokultur hämatopoietischer und stromaler Zellen ein Gleichgewicht zwischen den positiven Effekten der Zytokinproduktion und Zelladhäsion und den negativen Effekten des verstärkten Medienverbrauchs eingestellt werden. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Frequenz des Medienwechsels während der Kultivierung.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung wurde eine relativ hohe Zelldichte eingesetzt, damit ein deutlicher Effekt der Fütterung zu beobachten ist. Die Kulturparameter sind in Tabelle 6-4 aufgeführt. Beim Medienwechsel ist das entnommene Medium abzentrifugiert und die Zellen im frischen Medium in den jeweiligen Ansatz zurückgegeben worden. Der Einfluss der verschiedenen Fütterungsstrategien auf die Expansion der MNC, CFC und CAFC ist in Abbildung 6-4 dargestellt, und die Glukose-Konzentrationen sind in Abbildung 6-5 aufgetragen.

Wie in Abbildung 6-4 deutlich zu erkennen ist, war die Expansion aller Subpopulationen im nicht gefütterten Ansatz deutlich niedriger als in allen anderen Reaktoren. Auch die Konzentration der CFC, die bei den gefütterten Proben zwischen 12 und 15% lag, war mit

4,3% hier wesentlich geringer. Die höchsten Expansionsdaten für alle Subpopulationen konnten in dem Ansatz erzielt werden, bei dem täglich 2 mL Medium ausgetauscht worden sind (Faktor 23 für MNC, 7,2 für CFC und 2,1 für CAFC). Zwischen den anderen Fütterungsstrategien konnte kein wesentlicher Unterschied ermittelt werden. Selbst bei der geringsten Fütterungsrate (2 mL am Tag 4) wurden den anderen Ansätzen gegenüber gleichwertige Expansionswerte erzielt. Durchflusszytometrische Analysen haben ergeben, dass am Tag 7 noch in allen gefütterten Proben der CD34-Anteil mit 60-70% sehr hoch lag. Das spricht dafür, dass die Zellen während der Kulturdauer sehr wenig ausdifferenziert sind.

Tabelle 6-4: Parameter der Untersuchung der Fütterungsstrategie für die Kokultur

Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 3 verschiedene Spender		
Inokulum:	5·10 ⁵ stromale Zellen/Reaktor 5·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor		
Träger:	Collagen-Träger, 0,380 ± 0,064 g/Reaktor		
Kultur-Medium:	LTC, Standardzytokinkombination		
Fütterung:	A	Ungefüttert	
	B	2 mL/d	3faches Reaktorvolumen in 7 Tagen
	C	1 mL/d	1,5faches Reaktorvolumen in 7 Tagen
	D	0,5 mL/d	0,75faches Reaktorvolumen in 7 Tagen
	E	2 mL/2 d	1,5faches Reaktorvolumen in 7 Tagen
	F	2 mL/4 d	0,5faches Reaktorvolumen in 7 Tagen
Anzahl der Versuche:	n = 2		
Kulturdauer:	8 Tage für Stroma, 7 Tage für CD34 ⁺ -Zellen		

Exemplarisch für den Medienverbrauch in den verschiedenen Ansätzen ist der Verlauf der Glukose-Konzentration in Abbildung 6-5 dargestellt. Der niedrigste Wert für Glukose in einem gefütterten Versuchen wurde mit 6,6 mmol/L am Tag 4 im Ansatz F gemessen. Der Verlauf der Glukose-Konzentration in den Ansätzen, die bezogen auf das Reaktorvolumen mit der gleichen Menge Medium, aber in verschiedenen Abständen während der Kulturdauer gefüttert wurden (Ansatz E und C), ist identisch. Dieser Effekt ist auch für Glutamin zu beobachten. Die niedrigste Konzentration für Glutamin und die höchsten Werte für Glutamat und Laktat wurden im ungefütterten Ansatz gemessen (1,18 mmol/L Glutamin, 1,08 mmol/L Glutamat, 15,8 mmol/L Laktat).

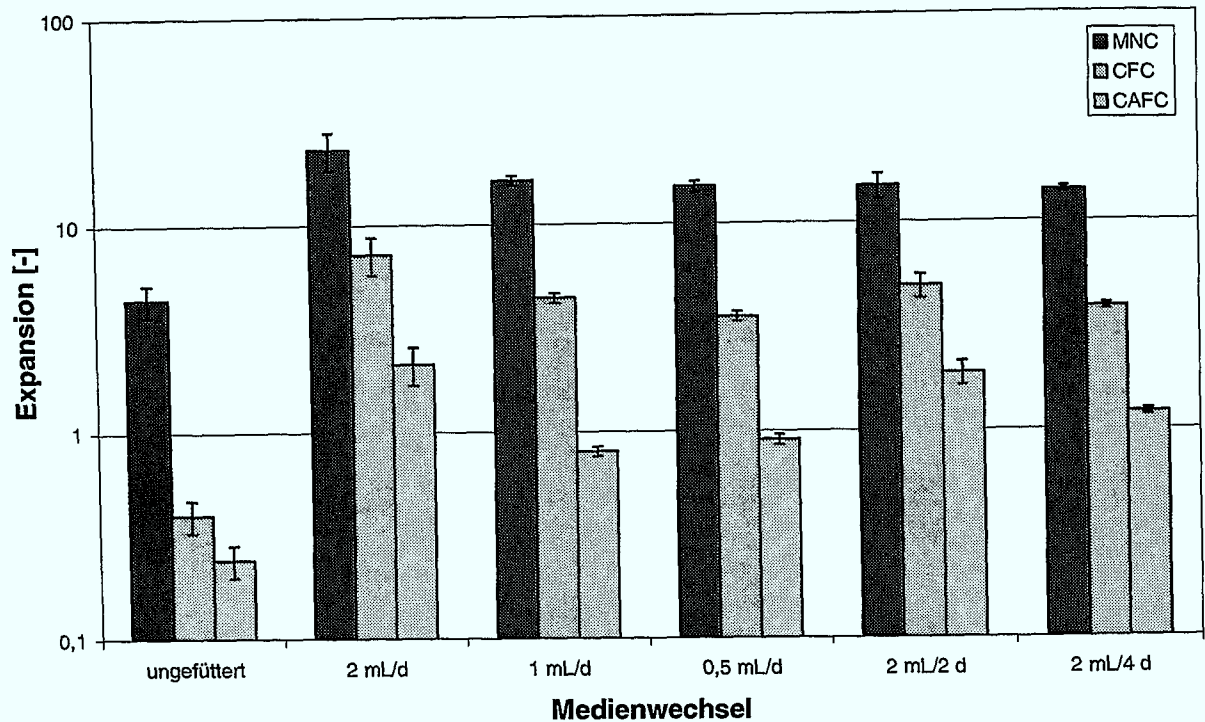


Abbildung 6-4: Einfluss verschiedener Fütterungsstrategien auf die Kokultivierung hämatopoietischer und stromaler Zellen

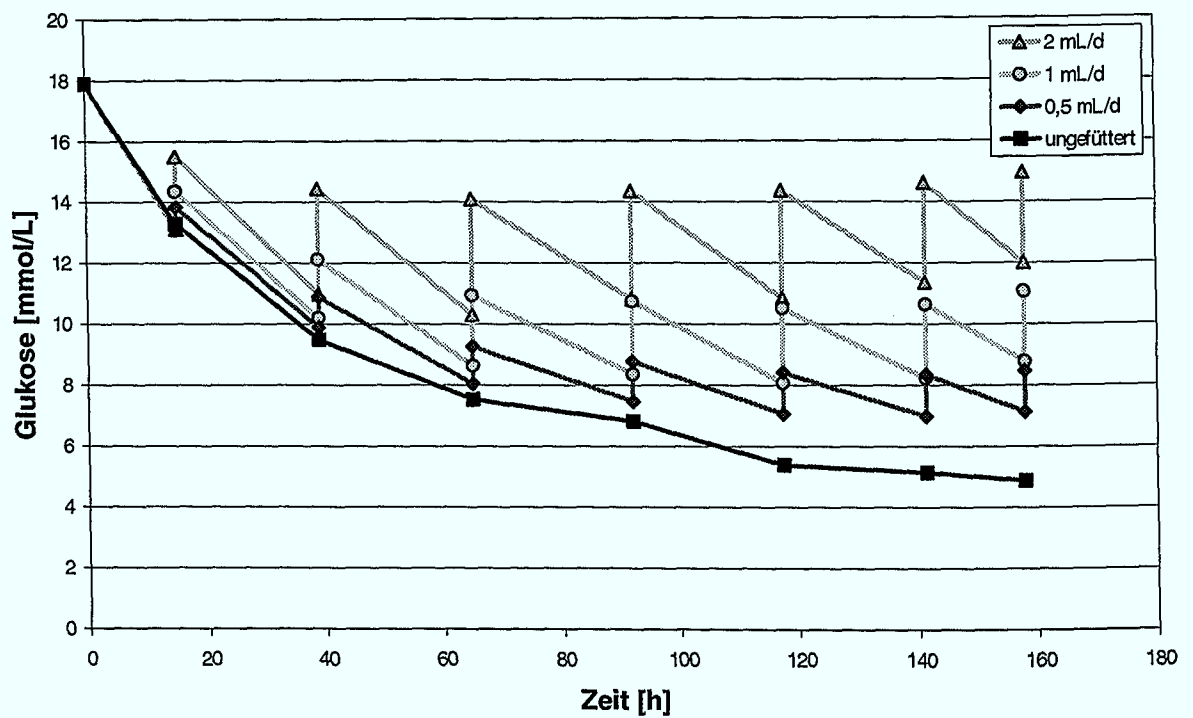


Abbildung 6-5: Glukose-Konzentration im Verlauf der Kultivierung mit verschiedenen Fütterungsstrategien

In den Medienproben von Tag 7 sind die Konzentrationen von IL-3, SCF, TPO und FL gemessen worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-6 zusammengestellt. In dem ungefütterten Ansatz liegen alle Zytokine in deutlich niedrigeren Konzentrationen als in den anderen Reaktoren vor. Dabei ist die Konzentration von TPO mit nur 9% vom täglich mit 2 mL gefütterten Ansatz am stärksten reduziert. Die Konzentrationen aller Zytokine sind in diesem Reaktor am höchsten. Für die Zytokine ist wie bei Glukose der Effekt zu beobachten, dass in den Versuchen mit vergleichbarem Medienaustausch über die gesamte Kulturdauer die gleichen Konzentrationen am Tag 7 vorliegen.

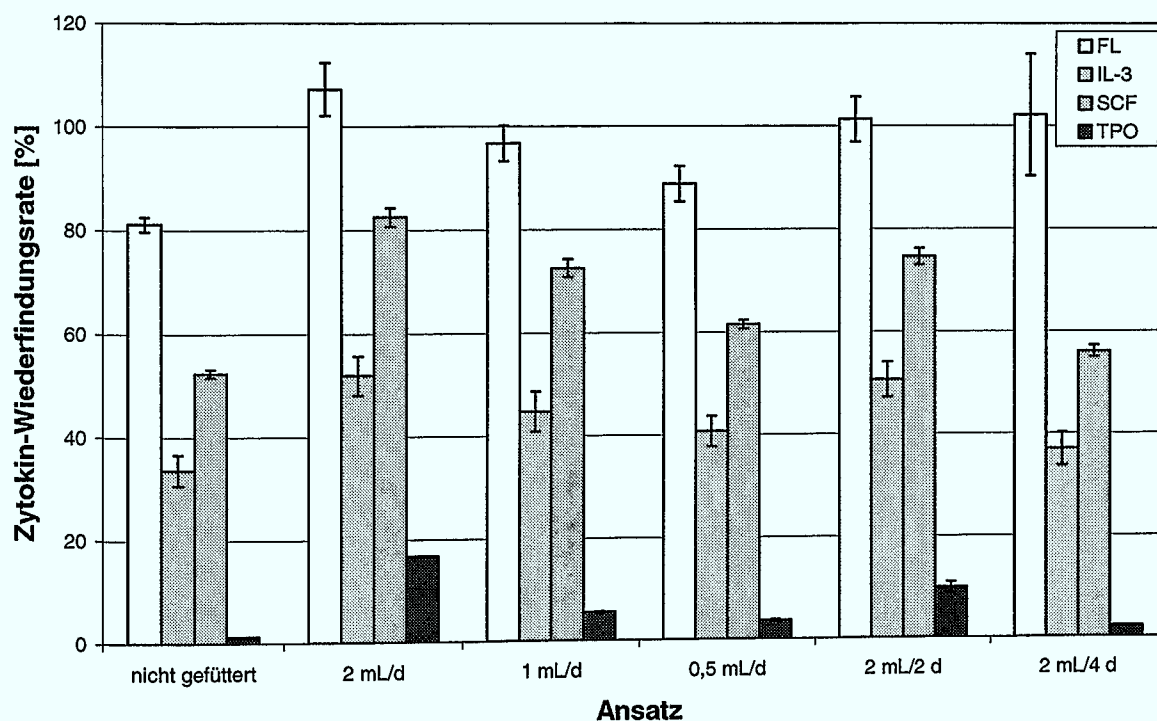


Abbildung 6-6: Zytokin-Konzentrationen nach 7 Tagen Kultivierung mit verschiedenen Fütterungsstrategien

6.1.5. Einfluss von serumfreiem Medium

Die Kokultur von hämatopoietischen und stromalen Zellen in serumfreien Medien ist insbesondere für eine klinische Anwendung von großem Interesse.

Es wurde untersucht, in welchem Ausmaß auf die Verwendung von Serum bei der Kultivierung immobilisierter Zellen verzichtet werden kann. Dabei ist im Vergleich zu einer herkömmlichen Kultivierung mit serumhaltigem LTC-Medium schrittweise der Einsatz dieses Mediums reduziert worden. Angefangen von einem Medienwechsel zu serumfreiem Medium nach eintägiger Immobilisierung der hämatopoietischen Zellen, bis hin zur direkten Überführung der in PBS gelagerten Träger in X-Vivo 10 und der anschließenden serumfreien

Kultivierung wurden alle Stufen getestet. Die Kulturbedingungen sind der Tabelle 6-5 zu entnehmen. Wenn die Träger mit serumhaltigem Medium in Berührung gekommen sind, sind sie vor ihrem Einsatz in serumfreier Kultivierung dreimal mit X-Vivo 10 gewaschen worden, damit keine Reste des Serums das Ergebnis beeinflussen. Bei bereits besiedelten Trägern sind eventuell im Medium befindliche Zellen abzentrifugiert und in serumfreies Medium überführt worden. Die Expansion der MNC, CFC und CAFC ist in Abbildung 6-7 dargestellt. Dabei wurden die Daten auf die Expansion der Zellen im LTC-Medium bezogen.

Tabelle 6-5: Parameter der Untersuchung zum Einsatz serumfreier Medien für die Kokultur

Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 5 verschiedene Spender
Inokulum:	5·10 ⁴ stromale Zellen/Reaktor 1·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor
Träger:	Collagen-Träger, 0,245 ± 0,047 g/Reaktor
Kultur-Medien:	LTC X-Vivo 10 Jeweils mit Standardzytokinkombination
Fütterung:	Keine
Versuchsansätze	A LTC B X-Vivo 10 C Träger 24 h in LTC, X-Vivo 10 ab Tag 0 D Stroma-Inokulum in LTC, X-Vivo 10 ab Tag 1 E CD34-Inokulum in LTC, X-Vivo 10 ab Tag 2
Anzahl der Versuche:	2 unabhängige Versuche; je n = 2
Kulturdauer:	8 Tage für Stroma, 7 Tage für CD34 ⁺ -Zellen

Collagen-Träger, die von PBS direkt in serumfreies Medium überführt werden, sind nicht zur Kultivierung von hämatopoietischen Zellen geeignet (Abbildung 6-7), da kaum noch Zellen nach einer 7tägigen Kultur nachgewiesen werden können. Schon die Lagerung der Träger über 24 h bei 37°C in serumhaltigem Medium ermöglichte die Immobilisierung und Kokultivierung von hämatopoietischen und stromalen Zellen unter serumfreien Bedingungen. Durch die Immobilisierung der stromalen bzw. der stromalen und der hämatopoietischen Zellen mit Serum wird zusätzlich die Expansion aller Subpopulationen schrittweise verbessert. In dem Ansatz, in dem X-Vivo 10 erst nach der serumhaltigen Immobilisierung der CD34⁺-Zellen verwendet wurde, konnten die MNC und die CFC um Faktor 2 und die CAFC sogar um Faktor 3 besser expandiert werden als in serumhaltigem Medium.

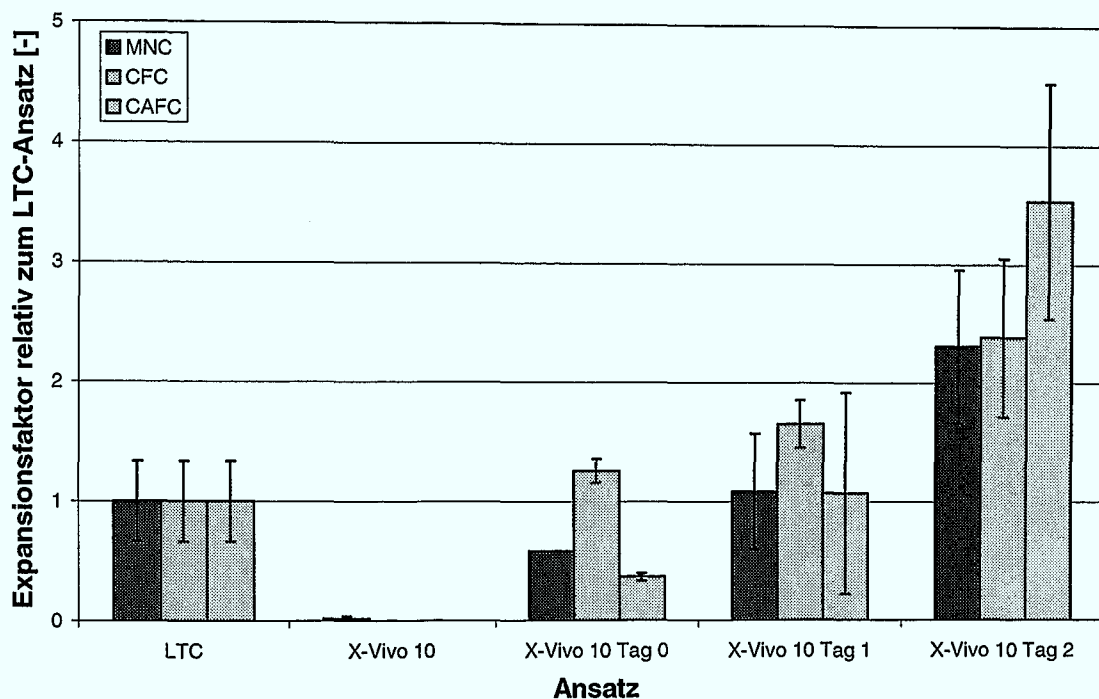


Abbildung 6-7: Einfluss von serumfreiem Medium auf die Kokultur hämatopoietischer und stromaler Zellen (Erklärung der Ansätze siehe Tabelle 6-5)

Ein deutlicher Unterschied konnte in der Zusammensetzung der CFC zwischen der Kultivierung mit und ohne Serum ermittelt werden. In Tabelle 6-6 sind die Konzentrationen verschiedener koloniebildender Zellen in Abhängigkeit vom Medium aufgelistet. Durch das serumhaltige Medium ist sowohl die Konzentration der CFU-G/M als auch der BFU-E deutlich niedriger als im serumfreien Medium. Außerdem wird vor allem der Erhalt der CFU-G/M gefördert, was durch das fast doppelt so hohe Verhältnis zwischen den CFU-G/M und den BFU-E bestätigt wird.

Tabelle 6-6: Vergleich der unterschiedlichen CFC in serumhaltigem und serumfreiem Medium

Medium	CFU-G/M [%]	BFU-E [%]	Verhältnis CFU-G/M zu BFU-E
LTC	7,1 ± 2,6	0,5 ± 0,1	14,5 ± 1,7
X-Vivo 10	15,9 ± 3,3	1,9 ± 0,2	8,5 ± 1,1

Die Konzentrationen der Medienbestandteile waren in keinem der Versuchsansätze limitierend (minimale Glukose-Konzentration: 14,8 mmol/L, minimale Glutamin-Konzentration: 1,4 mmol/L, maximale Laktat-Konzentration: 5 mmol/L).

6.2. Vergleich der Kokultur mit der stromafreien Kultivierung

In einer zweiwöchigen Kultivierung ist die Expansion hämatopoietischer Zellen mit und ohne die stromale Zelllinie SI/SI untersucht worden. Neben dem Einfluss des Stromas sollte auch die Eignung des Systems für längerfristige Experimente nachgewiesen werden.

Aufgrund der relativ hohen Zelldichte erfolgte ein täglicher Medienwechsel, bei dem im Medium befindliche Zellen nicht in die Reaktoren zurückgeführt worden sind. Die Kulturparameter sind in Tabelle 6-7 zusammengestellt. Für jede Probenahme wurden ein bzw. zwei Miniatur-Schlaufenreaktoren abgeerntet.

Die Abbildungen 6-8 und 6-10 zeigen den Verlauf der verschiedenen Subpopulationen hämatopoietischer Zellen während der Kultivierung. Der Tag 0 entspricht dem Zeitpunkt des CD34⁺-Inokulums. Die Expansion ist auf die inokulierte Zellzahl bezogen.

Tabelle 6-7: Parameter der Untersuchung zum Einsatz von Stroma

Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy)
Inokulum:	Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 2 verschiedene Spender 5·10 ⁵ stromale Zellen/Reaktor 5·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor
Träger:	Collagen-Träger, 0,385 ± 0,045 g/Reaktor
Kultur-Medien:	LTC mit Standardzytokinkombination
Fütterung:	½ Medienwechsel/Tag, ab Tag 2 (nach CD34 ⁺ -Inokulum)
Versuchsansätze:	A Kultivierung mit SI/SI B Kultivierung ohne Stroma
Anzahl der Versuche:	Je Probenahme n = 1-2
Probenahmen:	Tag 0*, 4, 7, 10*, 14 (* = nur stromahaltig)
Kulturdauer:	15 Tage für Stroma, 14 Tage für CD34 ⁺ -Zellen

Sowohl die stromahaltige als auch die stromafreie Kultivierung verlief über den Zeitraum von 2 Wochen ohne Probleme, was die Eignung des Miniatur-Schlaufenreaktors für längerfristige Experimente belegt.

Bei der stromahaltigen Kultivierung konnten die MNC bis zu einem Faktor 454 am Tag 14 expandiert werden (Abbildung 6-8). Die Expansion der CFC erreichte am Tag 10 ein Maximum (Faktor 26) und sank anschließend wieder ab. Die CAFC konnten ebenfalls vermehrt werden (Faktor 4,5). Anhand der Zellzahlen scheint sich ein stabiles hämatopoietisches System in diesem Zeitraum einzustellen. Ein Vergleich der Konzentrationen der Subpopulationen zeigte allerdings, dass dieses Gleichgewicht auf der Multiplikation der MNC-Expansion mit der zunehmenden Ausdifferenzierung beruhte. Auch wenn der Anteil der Vorläuferzellen sinkt, wird deren Absolutzahl unter den Versuchsbedingungen deutlich gesteigert. Dies ist vor allem für die CAFC zu beobachten, die

im Kulturzeitraum von 14 Tagen expandieren und noch nicht das Maximum überschritten haben. Bei dieser Betrachtung muss zudem berücksichtigt werden, dass die Expansion auf die inokulierten Zellzahlen bezogen ist. Da nicht alle Zellen immobilisiert werden, sind die realen Expansionswerte für die Zellen auf den Trägern sogar noch höher als die hier errechneten.

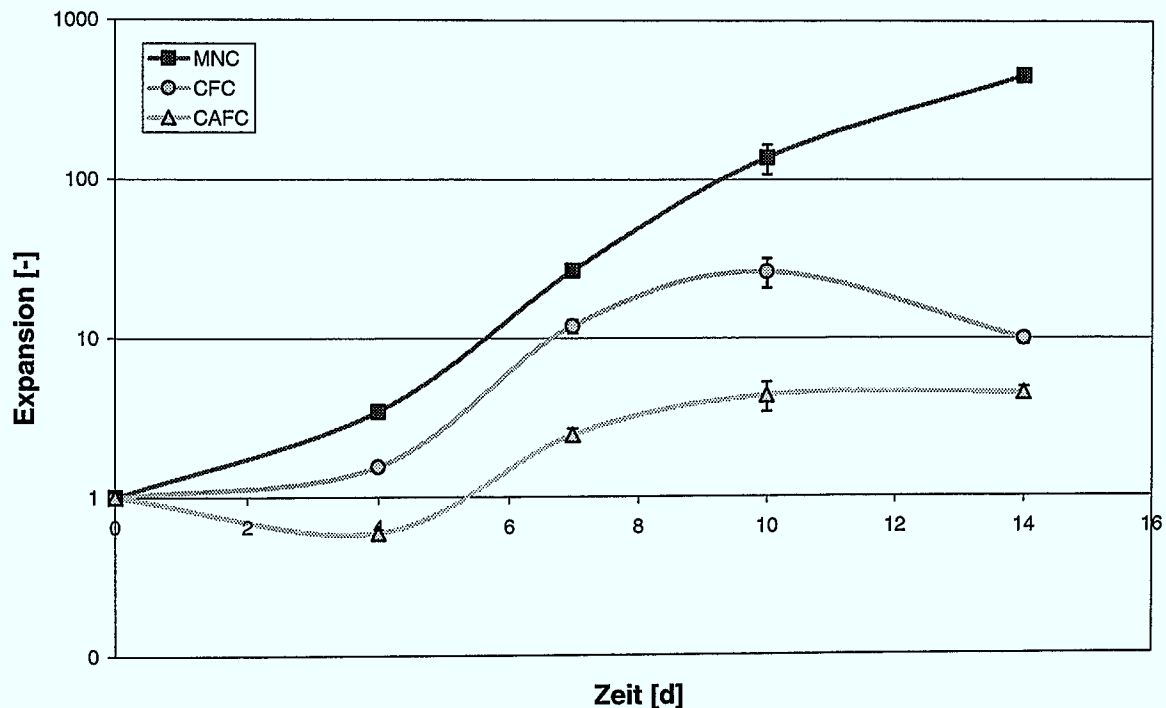


Abbildung 6-8: Kokultur hämatopoietischer Zellen mit der stromalen Zelllinie SI/SI im Miniatur-Schlaufenreaktor (Ansatz A)

Bei jedem Medienwechsel wurden 2 mL aus dem Reaktor entnommen und die darin enthaltenen Zellen gezählt. Die Konzentration der MNC im Medium ist in Abbildung 6-9 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die Zellzahl im Medium wie auf den Trägern exponentiell ansteigt. Eine Berechnung der akkumulierten Zellzahl über den Verlauf der Kultivierung führt mit einem Faktor von 562 ± 45 zu einer noch deutlich höheren Expansion der MNC. Eine genaue Bilanzierung ist allerdings nicht möglich, da aufgrund der anfangs sehr geringen Zellzahlen keine tägliche Analytik der Zellen erfolgen konnte. Bei den Probenahmen wurden die Zellen im Medium in einem MC-Assay untersucht. Die CFC-Konzentration der Zellen im Medium ist im Vergleich zu der der immobilisierten Zellen in Tabelle 6-8 aufgelistet. Es fällt auf, dass die CFC-Konzentration auf den Trägern höher ist als im Medium.

Tabelle 6-8: Vergleich der CFC-Anteile auf den Trägern und im Medium während der Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor

Zeit [d]	CFC [%] immobilisiert	CFC [%] im Medium
7	20,6	11,3
10	8,8	7,8
14	1,0	0,5

Die Expansion der hämatopoietischen Zellen im Miniatur-Schlaufenreaktor ohne stromale Zellen ist in Abbildung 6-10 dargestellt. Wie im stromahaltigen System kann ebenfalls eine deutliche Vermehrung aller Subpopulationen beobachtet werden, wobei die Expansionsfaktoren wesentlich geringer sind. So wurden die MNC um Faktor 180 expandiert, die CFC um Faktor 11 und die CAFC um Faktor 2. Die Konzentrationen der verschiedenen Populationen unterschieden sich nicht wesentlich vom stromahaltigen Ansatz. Die Expansion der CFC am Tag 14 ist für beide Systeme nahezu identisch, wobei die MNC mit Stroma um den Faktor 2,5 mehr expandiert werden als ohne Stroma.

In Kapitel 4.5. sind Untersuchungen zur Zellernte über die Lyse der Träger mittels Collagenase beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass vor allem stromale Zellen von Collagenase angegriffen werden, wodurch die Bilanzierung einer Kokultur erschwert wird. Im Rahmen der stromafreien Kultivierung im Miniatur-Schlaufenreaktor konnte bestätigt werden, dass die Trägerlyse keinen negativen Einfluss auf die hämatopoietischen Zellen ausübt. Dazu ist die Zellzahl, die mittels Kernfärbung bestimmt wurde, in Abbildung 6-11 der Zellzahl nach Trägerlyse gegenübergestellt. Dieser Vergleich zeigt, dass kein Unterschied zwischen diesen beiden Methoden für die Zellzahlbestimmung der hämatopoietischen Zellen zu erkennen ist.

Die Medienanalytik der hier beschriebenen Versuche zeigte, dass zu keinem Zeitpunkt eine Substrat-Limitierung einer der untersuchten Komponenten vorlag. Die Analytik der Zytokine IL-3, SCF und FL ist in Abbildung 6-12 dargestellt. Die Konzentration von TPO lag maximal bei 10% des eingesetzten Zytokins. Nach den 2 Tagen ohne Medienwechsel konnte TPO gar nicht mehr nachgewiesen werden. Der Verlauf der Zytokin-Konzentrationen ist für IL-3 und FL fast unbeeinflusst vom Stroma. Durch die tägliche Medienzufuhr wird die FL-Konzentration auf dem Ausgangswert gehalten. IL-3 liegt im Bereich zwischen 25 und 30%. Es fällt auf, dass für beide Ansätze die IL-3-Konzentration gegen Ende der Kulturdauer deutlich reduziert wird, was auf einen erhöhten Verbrauch durch die Zellen schließen lässt. Die SCF-Konzentration lag in den Reaktoren mit Stroma konstant bei 100%, wohingegen die stromafreien Ansätze niedrigere Werte aufwiesen. Eine Ursache für diesen Unterschied ist vermutlich die SCF-Produktion durch die Zelllinie SI/SI (Kapitel 4.2.2.).

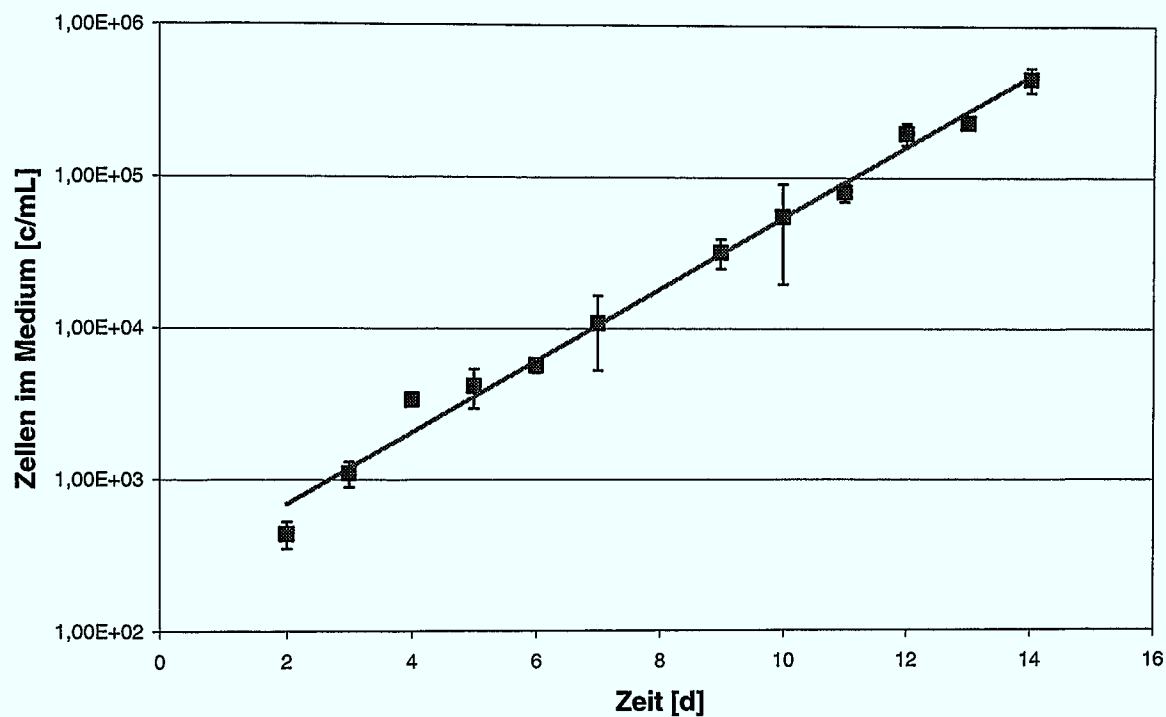


Abbildung 6-9: Verlauf der MNC-Konzentration im Medium während der Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor

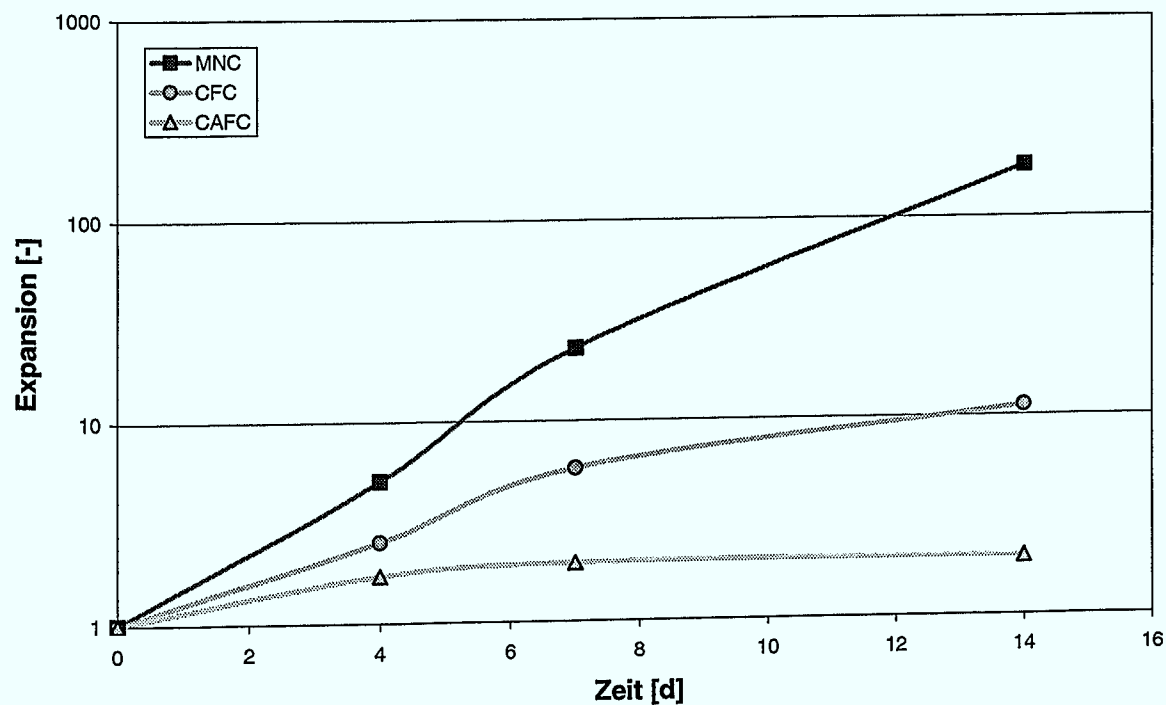


Abbildung 6-10: Kultivierung hämatopoietischer Zellen im Miniatur-Schlaufenreaktor ohne Stroma (Ansatz B)

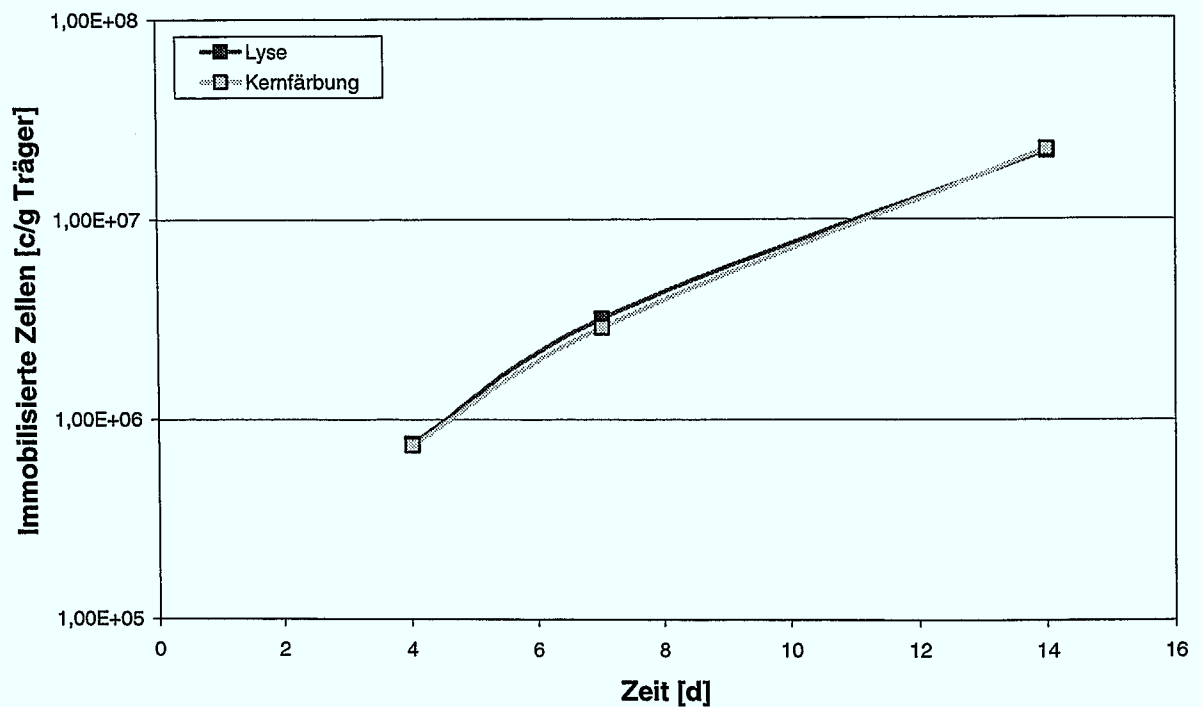


Abbildung 6-11: Vergleich der Zellzahlbestimmung mittels Trägerlyse und Kernfärbung während der stromafreien Kultivierung hämatopoietischer Zellen im Miniatur-Schlaufenreaktor

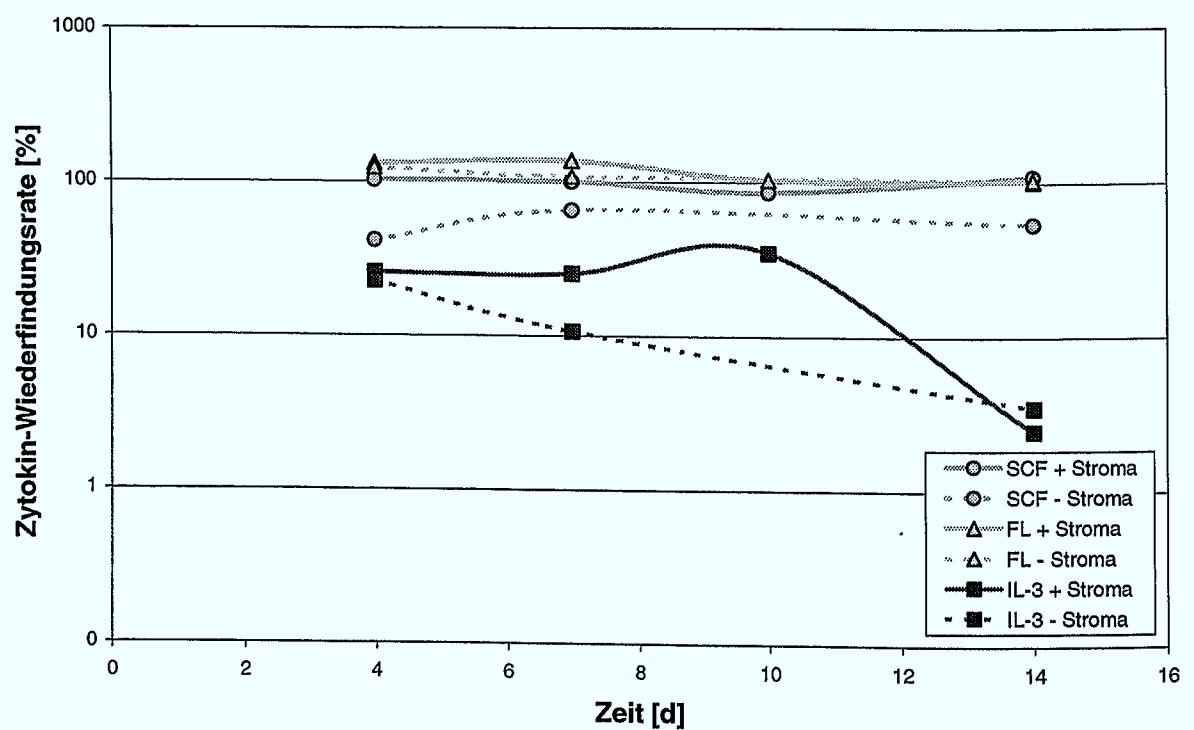


Abbildung 6-12: Zytokin-Wiederfindungsraten im Verlauf der Kultivierung hämatopoietischer Zellen mit und ohne Stroma im Miniatur-Schlaufenreaktor

6.3. Vergleich der Kokultur mit Suspensionskultur

In diesem Versuch wurde die Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor mit einem etablierten Suspensionssystem, dem Kultur-Beutel, verglichen. Da in der stromafreien Suspensionskultur serumfreies Medium eingesetzt wird, wurde ein Teil der Miniatur-Schlaufenreaktoren ebenfalls serumfrei betrieben. Aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 6.1.5. wurden die Zellen serumhaltig immobilisiert und das Medium erst durch die Fütterung mit X-Vivo 10 quasikontinuierlich ausgetauscht. Die Analytik der hämatopoietischen Zellen ist bei diesem Systemvergleich um die Bestimmung der SRC in immundefizienten Mäusen erweitert worden. Dadurch sollte die Verwendung des Kultursystems und der -parameter für den Erhalt der besonders frühen hämatopoietischen Zellen nachgewiesen werden (Kapitel 2.1.3.). Die Kultivierungsparameter der verschiedenen Systeme sind in Tabelle 6-9 zusammengefasst. In den trägerhaltigen Systemen sind die stromalen Zellen 24 h vor den hämatopoietischen inokuliert worden. Das Inokulum der CD34⁺-Zellen ist als Tag 0 definiert. Für die Probenahmen im Miniatur-Schlaufenreaktor wurden jeweils 2-4 Reaktoren vollständig abgeerntet. Die Expansion der hämatopoietischen Zellen in den verschiedenen Systemen ist in Abbildung 6-13 dargestellt.

Tabelle 6-9: Kulturparameter des Vergleichs der Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor (M) mit einer Suspensionskultur, dem Kultur-Beutel (B) (L = LTC-Medium, X = X-Vivo 10)

	M-L	M-X	Beutel
Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 5 Spender	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 5 Spender	Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 5 Spender
Inokulum:	5·10 ⁵ Stroma 5·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen	5·10 ⁵ Stroma 5·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen	3,78·10 ⁴ CD34 ⁺ -Zellen
Träger:	0,397 ± 0,044 g	0,398 ± 0,029 g	—
Medium:	LTC Standardzytokine 4 mL	LTC, X-Vivo 10 Standardzytokine 4 mL	X-Vivo 10 Standardzytokine 4 mL
Kulturdauer:	7 Tage	7 Tage	7 Tage
Probenahmen:	Tag 0, 1, 7	Tag 0, 1, 7	Tag 7
Anzahl der	Tag 0 und 1, n = 2	Tag 0 und 1, n = 2	n = 1
Versuche:	Tag 7, n = 4	Tag 7, n = 3	—
Fütterung:	Ab Tag 2 mit LTC 2 mL/Tag	Ab Tag 2 mit X-Vivo 10 2 mL/Tag	—

Die Expansion der MNC unter stroma- und serumfreien Bedingungen im Kultur-Beutel ist relativ niedrig im Vergleich zu anderen Untersuchungen (Expansionsfaktor ca. 40, Schmidt, 2000). Das bedeutet, dass die hämatopoietischen Zellen in diesem Versuch eine schlechte

proliferative Qualität aufwiesen. Diese Annahme wird durch den Anteil der CAFC im Inokulum (2,8%) bestätigt. Dieser Wert ist in Bezug auf vorangegangene Versuche (durchschnittlich $14,8 \pm 4,3\%$ CAFC) sehr gering.

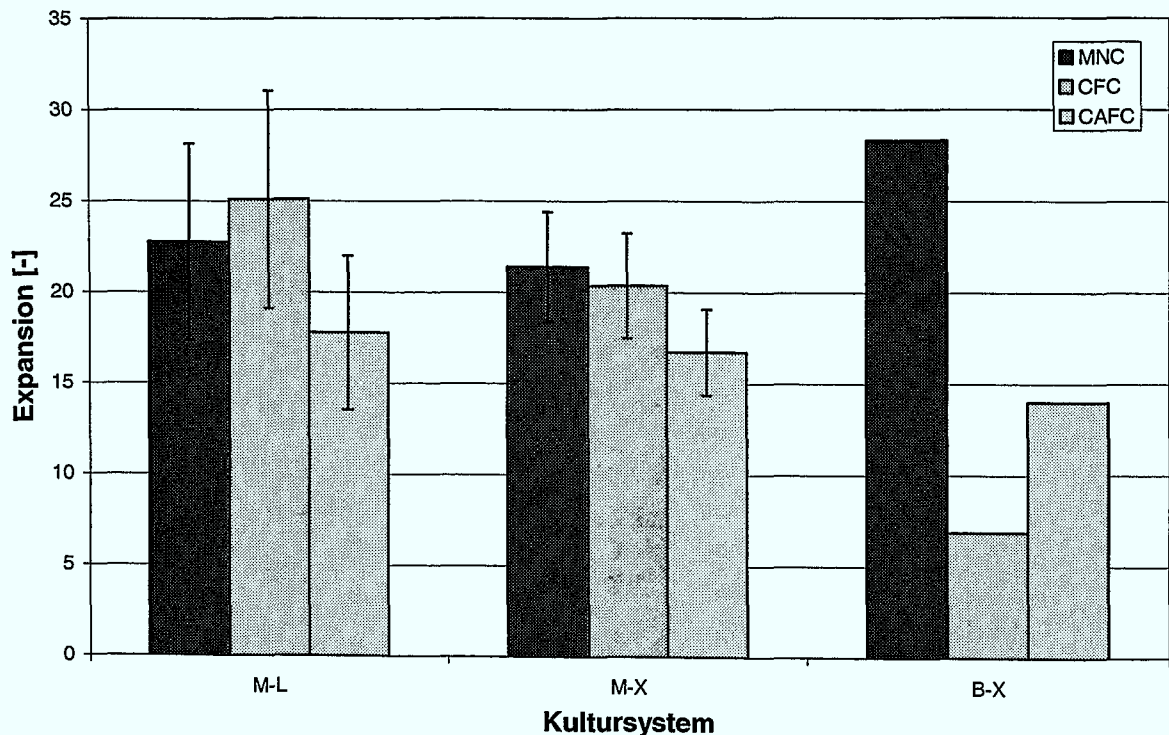


Abbildung 6-13: Expansion der hämatopoietischen Zellen in verschiedenen Kultursystemen (Tag 7)

Im Vergleich zum Kultur-Beutel ist die Expansion der MNC in den Miniatur-Schlaufenreaktoren etwas geringer, im Gegensatz zu der Vermehrung der CFC. Diese ist sowohl für M-L als auch für M-X deutlich höher als im Suspensionssystem. Das ist durch die stärkere Ausdifferenzierung der Zellen im stromafreien Ansatz zu erklären, da der Anteil der CFC am Tag 7 im Vergleich zu den immobilisierten Systemen nur 10,3% betrug (19,4% (M-L) und 16,7% (M-X)). Ein Vergleich der CFC-Konzentrationen auf den Trägern und im Medium in den verschiedenen Miniatur-Schlaufenreaktoren (Tabelle 6-10) bestätigt das in Kapitel 6.2. ermittelte Ergebnis, dass die CFC-Konzentration auf den Trägern deutlich höher ist als im Medium. Eine Analyse der Subpopulationen der immobilisierten CFC zeigt, dass kein wesentlicher Unterschied in der Zusammensetzung zwischen M-L und M-X zu finden ist, obwohl M-X mit serumfreiem Medium gefüttert worden ist. In früheren Experimenten ist eine verstärkte Förderung der BFU-E durch serumfreies Medium nachgewiesen worden (6.1.5.). Da im M-X das serumhaltige Medium nur quasikontinuierlich mit X-Vivo 10

ausgetauscht wurde, liegt die Serumkonzentration am Tag 7 noch bei 0,78%. Die Serumreste haben bei dieser Betriebsweise des Miniatur-Schlaufenreaktors demnach noch einen deutlichen Einfluss auf die Kultur.

Tabelle 6-10: Vergleich der CFC-Anteile auf den Trägern und im Medium während der Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor

Population [%]	M-L	M-X
CFC immobilisiert	19,4	16,7
CFU-G/M immobilisiert	17,6	15,4
BFU-E immobilisiert	1,6	1,3
CFC im Medium	10,2	11,8

Wie bereits beschrieben war die Konzentration der CAFC im Inokulum sehr gering. Während der Kultivierung im Miniatur-Schlaufenreaktor konnte dieser Anteil im Gegensatz zur Suspensionskultur fast erhalten werden. So wurden noch 2,16% CAFC in M-L und M-X nachgewiesen und 1,37% im Kultur-Beutel. Diese Zellpopulation ist demnach nicht stark ausdifferenziert, sondern konnte sehr stark expandiert werden. So wurden in M-L eine 17,8fache Expansion, in M-X eine 16,7fache Expansion und im Suspensionssystem eine 14fache Expansion dieser Population erzielt (Abbildung 6-13).

Sowohl die Zellen des Inokulums als auch die expandierten Zellen sind in immundefizienten Mäusen auf die Anwesenheit von SRC untersucht worden. Am Tag 7 wurde die Anzahl der Zellen transplantiert, die in einem Kultursystem produziert worden sind, um das Verfahren bei einer Transplantation zu simulieren. Dabei kommt es auf die Qualität der aus einer Spende insgesamt expandierten Zellen an. Die Zellen jedes Versuchs wurden auf je 4 Tiere einer Gruppe verteilt. Einen Tag nach der Transplantation der Zellen sind $5 \cdot 10^6$ Zellen des Kotransplantats (Kapitel 3.7.3.) injiziert worden.

Tabelle 6-11: Anzahl der in Mäuse injizierten Zellen zur Detektion der SRC

Versuch	Inokulierte Zellen/Maus
Inokulum	$7,5 \cdot 10^4$
B-X, Tag 7	$2,0 \cdot 10^5$
M-L, Tag 7	$5,3 \cdot 10^5$
M-X, Tag 7	$7,0 \cdot 10^5$
Kontrolle, Tag 1 und 7	0

In der Tier-Gruppe, die mit den Zellen aus dem Kultur-Beutel transplantiert worden sind, sind 2 Tiere vorzeitig verstorben (9 bzw. 13 Tage nach Transplantation). Diese zeigten Zeichen einer GVHD (abgemagert, ikterisch (Gelbsucht), Darm entzündet).

Nach 4 Wochen ist das periphere Blut der restlichen Mäuse auf den Anteil humaner DNA mittels PCR untersucht worden. Dabei konnte keine humane DNA nachgewiesen werden.

Nach 6 Wochen wurden die Mäuse getötet und die Zellen aus dem Knochenmark der Tiere analysiert. Die Tiere der Gruppe, denen das Inokulum transplantiert wurde, sind nach 7 Wochen getötet worden. Bei der durchflusszytometrischen Analyse konnten nur in 2 Tieren humane CD45⁺-Zellen nachgewiesen werden (0,32% und 5,2% CD45⁺). Beide Tiere sind mit Zellen aus M-X transplantiert worden. Da die PCR eine niedrigere Nachweisgrenze für humane Zellen aufweist, wurde die DNA von jeweils einem Tier je Gruppe mittels dieser Technik auf die humane Satelliten-DNA analysiert (Kapitel 3.8.2.). Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ist in Abbildung 6-14 gezeigt. Die teilweise sehr schwachen Banden sind mit weißen Pfeilen markiert. Da der Anteil der humanen Zellen und somit der humanen DNA sehr gering war, mussten sehr große Mengen Gesamt-DNA eingesetzt werden, um ein Signal zu erhalten. Dabei wurden jeweils 1 bzw. 2 µg Gesamt-DNA pro PCR-Ansatz getestet. Mithilfe der PCR konnte in den Mäusen humane DNA nachgewiesen werden, die mit dem Inokulum oder den in den Miniatur-Schlaufenreaktoren expandierten Zellen transplantiert worden sind. In der Maus, die mit Zellen aus dem Gewebekultur-Beutel injiziert worden ist, konnte keine humane DNA nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass bei der Erhöhung der eingesetzten DNA auf 2 µg keine Bande mehr zu erkennen ist. Diese DNA-Menge führt demnach zu Störungen der PCR. Für reine humane DNA reicht eine Menge von 10 ng für die erfolgreiche Amplifikation der humanen Satelliten-DNA aus.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nur ein sehr schwaches Engraftment humaner Zellen im Knochenmark der Tiere festgestellt werden konnte. Der Grund dafür liegt entweder in der relativ geringen Zellzahl, die in die Mäuse injiziert worden ist, und/oder in dem zu geringen Engraftmentpotential der Zellen. Letzteres wird durch den, wie schon beschrieben, niedrigen Anteil der CAFC im Inokulum und die geringe Expansionskapazität der MNC unterstützt.

In den Miniatur-Schlaufenreaktoren konnten im Gegensatz zum Suspensionssystem noch humane Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Es sind zwar mehr Zellen aus den immobilisierten Systemen transplantiert worden, was zu diesem Effekt geführt haben kann, aber die Anzahl der transplantierten Zellen entsprach dem Expansionspotential im jeweiligen System. Somit ist eine stärkere Ausdifferenzierung der hämatopoietischen Zellen im stromafreien Suspensionssystem verglichen mit dem stromahaltigen Miniatur-Schlaufenreaktor wie schon für die CFC und CAFC auch auf der Ebene der SRC nachgewiesen worden.

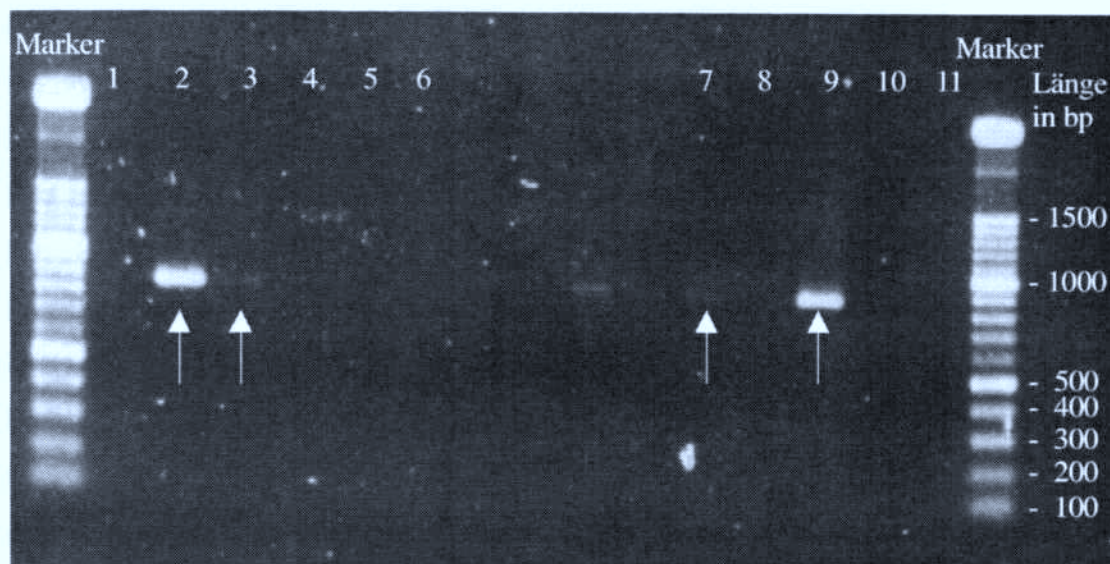


Abbildung 6-14: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis humaner Satelliten-DNA (Pfeile: Produktbande mit 850 bp, 1: Wasser, 2: Positivkontrolle aus frischen humanen MNC, 3: Inokulum 1 µg DNA, 4: Inokulum 2 µg DNA, 5: B-X 1 µg DNA, 6: B-X 2 µg DNA, 7: M-L 1 µg DNA, 8: M-L 2 µg DNA, 9: M-X 1 µg DNA, 10: Negativkontrolle, untransplantierte Maus 1 µg DNA, 11: Negativkontrolle, untransplantierte Maus 2 µg DNA)

6.4. Diskussion

Die Ergebnisse der in diesem Kapitel beschriebenen Parameter-Optimierung der Kokultur hämatopoietischer Zellen mit der Zelllinie SI/SI sind in Tabelle 6-12 zusammengefasst.

Tabelle 6-12: Zusammenfassung der optimierten Kulturbedingungen für eine Kokultur von CD34⁺-Zellen mit der Zelllinie SI/SI im Festbettreaktor

Parameter	Optimum
Zelldichte	$2,5 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$ CD34 ⁺ -Zellen/Reaktor
Zellzahlverhältnis CD34 ⁺ -Zelle zu Stroma	1:10
Inokulumsstrategie	Zeitdifferenz von ≥ 24 h zwischen Stroma und CD34 ⁺ -Inokulum _{hh}
Fütterungsstrategie	$\frac{1}{2}$ Medienwechsel/Tag
Einsatz von serumfreiem Medium	Möglich, wenn Träger mit Serum gewaschen

Die Zelldichte von $7,5 \cdot 10^4$ - $7,3 \cdot 10^5$ c/g Träger führte zu den besten Resultaten. Ein Vergleich dieser Werte mit Literaturdaten ist schwierig, da sehr unterschiedliche Kulturbedingungen und Trägertypen verwendet worden sind. Sardonini und Wu (1993) haben mit porösen Gelatine-Trägern gearbeitet, auf denen MNC aus humanem Knochenmark immobilisiert worden sind. Dabei wurden Zelldichten von ca. $2 \cdot 10^8$ c/g Träger eingesetzt. Dieser Wert kann nicht direkt mit den Daten dieser Arbeit verglichen werden, da das Medienvolumen in die Betrachtung mit einbezogen werden muss. So sind von Sardonini und Wu Spinner eingesetzt worden, die ein sehr großes Arbeitsvolumen aufwiesen. In diesen Systemen wurde einmal

wöchentlich ein halber Medienwechsel vorgenommen. Wenn die Zahl der immobilisierten Zellen auf das Medienvolumen bezogen wird, errechnet sich eine Konzentration von $5 \cdot 10^5$ c/mL Medium, die im Vergleich zu dem in dieser Arbeit ermittelten Optimum ($7,7 \cdot 10^3$ - $7 \cdot 10^4$ c/mL Medium) wesentlich höher ist. Bei der Kokultur von primärem Stroma und MNC aus humanem Knochenmark auf Siran-Trägern sind Zelldichten von bis zu $1,4 \cdot 10^7$ c/g Träger eingesetzt worden (Schröder, 1997). Das entspricht einer Zelldichte von $7,4 \cdot 10^6$ c/mL Medium. Dieser Wert ist um Faktor 100-1000 höher als die hier bestimmten Werte. Diese Zellen sind im perfundierten Festbettreaktor bei einer Medienverweilzeit von 14 h kultiviert worden, was einer täglichen Medienzugabe von $0,24 \text{ mL}/10^6 \text{ c}$ entspricht. Die Fütterung war um Faktor 10 niedriger als im Miniatur-Schlaufenreaktor. Das in dieser Arbeit ermittelte Optimum der Zellkonzentration liegt im Vergleich zu Literaturdaten sowohl bezogen auf die Trägermenge als auch bezogen auf das Medienvolumen deutlich niedriger. Obwohl die Kulturbedingungen (Zelltyp, Träger, Kultursystem) nicht direkt vergleichbar sind, wurden unter den hier optimierten Bedingungen die besten Expansionsdaten erzielt (siehe Kapitel 8).

Die Untersuchungen des Zellzahlverhältnisses der CD34^+ -Zellen zum Stroma im immobilisierten System bestätigen die Ergebnisse, die in Gewebekulturplatten mit den gleichen Zelltypen ermittelt worden sind (Koschmieder, 1998). Daraus ist zu schließen, dass durch die dreidimensionale Kultivierung keine Veränderungen in Bezug auf diesen Parameter im Vergleich zur zweidimensionalen Kultur zu beobachten sind. Das Verhältnis ist in dieser Arbeit nicht weiter erhöht worden, da unter den eingesetzten Kulturbedingungen die Zahl der hämatopoietischen Zellen unter die Nachweisgrenze sinken würde. Die murine, stromale Zelllinien M2-10B4 wurde in einem viel höheren Verhältnis (1:60) für die Kokultur eingesetzt (Burroughs et al., 1994). Das für die murine Zelllinie SI/SI erhaltene Ergebnis ist sehr gut mit den Daten für die Kokultur mit primärem Stroma vergleichbar, wo ebenfalls bei einem Verhältnis von 1:10 die optimalen Bedingungen vorlagen (Kapitel 5.2.2.).

Eine mögliche Ursache für dieses Verhalten könnte in der Verbesserung der Immobilisierung der hämatopoietischen Zellen bei einem höheren Verhältnis zum Stroma liegen. So konnte für die hämatopoietische Zelllinie KG-1 nachgewiesen werden, dass ihre Immobilisierung bei einer ratio von 1:10 im Vergleich zu niedrigeren Verhältnissen deutlich verbessert wird (Kapitel 4.3.4.). Bei dem höheren Verhältnis ist die Anzahl der CD34^+ -Zellen im Reaktor geringer, weshalb die absolute Zytokinmenge pro Zelle größer ist. Durch diesen Effekt könnte auch der positive Einfluss auf die Expansion der Blutzellen verstärkt werden.

Koller und Mitarbeiter haben ebenfalls verschiedene Verhältnisse zwischen CD34^+ -Zellen und Stroma aus humanem Knochenmark untersucht (Koller et al., 1997). Bei einem

Verhältnis (CD34⁺-Zellen zu Stroma) von 1:33 konnte im Vergleich zu 1:8 eine um Faktor 2 erhöhte Expansion der CFU-GM erzielt werden. Dabei wird die Produktion löslicher Zytokine als Ursache für die positiven Effekte diskutiert, wobei durch den direkten Zellkontakt noch eine Steigerung der Expansion erzielt werden konnte. In Arbeiten von Köhler und Mitarbeitern (Köhler et al., 1999) wurden CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut mit primärem Stroma aus Knochenmark kultiviert. Das dort eingesetzte Verhältnis dieser Zellpopulationen von 1:17,5 liegt in einem ähnlichen Bereich wie das hier ermittelte Optimum.

Die optimale Fütterungsrate, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt worden ist, entspricht Daten aus der Literatur für die Kultivierung hämatopoietischer Zellen aus anderen Quellen und in anderen Kultursystemen. So wiesen auch Schwartz und Mitarbeiter (1991) nach, dass bei der Kultur von hämatopoietischen Zellen aus humanem Knochenmark mit einem halben Medienwechsel pro Tag eine optimale Versorgung der Zellen in Bezug auf die Expansion gewährleistet ist. Diese Austauschrate entspricht übertragen auf ein kontinuierlich betriebenes System einer Verweilzeit von annähernd 48 h. Bei einer solchen Fütterungsrate konnte in Kulturen aus dem Knochenmark eine gesteigerte Zytokin-Produktion im Vergleich zu niedrigeren Frequenzen erzielt werden (Caldwell et al., 1991). Ein positiver Effekt der Perfusion auf die Expansion hämatopoietischer Zellen konnte von Koller und Mitarbeitern im Flachbettreaktor gezeigt werden (1992 c). Dabei wurden MNC aus Nabelschnurblut auf einer stromalen Schicht, die aus humanem Knochenmark etabliert worden ist, kultiviert. Die Fütterung erfolgte in diesem System allerdings nur mit einem halben Medienwechsel pro Woche, was übertragen auf einen kontinuierlichen Prozess einer Verweilzeit von annähernd 336 h entsprechen würde.

Der positive Effekt des häufigen Medienwechsels ist vermutlich auf die dadurch erhöhten Zytokin-Konzentrationen zurückzuführen. Die niedermolekularen Medienkomponenten waren zu keinem Zeitpunkt limitierend. Im Gegensatz zu dieser Vermutung steht ein Versuch von Sardonini und Wu (1991), bei dem durch eine erhöhte Fütterungsrate der Zytokine keine wesentliche Verbesserung der Expansionsdaten hämatopoietischer Zellen erreicht werden konnte. Weiterhin ist denkbar, dass durch die häufige Verdünnung die Konzentration inhibierender Substanzen verringert wird und dadurch der positive Einfluss auf die Zellen ausgeübt wird.

Es wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass der Einsatz von serumfreiem Medium möglich ist, wenn die Träger in serumhaltigem Medium gelagert worden sind. Die Immobilisierung mit Serum und die anschließende Kultivierung in serumfreiem Medium führte zu deutlich besseren Expansionsdaten. Die erforderliche Vorbehandlung der Träger mit Serum ist bereits

beschrieben und lässt sich darauf zurückführen, dass die Besiedlungsfähigkeit der Träger stark von der Fibronektin-Konzentration auf der Trägersoberfläche abhängig ist (Lüllau, 1992). Durch die Serumproteine wird eine 2-5 nm dicke Proteinschicht auf der Oberfläche aufgebaut (Koller et al., 1995 a). Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen ist eine Beschichtung der Träger mit zusätzlichen Komponenten denkbar (Kapitel 9). Von Varani und Mitarbeitern (1998) sind neue Mikroträger entwickelt worden, die durch ihr spezielles Material auch eine serumfreie Adhäsion von Fibroblasten ermöglichen.

In Untersuchungen der Kokultur von CD34⁺-Zellen mit primärem Stroma konnten im Gegensatz zu den hier gezeigten Versuchen mit dem serumfreien X-Vivo 10 nur maximal 40% der Expansionsdaten mit Serum erzielt werden (Koller, 1998). Der wesentliche Unterschied liegt dabei in den stromalen Zellen. Als Qualitätsmerkmal von primärem Stroma dient der Anteil stromaler Vorläuferzellen (colony forming units-fibroblasts = CFU-F). Durch serumfreies Medium wurde vor allem diese Population reduziert, woraus eine verminderte Unterstützung der Hämatopoiese resultiert. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse mit primärem Stroma, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt worden sind (Kapitel 5.2.1.). Dabei konnten mit X-Vivo 10 gleichwertige Expansionsdaten wie in serumhaltigen Medien erzielt werden. Der erfolgreiche Einsatz von serumfreien Medien in der Kokultur ist auch von Kawada und Mitarbeitern (1999) für die murine stromale Zelllinie HESS-5 beschrieben.

Der Vergleich der Expansion im Miniatur-Schlaufenreaktor mit Literaturdaten erfolgt in Kapitel 8. Im immobilisierten System führt die Kokultur mit der stromalen Zelllinie SI/SI zu einer wesentlich verbesserten Expansion sowohl der MNC als auch der CFC und CAFC im Vergleich zur stromafreien Kultur. Die Zellen im Medium waren weiter ausdifferenziert als die immobilisierten (Kapitel 6.2. und 6.3.), was der Beobachtung entspricht, dass reifere Zellen weniger adhärent sind als die Stammzellen (Coulombel et al., 1983).

Eine Anreicherung der Zytokine in der Extrazellulärmatrix (Kapitel 2.2.4.) konnte nicht nachgewiesen werden. Vermutlich ist die Menge der gebundenen Zytokine so gering, dass dadurch entstehende Konzentrationsdifferenzen unter der Nachweisgrenze liegen.

Die Expansion hämatopoietischer Zellen im stromahaltigen Miniatur-Schlaufenreaktor im Vergleich mit dem stromafreien Kultur-Beutel belegte eindeutig, dass die Kokultur vor allem in Bezug auf die Unterstützung und Vermehrung der frühen Vorläuferzellen den Suspensionssystemen überlegen ist. Die Ausdifferenzierung in den immobilisierten Systemen war nicht so stark wie in Suspension, was besonders mit dem Nachweis der SRC belegt werden kann. Dieser Effekt ist vor allem auf die stromalen Zellen zurückzuführen, da ihr positiver Einfluss bereits in vorher beschriebenen Versuchen nachgewiesen worden ist.

7. Kokultur im Festbettreaktor

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung und Optimierung der Bedingungen für eine Kokultur hämatopoietischer und stromaler Zellen im Festbettreaktor (Abbildung 1-1). Dazu wurden zuerst die stromalen Zelllinien in diesem System charakterisiert. Anschließend ist der Einsatz verschiedener Zelllinien und Zytokinkombinationen für die Kokultivierung im Festbettreaktor vergleichend untersucht worden.

7.1. Vergleich der Kultivierung stromaler Zelllinien im Festbettreaktor

Vor einer Kokultur im Festbettreaktor wurde untersucht, wie sich die stromalen Zellen unter den für die Kokultivierung erforderlichen Bedingungen im Reaktor verhalten. Dazu wurden die dafür wichtigsten Parameter eingestellt, wie die Bestrahlung der Zellen, das Medium und der Volumenstrom.

Als stromale Zellen wurden in einem Reaktor (A) nur die murine Zelllinie SI/SI und in einem zweiten (B) diese im Verhältnis 1:1 zur ebenfalls murinen Zelllinie M2-10B4 mod. eingesetzt. Der zweite Ansatz mit den gemischten Stromazelllinien wurde in Anlehnung an die gleiche Kombination von Stromazellen im Langzeitassay (LTC-IC bzw. CAFC, Kapitel 3.7.3.) gewählt. Die Kulturparameter sind in Tabelle 7-1 aufgeführt.

Tabelle 7-1: Parameter der Kultivierung bestrahlter stromaler Zelllinien im Festbettreaktor

	Reaktor A	Reaktor B
Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy)	Stromale Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy)
Inokulum:	$5,2 \cdot 10^6$ Zellen	Je Zelllinie $5 \cdot 10^6$ Zellen
Träger:	1,602 g	1,713 g
Medium:	LTC	LTC
Kulturdauer:	14 Tage	14 Tage
Medienzulauf:	Ab Tag 1	Ab Tag 1
Verweilzeit:	36 h	54 h

Ein wichtiger Aspekt bei der Kokultur mit bestrahlten Zellen ist der möglichst lange Erhalt der stromalen Schicht, damit die Bedingungen für die hämatopoietischen Zellen konstant bleiben. In Abbildung 7-1 ist der Verlauf der beiden Reaktoren dargestellt, wobei die Expansion der Zellen aufgetragen ist. Mit der Zelllinie SI/SI alleine konnte über die Kulturdauer von 2 Wochen eine stabile Zellzahl aufrecht erhalten werden (Reaktor A). Im

Gegensatz dazu wurde bei der Kultivierung beider stromaler Zelllinien (Reaktor B) ab Tag 7 ein konstanter Rückgang der Zellen bis auf 30% des Inokulums beobachtet.

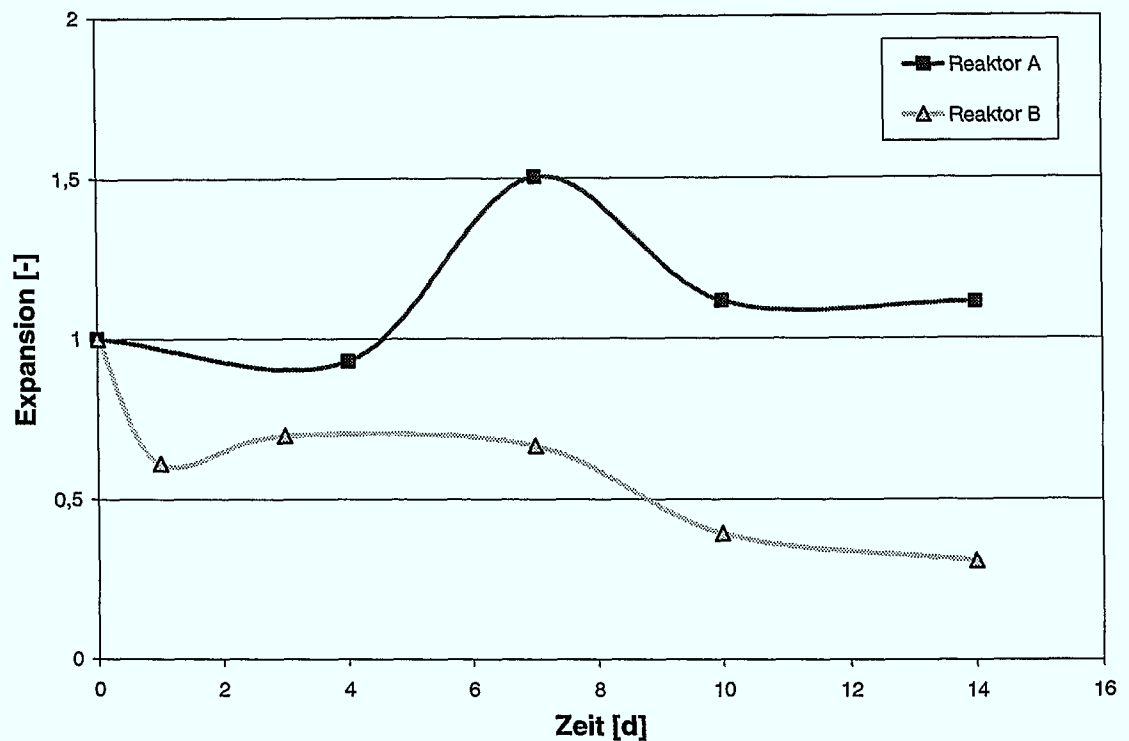


Abbildung 7-1: Vergleich der Kultivierung von bestrahlten stromalen Zelllinien im Festbettreaktor (Reaktor A: SI/SI; Reaktor B: M2-10B4 mod. und SI/SI)

Die Medienanalytik der beiden Reaktoren ergab, dass zu keinem Zeitpunkt für die hämatopoietischen Zellen limitierende Substrat-Konzentrationen vorlagen. Aus den in Tabelle 7-1 gezeigten Daten ist abzuleiten, dass die Betriebsweise und die Bedingungen dieser beiden Kultivierungen den Anforderungen einer Kokultur entsprechen.

Tabelle 7-2: Minimal- bzw. Maximalwerte von Medienkomponenten während der Kultivierung bestrahlter, stromaler Zelllinien im Festbettreaktor

Substanz	Reaktor A	Reaktor B	LTC-Medium
Glukose [mM]	8,95	12,9	19,1
Glutamin [mM]	1,19	1,61	2,85
Glutamat [mM]	0,75	0,85	0,597
Laktat [mM]	13,00	10,15	2,74

Der Verlauf der zellspezifischen Verbrauchsdaten für die Kultivierung der Zelllinie SI/SI im Festbettreaktor (Reaktor A) ist in Abbildung 7-2 gezeigt. Im Vergleich zu den Verbrauchsdaten, die in Gewebekulturplatten ermittelt worden sind (Kapitel 4.2.2.), ist der

Glukoseverbrauch im Festbettreaktor höher, der Glutaminverbrauch dagegen geringer. Das Verhalten der stromalen Zellen ändert sich demnach im Festbettreaktor, wobei einerseits die Perfusion und andererseits die dreidimensionale Kultivierung einen Einfluss ausüben können. Der Glukose- und Glutaminverbrauch sinkt im Verlauf der Kultivierung ab Tag 4, was eine Folge der strahlungsbedingten Veränderungen in den Zellen sein kann. Die Zellen sterben während der Kulturdauer nicht ab, weisen aber einen reduzierten Stoffwechsel auf.

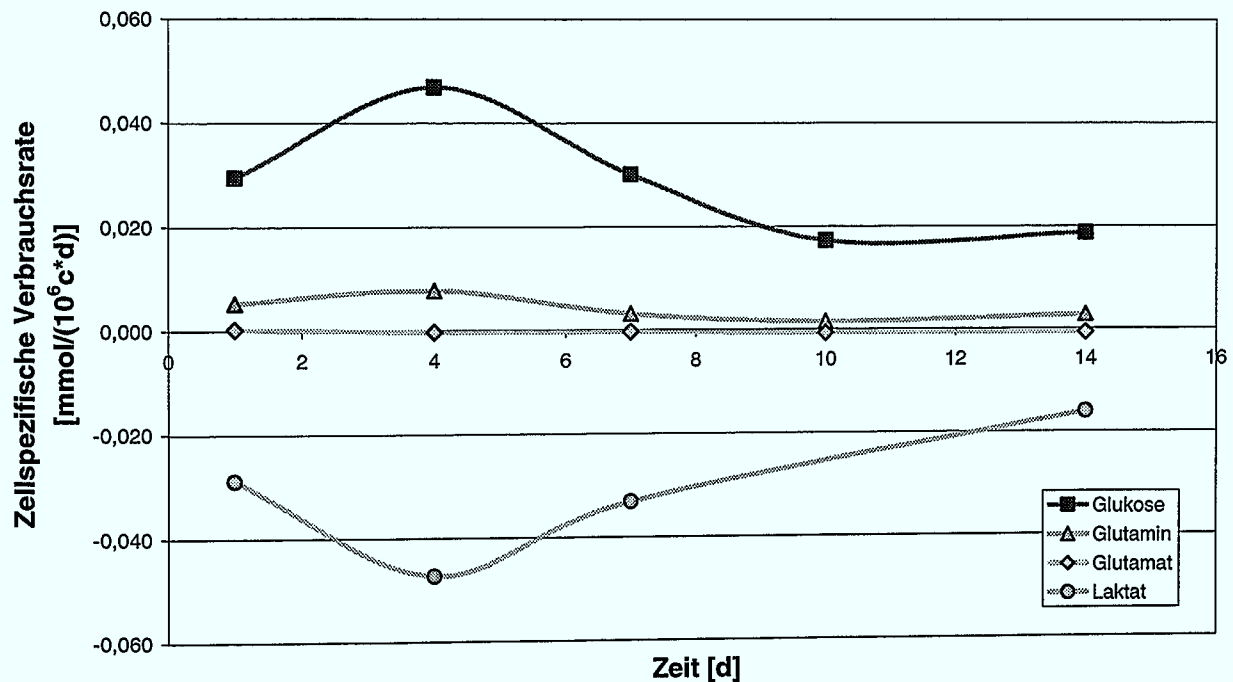


Abbildung 7-2: Verlauf der zellspezifischen Verbrauchsrate während der Kultivierung von bestrahlten SI/SI im Festbettreaktor (Reaktor A)

Sowohl für Reaktor A als auch für Reaktor B sind alle Aminosäuren in Konzentrationen von mindestens 60% des Ausgangsmediums nachgewiesen worden. Das bedeutet, dass für diese Medienkomponenten keine Limitierung während der Kultivierung aufgetreten ist.

Für beide Reaktoren sind bei den Proben von Tag 1, 7 und 14 die Zytokin-Konzentrationen von IL-3, SCF, FL und TPO bestimmt worden. FL und TPO konnten in keinem der Reaktoren nachgewiesen werden. IL-3 wurde nur in Reaktor B gemessen (0,644 ng/mL am Tag 7). Daraus ergibt sich eine zellspezifische Produktionsrate von 1,211 ng/(10⁶ c*d). Die SCF-Konzentrationen und die daraus berechneten zellspezifischen Produktionsraten sind in Tabelle 7-3 zusammengefasst. In Reaktor B wurden die beiden Zelllinien gleichzeitig kultiviert. Da M2-10B4 mod. kein humanes SCF produziert (Hogge et al., 1996; Kapitel 4.2.2.) ist die Produktion auf den Anteil der SI/SI im Reaktor zurückzuführen. Im Reaktor A konnte eine Steigerung der zellspezifischen Produktionsrate von Tag 1 bis Tag 7 beobachtet werden, die

aber am Ende der Kultur (Tag 14) deutlich reduziert war. Vermutlich ist dieses Verhalten, wie auch das Absinken der Substratverbrauchsraten, auf eine Reduktion des Stoffwechsels zurückzuführen. Im Reaktor B dagegen waren die zellspezifischen Produktionsraten konstant, aber im Vergleich zu Reaktor A sehr gering. Die im Reaktor A gemessene SCF-Produktion ist sehr gut mit den Werten einer Kultivierung der Zelllinie SI/SI in Gewebekulturplatten vergleichbar (Kapitel 4.2.2.). Für Reaktor A ist exemplarisch der Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes während einer Kultivierung im Festbettreaktor dargestellt (Abbildung 7-3).

Tabelle 7-3: Vergleich der SCF-Konzentration und Produktion während der Kultivierung bestrahlter stromaler Zelllinien im Festbettreaktor

Tag	Reaktor A		Reaktor B	
	SCF-Konzentration [ng/mL]	Zellspezifische Produktionsrate [ng/(10 ⁶ c·d)]	SCF-Konzentration [ng/mL]	Zellspezifische Produktionsrate [ng/(10 ⁶ c·d)]
1	0,674	4,9	0,137	0,515
7	1,530	6,3	0,305	0,573
14	0,090	1,0	Nicht bestimmt	Nicht bestimmt

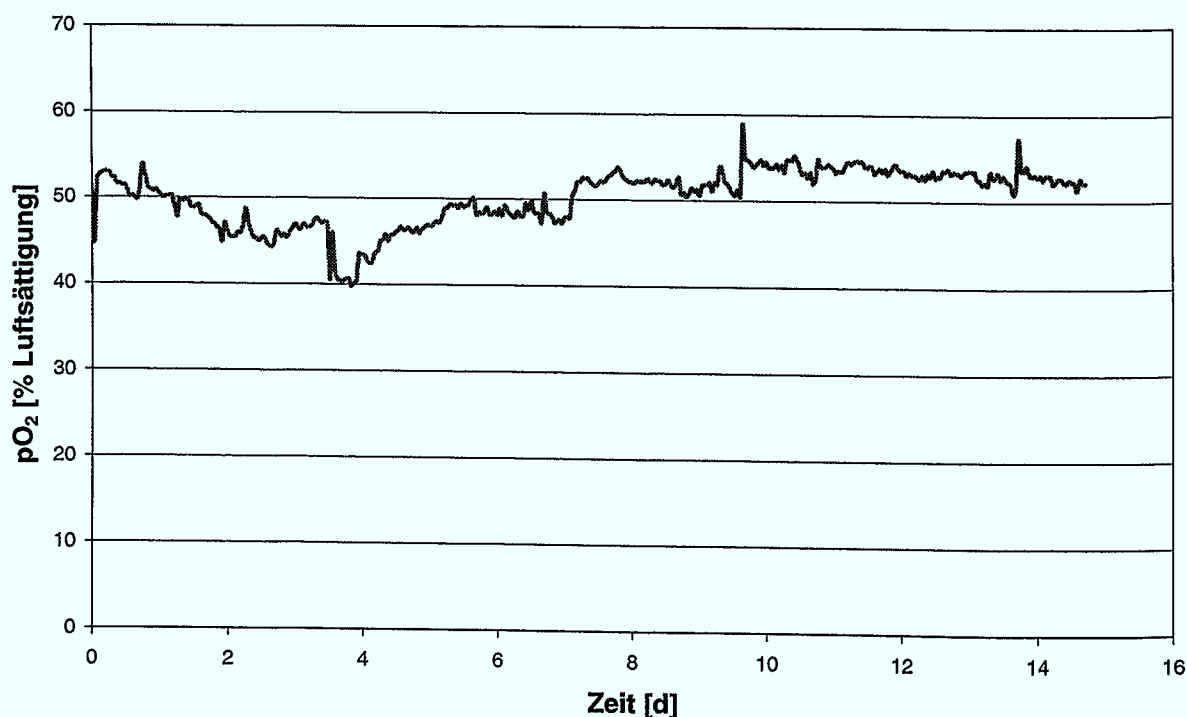


Abbildung 7-3: Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes im Festbettreaktor während einer Kultivierung der bestrahlten stromalen Zelllinie SI/SI (Reaktor A)

Die Regelung erfolgte auf einen Wert von 50% Luftsättigung, der über die gesamte Kulturdauer konstant gehalten wurde. Für die Berechnung von Sauerstoff-Verbrauchsraten

müsste die Differenz zwischen der Sauerstoff-Konzentration in der Gas- und in der Flüssigphase gebildet werden. Da jedoch über einen großen Zeitraum der Kultivierung der Messwert in der Flüssigkeit mit dem eingestellten Wert in der Gasphase identisch war, ist eine Berechnung dieser Rate nicht möglich. Der Umlaufvolumenstrom im Festbettreaktor wurde sehr hoch eingestellt (bis zu 1 L/h), damit sich keine starken Nährstoff- und Sauerstoff-Gradienten über dem Festbett aufbauen. Aufgrund dieses hohen Umlaufvolumenstroms liegen die Schwankungen des Sauerstoffpartialdruckes durch den Verbrauch der Zellen im Messrauschen der pO_2 -Sonde. Diese Beobachtung wurde bei allen Kultivierungen im Festbettreaktor gemacht.

7.2. Vergleich stromaler Zelllinien zur Kokultur im Festbettreaktor

Die stromalen Zelllinien M2-10B4, M2-10B4 mod. und SI/SI sind in verschiedenen Versuchen auf ihre Eignung zur Kokultur mit hämatopoietischen Zellen im Festbettreaktor untersucht worden. Dabei wurden die in Kapitel 6 optimierten Kulturparameter (Zelldichten, Fütterungsraten und Zellzahlverhältnis zwischen hämatopoietischen und stromalen Zellen) eingestellt. Die gezeigten Expansionsdaten beziehen sich auf die immobilisierten Zellen. Im Medium sind in den meisten Experimenten nur sehr wenig Zellen gefunden worden, weshalb die Darstellung akkumulierter Expansionswerte keine grundlegend andere Aussage bietet. Die Expansionsfaktoren beziehen sich auf die am Tag 1 auf den Trägern immobilisierten hämatopoietischen Zellen.

7.2.1. Vergleich verschiedener Zelllinien

In den ersten beiden Reaktoren wurde die Zelllinie M2-10B4 (Reaktor C) und eine Mischung aus M2-10B4 mod. und SI/SI (Reaktor D) für die Kokultivierung eingesetzt. Die genauen Versuchsparameter sind in Tabelle 7-4 zusammengefasst. Die stromalen Zellen sind 24 h vor den hämatopoietischen Zellen inokuliert worden. Der Tag, an dem die $CD34^+$ -Zellen inokuliert wurden, ist als Tag 0 definiert.

Der Verlauf der MNC-Expansion im Festbettreaktor C ist in Abbildung 7-4 dargestellt. Es zeigte sich, dass die hier eingesetzte Zelllinie M2-10B4 nicht zur Kokultur geeignet ist. Die Anzahl der MNC konnte zwar über den Zeitraum der Kultivierung erhalten werden, aber weder am Tag 7 noch am Tag 14 sind CFC oder CAFC nachgewiesen worden. Es kann ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf das Spendermaterial zurückzuführen ist, da die gleichen Zellen im Reaktor D gut vermehrt werden konnten. Eine Medienanalyse zeigte, dass die Glukose-Konzentration über den gesamten Kultivierungszeitraum konstant über 50% des

Ausgangsmediums lag. Eine Glukose-Limitierung ist demnach nicht für den negativen Effekt verantwortlich. Die Glutamin-Konzentration sank bis Tag 1 auf 35% des Ausgangsmediums und stieg dann durch die kontinuierliche Fütterung auf über 50% an.

Tabelle 7-4: Parameter der Kokultur hämatopoietischer Zellen mit verschiedenen stromalen Zelllinien im Festbettreaktor

	Reaktor C	Reaktor D
Zellen:	Stromale Zelllinie M2-10B4 (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 4 Spender	Stromale Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 4 Spender
Inokulum:	1·10 ⁷ Zellen Stroma 9,99·10 ⁵ CD34 ⁺ -Zellen	5·10 ⁶ Zellen je Zelllinie 9,99·10 ⁵ CD34 ⁺ -Zellen
Träger:	4,836 g	4,600 g
Medium:	LTC, PS, Standardzytokine	LTC, PS, Standardzytokine
Kulturdauer:	15 Tage für Stroma, 14 Tage für primäre Zellen	15 Tage für Stroma, 14 Tage für primäre Zellen
Medienzulauf:	Ab Tag 1	Ab Tag 1
Verweilzeit:	32 h	37 h

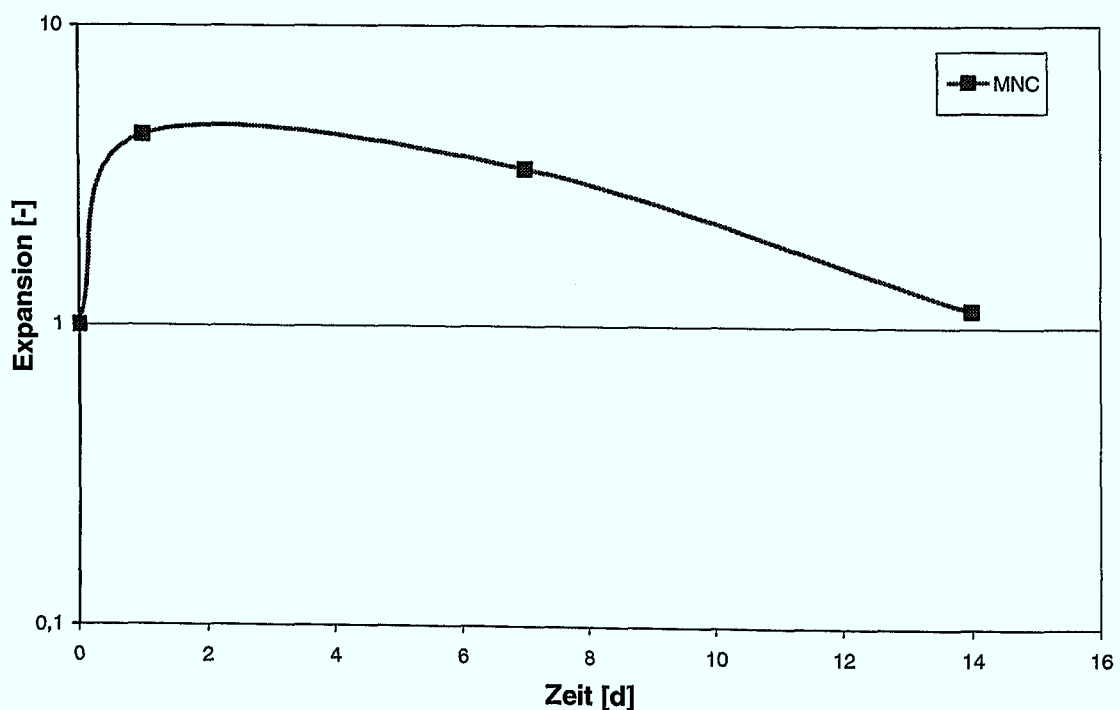


Abbildung 7-4: Kokultur hämatopoietischer Zellen mit der stromalen Zelllinie M2-10B4 im Festbettreaktor (Reaktor C)

Im Reaktor D sind die beiden modifizierten Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI als stromale Zellen eingesetzt worden. Die Expansion der MNC, CFC und CAFC in diesem Versuch ist in

Abbildung 7-5 dargestellt, wobei sich der Expansionsfaktor auf die am Tag 1 immobilisierten Zellen bezieht.

In diesem Versuch wurden 69,4% der stromalen und 89,6% der CD34⁺-Zellen immobilisiert. Während der Kultivierung sind sowohl die MNC als auch die CFC stark expandiert worden (Abbildung 7-5). Dabei ist zu erkennen, dass für die CFC die Expansion am Tag 7 noch deutlich über der von Tag 14 lag, was auf die zunehmende Ausdifferenzierung der Zellen zurückzuführen ist. So konnten 10,8% CFC am Tag 7 und nur noch 1,4% am Tag 14 nachgewiesen werden. Eine genauere Betrachtung der einzelnen Subpopulationen zeigt, dass von den koloniebildenden Zellen unter den gegebenen Bedingungen speziell die CFU-G/M vermehrt werden. Die erythroiden Vorläufer (BFU-E) waren nach zweiwöchiger Kultivierung nicht mehr detektierbar. Der Anteil der CAFC betrug nach 14 Tagen noch 49% des Ausgangswertes.

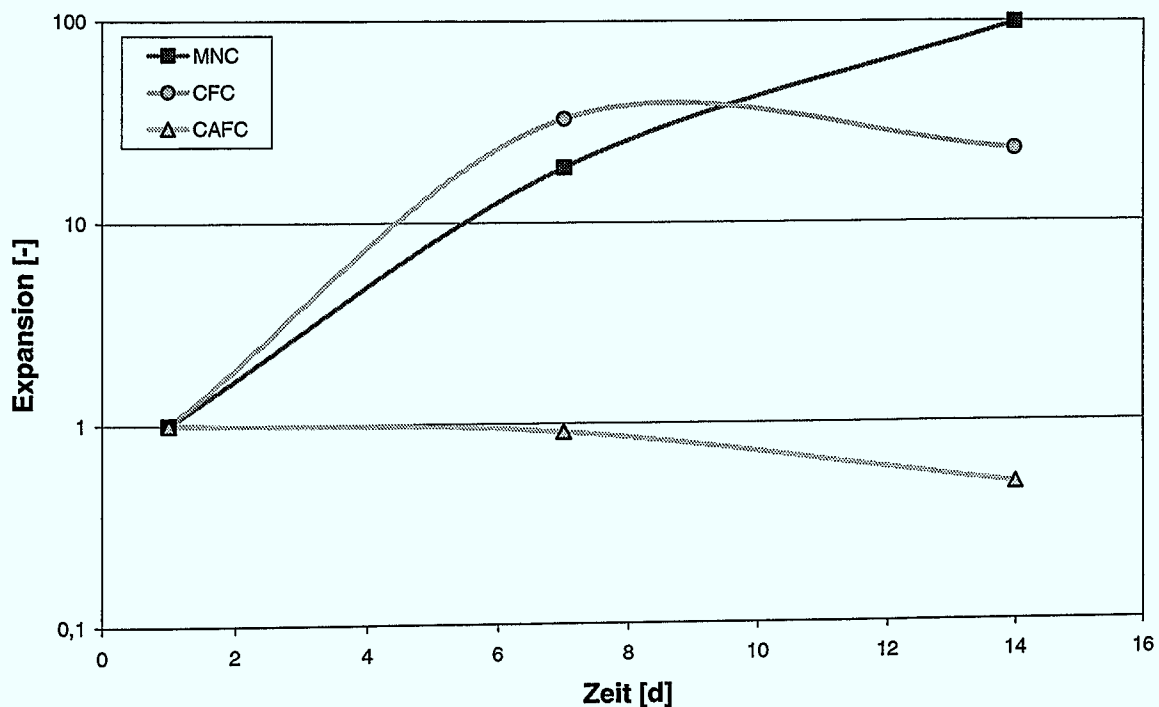


Abbildung 7-5: Kokultur hämatopoietischer Zellen mit den stromalen Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI im Festbettreaktor (Reaktor D)

Alle Medienkomponenten, die analysiert worden sind, wiesen während der gesamten Kultivierung Konzentrationen über 50% des Ausgangsmediums auf.

Die Analytik der Zytokine IL-3, SCF, FL und TPO ergab, dass besonders die TPO- und IL-3-Konzentrationen nach der anfangs ungefütterten Kultivierung stark reduziert waren. Der leichte Konzentrations-Anstieg von Tag 0 auf Tag 1 basiert darauf, dass die CD34⁺-Zellen am

Tag 0 in zytokinhaltigem Medium inokuliert worden sind. Die IL-3-Konzentration konnte durch die kontinuierliche Fütterung während der Kultivierung auf 30% des Ausgangswertes gehalten werden. TPO war dagegen nur zu maximal 6% des Mediums nachzuweisen. Die FL-Konzentration betrug 70-80% der zugefütterten Menge. SCF lag während der gefütterten Kultur konstant beim Ausgangswert. Die leicht erhöhte Wiederfindungsrate am Tag 14 ist durch die SCF-Produktion der stromalen Zellen zu erklären.

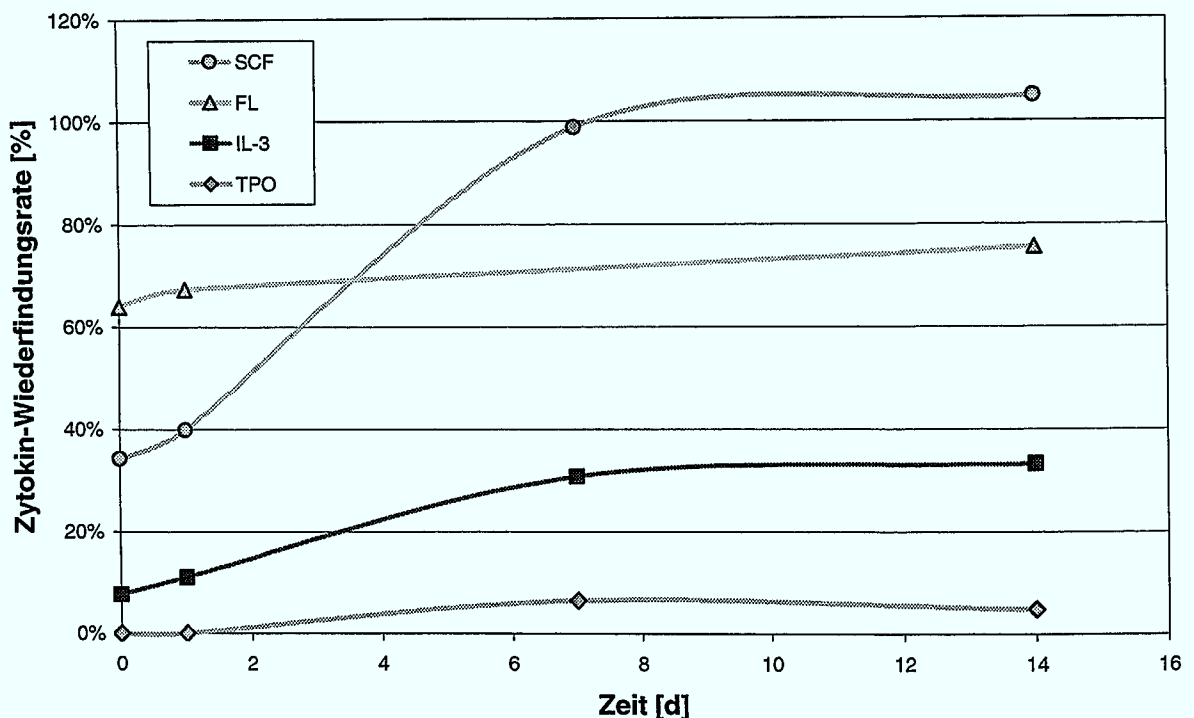


Abbildung 7-6: Verlauf der relativen Zytokinkonzentrationen während der Kokultur im Festbettreaktor (Reaktor D)

7.2.2. Vergleich verschiedener Zytokinkombinationen

In zwei weiteren Reaktorläufen wurde nur die Zelllinie SI/SI als stromale Komponente für die Kokultur eingesetzt. Da SI/SI modifiziert ist, IL-3 und SCF zu produzieren (Hogge et al., 1996), ist das Medium einer der beiden Reaktoren nicht mit diesen beiden Zytokinen supplementiert worden. Die Kulturparameter sind in Tabelle 7-5 zusammengefasst.

Die Abbildungen 7-8 und 7-9 stellen die Expansionsdaten der beiden Reaktoren dar. Im Reaktor E wurden sowohl die MNC als auch die CFC, CFU-G/M und CAFC expandiert. Die Analyse der Subpopulationen der koloniebildenden Zellen zeigt, dass vor allem die CFU-G/M unterstützt werden. Im Inokulum waren 26,3% CFU-G/M. Am Tag 1 betrug der Anteil dieser

Population auf den Trägern 11,6%. Dieser Wert blieb im Verlauf der Kultivierung konstant (10,7% (Tag 10), 12,3% (Tag 14)). Für diesen Zelltyp konnte demnach eine konstante Produktion erzielt werden. Der Anteil der BFU-E nimmt während der Kulturdauer von 11,6% (Tag 0) auf 0,1% (Tag 14) ab. Die Population der CAFC wird verdoppelt und bleibt auf diesem Wert bis Tag 14 erhalten. Dabei bleibt nicht nur deren Expansionsfaktor konstant, sondern auch der prozentuale Anteil (2,3% (Tag 10), 2,1% (Tag 14)).

Tabelle 7-5: Parameter der Kokultur hämatopoietischer Zellen mit der stromalen Zelllinie SI/SI im Festbettreaktor, Vergleich verschiedener Medien

	Reaktor E	Reaktor F
Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy)	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy)
	Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 4 Spender	Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 4 Spender
Inokulum:	1·10 ⁷ Zellen Stroma	1·10 ⁷ Zellen Stroma
	7,38·10 ⁵ CD34 ⁺ -Zellen	7,38·10 ⁵ CD34 ⁺ -Zellen
Träger:	4,662 g	5,751 g
Medium:	LTC, PS, Standardzytokine ohne IL-3 und SCF	LTC, PS, Standardzytokine
Kulturdauer:	15 Tage für Stroma, 14 Tage für primäre Zellen	15 Tage für Stroma, 14 Tage für primäre Zellen
Medienzulauf:	Ab Tag 1	Ab Tag 1
Verweilzeit:	35 h	35 h

Die Medienanalytik spiegelt den Verlauf der Prozessführung wieder. Am Tag 1, nachdem das System zwei Tage nicht gefüttert worden ist, war die Konzentration einiger Substrate auf 30% des Ausgangswertes reduziert (Glukose, Glutamin, Arginin, Asparagin). Durch die dann anschließende kontinuierliche Fütterung wurden die Glukose- und alle Aminosäuren-Konzentrationen konstant über 60% des Ausgangswertes gehalten. Eine Medienlimitierung dieser Komponenten ist daher ausgeschlossen. Die Laktat-Konzentration lag am Tag 1 bei 19,2 mmol/L, sank dann aber durch die Medienzudosierung auf 7 mmol/L ab.

Das Medium war in Reaktor E nicht mit IL-3 und SCF supplementiert, da diese Zytokine von SI/SI produziert werden sollten. Wie schon in vorher beschriebenen Versuchen (Kapitel 4.2.2., Kapitel 7.1.) konnte kein IL-3 nachgewiesen werden, wobei die Wert vermutlich unter der Nachweisgrenze lag. SCF konnte dagegen in Konzentrationen bis zu 1,7 ng/mL gemessen werden. Am Tag 10 war die SCF-Konzentration stark reduziert (0,2 ng/mL) und am Tag 14 nicht mehr detektierbar, was vermutlich auf die Degeneration des Stromas zurückzuführen ist (Kapitel 7.1.). Die FL-Konzentration wurde durch den kontinuierlichen Medienwechsel auf 100% des eingesetzten Wertes gehalten. TPO konnte am Tag 0 und 1 nicht nachgewiesen werden und erreichte während der Kultur nur maximal 25% der zugefütterten Menge.

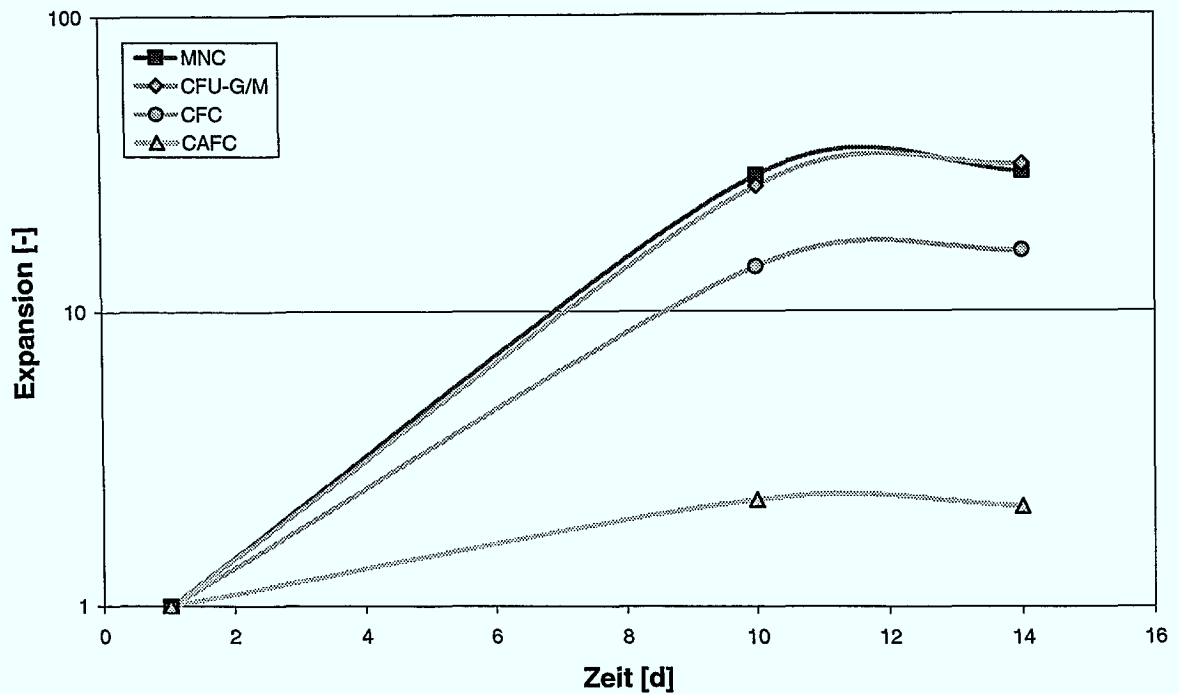


Abbildung 7-7: Kokultur hämatopoietischer Zellen mit der stromalen Zelllinie SI/SI im Festbettreaktor, Standardzytokine ohne IL-3 und SCF (Reaktor E)

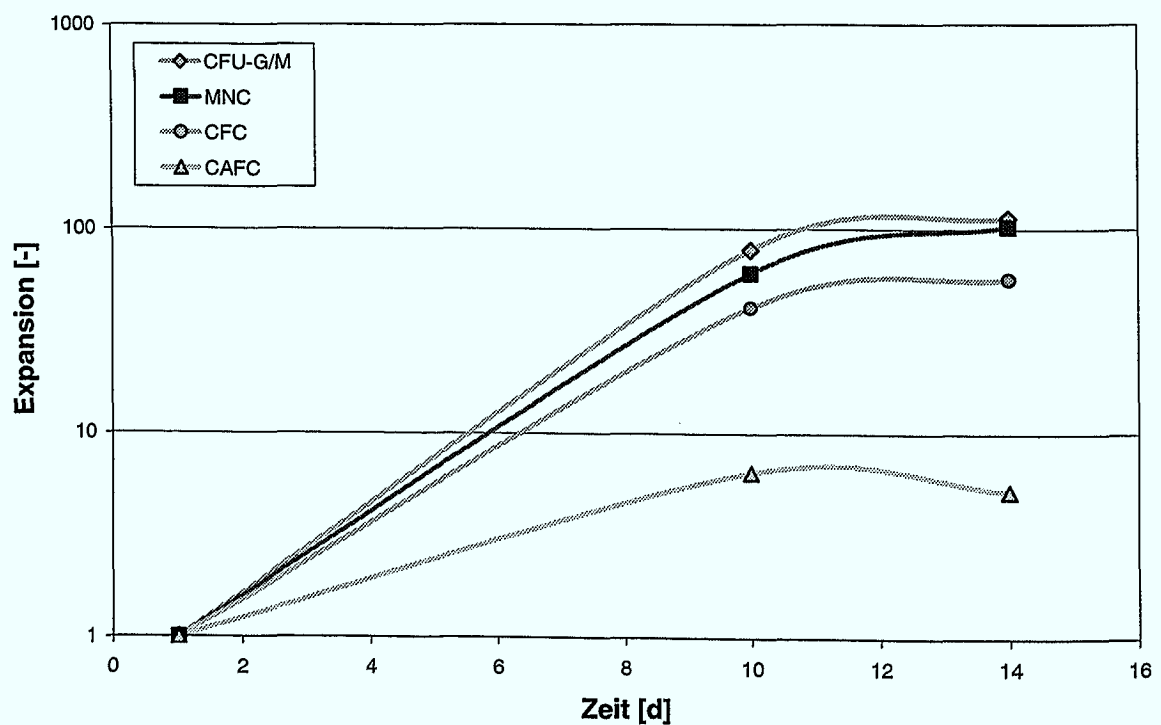


Abbildung 7-8: Kokultur hämatopoietischer Zellen mit der stromalen Zelllinie SI/SI im Festbettreaktor, Standardzytokine (Reaktor F)

Auch im Verlauf der Kultivierung im Reaktor F wurden alle Populationen expandiert, wobei die Expansionsfaktoren ca. dreifach höher waren als im Reaktor E (Abbildung 7-8). Wie

schon in Reaktor E beobachtet, wurden besonders die CFU-G/M vermehrt, wobei die Konzentration dieser Subpopulation von Tag 1 mit 12,3% sogar auf 16% am Tag 10 anstieg. Bis Tag 14 sank dieser Wert wieder auf 13,5%. Der Anteil der BFU-E dagegen fiel wie im Reaktor E sehr stark im Verlauf der Kultur (0,1% am Tag 14). Die Population der CAFC ist um den Faktor 6,4 am Tag 10 expandiert worden. Im Gegensatz zum Reaktor E war von Tag 10 bis Tag 14 eine Reduktion dieses Anteils von 3,06% auf 1,46% zu beobachten.

Die Medienanalytik ergab einen ähnlichen Verlauf der Konzentrationen der verschiedenen Substrate wie in Reaktor E. Eine Limitierung durch eine der untersuchten Komponenten ist demnach ausgeschlossen. Im Unterschied zu Reaktor E sind bei der Kultivierung im Reaktor F IL-3 und SCF supplementiert worden. SCF wurde wie FL durch die kontinuierliche Medienzufuhr konstant auf 100% der eingesetzten Konzentration eingestellt. Im Gegensatz dazu konnte IL-3 nur zu 23% im Medium während der Kultivierung nachgewiesen werden. Der Verlauf der TPO-Konzentration entsprach dem im Reaktor E.

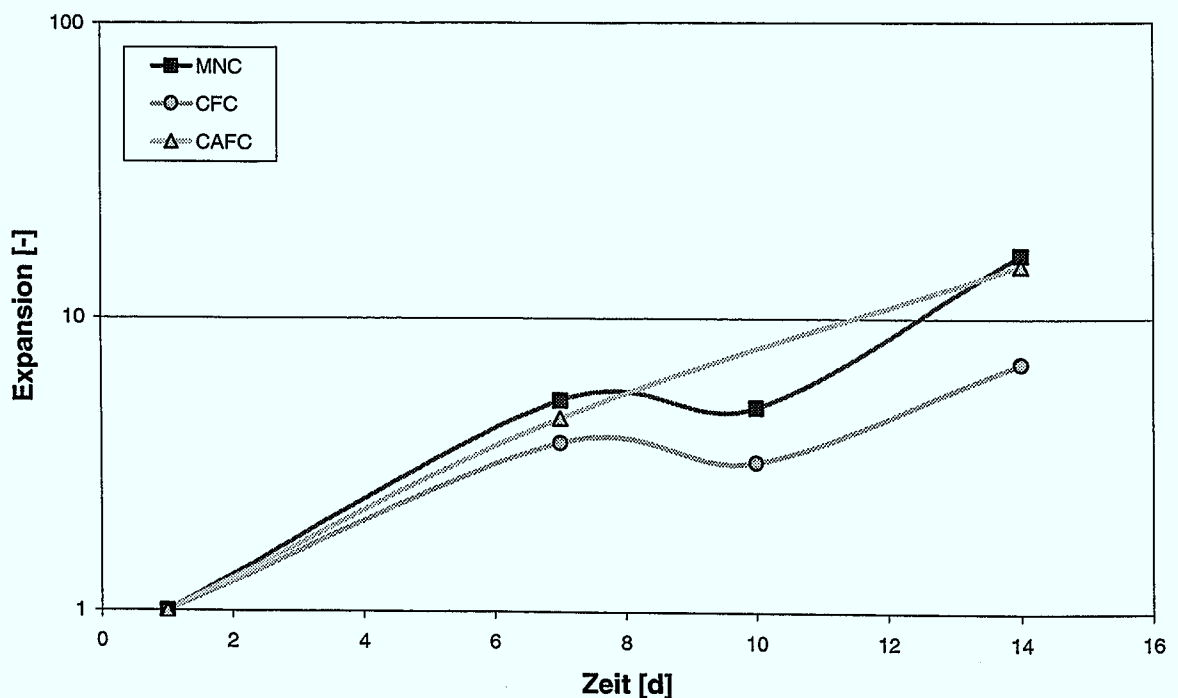
7.3. Einsatz von serumfreiem Medium im Festbettreaktor

Im Miniatur-Schlaufenreaktor ist nachgewiesen worden, dass eine serumfreie Kokultur hämatopoietischer Zellen im immobilisierten System möglich ist (Kapitel 6.1.5.). Dabei erwies sich eine serumhaltige Immobilisierung der stromalen und hämatopoietischen Zellen als vorteilhaft für die Expansion. Die Ergebnisse sollten nun im Produktionssystem, dem Festbettreaktor bestätigt werden. Dazu wurden parallel 2 Kultivierungen im Festbettreaktor durchgeführt, wobei die Immobilisierung der Zellen serumhaltig erfolgte. Die stromalen Zellen sind 24 h vor den hämatopoietischen inokuliert worden, wobei das Inokulum der CD34⁺-Zellen als Tag 0 definiert worden ist. Der eine Reaktor (G) wurde mit LTC-Medium betrieben, und im anderen (H) wurde durch die Medienzudosierung das serumhaltige Medium kontinuierlich durch serumfreies ausgetauscht. Beim Reaktor G war die Durchflussrate aufgrund einer defekten Pumpe wesentlich niedriger. Die Kulturparameter sind in Tabelle 7-6 zusammengefasst.

Die Expansion der verschiedenen Populationen im Verlauf der Kultivierungen ist für Reaktor G in Abbildung 7-9 und für Reaktor H in Abbildung 7-10 dargestellt. Ein Vergleich der beiden Reaktorläufe zeigt, dass kein wesentlicher Unterschied in der Expansion der verschiedenen Subpopulationen zu erkennen ist. Die MNC und die CFC sind sehr schwach expandiert, wohingegen die CAFC sehr stark vermehrt werden. Der Anteil der CAFC verlief über die Kulturdauer nahezu konstant (2,77% am Tag 0 und 2,54% am Tag 14).

Tabelle 7-6: Kulturparameter der Festbettreaktoren, Vergleich der Medien

	Reaktor G	Reaktor H
Zellen:	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 5 Spender	Stromale Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy) Primäre CD34 ⁺ -Zellen, 5 Spender
Inokulum:	1·10 ⁷ Stroma 1·10 ⁶ CD34 ⁺ -Zellen	1·10 ⁷ Stroma 1·10 ⁶ CD34 ⁺ -Zellen
Träger:	2,693 g	3,084 g
Medium:	LTC, PS Standardzytokine	LTC, PS, X-Vivo 10 Standardzytokine
Kulturdauer:	14 Tage	14 Tage
Probenahmen:	Tag 0, 1, 7, 10, 14	Tag 0, 1, 7, 10, 14
Medienzulauf:	Ab Tag 1 mit LTC, PS	Ab Tag 1 mit X-Vivo 10
Verweilzeit:	80 h	36 h

**Abbildung 7-9:** Kokultur hämatopoietischer Zellen mit der stromalen Zelllinie SI/SI im Festbettreaktor, LTC-Medium (Reaktor G)

Im Verlauf dieser beiden Fermentationen hat demnach nur eine sehr geringe Ausdifferenzierung stattgefunden, was einerseits durch die schwache Vermehrung der MNC und CFC und andererseits durch den Erhalt der CAFC-Konzentration bestätigt wird, woraus eine sehr gute Expansion dieser Population resultiert.

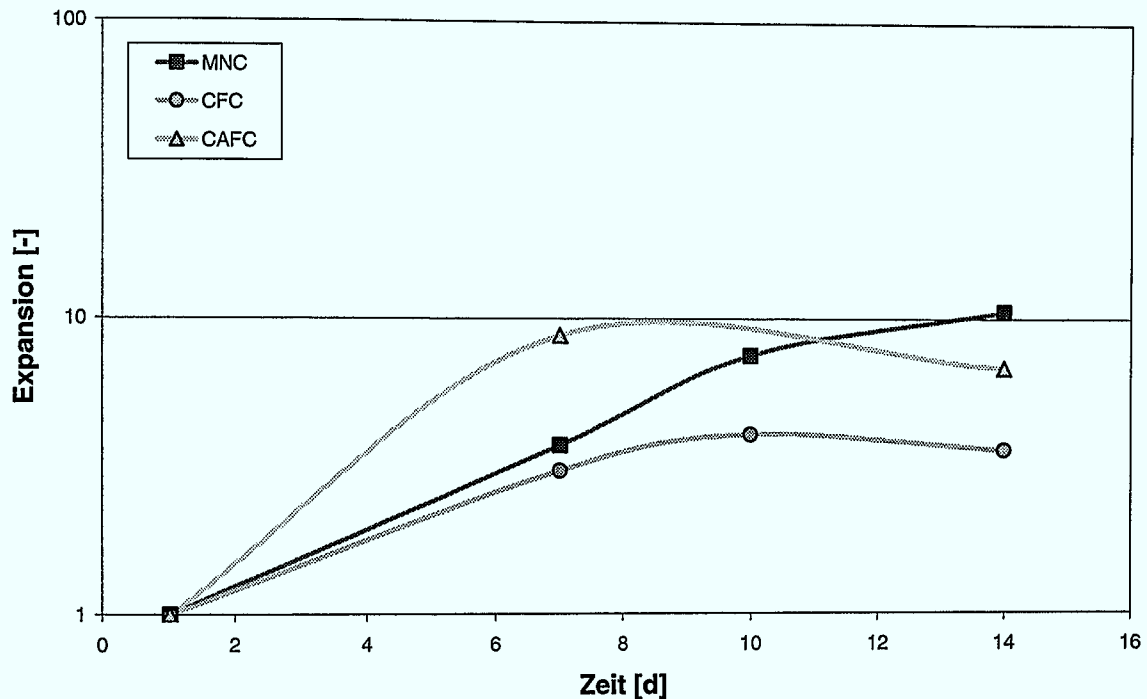


Abbildung 7-10: Kokultur hämatopoietischer Zellen mit der stromalen Zelllinie SL/SL im Festbettreaktor, X-Vivo 10 (Reaktor H)

Die Medienanalytik zeigt, dass alle analysierten niedermolekularen Medienbestandteile Konzentrationen von mindestens 40% des Ausgangsmediums aufwiesen, weshalb eine Substratlimitierung ausgeschlossen werden kann. Die Laktat-Konzentration betrug im Reaktor G maximal 14,7 mmol/L und in Reaktor H 11,1 mmol/L. Der Verlauf der Zytokin-Konzentrationen ähnelt dem der vorher beschriebenen Reaktorversuche. FL und SCF wurden in Reaktor G zu fast 100% nachgewiesen. Reaktor H zeigte im Gegensatz dazu eine deutlich reduzierte SCF-Konzentration (ca. 50%). Die Gründe für dieses Verhalten sind unbekannt. Die IL-3-Konzentration lag in beiden Reaktoren bei ca. 80% des eingesetzten Zytokins, und TPO wurde zu maximal 10% nachgewiesen.

7.4. Vergleich des Screening- und des Produktionssystems

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Screeningsystem Miniatur-Schlaufenreaktor auf das Produktionssystem Festbettreaktor ist in vielen Aspekten bestätigt. So konnten die Immobilisierungsraten, die in Kapitel 4.3. ermittelt worden sind, im Festbettreaktor reproduziert werden (Kapitel 7.2.). Weiterhin erwies sich die im Miniatur-Schlaufenreaktor etablierte Kokultur in serumfreiem Medium als auch für den Festbettreaktor geeignet.

Durch die Optimierung der Parameter für die Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor konnte eine Kulturstrategie entwickelt werden, die auch zur erfolgreichen Expansion der verschiedenen hämatopoietischen Subpopulationen im Festbettreaktor führte. Ein Beispiel für den Vergleich von Kulturdaten ist in Abbildung 7-11 aufgezeigt. Dabei wird die CAFC-Expansion unter vergleichbaren Kulturbedingungen im Miniatur-Schlaufenreaktor (Kapitel 6.2.) und im Festbettreaktor (Kapitel 7.2.2.) verglichen. Dabei ist zu erkennen, dass der Verlauf der CAFC-Expansion sehr ähnlich ist. Das bestätigt die Annahme, dass die Zellen in beiden Systemen das gleiche Expansionspotenzial aufweisen.

Auch die Fütterungsstrategie, die im Miniatur-Schlaufenreaktor als optimal ermittelt worden ist, erwies sich als gut geeignet im Festbettreaktor.

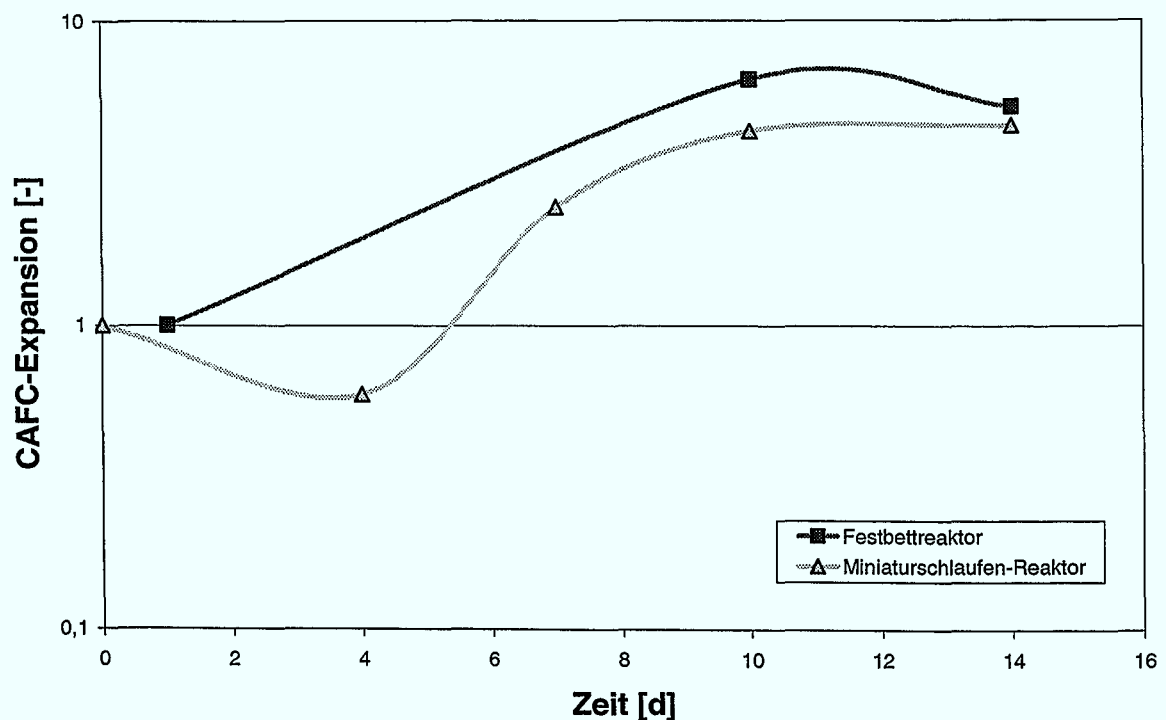


Abbildung 7-11: Vergleich der Expansion der CAFC im Festbett- und Miniaturschlaufenreaktor in zwei unabhängigen Versuchen und mit unterschiedlichem Spendermaterial

7.5. Bildliche Darstellung der Kokultur

Während verschiedener Kultivierungen im Festbettreaktor oder Miniatur-Schlaufenreaktor sind einige Trägerproben rasterelektronenmikroskopisch untersucht oder mit Neutralrot gefärbt und anschließend fotografiert worden. Diese Untersuchungen ermöglichen einen Einblick in die Strukturen, die sich während der *ex vivo* Kultivierung auf den Collagen-Trägern aufbauen.

In Abbildung 7-12 sind Übersichtsaufnahmen eines unbewachsenen und eines besiedelten Trägers dargestellt. Es ist gut zu erkennen, wie durch die stromalen Zellen eine Zell- und Proteinschicht über den Träger gezogen wird, wobei die dreidimensionale poröse Struktur des Collagen-Trägers erhalten bleibt. Die verhältnismäßig großen, ebenmäßigen Kugeln sind die Stahlpartikel, die der Beschwerung der Träger dienen.

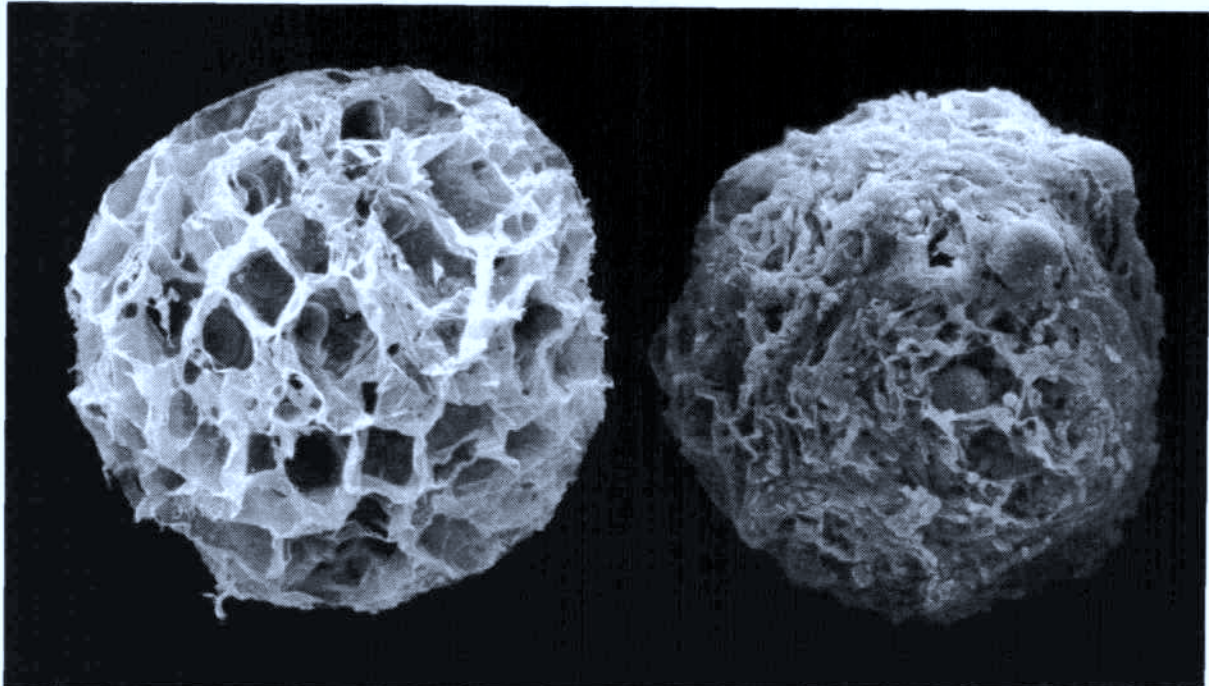


Abbildung 7-12: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines unbewachsenen und eines während der Kokultur im Miniatur-Schlaufenreaktor besiedelten Collagen-Trägers (Trägerdurchmesser: 0,6 mm)

In Abbildung 7-13 ist eine Detailaufnahme von immobilisierten Zellen auf den Trägern mit einer Fotografie aus dem Knochenmark verglichen. Die rechte Fotografie zeigt einen Ausschnitt der Kokultur auf einem Collagen-Träger. Auf den Trägern hat sich ein dichtes Netzwerk aus stromalen und hämatopoietischen Zellen aufgebaut, das den *in vivo* Verhältnissen sehr ähnlich ist. Es sind deutlich die langgezogenen stromalen Zellen zu sehen, die eine faserige Struktur, die extrazelluläre Matrix, gebildet haben. In dieser Zellschicht eingebettet liegen die hämatopoietischen Zellen, die an ihrer deutlich runderen Form zu erkennen sind. Der Querschnitt durch das Knochenmark zeigt im Detail blutbildendes Mark (Me) und einen Schnitt durch den Sinus, der durch den Bereich der glatten Endothelzellen gekennzeichnet ist. In dieser Aufnahme werden gerade reife Blutzellen (BC) in den Kreislauf abgegeben.

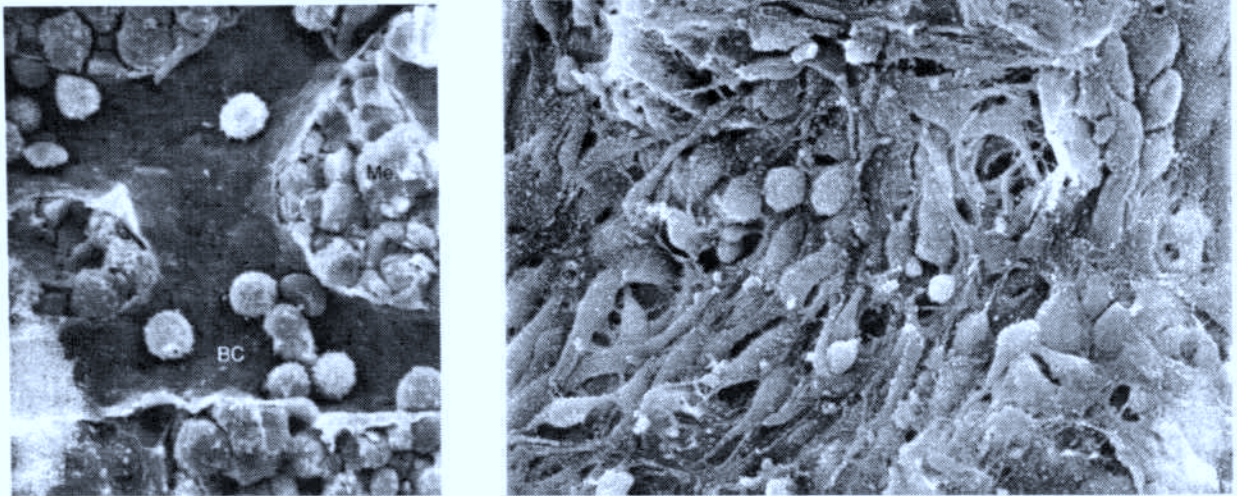


Abbildung 7-13: Detail der Kokultur im Knochenmark (*in vivo*, links) im Vergleich zu hämatopoietischen und stromalen Zellen *ex vivo* kultiviert auf Collagen-Trägern (rechts) (Me = blutbildendes Mark, BC = reife Blutzellen im Sinus)

Abbildung 7-14 zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer einzelnen Blutzelle mit einem Durchmesser von ca. 10 μm , die in der Matrix auf einem Collagen-Träger eingebettet ist.

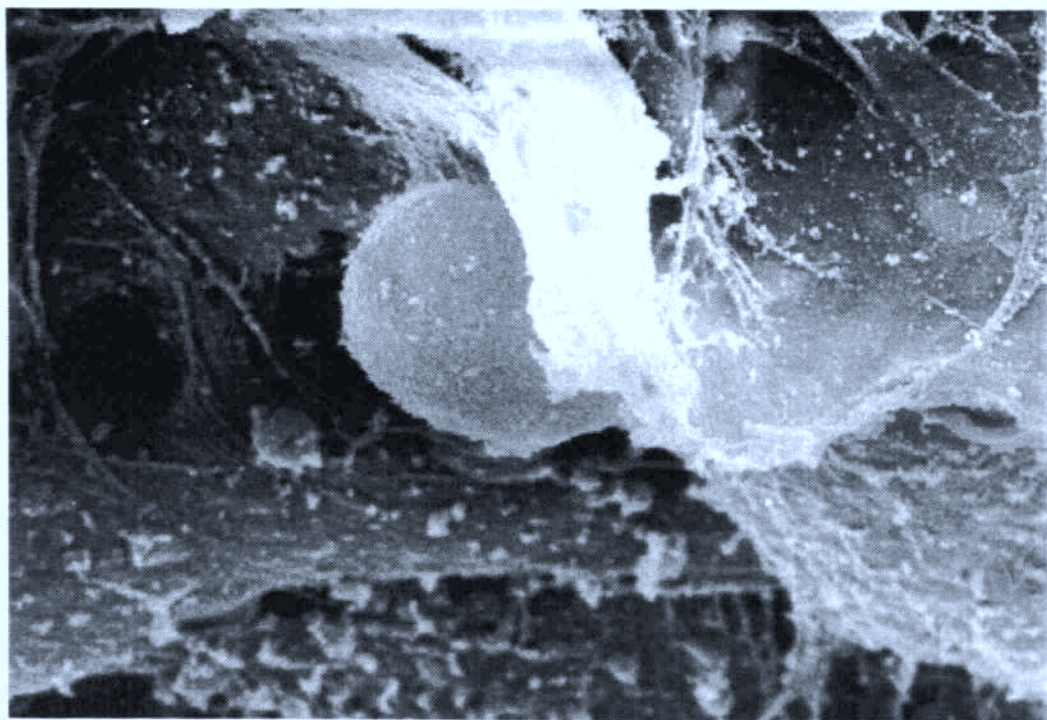


Abbildung 7-14: Detailaufnahme einer hämatopoietischen Zelle während der *ex vivo* Kokultur auf Collagen-Trägern (Zelldurchmesser: ca. 10 μm)

Eine andere Art der Darstellung ist in Abbildung 7-15 zu sehen. Besiedelte Collagen-Träger sind mit Neutralrot gefärbt worden, wobei nur lebende Zellen diesen Farbstoff aufnehmen. Es sind deutlich die einzelnen dunkelroten Zellen zu erkennen, die sich in die Poren der Träger eingeknistet haben. Die Proteine der Extrazellulärmatrix werden durch diese Methode nicht angefärbt. Die erkennbaren zellfreien Flächen sind vermutlich zumindest teilweise von der extrazellulären Matrix überzogen, was durch diese Darstellung nicht nachgewiesen werden kann. Die silbernglänzenden Kugeln sind die Stahlpartikel zur Beschwerung der Träger.

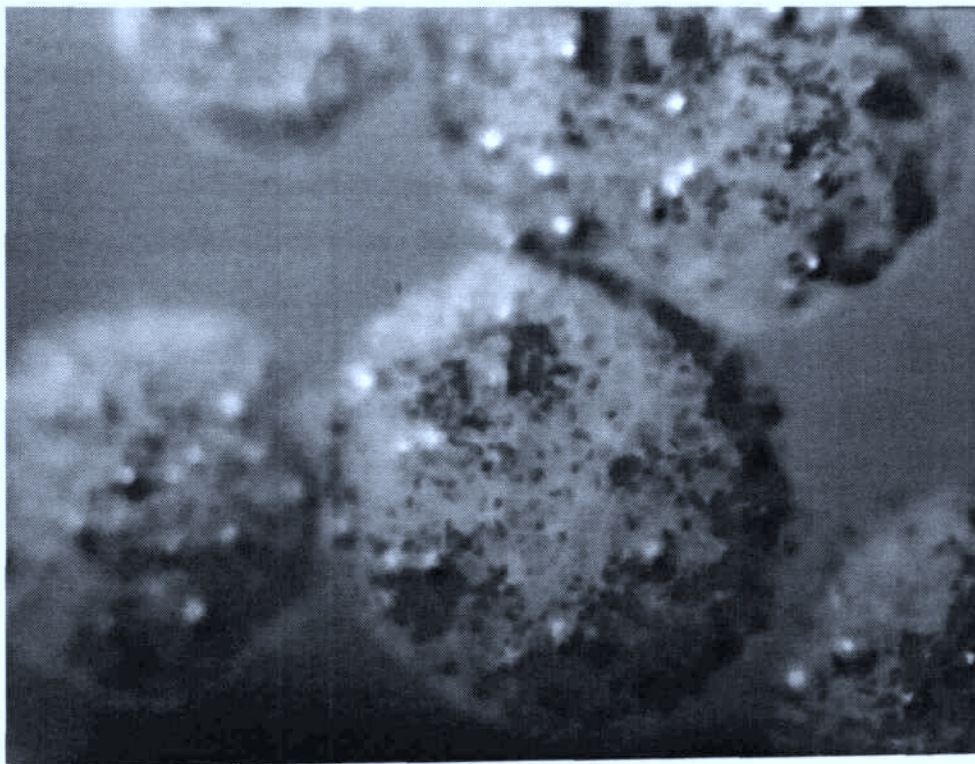


Abbildung 7-15: Besiedelte Collagen-Träger, angefärbt mit Neutralrot (Trägerdurchmesser: 0,6 mm)

7.6. Diskussion

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die stromale Zelllinie SI/SI nach einer Bestrahlung mit 80 Gy konstant über von 2 Wochen im Festbettreaktor erhalten wird. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu der Kultivierung in einer Gewebekulturplatte, wo bereits nach 7 Tagen eine deutliche Reduktion der Zellzahlen zu sehen ist (Kapitel 4.2.2.).

Es ist denkbar, dass durch die Kultivierung auf den Collagen-Trägern, die kontinuierliche Medienzufuhr und/oder durch den Scherstress die Bedingungen verändert wurden. Die Adhäsion am Collagen, einer natürlichen Unterlage, könnte die Zellen besonders stimuliert haben, da Art und Grad der Anheftung einen Einfluss auf die Zellen ausüben können (Koller

et al., 1995 a). So ist zum Beispiel für Chondrozyten beschrieben, dass sie durch die Art der Fibronectin-Unterlage eine unterschiedliche Morphologie aufweisen können (West et al., 1984). Auch für corneale Epithelzellen ist eine Veränderung durch die Wachstumsunterlage nachgewiesen worden (Koller et al., 1995 a). Dabei wurden neben morphologischen Veränderungen auch unterschiedliche Reaktionen auf Zytokine durch das Wachstum in einer Gewebekulturschale im Vergleich zu Collagen beobachtet.

Weiterhin werden durch die Perfusion eventuell inhibierende Faktoren oder durch Lyse von absterbenden Zellen freigesetzte Substanzen aus dem System ausgetragen. Der Scherstress im Festbettreaktor kann einen zusätzlichen Effekt auf die Zellen ausüben. Für Endothelzellen ist eine Stimulation des Arachidonsäure-Stoffwechsels (McIntire et al., 1987) und die Inhibierung der Fibronectinsynthese (Gupte und Frangos, 1990) durch Scherstress nachgewiesen worden. Die Zelllinie SI/SI reguliert während der Kultivierung im Festbettreaktor langsam ihren Stoffwechsel herunter, wie es für den Medienverbrauch und die Zytokinproduktion nachgewiesen wurde.

Die verschiedenen Versuche zur Kokultivierung stromaler und hämatopoietischer Zellen im Festbettreaktor sind in Tabelle 7-7 zusammengefasst. Die Bewertung der Expansionsdaten im Vergleich zu vorherigen Arbeiten und der Literatur erfolgt in Kapitel 8.

Tabelle 7-7: Zusammenfassung der Kokulturen im Festbettreaktor

Reaktor	Stroma (bestrahlt)	Zytokine	Maximale MNC Expansion	Maximale CFU-G/M Expansion	Maximale CAFC Expansion
C	M2-10B4	Standard in LTC	4	0	0
D	M2-10B4 mod. und SI/SI	Standard in LTC	99	47	0,91
E	SI/SI	Standard, in LTC ohne IL-3, SCF	29,5	31,2	2,3
F	SI/SI	Standard, in LTC	103	114	6,4
G	SI/SI	Standard, in LTC	16,3	7	15
H	SI/SI	Standard in LTC bzw. X-Vivo 10	10,5	4	8,7

Für alle Versuche im Festbettreaktor sowohl bei Stromakulturen als auch bei Kokultur mit hämatopoietischen Zellen, konnten die Kulturbedingungen sehr gut reguliert werden. So wurden die Konzentrationen der verschiedenen Substanzen (Substrate, Zytokine, Metabolite) nach der anfänglichen Batch-Betriebsweise durch die anschließende kontinuierliche Mediendosierung konstant gehalten. Dadurch konnten Substrat- und Zytokin-Limitierungen oder Inhibierungen z.B. durch zu hohe Laktat-Konzentrationen ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass das neu entwickelte und etablierte Screening-System für den Festbettreaktor, der Miniatur-Schlaufenreaktor, sehr gut für vorbereitende Untersuchungen eingesetzt werden kann und die Ergebnisse auf das Produktions-System übertragbar sind.

Der Vergleich der verschiedenen Stromazellen zeigt, dass die Kokultur nur mit der murinen Zelllinie Sl/Sl zu den besten Resultaten führte. Mit der murinen Zelllinie M2-10B4 konnte keine Expansion hämatopoietischer Zellen erzielt werden, obwohl von Sutherland et al. (1991) und Burroughs et al. (1994) beschrieben worden ist, dass eine dem primärem Stroma gleichwertige Unterstützung der LTC-IC und CFC aus humanem Knochenmark mit dieser Zelllinie erzielt werden kann. Es ist denkbar, dass durch die lange Kultivierung dieser Zelllinie genetische Veränderungen stattgefunden haben, die zu der wesentlichen Verschlechterung dieser Eigenschaft führten.

Der Vergleich der Reaktoren D und F zeigt, dass durch die Kokultur mit der Zelllinie M2-10B4 mod. zwar eine gleichwertige Expansion der MNC, aber eine um Faktor 2,4 reduzierte Vermehrung der CFC und sogar um Faktor 7 verminderte CAFC-Expansion erzielt wurde im Vergleich zu einer reinen Kultivierung mit Sl/Sl. Die Konzentration der supplementierten Zytokine in den beiden Reaktoren verlief ähnlich, weshalb der proliferative Unterschied vermutlich auf der G-CSF-Produktion der M2-10B4 mod. beruht (Hogge et al., 1996). G-CSF ist ein Zytokin, das besonders zur Ausdifferenzierung der Zellen zu Granulozyten führt (Metcalf, 1985). Weiterhin ist noch die Produktion von murinem SCF, M-CSF und IL-6 für M2-10B4 nachgewiesen (Deryugina und Müller-Sieburg, 1993), wobei diese Eigenschaften nicht durch die genetische Modifikation verändert sein sollten.

Die unmodifizierte Zelllinie Sl/Sl wurde ursprünglich aus immundefizienten Mäusen isoliert (Sutherland et al., 1993). Diese Tiere tragen eine Mutation im Steel-Locus (Sl), der für SCF kodiert, weshalb sie kein SCF produzieren können (Zsebo et al., 1990). Es zeigte sich, dass diese Zelllinie im Vergleich zu humanem Stroma die gleiche Unterstützung humaner hämatopoietischer Zellen bietet. Der Zusatz von humanem SCF zeigte keine synergistischen Effekte auf der Ebene der LTC-IC, aber im Gegensatz dazu auf die Expansion der CFC (Sutherland et al., 1993). In den hier gezeigten Versuchen konnte besonders die CAFC-Expansion durch den Einsatz der reinen Sl/Sl gesteigert werden, was im Vergleich der Reaktoren D und G deutlich zu erkennen ist. Diese Effekte sind auf die zusätzliche Supplementierung des Mediums mit Zytokinen zurückzuführen, da vor allem TPO und FL die CAFC bzw. LTC-IC Vermehrung unterstützen (Petzer et al., 1996; Borge et al., 1997).

Für eine andere stromale Zelllinie aus einer SI/SI Maus ist eine stark verschlechterte Adhäsion hämatopoietischer Zellen im Vergleich zu Zellen, die keinen Defekt im SI-Locus aufweisen, beobachtet worden (Anklersaria et al., 1991). Als Ursache für dieses Verhalten wurde eine verringerte Produktion von Hemonektin nachgewiesen, das als Komponente der Extrazellulärmatrix die Adhäsion von hämatopoietischen Zellen fördert. Das membranständige SCF ist auch an der Adhäsion beteiligt und/oder reguliert durch Bindung die Funktion der anheftenden Zellen (Kaneko et al., 1991; Pesce et al., 1997). In den SI/SI Zellen ist das murine, membranständige SCF ebenfalls nicht exprimiert, was zu einer Verschlechterung der Adhäsion und Stimulation führen könnte. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie ist aber die vollständige Sequenz des humanen SCF kloniert worden (Hogge et al., 1996), weshalb wie in humanen Fibroblasten durch alternatives Splicen der RNA sowohl lösliches als auch transmembranes SCF zu erwarten ist (Broudy, 1997).

Die vergleichende Kultivierung der hämatopoietischen Zellen mit der Zelllinie SI/SI ohne die Zytokine IL-3 und SCF (Reaktor E und F) führte zu einer verminderten Expansion aller Subpopulationen. Dabei wurden durch die Zytokinsupplementierung 3,5fach mehr MNC und CFC gebildet, während die CAFC nur 2,8fach höher expandiert wurden. Die Kultivierung der stromalen Zelllinie SI/SI im Festbettreaktor zeigte, dass kein IL-3 und eine SCF-Konzentration von maximal 1,53 ng/mL nachgewiesen werden konnten (Kapitel 7.1.). Die geringe SCF- und die fehlende IL-3-Produktion der stromalen Zellen ist vermutlich für die unterschiedliche Expansion der hämatopoietischen Zellen verantwortlich.

Die Expansionsdaten der Reaktoren F und G sind, obwohl nahezu identische Kulturbedingungen vorlagen, sehr unterschiedlich, was vermutlich auf Spendervariabilität basiert. Der Anteil der CAFC im Reaktor F betrug 29,1% im Inokulum und beim Reaktor G nur 2,8%. Die Konzentration dieser Zellpopulation am Ende der Kultivierung war allerdings fast identisch (2,31% Reaktor F und 2,54% Reaktor G). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass im Festbettreaktor unter den gegebenen Bedingungen ein Mikromilieu aufgebaut wurde, das unter verschiedenen Voraussetzungen zu einem ähnlichen Gleichgewicht der verschiedenen hämatopoietischen Zellpopulationen führte.

Der Einsatz von serumfreiem Medium nach Immobilisierung mit Serum erwies sich als möglich, wobei ein schnellerer Medienaustausch die positiven Effekte des serumfreien Mediums verstärken würde. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch wurde die Serumkonzentration langsam reduziert, wodurch die Zellen vermutlich schon sehr stark durch die Serumkomponenten beeinflusst worden waren.

8. Schlussfolgerungen

8.1. Entwicklung der Kokultur im Festbettreaktor

Am Ausgangspunkt dieser Arbeit stand ein Kultursystem, der Festbettreaktor, dessen Konstruktion als Ableitung vom Wirbelschichtreaktor den Erfordernissen der Kultivierung hämatopoietischer Zellen nicht ideal angepasst war (Schröder, 1997). Durch die Weiterentwicklung dieses Festbettreaktors stand ein optimales System für die Kokultivierung hämatopoietischer und stromaler Zellen zur Verfügung. Mit der Entwicklung des Miniatur-Schlaufenreaktors (Schmidt, 2000) und seiner Etablierung im Verlauf dieser Arbeit konnte erstmals auch ein Screeningsystem für auf Trägern immobilisierte Zellen eingesetzt werden.

In Abbildung 8-1 sind die jeweils besten Produktionsdaten für MNC verglichen, die mit dem alten und dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten neuen Festbettreaktor erzielt werden konnten. Durch die konsequente Weiterentwicklung der Kulturbedingungen wurde die Kokultur so optimiert, dass ausgehend von einem kontinuierlichen Verlust der immobilisierten Zellen auf den Trägern (Schröder, 1997) eine über 100fache Expansion dieser Population erzielt werden konnte. Die von Schröder beschriebene Zell-Vermehrung basiert auf Akkumulation der immobilisierten und im Medium befindlichen und so durch die kontinuierliche Perfusion ausgespülten Zellen.

Die Unterschiede in den Kulturbedingungen gegenüber den Arbeiten von Schröder sind sehr vielseitig und sowohl auf technischen als auch biologischen Veränderungen begründet, von denen die wichtigsten in Tabelle 8-1 zusammengefasst sind.

Tabelle 8-1: Vergleich der Kulturbedingungen im Festbettreaktor

Parameter	Schröder, 1997	Vorliegende Arbeit
Hämatopoietische Zellen	MNC aus KM und PB	CD34 ⁺ -Zellen aus CB
Stroma	Primäres Stroma, humane Zelllinien L87-4 und L88-5	Murine Zelllinien M2-10B4 mod. und SI/SI
Zytokine	IL-3, SCF, IL-6, G-CSF	IL-3, SCF, FL und TPO
Trägermaterial	Siran-Träger	Collagen-Träger

Vor allem die Optimierung der biologischen Komponenten, wie den stromalen Zellen und den Zytokinen, sind für die stark verbesserte Expansion verantwortlich. So ist z.B. der Einsatz der Zytokine TPO und FL für die Kultivierung hämatopoietischer Zellen noch nicht sehr lange etabliert (Petzer et al., 1996; Ohmizono et al., 1997; Ramsfjell et al., 1997).

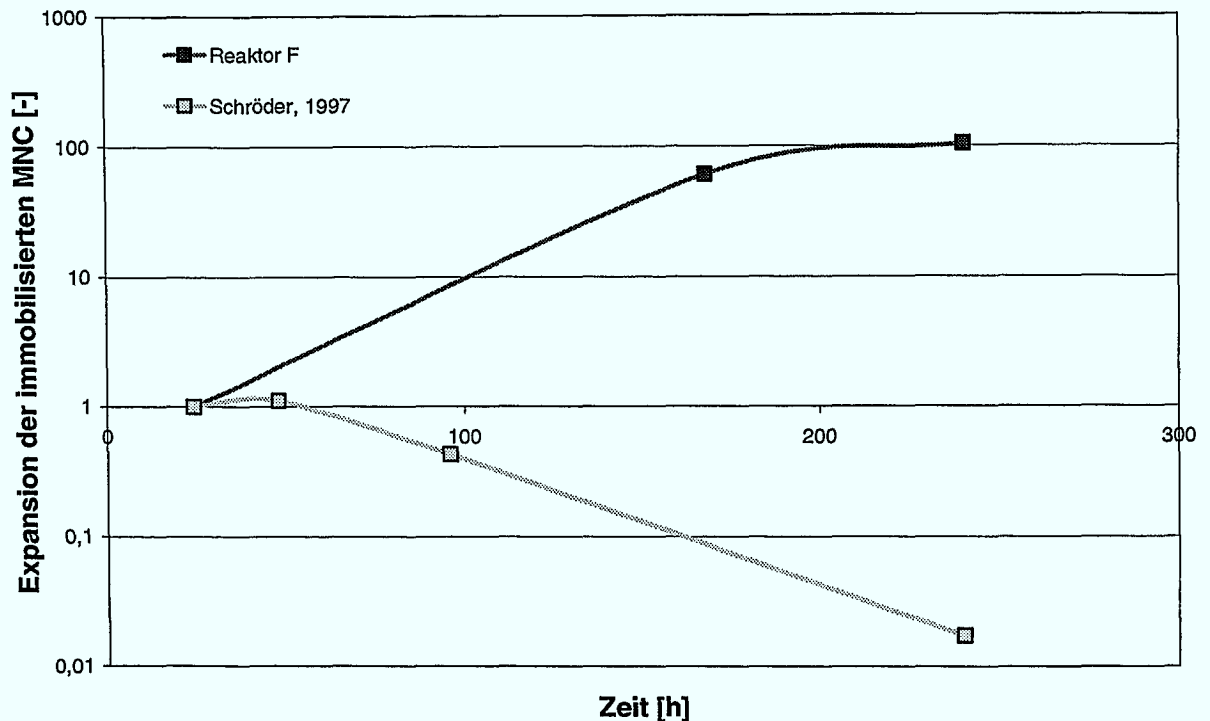


Abbildung 8-1: Vergleich der Kultivierung im Festbettreaktor (Kapitel 7.2.2. und Schröder, 1997)

8.2. Vergleich der Kokultur im Festbettreaktor mit anderen Systemen

Ein Vergleich der hier erzielten Ergebnisse mit Daten aus der Literatur erweist sich als sehr schwierig, da von verschiedenen Arbeitsgruppen die unterschiedlichsten Rahmenbedingungen für die Kultur hämatopoietischer Zellen gewählt wurden. In Tabelle 8-2 sind die Kulturbedingungen einiger Referenzen für eine stromhaltige Kultivierung zusammengestellt. Um dennoch eine Bewertung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu ermöglichen, wurden sie mit den Expansionsdaten der in Tabelle 8-2 beschriebenen Referenzen verglichen (Abbildung 8-2). Sowohl die im Festbettreaktor als auch die im Miniatur-Schlaufenreaktor erzielten Expansionsdaten der CFC bzw. CFU-G/M und der CAFC sind zumindest gleichwertig mit Ergebnissen aus der Literatur und vielfach sogar besser. Die Expansion der CFU-G/M in Reaktor F war besonders hoch.

Neben der Vermehrung der CFC und CAFC ist es darüber hinaus gelungen, im Miniatur-Schlaufenreaktor SCID-Maus repopulierende Zellen (SRC) (Kapitel 6.3.) zu erhalten. Dadurch ist im Rahmen der heutigen Detektionsmöglichkeiten für hämatopoietische Stammzellen die Eignung der Kulturbedingungen für den Erhalt dieser Population nachgewiesen (Kapitel 2.1.3.). Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die parallel zum

Miniatur-Schlaufenreaktor stromafrei im Kultur-Beutel kultiviert worden sind, keine SRC mehr enthielten. In anderen Arbeiten konnten aber nach einer Kultivierung im Kultur-Beutel, einem etablierten Suspensionssystem, noch SRC detektiert werden (Schmidt, 2000). In Bezug auf die in dieser Arbeit ermittelten Daten lässt das die Schlussfolgerung zu, dass die stromahaltige, immobilisierte Kultivierung hämatopoietischer Zellen im Miniatur-Schlaufenreaktor bzw. Festbettreaktor besonders die Unterstützung der Stamm- und frühen Vorläuferzellen gewährleistet.

Tabelle 8-2: Übersicht der Kulturparameter der vergleichenden Literatur

Referenz	Koller et al., 1993 b	Bachier et al., 1999	Breems et al., 1998	Kawada et al., 1999
Kultursystem	Flachbett- reaktor	Flachbett- reaktor	Gewebekulturschale	Transwell
Hämatopoietische Zellen	MNC aus KM	MNC aus KM	CD34 ⁺ -Zellen aus PB	CD34 ⁺ -Zellen aus CB
Stroma	primäres humanes Stroma	primäres humanes Stroma	murine Zelllinie FBMD-1	murine Zelllinie HESS-5
Zytokine	IL-3, GM-CSF, EPO, SCF	EPO, FL, PIXY 321	IL-3, SCF, FL, TPO, IL-6, anti TGFβ	TPO, FL

Bei dem Vergleich mit den Literaturdaten ist anzumerken, dass die schlechtesten Expansionsdaten (Bachier et al., 1999), aus einem klinischen Versuch stammen. Das einzige kontrollierte Kultursystem, in dem annähernd Expansionsdaten wie im Festbettreaktor und Miniatur-Schlaufenreaktor erzielt worden sind, ist der Flachbettreaktor. In anderen Kultursystemen fand eine wesentlich schlechtere Expansion der hämatopoietischen Zellen statt (z.B. Wu und Wang, 1992; Sardonini und Wu, 1993).

Die beste Vermehrung der frühen Population der LTC-IC wurde ebenfalls mit einer murinen Zelllinie, HESS-5, erreicht (Kawada et al., 1999), wobei dieser Wert nur um Faktor 1,4 höher ist, als das Beste in dieser Arbeit erzielte Ergebnis. Dabei wurde ein als „Transwell“ bezeichnetes Kultursystem eingesetzt, das auf der Verwendung von Gewebekulturplatten basiert. In die Vertiefungen einer solchen Platte werden spezielle, kommerziell erhältliche Einsätze platziert, die durch eine poröse Membran die hämatopoietischen von den stromalen Zellen physikalisch trennen. Diese Membran wird von beiden Seiten besiedelt, sodass durch die Poren ein direkter Kontakt zwischen den Zellen möglich ist. Dieses Kulturprinzip ist allerdings nur im kleinen Maßstab verwirklicht, sodass ein Produktionssystem für die klinische Anwendung nicht zur Verfügung steht.

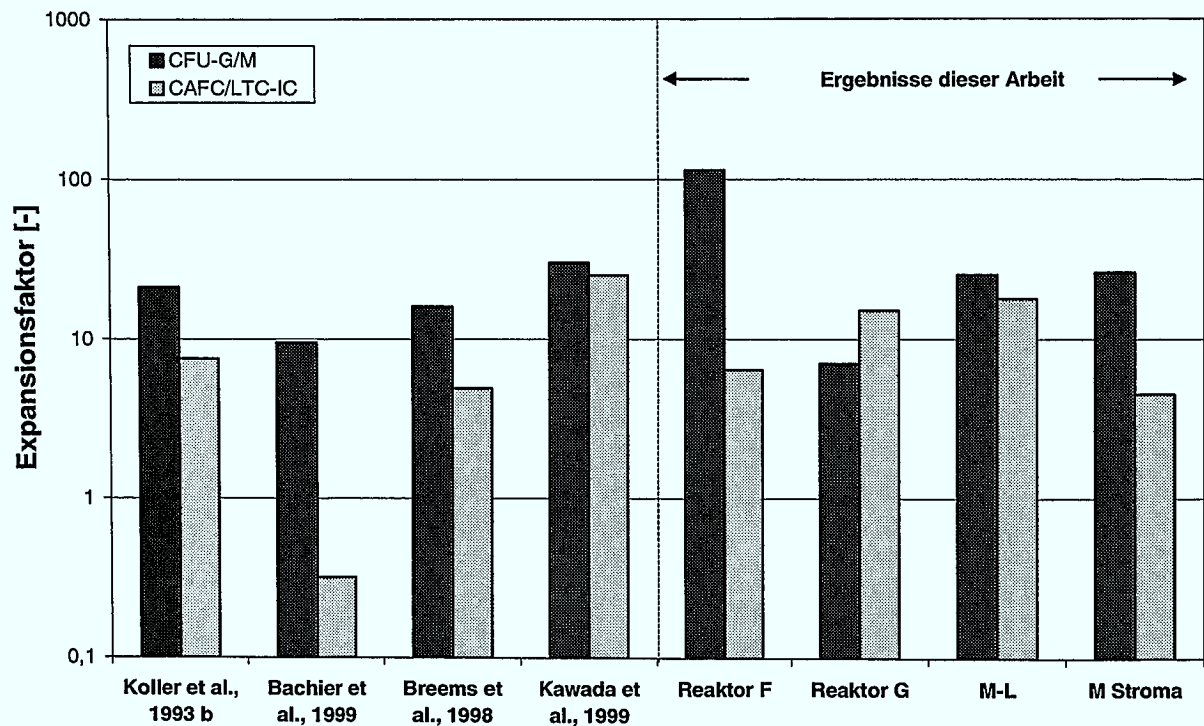


Abbildung 8-2: Vergleich der maximalen Expansion von CFU-G/M und LTC-IC/CAFC mit Literaturdaten (M Stroma: Kapitel 6.2., M-L: Kapitel 6.3., Reaktor F: Kapitel 7.2.2., Reaktor G: Kapitel 7.3.)

8.3. Klinische Relevanz der Kokultur im Festbettreaktor

Der Hintergrund der Entwicklung und Optimierung der Kultivierung hämatopoietischer Zellen ist die klinische Anwendung z.B. eine Stammzell-Transplantation. Besonders für die Verwendung von Nabelschnurblut bei einer Transplantation von erwachsenen Patienten ist eine *ex vivo* Expansion der Zellen erforderlich (Kapitel 2.3.2.). In Abbildung 8-3 ist dargestellt, in welchem Ausmaß die Zellen einer Nabelschnurblutspende expandiert werden müssen, um einen Patienten mit 70 kg Körpergewicht transplantieren zu können. Dabei wurde ein Expansionsfaktor der CFU-G/M von 65 ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Festbettreaktor sogar eine Expansion dieser Population von Faktor 114 erzielt werden. Die MNC wurden sogar über 30 mal mehr vermehrt als erforderlich, aber die Vorläuferzellen bestimmen die Qualität des Transplantats.

Bei einer Stammzell-Transplantation mit expandierten Zellen wird vielfach nur ein Teil der Zellen expandiert und zusammen mit unmanipulierten Zellen dem Patienten injiziert (Kapitel 2.3.1.). De Felice und Mitarbeiter (1999) konnten nachweisen, dass nach einer 8tägigen

Kultivierung hämatopoietischer Zellen aus Nabelschnurblut noch mehr als 6% der CD34⁺-Zellen nicht im Zellzyklus waren. Diese ruhenden Zellen sind vermutlich Stammzellen (Kapitel 2.1.1.), die auch durch Stimulierung mit Zytokinen nicht modifiziert worden sind. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass auch in einer *ex vivo* Kultur, bei der sowohl LTC-IC als auch CFU-GM expandiert werden, ein Pool von Stammzellen erhalten bleiben kann. Bezogen auf die klinische Anwendung der Stammzell-Transplantation bedeutet das, dass die *ex vivo* Expansion hämatopoietischer Stammzellen eine wichtige Methode werden kann, um die Menge und Qualität eines Transplantates zu verbessern.

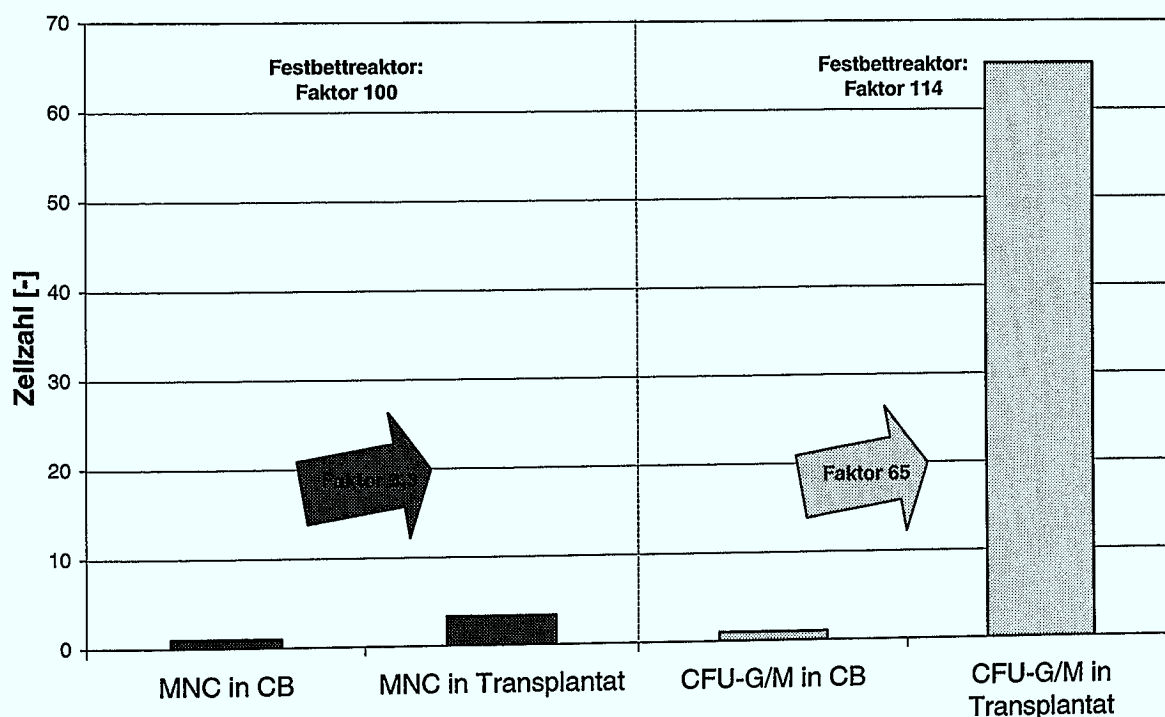


Abbildung 8-3: Vergleich der standardisierten Zellzahl aus einer Nabelschnurblutspende und eines erforderlichen Transplantats (bezogen auf einen Patienten mit 70 kg Körpergewicht, Zellzahl in einer Nabelschnurblutspende ca. $1,4 \cdot 10^9$ MNC und $5,8 \cdot 10^5$ CFU-GM)

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass durch die Kultivierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen im Festbettreaktor Expansionsdaten erzielt werden können, die einem medizinischen Maßstab entsprechen. Damit ist die klinische Relevanz des Kultursystems und der optimierten Kulturbedingungen nachgewiesen.

9. Ausblick

Das Expansionspotenzial des Festbettektors unter den optimierten Kulturbedingungen entspricht den Anforderungen, die eine klinische Anwendung an ein solches System stellt (Kapitel 8.3.). Eine direkte Übertragung dieses Kultursystems auf die Klinik ist allerdings unter mehreren Aspekten kritisch zu beurteilen.

Ein wesentlicher Parameter ist dabei die Verwendung muriner Zelllinien, die für eine klinische Studie vermutlich nicht zugelassen werden würden. Nach der in dieser Arbeit entwickelten Methode liegt nach der Zellernte eine Mischpopulation von hämatopoietischen und stromalen Zellen vor, wobei das Stroma durch die Bestrahlung nicht mehr wachstumsfähig sein sollte. Weitere Ansätze zur Lösung dieses Problems liegen einerseits in der Entwicklung humaner Zelllinien, die im klinischen Einsatz weniger bedenklich sind oder andererseits in einer Abtrennung des Stromas. Eine Aufreinigung der hämatopoietischen Zellen im Anschluss an eine Kultivierung, z.B. über den Leukozytenmarker CD45, wäre technisch leicht zu realisieren.

Eine weitergehende Überlegung wäre die Modifikation der Zellernte. Das Prinzip des Festbettektors ist die Simulation des menschlichen Knochenmarks. Die Stammzellen im menschlichen Organismus können z.B. durch die Gabe von spezifischen Zytokinen veranlasst werden, aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf einzuwandern (Kapitel 2.3.2.). Wenn *ex vivo* die Nachahmung eines funktionellen hämatopoietischen Systems im knochenmarksähnlichen Milieu gelingt, sollte eine logische Folgerung sein, auch diesen Mechanismus der Mobilisierung simulieren zu können. Das Produkt einer solchen Zellernte wären demnach Stamm- und Vorläuferzellen ohne stromale „Kontamination“.

Die Kultivierung im Festbettektor ist von der Immobilisierung hämatopoietischer Zellen auf Mikroträgern abhängig. In dieser Arbeit sind unmodifizierte Collagen-Träger eingesetzt worden. Durch ihr Material weisen sie eine Parallele zum natürlichen Umfeld der Hämatopoiese auf, da Collagen ein wichtiger Bestandteil der stromalen Extrazellulärmatrix ist. Dieser Ansatz kann zur Verbesserung der Immobilisierung und zum optimierten Aufbau der spezifischen Stammzellnischen weitergedacht werden. Dabei könnten die Träger so modifiziert werden, dass weitere Komponenten der Extrazellulärmatrix wie Fibronektin oder Glykosaminoglycane am Aufbau der dreidimensionalen Struktur beteiligt sind. Eine zusätzliche Immobilisierung von Zytokinen oder Adhäsionsmolekülen auf den Trägern könnte ebenfalls zu einer Optimierung der Simulation der *in vivo* Bedingungen beitragen. Unter Umständen ist dann auch eine stromafreie, immobilisierte Kultivierung

hämatopoietischer Zellen besser möglich als bisher, da eventuell einige der regulatorischen Funktionen, die durch den Stromakontakt vermittelt werden, auf die künstliche Extrazellulärmatrix übertragbar sind. Gupta et al. (2000) konnten solche Effekte für O-sulfatiertes Heparan-Sulfat nachweisen.

Wenn sich durch zukünftige Forschung herausstellt, dass ein von stromalen Zellen konditioniertes Medium optimale Voraussetzungen für die stromafreie Kultivierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen in Suspensionssystemen bietet, ist eine relativ einfache Kopplung der verschiedenen Systeme denkbar. So kann der Festbetteaktor als Produktionssystem für das konditionierte Medium direkt an das Kultursystem der hämatopoietischen Zellen angeschlossen werden. Durch einen kontinuierlichen, geregelten Prozess im Festbetteaktor in Kombination mit einer Zudosierung von frischem, zytokinhaltigem Medium, können so im Suspensionssystem optimale Bedingungen für die hämatopoietischen Zellen eingestellt werden.

Ein völlig anderes Kultivierungs-Konzept wäre die Übertragung des Prinzips der Transwells (Kapitel 8.2.) auf ein Produktionssystem. Eine Abtrennung der stromalen Zellen wäre dabei aufgrund der Kompartimentierung nicht notwendig. Vielleicht kann auch ein Gradient verschiedener stromaler Zellen, die unterschiedliche Populationen der hämatopoietischen Zellen unterstützen, in einem solchen System aufgebaut werden. Dadurch wäre die *ex vivo* Kultur noch näher an der *in vivo* Situation im Knochenmark als bei den bisher verfolgten Strategien.

Unabhängig von Kultursystemen wird der Vorgang einer Medienoptimierung für hämatopoietische Zellen nie abgeschlossen sein. Durch die Entdeckung z.B. neuer Zytokine stehen weitere Komponenten der Regulation zur Verfügung, die mit den bisher bekannten optimal verknüpft werden müssen. So sollten die Zytokine SDF-1, SCGF, VEGF und SCEPF (Kapitel 2.2.5.) in die Optimierung der Kulturbedingungen aufgenommen werden.

Die Vielfalt der beschriebenen weiterführenden Möglichkeiten und Ideen zeigt, dass im Rahmen dieser Arbeit eine breite Grundlage für weitere Forschung geschaffen worden ist, die schließlich zu einem klinisch einsetzbaren Kultursystem für hämatopoietische Zellen führen kann.

Die potenzielle medizinische Anwendung von hämatopoietischen Stammzellen wird jedenfalls weiter wachsen: „Es scheint mehr als wahrscheinlich, dass hämatopoietische Stammzellen das Knochenmark bei vielen Indikationen ersetzen werden ...“ (nach Goldman et al., 1994).

10. Zusammenfassung

Die *ex vivo* Expansion hämatopoietischer Zellen ist eine bedeutende Technologie für ein breites Spektrum klinischer Applikationen. Aufgrund der hohen Komplexität des hämatopoietischen Systems wurde in dieser Arbeit der Ansatz einer *ex vivo* Simulation des menschlichen Knochenmarks gewählt, der technisch durch die Kokultur hämatopoietischer und stromaler Zellen im Festbettreaktor realisiert wurde. Dabei werden die Zellen auf porösen Collagen-Trägern immobilisiert. Weiterhin wurde ein miniaturisiertes System, der Miniatur-Schlaufenreaktor, als Screeningsystem während dieser Arbeit etabliert.

Zu Beginn der Arbeit wurde eine Zellbank von CD34⁺-Zellen aufgebaut. Weiterhin sind die stromalen Komponenten der Kokultur, die murinen Zelllinien S1/S1 und M2-10B4 mod. charakterisiert worden. Die Zellernte der immobilisierten Zellen durch enzymatische Lyse der Träger wurde etabliert, wobei ein negativer Einfluss des Enzyms ausgeschlossen wird.

Neben den stromalen Zelllinien ist auch primäres Stroma verwendet worden, wobei sich sowohl der Festbettreaktor als auch der Miniatur-Schlaufenreaktor als geeignete Kultursysteme erwiesen. Da das primäre Stroma allerdings zu einer relativ starken Ausdifferenzierung der hämatopoietischen Zellen führte, wurde keine Kokultur im Festbettreaktor durchgeführt.

Im Miniatur-Schlaufenreaktor sind die Parameter für die immobilisierte Kokultur optimiert worden. Dabei wurden die Inokulationsstrategie, Zelldichte, Zellverhältnis, Fütterung und der Einsatz von serumfreiem Medium untersucht. Bei Kultivierungen im miniaturisierten System konnten die MNC bis zu 454fach, die CFC bis zu 26fach und die CAFC bis zu 18fach vermehrt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine stromafreie Kultivierung von CD34⁺-Zellen auf Collagen-Trägern möglich ist, aber zu deutlich geringeren Expansionen führt. Im Vergleich zu einer Suspensionskultur wurde im immobilisierten System sogar die Population der SRC erhalten, die im Suspensionssystem nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Das zeigt deutlich, dass die Kokultur vor allem in Bezug auf die Unterstützung und Vermehrung der frühen Vorläuferzellen den Suspensionssystemen überlegen ist.

Auf Basis der Optimierung im Miniatur-Schlaufenreaktor konnten die hämatopoietischen Zellen auch im Festbettreaktor erfolgreich expandiert werden, wobei die Kokultur mit S1/S1 und den Standardzytokinen zu den besten Resultaten führte. So konnte eine maximal 103fache Expansion der MNC, 114fache Expansion der CFU-GM und 15fache Expansion der CAFC erzielt werden. Diese Expansionsdaten entsprechen einem medizinischen Maßstab, wodurch die klinische Relevanz der in dieser Arbeit erreichten Ergebnisse bewiesen ist.

Literaturverzeichnis

- Abuzakouk, M., Feighery, C., O'Forely, C. (1996). "Collagenase and dispase enzymes disrupt lymphocyte surface molecules." Journal of Immunological methods **194**: 211-216.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1997). Molekularbiologie der Zelle. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft.
- Alcorn, M. J., Holyoake, T.L., Richmond, L., Pearson, C., Farrell, E., Kyle, B., Dunlop, D.J., Fitzsimons, E., Steward, W.P., Pragnell, I.B., Franklin, I.M. (1996). "CD34-positive cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded ex vivo and used for transplantation with little or no toxicity." Journal of Clinical Oncology **14**: 1839-1847.
- Allen, T. D., Dexter, T.M. (1984). "The essential cells of the hemopoietic microenvironment." Experimental Hematology **12**: 517-521.
- Almeida-Porada, G., Ascensao, J.L., Zanjani, E.D. (1996). "The role of sheep stroma in human haemopoiesis in the human/sheep chimerae." British Journal of Haematology **93**: 795-802.
- Al-Rubeai, M., Emery, A.N. (1993). "Flow-cytometry in animal cell culture." Biotechnology/Technology **11**: 572-579.
- Anklesaria, P., Greenberger, J.S., FitzGerald, T.J., Sullenbarger, B., Wicha, M., Campbell, A. (1991). "Hemonection mediates adhesion of engraftment murine progenitors to a clonal bone marrow stromal cell line from SI/SI d mice." Blood **77**: 1691-1698.
- Arseniev, L., Griesel, C. (1998). Kultivierung von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen als Qualitätskontrolle des Transplantats. Köln, Rheinisches Bildungszentrum e.V., Institut für Biologie und Medizin.
- Avanzi, G. C., Lista, P., Giovinnazzo, B., Miniero, R., Saglio, G., Benetton, G., Coda, R., Cattoretti, G., Pegoraro, L. (1988). "Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features." British Journal of Haematology **69**: 359-366.
- Bachier, C. R., Gokman, E., Teale, J., Lanzkron, S., Childs, C., Franklin, W., Sphall, E., Douville, J., Weber, S., Muller, T., Armstrong, D., LeMaistre, C.F. (1999). "Ex-vivo expansion of bone marrow progenitor cells for hematopoietic reconstitution following high-dose chemotherapy for breast cancer." Experimental Hematology **27**: 615-623.
- Bagley, J., Rosenzweig, M., Marks, D.F., Pykett, M.J. (1999). "Extended culture of multipotent hematopoietic progenitors without cytokine augmentation in a novel three-dimensional device." Experimental Hematology **27**: 496-504.
- Barclay, A. N., Brown, M.H., Law, S.K.A., McKnight, A.J., Tomlinson, M.G., van der Merwe, P.A. (1997). The Leukocyte Antigen FactsBook. San Diego, Academic Press.
- Barillé, S., Collette, M., Bataille, R., Amiot, M. (1995). "Myeloma cells upregulates interleukin-6 secretion in osteoblastic cells through cell-to-cell contact but downregulates osteocalcin." Blood **86**: 3151-3159.
- Baum, C. M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.-M., Peault, B. (1992). "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**: 2804-2808.
- Bearman, S. I. (1997). "Use of stem cell factor to mobilize hematopoietic progenitors." Current Opinion in Hematology **4**: 157-162.
- Becker, P. S., Nilsson, S.K., Berrios, V.M., Dooner, M.S., Cooper, C.L., Hsieh, C.C., Quesenberry, P.J. (1999). "Adhesion receptor expression by hematopoietic cell lines and murine progenitors: Modulation by cytokines and cell cycle status." Experimental Hematology **27**: 533-541.

- Bennaceur-Griscelli, A., Tourino, C., Izac, B., Vainchenker, W., Coulombel, L. (1999). "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 **94**: 529-538.
- Bertolini, F. (1995). "Comparative study of different procedures for the collection and banking of umbilical cord blood." Journal of Hematotherapy **4**: 29-36.
- Bertolini, F., Battaglia, M., Soligo, D., Corsini, C., Curioni, C., Lazzari, L., Pedrazzoli, P., Thalmeier, K. (1997). "'Stem cell candidates' purified by liquid culture in the presence of steel factor, IL-3, and 5FU are strictly stroma-dependent and have myeloid, lymphoid, and megakaryocytic potential." Experimental Hematology **25**: 350-356.
- Bhatia, M., Wang, J.C.Y., Kapp, U., Bonnett, D., Dick, J.E. (1997). "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**: 5320-5325.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O.I., Dick, J.E. (1998). "A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity." Nature Medicine **4**: 1038-1045.
- Blundell, M. P., Demaison, C., Brouns, G., Goldman, J.P., Gaspar, H.B., Kinnon, C., Thrasher, A.J., Lazzari, L., Sirchia, G. (1999). "Quality of repopulation in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice engrafted with expanded cord blood CD34+ cells." Blood **94**: 3269-3270.
- Boccaccio, C. (1999). "Sorting CD34 antigens: objectives, biological and clinical results." Presse Medicale **28**: 1709-1716.
- Borge, O. J., Ramsfjell, C., Cui, L., Jacobsen, E.W. (1997). "Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: Key role of thrombopoietin." Blood **90**: 2282-2292.
- Brandt, J. E., Bartholomew, A.M., Fortman, J.D., Nelson, M.C., Bruno, E., Chen, L.M., Turian, F.V., Davis, T.A., Chute, J.P., Hoffman, R. (1999). "Ex vivo expansion of autologous bone marrow CD34+ cells with porcine microvascular endothelial cells results in a graft capable of rescuing lethally irradiated baboons." Blood **94**: 106-113.
- Breems, D. A., Blokland, E.A.W., Neben, S., Ploemacher, R.E. (1994). "Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay." Leukemia **8**: 1095-1104.
- Breems, D. A., Blokland, E.A.W., Ploemacher, R.E. (1997). "Stroma-conditioned media improve expansion of human primitive hematopoietic stem cells and progenitor cells." Leukemia **11**: 142-150.
- Breems, D. A., Van Driel, E.M., Hawley, R.G., Siebel, K.E., Ploemacher, R.E. (1998 a). "Stroma-conditioned medium and sufficient prestimulation improve fibronectin fragment-mediated retroviral gene transfer into human primitive mobilized peripheral blood stem cells through effects on their recovery and transduction efficiency." Leukemia **12**: 951-959.
- Breems, D. A., Blokland, E.A.W., Siebel, K.E., Mayen, A.E.M., Engels, L.J.A., Ploemacher, R.E. (1998 b). "Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells." Blood **91**: 111-117.
- Broudy, V. C. (1997). "Stem cell factor and hematopoiesis." Blood **90**: 1345-1364.
- Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Lu, L., Miller, M.E., Langefeld, C.D., Ralph, P. (1990). "Enhanced stimulation of human bone marrow macrophage colony formation in vitro by recombinant human macrophage colony-stimulating factor in agarose medium and at low oxygen tension." Blood **76**: 323-329.
- Brugger, W., Heimfeld, S., Berenson, R.J., Mertelsmann, R., Kanz, L. (1995). "Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo." The New England Journal Of Medicine **333**: 283-287.
- Burroughs, J., Gupta, P., Blazar, B.R., Verfaillie, C.M. (1994). "Diffusible factors from the murine cell line M2-10B4 support human in vitro hematopoiesis." Experimental Hematology **22**: 1095-1101.

- Burt, R. K., Traynor, A.E., Pope, R., Schroeder, J., Cohen, B., Karlin, K.H., Lobeck, L., Goolsby, C., Rowlings, P., Davis, F.A., Stefoski, D., Terry, C., Keever-Taylor, C., Rosen, S., Vesole, D., Fishman, M., Brush, M., Mujias, S., Villa, M., Burns, W.H. (1998). "Treatment of autoimmune disease by intense immunosuppressive conditioning and autologous hematopoietic stem cell transplantation." Blood **92**: 3505-3514.
- Cahn, F. (1990). "Biomaterials aspects of porous microcarriers for animal cell culture." Trends in Biotechnology **8**: 131-136.
- Cairo, M. S., Wagner, J.E. (1997). "Placental and/or umbilical cord blood: An alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation." Blood **90**: 4665-4678.
- Caldwell, J., Palsson, B.O., Locey, B., Emerson, S.G. (1991). "Culture perfusion schedules influence the metabolic activity and granulocyte-macrophage colony-stimulation factor production rates of human bone marrow stromal cells." Journal of Cellular Physiology **147**: 344-353.
- Campagnoli, C., Fisk, N., Overton, T., Bennet, P., Watts, T., Roberts, I. (2000). "Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood." Blood **95**: 1967-1972.
- Campbell, A. D., Long, M.W., Wicha, M.S. (1987). "Haemonectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of granulocyte lineage." Nature **329**: 744-746.
- Cashman, J. D., Eaves, A.C., Eaves, C.J. (1985). "Regulated proliferation of primitive hematopoietic progenitor cells in long-term human marrow cultures." Blood **66**: 1002-1005.
- Cashman, J. D., Eaves, C.J. (1999). "Human growth factor-enhanced regeneration of transplantable human hematopoietic stem cells in nonobese diabetic/SCID combined immunodeficient mice." Blood **93**: 481-487.
- Cashman, J. D., Clark-Lewis, I., Eaves, A.C., Eaves, C.J. (1999 b). "Differentiation stage specific regulation of primitive human hematopoietic progenitor cycling by exogenous and endogenous inhibitors in an in vivo model." Blood **94**: 3722-3729.
- Chabannon, C., Novakovitch, G., Blache, J.L., Olivero, S., Camerlo, J., Genre, D., Maraninchi, D., Viens, P. (1999 a). "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." Hematological Cell Therapy **41**: 78-81.
- Chabannon, C., Blache, J.L., Sielleur, I., Douville, J., Faucher, C., Gravis, G., Arnoulet, C., Oziel-Taieb, S., Blaise, D., Novakovitch, G., Camerlo, J., Chabbert, I., Genre, D., Appel, M., Armstrong, D., Maraninchi, D., Viens, P. (1999 b). "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." International Journal of Oncology **15**: 511-518.
- Civin, C. I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., Shaper, J.H. (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." Journal of Immunology **133**: 157-165.
- Collins, P. C., Nielsen, L.K., Patel, S.D., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M. (1998 a). "Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system." Biotechnology Progress **14**: 466-472.
- Collins, P. C., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T. (1998 b). "Stirred culture of peripheral and cord blood hematopoietic cells offers advantages over traditional static systems for clinically relevant applications." Biotechnology and Bioengineering **59**: 534-543.
- Conget, P., Minguell, J.J. (1995). "IL-3 increases surface proteoglycan synthesis in haematopoietic progenitors and their adhesiveness to the heparin-binding domain of fibronectin." British Journal of Haematology **89**: 1-7.
- Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A., Eaves, C. (1997). "Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-SCID/SCID mice." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**: 9836-9841.

- Cottner, T. G., Fernandes, R.S., Verhaegen, S., McCarthy, J.V. (1994). "Cell death in myeloid lineage." Immunological Reviews **142**: 93-112.
- Coulombel, L., Eaves, A.C., Eaves, C.J. (1983). "Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer." Blood **62**: 291-297.
- Craig, W., Kay, R., Cutler, R.L., Lansdorp, P.M. (1993). "Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells." Journal of Experimental Medicine **177**: 1331-1342.
- Crocker, P. R., Morris, L., Gordon, S. (1988). "Novel cell surface adhesion receptors involved in interactions between stromal macrophages and haematopoietic cells." Journal of Cell Science **9**: 185-206.
- Curtis, B. M., Williams, D.E., Broxmeyer, H.E., Dunn, J., Farrah, T., Jeffery, E., Clevenger, W., deRoos, P., Martin, U., Friend, D. (1991). "Enhanced hematopoietic activity of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein." Proceedings of the National Academy of Sciences **92**: 2859-2863.
- Dainiak, N. (1991). "Surface membrane-associated regulation of cell assembly, differentiation, and growth." Blood **78**: 264-276.
- Dao, M. A., Pepper, K.A., Nolta, J.A. (1997). "Long-term cytokine production from engineered primary human stromal cells influences human hematopoiesis in an in vivo xenograft model." Stem Cells **15**: 443-454.
- Dao, M. A., Hashino, K., Kato, I., Nolta, J.A. (1998). "Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **92**: 4612-4621.
- Dazey, B., Hamsany, P., Duchez, P., Bouzgarrou, R., Boiron, J.M., Vezon, G., Reiffers, J. (1999). "Ex vivo expansion of CD34+ cells after selection and cryopreservation." Cryobiology **39**: 288.
- De Felice, L., Di Pucchio, T., Mascolo, M.G., Agostini, F., Breccia, M., Guglielmi, C., Ricciardi, M.R., Tafuri, A., Screnci, M., Mandelli, F., Arcese, W. (1999). "Flt3L induces the ex-vivo amplification of umbilical cord blood committed progenitors and early stem cells in short-term cultures." British Journal of Haematology **106**: 133-141.
- De León, A., Mayani, H., Ramírez, O.T. (1998). "Design, characterization and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions." Cytotechnology **28**: 127-138.
- de Wynter, E. A., Coutinho, L.H., Pei, X., Marsh, J.C.W., Hows, J., Luft, T., Testa, N.G. (1995). "Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord, and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems." Stem Cells **13**: 524-532.
- Debili, N., Wendling, F., Cosman, D., Titeux, M., Florindo, C., Dusanter-Fourt, I., Schooley, K., Methia, N., Charon, M., Nador, R., Bettaieb, A., Vainchenker, W. (1995). "The mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets." Blood **85**: 391-401.
- Denning-Kendall, P. A., Nicol, A., Horsley, H., Donaldson, C., Bradley, B., Hows, J.M. (1998). "Is in vitro expansion of human cord blood cells clinically relevant?" Bone Marrow Transplantation **21**: 225-232.
- Deryugina, E. I., Müller-Sieburg, C.E. (1993). "Stromal cells in long-term cultures: Keys to the elucidation of hematopoietic development?" Critical Reviews in Immunology **13**: 115-150.
- Dexter, T. M., Wright, E.G., Krizsa, F., Lajtha, L.G. (1977 a). "Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures." Biomedicine **27**: 344-349.
- Dexter, T. M., Allen, T.D., Lajtha, L.G. (1977 b). "Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro." Journal of Cellular Physiology **91**: 335-344.
- Dooley, D. C., Oppenlander, B.K., Spurgin, P., Mead, J.H., Novak, F.P., Plunkett, M., Beckstead, J., Heinrich, M.C. (1995). "Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor downmodulate the growth of hematopoietic cells in long-term stromal cultures." Journal of Cellular Physiology **165**: 386-397.

- Dorrell, C., Gan, O.I., Pereira, D.S., Hawley, R.G., Dick, J.E. (2000). "Expansion of human cord blood CD34+CD38- cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function." Blood **95**: 102-110.
- Dunbar, C. E., Seidel, N.E., Doren, S., Sellers, S., Cline, A.P., Metzger, M.E., Agricola, B.A., Donahue, R.E., Bondine, D.M. (1996). "Improved retroviral gene transfer into murine and rhesus peripheral blood or bone marrow repopulating cells primed in vivo with stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**: 11871-11876.
- Eaves, C. J., Lambie, K. (1995). Atlas of human hematopoietic colonies. Vancouver, StemCell Technologies Inc.
- Eichler, H., Richter, E., Leveringhaus, A., Zieger, W., Watz, E., Friedmann, G., Kerowgan, M., Goldmann, S.F. (1998). "The mannheim cord blood project: Experience in collection and processing of the first 880 banked unrelated cord blood transplants." Infusionstherapie und Transfusionsmedizin **26**: 110-114.
- Eichmann, A., Corbel, C., Nataf, V., Vaigot, P., Bréant, C., LeDouarin, N. (1997). "Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**: 5141-5146.
- Emerson, S. G., Taichman, R. (1995). The hematopoietic microenvironment. High-dose cancer therapy. J. D. Armitage, Autman, K.H. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Engel, H., Kaya, E., Bald, R., Kolhagen, H., Grecu, O., Schondorf, T., Brenne, U., Kurbacher, C.M., Gohring, U.J., Kleine, M., Mallmann, P. (1999). "Fetal cord blood as an alternative source of hematopoietic progenitor cells: immunophenotype, maternal cell contamination, and ex vivo expansion." Journal of Hematotherapy **8**: 141-155.
- Engelmann, H., Aderka, D., Novick, D., Wallach, D. (1993). Lösliche Zytokinrezeptoren - Transportproteine oder endogene Zytokininhibitoren. Zytokine. W. Wilmanns. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 20-26.
- Evans, T. (1997). "Developmental biology of hematopoiesis." Hematology/Oncology clinics of north america **11**: 1115-1147.
- Faller, A., Schünke, M. (1995). Der Körper des Menschen. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Fernandez, M., Minguell, J.J. (1996 a). "Adhesive interactions in the hematopoietic system: regulation by cytokines." Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine **212**: 313-323.
- Fernandez, M., Minguell, J.J. (1996 b). "The role of collagen in hematopoiesis." Brazilian Journal of medical and biological research **29**: 1201-1207.
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J.P.G., Kallen, K.-J., Wollmer, A., Grötzinger, J., Rose-John, S. (1996). "A bioactive desinger cytokine for human hematopoietic progenitors cell expansion." Nature Biotechnology **15**: 142-145.
- Ford, C. E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W.H., Loutit, J.F. (1956). "Cytological identification of radiation-chimaeras." Nature **177**: 452-454.
- Francis, K., Ramakrishna, R., Holloway, W., Palsson, B.O. (1998). "Two new pseudopod morphologies displayed by the human hematopoietic KG1a progenitor cell line and by primary human CD34+ cells." Blood **92**: 3616-3623.
- Freedman, A. R., Zhu, H., Levine, J.D., Kalamis, S., Scadden, D.T. (1996). "Generation of human T-lymphocytes from bone marrow CD34+ cells in vitro." Nature Medicine **2**: 46-51.
- Fujisaki, T., Berger, M.G., Rose-John, S., Eaves, C.J. (1999). "Rapid differentiation of a rare subset of adult human Lin- CD34- CD38- cells stimulated by multiple growth factors in vitro." Blood **94**: 1926-1932.
- Gallacher, L., Murdoch, B., Wu, D.M., Karanu, F.N., Keeney, M., Bhatia, M. (2000). "Isolation and characterization of human CD34- Lin- and CD34+ Lin- hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7." Blood **95**: 2813-2820.

- Galotto, M., Berisso, G., Delfino, L., Podesta, M., Ottaggio, L., Dallorso, S., Dufour, C., Ferrara, G.B., Abbondandolo, A., Dini, G., Bacigalupo, A., Cancedda, R., Quarto, R. (1999). "Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients." Experimental Hematology **27**: 1460-1466.
- Gartner, S., Kaplan, H.S. (1980). "Long-term culture of human bone marrow cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **77**: 4756-4759.
- Gätgens, J. (2000). "Persönliche Mitteilung."
- Ghaffari, S., Dougherty, G.J., Eaves, A.C., Eaves, C.J. (1997). "Diverse effects of anti-CD44 antibodies on the stromal cell-mediated support of normal but not leukaemic (CML) haemopoiesis in vitro." British Journal of Haematology **97**: 22-28.
- Giarratana, M. C., Kobari, L., Neildez Nguyen, T.M., Firat, H., Bouchet, S., Lopez, M., Gorin, N.C., Thierry, D., Douay, L. (1998). "Cell culture bags allow a large extent of ex vivo expansion of LTC-IC and functional mature cells which can subsequently be frozen: interest for a large-scale clinical application." Bone Marrow Transplantation **22**: 707-715.
- Glowacki, J., Mizuno, S., Greenberger, J.S. (1998). "Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture." Cell Transplantation **7**: 319-326.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H.E., Auernach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J., Boyse, E.A. (1989). "Hematopoietic reconstitution in a patient with fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling." The New England Journal Of Medicine **321**: 1174-1178.
- Goan, S.-R., Schwarz, K., Harsdorf, S. von, Schilling, C. von, Fichtner, I., Junghahn, I., Just, U., Herrmann, F. (1996). "Fibroblasts retrovirally transfected with the human IL-3 gene initiate and sustain multilineage human hematopoiesis in SCID mice: Comparison of CD34-enriched vs C34-enriched and in vitro expanded." Bone Marrow Transplantation **18**: 513-519.
- Goldman, J. (1994). "Blood and marrow transplantation: A message from the editor." Bone Marrow Transplantation **14**: 1.
- Goldstein, S. (1990). "Replicative senescence: The human fibroblast comes of age." Science **249**: 1129-1133.
- Goodell, M. A. (1999). "CD34+ or CD34-: Does it really matter?" Blood **94**: 2545-2547.
- Gordon, M. Y., Riley, G.P., Watt, S.M., Greaves, M.F. (1987). "Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycoaminoglycans in the bone marrow microenvironment." Nature **326**: 403-405.
- Graham, G. J., Wright, E.G. (1997). "Haematopoietic stem cells: their heterogeneity and regulation." International Journal of Experimental Pathology **78**: 197-218.
- Greaves, M. F., Titley, I., Colman, S.M., Bühring, H.-J., Campos, L., Castoldi, G.L., Garrido, F., Gaudernack, G., Girard, J.-P., Inglés-Esteve, J., Invernizzi, R., Knapp, W., Lansdorp, P.M., Lanza, F., Merle-Béral, H., Parravicini, C., Razak, K., Ruiz-Cabello, F., Sprin (1995). M10 CD34 cluster workshop report. Leukocyte typing V: White cell differentiation antigens. S. Schlossman, Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J., Kishimoto, T., Morimoto, C., Ritz, J., Shaw, S., Silverstein, R., Springer, T., Tedder, T., Todd, R. New York, Oxford Academic Press: 840-846.
- Greenberger, J. S. (1978). "Sensitivity of corticosteroid-dependent insulin-resistant lipogenesis in marrow preadipocytes of obese diabetic (db/db) mice." Nature **275**: 752-754.
- Greenberger, J. S. (1991). "The hematopoietic microenvironment." Critical Reviews in Oncology/Hematology **11**: 65-84.
- Grell, M., Scheurich, P., Pfizenmaier (1993). Zytokinrezeptoren und intrazelluläre Signaltransduktion. Zytokine. W. Wilmanns. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 9-19.

- Güenechea, G., Segovia, J.C., Albella, B., Lamana, M., Ramírez, M., Regidor, C., Fernández, M.N., Bueren, J.A. (1999). "Delayed engraftment of nonobese diabetic/serve combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34+ cord blood cells." Blood **93**: 1097-1105.
- Guerriero, A., Worford, L., Holland, H.K., Guo, G.-R., Sheehan, K., Waller, E.K. (1997). "Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells." Blood **90**: 3444-3455.
- Gunji, Y., Suda, T. (1995). Characterization and enrichment of human hematopoietic stem cells. Hematopoietic Stem Cells - Biology and Therapeutic Applications. D. Levitt, Mertelsmann, R. New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker, Inc.: 1-25.
- Gupta, P., McCarthy, J.B., Verfaillie, C.M. (1996). "Stromal fibroblast heparan sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells." Blood **87**: 3229-3236.
- Gupta, P., Oegema, T.R., Brazil, J.J., Dudek, A.Z., Slungaard, A., Verfaillie, C.M. (1998). "Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche." Blood **92**: 4641-4651.
- Gupta, P., Oegema, T.R., Brazil, J.J., Dudek, A.Z., Slungaard, A., Verfaillie, C.M. (2000). "Human LTC-IC can be maintained for at least 5 weeks in vitro when interleukin-3 and a single chemokine are combined with O-sulfated heparan sulfates: Requirement for optimal binding interactions of heparan sulfat with early-acting cytokines and matrix proteins." Blood **95**: 147-155.
- Gupte, A., Frangos, J.A. (1990). "Effects of flow on the synthesis and release of fibronectin by endothelial cells." In Vitro Cellular Developmental Biology **26**: 57-60.
- Hambach, B. (1994). Der Einsatz von Wirbelschichtreaktoren in der Zellkulturtechnik - Beiträge zur Verfahrensentwicklung. Aachen, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
- Han, P., Hodge, G. (1999). "Intracellular cytokine production and cytokine receptor interaction of cord mononuclear cells: Relevance to cord blood transplantation." British Journal of Haematology **107**: 450-457.
- Hao, Q.-L., Shah, A.J., Thiemann, F.T., Smogorzewska, E.M., Crooks, G.M. (1995). "A functional comparison of CD34+CD38- cells in cord blood and bone marrow." Blood **86**: 3745-3753.
- Harrison, R. G. (1907). "Observation on the living developing nerve fiber." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **4**: 140-143.
- Hayflick, L., Moorhead, P.S. (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Experimental Cell Research **25**: 585-621.
- Heany, M. L., Golde, D.W. (1996). "Soluble Cytokine Receptors." Blood **87**: 847-857.
- Heinrich, M. C., Dooley, D.C., Freed, A.C., Band, L., Hoatlin, M.E., Keeble, W.W., Peters, S.T., Silvey, K.V., Ey, F.S., Kabat, D., Maziarz, R.T., Bagby, G.C. Jr. (1993). "Constitutive expression of steel factor gene by human stromal cells." Blood **82**: 771-783.
- Henschler, R., Mertelsmann, R. (1993). Das pleiotrope Netzwerk der Zytokine. Zytokine. W. Wilmanns. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 3-8.
- Hevehan, D. L., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M. (2000). "Physiologically significant effects of pH and oxygen tension on granulopoiesis." Experimental Hematology **28**: 267-275.
- Highfill, J. G., Haley, S.D., Kompala, D.S. (1995). "Large-scale production of murine bone marrow cells in an airlift packed bed bioreactor." Biotechnology and Bioengineering **50**: 514-520.
- Hildebrandt, H. (1994). Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch. Berlin, Walter de Gruyter & Co.
- Hodohara, K., Fujii, N., Yamamoto, N., Kaushansky, K. (2000). "Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells." Blood **95**: 769-775.

- Hogan, C. J., Shpall, E.J. McNulty, O., McNiece, I., Dick, J.E., Shultz, L.D., Keller, G. (1997). "Engraftment and development of human CD34+-enriched cells from umbilical cord blood in NOD/LtSz-scid/scid mice." Blood **90**: 85-96.
- Hogge, D. E., Lansdorp, P.M., Reid, D., Gerhard, B., Eaves, C.J. (1996). "Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, IL-3, and granulocyte colony-stimulating factor." Blood **10**: 3765-3773.
- Howie, S. E. M., Harrison, D.J., Wyllie, A.H. (1994). "Lymphocyte apoptosis - mechanisms and implications in disease." Immunological Reviews **142**: 141-156.
- Hurley, R. W., McCarthy, J.B., Verfaillie, C.M. (1995). "Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation." Journal of Clinical Investigations **96**: 511-519.
- Hurley, R. W., McCarthy, J.B., Wayner, E.A., Verfaillie, C.M. (1997). "Monoclonal antibody crosslinking of the alpha 4 or beta 1 integrin inhibits committed clonogenic hematopoietic progenitor proliferation." Experimental Hematology **25**: 321-328.
- Ichikawa, Y., Pluznik, D.H., Sachs, L. (1966). "In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies." Proceedings of the National Academy of Sciences **56**: 488-495.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D. (1999). Immunobiology - The immune system in health and disease. London, Current Biology Publications.
- Janowska-Wieczorek, A., Marquez, L.A., Nabholz, J.M., Cabuhat, M.L., Montano, J., Chang, H., Pozmus, J., Russell, J.A., Edwards, D.R., Turner, A.R. (1999). "Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34+ cells and their transmigration through reconstituted basement membrane." Blood **93**: 3379-3390.
- Jelinek, N., Schmidt, S., Wandrey, C., Biselli, M. (1999). Effects of Collagenase on Human Hematopoietic Cells. Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products. A. Bernard, Griffiths, B., Noé, W., Wurm, F. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 547-549.
- Jiang, Y., Prosper, F., Verfaillie, C.M. (2000). "Opposing effects of engagement of integrins and stimulation of cytokine receptors on cell cycle progression of normal human hematopoietic progenitors." Blood **95**: 846-854.
- Kaneko, Y., Takenawa, J., Yoshida, O., Fujita, K., Sugimoto, K., Nakayama, H., Fujita, J. (1991). "Adhesion of mouse mast cells to fibroblasts: adverse effects of steel (Sl) mutation." Journal of Cellular Physiology **147**: 224-230.
- Kawabata, K., Ujikawa, M., Egawa, T., Kawamoto, H., Tachibana, K., Iizasa, H., Katsura, Y., Kishimoto, T., Nagasawa, T. (1999). "A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**: 5663-5667.
- Kawada, H., Ando, K., Tsuji, T., Shimakura, Y., Nakamura, Y., Chargui, J., Hagihara, M., Itagaki, H., Shimizu, T., Inokuchi, S., Kato, S., Hotta, T. (1999). "Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system." Experimental Hematology **27**: 904-915.
- Keller, J. R., Ortiz, M., Ruscetti, F.W. (1995). "Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division." Blood **86**: 1757-1764.
- Khaldoyanidi, S., Moll, J., Karakhanova, S., Herrlich, P., Ponta, H. (1999). "Hyaluronate-enhanced hematopoiesis: Two different receptors trigger the release of interleukin-1 beta and interleukin-6 from bone marrow macrophages." Blood **94**: 940-949.
- Kim, B.-S. (1998). "Production of human hematopoietic progenitors in a clinical-scale stirred suspension bioreactor." Biotechnology Letters **20**: 595-601.
- Kim, D. K., Fujiki, Y., Fukushima, T., Ema, H., Shibuya, A., Nakauchi, H. (1999). "Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells." Stem Cells **17**: 286-294.

- Klein, G., Müller, C.A., Tillet, E., Chu, M.-L., Timpl, R. (1995). "Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: A strong cytoadhesive component." Blood **86**: 1740-1748.
- Klein, G. (1995). "The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment." Experientia **51**: 914-926.
- Knudtzon, S. (1974). "In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood." Blood **43**: 357-361.
- Koeffler, H. P., Golde, D.W. (1978). "Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity." Science **200**: 1153-1154.
- Koenigsmann, M., Griffin, J.D., DiCarlo, J., Cannistra, S.A. (1992). "Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type I." Blood **79**: 657-665.
- Kogler, G., Somville, T., Gobel, U., Hakenberg, P., Knipper, A., Fischer, J., Adams, O., Krempe, C., McKenzie, C., Ruttgers, H., Meier, W., Bellmann, O., Streng, H., Ring, A., Rosseck, U., Rocha, V., Wernet, P. (1999 a). "Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: the first six years of the EUROCORD/NETCORD bank Germany." Klinische Pädiatrie **211**: 224-232.
- Kogler, G., Nurnberger, W., Fischer, J., Niehues, T., Somville, T., Gobel, U., Wernet, P. (1999 b). "Simultaneous cord blood transplantation of ex vivo expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia." Bone Marrow Transplantation **24**: 397-403.
- Kögler, G., Callejas, J., Sorg, R.V., Wernet, P. (1998). "An eight-fold ex vivo expansion of long-term culture-initiating cells from umbilical cord blood in stirred suspension cultures." Bone Marrow Transplantation **21**: S48-S53.
- Köhler, T., Plettig, R., Wetzstein, W., Schaffer, B., Ordemann, R., Nagels, H.-O., Ehninger, G., Bornhäuser, M. (1999). "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 **17**: 19-24.
- Koller, M. R., Bender, J.G., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M. (1992 a). "Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors." Blood **80**: 403-411.
- Koller, M. R., Bender, J.G., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T. (1992 b). "Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow." Experimental Hematology **20**: 264-270.
- Koller, M. R., Bender, J.G., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M. (1992 c). "Beneficial effects of reduced oxygen tension and perfusion in long-term hematopoietic cultures." Annals of the New York Academy of Science **665**: 105-116.
- Koller, M. R., Palsson, B.O. (1993). "Tissue Engineering: Reconstitution of human hematopoiesis ex vivo." Biotechnology and Bioengineering **42**: 909-930.
- Koller, M. R., Bender, J.G., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T. (1993 a). "Expansion of primitive human hematopoietic progenitors in a perfusion bioreactor system with IL-3, IL-6, and stem cell factor." Bio/Technology **11**: 358-363.
- Koller, M. R., Emerson, S.G., Palson, B.O. (1993 b). "Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures." Blood **82**: 378-384.
- Koller, M. R., Papoutsakis, E.T. (1995 a). Cell adhesion in animal cell culture: Physiological and fluid-mechanical implications. Cell Adhesion. M. A. Hjortso, Roos, J.W. New York, Basel, Hong-Kong: 61-110.
- Koller, M. R., Manchel, I., Palsson, B.O. (1997). "Importance of parenchymal:stromal cell ratio for the ex vivo reconstitution of human hematopoiesis." Stem Cells **15**: 305-313.

- Koller, M. R., Maher, R.J., Manchel, I., Oxender, M., Smith, A.K. (1998 a). "Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: Human serum and serum-free media." Journal of Hematotherapy 7: 413-423.
- Koller, M. R., Manchel, I., Maher, R.J., Goltry, K.L., Armstrong, R.D., Smith, A.K. (1998 b). "Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system." Bone Marrow Transplantation 21: 653-663.
- Koller, M. R., Oxender, M., Jensen, T.C., Goltry, K.L., Smith, A.K. (1999). "Direct contact between CD34+lin-cells and stroma induces a soluble activity that specifically increases primitive hematopoietic cell production." Experimental Hematology 27: 734-741.
- Koschmieder, S. (1998). "Persönliche Mitteilung."
- Krafczyk, J. (1996). Charakterisierung von Wachstum und Zytokinbildung der stromalen Zelllinie L88/5 in Wirbelschichtreaktoren. Jülich, Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich.
- Krause, D. S., Fackler, M.J., Civin, C.I., Stratford May, W. (1996). "CD34: Structure, biology, and clinical utility." Blood 87: 1-13.
- Krauss, G. (1997). Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. Weinheim, Wiley VCH.
- Krauss, J. C. (1995). Therapy with genetically modified hematopoietic stem cells. Hematopoietic stem cells: Biology and therapeutic applications. R. Mertelsmann. New York, Marcel Dekker, Inc.: 195-217.
- Kronenwett, R., Lichterfeld, M., Martin, S., Burkly, L., Haas, R. (1999). "Mobilization of CD34+ hematopoietic stem cells is associated with a reduced activation state of the integrin VLA-4." Onkologie 22 (Supplement 1): 180.
- Lajtha, L. G. (1979). "Stem Cell Concepts." Differentiation 14: 23-34.
- Landsdorp, P. M. (1997). "Intrinsic control of stem cell fate." Stem Cells 15 (Supplement 1): 223- 227.
- Langley, K. E., Bennett, L.G., Wypych J., Yancik, S.A., Liu, X.-D., Westcott, K.R., Chang, D.G., Smith, K.A., Zsebo, K.M. (1993). "Soluble stem cell factor in human serum." Blood 81: 656-660.
- Lapidot, T., Pflumio, F., Doedens, M., Murdoch, B., Williams, D.E., Dick, J.E. (1992). "Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice." Science 255: 1137-1141.
- Lataillade, J.-J., Clay, D., Dupuy, C., Rigal, S., Jasmin, C., Bourin, P., Le Bousse-Kerdilès, M.-C. (2000). "Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34+ cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival." Blood 95: 756-768.
- Lebkowski, J. S., Schain, L.R., Okrongly, D., Levinsky, R., Harvey, M.J., Okarma, T.B. (1992). "Rapid isolation of human CD34 hematopoietic stem cells - purging of human tumor cells." Transplantation 53: 1011-1019.
- Lemischka, I. R. (1997). "Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells." Stem Cells 15 (Supplement 1): 63-68.
- Lemoine, F. M., Humphries, R.K., Abraham, S.D., Krystal, G., Eaves, C.J. (1988). "Partial characterization of a novel stromal cell-derived pre-B-cell growth factor active on normal and immortalized pre-B cells." Experimental Hematology 16: 718-726.
- Lemoli, R. M., Tafuri, A., Strife, A., Andreef, M., Clarkson, B.D., Gulati, S.C. (1992). "Proliferation of human hematopoietic progenitors in long-term bone marrow cultures in gas-permeable plastic bags is enhanced by colony-stimulating factors." Experimental Hematology 20: 569-575.
- Levee, M. G., Lee, G.-M., Paek, S.-H., Palsson, B.O. (1994). "Microencapsulated human bone marrow cultures: A potential culture system for the clonal outgrowth of hematopoietic progenitor cells." Biotechnology and Bioengineering 43: 734-739.

- Lichtman, M. A. (1981). "The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: A review." Experimental Hematology **9**: 391-410.
- Lindl, T., Bauer, J. (1994). Zell- und Gewebekultur. Stuttgart, Fischer Verlag.
- Linenberger, M. L., Jacobsen, F.W., Bebbett, L.G., Broudy, V.C., Martin, F.H., Abkowitz, J.L. (1995). "Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts." Experimental Hematology **23**: 1104-1114.
- Lisovsky, M., Braun, S.E., Ge, Y., Takahari, H., Lu, L., Savchenko, V.G., Lyman, S.D., Broxmeyer, H.E. (1996). "Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells." Leukemia **10**: 1012-1018.
- Liu, J., Li, K., Yuen, P.M., Fok, T.F., Wau, F.W., Yang, M., Li, C.K. (1999). "Ex vivo expansion of enriched CD34+ cells from neonatal blood in the presence of thrombopoietin, a comparison with cord blood and bone marrow." Bone Marrow Transplantation **24**: 247-252.
- Long, M. W., Dixit, V.M. (1990). "Thrombospondin functions as a cytoadhesion molecule for human hematopoietic progenitor cells." Blood **75**: 2311-2318.
- Long, M. W., Briddell, R., Walter, A.W., Bruno, E., Hoffman, R. (1992). "Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules." Journal of Clinical Investigations **90**: 251-255.
- Lorenz, E., Uphoff, D.E., Reid, T.R., Shelton, E. (1951). "Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injection." Journal of National Cancer Institute **12**: 197.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998). Bioanalytik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lüllau, E. (1992). Immobilisierung von Säugetierzellen auf chemisch modifizierten Sinterglaträgern. Köln, Universität zu Köln.
- Lundell, B. I., Vredenburgh, J.J., Tyer, S., DeSombre, K., Smith, A.K. (1998). "Ex vivo expansion of bone marrow from breast cancer patients: reduction in tumor cells content through passive purging." Bone Marrow Transplantation **22**: 153-159.
- Lyman, S. D., Jacobsen, S.E.W. (1998). "c-kit ligand and Flt3 ligand: Stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities." Blood **91**: 1101-1134.
- MacVittie, T. J., Farese, A.M., Smith, W.G., Baum, C.M., Burton, E., McKearn, J.P. (2000). "Myelopoietin, an engineered chimeric IL-3 and G-CSF receptor agonist, stimulates multilineage hematopoietic recovery in a nonhuman primate model of radiation-induced myelosuppression." Blood **95**: 837-845.
- Madihally, S. V., Flake, A.W., Matthew, H.W. (1999). "Maintenance of CD34 expression during proliferation of CD34+ cord blood cells on glycosaminoglycan surfaces." Stem Cells **17**: 295-305.
- Mauch, P., Botnick, L.E., Hannon, E.C., Obbagy, J., Hellman, S. (1982). "Decline in bone marrow proliferation capacity as a function of age." Blood **60**: 245-252.
- Maximow, A. A. (1924). "Relation of blood cells to connective tissues and endothelium." Physiological Reviews **4**: 533-562.
- Mayani, H., Guilbert, L.J., Janowska-Wieczorek, A. (1992). "Biology of the hemopoietic microenvironment." European Journal of Haematology **49**: 225-233.
- McAdams, T. A., Sandstrom, C.E., Miller, W.M., Bender, J.G., Papoutsakis, E.T. (1995). Ex vivo expansion of primitive hematopoietic cells for cellular therapies: An overview. Animal Cell Technology: Developments towards the 21st Century. E. C. e. a. Beuvery, Kluwer Academic: 1083-1098.
- McAdams, T. A., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T. (1996 a). "Lineage distribution of ex vivo hematopoietic cultures is substantially influenced by small changes in culture pH." Blood suppl. **1**: 607.
- McAdams, T. A., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T. (1996 b). "Hematopoietic cell culture therapies (part I): Cell culture considerations." Trends in Biotechnology **14**: 341-349.

- McAdams, T. A., Winter, J.N., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T. (1996 c). "Hematopoietic cell culture therapies (part II): clinical aspects and applications." Trends in Biotechnology **14**: 388-396.
- McAdams, T. A., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T. (1998). "pH is a potent modulator of erythroid differentiation." British Journal of Haematology **103**: 317-325.
- McAlister, I. B., Teepe, M., Gillis, S., Williams, D.E. (1992). "Ex vivo expansion of peripheral blood progenitor cells with recombinant cytokines." Experimental Hematology **20**: 626-628.
- McCarthy, J. B., Vachhani, B., Iida, J. (1996). "Cell adhesion to collagenous matrices." Biopolymers **40**: 371-381.
- McIntire, L. V., Frangos, J.A., Rhee, B.G., Eskin, S.G., Hall, E.R. (1987). "The effect of fluid mechanical stress on cellular arachidonic acid metabolism." Annals of New York Academy of Science **516**: 513-24.
- Meagher, R. C., Salvado, A.J., Wright, D.G. (1988). "An analysis of the multilineage production of human hematopoietic progenitors in long-term bone marrow culture: Evidence that reactive oxygen intermediates derived from mature phagocytic cells have a role in limiting progenitor cell self-renewal." Blood **72**: 273-281.
- Meissner, P., Schröder, B., Herfurth, C., Biselli, M. (1999). "Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells." Cytotechnology **30**: 227-234.
- Metcalf, D., Moore, M.A.S. (1971). Haemopoietic cells. Amsterdam, North-Holland Publishing.
- Metcalf, D. (1985). "The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors." Science **229**: 16-22.
- Mills, K. C., Gross, T.G., Varney, M.L., Heimann, D.G., Reed, E.C., Kessinger, A., Talmadge, J.E. (1996). "Immunologic phenotype and function in human bone marrow, blood stem cells and umbilical cord blood." Bone Marrow Transplantation **18**: 53-61.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990). "High gradient magnetic cell separation with MACS." Cytometry **11**: 231-238.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., Buck, D.W. (1997). "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: Isolation, Characterization, and molecular cloning." Blood **90**: 5013-5021.
- Miyake, K., Underhill, C.B., Lesley, J., Kincade, P.W. (1990). "Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition." Journal of Experimental Medicine **172**: 69-75.
- Möbest, D., Goan, S.-R., Junghahn, I., Winkler, J., Fichtner, I., Hermann, M., Becker, M., De Lima-Hahn, E., Henschler, R. (1999). "Differential kinetics of primitive hematopoietic cells assayed in vitro and in vivo during serum-free suspension culture of CD34+ blood progenitor cells." Stem Cells **17**: 152-161.
- Möhle, R., Bautz, F., Rafii, S., Moore, M.A.S., Brugger, W., Kanz, L. (1998). "The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1." Blood **91**: 4523-4530.
- Moses, H. L., Serra, R. (1996). "Regulation of differentiation by TGF-beta." Current Opinion in Genetics and Development **6**: 581-586.
- Müller-Sieburg, C. E., Deryugina, E. (1995). "The stromal cells' guide to the stem cell universe." Stem Cells **13**: 477-486.
- Murray, L., Chen, B., Galy, A., Chen, S., Tushinski, R., Uchida, N., Negrin, R., Tricot, G., Jagannath, S., Vesole, D., Barlogie, B., Hoffman, R., Tsukamoto, A. (1995). "Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+lin - subpopulation from mobilized peripheral blood." Blood **85**: 368-378.
- Murray, L. J., Young, J.C., Osborne, L.J., Luens, K.M., Scollary, R., Hill, B.L. (1999). "Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34+ cells and recruit primitive CD34+Thy-1+ cells into rapid division." Experimental Hematology **27**: 1019-1028.

- Nakamura, Y., Ando, K., Chargui, J., Kawada, H., Sato, T., Tsuji, T., Hotta, T., Kato, S. (1999). "Ex vivo generation of CD34+ cells from CD34- hematopoietic cells." Blood **94**: 4053-4059.
- Naughton, B. A., Preti, R.A., Naughton, G.K. (1987). "Hematopoiesis on nylon mesh templates.I. Long-term culture of rat bone marrow cells." Journal of Medicine **18**: 219-250.
- Naughton, B. A., Jacob, L., Naughton, G.K. (1990). "A three-dimensional culture system for the growth of hematopoietic cells." Progress in Clinic and Biology Research **333**: 435-445.
- Naughton, B. A., Tjota, A., Sinada, B., Naughton, G.K. (1991). "Hematopoiesis on suspended nylon screen-stromal cell microenvironments." Journal of Biomechanical Engineering **113**: 171-177.
- Naughton, B. A., Sinada, B., Azar, L., San Roman, J. (1992). "Differentiation effects of drugs upon hematopoiesis can be assessed in long-term bone marrow cultures established on nylon screens." Progress in Clinic and Biological Research **199**: 481-490.
- Nikol, S., Höfling, B. (1996). "Aktueller Stand der Gentherapie." Deutsches Ärzteblatt **93**: C-1852-C-1860.
- Nishi, N., Ishikawa, R., Inoue, H., Bishikawa, M., Yoneya, T., Kakeda, M., Tsumara, H., Ohashi, H., Mori, L.J. (1997). "In vitro long-term culture of human primitive hematopoietic cells supported by murine stromal cell line MS-5." Leukemia **11**, Supplement 3: 468-473.
- Nordon, R. E., Schindhelm, K. (1996). "Ex vivo manipulation of cell subsets for cell therapies." Artificial Organs **20**: 396-402.
- Ogawa, M. (1993). "Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells." Blood **81**: 2844-2853.
- Ohmizono, Y., Sakabe, H., Kimura, T., Tanimukai, S., Matsumara, T., Miyazaki, H., Lyman, S.D., Sonoda, Y. (1997). "Thrombopoietin augments ex vivo expansion of human cord blood-derived hematopoietic progenitors in combination with stem cell factor and flt3 ligand." Leukemia **11**: 524-530.
- Oostendorp, R. A. J., Spitzer, E., Reisbach, G., Dörmer, P. (1997). "Antibodies to the beta1-integrin chain, CD44, or ICAM-3 stimulate adhesion of blast colony-forming cells and may inhibit their growth." Experimental Hematology **25**: 345-349.
- Palsson, B. O., Paek, S.-H., Schwartz, R.M., Palsson, M., Lee, G.-M., Silver, S., Emerson, S.G. (1993). "Expansion of human bone marrow progenitor cells in a high cell density continuous perfusion system." Bio/Technology **11**: 368-372.
- Papadimitriou, C. (1995). "Immunomagnetic selection of CD34+ cells from fresh peripheral blood mononuclear cell preparations using two different separation techniques." Journal of Hematotherapy **4**: 539-544.
- Pasch, J., Thoma, S., Schiefer, A., Niessen, L., Jelinek, N., Schmidt, S., Rau, G., Heschel, I. (1999). "Cryopreservation of human mononuclear cord blood cells with HES, Me2SO and a mixture thereof." Cryobiology **39**: 289.
- Pasternak, G., Pasternak, L. (1994). "Behaviour in vitro of long-term cultured bone marrow or blood cells from chronic myeloid leukemia: Adhesion molecules and differentiation antigens as detected by immunocytochemistry." Folia Biologica **40**: 439-454.
- Patel, S.D., Papoutsakis, E.T., Winter, J.N., Miller, W.M. (2000). "The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures." Biotechnology Progress **16**: 885-892.
- Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., Lider, O., Alon, R., Zipori, D., Lapidot, T. (1999). "Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4." Science **283**: 845-848.
- Pesce, M., Di Carlo, A., De Felici, M. (1997). "The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture." Mechanisms of Development **68**: 37-44.

- Peters, C., O'Shea, K.S., Campbell, A.D., Wicha, M.S., Long, M.W. (1990). "Fetal expression of hemonectin: An extracellular matrix hematopoietic cytoadhesion molecule." Blood **75**: 357-364.
- Peters, M., Müller, A.M., Rose-John, S. (1998). "Interleukin-6 and soluble Interleukin-6 receptor: Direct stimulation of gp130 and hematopoiesis." Blood **92**: 3495-3504.
- Petzer, A. L., Zandstra, P.W., Piret, J.M., Eaves, C.J. (1996). "Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: Novel responses to Flt3-Ligand and thrombopoietin." Journal of Experimental Medicine **183**: 2551-2558.
- Petzold, K., Ordemann, R., Hölig, K., Drahs, T., Schaffer, B., Ehninger, G. (1999). "DNS-BB cord blood bank experiences of the dresdner cord blood bank promoted by the DKMS." Onkologie **22** (Supplement 1): 179.
- Piacibello, W., Sanavio, F., Garetto, L., Severino, A., Bergandi, D., Ferrario, J., Fagioli, F., Berger, M., Aglietta, M. (1997). "Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood." Blood **89**: 2644-2653.
- Piacibello, W., Sanavio, F., Garetto, L., Severino, A., Danè, A., Gammaitoni, L., Aglietta, M. (1998 a). "Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self-renewal and amplification vs. proliferation and differentiation." Leukemia **12**: 718-727.
- Piacibello, W., Sanavio, F., Severino, A., Garetto, L., Dane, A., Gammaitoni, L., Aglietta, M. (1998 b). "Ex vivo expansion of cord blood progenitors." Vox sanguinis **74** (Suppl. 2): 457-462.
- Piacibello, W., Sanavio, F., Severino, A., Danè, A., Gammaitoni, L., Fagioli, F., Perissinotto, E., Cavalloni, G., Kollest, O., Lapidot, T., Aglietta, M. (1999). "Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice on human CD34+ cord blood cells after ex vivo expansion: Evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells." Blood **93**: 3736-3749.
- Ploemacher, R. E. (1997). Stem cells: Characterization and measurement. Baillière's Clinical Haematology. **10**: 429-444.
- Potten, C. S., Loeffler, M. (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties lessons for and from the Crypt." Development **110**: 1011-1020.
- Primrose, S. (1990). Biotechnologie - Grundlagen, Anwendungen, Perspektiven. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Punzel, M., Wissingk, S.D., Miller, J.S., Moore, K.A., Lemischka, I.R., Verfaillie, C.M. (1999). "The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro." Blood **93**: 3750-3756.
- Purdy, M. H., Hogan, C.J., Hami, L., McNiece, I., Franklin, W., Hones, R.B., Bearman, S.I., Berenson, R.J., Cagnoni, P.J., Heimfeld, S., Shpall, E.L. (1995). "Large volume ex vivo expansion of CD34-positive hematopoietic progenitor cells for transplantation." Journal of Hematotherapy **4**: 515-525.
- Raffi, S., Shapiro, F., Rimarachin, J., Nachman, R.L., Ferris, B., Weksler, B., Moore, M.A., Asch, A.S. (1994). "Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion." Blood **84**: 10-19.
- Ramsfjell, V., Borge, O.J., Cui, L., Jacobsen, S.E.W. (1997). "Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34+CD38-) human bone marrow progenitor cells." The Journal of Immunology **158**: 5169-5177.
- Ramsfjell, V., Bryder, D., Björgvinsdottir, H., Kornfält, S., Nilsson, L., Borge, O.J., Jacobsen, S.E.W. (1999). "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 **94**: 4093-4102.
- Rappold, I., Watt, S.M., Kusadasi, N., Rose-John, S., Hatzfeld, J., Ploemacher, R.E. (1999). "Gp130 signaling synergizes with FL and TPO for the long-term expansion of cord blood progenitors." Leukemia **13**: 2036-2048.

- Rapraeger, A. C., Krufka, A., Olwin, B.B. (1991). "Requirement of heparin-sulfat for b-FGF mediated fibroblast growth and myoblast differentiation." Science **252**: 1705-1708.
- Reddy, G. P. V., Tiarks, C.Y., Pang, L., Wu, J., Hsieh, C.-C., Quesenberry, P.J. (1997). "Cell cycle analysis and synchronisation of pluripotent hematopoietic progenitor stem cells." Blood **90**: 2293-2299.
- Reems, J. A., Torok-Storb, B. (1995). "Cell cycle and functional differences between CD34+/CD38 high and CD34+/CD38 low human marrow cells after in vitro cytokine exposure." Blood **85**: 1480-1487.
- Rich, I. N. (1982). "The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells in vitro." British Journal of Haematology **52**: 579-588.
- Rich, I. N. (1986). "A role for the macrophage in normal hemopoiesis. II. Effect of varying physiological oxygen tensions on the release of hemopoietic growth factors from bone-marrow-derived macrophages in vitro." Experimental Hematology **14**: 746-751.
- Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T.D., Bloomfield, F., Dexter, T.M. (1988). "Heparan sulfate bound growth factors: A mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis." Nature **332**: 376-378.
- Roots-Weiß, A., Papadimitriou, C., Serve, H., Hoppe, B., Koenigsmann, M., Reufi, B., Oberberg, D., Thiel, E., Berdel, W.E. (1997). "The efficiency of tumor purging using immunomagnetic CD34+ cell separation systems." Bone Marrow Transplantation **19**: 1239-1246.
- Rosendaal, M., Mayen, A., de Koning, A., Dunina-Barkovskaya, T., Krenács, T., Ploemacher, R. (1997). "Does transmembrane communication through gap junctions enable stem cells to overcome stromal inhibition?" Leukemia **11**: 1281-1289.
- Rowlings, P. A. (1999). Allogenic hematopoietic stem cell transplantation. Ex Vivo Cell Therapy. K. Schindhelm, Norton, R. San Diego, Academic Press: 85-97.
- Sadahira, Y., Mori, M., Kimoto, T. (1990). "Isolation and short-term culture of mouse splenic erythroblastic islands." Cell Structure and Function **15**: 59-65.
- Saeland (1992). "Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells." Experimental Hematology **20**: 24-33.
- Sakabe, H., Yahate, N., Zeng, Z.Z., Minamiguchi, H., Kaneko, H., Mori, K.J., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J.H. (1998). "Human cord blood-derived primitive progenitors are enriched in CD34+c-kit- cells: Correlation between long-term culture-initiating cells and telomerase expression." Leukemia **12**: 728-734.
- Sandstrom, C. E., Bender, J.G., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M. (1995). "Effects of CD34+ cell selection and perfusion on ex vivo expansion of peripheral blood mononuclear cells." Blood **86**: 958-970.
- Sandstrom, C. E., Bender, J.G., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T. (1996). "Development of novel perfusion chamber to retain nonadherent cells and its use for comparison of human "mobilized" peripheral blood mononuclear cell cultures with and without irradiated bone marrow stroma." Biotechnology and Bioengineering **50**: 493-504.
- Sardonini, C. A., Wu, Y.-J. (1993). "Expansion and differentiation of human hematopoietic cells from static cultures through small-scale bioreactors." Biotechnology Progress **9**: 131-137.
- Sato, T., Laver, J.H., Ogawa, M. (1999). "Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells." Blood **94**: 2548-2554.
- Schillberg, S., Fischer, R. (1994). Molekularbiologie Praktikum II: Klonierung, Modifikation und Expression von Fremdgenen in heterologen Systemen und Analyse ihrer Proteinprodukte, Botanisches Institut der RWTH-Aachen.
- Schmidt, S. (2000). Verfahrenstechnik für die Kultivierung hämatopoietischer Zellen. Aachen, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule.

- Schröder, B. (1997). Kultivierung und Charakterisierung von hämopoietischen und stromalen Zellen zur Knochenmark-Simulation im Bioreaktor. Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität.
- Schwartz, R. M., Palsson, B.O., Emerson, S.G. (1991). "Rapid medium perfusion rate significantly increases the productivity and longevity of human bone marrow cultures." Proceedings of the National Academy of Sciences **88**: 6760-6764.
- Shaw, S. (1994). "Leukocyte differentiation antigens." Human Immunology **41**: 103-104.
- Shih, C.-C., Hu, M.C.-T., Hu, J., Medeiros, J., Forman, S.J. (1999). "Long-term ex vivo maintenance and expansion of transplantable human hematopoietic stem cells." Blood **94**: 1623-1636.
- Shih, C. C., Hu, M.C., Weng, Y., Yazaki, P.J., Medeiros, J., Forman, S.J. (2000). "A secreted and LIF-mediated stromal cell-derived activity that promotes ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells." Blood **95**: 1957-1966.
- Shimizu, Y., Ogawa, M., Kobayashi, M., Almeida-Porada, G., Zanjani, E.D. (1998). "Engraftment of cultured human hematopoietic cells in sheep." Blood **91**: 3688-3692.
- Shirihai, O., Attali, B., Dagan, D., Merchav, S. (1998). "Expression of two inward rectifier potassium channels is essential for differentiation of primitive human hematopoietic progenitor cells." Journal of Cellular Physiology **177**: 197-205.
- Simmons, P. J., Zannettino, A., Gronthos, S., Leavesley, D.L. (1994). "Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma." Leukemia and Lymphoma **12**: 353-363.
- Simmons, P. J., Haylock, D.N., Lévesque, J.-P. (1999). Influence of cytokines and adhesion molecules on hematopoietic stem cell development. Ex Vivo Cell Therapy. K. Schindhelm, Nordon, R. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press: 51-83.
- Singer, N. G., Todd, R.F., Fox, D.A. (1994). "Structures on the cell surface." Arthritis and Rheumatism **37**: 1245-1248.
- Small (1994). "STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**: 459-463.
- Smith, S., Broxmeyer, H.E. (1986). "The influence of oxygen tension on the long-term growth in vitro of haematopoietic progenitor cells from human cord blood." British Journal of Haematology **63**: 29-34.
- Smith, S. P., Yee, G.C. (1992). "Hematopoiesis." Pharmacotherapy **12**: 11S-19S.
- Somville, T., Kögler, G., Enczmann, J., Adams, O., Krempe, C., Däubener, W., Göbel, U., Bender, H.G., Wernet, P. (1996). "Plazentares Restblut als Stammzelltransplantat." PerinatalMedizin **8**: 93-99.
- Spyridonidis, A., Schmidt, M., Bernhardt, W., Papadimitriou, A., Azemar, M., Wels, W., Groner, B., Henschler, R. (1998). "Purging of mammary carcinoma cells during ex vivo culture of CD34+ hematopoietic progenitor cells with recombinant immunotoxins." Blood **91**: 1820-1827.
- Stark, D. (1975). Embryologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Strauss, L. C., Welsh, S.B., Civin, C.I. (1991). "Initiation in DNA synthesis by colony-stimulating factors in subsets of human CD34+ marrow cells." Experimental Hematology **19**: 734-741.
- Strengers, P. F. W., van Aken, W.G. (1996). Blut. Heidelberg, Spektrum, Akademischer Verlag.
- Stryer, L. (1990). Biochemie. Heidelberg, Spektrum, Akademischer Verlag.
- Sumida, S., Oshikawa, K. (1999). "How long can we cryopreserve stem cells? Eighty percent of progenitors are viable for 33 years in liquid nitrogen." Cryobiology **39**: 290.

- Sutherland, D. R., Yeo, E.L., Stewart, A.K., Nayar, R., DiGiusto, R., Zanjani, E., Hoffman, R., Murray, L.J. (1996). "Identification of CD34+ subsets after glycoprotease selection: Engraftment of CD34+Thy-1+Lin- stem cells in fetal sheep." Experimental Hematology **24**: 795-806.
- Sutherland, H. J., Eaves, C.J., Lansdorp, P.M., Thaker, J.D., Hogge, D.E. (1991). "Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells." Blood **78**: 666-672.
- Sutherland, H. J., Hogge, D.E., Cook, D., Eaves, C.J. (1993). "Alternative mechanisms with and without steel factor support primitive human hematopoiesis." Blood **81**: 1465-1470.
- Sutherland, H. J., Eaves, C.J. (1994). Long-term culture of human myeloid cells, Wiley-Liss, Inc.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hunsher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., Shaw, S. (1993). "T-cell adhesion induced by proteoglycan immobilized cytokine." Nature **361**: 79-82.
- Thalmeier, K., Meißner, P., Reisbach, G., Falk, M., Brechtel, A., Dörmer, P. (1994). "Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity." Blood **83**: 1799-1807.
- Thoma, S. J., Lamping, C.P., Ziegler, B.L. (1994). "Phenotype analysis of hematopoietic CD34+ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-Polymerase chain reaction." Blood **83**: 2103-2114.
- To, L. B., Haylock, D.N., Simmons, P.J., Juttner, C.A. (1997). "The biology and clinical use of blood stem cells." Blood **89**: 2233-2258.
- Todisco, E., Suzuki, T., Srivannaboon, K., Coustan-Smith, E., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Kitanaka, A., Campana, D. (2000). "CD38 ligation inhibits normal and leukemic myelopoiesis." Blood **95**: 535-542.
- Toksoz, D., Dexter, T.M., Lord, B.I., Wright, E.G., Lajtha, L.G. (1980). "The regulation of hemopoiesis in long-term bone marrow culture. II. Stimulation and inhibition of stem cell proliferation." Blood **55**: 931-936.
- Toksoz, D., Zsebo, K.M., Smith, K.A., Hu, S., Brankow, D., Suggs, S.V., Martin, F.H., Williams, D.A. (1992). "Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog and the steel gene product, stem cell factor." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**: 7350-7354.
- Tordjman, R., Ortéga, N., Coulombel, L., Plouet, J., Romeo, P.-H., Lemarchandel, V. (1999). "Neuropilin-1 is expressed on bone marrow stromal cells: a novel interaction with hematopoietic cells?" Blood **94**: 2301-2309.
- Tsuji, T., Nishimura-Morita, Y., Watanbe, Y., Hirano, D., Nakanishi, S., Mori, K.J., Yatsunami, K. (1999). "A murine stromal cell line promotes the expansion of CD34 high+-primitive progenitor cells isolated from human umbilical cord blood in combination with human cytokines." Growth Factors **16**: 225-240.
- Turner, M. L., Masek, L.C., Hardy, C.L., Parker, A., Sweetenham, J.W. (1998). "Comparative adhesion of human haematopoietic cell lines to extracellular matrix component, bone marrow stromal and endothelial cultures." British Journal of Haematology **100**: 112-122.
- Van der Rest, M., Garrone, R. (1991). "Collagen family of proteins." FASEB Journal **5**: 2814-2823.
- Van Zant, G., Rummel, S.A., Koller, M.R., Larson, D.B., Drubachevsky, I., Palsson, M., Emerson, S.G. (1994). "Expansion in bioreactors of human progenitor populations from cord blood and mobilized peripheral blood." Blood Cells **20**: 492-497.
- Varani, J., Piel, F., Josephs, S., Beals, T.F., Hillegas, W.J. (1998). "Attachment and growth of anchorage-dependent cells on a novel, charged-surface microcarrier under serum-free conditions." Cytotechnology **28**: 101-109.
- Verfaillie, C., Hurley, R., Bhatia, R., McCarthy, J.B. (1994). "Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis." Critical Reviews in Oncology/Hematology **16**: 201-224.

- Verfaillie, C. M. (1992). "Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis." Blood **79**: 2821-2826.
- Verfaillie, C. M., Catanzaro, P. (1996). "Direct contact with stroma inhibits proliferation of human long-term culture initiating cells." Leukemia **10**: 498-504.
- Verfaillie, C. M. (1998). "Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process." Blood **92**: 2609-2612.
- Verfaillie, C. M. (2000). "Meeting report on an NHLBI workshop on ex vivo expansion of stem cells, July 29, 1999, Washington, D.C." Experimental Hematology **28**: 361-364.
- von Heyden, H. W. (1978). Die ortsständigen Knochenmarkzellen. Das Knochenmark: Morphologie, Funktion, Diagnostik. W. Queißer. Stuttgart, Thieme Verlag: 99-107.
- von Keyserlingk, D. G. (1978). Anatomie des Knochenmarks. Das Knochenmark: Morphologie, Funktion, Diagnostik. W. Queißer. Stuttgart, Thieme Verlag: 78-98.
- Wang, J. C. Y., Doedens, M., Dick, J.E. (1997). "Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay." Blood **89**: 3919-3924.
- Wang, T.-Y., Mantalaris, A., Wu, J.H.D. (1994). A novel three-dimensional long-term bone marrow bioreactor culture system. Animal Cell Technology: Basic and applied aspects. T. Kobayashi, Kluwer Academic Publishers. **6**: 115-120.
- Wang, T.-Y., Brennan, J.K., Wu, J.H.D. (1995). "Multilineal hematopoiesis in a three-dimensional murine long-term bone marrow culture." Experimental Hematology **23**: 26-32.
- Wang, T.-Y. W., J.H.D. (1992). "A continuous perfusion bioreactor for long-term bone marrow culture." Annals of the New York Academy of Sciences **665**: 274-284.
- Warburton, P. E., Greig, G.M., Haaf, T., Huntington, F.W. (1991). "PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: Definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis." Genomics **11**: 324-333.
- Waterhouse, E. J., Quesenberry, P.J., Balian, G. (1986). "Collagen synthesis by murine bone marrow cell culture." Journal of Cellular Physiology **127**: 397-402.
- Waymouth, C. (1970). "Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells." In Vitro **6**: 109-127.
- Weaver, A., Ryder, W.D.J., Testa, N.G. (1997). "Measurement of long-term culture initiating cells (LTC-ICs) using limiting dilution: Comparison of endpoints and stromal support." Experimental Hematology **25**: 1333-1338.
- Weissman, I. L. (1994). "Developmental switches in the immune system." Cell **76**: 207-218.
- West, C. M., DeWeerd, H., Dowdy, K., DeLaPaz, A. (1984). "A specificity for cellular fibronectin in its effect on cultured chondroblasts." Differentiation **27**: 67-73.
- Whitlock, C. A., Robertson, D., Witte, O.N. (1984). "Murine B cell lymphopoiesis in long term culture." Journal of Immunological Methods **67**: 353-369.
- Wilkins, B. S. (1992). "Histology of normal haemopoiesis: Bone marrow histology I." Journal of Clinical Pathology **45**: 645-649.
- Wineman, J., Moore, K., Lemischka, I., Müller-Sieburg, C. (1996). "Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: Rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells." Blood **87**: 4082-4090.
- Xiao, M., Oppenlander, B.K., Plunkett, J.M., Dooley, D.C. (1999). "Expression of Flt3 and c-kit during growth and maturation of human CD34+CD38- cells." Experimental Hematology **27**: 916-927.

- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D.W. (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **90**: 5002-5012.
- Young, J. C., DiDiusto, D., Backer, M.P. (1995). "In vitro characterization of fetal hematopoietic stem cells: Range and kinetics of cell production from individual stem cells." Biotechnology and Bioengineering **50**: 465-478.
- Zandstra, P. W., Eaves, C.J., Piret, J.M. (1994). "Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells." Bio/Technology **12**: 909-914.
- Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Livingston, A.G., Flake, A.W., Ogawa, M. (1998). "Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo, and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells." Experimental Hematology **26**: 353-360.
- Ziegler, B. L., Valitieri, M., Almeida-Porada, G., De Maria, R., Müller, R., Masella, B., Gabbianelli, M., Casella, I., Pelosi, E., Bock, T., Zanjani, E.D., Peschle, C. (1999). "KDR receptor: A key marker defining hematopoietic stem cells." Science **285**: 1553-1558.
- Zon, L. I. (1995). "Developmental biology of hematopoiesis." Blood **86**: 2876-2891.
- Zsebo, K. M., Williams, D.A., Geissler, E.N., Broudy, V.C., Martin, F.H., Atkins, H.L., Hsu, R.Y., Birkett, N.C., Okio, K.H., Murdock, D.C. (1990). "Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse, and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor." Cell **63**: 213-214.

Anhang

Herstellernachweis der verwendeten Chemikalien, Medien, Medienzusätze und Geräte

Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	SIGMA, Deisenhofen
Adenosin	SIGMA, Deisenhofen
Agarose	Serva, Heidelberg
Casyton	Schärfe System, Reutlingen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase Typ IA	SIGMA, Deisenhofen
D-Glukose	SIGMA, Deisenhofen
DNA-Längenstandard XIV	Boehringer Mannheim, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie, Deisenhofen
Di-Natriumphosphat	Fluka Chemie, Deisenhofen
Ethanol	Werner Hofman, Düsseldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natriumsalz	Serva, Heidelberg
FACS-Lysing Solution	BD PharMingen, Heidelberg
FACS-Clean	BD PharMingen, Heidelberg
FACS-Flow	BD PharMingen, Heidelberg
FACS-Safe	BD PharMingen, Heidelberg
Ficoll	Biochrom, Berlin
Geneticin (G418)	Life Technologies, Karlsruhe
Gentamicin	Life Technologies, Karlsruhe
Heparin-Natrium	B. Braun, Melsungen
Hydrocortison	SIGMA, Deisenhofen
Hygromycin	SIGMA, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Fluka Chemie, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie, Deisenhofen
Kristallviolett	Serva, Heidelberg
L-Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumbenzoat	SIGMA, Deisenhofen
Natriumchlorid	Biochrom, Berlin
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCR Nukleotid Mix	Boehringer Mannheim, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Karlsruhe
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenolrot	SIGMA, Deisenhofen
Proteinase K	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Rotiform (PCI-Lösung)	Carl Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt

Taq DNA-Polymerase	Boehringer Mannheim, Mannheim
Theophyllin	SIGMA, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris-Cl	Merck, Darmstadt
Glutardialdehyd	SIGMA, Deisenhofen
Trypanblau	SIGMA, Deisenhofen
Trypsin	Life Technologies, Karlsruhe
Zitronensäure	SIGMA, Deisenhofen

Medien und Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller
BSA Fraktion V	Life Technologies, Karlsruhe
Fötale Rinderserum (FBS)	Life Technologies, Karlsruhe
IMDM	Life Technologies, Karlsruhe
McCoys 5a	Life Technologies, Karlsruhe
MC-Medium (MethoCult GF H4434)	CellSystems, St. Katharinen
Pferdeserum (HS)	Boehringer Mannheim, Mannheim
X-Vivo 10	BioWhittaker, Taufkirchen

Geräte und Labormaterial

Bezeichnung	Hersteller
Aminosäure HPLC, Amino Quant 1090 AX	Hewlett Packard, Waldbronn
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Begasungsbrutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Deckel für Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Einfrierbox	Nalgene, Wiesbaden
Einwegsterilfilter	Pall Deutschland, Dreieich
Finn-Pipetten	Labsystems, Helsinki, Finnland
Fluorometer, Wallac Victor ²	PerkinElmer Life Sciences, Bad Wildbad
Gewebekulturflaschen	Greiner, Solingen
Gewebekulturplatten, 12 Vertiefungen	Falcon, Heidelberg
Gewebekulturplatten, 96 Vertiefungen	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturschalen für MC-Assay	Greiner, Solingen
Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Glukose Analysator, Ebio compact	Eppendorf, Hamburg
Glutamin/Glutamat Analysator	YSI, Yellow Springs, OH, USA
Invertmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Kabelbinder	Carl Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Düren
Kühlzentrifuge, GPKR	Beckmann Instruments, München
Kultur-Beutel	American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD, USA
Laborzentrifuge, Typ 302	Sigma Laborzentrifugen, Osterode

Laktat Analysator	YSI, Yellow Springs, OH, USA
Laminar-Flow Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Luftfilter	Pall Deutschland, Dreieich
Magnetic Cell Separator, Vario MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Magnetrührantrieb mit zwölf Rührstellen	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Magnetrührstäbe	neoLab Migge, Heidelberg
Massendurchflussventile (O ₂ , CO ₂ , Luft)	Brooks Instrument, Veenendaal, NL
Mediensterilfilter	Sartorius, Göttingen
Mehrkanalpipetten	Biohit, Köln
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Osmometer, Osmomat O30	Gonotec, Berlin
Partikelzählgerät, CASY1	Schärfe System, Reutlingen
PCR-Block, PTC-100	MJ Research, Inc., USA
Phasenkontrastmikroskop	Nikon, Düsseldorf
pH-Einstabmesskette	Mettler-Toledo, Steinbach/TS
pH-Verbindungskabel	Mettler-Toledo, Steinbach/TS
pH-Verstärker	Mettler-Toledo, Steinbach/TS
Pipettenspitzen	Greiner, Solingen und Eppendorf, Hamburg
pO ₂ -Elektrode	Mettler-Toledo, Steinbach/TS
pO ₂ -Verbindungskabel	Mettler-Toledo, Steinbach/TS
pO ₂ -Verstärker	Mettler-Toledo, Steinbach/TS
Pumpenschläuche, Marprene	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reaktorgefäß	Forschungszentrum Jülich, Jülich
Reinstwasseranlagen, RO-80 und Milli-Q	Millipore, Eschborn
Schlauchpumpen	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Schlauchverbinder	Carl Roth, Karlsruhe
Schnellkupplung für Wärmebadzuleitung	Walther, Wuppertal
Silikonschlauch	BIW Isolierstoffe, Ennepetal
Steuereinheit für Massendurchflussventile	Brooks Instrument, Veenendaal, NL
Stickstofftank	Messer Griesheim, Krefeld
Tischzentrifuge, Biofuge B	Heraeus Instruments, Hanau
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Wärmebäder	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda
Zentrifuge, SIGMA 2K15	B. Braun Biotechnologie, Melsungen
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Solingen

Verwendete Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
BSA-Lösung	10% BSA in PBS, sterilfiltrieren
G418	Stammlösung: 100 mg/mL, Lösung in Milli-Q-Wasser, sterilfiltrieren und aliquotiert bei -20°C lagern
Hygromycin	Stammlösung: 100 mg/mL, Lösung in Milli-Q-Wasser, sterilfiltrieren und aliquotiert bei 4°C lagern
Kristallviolett-Lösung	0,1 M Zitronensäure, 0,1 % w/v Kristallviolett Lösung in Milli-Q-Wasser
PBS (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+})	Zehnfachkonzentrat: 1,37 M NaCl, 0,08 M Na_2HPO_4 , 0,015 M KH_2PO_4 , 0,027 M KCl; Zum Gebrauch Stammlösung 1:10 mit Milli-Q-Wasser verdünnen, pH auf 7,2-7,3 einstellen, autoklavieren.
PBS (A/T)	PBS (pH 7,4), 1 mM Adenosin, 2 mM Theophyllin
PCR-Lyse-Puffer	100 mM Tris-Cl (pH 8,5), 5 mM EDTA (pH 8,0), 0,2 % SDS, 200 mM NaCl, 100 µg/mL Proteinase K
Puffer für Medien-Analysatoren	5,1 g/L NaCl, 5,0 g/L Na_2HPO_4 , 1,0 g/L NaH_2PO_4 , 0,3 g/L Na-Benzoesäure, 0,5 g/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 50 mg/L Genatmicin; pH 7,3 und 0,27 Osmol/kg
Selektionsmedien	M2-10B4 mod: IMDM, 10% FCS, 0,4 mg/mL G418, 0,06 mg/mL Hygromycin SI/SI: IMDM, 10% FCS, 0,8 mg/mL G418, 0,125 mg/mL Hygromycin

Zusammensetzung des P-LTC-Mediums

Bezeichnung	Stammlösung	Anteil im Medium
McCoys 5a		68,80%
FCS		12,50%
HS		12,50%
Glutamin	200 mM	1%
Na Bicarbonat		1%
Na Pyruvat		1%
non ess AS	100x	0,4%
ess AS	50x	0,8%
Vitamin		1%
alpha Thioglycerol	0,02 M	0,5%
Hydrocortison	0,0002 M	0,5%

Angaben zur PCR

Struktur der Primer

17 α 1	5'- AAT TTC AGC TGA CTA AAC A -3'	c = 100 μ M
17 α 2	5'- TTT AGT TAG GTG CAG TTA T -3'	c = 100 μ M

(Hersteller: ARK Scientific, Frankfurt)

Die Primer werden vor der PCR mit sterilem Wasser 1:10 verdünnt. Im nächsten Schritt kommen 10 μ L DNA dazu.

PCR-Master-Mix (Angaben für einen PCR Ansatz)

10x dNTP's	2 μ L
10x PCR-Puffer (inklusive MgCl ₂)	10 μ L
Primer 17 α 1 (10 μ M)	5 μ L
Primer 17 α 2 (10 μ M)	5 μ L
Steriles Wasser	67,2 μ L
Summe 89,2 μ L	

In jeden Ansatz kommen 10 μ L DNA dazu und nach dem „Hot-start“ 0,8 μ L Polymerase.
Gesamtvolumen je Ansatz: 100 μ L.

Protokoll der Amplifikation

1 Zyklus	94°C	2 min
30 Zyklen	94°C	60 sec
	55°C	60 sec
	72°C	2 min
1 Zyklus	72°C	10 min
Bis zur Weiterverarbeitung	4°C	

Die PCR-Produkte werden mit 16 μ L 6fach DNA-Ladepuffer versetzt und 20 μ L dieser Mischung auf das Gel aufgetragen. Vom Marker werden 4 μ L eingesetzt, die mit 7 μ L Wasser und 2,5 μ L 6xDNA-Ladepuffer (mit Bromphenolblau) vermengt auf das Gel aufgetragen werden.

Berechnung der Zellkonzentrationen auf Collagen-Trägern nach Trägerlyse

$$m_{\text{Röhrchen mit Stahlpartikeln nach Lyse, trocken}} - m_{\text{Röhrchen}} = m_{\text{Stahlpartikel nach Lyse}} \quad (\text{A.1.})$$

mit: m = Gewicht

$$m_{\text{Stahlpartikel}} \cdot 1,065 = m_{\text{Collagenträger}} \quad (\text{A.2.})$$

1,065 ist der Umrechnungsfaktor von Stahlpartikel nach der Lyse auf die unlysierten Träger

(1,065 g trockene Collagenträger / g Stahlpartikel nach Lyse)

$$\frac{Z_{\text{ermittelte Gesamtzellzahl der Probe}}}{m_{\text{Collagenträger, trocken}}} = c \quad (\text{A.3.})$$

mit: Z = Zellzahl

c = Zelldichte (Zellen/g Träger)

Berechnung der Zellkonzentrationen auf Collagen-Trägern nach Kristallviolettffärbung

$$m_{\text{Röhrchen (Träger/Kristallviolett, trocken)}} - m_{\text{Röhrchen}} - (V_{\text{Kristallviolettlösung}} \cdot \delta_{\text{Kristallviolettlösung}}) = m_{\text{Collagenträger}} \quad (\text{A.4.})$$

mit: V = Volumen

δ = Dichte

Die weitere Berechnung erfolgt wie unter A.3. beschrieben. = Dichte

Forschungszentrum Jülich



Jül-3863
April 2001
ISSN 0944-2952