

***In vitro* Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen durch Komponenten der Stammzellnische**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Thomas Walenda
aus
Bielefeld

Berichter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. rer. nat. Wolfgang Wagner
 Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Martin Zenke

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2011

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

1	Einleitung	1
1.1	Definition und physiologisches Vorkommen von Stammzellen	1
1.1.1	Eigenschaften von Stammzellen	1
1.1.2	Hämatopoetische Stammzellen	3
1.1.3	Asymmetrische Zellteilung.....	5
1.1.4	Hämatopoetische Stammzellnische im Knochenmark	6
1.1.5	Mobilisation und Homing	10
1.2	Kultivierung und Analyse von hämatopoetischen Stammzellen <i>in vitro</i>	12
1.2.1	Isolation von hämatopoetischen Progenitorzellen.....	12
1.2.2	Mesenchymale Stromazellen	12
1.2.3	Die Stromale Funktion von MSC	15
1.2.4	<i>In vitro</i> Assays zur Analyse des Stammzellpotentials	17
1.2.5	Zellalterung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	18
1.3	Klinische Relevanz und therapeutisches Potential	20
1.3.1	Erkrankungen des blutbildenden Systems mit Bezug zu dieser Arbeit.....	20
1.3.2	Transplantation von HPC bei hämatopoetischen Erkrankungen und hämatopoetische Rekonstitution	22
1.4	Ziele dieser Arbeit.....	22
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Primärantikörper.....	25
2.1.2	Sekundärantikörper	25
2.1.3	FACS-Antikörper	25
2.1.4	Chemikalien	25
2.1.5	Molekularbiologische Chemikalien und Kits.....	26
2.1.6	siRNA Konstrukte und Primer.....	26
2.1.7	PCR-Programme und Mastermixe.....	27
2.1.8	Zellkulturmedien und Puffer.....	29
2.1.9	Zellen	31
2.1.10	Geräte	31

2.1.11	Verbrauchsmaterial und Glaswaren	32
2.1.12	Software.....	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Isolation und Separation der MSC.....	34
2.2.2	Kultivierung der MSC	35
2.2.3	Passagieren und Kryokonservierung der MSC	35
2.2.4	Isolation und Separation der HPC	35
2.2.5	Durchflusszytometrie und Zellsortierung.....	36
2.2.6	Ko- / Kultivierung der HPC	37
2.2.7	Bestrahlung von MSC	38
2.2.8	Durchflusszytometrische Untersuchungen	38
2.2.9	CFSE-Färbung.....	39
2.2.10	PKH-26 Färbung	40
2.2.11	MTT-Proliferationsassay.....	40
2.2.12	Zellzahlbestimmungen mit dem Casy-Zellzähler	41
2.2.13	Colony-Forming-Unit und Cobblestone Area-forming Cell Assays.....	41
2.2.14	Long-Term-Culture Initiating Cell Assay	42
2.2.15	siRNA Transfektion von adhären MSC	44
2.2.16	RNA Isolation und Integritätskontrolle.....	44
2.2.17	cDNA-Generierung und qRT-PCR.....	45
2.2.18	Proteinisolation und Western-Blot	46
2.2.19	Gewinnung von humanem Plättchenlysate.....	47
2.2.20	Gewinnung von humanem Serum aus Peripherblut.....	48
2.2.21	Analyse der Zytokinzusammensetzung mittels Ray Biotech Membranen	48
2.2.22	Zelltransplantation in NOD/SCID Mäuse	49
2.2.23	Gewebeanalyse der NOD/SCID Mäuse.....	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Kokultur mit MSC erhöht die Proliferation und den Erhalt des Stammzellcharakters von HPC	51
3.1.1	MSC unterstützen die Proliferation primitiver HPC	51
3.1.2	Kokultivierung mit MSC resultiert in schnellteilenden Zellen mit elongierter Morphologie.....	52
3.1.3	Simultane Analyse der Zellteilungen und des Immunphänotyps.....	53
3.1.4	Replikative Seneszenz von MSC beeinflusst ihre stromale Funktion.....	55

3.1.5	Der MAPK1-Signalweg ist in der Proliferation und Differenzierung von HPC beteiligt	56
3.1.6	Interaktion von HPC mit MSC wird durch bestimmte Adhäsionsproteine reguliert	58
3.2	Expansion von HPC wird von einem komplexen Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und MSC reguliert.....	60
3.2.1	Vergleich verschiedener Kulturbedingungen zur Verstärkung der <i>in vitro</i> Expansion von HPC.....	60
3.2.2	Wachstumsfaktoren zusammen mit MSC Kokultur erhalten HPC mit primitivem Immunphänotyp.....	61
3.2.3	Kokultivierung mit MSC unter Zytokinzusatz expandiert CFU-initiierende Zellen.....	65
3.2.4	Transplantation von HPC in NOD/SCID Mäuse.....	67
3.3	Serum nach autologer Transplantation stimuliert die Proliferation und Expansion von HPC	69
3.3.1	Serum isoliert nach HSCT stimuliert die Proliferation von HPC	69
3.3.2	Serum isoliert nach HSCT wirkt dem Verlust von CD34 Expression entgegen	71
3.3.3	Serum isoliert nach HSCT verstärkt die CFU-Bildung.....	73
3.3.4	Hochregulation von Differenzierungsmarkern unter verschiedenen Serumzusätzen.....	74
3.3.5	Chemokinprofile der Serumproben.....	76
4	Diskussion	81
4.1	Analyse des Einflusses von Kokultur und bestimmter Proteine auf die <i>in vitro</i> Expansion von HPC	81
4.2	Systematischer Einsatz verschiedener Wachstumsfaktoren und Optimierung der <i>in vitro</i> Expansionsbedingungen.....	87
4.3	Serum nach autologer Transplantation stimuliert die Proliferation und Expansion von HPC während <i>in vitro</i> Kultivierung.....	90
4.4	Schlussfolgerung.....	92

5	Zusammenfassung	94
6	Abstract.....	95
7	Literaturverzeichnis.....	96
8	Danksagung	119
9	Lebenslauf.....	120
10	Eigene Veröffentlichungen	121

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Ak	Antikörper
ANGPTL5	Angiopoietin-like-5
APC	Allophycocyanin
AT	Fettgewebe (adipose tissue)
BM	Knochenmark (bone marrow)
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serenalbumin
cDNA	komplementäre DNA-Kopie von RNA
CFSE	5-(6)-Carboxyfluorescein-diacetat-N-succinimidylester
CFU	koloniebildende Einheit (colony forming unit)
CFU-E	erythroide koloniebildende Einheit
CFU-G	granulozytäre koloniebildende Einheit
CFU-M	makrophagenartige koloniebildende Einheit
CB	Nabelschnurblut (umbilical cord blood)
CD	Differenzierungsklaster (cluster of differentiation)
CDH-11	Cadherin-11
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EPO	Erythropoietin
ESC	embryonale Stammzelle
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblast growth factor
Ficoll	Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FCS	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

G-CSF	Granulozyten koloniebildender Faktor (granulocyte colony-stimulating factor)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniebildender Faktor (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HSC	hämatopoetische Stammzellen
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HPC	hämatopoetische Progenitorzellen
HRP	Meerrettichperoxidase
IGFBP2	insulin-like growth factor-binding protein 2
IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbecco Medium
iPSC	induzierte Pluripotenz
ITGB1	Integrin-beta-1
ITS	Insulin Transferrin Selen
LG	wenig (low) Glukose
LTC-IC	Langzeitkultur-initiierende Zelle (long-term-culture initiating-cell)
MACS	magnetische Zellsortierung
M-CSF	Makrophagen koloniebildender Faktor (macrophage colony-stimulating factor)
MeV	Mega-Elektronenvolt
MM	multiples Myelom
MNC	mononukleäre Zellen
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
mPB	Mobilisiertes Peripherblut
mRNA	Messenger RNA
MSC	mesenchymale Stroma- / Stammzellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N-Cdh	N-Cadherin
NOD/SCID	non-obese diabetic / severe combined immunodeficiency
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PB	Peripherblut
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived-growth-factor
PE	Phycoerythrin

PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pHPL	gepooltes humanes Plättchenlysate
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen (rounds) pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
SFEM	serumfreies Expansionsmedium
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
TPO	Thrombopoietin
U	Unit (Enzymeinheit)
V	Volt
VCAM-1	vaskuläres (cell-) Zelladhäsionsmolekül 1

1 Einleitung

1.1 Definition und physiologisches Vorkommen von Stammzellen

1.1.1 Eigenschaften von Stammzellen

Mit dem Begriff der Stammzelle werden undifferenzierte Zellen bezeichnet, welche in lebenden Organismen die Fähigkeit besitzen, sich einerseits selbst zu erneuern, und sich andererseits in unterschiedliche differenzierte Zelltypen zu entwickeln. Es wird davon ausgegangen, dass Selbsterneuerung und Differenzierung durch asymmetrische Zellteilungen gewährleistet werden. Dabei entstehen zwei Tochterzellen, von denen eine Stammzellcharakteristika behält, während die andere Tochterzelle in verschiedene Gewebetypen ausdifferenzieren kann (Blau et al., 2001; Ho und Wagner, 2007). Durch die Kontinuität dieses Prozesses sind Stammzellen in der Lage, ganze Gewebe zu regenerieren. Embryonale Stammzellen (ESC) können während der Embryonalentwicklung mesodermale Gewebe wie Herz-, Skelett- und Glattmuskelzellen, ektodermale Gewebe wie die Epidermis oder Neuronen des Gehirns und endodermale Gewebe wie die Zellen des Verdauungstraktes oder der Lunge bilden. Es wurde demonstriert, dass bei einer *in vitro* Kultivierung hämatopoetische koloniebildende Zellen aus humanen embryonalen Stammzellen bei Kokultivierung mit als Feederzellen bezeichneten Zellen zur Unterstützung hervorgehen und hämatopoetische Oberflächenantigene exprimieren (Kaufman et al., 2001). Aufgrund dieser uneingeschränkten Differenzierungsfähigkeit werden diese Zellen als „pluripotent“ bezeichnet (Silva und Smith, 2008). Adulte Stammzellen hingegen besitzen zwar das gesamte Leben lang eine nahezu uneingeschränkte Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung, allerdings ist ihr Schicksal prädestiniert, und sie können nur verschiedene Zelltypen bestimmter Zelllinien bilden. Bei den adulten Stammzellen wird so beispielsweise zwischen hämatopoetischen, neuralen und epithelialen Stamm- und Progenitorzellen unterschieden, welche in gleicher Reihenfolge alle Zelltypen des Blutes, des Nervengewebes oder der Haut bilden können. Aus diesem Grund und der Tatsache, dass diese Zellen innerhalb eines Kompartiments in verschiedene Zelllinien differenzieren können, werden adulte Stammzellen als „multipotent“ bezeichnet (Adams und Scadden, 2006).

In den letzten Jahren hat eine Reihe von Forschungsergebnissen eine Diskussion angeregt, ob diese Prozesse nicht nur starr in einer Richtung ablaufen, und dass Stamm- und Progenitorzellen einer gewissen Plastizität unterliegen könnten. So haben einige Autoren

eine Transdifferenzierung transplanteder HPC von einem Keimblatt zum anderen in Erwägung gezogen (Terada et al., 2002), jedoch wird dies von anderen Gruppen kritischer betrachtet (Weissman, 2000; Hochedlinger et al., 2004). Vor einigen Jahren wurde außerdem beschrieben, dass für diese Reprogrammierung der Zellen auch Zellfusionen verantwortlich sein könnten. Wurden z.B. adulte Mauszellen aus Knochenmark oder Gehirn mit ESC kokultiviert, so formten sich zeitweise Zellhybriden mit einem Phänotyp ähnlich der ESC, die einen doppelten Chromosomensatz besaßen und daher genetisch instabil waren. Solche Zellfusionen könnten ohne genaue genetische Analysen auch als eine Transdifferenzierung missinterpretiert werden (Holden und Vogel, 2002; Terada et al., 2002).

Im Jahr 2006 konnten Takahashi und Yamanaka erstmals zeigen, dass sich ausdifferenzierte Zellen, nämlich embryonale und adulte Fibroblasten der Maus, durch retrovirale Induktion der vier Gene Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 zu pluripotenten Zellen, den induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC), redifferenzieren lassen. Die induzierten Faktoren tragen in ESC zur Pluripotenz bei. iPSC besitzen gleiche Morphologie und Wachstumseigenschaften von ESC und exprimieren ESC-Zellmarkergene. Nach subkutaner Transplantation von iPSC wurde in Mäusen verstärkt Tumorstachstum beobachtet, wobei die Tumore aus Zellen aller drei Keimblätter bestanden (Takahashi und Yamanaka, 2006). Ein Jahr später gelang der gleichen Forschergruppe die Generierung von iPSC aus adulten humanen Fibroblasten durch retrovirale Induktion der gleichen vier Faktoren. Die humanen iPSC ähneln humanen ESC z.B. in ihrem Proliferationsverhalten, der Expression von Oberflächenantigenen, dem Genexpressionsmuster und der Telomeraseaktivität (Takahashi et al., 2007). Inzwischen wurde demonstriert, dass sich aus nahezu allen bisher untersuchten somatischen Zelltypen iPSC generieren lassen (Jaenisch, 2009; Stadtfeld und Hochedlinger, 2010).

Diese Forschungsergebnisse haben im Rahmen der regenerativen Medizin enorme Hoffnungen geweckt. Aus somatischen Zellen von Patienten könnten iPSC generiert werden, welche dann zu den jeweils notwendigen Geweben ausdifferenziert und dem Patienten autolog transplantiert werden. Allerdings besteht nach einer solchen Transplantation eine hohe Gefahr der Tumorbildung, weshalb Methoden gefunden werden müssen, um in aus iPSC differenzierten Geweben und Zellverbänden residuale pluripotente Zellen vollständig zu eliminieren. Dies kann einerseits im Fall von differenzierten Erythrozyten und Thrombozyten mittels Zellbestrahlung geschehen, da diese keinen Nukleus besitzen. Bei allen anderen Zelltypen müssen alternative Methoden angewendet werden. Dazu zählen beispielsweise eine Miteinbringung von Suizidgenen in iPSC, welche verbleibende pluripotente Zellen zur Apoptose zwingen, oder eine pharmakologische Inhibierung der Expression von spezifisch in

pluripotenten Zellen vorhandenen Genen (Yamanaka, 2009; Stadtfeld und Hochedlinger, 2010; Gekas und Graf, 2010). Eine andere Möglichkeit, direkte virale Transfektionen und damit die Entstehung einer genetisch sehr heterogenen Zellpopulation zu vermeiden, könnte in der Generierung homogener sekundärer somatischer Zellen liegen, welche die Reprogrammierungsfaktoren als z.B. Doxozyklin-induzierbare Transgene beherbergen. Werden mit Doxozyklin-induzierbaren Lentiviren Mausfibroblasten transfiziert, reprogrammiert und aus entstandenen iPSC chimäre Mäuse generiert, so können Zellen aus diesen Mäusen 25- bis 50-fach effizienter reprogrammiert werden, als dies bei direkt transfizierten Zellen der Fall war (Wernig et al., 2008a). iPSC mit geringeren tumorigenen Eigenschaften könnten außerdem durch Transfektion mit weniger als den vier erwähnten Transkriptionsfaktoren erzeugt werden, wie Wernig und Kollegen es für Mausfibroblasten bei retroviraler Transfektion nur von Oct4, Sox2 und Klf4 ohne c-Myc beschrieben haben (Wernig et al., 2008b). Neben der Fragestellung, ob diese Ergebnisse auf das humane System übertragbar sind, muss auch kritisch untersucht werden, ob aus iPSC generierte Zell- und Gewebetypen die gleichen Eigenschaften wie die natürlicher Weise vorkommenden Zellen und Gewebe besitzen. So wurde demonstriert, dass beispielsweise aus iPSC generierte murine Kardiomyozyten *in vitro* leicht veränderte morphologische und physiologische Eigenschaften als ihre natürlichen Gegenstücke besitzen (Kuzmenkin et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit der Anwendung von iPSC könnte eine direkte Konvertierung von Fibroblasten in HPC sein (Szabo et al., 2010).

1.1.2 Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HPC) sind derzeit die am längsten und gründlichsten analysierte Stammzellpopulation. Die Forschung an HPC erlebte in den 60er Jahren einen bedeutenden Aufschwung, nachdem Methoden zum Nachweis von HPC entwickelt wurden. Durch Analyse der koloniebildenden Einheiten aus Milzzellen wurde deren Fähigkeit zur Differenzierung in Erythrozyten, Granulozyten und Megakaryozyten demonstriert (Siminovich et al., 1963). In Abbildung 1 ist der Verlauf der Hämatopoese schematisch dargestellt.

Nabelschnurblut ist besonders reich an primitiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen und dient als HPC-Quelle bei Stammzelltransplantationen und für die Isolation von HPC im Rahmen von Forschungszwecken. Der Prozess der Hämatopoese wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine gesteuert. Beispielsweise wird die Bildung von Erythrozyten durch Erythropoietin und die Bildung von Granulozyten und

Makrophagen durch GM-CSF angeregt. Wie der Name „koloniebildender Faktor“ impliziert, entstehen differenzierte Zellen einer gleichen Linie aus einer oder mehrerer Vorläuferzellen, und liegen daher zunächst in Form von Kolonien eines differenzierteren Zelltyps vor. Die Entstehung solcher Kolonien wird auch in bestimmten Assays genutzt (siehe Abschnitt 1.3.2). Sie werden als CFU (von „colony forming units“) bezeichnet (Alberts et al., 1994). In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Zellen aus Knochenmark nach Transplantation in letal bestrahlten Tieren die Hämatopoese rekonstituieren können. Durch die Beobachtung, dass diese Zellen ebenfalls rekonstituierendes Potential in sekundären letal bestrahlten Empfängertieren haben und verschiedene granulozytäre und erythroide Kolonien formen, konnte nachgewiesen werden, dass transplantierte Zellen in den primären Empfängertieren die Fähigkeit zur Selbsterneuerung behalten (Siminovich et al., 1963; BECKER et al., 1963). Diese Untersuchungen trugen zu einem neuen Verständnis einer hämatopoetischen Stammzelle bei. Die HSC wurden als Zellen mit unbeschränkter Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung definiert, welche ein Leben lang alle Blutzelllinien bilden können, während ausgereifte Blutzellen im adulten Organismus nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen (Ho und Punzel, 2003).

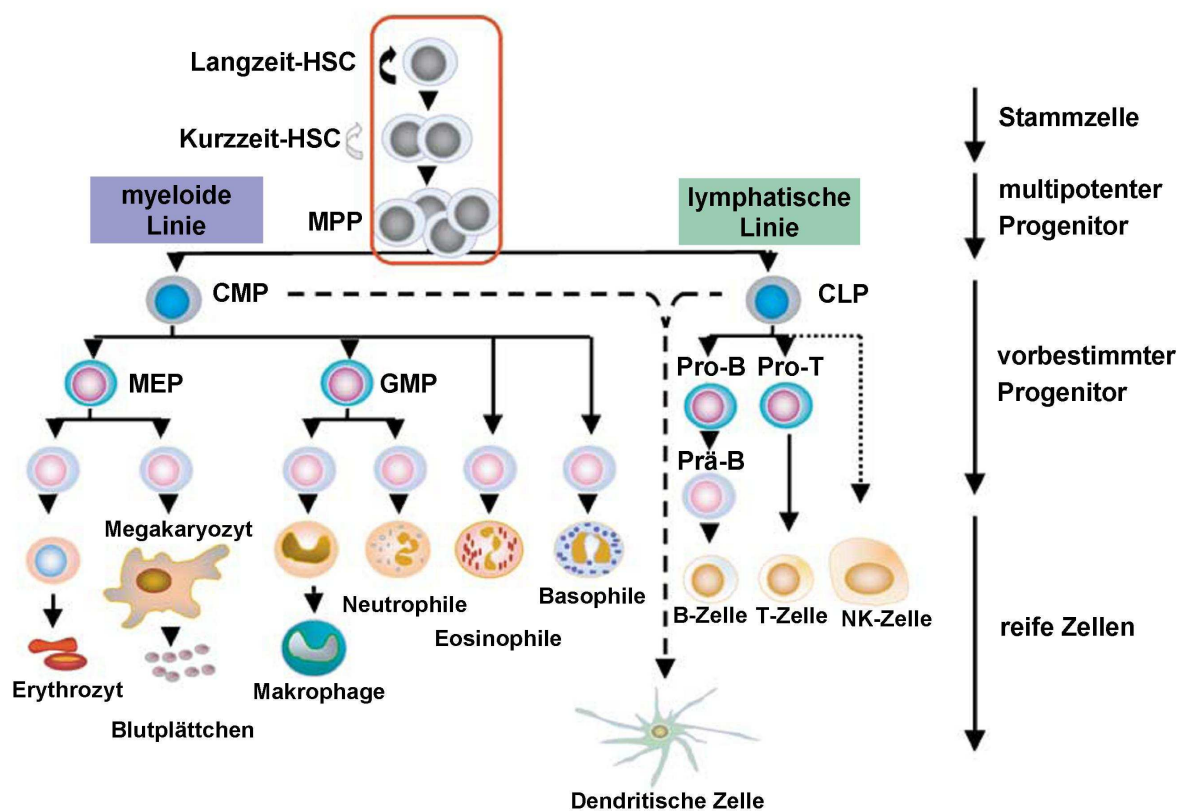


Abbildung 1: Modell des Hämatopoeseverlaufs. MPP (multipotenter Progenitor), CMP (allgemeiner myeloider Progenitor), CLP (allgemeiner lymphatischer Progenitor), MEP (Megakaryozyten / Erythrozyten Progenitor), GMP (Granulozyten und Makrophagen Progenitor). Adaptiert aus Larsson und Karlsson, 2005.

HPC werden im Wesentlichen durch die Präsenz und Absenz von bestimmten Oberflächenantigenen identifiziert, welche z.B. immunhistochemisch per Western Blot oder durchflusszytometrisch via Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern bestimmt werden können. Primitive humane HPC exprimieren gewöhnlich die Oberflächenantigene CD34 und CD133 auf ihrer Oberfläche, und sind durch fehlende Expression von CD38 gekennzeichnet. Bereits seit über 20 Jahren findet CD34 als Oberflächenmarker für HPC Verwendung (Civin et al., 1984; Berenson et al., 1991). CD34 ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche und ein wichtiger Faktor für die Adhäsion von HPC an die ECM des Knochenmarks und an die zelluläre Mikroumgebung der Nische, weshalb es vermutlich von primitiven undifferenzierten Zellen exprimiert wird (Healy et al., 1995). Das Oberflächenantigen CD133 wird auch als Prominin-1 bezeichnet. Es zählt ebenfalls zu den Glykoproteinen und ist durch das Cholesterin der Plasmamembran verankert. Es ist vor allem in Zellausläufern und hervorstehenden Zellmembranteilen lokalisiert, und wird unter anderem von HPC, endothelialen Vorläufern und neuronalen Stammzellen exprimiert (Bauer et al., 2008). CD38 ist ein Glykoprotein, welches auf der Oberfläche von weiter differenzierten HPC und vielen Immunzelltypen vorhanden ist. Außerdem zeigt eine neuere Studie, dass CD38 auch im Nukleus von HPC exprimiert ist. Es kann zyklische ADP-Ribose synthetisieren und hydrolysieren und besitzt Funktionen in der Zelladhäsion und Signaltransduktion (Orciani et al., 2008).

1.1.3 Asymmetrische Zellteilung

Während einer HPC Kultur kann beobachtet werden, dass sich bestimmte Zellpopulationen von HPC deutlich langsamer als die anderen Zellen teilen. Auf Genexpressions- und Immunphänotypebene ist nachgewiesen worden, dass die langsamteilende Zellfraktion Stammzeleigenschaften behält und die schnellteilende Zellfraktion eher Merkmale differenzierter Zellen besitzt (Wagner et al., 2004; Walenda et al., 2010). Diese Beobachtungen korrelieren mit dem Modell der asymmetrischen Zellteilung, in dem eine Tochterzelle Stammzeleigenschaften behält und quieszent verbleibt, während die andere Tochterzelle proliferiert und ausdifferenziert. Bereits vor über 25 Jahren wurden Hinweise auf asymmetrische Zellteilungen bei hämatopoetischen Zellen durch mikroskopische Beobachtung einzelner Zellen aus hämatopoetischen Kolonien gewonnen (Leary et al., 1984; Leary et al., 1985). Die Theorie der asymmetrischen Zellteilung bei Stammzellen

manifestierte sich weiter, als Forschungsergebnisse mit dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* publiziert wurden. So konnten Lin und Schagat anhand der Teilungssymmetrien von Neuroblastenzellen, welche für die große Zelldiversität in Neuronen und Ganglien von *Drosophila* verantwortlich sind, die Theorie asymmetrischer Zellteilungen neu aufgreifen und ausarbeiten (Lin und Schagat, 1997). Gegenwärtige Untersuchungen belegen, dass asymmetrische Zellteilungen in Keimbahnzellen von *Drosophila* unter anderem von einer E-Cadherin vermittelten Orientierung des Spindelapparates und der Zentrosomen (Inaba et al., 2010) sowie einer Umorientierung des Spindelapparates in der Anaphase (Cheng et al., 2011) ermöglicht werden. Obwohl die Zentrosomen in *Drosophila*-Keimbahnzellen einer asymmetrischen Umorientierung unterliegen, ist dies bei den Chromosomen selbst nicht der Fall (Yadlapalli et al., 2011).

Nachdem Experimente an *Drosophila* die Forschung zu asymmetrischen Zellteilungen in Gang gebracht hatten, wurden in der Folgezeit weitere Hinweise im Bezug zu asymmetrischen Teilungen von humanen hämatopoetischen Zellen gesammelt, indem Differenzierung und Koloniebildungsfähigkeit verschiedener Tochterzellen miteinander verglichen wurden (Brummendorf et al., 1998; Ho, 2005; Punzel et al., 2002; Giebel et al., 2006). Die Gesamtheit der Experimente belegen, dass gepaarte Tochterzellen individueller HPC nicht funktionell äquivalent sind und sich zu Nachkommenschaft mit unterschiedlichem Potential entwickeln können (Punzel et al., 2003; Congdon und Reya, 2008). Das Vorhandensein einer Asymmetrie wurde unter anderem durch die Entdeckung von asymmetrischen Proteinverteilungen in Tochterzellen einer HPC belegt. So wurde beispielsweise bei vier Proteinen (CD53, CD62L/L-Selektin, CD63/lamp-3 und CD71/Transferrin Rezeptor) demonstriert, dass diese in 20 % der Tochterzellen sich teilender HPC asymmetrisch aufgeteilt werden (Beckmann et al., 2007). Zusammengefasst stimmen diese Beobachtungen mit dem Modell der asymmetrischen Zellteilungen bei hämatopoetischen Stammzellen sowie mit der Regulation von Selbsterneuerung und Differenzierung der Zellen auf diesem Wege überein (Brummendorf et al., 1999; Punzel et al., 2002), wenngleich ein definitiver Beweis für asymmetrische Zellteilungen noch erbracht werden muss.

1.1.4 Hämatopoetische Stammzellnische im Knochenmark

Die große Mehrheit der adulten Stammzellen befindet sich geschützt in speziellen Mikroumgebungen. Die umgebenden Zellen sezernieren und organisieren eine Vielfalt von extrazellulärer Matrix und anderen Faktoren, welche zum Stammzellerhalt beitragen. Diese

Mikroumgebung wird als Stammzellnische bezeichnet. Das Konzept einer Nische wurde erstmals von Schofield im Jahre 1978 postuliert (Schofield, 1978). Innerhalb einer Stammzellnische wird durch verschiedene zellintrinsische und zellextrinsische Mechanismen das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzellen gesteuert. Durch Zellen der Stammzellnische werden die Stammzellen auf diese Weise z.B. vor differenzierenden und apoptoseinduzierenden Stimuli abgeschirmt, und gleichzeitig eine übermäßige Stammzellproliferation, welche zur Krebsentstehung beitragen kann, verhindert (Moore und Lemischka, 2006). Im Bezug auf die Verhinderung unkontrollierter Proliferation von Stammzellen wurde die Bedeutung einer zelltyp- und wirtsspezifischen Nische durch Experimente untermauert, in denen humane Stammzellen aus Blastozysten, welche während einer *in vitro* Kultivierung ohne Feederzellen ihr pluripotentes Potential behielten (Thomson et al., 1998), nach subkutaner Transplantation im Mausmodell differenzierten und zur Bildung von Teratomen führten (Odorico et al., 2001). Im Körper des Menschen befinden sich Nischen für Stammzellen beispielsweise in den Zotten des Dünndarms, wo die Zellen des Epithels laufend erneuert werden und im Haarfollikel, wo Zellen des Haarschaftes und der Umgebung gebildet werden. Die bedeutendste Stammzellnische des blutbildenden Systems ist das Knochenmark. Die dort befindlichen hämatopoetischen Stammzellen werden als die bisher am besten charakterisierte Stammzellpopulation betrachtet (Moore und Lemischka, 2006).

Während der Embryogenese bleibt der Entstehungsort der Blutzellen nicht konstant. Beim menschlichen Embryo erfolgt die Blutbildung zunächst im Mesenchym des Dottersacks. Die Blutbildung geht dann auf die fötale Leber und anschließend auch auf die fötale Milz und den Thymus über. In der weiteren fötalen Entwicklung übernimmt letztendlich wie im adulten Organismus hauptsächlich das Knochenmark die Aufgabe der Blutbildung (Mikkola und Orkin, 2006). In Abbildung 2 ist eine schematische Abbildung der Knochenmarknische gezeigt. Aus der Literatur geht hervor, dass die Knochenmarknische der HPC in zwei Komponenten unterteilt werden kann. Zum einen in eine osteoblastische Nische, in welcher HPC zusammen mit Osteoblasten an der inneren Oberfläche zwischen Knochenmark und Knochenhöhle lokalisiert sind (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003; Arai und Suda, 2007; Xie et al., 2009), und zum anderen in eine vaskuläre Nische, welche durch Endothelzellen in den Sinusoiden des Knochenmarks gebildet wird (Kiel et al., 2005). Versuche belegen, dass HPC in der osteoblastischen Nische über einen längeren Zeitraum quieszent verbleiben, wohingegen die vaskuläre Nische die Expansion und Differenzierung der HPC unterstützt (Zhang und Li, 2008).

Die Knochenmarksnische beinhaltet somit Osteoblasten, Endothelzellen, Fibroblasten und Adipozyten, die alle aus MSC hervorgehen (Taichman, 2005). Die Regulation der Hämatopoese in der Knochenmarksnische wird durch Zytokine und intrazelluläre Signalwege gewährleistet, welche bei adhäsiven Interaktionen von HPC mit MSC aktiviert werden (Shiozawa et al., 2008).

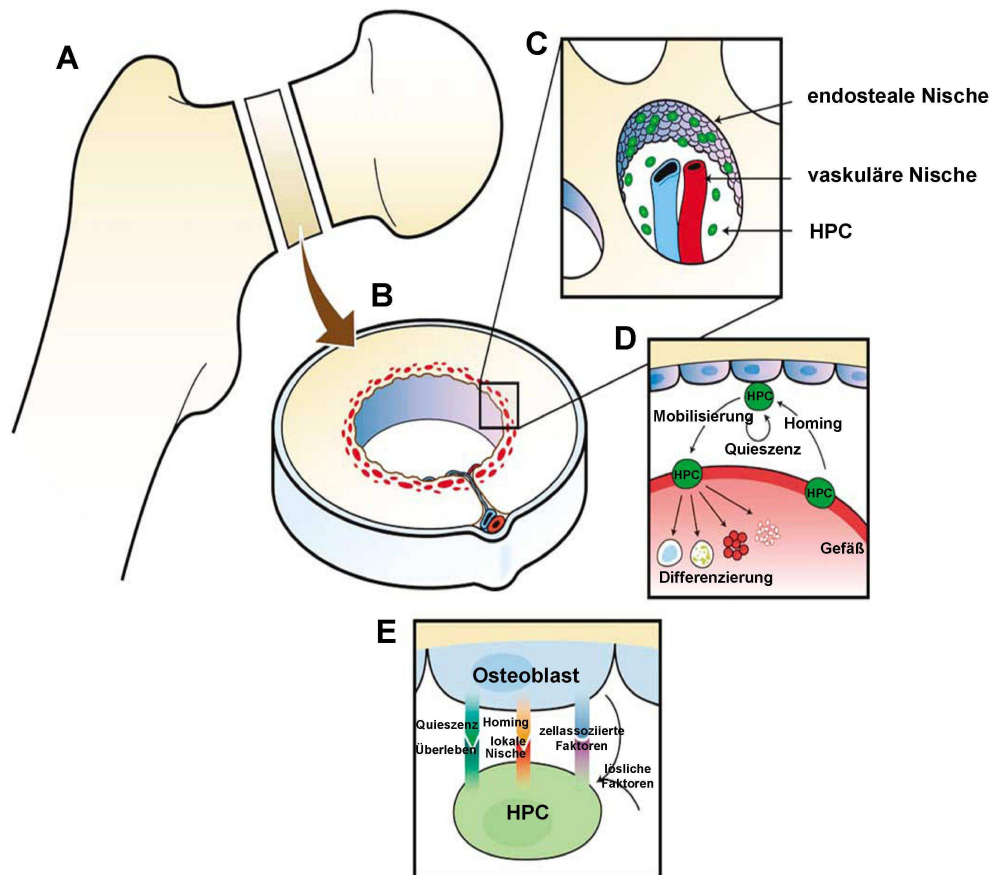


Abbildung 2: Modell der hämatopoetischen Stammzellnische im Knochenmark. Eine Darstellung der Lokalisation der Stammzellnische (A, B). Osteoblasten und Endothelzellen tragen essentiell zur Bildung der Nische bei (C). Darstellung der Interaktionen zwischen Aufrechterhaltung, Mobilisierung und Homing von HPC (D). Die Hämatopoese wird von sezernierten Faktoren beeinflusst (E). Adaptiert aus Shiozawa et al., 2008.

Die enorme Bedeutung der Interaktionen von HPC mit MSC der Nische wurde anhand verschiedener Experimente verdeutlicht. Wurden beispielsweise in subletal bestrahlte NOD/SCID Mäuse humane $CD34^+$ $CD38^-$ HPC injiziert, waren die humanen HPC nach kurzer Zeit in der murinen Knochenmarksnische präsent. Die humanen HPC trugen vollständig zu einer Langzeit-Hämatopoese mit humanen Zellen bei, wobei auch die Steuerung der Repopulationsdynamik initial von humanen $CD34^+$ $CD38^-$ HPC ausging. HPC

in der Nische kontrollierten die Homöostase und erzeugten einen hierarchisch organisierten Stammzellpool, welcher zu primärer und sekundärer Rekonstitution in Mäusen fähig war. Diese und andere Untersuchungen zeigen, dass humane HPC in der Knochenmarknische für eine hierarchische Organisation der Hämatopoese verantwortlich sind (Yahata et al., 2008).

Die Bedeutung der MSC wurde in Experimenten verdeutlicht, indem z.B. humane MSC subkutan in subletal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert wurden. Die transplantierten humanen MSC waren in der Lage, die murine Hämatopoese neu zu stimulieren. Diese murinen hämatopoetischen Zellen wiesen typische Oberflächenmarker auf, und waren zu einer kompletten sekundären Rekonstitution in letal bestrahlten Tieren in der Lage (Tolar et al., 2010). Als essentiell für die Formation einer humanen MSC-Knochenmarknische in den Empfängertieren konnte eine Stimulierung durch den PDGF-Signalweg identifiziert werden, der über eine Hochregulation von β -Catenin wirkt (Miura et al., 2006). Neben PDGF ist von einer Vielzahl von anderen Zytokinen und Wachstumsfaktoren ein regulierender Einfluss auf die Hämatopoese beschrieben worden. So wurde auch von TGF- β über Smad-Signalweg Moleküle ein regulativer Effekt auf die Blutbildung und die Stammzellnische berichtet (Larsson und Karlsson, 2005). Neben diesen besitzen noch einige andere Signalwege, Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie bestimmte Adhäsionsproteine und Adhäsionsrezeptoren eine wichtige Rolle in der Regulation der Zell-Zell Interaktion und Modulation der Knochenmarknische (Simmons et al., 1997; Moore und Lemischka, 2006). Hämatopoetische Wachstumsfaktoren und Zytokine werden sowohl systemisch wie auch von den MSC, den HPC und anderen Zellen der Nische sezerniert, und können in der Nische entweder an die Zellen oder an die ECM gebunden sein sowie in löslicher Form vorliegen.

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen exprimieren Adhäsionsrezeptoren, welche spezifische Zell-Zell und Zell-ECM Interaktionen ermöglichen (Yoder und Williams, 1995). Die Adhäsionsmoleküle der Nische werden aufgrund ihrer Struktur und Funktion unter anderem in Integrine, Cadherine und Selektine unterteilt (Prosper und Verfaillie, 2001). Neben der Aufgabe, die HPC in der Nische zu verankern, dienen adhäsive Interaktionen dazu, wachstumsfaktorabhängige Signalkaskaden zu modellieren. Für BM-MSC ist dokumentiert worden, dass sie eine Vielzahl von Integrintypen auf ihrer Oberfläche exprimieren (Docheva et al., 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass unter normalen physiologischen Zytokinkonzentrationen Integrin-beta1 bei CD34⁺ HPC den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus verhindert (Jiang et al., 2000), was mit der Feststellung korrespondiert, dass langsamteilende HPC mit höherer Selbsterneuerungskapazität und längerem Erhalt von Stammzellcharakteristika (LTC-IC Rate) signifikant besser an humanen BM-MSC in

einem *in vitro* Kokultursystem adhären (Wagner et al., 2007c). Außerdem wurde demonstriert, dass primitivere, langsamteilende CD34⁺ CD38⁻ HPC mit höherer Selbsterneuerungsfähigkeit in einem *in vitro* Kokultursystem signifikant stärker an MSC aus Knochenmark adhären. Als Vergleich dienten MSC aus Fettgewebe, eine HS68-Fibroblastenzelllinie und eine murine immortalisierte AFT024-Zelllinie. Dabei fördert CD34 die adhäsiven Eigenschaften der HPC zu den MSC (Healy et al., 1995). Auf Genexpressionsebene ist zusätzlich nachgewiesen worden, dass für Adhäsionsproteine oder ECM kodierende Gene in der adhären HPC Fraktion signifikant höher exprimiert werden (Wagner et al., 2007a). Umgekehrt werden adhäsive Interaktionen in der Knochenmarknische ebenfalls durch bestimmte Faktoren reguliert, womit sich eine weitere Regulationsebene der Hämatopoese im Knochenmark ergibt. Dies wurde z.B. für die Wirkung der Wachstumsfaktoren GM-CSF und IL-3 auf die Aktivität von Integrinen bereits 1995 von Lévesque und Kollegen beschrieben (Levesque et al., 1995). Cadherine vermitteln kalziumabhängige Zell-Zell Adhäsion durch homophile Bindung zweier Cadherine benachbarter Zellen, und sind jeweils im Zytoplasma durch α -Catenin und β -Catenin mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Außerdem ist das Zusammenspiel von Cadherinen mit β -Catenin indirekt mit Signalkaskaden wie dem Wnt-Signalweg verknüpft (Suda und Arai, 2008; Fleming et al., 2008). In der Knochenmarknische spielt neuronales Cadherin (N-Cadherin) aufgrund dieser Verknüpfungen eine zentrale Rolle (Arai und Suda, 2007). Als essentielle Bestandteile der Nische werden spezielle spindelförmige N-Cadherin exprimierende Osteoblasten diskutiert (Zhang et al., 2003), und es wird vermutet, dass Herunterregulation von N-Cadherin essentiell für die Bereitstellung von Zellen aus dem Stammzellpool ist (Wilson et al., 2004; Niu et al., 2009). Von einigen Autoren wurde keine N-Cadherin-Genexpression und auf Proteinebene kein N-Cadherin in murinen HPC oder in der Gesamt-Knochenmarkzellpopulation nachgewiesen (Kiel et al., 2007; Kiel et al., 2009), jedoch ist dieses für humane HPC demonstriert worden (Wein et al., 2010). Außerdem ist nachgewiesen worden, dass Cadherin-11 von Osteoblasten exprimiert und während ihrer Differenzierung hochreguliert wird (Okazaki et al., 1994). Neben diesen Adhäsionsproteinen ist außerdem die ECM, verschiedene Metabolite und Wachstumsfaktoren sowie der Sauerstoffpartialdruck an dem komplexen Zusammenspiel zwischen HPC und Nische beteiligt (Wilson und Trumpp, 2006; Wagner et al., 2008b).

1.1.5 Mobilisation und Homing

Wenn eine hämatopoetische Stammzelle in eine bestimmte Blutzelle ausdifferenziert, so wird sie aus der Stammzellnische entlassen. Dieses geschieht, indem die Zelle allmählich den Kontakt zu den Nischenzellen verliert und in ein Blutgefäß wandert, was als Mobilisation

bezeichnet wird. Umgekehrt können adulte Stammzellen wieder in ihre physiologische Nische wandern, was als „Heimfindung“ bzw. „Homing“ bezeichnet wird (Fruehauf und Seggewiss, 2003). Hämatopoetischen Zellen wandern innerhalb eines Zeitraums von höchstens ein bis zwei Tagen vom Peripherblut zurück in das Knochenmark und stehen dort für die Blutbildung zur Verfügung. Dazu wird die endotheliale Barriere vom Blut zum Knochenmark überwunden und die Adhäsion durch Aktivierung von Adhäsionsrezeptoren im Knochenmark ermöglicht, wobei auch ein reversibler Zell-Zell Kontakt wichtig ist (Lapidot et al., 2005).

Ein gut untersuchter Faktor, welcher Mobilisation und Homing reguliert, ist das Zusammenspiel des Chemokins SDF-1 mit seinem Rezeptor CXCR4 (Fruehauf und Seggewiss, 2003; Dar et al., 2005; Faber et al., 2007). Bei Überexpression von SDF-1 in Mausserum konnte eine induzierte Mobilisierung von primitiven HPC im Mausmodell beobachtet werden (Hattori et al., 2001). SDF-1 existiert in zwei Formen, SDF-1 α und SDF-1 β , welche beide durch ein einziges Gen kodiert werden und durch alternatives Spleißen entstehen (Shirozu et al., 1995). Als eine mögliche Erklärung für die funktionelle Diversität wurde in Betracht gezogen, dass beide Formen unterschiedlich prozessiert werden und so andere Eigenschaften erhalten (De La Luz et al., 2004). SDF-1 reguliert die primitive Hämatopoese durch Suppression der Apoptose und Stimulation eines Zellzyklusübergangs von G₀ nach G₁ in CD34⁺ Zellen (Lataillade et al., 2002), und stimuliert die Proliferation zirkulierender CD34⁺ Zellen zusammen mit anderen Zytokinen (Lataillade et al., 2000). Das Homing wird durch endotheliale Zellen, Osteoblasten und Stromazellen im Knochenmark ermöglicht, welche Zytokine wie SDF-1 sezernieren, um durch Bindung dieser Lockstoffe an spezifische Rezeptoren die Zellen zur physiologischen Nische zu führen (Imai et al., 1999; Kortessidis et al., 2005). Seit Bekanntwerden der Mechanismen werden diese klinisch beispielsweise bei der Leukapherese genutzt, bei welcher vorab durch G-CSF mobilisierte HPC aus peripherem Blut für autologe oder allogene Stammzelltransplantationen angereichert werden. Neben G-CSF stimuliert auch der CXCR4 Antagonist AMD3100 (Handelsname: Plerixafor) die Mobilisation von HPC in das Peripherblut, wobei aus einigen Studien hervorging, dass AMD3100 eine primitivere HPC Population als G-CSF mobilisiert (Fruehauf et al., 2006; Faber et al., 2007; Kessans et al., 2010).

1.2 Kultivierung und Analyse von hämatopoetischen Stammzellen *in vitro*

1.2.1 Isolation von hämatopoetischen Progenitorzellen

Für eine *in vitro* Kultivierung können HPC auf verschiedene Weisen isoliert werden, wobei die Zellausbeute je nach Methode variiert. Wichtig sind hierbei für zuverlässige Forschungsergebnisse insbesondere Isolationsmethoden, die leicht und effizient durchführbar sowie standardisierbar sind. Zu den beschriebenen Isolationsmethoden zählen unter anderem verschiedene Kombinationen von Ficoll- und / oder Hydroxy-Ethylstärke-Dichtegradientenzentrifugationen mit und ohne Ammoniumchloridlyse der Erythrozyten (Singh et al., 2009). Im Anschluss an solche Vorabisolationen werden die Zellen anhand ihres Oberflächenmarkers CD34 per antikörperbeschichteten Magnetbeads aufgereinigt (MACS). In dieser Arbeit werden die HPC zunächst per Dichtegradientenzentrifugation (Newton et al., 1993) mit folgender CD34-MACS Aufreinigung isoliert, was den Vorteil bietet, dass diese Prozeduren in der Arbeitsgruppe bestens etabliert sind.

Für eine weiterreichende Separation der Stamm- und Progenitorzellen wird sich zu Nutze gemacht, dass bestimmte Zelltypen definierte Zelloberflächenmarker präsentieren, welche in das Differenzierungscluster („Cluster of Differentiation“, CD) numerisch eingeteilt sind. Diese Einteilung wurde im Jahre 1982 auf der Konferenz zu humanen Leukozyten Differenzierungsantigene (HLDA) beschlossen, um Klarheit und Struktur in die Vielzahl von identifizierten Oberflächenantigenen zu bringen (Fiebig et al., 1984). In der Zwischenzeit wurden immer weitere Oberflächenantigene gefunden, welche diese Liste auf derzeit über 350 Cluster erweitert haben. Mittels gekoppelter Antikörper-Antigenbindung wird so eine magnetische oder durchflusszytometrische Zellanreicherung möglich. Als Marker für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen dienen z.B. in erster Linie CD34 und CD133, da CD38 in primitiven nicht ausdifferenzierten Zellen kaum exprimiert wird (s. Abschnitt 1.1.3), wobei expandierende HPC CD133 schneller als CD34 verlieren (Singh et al., 2009; Walenda et al., 2010).

1.2.2 Mesenchymale Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen (MSC) enthalten eine Subfraktion multipotenter Vorläufer somatischer Zellen mesodermalen Ursprungs, aus diesem Grund werden sie alternativ auch als mesenchymale Stammzellen bezeichnet (Horwitz et al., 2005). MSC können aus Knochenmarkaspiraten und anderen Geweben wie Fettgewebe isoliert und aufgrund ihrer

Plastikadhärenz unter verschiedenen Kulturbedingungen zu sehr hohen Zellzahlen *in vitro* expandiert werden. MSC werden neben ihrer adhäsiven Eigenschaften auch durch eine Reihe von Oberflächenmarkern wie CD44, CD73, CD90 und CD105 definiert. Außerdem sind MSC unter entsprechenden Kulturbedingungen in der Lage, in unterschiedliche mesodermale Zelllinien einschließlich Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten zu differenzieren (Baksh et al., 2004; Wagner et al., 2005b; Dominici et al., 2006; Horn et al., 2008; Augello et al., 2010). Überdies existieren Hinweise, dass MSC auch in Myozyten und Kardiomyozyten sowie in Zellen nicht mesodermalen Ursprungs wie Hepatozyten und Neuronen differenzieren können, was jedoch kontrovers diskutiert wird (Petersen et al., 1999; Reyes et al., 2001; Jiang et al., 2002; Schwartz et al., 2002). Allerdings stellen MSC eben auch eine sehr heterogene Zellpopulation dar, welche nur eine Subpopulation von Stammzellen enthält (Horwitz und Keating, 2000). Die Heterogenität von MSC-Präparationen zeigt sich zum einen auf molekularer Ebene, indem analysierte Genexpressionsmuster und Proteomics von MSC in hohem Maße von den Kulturbedingungen abhängig sind (Wagner et al., 2006). Zum anderen konnte auch demonstriert werden, dass sich verschiedene Populationen von MSC, retinalen perivaskulären Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten hinsichtlich ihrer Zellmorphologie und ihres Immunphänotyps kaum unterscheiden. Einzig in ihrer Differenzierungsfähigkeit in osteogene, adipogene und chondrogene Linien können leichte Unterschiede beobachtet werden. Aus MSC entstandene fibroblastoide Kolonien weisen beispielsweise eine große Heterogenität untereinander auf, was durch Analyse der Proliferation und des Differenzierungspotentials einzelner Kolonien nachgewiesen werden kann. Globale Genexpressionsanalysen verdeutlichten Ähnlichkeiten zwischen MSC, retinalen perivaskulären Zellen und hepatischen Sternzellen, allerdings wurden auf diese Weise auch einige Unterschiede in angiogeneseassoziierten Genen gefunden, welche in MSCs aus verschiedenen Ursprungsgeweben sowie in Fibroblasten heterogen exprimiert wurden (Covas et al., 2008). Aufgrund dieser beobachteten Heterogenität der MSCs werden zuverlässige Marker für eine pure Population von mesenchymalen Stammzellen diskutiert (Wagner und Ho, 2007; Ho et al., 2008). Die Isolation von MSC aus Knochenmaterial oder Knochenmarkaspiraten kann dabei über eine Dichtegradientenzentrifugation oder Lyse der Erythrozyten mittels Ammoniumchlorid erfolgen (Horn et al., 2008).

Isolation und Expansion von MSC werden derzeit hauptsächlich in Medium mit FCS durchgeführt. FCS wird aus agglutiniertem Blut ungeborener boviner Föten gewonnen und ist reich an Wachstumsfaktoren. Jedoch müssen in der klinischen Anwendung alle Produkte unter der „good manufacturing practice“ (GMP) generiert werden. Aus diesem Grund muss FCS vor Applikation auf Erreger getestet und bestrahlt oder sterilfiltriert werden. Trotzdem verbleibt das Risiko xenogener Kontaminationen wie z.B. anti-FCS Antikörper (Heiskanen et

al., 2007; Sundin et al., 2007; Horn et al., 2010). Da außerdem eine hohe Variabilität in der FCS-Beschaffenheit von Charge zu Charge Forschungsergebnisse aus Zellkultur beeinflussen kann, sind humane Komponenten wie z.B. humanes Serum als Mediumszusatz vorgeschlagen worden (Kuznetsov et al., 2000; Stute et al., 2004). Allerdings zeigte sich, dass humanes Serum nicht *per se* die Proliferation von MSC fördert (Bieback et al., 2009; Perez-Illarbe et al., 2009). Daher wurden humane Zusätze wie Plättchen, Plättchenlysate (HPL) und von Plättchen sezernierte Faktoren als Mediumszusatz vorgeschlagen, welche viele Wachstumsfaktoren wie PDGF beinhalten und die Proliferation von MSC unterstützen (Muller et al., 2006; Kocaoemer et al., 2007; Ng et al., 2008). In der Zwischenzeit ist eine Vielzahl von Studien erschienen, welche zeigen, dass HPL in hohem Maß die Proliferation von MSC unterstützt, und es wurden Protokolle für die therapeutische Anwendung erarbeitet (Schallmoser et al., 2007; Schallmoser et al., 2008; Avanzini et al., 2009; Bieback et al., 2009; Blande et al., 2009). Um donorspezifische Variationen zu minimieren, werden gepoolte Plättcheneinheiten bis zu 50 Spendern benutzt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Einsatz von individuellen Plättchenlysaten einzelner Spender zu nicht nennenswerten Variationen in Proliferation und Differenzierungsverhalten von MSC führte, und alle individuellen HPL Einheiten dem Einsatz von FCS überlegen waren (Horn et al., 2010). Daher werden die MSC in dieser Arbeit in Medium mit gepooltem HPL expandiert.

Des Weiteren wird die Gabe von MSC für klinische Applikationen getestet. Derzeit sind kaum Studien vorhanden, welche über Nebenwirkungen der klinischen Anwendung von MSC berichten. Durch die unkomplizierte Isolation und *in vitro* Expansion zu hohen Zellzahlen, immunmodulatorische Eigenschaften und Differenzierungsfähigkeit sowie das Fehlen der Beobachtung von bedeutenden Nebenwirkungen in klinischen Studien könnten MSC in einigen therapeutischen Anwendungen transplantiert werden (Nesselmann et al., 2008; Satija et al., 2009; Sensebe et al., 2009). Außerdem fallen bisherige Studien zur Anwendung von MSC z.B. bei dilatativer Kardiomyopathie im Tiermodell (Nagaya et al., 2005) oder bei „Graft versus Host Disease“ (GvHD) (Le Blanc et al., 2004; Le Blanc et al., 2008) vielversprechend aus. Die Bandbreite derzeitiger klinischer Studien zur therapeutischen Anwendung von MSC umfasst beispielsweise die Behandlung von Osteogenesis Imperfecta, Herzfehlern, Morbus Crohn, Osteoarthritis, Multipler Sklerose und Schlaganfällen (www.clinicaltrials.com, abgerufen im März 2011). Wenn einige dieser klinischen Studien positiv ausfallen und somit Verbesserungen und Therapieerfolge erzielt werden können, würde dieses den Weg zu einer gezielten therapeutischen Nutzung von MSC ebnen.

1.2.3 Die Stromale Funktion von MSC

Da MSCs *in vivo* die hämatopoetische Knochenmarknische auskleiden und an der Regulation von Selbsterneuerung und Differenzierung der HPC beteiligt sind (s. Abschnitt 1.1.4), üben sie während der *in vitro* Kultivierung ebenfalls unterstützenden Einfluss (stromale Aktivität) auf bestimmte Zelltypen wie HPC aus. Daher wird eine Kokultivierung von HPC mit MSC als ein gewisser *in vitro* Ersatz für die *in vivo* Nische angesehen, weil durch zelluläre Unterstützung von MSC die Expansion von HPC *in vitro* gesteigert werden kann (Huang et al., 2007; Mendez-Ferrer et al., 2010; Walenda et al., 2010). Um die Bedeutung der Regulation der Selbsterneuerung von HPC auf mathematischem Weg beschreiben zu können, wurde ein theoretisches Modell der Zellteilung entwickelt, aus welchem hervorgeht, dass neben intrinsischen Faktoren insbesondere die extrinsische Regulation der Selbsterneuerungsrate der HPC ausschlaggebend für die Hämatopoese ist (Marciniak-Czochra et al., 2009). Bereits in den 1970er Jahren wurde von Dexter und Kollegen die essentielle Rolle von MSC Feederlayern auf den Erhalt von multipotenten HPC beschrieben (Dexter et al., 1977; Dexter, 1979). Seitdem hat dies eine Vielzahl von Studien bestätigt. Außerdem wurde demonstriert, dass verschiedene stromale Zellen einschließlich MSC für den Erhalt des primitiven Phänotyps verantwortlich sind (Kadereit et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002; Punzel et al., 2003; Jang et al., 2006; Robinson et al., 2006; Wagner et al., 2007a; Wagner et al., 2007c). So ist z.B. mit der murinen stromalen Zelllinie AFT024 als Modell und CD34⁺ CD38⁻ HPC demonstriert worden, dass der direkte Zell-Zell Kontakt und zelluläre Komponenten der Mikroumgebung entscheidend für die Kontrolle der HPC Zellteilungen sind. Humane CD34⁺ hämatopoetische Zellen wurden mit AFT024 Zellen kokultiviert und die Zellmigration per Zeitraffermikroskopie sowie die Zell-Zell-Adhäsion untersucht. Humane HPC zeigten eine aktive Migration zu den Stromazellen. Anschließend wiesen 30 % der HPC eine feste Adhärenz an den Stromazellen auf. Mittels Antikörperfärbungen wurde demonstriert, dass CD44 und CD34 an der Kontaktstelle kolokalisiert waren. Außerdem konnte durch Genexpressionsanalysen verdeutlicht werden, dass in HPC eine aktive Umorganisation des Zytoskeletts und eine Stabilisierung der DNA für die Interaktion nötig sind (Wagner et al., 2005a). Einhergehend mit Zellproliferation während *in vitro* Kokultivierungen von HPC mit Stromazellen verlieren die HPC die Expression von CD133 und CD34 und werden positiv für CD38, bis die Zellen schließlich negativ für CD34 und CD38 werden und parallel andere Differenzierungsmarker exprimieren (Ruzicka et al., 2004; Walenda et al., 2010; Walenda et al., 2011a; Walenda et al., 2011b). Unter bestimmten Voraussetzungen wie Transplantation in immundefiziente Mäuse ist der Verlust an CD34 Expression in rekonstituierenden HPC jedoch reversibel. Es konnte demonstriert werden, dass aus CD34⁺ CD38⁻ humanen HPC in einem Langzeit-Transplantationsmodell in immundefizienten Mäusen CD45⁺ CD38⁻ Zellen entstehen, welche

wiederum in sekundären Empfängern erneut CD34⁺ Nachkommen generieren (Dao et al., 2003). Da Stammzellen in der Maus generell CD34⁻ sind, verdeutlichen diese Ergebnisse, dass sich humane HPC an die Bedingungen in der Maus anpassen und die Hämatopoese rekonstituieren können.

Es existieren ebenfalls Hinweise darauf, dass HPC aktiv an der Regulation und Aufrechterhaltung der Stammzellnische beteiligt sind, in welcher sie sich befinden. So konnte in einem murinen *in vitro* Modell demonstriert werden, dass eine geringe Anzahl an HPC zusammen mit Dexamethason eine osteogene Differenzierung kokultivierter MSC beschleunigt (Liao et al., 2011). Neben solchen zweidimensionalen Kokulturen wurde auch ein dreidimensionales Kokultursystem beschrieben, welches im direkten Vergleich zu signifikant erhöhter Expansion von CD34⁺ Zellen und erhöhter Koloniebildungsfrequenz führte (Zhang et al., 2006b). Dies impliziert, dass die Position von HPC auf bzw. in dem MSC Feederlayer wichtig ist. Es konnte gezeigt werden, dass adhärenzte CD34⁺ Zellen in zweidimensionaler Kokultur mehr CXCR4 exprimieren und in ihrer Differenzierung inhibiert werden. Außerdem können den adhärenzten HPC aufgrund ihrer Position über dem MSC Feederlayer oder unter der Zellschicht zwischen MSCs und Zellkulturplastikboden unterschiedliche Eigenschaften zugeordnet werden. So sind die HPC unter dem MSC Feeder quieszenter und weisen einen primitiveren Phänotyp auf, während die HPC auf dem MSC Feeder eine hohe Zellteilungsrate aufweisen. CD34⁺ CD38⁻ HPC migrieren rasch unter die MSC, und diese Migration kann durch Inhibierung von Integrin-β1 oder CXCR4 gestoppt werden (Alakel et al., 2009; Jing et al., 2010). Überdies konnte berichtet werden, dass die Kokultivierung von HPC mit MSC die CD34⁺ Zellen vor induzierter Apoptose schützt (Koh et al., 2005). Einen schematischen Überblick über die MSC-HPC-Interaktion und die daran möglicherweise beteiligten Faktoren bietet die Abbildung 3.

Eine *ex vivo* Expansion von HPC, auch unter Kokulturbedingungen mit MSC, würde bedeutende Vorteile für die klinische Anwendung mit sich bringen. Nach weitgehendem Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen könnten die zu expandierenden HPC gezielt stimuliert werden, um ein optimales Anwachsen und bestmögliche Therapieerfolge zu erzielen. So könnten autolog HPC von Patienten oder allogenen aus Nabelschnurblut gewonnen werden und nach *ex vivo* Expansion wieder zurück transplantiert werden. Zum derzeitigen Stand der Forschung ist es jedoch noch nicht möglich, sämtliche Komponenten und Interaktionen der physiologischen HPC Nische im Knochenmark nachzuahmen, so dass die HPC über längere Zeit quieszent mit CD34⁺ CD38⁻ Phänotyp verbleiben (Hofmeister et al., 2007; Walenda et al., 2010; Walenda et al., 2011a; Walenda et al., 2011b). Einen wesentlichen Einfluss auf eine *in vitro* Expansion von HPC hat ebenfalls das

Kultivierungsmedium. So haben vor mehr als zwei Jahren Zhang und Kollegen ein Medium für die Kultur von HPC beschrieben, welches neben dem Basalmedium mit einer Kombination aus fünf verschiedenen Wachstumsfaktoren (SCF, TPO, FGF, ANGPTL5, IGFBP2) versetzt wurde, um eine optimale Expansion von primitiven HPC zu erzielen (Zhang et al., 2008).

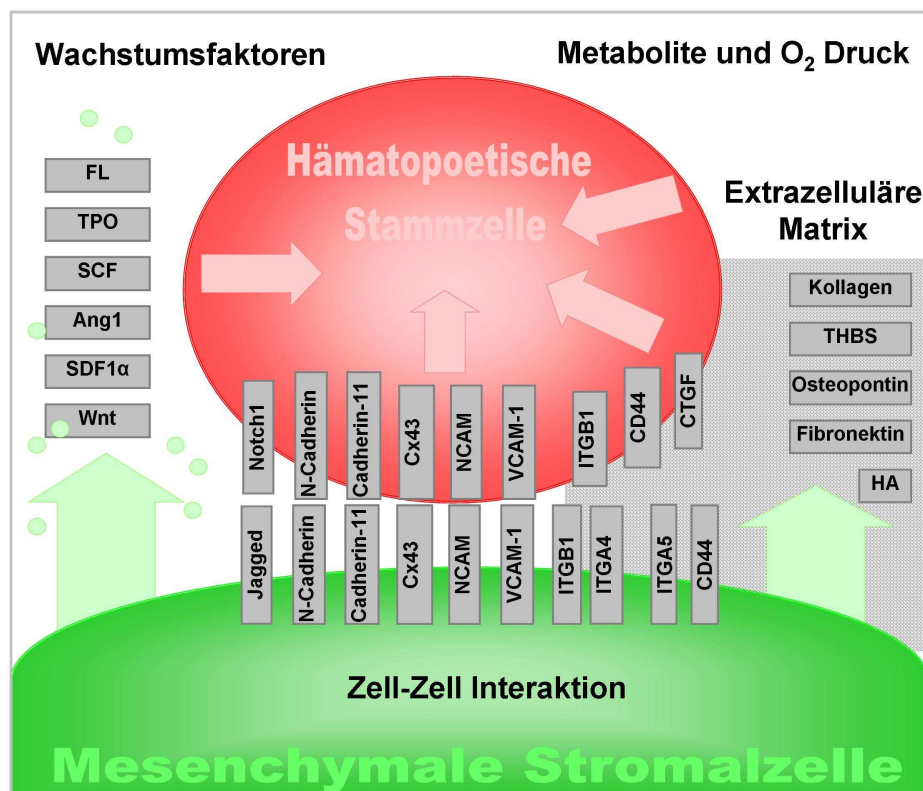


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer *in vitro* Kokultivierung von HPC mit MSC. Dargestellt sind Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren, Metabolite und der Sauerstoffpartialdruck, die extrazelluläre Matrix und verschiedene Zell-Zell-Adhäsionsproteine, welche an der Interaktion von HPC mit MSC beteiligt sind. Eine optimale Nachahmung der natürlichen Umgebung der Nische *in vitro* könnte zu einer optimierten Expansion von primitiven HPC führen. Adaptiert aus Wagner et al., 2008b.

1.2.4 *In vitro* Assays zur Analyse des Stammzellpotentials

Um das verbleibende Stammzellpotential nach einer *in vitro* Kultivierung zu untersuchen, stehen eine Reihe von Assays zur Verfügung. Ein koloniebildender (CFU-) Assay misst die Entstehung von verschiedenen Kolonien von differenzierten Blutzellen. Es wird dabei beispielsweise zwischen erythroiden (CFU-E), granulozytären (CFU-G) und makrophagenartigen Kolonien (CFU-M) sowie verschiedenen Mischformen (z.B. CFU-GM, CFU-GEMM) unterschieden. Während diese Methode den Vorteil der Reproduzierbarkeit

bietet, bleibt es unklar, ob die gemessenen Zellen tatsächlich zur Hämatopoese beitragen. Des Weiteren sind „Long-Term-Culture Initiating Cell“ Assays (LTC-IC) und „Cobblestone-Area-forming-Cell“ Assays (CAFC-Assay) etabliert (Sutherland et al., 1989; Zhang et al., 2002). Der LTC-IC-Assay ist in der Lage, nach einem Zeitraum von fünf Wochen primitiv erhaltene HPC in Kultur nachzuweisen, während im CAFC-Assay das Entstehen von charakteristischen kopfsteinpflasterartigen Zellverbänden mit Stammzellpotential untersucht wird. Nachteile dieser Methoden sind, dass kein Langzeitanwachsen gemessen wird und die Komplexität und Dauer der Versuche eine Reproduzierbarkeit erschweren (Hofmeister et al., 2007). Außerdem wurde demonstriert, dass Fraktionen aus mononukleären Nabelschnurblutzellen eine höhere CAFC Frequenz als LTC-IC-Frequenz aufweisen, und dass mehr als 60 % der CAFC nach fünf Wochen keine LTC-IC-Funktion nachweisbar ist. Jedoch sind beide Assays in ihrer Aussage vergleichbar, wenn wie in dieser Arbeit CD34⁺ angereicherte Zellen verwendet werden (Denning-Kendall et al., 2003). Als *in vivo* Assays stehen z.B. NOD/SCID Repopulationsassays zur Verfügung, mit welchem das Anwachsen von humanen Blutzellen in subletal oder letal bestrahlten Mäusen untersucht werden kann. Mit Hilfe dieses Assays wurde erstmalig das repopulierende Potential von humanen HPC beschrieben (Siminovich et al., 1963; Siminovich et al., 1964). Obwohl dieser Assay gut etabliert und anerkannt ist, wird das Anwachsen von humanen Zellen in der Mikroumgebung der Maus untersucht, welche nicht 1:1 die humane Stammzellnische darstellt und somit eventuell nicht mit dem Homing in das humane Knochenmark vergleichbar ist (Hofmeister et al., 2007).

1.2.5 Zellalterung *in vitro* und *in vivo*

Alle Zellen des menschlichen Körpers sind einem Alterungsprozess unterworfen. Dabei wird die Hämatopoese ebenfalls beeinflusst, und Seneszenzeinflüsse von MSC auf deren stromale Funktion stellen auch während *in vitro* Kokultivierungen mit HPC einen nicht unentscheidenden Faktor dar. Das regenerative Potential der Gewebe nimmt im Verlauf der Alterung ab. Im Rahmen von *in vitro* Kultivierung ist die Seneszenz von humanen somatischen Zellen über die Anzahl an Passagen definiert, es wird auch von replikativer Seneszenz gesprochen (Ho et al., 2005). Das Altern der Zellen ist dabei von der Anzahl der Zellteilungen abhängig (von Zglinicki und Martin-Ruiz, 2005). Beispielsweise werden MSC nach etwa 20 bis 50 Populationsverdopplungen größer und granulärer, wobei die Anzahl an möglichen Zellteilungen von den Kulturbedingungen abhängig ist. Die Aktivität der β -Galaktosidase sowie die Apoptoserate ist in seneszenten MSC signifikant erhöht (Zhou et al., 2008). Im Gegensatz zu humanen MSC können beispielsweise murine MSC über mehr als hundert Populationsverdoppelungen kultiviert werden (Fehrer und Lepperdinger, 2005).

Werden humane MSCs aus einem einzelnen Zellklon in niedriger Zelldichte mit regelmäßigem Passagieren kultiviert, so sind bis zu 50 Populationsverdoppelungen möglich, wohingegen diese MSC ihre Proliferation unter hoher Zelldichte bereits nach 15 Populationsverdoppelungen einstellen (Colter et al., 2000). Trotzdem verbleiben senescente Zellen weiterhin metabolisch aktiv, und können in diesem Stadium über Jahre am Leben erhalten werden. Dieses Phänomen wurde bereits vor über 40 Jahren von Leonard Hayflick beschrieben und die Zellteilungsgrenze seitdem als „Hayflick-Limit“ bezeichnet (Hayflick L. und Moorhead P.S., 1961; Hayflick, 1965). Es wird seither diskutiert, ob das Hayflick-Limit auch den Alterungsprozess *in vivo* widerspiegelt. So haben einige Studien gezeigt, dass Langzeitkultur von MSC Auswirkungen auf das Differenzierungspotential hat (Stenderup et al., 2003; Fehrer und Lepperdinger, 2005; Bonab et al., 2006). Außerdem ist die Alterung von MSC ein kontinuierlicher Prozess, welcher mit der ersten Zellpassage beginnt. Abbildung 4 zeigt typische Wachstumskurven von MSC unterschiedlich alter Spender. Verschiedene Gene werden im Verlauf von replikativer Seneszenz differentiell exprimiert. Diese Änderungen der Genexpression sind zwischen verschiedenen Spendern sehr konstant und korrelieren ebenso mit den Änderungen in der Genexpression von Zellen alter und junger Spender. Es konnte zudem beobachtet werden, dass die Telomerlänge von MSC nicht zwangsläufig mit dem Spenderalter korreliert. Jedoch existieren Hinweise, dass mit zunehmenden Spenderalter die Variationen in der Telomerlänge zunehmen. Somit scheint bei MSC ein Zusammenhang zwischen dem Prozess der replikativen Seneszenz und der Zellalterung *in vivo* zu bestehen (Parsch et al., 2004; Wagner et al., 2008a; Wagner et al., 2009).

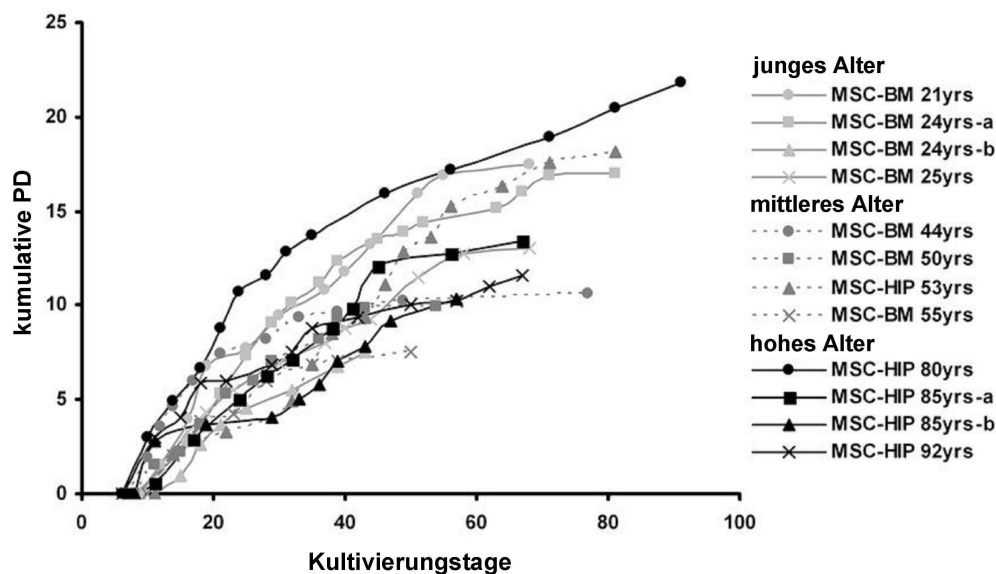


Abbildung 4: Wachstumskurven von MSC in Langzeitkulturen von Spendern unterschiedlicher Altersklassen. Nach einer bestimmten Zahl an Populationsverdoppelungen erreichen die MSC das Hayflick-Limit, stoppen die Proliferation und verbleiben in einem seneszenten und quieszenten Status. Bei *in vitro* Kulturen kann nur ein sehr geringer und nicht signifikanter Einfluss des Spenderalters auf das Wachstumsverhalten verzeichnet werden. Adaptiert aus Wagner et al., 2009.

Auch hämatopoetische Stammzellen werden durch Alterungsprozesse beeinflusst. So konnte demonstriert werden, dass die Differenzierungsfähigkeit in lymphoiden Zellen mit zunehmendem Alter sowohl in Mäusen als auch im Menschen abnimmt (Sudo et al., 2000; Linton und Dorshkind, 2004). Im Gegensatz dazu ist das myeloide Potential mit zunehmendem Alter nicht beeinflusst. Dieser Unterschied wurde in Mausexperimenten selbst mit sehr kleinen transplantierten Zellmengen auf der Ebene von oligopotenten myeloiden und lymphatischen Vorläufern deutlich, was ein Hinweis auf altersabhängige unterschiedliche Differenzierungsentscheidungen von HPC ist (Rossi et al., 2005; Gazit et al., 2008). Im Zusammenhang damit könnte auch die Beobachtung stehen, dass hämatologische Erkrankungen, welche mit zunehmendem Alter auftreten, eher myeloiden Ursprungs sind, während Erkrankungen bei Kindern sich eher im lymphatischen Kompartiment manifestieren (Signer et al., 2007). Jedoch ist über die genauen Mechanismen, welche zur Alterung in HPC beitragen, bisher wenig bekannt. In globalen Genexpressionsprofilen in murinen HPC wurde eine Reihe von zelllinienspezifischen Genen identifiziert, die im Rahmen der Alterung differentiell reguliert werden (Rossi et al., 2005; Prall et al., 2007). Zusammengefasst wird verdeutlicht, dass Seneszenz und Zellalterung sehr komplexe Prozesse sind, an denen viele Faktoren beteiligt sind.

1.3 Klinische Relevanz und therapeutisches Potential

1.3.1 Erkrankungen des blutbildenden Systems mit Bezug zu dieser Arbeit

Im Verlauf von hämatologischen Erkrankungen wie Leukämien beginnen meistens ein oder mehrere Zellklone mit einer unkontrollierten Proliferation, was zu einer Verdrängung der übrigen Blutzelltypen führt. So zählt das multiple Myelom (MM) zu den Plasmazellerkrankungen mit unkontrollierter Proliferation dieses Zelltyps in der Knochenmarkmikroumgebung. Es wird zusätzlich anhand verschiedener Organfehlfunktionen charakterisiert (Palumbo und Anderson, 2011). Ein multiples Myelom entsteht aus einer asymptomatischen prä malignen Proliferation monoklonaler Plasmazellen aus B-Zellen, indem eine Vielzahl von genetischen Veränderungen und Abnormalitäten in der Mikroumgebung zu einer Transformation und schließlich zu einem malignem Neoplasma führt (Kuehl und Bergsagel, 2002). Entscheidend ist, dass durch diese genetischen Veränderungen auch die Expression von Adhäsionsproteinen auf Myelomzellen sowie die Reaktionen auf Wachstumsreize beeinflusst werden. Interaktionen zwischen den

Myelomzellen und den Zellen der Knochenmarknische sowie den Proteinen der ECM, welche über Zelloberflächenrezeptoren wie Integrine, Cadherine, Selektine und andere Zelladhäsionsmoleküle binden, führen zu einem verstärkten Tumorwachstum und erhöhen in der malignen Zellfraktion die Überlebensrate, Migration und Resistenzen gegen Therapeutika (Palumbo und Anderson, 2011).

Im Gegensatz dazu werden alle malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems unter dem Sammelbegriff der „Non-Hodgkin-Lymphome“ (NHL) zusammengefasst, außer wenn es sich um das Morbus Hodgkin handelt. Unter dem Morbus Hodgkin wird ein bösartiger Tumor der Lymphknoten verstanden, welcher sich unter anderem durch charakteristische Symptome wie Schwellungen der Lymphknoten und das Vorhandensein von sogenannten Reed-Sternberg-Zellen, welche fusionierte Zellen aus B-Lymphozyten darstellen, auszeichnet (Brauninger et al., 2006). Es wurde erstmals 1832 von dem britischen Arzt Thomas Hodgkin beschrieben (Hodgkin, 1832). Unter den NHL wurden bis 2001 wenigstens 20 Subtypen definiert, welche sich alle in histopathologischer, immunologischer und klinischer Hinsicht unterscheiden (Harris et al., 1999). Inzwischen werden 43 Formen des Lymphoms in vier Gruppen durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert (Turner et al., 2004; Clarke et al., 2004).

Eine weitere Gruppe der hämatologischen Erkrankungen ist die Gruppe der myeloproliferativen Neoplasien (MPN). Dabei handelt es sich um eine monoklonale Erkrankung einer myeloischen Stammzelle mit exzessiver autonomer Proliferation in eine oder mehrere Zelllinien. Dem entsprechend wird die Erkrankung in chronische myeloische Leukämien (CML), Polycythaemia vera (PV), essentielle Thrombozythämie (ET) und primäre Myelofibrose (PMF) unterteilt. Das Durchschnittsalter der Diagnosestellung liegt zwischen 55 und 65 Jahren. Als Mitverursacher der Erkrankung wird in vielen Fällen die Mutation V617F der intrazytoplasmatisch lokalisierten rezeptorassoziierten Januskinase 2 (JAK2 V617F-Mutation) in den klonalen Zellen nachgewiesen. Außerdem wurden Mutationen im TET2 Gen beobachtet, welches ebenfalls eine wichtige Rolle in der Myelopoese und in Methylierungsschritten spielt. Jedoch sind diese Mutationen nicht immer nachweisbar. Aus diesem Grund ist derzeit unklar, welche Mechanismen zur Unterdrückung der normalen Hämatopoese beitragen (Wickenhauser, 2002; Benesch und Deeg, 2003; Jost et al., 2007; Orazi und Germing, 2008; Delhommeau et al., 2009).

1.3.2 Transplantation von HPC bei hämatopoetischen Erkrankungen und hämatopoetische Rekonstitution

In den vergangenen Jahren hat sich die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (HSCT) bei malignen hämatologischen Erkrankungen von einer sehr experimentellen Prozedur zu einer Standardtherapie entwickelt (Gratwohl et al., 2009). Bereits vor über 50 Jahren wurde von Thomas und Kollegen Pionierarbeit geleistet und Knochenmarkaspirat intravenös Patienten nach Bestrahlung und Chemotherapie verabreicht (Thomas et al., 1957). Seit dieser Zeit wurden autologe und allogene HSCT in der Klinik gut etabliert und werden derzeit standardmäßig für die Rekonstitution des blutbildenden Systems nach erfolgter Hochdosis-Chemotherapie angewendet (Ljungman et al., 2010). Die hämatopoetische Rekonstitution nach HSCT wird gewöhnlich innerhalb von Wochen beobachtet, doch es ist bis heute unklar, welche Mechanismen das enorme regenerative Potential und die Aktivierung der HPC bestimmen (Spiegel et al., 2008). Traditionell werden HPC für die Transplantation aus Knochenmarkaspiraten oder mobilisiertem Peripherblut per Leukapherese isoliert. Zusätzlich wurde in den letzten 20 Jahren das Nabelschnurblut (CB) als attraktive und alternative Quelle für HPC entdeckt (Broxmeyer et al., 1989; Gluckman et al., 1989). Derzeit sind über 600.000 CB Einheiten in öffentlichen Nabelschnurblutbanken eingefroren (Sullivan, 2008; Stanevsky et al., 2011). Eine HSCT mit CB-HPC bringt den Vorteil signifikant niedrigerer Raten von „Graft-vs-Host Disease“ (GvHD) mit sich, und ermöglicht aufgrund einer breiteren HLA Verteilung eine optimierte Auswahl an passenden Transplantaten für den Empfänger (Gluckman et al., 1997; Rocha et al., 2004). Allerdings ist die Anzahl an HPC pro CB-Einheit sehr begrenzt, weshalb eine *in vitro* Expansion von HPC, beispielsweise durch Kokultivierung mit MSC wie unter Punkt 1.2.3 beschrieben, neue Perspektiven für HPC Transplantationen öffnen würde.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die Zahl an HPC pro CB-Einheit ist für die Transplantation bei hämatologischen Erkrankungen sehr begrenzt. Im Rahmen von allogenen und autologen HSCT wäre es daher von bedeutendem Vorteil, wenn HPC nach Isolation zunächst in einem geeigneten *in vitro* Kultursystem expandiert werden könnten, ohne dass die Zellen ihre Stammzeleigenschaften verlieren. Im Anschluss an eine solche *in vitro* Expansion stünden erheblich größere Mengen an HPC pro Transplantat zur Verfügung, was das Anwachsen der Zellen verbessern würde.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedingungen für eine optimale *in vitro* Expansion von HPC zu untersuchen. Dazu wird ein Hauptaugenmerk zunächst darauf gerichtet, Faktoren zu identifizieren und analysieren, welche an der Expansion von HPC während *in vitro*

Kultivierungen beteiligt sind. Dazu zählt der Vergleich des Einflusses einer *in vitro* Expansion von humanen CD34⁺ HPC ohne und mit MSC Kokultur durch durchflusszytometrische Analyse der Stammzellmarker CD34, CD38 und CD133 sowie verschiedene Differenzierungsmarker wie CD13, CD45 und CD56. Da die HPC mit dem Farbstoff CFSE gefärbt werden, erlaubt dieses nach Expansion eine parallele durchflusszytometrische Analyse der Zellteilungen.

Ein Parameter, der untersucht werden soll, ist der Einfluss von Adhäsionsproteinen und das zelluläre Altern von MSC auf deren stromale Funktion für den Erhalt der HPC. Um gezielter zu analysieren, welche Proteine an der Zell-Zell-Interaktion und der Aufrechterhaltung des Stammzellpotentials beteiligt sind, werden mit bereits etablierten siRNA Systemen bestimmte Proteine wie die Adhäsionsproteine N-Cadherin, Cadherin-11, CD44 und ITGB1 in den MSC-Feederzellen herunter reguliert und Zellteilungen und Immunphänotyp der HPC nach Expansion untersucht. Um die Aufrechterhaltung des Stammzellpotentials genauer bestimmen zu können, werden koloniebildende Assays wie ein LTC-IC-Assays mit auf siRNA-transfizierten MSC kultivierten HPC durchgeführt. Diese Versuche dienen dazu, Modifikationsmöglichkeiten zu identifizieren, welche helfen könnten, die Expansion von HPC zu optimieren.

Im Anschluss soll der Einfluss von Wachstumsfaktoren unter Kokulturbedingungen von HPC und MSC getestet werden. Es werden HPC ohne und mit MSC expandiert und dem Kultivierungsmedium verschiedene Kombinationen der Zytokine SCF, TPO, FGF, ANGPTL5 und IGFBP2 zugesetzt. Nach Expansion werden die Aufrechterhaltung der Stammzellcharakteristika und Zellteilungen durchflusszytometrisch und mittels CFU-Assays untersucht. Um ein repopulierendes Potential *in vivo* nachzuweisen, kommt ein NOD/SCID Mausmodell zum Einsatz. Dabei werden subletal bestrahlten Tieren ohne und mit MSC und jeweils allen fünf Zytokinen präexpandierte HPC transplantiert und nach sieben Wochen das Anwachsen analysiert.

Überdies soll weitergehenden klinisch relevanten Fragestellungen nachgegangen werden, wie die Hämatopoese im menschlichen Körper reguliert und nach einer Chemotherapie regeneriert wird. Dazu wird aus Peripherblut von Patienten, welches zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Chemotherapie abgenommen wird, Serum isoliert. Es wird der Einfluss des Zusatzes dieser Serumproben im Kulturmedium mit und ohne Kokulturbedingungen auf den Erhalt der Stammzeleigenschaften getestet. Diese Untersuchungen sollen neben einem genaueren Verständnis der zugrundeliegenden

Mechanismen dazu beitragen, neue Wege für eine klinisch relevante Expansion von HPC im Rahmen autologer Stammzelltransplantationen mit patienteneigenem Material zu ebnen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Primärantikörper

anti-Cadherin-11	Klon 5B2H5, Zymed Laboratories, San Francisco, USA
anti-N-Cadherin	Klon 32, Beckton Dickinson [BD], Heidelberg
anti-ERK2	BD; 610030
anti-Integrin beta 1	Klon 4B4LDC9LDH8, Beckman Coulter, Fullerton, USA
anti-CD44	Klon DF1485, 03-16080, Gentaur, Brüssel, Belgien
anti- β -Aktin	Klon sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

(alles monoklonale Antikörper aus der Maus)

2.1.2 Sekundärantikörper

Ziege-anti-Maus Antikörper Klon sc-2005, Santa Cruz Biotechnology

2.1.3 FACS-Antikörper

CD3-APC	Klon HIT3a, BD, San Jose, USA
CD3-PE	Klon SK3, BD
CD13-APC und -PE	Klon WM15, BD
CD19-APC	Klon HIB19, BD
CD19-PE	Klon 4G7, BD
CD20-APC	Klon L27, BD
CD33-PE	Klon D3HL60.251, Beckman Coulter, Krefeld
CD34-APC	Klon 8G12, BD
CD38-PE	Klon HB-7, BD
CD45-APC	Klon HI30, BD
CD45-V500	Klon HI30, BD
CD56-PE	Klon MY31 und B159, BD
CD133-PE	Klon AC141, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.4 Chemikalien

CASYCLEAN	Schärfe System, Reutlingen
CASYTON	Schärfe System
CFSE	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe

DMSO	Roth
EDTA	Sigma
Ethanol reinst	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth
Magermilchpulver	Merck
Methanol	Roth
PBS	PAA, Pasching, Österreich
PD098059	Promega, Madison, WI, USA
Propidiumiodid Färbelösung	BD, Heidelberg
Triton-X-100	Sigma
Tween-20	Roth

2.1.5 Molekularbiologische Chemikalien und Kits

2'-Amino-3'-Methoxyflavon	PD098059, Promega, Madison, USA
CD34-Micro-Bead Kit	Miltenyi Biotec
Chemilumineszenz ECL Lösung	Amersham Biosciences, UK
Gelladepuffer	Fermentas GmbH, St. Leon Rot
High Capacity cDNA RT Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Page Ruler pre-stained protein ladder	SM0671, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Polyvinylidendifluorid Membran	Millipore, Billerica, USA
RayBio Human Cytokine Antibody Array	RayBiotech, Norcross, GA, USA
RNA Größenstandard RNA 6000	Ambion Inc., Austin, TX, USA
RNAi Starter Kit	301799, Qiagen, Hilden
RNA 6000 Pico LabChip kit	Agilent, Waldbronn
Transferpuffer 25x	Anamed Elektrophorese GmbH; Darmstadt
Tris-Glycin-SDS Laufpuffer 10x	Anamed
4-12 % TRIS-Glycin Gradientengele	Anamed
TRIzol Reagenz	Invitrogen, Paisley, UK
Trypsin EDTA 0,25 %	Sigma

2.1.6 siRNA Konstrukte und Primer

Alle verwendeten siRNA-Konstrukte wurden von der Firma Qiagen bezogen und sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Biospring in Frankfurt am Main synthetisiert. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete siRNA Konstrukte

Ziel - mRNA	Abkürzung	Nummer
Integrin-beta-1	ITGB1	SI00034370
N-Cadherin	N-CDH	SI00028441
Cadherin-11	CDH11	SI00028511
Jagged-1	Jagged-1	SI02780134
vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1	VCAM-1	SI00021630
mitogenaktivierte Protein Kinase-1	MAPK-1	SI1022564

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Primersysteme

Name	Abkürzung	Sequenz
Integrin-beta-1	ITGB1-F	5'-CGTAGCAAAG GAACAGCAGA -3'
	ITGB1-R	5'-GCTTAGCTGT TGTGCTA-3'
vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1	VCAM-1-F	5'-TACCCATTTG ACAGGCTGGA-3'
	VCAM-1-R	5'-TGGAACAGGT ATGGTCACA-3'
Jagged-1	Jagged-1-F	5'-CTTCCAACGA ACACCTGAA-3'
	Jagged-1-R	5'-GTTGACACCAT CGATGCAAG-3'
Glycerinaldehyd-3- Phosphat-Dehydrogenase	GAPDH-F	5'-TTCGTCATGG TGTGAACCA-3'
	GAPDH-R	5'-CTGTGGTCAT AGTCCTTCCA-3

2.1.7 PCR-Programme und Mastermixe

Reverse Transkription

Die reverse Transkription isolierter RNA wird mit dem „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ von Applied Biosystems an einem Eppendorf Mastercycler durchgeführt.

Tabelle 3: Pipettierschema für eine reverse Transkription isolierter RNA

Reagenz	Konzentration	1x Vol.
H ₂ O		4,20 µL
Reverse Transcription Puffer	10x	2,00 µL
Random Primer	10x	2,00 µL
dNTPs	25x	0,80 µL
Multiscribe Rev. Transkriptase	50 U/µL	1,00 µL
Template RNA in H ₂ O	5 ng/µL	10,00 µL
Summe		20,00 µL

Tabelle 4: Temperaturprogramm einer reversen Transkription

Primerbindung	Reverse Transkription	Denaturierung	Programmende
1 x 25 °C, 10 min	1 x 37 °C, 120 min	1 x 85 °C, 5 s	1 x 4 °C

Quantitative Realtime-PCR

Realtime-PCR werden mit dem Farbstoff SYBR-Green am "ABI PRISM 7700HT Sequence Detection System Instrument" (Applied Biosystems) durchgeführt.

Tabelle 5: Pipettierschema für eine Realtime-PCR

Reagenz	Konzentration	1x Vol.
H ₂ O		6,00 µL
Power SYBR Green PCR Master Mix	2x	10,00 µL
Forward Primer	10 µM	1,00 µL
Reverse Primer	10 µM	1,00 µL
Template cDNA in H ₂ O	5 ng/µL	2,00 µL
Summe		20,00 µL

Tabelle 6: Temperaturprogramm einer Realtime-PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annäherung und Elongation	Programmende
1 x 95 °C, 10 min	40 x 95 °C, 15 s	40 x 60 °C, 60 s	1 x 4 °C

2.1.8 Zellkulturmedien und Puffer

Medium 7

58 % DMEM-LG	PAA, Pasching, Österreich
40 % MCDB201	Sigma, Deisenhofen
2 % FCS	HyClone, Bonn
2 mM L-Glutamin	Sigma
100 U/mL Pen/Strep	Lonza, Basel, Schweiz
1 % ITS	Sigma
1 % Linolensäure BSA	Sigma
10 nM Dexametason	Sigma
0.1 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma
10 ng/mL PDGF-bb	Peptotech, Hamburg
10 ng/mL EGF	Peptotech

HPL-Medium

DMEM-LG	PAA
2 mM L-Glutamin	Sigma
100 U/mL Pen/Strep	Lonza
10 % pHPL	diese Arbeit
2 U/mL Heparin	Roche GmbH, Mannheim

Einfriermedium

80 % FCS	HyClone
20 % DMSO	Roth

LTBMC-Medium

IMDM	Gibco, Carlsbad, CA, USA
12.5 % FCS	HyClone
12.5 % Pferdeserum	Terry Fox Laboratories, Vancouver, Canada
2 mM L-Glutamin	Sigma
1000 U/mL Penicillin	Gibco
100 U/mL Streptomycin	Gibco
1 µM Hydrocortison	Sigma

StemSpan Medium komplett

StemSpan SFEM	Stem Cell Technologies, Grenoble, Frankreich
500 ng/mL ANGPTL5	Abnova GmbH, Heidelberg
10 ng/mL FGF	PeptoTech
10 µg/mL Heparin	Roche GmbH
100 ng/ml IGFBP2	R&D Systems, Wiesbaden
10 ng/mL SCF	PeptoTech
20 ng/mL TPO	PeptoTech

StemSpan Medium mit Peripherblutserum

StemSpan SFEM	Stem Cell Technologies
10 % Serum aus Peripherblut	diese Arbeit

Methylzellulose Medium für CFU- und LTC-IC-Assays

HSC-CFU light with EPO	Miltenyi Biotec
------------------------	-----------------

Zelllyse-Puffer

50 mM Tris HCl pH 7.5	Roth
150 mM NaCl	Merck
5 mM EDTA	Roth
1 % Triton-X-100	Sigma
1 % Protease Inhibitor Cocktail	Sigma

MACS-Puffer

PBS	PAA
1 % FCS	HyClone
2 mM EDTA	Sigma

MTT-Solvent Lösung

4 mM HCl	Roth
0,1 % Nonidet-P-40	Sigma
Isopropanol	Roth

RBC-Lysepuffer

150 mM Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck
10 mM Kaliumbikarbonat (KHCO ₃)	Merck
0,1 mM EDTA	Roth

2.1.9 Zellen

Mesenchymale Stromalzellen	Primärkulturen aus humanem Knochenmark
Hämatopoetische Stammzellen	frische Isolate aus humanem Nabelschnurblut

2.1.10 Geräte

ABI PRISM® 7700HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn
Autoklav	Zentracert, Typ 5169, Lautenschläger, Köln
Auto MACS System	Miltenyi Biotec
Bestrahlungsgerät	IBL-437, Cis Bio International, Bagnols, Frankreich
Eismaschine	Scotsman Frimont AF80, Pogliano, Italien
FACS CANTO II	BD
FACS SCAN	BD
FACS Vantage SE Zellsorter	BD
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80 °C	Platinum 340, Angeloni Industrie SpA, Massa Martana, Italien
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Hyperfilm (Western Blot Detektion)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Hyperprocessor 110/120 V	GE Healthcare, Freiburg
Inkubator 37 °C	Hera Cell 240, Thermo Scientific, Langenselbold
Kühlschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborwaage	TE313S, Sartorius GmbH, Göttingen
Plattenfluoreszenzlesegerät	LAS-3000, Fujifilm Europe, Düsseldorf
Linearbeschleuniger Precise	Elekta GmbH, Hamburg
Magnetrührer	VMS-C7, VWR International GmbH, Darmstadt
Nano Drop ND-1000 Spektralphotometer	Peqlab Biotechnology, Erlangen
Reinstwasseranlage	EDI 40-System, membraPure GmbH, Bodenheim
Schüttelinkubator	HT Minitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Sequence Detection System Instrument	Applied Biosystems
Spannungserzeuger	VWR International GmbH, Darmstadt
Spülmaschine	Riebesam Prof. 26-03, Seland GmbH, Essen
Sterilbänke	Thermoscientific, Karlsruhe
Tecan Infinite 200 Platten Lesegerät	Tecan Trading, Männedorf, Schweiz
Tischzentrifuge	Centrifuge 5418, Eppendorf
Trima Accel Collection System	CaridianBCT, Garching
Wasserbad	PD Industriegesellschaft mbH, Dresden
Wärmeschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Western Blot Kammern	Bio-Rad Laboratories, München
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifugen	Rotanta 460, Hettich, Tuttlingen

2.1.11 Verbrauchsmaterial und Glaswaren

2 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt
1,5 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt
0.2 µm GD/X PVDF Filter	Whatman, Dassel
2 mL Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
5 mL Kunststoff-Einwegpipetten	Corning Inc., New York, USA
10 mL Kunststoff-Einwegpipetten	Corning
25 mL Kunststoff-Einwegpipetten	Corning
Einfrierdose für Zellen (Mr. Frosty)	Nalgene, Roskilde, Dänemark
Fotoplatten zur Western Blot Detektion	Fujifilm Europe, Düsseldorf
Magnetrührstäbchen versch. Größen	VWR
Mini-MACS Zellseparationsröhrchen	Miltenyi Biotec
Nabelschnurblut-Entnahmesets	Vita 34 AG, Leipzig
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim
Pasteur-Pipetten	Brand
24-Well Platten	Nunc
96-Well Platten	Nunc
Pipetten versch. Größen	Eppendorf
Pipettenspitzen versch. Größen	Star Lab, Ahrensburg
15 mL Röhrchen	BD Falcon, Heidelberg und Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
50 mL Röhrchen	BD Falcon
5 mL Röhrchen	BD Falcon

Schottflaschen verschiedener Größen	Schott GmbH, Mainz
Sonstige Glaswaren	Schott
75 cm ² Zellkulturflaschen	Nunc
25 cm ² Zellkulturflaschen	Nunc
Zellsiebe verschiedene Größen	BD

2.1.12 Software

Adobe Photoshop	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
FACS-Diva, Version 4.1	BD
FACS CellQuest Pro	BD
FlowJo, Version 5.7.2	Tree Star, Ashland, OR, USA
L-Calcul	Stem Cell Technologies
Leica application suite	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Multi Gauge	Fujifilm Europe
TIGR MeV Version 4.4	Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA
WinMDI 2.8	The Scripps Institute, San Diego, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation und Separation der MSC

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt die Isolation von MSC aus humanem Knochenmark. Es werden zum einen Knochenmarkaspirationen von gesunden allogenen Spendern bezogen, welche nach umfassender Aufklärung durch den behandelnden Arzt und schriftlichem Einverständnis des Patienten aus Filtersets von Knochenmarkaspiratbeuteln in Übereinstimmung mit der Ethikkommission der Universität Heidelberg mit Bezug zur Verwendung von humanem Material isoliert werden. Die Beutel enthalten nach Knochenmarktransplantationen Restmengen an MSC. Diese Filtersets werden unter sterilen Bedingungen geöffnet und mit PBS gespült. Zum anderen werden MSC aus bei Routineeingriffen anfallenden Knochenfragmenten und Hüftköpfen in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Wolf Drescher aus der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie nach ausführlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis des Patienten isoliert. Dazu werden die Knochenstücke unter sterilen Bedingungen mechanisch zerkleinert und mehrfach mit PBS gespült. Um größere Knochenstückchen auszuschließen, wird die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße passiert.

Zur Separation der mononukleären Zellen werden Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt. Eine Dichtegradientenzentrifugation beruht auf der Tatsache, dass mononukleäre Zellen wie Lymphozyten und Monozyten eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten haben. Aus diesem Grund sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten, koagglutiniert durch das Polysaccharid Ficoll (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer), während die mononukleären Zellen ihrer geringeren Dichte entsprechend einen gut sichtbaren weißen Interphasering bilden. Die größere Dichte wird durch die Kombination von Ficoll mit Hypaque (auch Metrizoat, ein Röntgenkontrastmittel) erzielt. Zur Separation der MSC aus den Zellsuspensionen werden 50 mL Röhrchen mit 18 mL Ficoll-Hypaque Lösung befüllt und vorsichtig mit 27 mL Zellsuspension ohne Durchmischung überschichtet. Anschließend werden die Proben bei 950 x g für 25 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Ring aus mononukleären Zellen möglichst vollständig abgenommen und in ein weiteres Röhrchen überführt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wird das Zellpellet in ca. 5 mL Medium in eine 25 cm² Zellkulturflasche gegeben und bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert.

2.2.2 Kultivierung der MSC

MSC zeichnen sich durch ihre Plastikadhärenz aus. Bei Aussaat nach erfolgter Dichtegradientenzentrifugation werden diese Zellen ausschließlich durch diese Eigenschaft von den anderen hämatopoetischen Zellen separiert. In dieser Arbeit werden MSC in drei verschiedenen Medien kultiviert: Medium 7 (Reyes et al., 2001), DMEM-LG mit 10 % FCS und DMEM-LG mit 10 % pHPL (Horn et al., 2010).

2.2.3 Passagieren und Kryokonservierung der MSC

Zur Expansion von MSC eines Spenders werden diese so lange kultiviert, bis sie 80 % bis 95 % des Zellkulturgefäßes bedecken. Die MSC werden passagiert, indem das Medium abgenommen und der Zellrasen zwei Mal mit PBS gewaschen wird. Anschließend werden ca. $13 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ Trypsin / EDTA 0,25 % hinzugegeben und die Zellen bis zum Ablösen des Zellrasens (2 bis 5 min) bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinreaktion wird durch Zugabe von etwa $80 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ Medium oder PBS jeweils mit 10 % FCS abgestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 350 x g und Suspendieren des Zellpellets in 1 mL Medium wird ein Aliquot zum Ausschluss toter Zellen mit Trypanblau-Lösung gefärbt und die Zellzahl mittels einer Neubauerzählkammer bestimmt. Bei einer erneuten Aussaat werden die MSC in einer Dichte von ca. $13.000 / \text{cm}^2$ ausgesät.

Um für eine spätere Verwendung genügend Zellmaterial eines Spenders und verschiedener Passagenzahl zur Verfügung zu haben, werden MSC für maximal ein halbes Jahr bei -80 °C oder für längere Zeit in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingelagert. Dafür werden in der Regel 10^6 MSC in 500 μL Medium mit einem gleichen Teil Einfriermedium pro Kryoröhrchen in einer Einfrierdose mit Isopropanol eingefroren. Bedingt durch die Abkühlrate des Isopropanols von 1 °C/min ist gewährleistet, dass die Bildung von für die Zelle schädlichen Eiskristallen verhindert wird. Im Gegensatz zum Einfrieren erfolgt das Wiederauftauen der MSC schnell. Die MSC-Suspension wird direkt in Medium in einer Dichte von $13.000 / \text{cm}^2$ ausgesät. Nach ein bis zwei Tagen Kultur kann ein Mediumwechsel erfolgen, um restliches DMSO zu entfernen.

2.2.4 Isolation und Separation der HPC

Die Isolation der HPC erfolgt nach ausführlicher Aufklärung durch den behandelnden Arzt und schriftlichem Einverständnis der Patientin aus humanem CB. Nach erfolgter Abnabelung wird entweder die Nabelschnur unter Zuhilfenahme eines speziellen Blutbeutel-Entnahmesets punktiert und maximal 100 mL gesammelt, oder das Blut wird direkt aus den

Nabelschnüren in vorbereitete 50 mL Röhrchen, welche mit 2000 U Heparin als Antikoagulans versetzt sind, ausgestrichen. Die Blutkollektion erfolgt durch die behandelnden Ärzte oder Hebammen. Im Anschluss wird die Blutprobe bei 4 °C gelagert und innerhalb von 24 h weiter verarbeitet. Zur weiteren Aufbereitung wird die CB-Probe mit ein bis zwei Teilen PBS verdünnt. Dann erfolgt eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Hypaque wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben. Nach Abnahme und Überführung des weißen Interphaserings aus mononukleären Zellen wird die Zellsuspension zur Vorbereitung auf eine magnetische Zellseparation zwei Mal mit MACS-Puffer gewaschen und die Zellzahl per Neubauerzählkammer bestimmt.

Die magnetische Zellseparation beruht auf der spezifischen Bindung eines Antikörpers an das entsprechende Antigen auf der Zelloberfläche, wobei die Antikörper wiederum an Eisenpartikel gekoppelt sind. Nach Inkubation der Zellen werden diese über eine in einem Magnetfeld gelagerte Säule gegeben, wobei die Zellen mit gebundenem Antikörper-Eisenpartikel-Komplex im Magnetfeld hängen bleiben. Wird die Säule aus dem Magnetfeld genommen, können die so angereicherten Zellen herausgespült werden.

Die Isolation von CD34⁺ HPC erfolgt mit dem CD34-Micro-Bead Kit gemäß den Herstellerangaben. Dazu wurde das Zellpellet nach dem Waschen in insgesamt 300 µL MACS-Puffer resuspendiert. Pro 10⁸ Zellen werden 100 µL Blocking-Puffer und 100 µL Microbead-Suspension dazugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen ein Mal mit MACS-Puffer gewaschen und in 1 µL MACS-Puffer resuspendiert. Die magnetische Aufreinigung erfolgt entweder per AutoMACS System nach Herstellerangaben oder über Mini-MACS Säulen. Zur Aufreinigung über eine Mini-MACS Säule wird diese im Ständer platziert und mit 500 µL MACS-Puffer equilibriert. Im Anschluss wird die Zellsuspension auf die Säule gegeben und nach Durchlauf der Probe drei Mal mit 500 µL MACS-Puffer gewaschen. Die CD34⁺ Zellen werden vom Magnetfeld in der Säule zurückgehalten. Nach den Waschschritten wird die Säule in einem 15 mL Röhrchen platziert, mit 1 mL MACS-Puffer befüllt und die CD34⁺ Zellen mit dem zur Säule gehörenden Stempel herausgedrückt.

2.2.5 Durchflusszytometrie und Zellsortierung

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um die Messung zellulärer Eigenschaften in einem Flüssigkeitsstrom, welcher fest installierte Detektoren passiert. Die Zellen emittieren als Einzelpartikel charakteristische optische Muster, wenn sie in einer Kapillare nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung einen oder mehrere Laserstrahlen mit

verschiedenen Emissionswellenlängen passieren. Bei Kontakt mit dem Laserlicht werden die Lichtphotonen von den Zellen gestreut und emittiert. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und Autofluoreszenzimpulse, im Falle einer Konjugation mit einem fluorochrommarkierten Antikörper spezifische Fluoreszenzimpulse. Das so gestreute Licht wird durch eine Reihe von verschiedenen Spiegeln und Filtern in die konstituierenden Wellenlängen aufgespalten, und fällt auf spezielle Detektoren, welche proportional zur detektierten Lichtmenge elektrische Impulse auslösen. Somit findet eine Konvertierung vom Analog- zum Digitalsignal statt, welches computergestützt dargestellt und analysiert werden kann. Bei einem Zellsortiergerät kommt weitere Technik zum Einsatz, bei der Subpopulationen von Zellen oder Partikeln von der Hauptpopulation aufgrund ihrer Eigenschaften getrennt werden können. Dazu zählen das Vorwärtsstreulicht (FSC; forward scatter) als relatives Maß für die Partikelgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC; side scatter) als relatives Maß für die Granularität von Partikeln sowie spezifisch emittierte Fluoreszenz von konjugierten Antikörpern (Fruehauf et al., 2000).

Zur Anreicherung von CD34⁺ Zellen werden diese nach der unter Punkt 2.2.4 beschriebenen MACS Aufreinigung mit einem direkt konjugierten CD34 Antikörper für 30 min bei 4 °C inkubiert. Zur Anreicherung von CD34⁺ und CD38⁺ HPC werden diese zusätzlich mit einem direkt konjugierten CD38 Antikörper mit anderem Fluoreszenzfarbstoff als der CD34 Antikörper inkubiert. Zellsortierungen wurden von Dr. Volker Eckstein und Frau Kerstin Wörner mit einem FACS Vantage SE Cellsorter durchgeführt (Keeney et al., 2004; Horn et al., 2008; Walenda et al., 2010; Wein et al., 2010; Tarnok et al., 2010).

2.2.6 Ko- / Kultivierung der HPC

In Abhängigkeit vom Versuchsaufbau werden die CD34⁺ HPC in unterschiedlichen Medien aufgenommen. Im Rahmen dieser Arbeit werden das LTBM Medium sowie das StemSpan SFEM Medium (beide siehe Punkt 2.1.7) mit humanem Serum oder verschiedenen Zytokinzusätzen, wie im Ergebnisteil beschrieben, verwendet. Für Kultivierungsexperimente mit anschließender durchflusszytometrischer Untersuchung des Immunphänotyps werden CD34⁺ Zellen in einer Dichte von etwa 8.000 Zellen / cm² Wachstumsfläche ausgesät. Bei einer Kokultivierung mit MSC werden diese entsprechend mindestens einen Tag vor Aussaat der HPC in einer Dichte von 15.000 / cm² Wachstumsfläche in MSC Medium als Feederlayer ausgesät. Die CD34⁺ HPC werden dann nach Abnahme des MSC Mediums in der entsprechenden Dichte im HPC Medium direkt auf die Zellen gegeben. Werden die frisch isolierten HPC aufgrund der Versuchsplanung erst am Folgetag verwendet, so werden sie über Nacht bei 37 °C in einem 15 mL Röhrchen im Bru tschrank gelagert.

2.2.7 Bestrahlung von MSC

Um eine Proliferation der MSC in Langzeitkulturen für LTC-IC-, CFU- und Proliferationsassays zu verhindern, wurden bei diesen Experimenten die Feederzellen mit Gammastrahlung in einer Intensität von 20 Gy bestrahlt. Dazu wurde ein IBL-437 Bestrahlungsgerät der Blutbank verwendet. Durch die Gammastrahlung werden Proteine und Nukleinsäuren der Zellen beschädigt, was in den meisten Fällen einen Stopp der Proliferation bewirkt. 24 h nach der Bestrahlung wird das MSC Medium durch frisches Medium oder CD34⁺ Zellen in Medium ausgetauscht, da die MSC unmittelbar nach Bestrahlung toxische Substanzen sezernieren (Punzel et al., 1999).

2.2.8 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Nach Kultivierung der HPC ohne und mit MSC Kokultur wird der Immunphänotyp von verschiedenen Oberflächenantigenen durchflusszytometrisch untersucht. Für eine FACS-Messung werden neben den Untersuchungsproben auch Autofluoreszenz- und Einzelfluorochromproben zur Kompensation der verschiedenen Fluoreszenzkanäle verwendet. Hierzu zählen eine gänzlich ungefärbte Probe zur Messung der Zell-Autofluoreszenz und Proben, welche jeweils nur mit einem einzigen Farbstoff konjugiert sind. Das Prinzip der Kompensation beruht auf der Messung des Fluoreszenzlichtes, das in andere Kanäle als den jeweils spezifischen Kanal streut, da sich die Emissionswellenlängen verschiedener Farbstoffe wie z.B. PE, PI und FITC, welche mit dem gleichen Laser angeregt werden, zum Teil überlappen. Es wird der jeweilige Streulichtanteil vom zu kompensierenden Kanal elektronisch subtrahiert (Fruehauf et al., 2000).

Zur FACS-Messung werden die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren abgeerntet, die Zellkulturschale mit 1 mL PBS gespült, bis sich alle Zellen vom Boden abgelöst haben und diese in 5 mL Röhrchen gegeben. Die Röhrchen werden bei 400 x g für 7 min zentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 200 µL abgenommen. Anschließend wird das Zellpellet resuspendiert und in die entsprechenden Röhrchen direkt konjugierter Antikörper in einer Endverdünnung von 1:200 in die Zellsuspension gegeben. Die Röhrchen werden für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Antikörperinkubation werden die Röhrchen mit 2 mL PBS aufgefüllt und für 7 min bei 400 x g zentrifugiert. Im Anschluss wird der Überstand bis auf ca. 200 µL Restvolumen abgenommen. Um bei der Messung tote Zellen auszuschließen, werden die Untersuchungsproben jeweils mit 2 µL PI Färbelösung versetzt. Das PI kann nicht mehr intakte Zellmembranen toter Zellen passieren und interkaliert ähnlich dem

Ethidiumbromid in die DNA (Walenda et al., 2010; Wein et al., 2010). Weitere durchflusszytometrische Anwendungen des PI sind z.B. die Messung von DNA-Gehalt und Zellzyklusanalysen (Moore et al., 1998; Lecoeur, 2002). Bis zur FACS-Messung werden die Proben auf Eis gelagert.

2.2.9 CFSE-Färbung

Carboxyfluorescein Diacetat N-Succinimidyl Ester (CFSE) ist ein kleines lipophiles Molekül, welches leicht durch die Zellmembran in das Zytoplasma diffundiert. Dort entfernt eine Esterase die Azetylgruppen, wodurch die fluoreszierenden Eigenschaften des CFSE-Moleküls aktiviert werden. Die Succinimidyl-Ester Gruppe bindet kovalent an Aminogruppen intrazellulärer Proteine und verankert auf diese Weise den Farbstoff im Zytoplasma (Lyons und Parish, 1994; Wang et al., 2005). Der CFSE-Farbstoff besitzt in den Zellen eine Halbwertszeit von 72 ± 4 h. Bei Zellteilungen wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt und somit in der Fluoreszenzintensität halbiert. Auf diese Weise lässt sich die Anzahl an Zellteilungen innerhalb eines begrenzten Kultivierungszeitrahmens von etwa einer Woche bei CD34⁺ HPC (Walenda et al., 2010) durchflusszytometrisch bestimmen, da aufgrund der sukzessiven Halbierung der Fluoreszenzintensität ein charakteristisches Bandenmuster in der grafischen Darstellung des FITC-Kanals detektiert werden kann (Lyons, 1999; Hasbold et al., 1999; Wallace et al., 2008). Dabei entspricht eine Bande einer Zellpopulation mit gleicher Anzahl an unternommenen Zellteilungen. Da bei jedem Färbungsvorgang die CFSE-Konzentrationen und die Zellmengen leicht variieren, muss eine durchflusszytometrische Messung der initialen Fluoreszenzintensität durchgeführt werden, um die Ausgangsintensität und somit Zellteilung null zu bestimmen. Diese Messung sollte idealerweise etwa 24 h nach der Färbung durchgeführt werden, da die Zellen unmittelbar nach der Färbung noch etwas an CFSE-Fluoreszenzintensität verlieren (Ko et al., 2007).

Um CD34⁺ HPC zu färben, werden die Zellen mit PBS gewaschen, für 7 min bei 400 x g zentrifugiert und das Zellpellet in PBS mit 0,1 % FCS resuspendiert. Es wird 2,5 µM CFSE in PBS dazugegeben und die Zellen für 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss werden 6 mL RPMI mit 10 % FCS hinzugegeben und die Zellen für 5 min auf Eis gestellt. Die Zellen werden zwei Mal mit PBS gewaschen, im entsprechenden HPC-Medium resuspendiert und entsprechend dem Versuchsaufbau ausgesät (Faber et al., 2007; Walenda et al., 2010).

2.2.10 PKH-26-Färbung

Im Gegensatz zur CFSE-Färbung wird bei der PKH-Färbung die Zellmembran angefärbt, indem der Farbstoff über aliphatische Reportermoleküle in der Membran verankert wird. Diese Färbung wird mit einem Kit der Firma Sigma Aldrich durchgeführt. Es wird zwischen PKH-2 und PKH-26 unterschieden, wovon PKH-2 Licht im grünen und PKH-26 Licht im roten Wellenlängenbereich emittiert (Horan und Slezak, 1989). Im Rahmen dieser Arbeit wird PKH-26 zur Färbung benutzt. Um die Zellen zu färben, werden diese in 500 μL Diluent C, ein Bestandteil des Kits, suspendiert. Zeitgleich wird 1,6 μL PKH-26 Färbelösung in 500 μL Diluent C vorverdünnt, diese Lösung in die Zellsuspension gegeben und 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Färbereaktion mit 5 mL Medium mit 10 % FCS abgestoppt, die Zellen werden ein Mal mit PBS gewaschen und analog zum Versuchsaufbau in Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.11 MTT-Proliferationsassay

Der MTT-Proliferationsassay zählt zu den kolorimetrischen Tests, mit dessen Hilfe die Vitalität von Zellen bestimmt werden kann. Dabei wird die Aktivität von Enzymen in den Mitochondrien der Zellen gemessen, welche den wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein wasserunlösliches, blau-violettes Formazan reduzieren. Die Menge des umgesetzten Farbstoffs entspricht der Glykolyserate der Zellen, da die Umsetzung von NADH und NADPH abhängig ist und durch Succinat-Dehydrogenasen gesteuert wird (Mosmann, 1983; Cory et al., 1991; Bernas und Dobrucki, 2002).

Da der MTT-Assay im Rahmen dieser Arbeit mit zum Teil nicht adhärennten HPC erfolgte, wurde der Assay leicht modifiziert. Für eine Messung werden alle Zellen einer Bedingung durch kräftiges Auf- und Abpipettieren aus der Kulturschale abgeerntet, in je einen 5 mL Röhrchen pro Bedingung überführt und die Zellkulturschalen mit 1 mL PBS gespült. Nach Zentrifugation bei 500 x g für 10 min wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 240 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ MTT-Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/mL MTT in PBS resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in den Röhrchen über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen bei 2330 x g für 7 min zentrifugiert, um die gebildeten Formazankristalle zu pelletieren. Der Überstand wird möglichst vollständig abgenommen, die Kristalle werden in 150 μL MTT-Solvent gelöst und in je ein 96-Well einer Zellkulturplatte überführt. Anschließend wird die Absorption bei 590 nm mit einem Referenzfilter bei 620 nm mit einem Tecan Infinite 200 Platten Lesegerät bestimmt. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch proliferierende MSC in kokultivierten HPC Proben zu

vermeiden, werden die MSC vor HPC Aussaat mit einer Dosis von 20 Gy wie unter Punkt 2.2.7 beschrieben bestrahlt. Bestrahlte MSC ohne HPC dienen bei der Messung als Hintergrundkontrolle. Die gemessene Absorption wird mit den Hintergrundkontrollen verrechnet und als Maß des Vorhandenseins vitaler Zellen dargestellt, was letztlich der Zellproliferation entspricht.

2.2.12 Zellzahlbestimmungen mit dem Casy-Zellzähler

Um die Zellzahl innerhalb eines gewählten Zellgrößenfensters zuverlässig bestimmen zu können, wurde anstatt einer Neubauerzählkammer ein Casy-Zellzählgerät eingesetzt. Vor Beginn der Messung wird die Zellsuspension mit isotoner Elektrolytlösung (CASYTON) verdünnt, um zu hohe Zellzahlen zu vermeiden. Die Zellzahl wird elektronisch bestimmt, indem der Casy-Zellzähler den elektrischen Widerstand der Zellen misst, wenn diese durch eine Kapillare von definiertem Durchmesser gezogen werden und zwei Elektroden mit angelegter Spannung passieren. Außerdem verdrängen die Zellen entsprechend ihres Volumens Elektrolytlösung, was eine Änderung des Widerstandes bewirkt. Somit werden von den Zellen ausgehende Impulse auch nach Zellgröße sortiert, was einer Kombination des Widerstandsmessprinzips mit der Pulsflächenanalyse bedeutet. Überdies können mit dieser Methode auch vitale von toten Zellen abgegrenzt werden, weil tote Zellen mit einer nicht mehr intakten Membran einen anderen Widerstand besitzen und kleiner als lebende HPC dargestellt werden (Schärfe System, http://www.ninolab.dk/fileadmin/Ninolab/pdf/innovatis/casy_tt_eng.pdf).

In dieser Arbeit wird eine Kapillare von 60 µm Durchmesser und eine Verdünnung der Zellsuspension von 1:200 benutzt, was 35 µL Zellsuspension in 6.965 µL CASYTON entspricht. Der Messbecher wird unter der Messkapillare platziert und der Messvorgang gestartet. Für die Bestimmung der Anzahl an HPC in Suspension wird der Messgrößenbereich zwischen 7 und 20 µm und der Verdünnungsfaktor auf 1:200 eingestellt. Die ermittelten Zellzahlen pro Messvorgang und pro Milliliter Ausgangszellsuspension werden abgelesen.

2.2.13 Colony-Forming-Unit und Cobblestone Area-forming Cell Assays

Ein Colony-Forming-Unit (CFU) -Assay ist ähnlich zu einem LTC-IC-Assay eine Untersuchungsmethode, bei welcher hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen identifiziert und quantifiziert werden können. Allerdings werden bei einem CFU-Assay nicht nur Erkenntnisse über die Frequenz der Koloniebildung gewonnen, sondern auch die klonale

Nachkommenschaft einzelner Progenitorzellen identifiziert. Es werden somit Aussagen über die Art der gebildeten Kolonien getroffen. Aus diesem Grund wird bei CFU- und auch LTC-IC-Assays viskoses Methylzellulosemedium verwendet, da in dieser semisoliden Umgebung die gebildeten Kolonien nicht zerfallen und mikroskopisch identifiziert und ausgezählt werden können. Der CAFC-Assay ist ein Test, bei welchem gezielt primitive Progenitorzellen unterstützt werden. Die Zellen werden über 5 Wochen kultiviert und bilden dann kopfsteinpflasterartige Zellakkumulationen aus, welche ausgezählt werden (Ploemacher et al., 1989; Olesen et al., 2001; Zhang et al., 2002).

CFU-Assays in dieser Arbeit werden in 24-Well Zellkulturplatten durchgeführt. Frisch isolierte HPC aus Nabelschnurblut werden unter verschiedenen Zytokin- oder Mediumbedingungen sowie ohne und mit MSC Kokultur für 7 Tage bei 37 °C im Zellkulturinkubator in einer initialen Dichte von ca. 5.000 HPC/cm² Plattenboden kultiviert. Anschließend werden alle Zellen pro Well durch kräftiges Auf- und Abpipettieren abgeerntet und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen werden jeweils 1:10, 1:100 und 1:1000 mit Methylzellulosemedium verdünnt und in eine weitere Zellkulturplatte neu ausgesät. Nach 10 bis 14 Tagen werden die Platten mikroskopisch systematisch durchgesehen und in einer auszählbaren Verdünnungsstufe die Anzahl und Art der Kolonien bestimmt. Die Anzahl der Kolonien pro Typ wird in CFU pro 100 initial zu Beginn der Kultur ausgesäte HPC angegeben. Zur Bestimmung der initialen Koloniezahl werden frisch isolierte Zellen direkt in Methylzellulose gegeben und nach 10 bis 14 Tagen die gebildeten Kolonien gezählt.

Um die Ergebnisse der CFU-Assays zu validieren, werden CAFC-Assays in 96-Well Zellkulturplatten durchgeführt. Dazu werden MSC in Suspension mit einer Dosis von 20 Gy bestrahlt und anschließend in einer Dichte von 20.000 MSC/cm² in jedes Well der Zellkulturplatte ausgesät. Nach Anwachsen der MSC werden frisch isolierte HPC aus CB in Konzentrationen von 10, 100 und 1.000 Zellen pro Well in 160 µL Medium mit unterschiedlichen Bedingungen ausgesät und über einen Zeitraum von 5 Wochen kultiviert. Das Medium wird wöchentlich zu 2/3 durch frisches Medium ersetzt und die Anzahl der CAFC nach 5 Wochen bestimmt. Die Anzahl der kopfsteinpflasterartigen Zellakkumulationen wird in CAFC pro 100 ursprünglich ausgesäte HPC angegeben.

2.2.14 Long-Term-Culture Initiating Cell-Assay

Der LTC-IC-Assay wurde von Sutherland und Kollegen entwickelt, um die primitiven Zellen des menschlichen Knochenmarks quantifizieren zu können, welche auch nach einer fünfwöchigen Langzeitkultur *in vitro* noch in der Lage sind, nach Stimulierung durch

spezifische Zytokine myeloische Kolonien zu bilden (Sutherland et al., 1989). Die Aufrechterhaltung von LTC-IC über eine Langzeitkulturperiode ist von der Präsenz geeigneter Feederlayer wie MSC abhängig. Die LTC-IC-Frequenz ist dabei als Maß für die Aufrechterhaltung von primitiven Vorläuferzellen zu verstehen, sie steht in einer linearen Beziehung zu der initial eingesetzten Zellzahl und der Zahl an klonogenen Progenitorzellen (Sutherland et al., 1990). So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Expansion von $CD34^+ CD38^-$ Nabelschnurblutzellen auf MSC eine signifikant höhere LTC-IC-Ausbeute und einen signifikant höheren Anteil an $CD34^+$ Zellen lieferte, als dies im Vergleich zu nur mittels Zytokinen expandierten Nabelschnurblutzellen der Fall war (Kadereit et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit werden die LTC-IC-Assays in 96-Well Zellkulturplatten durchgeführt. Es werden in jeweils 88 Wells einer Platte 5.000 MSC pro Well in 150 μ L Medium 7 ausgesät. An einer Seite der Platte wird eine Spalte frei gelassen, diese wird später mit sterilem H_2O befüllt und dient der Befeuchtung der Mikroatmosphäre. Nach dem Anwachsen der MSC werden diese in der Platte mit einer Dosis von 20 Gy bestrahlt und nach 24 h das Medium ausgetauscht oder direkt HPC in LTBMCMedium auf die Feederzellen gegeben. Zur späteren Bestimmung der LTC-IC-Frequenz nach Sutherland werden frisch isolierte $CD34^+$ HPC aus CB in einer Verdünnungsreihe auf die Platte gegeben. Es werden in jeweils zwei Zeilen (22 Wells) 150, 52, 18 und 6 HPC pro Well ausgesät und für 5 Wochen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das LTBMCMedium wird wöchentlich zu 2/3 ausgetauscht, bis nach der 5. Woche das Medium komplett abgenommen und durch 150 μ L / Well HSC-CFU light mit EPO (Methylzellulosemedium) ersetzt wird. Dieses enthält verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche die bis zu diesem Zeitpunkt primitiv verbliebenen Zellen zur Zellteilung und Ausdifferenzierung anregen. Bedingt durch die hohe Viskosität der Methylzellulose zerfallen entstehende Kolonien nicht und können ausgezählt werden. Nach Überschichtung mit Methylzellulosemedium wird die Platte weiter bei 37 °C je nach Dichte der entstehenden Kolonien für 10 bis 14 Tage inkubiert und anschließend die Kolonien ausgezählt. Dabei werden beim LTC-IC-Assay im Gegensatz zum CFU-Assay (siehe Punkt 2.2.14) nicht die Kolonietypen, sondern nur das Entstehen von Kolonien jeglicher Art beurteilt. Wells mit einer oder mehreren Kolonien werden als positiv, Wells ohne Kolonien als negativ betrachtet. Die Berechnung der LTC-IC-Frequenz geschieht mit Hilfe der L-Calcul-Software über die Bestimmung der Poissonverteilung. Die Signifikanz wird über einen gepaarten T-Test zwischen den Ergebnissen von verschiedenen biologischen Replika abgeschätzt (Sutherland et al., 1989).

2.2.15 siRNA Transfektion von adhären MSC

Die sequenzspezifische posttranskriptionale Herunterregulation von Genen durch RNA-Interferenz ist ein evolutionär konservierter Prozess, bei welchem doppelsträngige RNA durch das Enzym „Dicer“ in kleine RNAs gespalten und anschließend in einzelsträngige siRNA entwunden wird. Der sogenannte „Passenger“ Strang wird abgebaut, nur der „Guide“ Strang der siRNA wird in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) eingebaut. Bestandteil des RISC Komplexes ist das Protein „Argonaute2“, welches die katalytische Komponente zur Degradation der Ziel-mRNA darstellt (Hutvagner und Zamore, 2002; Matranga et al., 2005). „Small interfering RNAs“ (siRNAs) sind kleine, maximal 30 bp lange, künstlich synthetisierte RNAs, welche spezifisch die Translation ihrer Zielproteine hemmen. Sie werden bei vielen experimentellen und therapeutischen Zwecken eingesetzt (Persengiev et al., 2004).

Adhären MSC werden mit dem HiPerFect Transfektionskit von Qiagen mit verschiedenen siRNA in 24-Well Zellkulturplatten transfiziert. Die in dieser Arbeit benutzten siRNAs wurden mittels des „HiPerformance siRNA Design Algorithmus“ (<http://www.qiagen.com/>) modelliert und die lyophilisierten RNAs mit sterilem PBS zu einer Konzentration von 20 μM rekonstituiert (Tabelle 1). Zu einer Transfektion in einer 24-Well Platte werden 30.000 MSC pro Well in Medium 7 ausgesät. Nach 24 h werden die MSC mit einer Dosis von 20 Gy bestrahlt. Am Folgetag wird das Medium abgenommen und durch 400 μL frisches Medium ersetzt. Anschließend werden die MSC mit 5 nM siRNA in 3 μL HiPerFect Reagenz und 97 μL serumfreiem Medium 7 pro Well transfiziert, indem 100 μL der fertig gemischten Transfektionslösung auf die Zellen getropft wird (Wein et al., 2010; Walenda et al., 2010). Alternativ wird die Aktivität der MAPK1 durch Zugabe von 25 μM PD098059 in DMSO inhibiert.

2.2.16 RNA Isolation und Integritätskontrolle

Für den Nachweis der siRNA Wirksamkeit in MSC wird die Gesamt-RNA mittels Trizol Reagens gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Dazu werden MSC in einer Dichte von 15.000 / cm^2 in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät und wie unter Punkt 2.2.15 beschrieben mit verschiedenen siRNA transfiziert. An Tag 1 und Tag 7 nach der Transfektion erfolgt die RNA-Isolation. Dazu werden pro cm^2 Fläche 400 μL Trizol-Reagens in die Wells gegeben und dann mit den lysierten Zellen je in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Es werden 200 μL Chloroform pro mL Trizol dazugegeben, 15 s kräftig geschüttelt und für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Proben für 15 min bei 12.000 x g und 2 – 8 $^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgenommen, in je ein neues 1,5 mL

Reaktionsgefäß überführt und 500 µL Isopropanol pro mL Trizol dazugegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wird die RNA für 10 min bei 12.000 x g und 2 – 8 °C pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet ein Mal mit 75 % unvergälltem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 7.500 x g und 2 – 8 °C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wird das Pellet an der Luft antrocknen gelassen und in 50 µL RNase-freiem H₂O gelöst. Nach 10 min Inkubation bei 55 – 60 °C im Heizblock zur Eliminierung von RNA-Sekundärstrukturen wird die RNA bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle der RNA-Integrität wird das RNA 6000 Pico LabChip Kit und der Agilent 2100 Bioanalyzer oder ein Nano Drop ND-1000 Spektralphotometer benutzt. Die Technik eines Pico LabChip beruht auf der Kapillarelektrophorese, die RNA wird ähnlich wie in einem Agarosegel ihrer Stranglänge nach aufgetrennt. Die RNA wandert in Mikrokanälen aus den Probenkammern des Chips und wird in einen Trennkanal injiziert. Außerdem kommt ein RNA-Größenstandard zum Einsatz, anhand dessen die Länge an Basen der gemessenen RNA abgeleitet werden kann. Durch einen in der Polymermatrix eingelagerten Fluoreszenzfarbstoff werden die RNA-Fragmente durch den Bioanalyzer detektiert und anschließend in einem Elektropherogramm dargestellt. Die RNA wird gemäß der Angaben des Herstellers auf die Chips gegeben. Anhand der beiden 18s und 28s Spitzen lassen sich Rückschlüsse auf die Qualität und Reinheit der RNA ziehen.

2.2.17 cDNA-Generierung und qRT-PCR

Bei einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische DNA-Sequenzen vervielfältigt. Dies kann mit Hilfe einer DNA-Polymerase, z.B. der Taq-Polymerase, geschehen, welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt und ein Temperaturoptimum bei 72 °C besitzt. Auch während der Denaturierungsphasen einer PCR bei 95 °C nimmt das Enzym keinen Schaden. Außerdem sind bei einer PCR zwei kurze Oligonukleotide, die Primer, essentiell, welche in ihrer Basensequenz komplementär zum Beginn und Ende des zu amplifizierenden DNA Abschnitts sind und diesen flankieren. Die Taq-Polymerase bindet an die Primer und beginnt an diesen mit der DNA-Doppelstrangsynthese. Zusätzlich werden dNTPs als Bausteine für die Polymerase, ein PCR-Puffer, H₂O und die Template-DNA als Matrize benötigt. Amplifizierte DNA-Sequenzen können sichtbar gemacht werden, indem das PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und durch einen angelegten Strom im Gel aufgetrennt wird. Das Gel wird mit DNA-interkalierenden und unter UV-Licht fluoreszierenden Substanzen wie z.B. Ethidiumbromid gefärbt und ein Bandenmuster im UV-Licht sichtbar.

Um die Herunterregulation von mRNA durch siRNAs zu überprüfen, wird nach Isolation und Integritätskontrolle die zelluläre RNA mittels des „High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit“ und des unter Punkt 2.1.7 aufgelisteten PCR-Programms am Mastercycler in die komplementäre cDNA umgeschrieben, indem jeweils 500 ng RNA pro Reaktion eingesetzt werden. Nach Generierung der cDNA wird diese in einer qRT-PCR eingesetzt. Die PCR wird mit dem SYBR Green PCR Master Mix am ABI PRISM 7700HT Sequence Detection System Instrument durchgeführt und die differentielle Genexpression mit der Expression der GAPDH verrechnet.

Im Gegensatz zu einer herkömmlichen PCR bietet eine Realtime-PCR den Vorteil, dass die Entstehung des PCR-Produktes in Echtzeit verfolgt werden kann. In die PCR-Reaktion gegebene fluorochrommarkierte Sonden oder Farbstoffe wie SYBR-Green zeigen durch einen Anstieg ihres spezifischen Fluoreszenzsignals, welcher z.B. durch Abbau einer Sonde durch die Polymerase oder durch Interkalation in das entstandene PCR-Produkt wie im Falle von SYBR-Green entsteht, die genaue Zyklenzahl des Anstiegs über einen Schwellenwert. Dieser Punkt, auch „CT-Wert“ genannt, erlaubt Rückschlüsse über die initial eingesetzte Menge an Template-DNA, und ermöglicht es, diese CT-Werte mit denen des Kontrollgens in Bezug zu setzen.

2.2.18 Proteinisolation und Western-Blot

Bei der Technik des Western-Blots werden Proteinproben zellulären Ausgangsmaterials in einem Polyacrylamidgel durch ein gelelektrophoretisches Verfahren bei angelegter Spannung der Größe nach aufgetrennt. Im Anschluss werden die aufgetrennten Proteinproben mittels eines Blottingverfahrens auf eine spezielle Trägermembran übertragen. Auf dieser Membran können spezifisch Proteine durch Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Diese Technik wurde von Renart und Kollegen im Jahre 1979 erstmals beschrieben (Renart et al., 1979).

Vor Auftrennung der Proben in einem Gel müssen die Proteine aus zellulärem Ausgangsmaterial isoliert werden. Dieses geschieht, indem in den Zellkulturschalen das Medium abgenommen und verworfen wird. Die Schalen werden ein Mal vorsichtig ohne Ablösen der adhären Zellen mit PBS gespült und dabei für 10 min auf Eis gestellt. Dann werden pro 10^6 Zellen 100 µL Zellyse-Puffer auf die Zellen gegeben, welcher die Zellmembranen aufbricht und eine Autolyse der Proteine durch zelleigene Proteasen verhindert. Mit einem Spatel werden die adhären Zellen vom Boden gelöst, die entstandene Zellsuspension vollständig in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 15

min auf Eis inkubiert. Es wird eine Probe von 2 µL zur Proteinkonzentrationsbestimmung am Nanodrop Spektralphotometer entnommen, und die Proteinproben werden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Proteinauftrennung in einem 4 – 12 % TRIS-Glyzin PAA-Gradienten Gel wird die gewünschte Proteinkonzentration der zu trennenden Proben mit PBS eingestellt. Das Gel wird in die Gelkammer eingespannt und die obere und untere Elektrodenkammer jeweils mit Laufpuffer befüllt. 25 µL des Lysats werden mit 5 µL SDS-haltigem Ladungspuffer versetzt und die Proben für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Das SDS ummantelt die denaturierten Proteine, verändert die Konformation der Proteine stäbchenförmig und versieht sie zugleich mit einer negativen Ladung. Die Proben werden vollständig in je eine Geltasche gegeben. Als Größenmarker werden in die entsprechende Tasche 5 µL PageRuler Proteinleiter gegeben. Im Anschluss wird für ca. 60 min eine Spannung von 140 V angelegt, wodurch die negativ geladenen Proteine in Richtung der positiv geladenen Elektrode zum unteren Gelrand wandern. Hat der Laufpuffer etwa den unteren Gelrand erreicht, wird die Auftrennung beendet. Anschließend wird die PVDF-Membran 15 s in Methanol und dann 2 min in Aqua-Bidest aktiviert, so dass hydrophobe Wechselwirkungen möglich werden und Proteine an der Oberfläche haften können. Zum anschließenden Proteintransfer auf eine PVDF-Membran wird das Gel zusammen mit der Membran in einem sandwichartigen Aufbau aus mehreren mit Transferpuffer equilibrierten Filterpapieren so in der Transferkammer platziert, dass das Gel zur negativ geladenen Elektrode zeigt und die Proteine der Ladung entsprechend auf die Membran wandern. Der Transfer geschieht bei einer Stromstärke von 370 mA für 3 h. Die PVDF-Membran wird nach dem Transfer in Milchpulverlösung geblockt, um bisher freie Stellen der Membran mit Protein zu versehen. Nach drei Waschschritten in PBS-Tween erfolgt die Antikörperinkubation über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag erfolgt nach drei Waschschritten in PBS-Tween die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, welcher mit HRP gekoppelt ist. Durch Gabe von ECL-Reagenz direkt auf die Membran wird die HRP-katalysierte Substratumsetzung in dessen oxidierte Form gestartet, wobei eine Lumineszenz per Fotofilm detektiert wird (Walenda et al., 2010; Wein et al., 2010).

2.2.19 Gewinnung von humanem Plättchenlysat

In einigen Studien wurde humanes Plättchenlysat als Ersatz für tierische Komponenten wie FCS im Zellkulturmedium vorgeschlagen (Kocaoemer et al., 2007; Bieback et al., 2009), um xenogene Reaktionen zu verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit wird HPL aus Thrombozytenkonzentraten gewonnen, welche im Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Aachen aus gesunden Spendern durch Apherese mit dem Trima Accel

Collection System gewonnen werden. Fünf Tage nach Aphaese werden die Thrombozytenkonzentrate zu 45 mL in 50 mL Röhrchen überführt, drei Mal bei -80 °C eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut, um die Plättchenstruktur aufzubrechen und wichtige Wachstumsfaktoren wie PDGF zu lösen. Zur Pellettierung von Membrantrümmern werden die Röhrchen bei 2.600 x g für 30 min zentrifugiert und der Überstand durch 0,2 µM GD/X PVDF Membranen gefiltert. Im Anschluss werden fünf bis sechs HPL-Proben von unterschiedlichen Spendern zur Herstellung von pHPL gemischt und bis zur Zugabe zum Kulturmedium bei -80 °C gelagert. Nach Zugabe von 10 % HPL zum Medium werden 2 U/mL Heparin zugesetzt, um ein Gelatinieren des Mediums zu verhindern (Horn et al., 2010; Walenda et al., 2011b).

2.2.20 Gewinnung von humanem Serum aus Peripherblut

Um den Einfluss von Sera von Patienten mit multiplem Myelom oder non-Hodgkin Lymphom auf Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen zu testen, wird Serum aus Peripherblut einen Tag vor Beginn der Chemotherapie und an verschiedenen Tagen nach Stammzelltransplantation isoliert. Dazu werden 10 µL Peripherblut von diesen Patienten nach ausführlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis in der Klinik für Hämatologie und Onkologie entnommen. Die Blutproben werden in 15 mL Röhrchen überführt und horizontal bei 37 °C für 1 h zur Koagulation geschüttelt. Anschließend werden die Proben für 15 min bei 840 x g zentrifugiert, der Serumüberstand in mehrere 1,5 mL Röhrchen aliquotiert und bis zur Zugabe zum Medium bei -80 °C gelagert (Kurita et al., 2008; Walenda et al., 2011a).

2.2.21 Analyse der Zytokinzusammensetzung mittels Ray Biotech Membranen

Um die Zusammensetzung der Seren mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu analysieren und daraus Rückschlüsse auf die Mechanismen der Regulation der Hämatopoese ziehen zu können, werden die Serumproben mit „RayBio Human Cytokine Antibody Array“ Membranen untersucht. Diese Technik basiert darauf, dass die Membran in punktförmigen Feldern mit spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Zytokine und Wachstumsfaktoren beschichtet ist sowie mehrere Feldern für positive und negative Kontrollen besitzt. Bei Inkubation mit einer Probe binden die Antigene an ihre spezifischen Antikörper auf der Membran. Dann werden die Membranen mit einem Cocktail aus biotinylierten Antikörpern und im Anschluss mit HRP-gekoppeltem Streptavidin inkubiert. Nach einer ECL-Reaktion werden die

Lumineszenzsignale detektiert, wobei die Intensität der Lumineszenz proportional zu der Menge an gebundenem Antigen ist.

Die Zytokindetektion erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Die Membranen werden in einer speziellen Schale (im Kit enthalten) platziert und mit je 2 mL Blocking Puffer für 30 min inkubiert und dann verworfen. 600 µL der Serumproben werden jeweils mit 600 µL Blocking Puffer verdünnt und jeweils auf die Membranen gegeben. Nach 1 bis 2 h Inkubation bei RT erfolgen 3 Waschschrte für 5 min bei 80 rpm auf dem Schüttler mit 1x Waschpuffer I und 2 x 5 min mit 1x Waschpuffer II. Pro 2 Membranen werden 100 µL Blocking Puffer in ein Röhrchen mit biotinyliertem Antikörper gegeben und der komplette Inhalt zu 2 mL Blocking Puffer gegeben. Jede Membran wird mit 1 mL biotinyliertem Antikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach den oben beschriebenen Waschschrten wird jede Membran mit 2 mL von 1:1000 in Blocking Puffer verdünnten HRP-gekoppelten Streptavidin für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneuten Waschschrten werden am LAS-Reader pro Membran 250 µL Detektionspuffer C mit 250 µL Detektionspuffer D gemischt, auf die Membranen gegeben und für 2 min inkubiert. Anschließend werden die Membranen im LAS-Reader platziert, die Lumineszenz detektiert und mit Multi Gauge Software ausgewertet. Die Zytokinprofile werden im Anschluss mit dem Microarray Analyseprogramm TIGR MeV v4.4 ausgewertet. Eine Identifikation signifikanter Konzentrationsänderungen von Zytokinen erfolgt mit einem gepaarten zweiseitigen T-Test.

2.2.22 Zelltransplantation in NOD/SCID Mäuse

Um das Anwachsen von frisch isolierten sowie ohne und mit MSC-Kokultur präexpandierten HPC im *in vivo* Mausmodell zu untersuchen, werden Transplantationsexperimente an NOD.Cg-Prkdc^{scid} Ilrg^{tm1Wjl}/SzJ (NOD/SCID) Mäusen durchgeführt. Alle Tierversuche werden lokal nach ihrer Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz von den zuständigen Behörden begutachtet und erlaubt (Tierversuchsantragsnummer 87-51.04.2010.A040; LANUV Recklinghausen). Die Mäuse wurden bei Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben und im ZEMM der Universität Würzburg weiter gezüchtet. Mindestens 7 Tage vor Transplantation wurden die Tiere zum Universitätsklinikum Aachen transportiert. Die Tiere werden unter speziellen pathogenfreien Bedingungen gehalten. 8 bis 12 Wochen alte Mäuse werden mit einer Dosis von 2,5 Gy subletal mit einem 6 MeV Linearbeschleuniger bestrahlt. 12 h nach Bestrahlung werden die Mäuse mit 50.000 frisch isolierten CD34+ HPC in einem Volumen von 200 µL in PBS per Injektion in die Schwanzvene transplantiert. Zusätzlich wird die ganze Nachkommenschaft von 50.000 mit und ohne MSC-Kokultur präexpandierten HPC in 200 µL PBS jeweils in bestrahlte

NOD/SCID Mäuse transplantiert. Die Transplantationsexperimente erfolgen im Triplikat pro Bedingung. 7 bis 8 Wochen nach Transplantation werden die Mäuse per zervikaler Dislokation getötet und Milz, Thymus, Knochenmark und Blut zur Analyse entnommen (Gan et al., 1997; Shultz et al., 2005; Zhang et al., 2008; Walenda et al., 2011b). Die Zelltransplantationen in NOD/SCID Mäuse wurden von Frau Gudrun Walenda durchgeführt.

2.2.23 Gewebeanalyse der NOD/SCID Mäuse

Zum Nachweis von humanen Zellen werden Milz, Thymus, Knochenmark und Blut Mäusen 7 bis 8 Wochen nach Transplantation entnommen und durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von Zellen untersucht, welche humane Oberflächenantigene präsentieren. Der Prozentsatz an Zellen mit humanen Markerproteinen ist dabei ein Maß für die Fähigkeit der transplantierten Zellen, im Tier anzuwachsen.

Zur Blutanalyse werden den Mäusen 500 µL Blut durch Punktierung des Herzens entnommen und direkt in 3 Teile RCB-Lysepuffer überführt und für 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wird 2 Mal mit MACS-Puffer gewaschen und die Probe bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Zur Analyse von Proben der Milz werden die Zellen in einer Petrischale mit MACS-Puffer durch Zerreißen des Gewebes isoliert. Anschließend wird die Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb in ein 50 mL Röhrchen gegeben und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Um überschüssige Erythrozyten zu entfernen, wird optional nach Bedarf eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Zur Analyse von Knochenmark wird dieses aus den Femurknochen mit MACS-Puffer gespült und resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 50 mL Röhrchen überführt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Gewebeanalysen wurden von Frau Gudrun Walenda durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Kokultur mit MSC erhöht die Proliferation und den Erhalt des Stammzellcharakters von HPC

In einer Vielzahl von Studien ist demonstriert worden, dass sich eine *in vitro* Kokultivierung von HPC mit MSC positiv auf die Zellproliferation und den Erhalt primitiver Marker der HPC auswirkt (Breems et al., 1998; Huang et al., 2007; Mendez-Ferrer et al., 2010). Eine Kokultivierung von HPC mit humanen MSC bietet zudem den Vorteil eines rein humanen Systems, in welchem die Gefahr xenogener Reaktionen minimiert ist. Daher ist denkbar, dass solche Expansionsstrategien in der Klinik Verwendung finden (Hofmeister et al., 2007; Wagner et al., 2008b). Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit zunächst untersucht, wie sich eine Kokultivierung mit humanen MSC auf die Proliferation und den Immunphänotyp von HPC während einer *in vitro* Expansion auswirkt. Des Weiteren wurden der Einfluss replikativer Seneszenz in MSC auf HPC in der Kokultur und bestimmte Proteine der Stammzellnische untersucht, welche an der HPC-Nischen Interaktion beteiligt sein könnten. Nach Identifizierung von Komponenten und physiologischen Bedingungen der Stammzellnische sollten neue Ansatzpunkte helfen, die *in vitro* Expansion von CD34⁺ HPC weiter zu verbessern.

3.1.1 MSC unterstützen die Proliferation primitiver HPC

Es wurde der Einfluss einer Kokultivierung mit MSC auf die Proliferation von HPC getestet. Dazu wurden HPC aus CB mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE gefärbt und mit und ohne MSC Feeder kultiviert. Bei jeder Zellteilung der HPC wurde der Farbstoff gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt, so dass die Fluoreszenz aller folgenden Tochterzellen sukzessiv um die Hälfte niedriger war als bei der initialen Zelle. Zur Abschätzung der ursprünglichen CFSE-Intensität wurde nach 24 h ein gefärbtes Zellaliquot analysiert. Nach einer Kultivierungszeit von sieben Tagen konnte jeder CFSE-Peak einer Zellteilungsnummer zugeordnet werden. Es zeigte sich, dass unter Kokulturbedingungen die Anzahlen an HPC-Zellteilungen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ohne MSC signifikant erhöht wurden (Abbildung 5). Mit MSC wurden in der primitiveren CD34⁺ CD38⁻ HPC-Fraktion zwischen 3 und 11 Zellteilungen detektiert, wohingegen ohne Kokultur kaum Zellteilungen in dieser Zellfraktion beobachtet werden konnten (Abbildung 6A).

3.1.2 Kokultivierung mit MSC resultiert in schnellteilenden Zellen mit elongierter Morphologie

In einer Population von HPC ist die Zellmorphologie sehr heterogen. Sie besitzen entweder eine runde kugelartige Gestalt, oder weisen einen elongierten Phänotyp mit verschiedenen Arten von Podien und Membranausstülpungen auf (Giebel et al., 2004; Freund et al., 2006). Nach 7 Tagen Kultivierung mit und ohne MSC wurden die CFSE-markierten HPC anhand ihres Fluoreszenzsignals in eine schnellteilende (CFSE⁻, SDF) und eine langsamteilende (CFSE⁺, FDF) Zellfraktion sortiert (Huang et al., 1999). SDF und FDF enthielten dabei jeweils 10 % der Zellen mit schnellster oder langsamster Proliferationsrate. Um ein Absetzen der HPC am Boden zu ermöglichen, wurden die HPC für 12 h im Medium ohne MSC kultiviert und die Zellmorphologie dann mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass HPC, welche ohne MSC kultiviert wurden, signifikant mehr einen elongierten Phänotyp statt eines runden Phänotyps aufwiesen, wobei dieses Verhältnis nach Kokultur mit MSC invertiert war (Abbildung 5).

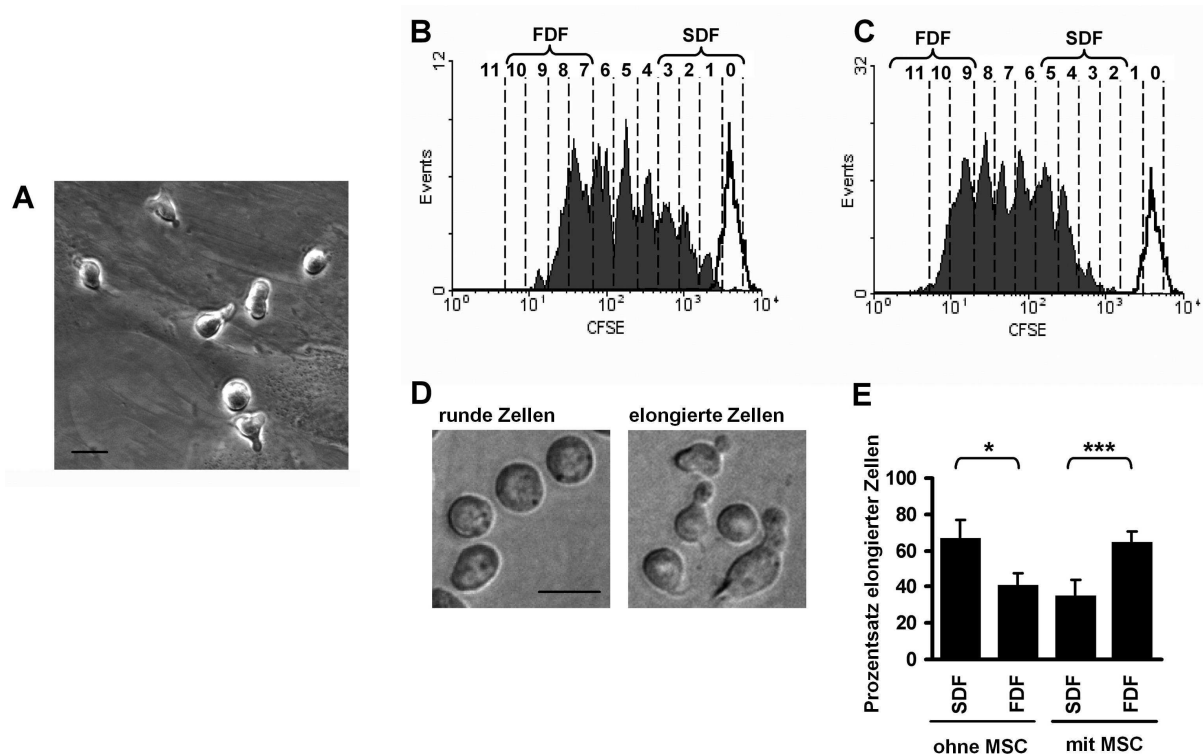


Abbildung 5: Kokultur mit MSC unterstützte die Proliferation von HPC. Die Mehrzahl der HPC war unter Kokulturbedingungen mit MSC elongiert (A). CD34⁺ Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für 7 Tage ohne MSC (B) oder mit MSC-Kokultur (C, schwarze Linie repräsentiert die initiale Fluoreszenzintensität von sich noch nicht geteilten Zellen nach 24 h). Die Anzahl der Zellteilungen ist für jeden Peak angegeben. Die Zellen wurden in eine schnellteilende (FDF, CFSE⁻) und eine langsamteilende (SDF, CFSE⁺) Zellfraktion unterteilt. Ohne stromale Unterstützung war die Fraktion an elongierten Zellen signifikant höher in der SDF. Dieser Effekt wurde unter Kokultur mit MSC invertiert (D, E; Vergrößerung 400x, Skalierungsbalken 10 µm; * p ≤ 0,05; *** p ≤ 0,001; n = 7) (Walenda et al., 2010).

3.1.3 Simultane Analyse der Zellteilungen und des Immunphänotyps

Zur parallelen Analyse der Zellteilungen und des Immunphänotyps wurden CFSE-gefärbte und initial $CD34^+$ sortierte HPC nach 7 Tagen mit fluorchromgekoppelten Antikörpern inkubiert und dann durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die $CD34$ -Expression in der langsamteilenden Zellfraktion in hohem Maß erhalten blieb, wohingegen die schneller teilenden Zellen stetig negativer für $CD34$ wurden. Interessanterweise verblieb die $CD34$ -Expression zwischen 4 und 7 Zellteilungen nach Kokultur höher als nach der gleichen Zahl an Zellteilungen ohne MSC (Abbildung 6). Analog dazu verringerte sich die $CD133$ -Expression in der schnellteilenden Zellfraktion.

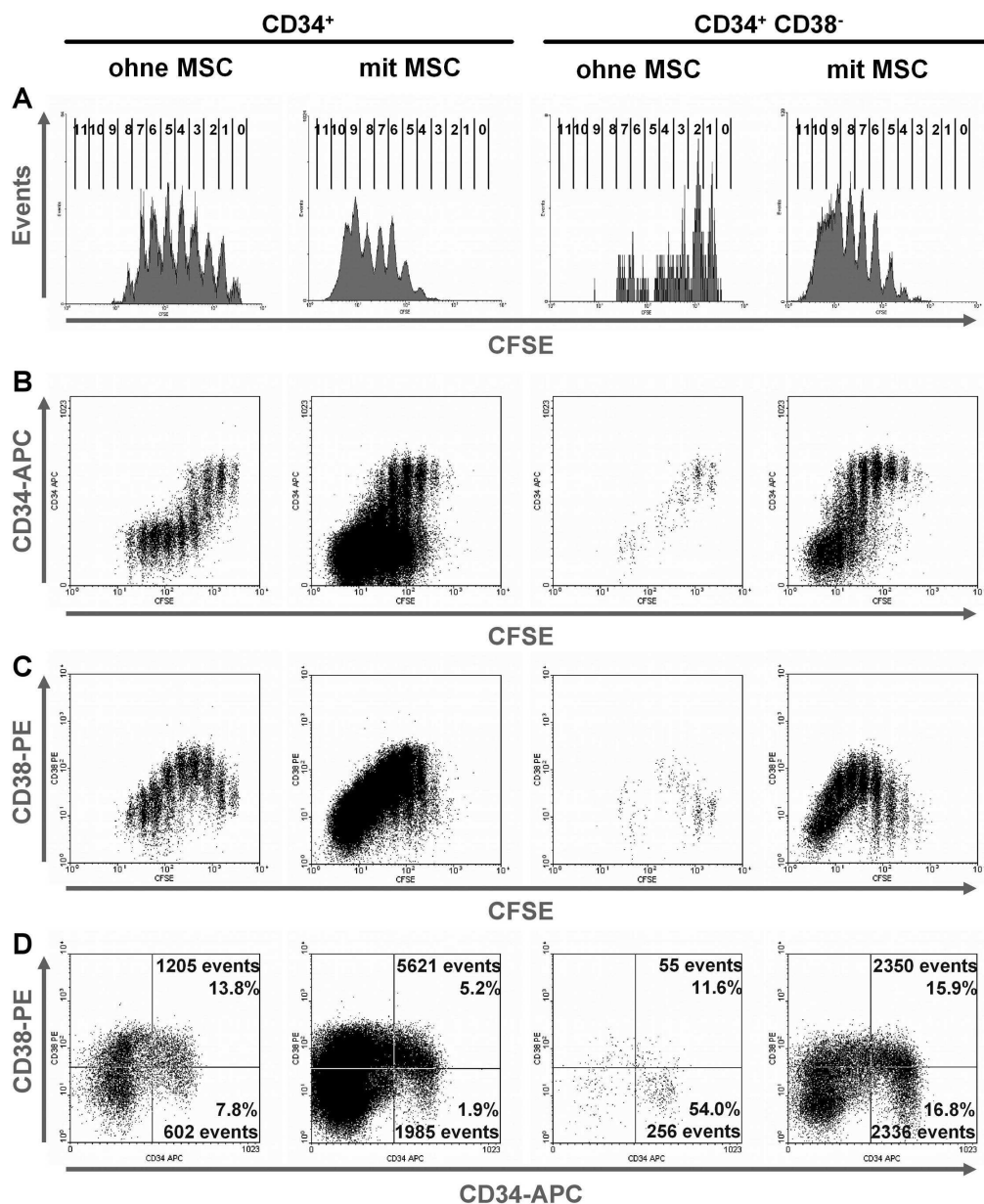


Abbildung 6: Darstellung der CD34 und CD38 Expression im Verhältnis zu der Anzahl an Zellteilungen. CD34⁺ Zellen (linke Spalten) oder CD34⁺ CD38⁻ Zellen (rechte Spalten) wurden mit CFSE gefärbt und für 7 Tage mit oder ohne MSC kultiviert. Für jeden Peak ist die Zellteilungszahl angegeben (A). Die CD34 Expression wurde in den CFSE⁺ Zellen beibehalten und verringerte sich mit zunehmenden Zellteilungszahlen (B). Die CD38-Expression wurde vorübergehend nach einigen Zellteilungen heraufreguliert und verringerte sich dann in der FDF (C). Unter MSC-Kokultur war der Prozentsatz an CD34⁺ CD38⁻ Zellen niedriger, wohingegen die Gesamtzahl an Events anstieg (D) (Walenda et al., 2010).

Diese Herunterregulation war durch Kokultur mit MSC zu einer höheren Zahl an Zellteilungen verschoben (Abbildung 7 B). Der Vergleich mit einem analogen Versuchsaufbau und initial CD34⁺ CD38⁻ sortierten Zellen ergab, dass die Expression von CD38 mit steigender Anzahl an Zellteilungen hochreguliert wurde und dann in der FDF wieder abnahm. Hoch- und Herunterregulation von CD38 wurde ebenfalls durch Kokultur mit MSC zu einer höheren Anzahl an Zellteilungen verschoben (Abbildung 6C, 7B). Obwohl die prozentualen Anteile an primitiven CD34⁺ CD38⁻ HPC nach einer *in vitro* Expansion mit MSC im Vergleich zu ohne Kokultivierung generell niedriger waren, wurde die absolute Zellzahl durch Kokultur erhöht (Abbildung 6D). Dieses deutet auf eine Expansion von HPC mit Stammzellcharakter hin.

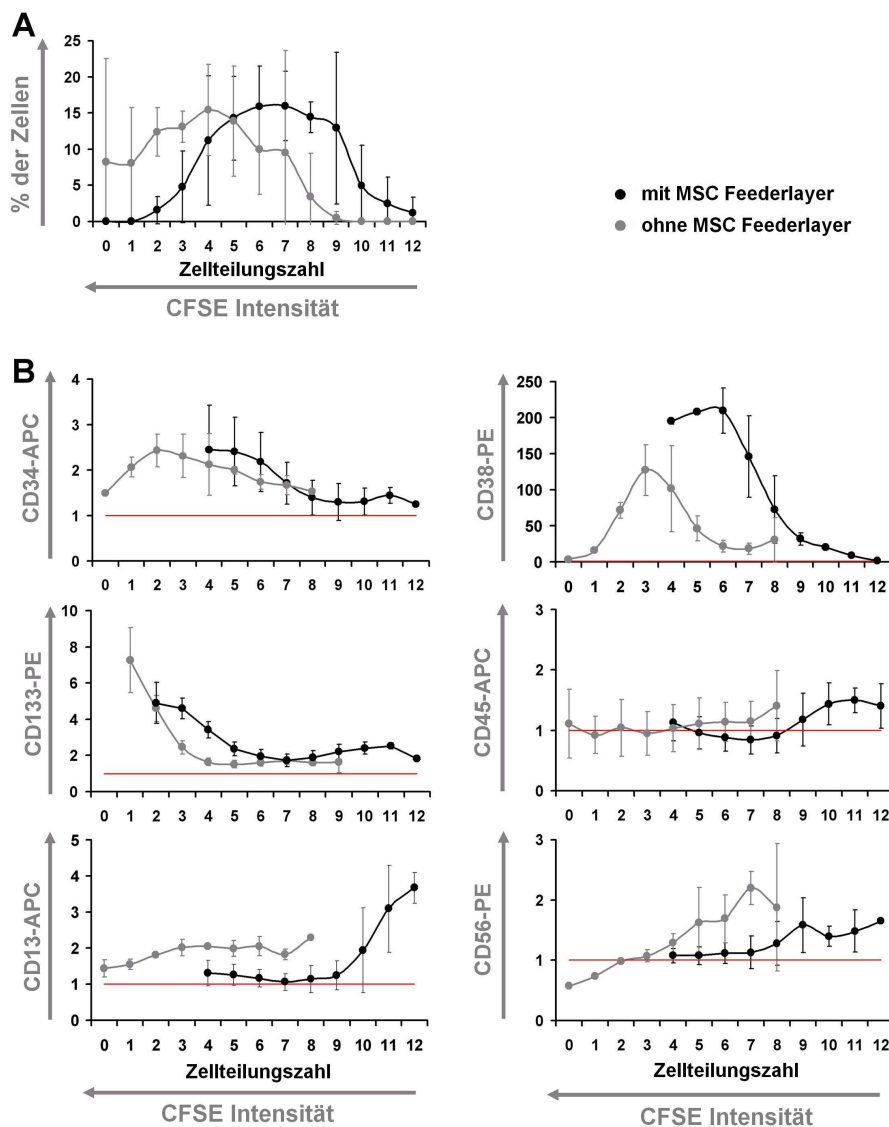


Abbildung 7: Kokultivierung verschob eine Differenzierung zu höheren Zellteilungszahlen. CD34⁺ Zellen wurden CFSE gefärbt und mit MSC (schwarze Punkte) oder ohne (graue Punkte) 7d kultiviert. Jeder CFSE-Peak (0 – 12 Teilungen) wurde einzeln analysiert. Die Kokultur erhöhte die HPC-Zellteilungszahl (A). Verringerungen in CD34, CD133 und CD38 Expressionen wurden durch Kokultur zu höheren Zellteilungen verschoben. Die Hochregulation von Differenzierungsmarkern CD13, CD45 und CD56 verschob sich ebenfalls zu höheren Zellteilungen (B). Zur Analyse wurden Daten aus 3 unabhängigen Experimenten zur entsprechenden Autofluoreszenz normalisiert (rote Linie) und Mittelwert $\pm$ SD angegeben (Walenda et al., 2010).

Die Expression von Differenzierungsmarkern wie CD45 als allgemeines Lymphozyten Antigen, CD13 als myeloider Marker und CD56 als Marker für NK-Zellen wurde durch Kokultur mit MSC zu einer höheren HPC-Zellteilungszahl verschoben (Abbildung 7B). Die Expression von weiteren verschiedenen lymphatischen Markern wie CD3, CD19 und CD20 konnte auf HPC nach 7 und 14 Tagen Kultur mit und ohne MSC nicht nachgewiesen werden. Zusammengefasst belegen diese Ergebnisse, dass MSC nicht nur die Proliferation von HPC steigern, sondern auch zum Erhalt und zur Expansion von HPC mit primitivem CD34⁺ CD133⁺ Immunphänotyp beitragen. Der primitive HPC-Immunphänotyp wird dabei über mehr Populationsverdopplungen aufrecht erhalten, was verdeutlicht, dass durch solche Kokultursysteme eine effizientere *in vitro* Expansion von HPC stattfinden kann.

3.1.4 Replikative Seneszenz von MSC beeinflusst ihre stromale Funktion

Die Langzeitkultivierung von MSC und die damit einhergehende replikative Seneszenz beeinflussen das Differenzierungspotential und das globale Genexpressionsmuster (Wagner et al., 2008a). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde analysiert, ob replikative Seneszenz von MSC einen Einfluss auf deren stromale und supportive Eigenschaften im hämatopoetischen System hat. Dazu wurden MSC von jeweils 5 gleichen Spendern, aber verschiedener Passagen, zunächst der normalen Kultivierung entnommen und Kryokonserviert. Diese MSC wurden dann zu einem identischen Zeitpunkt simultan in Kultur gegeben, um ein direktes Vergleichen des supportiven Potentials zu ermöglichen. CD34⁺ HPC wurden mit CFSE gefärbt und für 7 Tage mit den MSC-Feedern unterschiedlicher Passagenzahl kokultiviert. Dabei stellte sich heraus, dass MSC späterer Passagenzahlen stärker die Proliferation von kokultivierten HPC unterstützen als MSC niedrigerer Passagen (Abbildung 8A). Allerdings exprimierten HPC, welche mit MSC niedrigerer Passagenzahl kokultiviert wurden, auf einem höheren Level CD34 über eine größere Anzahl an Zellteilungen (Abbildung 8B). Es konnte kein Einfluss replikativer MSC-Seneszenz auf die Expression von CD38 beobachtet werden. Die Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass MSC höherer Passagenzahlen eher die Proliferation von HPC anregen, und dass MSC einer Passagenzahl von 6 oder weniger eher einen primitiven CD34⁺ Immunphänotyp über eine

höhere Anzahl an HPC-Zellteilungen aufrecht erhalten. Daher scheinen MSC früherer Passagen in HPC das Verhältnis der Selbsterneuerung gegenüber der Differenzierung zu erhöhen, und aus diesem Grund sind sie besser für eine *in vitro* Expansion von CD34⁺ HPC geeignet.

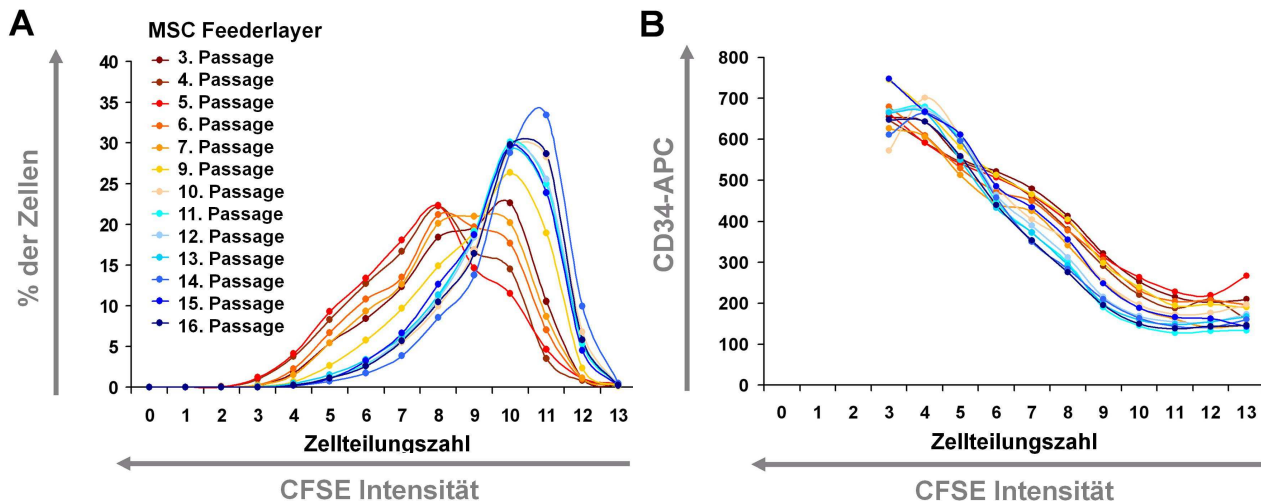


Abbildung 8: Replikative Seneszenz beeinflusst die die Hämatopoese unterstützende Funktion von MSC. MSC höherer Passagen verstärken die Proliferation von HPC (Linien in Blautönen, 9–12 Populationsverdopplungen) im Vergleich zu MSC jüngerer Passagen (Linien in Rottönen, 5–10 Populationsverdopplungen) (A). Die HPC verblieben für mehr Zellteilungen CD34⁺, wenn sie mit MSC jüngerer Passagen kokultiviert werden (B). Exemplarische Daten von insgesamt 5 unabhängigen Experimenten sind dargestellt (Walenda et al., 2010).

3.1.5 Der MAPK1-Signalweg ist in der Proliferation und Differenzierung von HPC beteiligt

Es ist gezeigt worden, dass die mitogenaktivierte Proteinkinase 1 (MAPK1) eine entscheidende Rolle sowohl für die Zellproliferation als auch für die Differenzierungsfähigkeit in granulozytäre und makrophagenartige Zelllinien spielt (Hsu et al., 2007). In dieser Arbeit wurde der Einfluss der MAPK1 auf das HPC-MSC Kokultursystem untersucht. Dazu wurde die MAPK1 in MSC und HPC durch den Inhibitor PD098059 in ihrer Aktivität gehemmt bzw. durch kleine interferierende RNAs (siRNA) nur in den MSC Feederzellen herunterreguliert (Abbildung 9). Hemmung der MAPK1 durch den Inhibitor reduzierte deutlich die Proliferation der HPC. Ein vergleichbarer, nicht so starker Effekt konnte beobachtet werden, als die MAPK1 per siRNA nur in den MSC herunterreguliert wurde (Abbildung 10A, B). Allerdings wurde dieser Effekt nochmals gedämpft, als MSC nach siRNA Transfektion zur Kontrolle mehrmals mit Kulturmedium gewaschen wurden, was darauf hindeutet, dass die siRNA auch

revers HPC transfiziert hat. Aufgrund einer langsameren Proliferation wurde nach 7 Tagen Kultur ein höherer Anteil an $CD34^+$ und $CD34^+ CD38^-$ Zellen nachgewiesen. Außerdem konnte durch simultane Analyse der Zellteilungen und des Immunphänotyps demonstriert werden, dass Inhibition von MAPK1 die differenzierungsbedingte Heraufregulation von CD38 verminderte (Abbildung 10F). MAPK1-Inhibierung mit PD098059 in LTC-IC-Assays hatte keinen Einfluss auf die Aufrechterhaltung von koloniebildenden Zellen (Abbildung 10G). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MAPK1 sowohl in der Proliferation als auch in der Differenzierung von HPC eine aktive Rolle spielt, jedoch nicht in der Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften in quieszenten und langsamteilenden HPC.

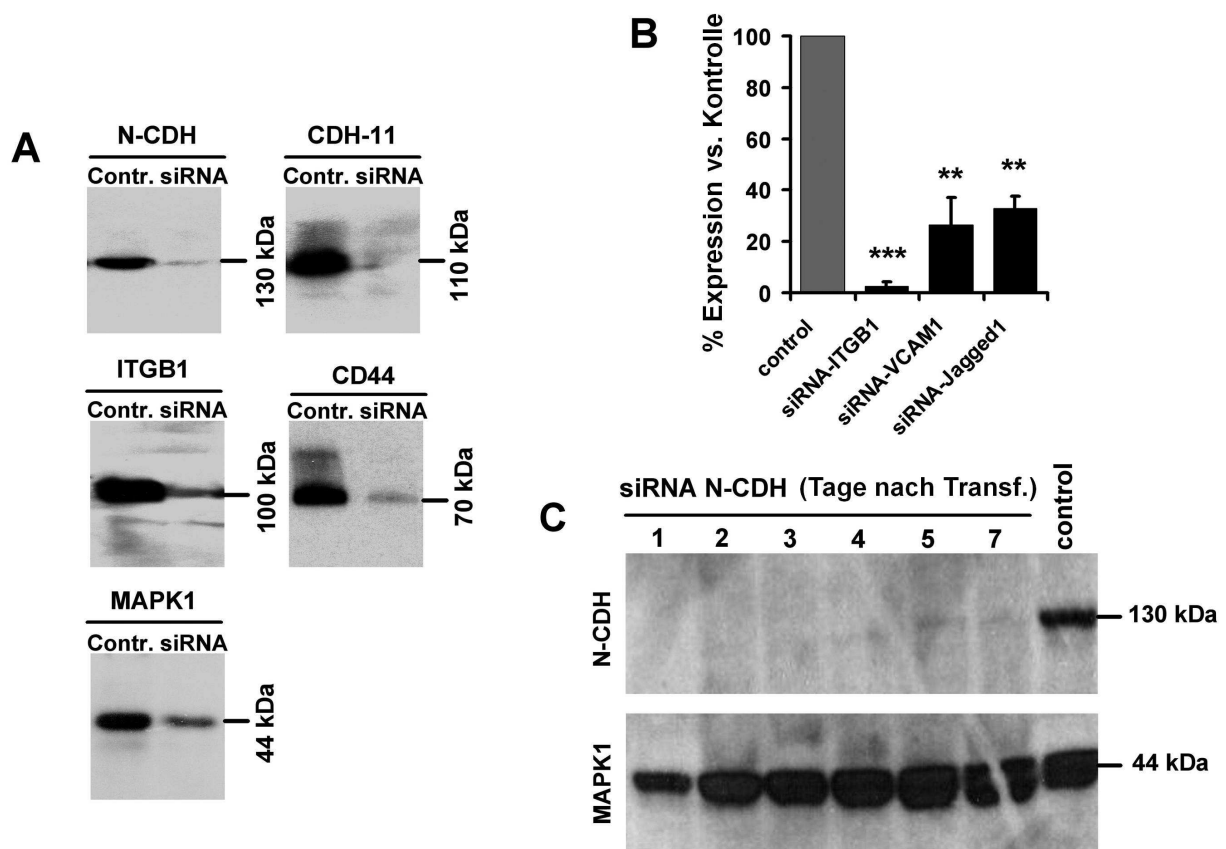


Abbildung 9: Spezifische Herunterregulation von Adhäsionsproteinen durch siRNA. Herunterregulation von N-Cadherin (N-CDH), Cadherin-11 (CDH11), Integrin beta 1 (ITGB1), CD44 und mitogenaktivierter Proteinkinase 1 (MAPK1) in MSC wurde nach 2 Tagen per Western Blot überprüft (A). Herunterregulation von ITGB1, VCAM1 und Jagged1 wurde nach 2 Tagen per quantitativer RT-PCR überprüft (B; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Der vorübergehende siRNA-Effekt dauerte mehr als 7 Tage an (C) (Walenda et al., 2010).

3.1.6 Interaktion von HPC mit MSC wird durch bestimmte Adhäsionsproteine reguliert

Von einer Vielzahl von Adhäsionsproteinen wie N-Cadherin (N-Cdh), Cadherin-11 (Cdh11), Integrin beta 1 (ITGB1), CD44, VCAM1 und Jagged1 wurde postuliert, dass sie in der Interaktion von HPC mit MSC in der Stammzellnische eine entscheidende Rolle spielen (Prosper und Verfaillie, 2001; Arai und Suda, 2007; Wein et al., 2010). In dieser Arbeit wurde der Beitrag dieser Adhäsionsrezeptoren im HPC-MSC-Kokultursystem untersucht, indem diese in den MSCs mittels spezifischer siRNA-Konstrukte herunter reguliert wurden und Proliferation und Immunphänotyp der HPC nach Kokultivierung analysiert wurden. Die Effizienz der Herunterregulation wurde 3 Tage nach siRNA-Transfektion für N-Cdh, Cdh11, ITGB1 und CD44 per Western Blot oder per quantitativer Realtime RT-PCR für ITGB1, VCAM1 und Jagged1 analysiert. Es zeigte sich, dass die Herunterregulation sehr effizient funktionierte und dieser Effekt über mehr als 7 Tage nachweisbar war (Abbildung 9). In 8 unabhängigen Experimenten wurden CD34⁺ HPC entweder mit CFSE oder mit PKH26 gefärbt und simultan auf unbehandelten und siRNA-transfizierten MSC Feedern für 7 Tage kultiviert. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Analyse von Zellteilungen und des Immunphänotyps. Es wurde herausgefunden, dass die siRNA-Herunterregulation von N-Cadherin und VCAM1 die Fraktion von langsamteilenden HPC leicht signifikant erhöht (Abbildung 10A), was bedeutet, dass N-Cadherin und VCAM1 die Proliferation der HPC anregen. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Transfektion mit siRNA gegen Cadherin-11, ITGB1, CD44 und Jagged1 nicht die Proliferation der HPC. Allerdings resultierte die Herunterregulation von CD44 und ITGB1 in einem signifikant höheren Anteil an HPC mit einem primitiven CD34⁺ und CD34⁺ CD38⁻ Immunphänotyp (Abbildung 10C, E). Überdies wurde die maximale Hochregulation von CD38 durch siRNA gegen CD44 und ITGB1 erniedrigt (Abbildung 10F). Jedoch war die Aufrechterhaltung der LTC-IC-Frequenz nicht von CD44 oder ITGB1 abhängig (Abbildung 10G), was impliziert, dass CD44 und ITGB1 in der Stammzellnische eher in der Differenzierung der HPC als in der Aufrechterhaltung eines CD34⁺ CD38⁻ Immunphänotyps involviert sind.

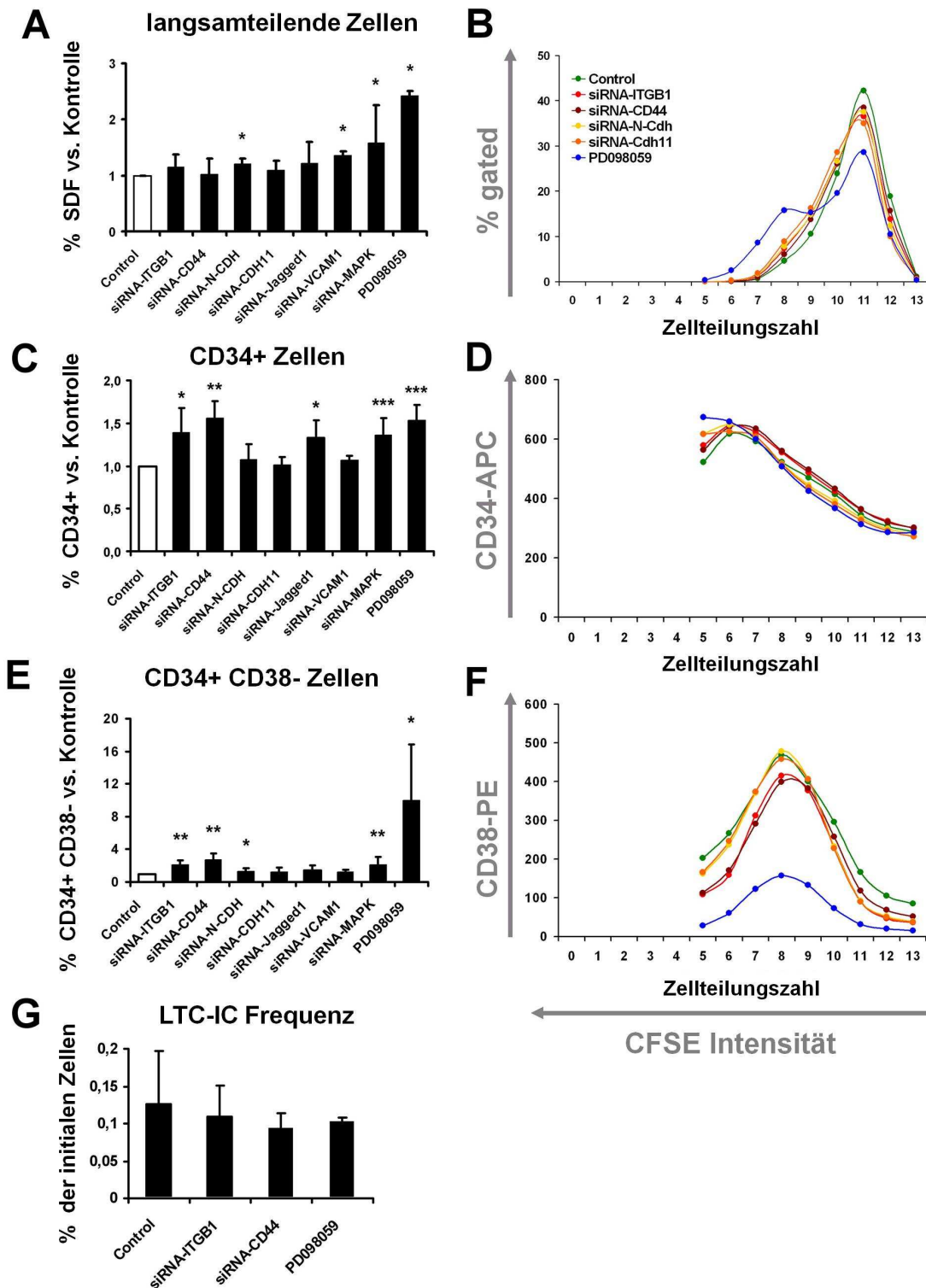


Abbildung 10: Die Bedeutung verschiedener Adhäsionsproteine für die stromale Funktion. CD34⁺ HPC wurden nach siRNA-Herunterregulation von Proteinen in den MSC mit diesen kokultiviert. Alternativ wurde die MAPK durch PD098059 inhibiert. Der Prozentsatz für langsamteilende Zellen per PKH26-Färbung (A), CD34⁺ Zellen (C) und CD34⁺ CD38⁻ Zellen (E) wurde nach 7 Tagen Kokultur bestimmt. Mittelwerte $\pm$ SD aus 8 unabhängigen Experimenten wurden im Verhältnis zu unbehandelten Feedern angegeben. Außerdem wurden repräsentative Ergebnisse für die Proliferation (B), CD34-Expression (D) und CD38-Expression (F) in Kombination mit CFSE-Zellteilungsanalyse dargestellt. Ungeachtet der Erhöhungen der CD34⁺ und CD34⁺ CD38⁻ Zellzahlen konnte kein signifikanter Effekt auf die Aufrechterhaltung von LTC-IC nach Herunterregulation von ITGB1, CD44 oder MAPK1 festgestellt werden (G; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) (Walenda et al., 2010).

3.2 Expansion von HPC wird von einem komplexen Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und MSC reguliert

Nachdem der Einfluss einer Kokultivierung von MSC mit HPC untersucht und Komponenten sowie physiologische Bedingungen der Stammzellnische identifiziert wurden, die an der Aufrechterhaltung primitiver HPC beteiligt sind, sollten die Kultivierungsbedingungen durch Optimierung der Wachstumsfaktorzusätze des Mediums weiter verbessert werden. Vor mehr als zwei Jahren haben Zhang und Kollegen ein Medium für die Kultur von HPC beschrieben, welches neben dem Basalmedium mit einer Kombination aus fünf verschiedenen Wachstumsfaktoren (SCF, TPO, FGF, ANGPTL5, IGFBP2) versetzt wurde, um eine optimale Expansion von primitiven HPC zu erzielen (Zhang et al., 2008). Ziel dieser Arbeit war es, diese einzelnen Wachstumsfaktoren in verschiedenen Kombinationen in dem bereits etablierten Kokultursystem auf ihren Einfluss zu testen. Besonderes Augenmerk lag bei der Fragestellung, ob durch Kokultur mit MSC bestimmte Zytokine für eine erfolgreiche und optimierte *in vitro* Expansion von HPC redundant sind.

3.2.1 Vergleich verschiedener Kulturbedingungen zur Verstärkung der *in vitro* Expansion von HPC

Zum Vergleich verschiedener Kulturbedingungen wurden 20 verschiedene Kombinationen der Wachstumsfaktoren SCF, TPO, FGF, ANGPTL5 und IGFBP2 entweder mit MSC oder ohne Kokultur systematisch im Hinblick auf eine erfolgreiche *in vitro* Expansion von HPC getestet. CD34⁺ HPC wurden aus CB isoliert und zur Nachverfolgung der Zellteilungen mit CFSE gefärbt. Anschließend wurden sie unter den verschiedenen Bedingungen für 7 Tage expandiert. Der CFSE-Farbstoff wurde mit jeder Zellteilung auf beide Tochterzellen verteilt, somit konnten klare Zellteilungspeaks erkannt werden (Abbildung 11A). Ohne Wachstumsfaktorzusätze und ohne Feederzellen konnten keine HPC durchflusszytometrisch detektiert werden. Zugabe von einzelnen Wachstumsfaktoren ergab, dass SCF oder TPO die Proliferation und Aufrechterhaltung von HPC mit Stammzeleigenschaften förderten, jedoch nicht Zugabe von FGF, ANGPTL5 oder IGFBP2. Wurde ein Cocktail aus StemSpan Basalmedium versetzt mit SCF, TPO und FGF (S.T.F. Medium) zur Kultivierung von HPC benutzt, so führte dieses zu einer signifikant erhöhten HPC Proliferation. Zusätzliche Zugabe von ANGPTL5 und / oder IGFBP2 (S.T.F.A.I.-Medium) erhöhte leicht aber nicht signifikant die Proliferation der HPC. Im Gegensatz dazu führte die Kokultivierung von HPC mit MSC Feederzellen sogar ohne jeglichen Zytokinzusatz zu einer Verstärkung der Zellteilungen. Dieser supportive Effekt wurde durch Zugabe von S.T.F.-Medium signifikant erhöht

(Abbildung 11B). Weiterer Zusatz von ANGPTL5 und / oder IGFBP2 führte zu keiner signifikanten Verbesserung der HPC-Expansion. Um das zu verdeutlichen, wurden absolute HPC-Zellzahlen in zwei unabhängigen Experimenten nach 4, 8, 13 und 15 Tagen in Kultur mit und ohne MSC bestimmt (Abbildung 11C). Zusammengefasst konnte demonstriert werden, dass sich S.T.F.-Medium und MSC-Kokultur synergistisch auf die Proliferation von HPC auswirken, wohingegen ANGPTL5 und IGFBP2 nur moderate Effekte darauf ausüben.

3.2.2 Wachstumsfaktoren zusammen mit MSC Kokultur erhalten HPC mit primitivem Immunphänotyp

Als nächster Schritt wurde die Aufrechterhaltung des primitiven Immunphänotyps nach 7 Tagen *in vitro* Expansion durchflusszytometrisch analysiert. Generell wurde der prozentuale Anteil an CD34⁺ Zellen durch verschiedene Zytokinkombinationen ohne MSC-Feeder nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 11D, E). Die kombinierten Analysen des CD34⁺ CD38⁻ Immunphänotyps und Zellteilungen mittels CFSE-Färbung ergaben, dass das S.T.F.-Medium die CD34 Expression über mehr Zellteilungen aufrecht erhielt als Zugabe von SCF oder TPO alleine (Abbildung 12). Der zuvor demonstrierte Verlust von CD38-Expression wurde mit S.T.F.-Medium ebenfalls zu einer höheren Zellteilungszahl verschoben. Aus diesem Grund lässt sich schlussfolgern, dass die S.T.F.-Kombination nicht nur die Proliferation erhöht, sondern auch die Aufrechterhaltung eines primitiven Immunphänotyps fördert. Unter MSC-Kokulturbedingungen konnte gezeigt werden, dass der Anteil an CD34⁺ Zellen signifikant erhöht wurde (Abbildung 11E). Dies wurde weiter signifikant mit S.T.F.-Medium gesteigert, denn selbst nach mehr als 10 Zellteilungen verblieb eine große Zellpopulation CD34⁺. Extrapolation der sich erhöhenden Zellzahlen und der prozentualen Anteile an CD34⁺ Zellen ergab eine mehr als 35-fache Expansion an CD34⁺ Zellen mit S.T.F.-Medium und MSC-Feeder Unterstützung (Abbildung 11F).

Zur Anreicherung von primitiveren HPC aus Primärmaterialien wird oftmals die CD34⁺ CD38⁻ Zellpopulation benutzt. Wie zuvor beobachtet war der Anteil an primitiven HPC unter Kokulturbedingungen stark erhöht (Abbildung 13A). Außerdem wird CD38 in den schnellteilenden Zellen wieder herunter reguliert (Abbildung 12), was impliziert, dass diese Kombination von Markern zur Identifikation von primitiven HPC nach Expansion nicht geeignet sein könnte. Der Verlust an CD38-Expression wurde unter Kokulturbedingungen zu einer höheren Zellteilungszahl verschoben, wobei Zugabe von ANGPTL5 und / oder IGFBP2 keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil an CD34⁺ und CD34⁺ CD38⁻ Zellen nach Expansion hatte. Zusammengefasst bieten das S.T.F.-Medium zusammen mit MSC-Kokultur

gute Möglichkeiten für eine optimierte HPC-Expansion mit weitestgehendem Erhalt von CD34-Expression.

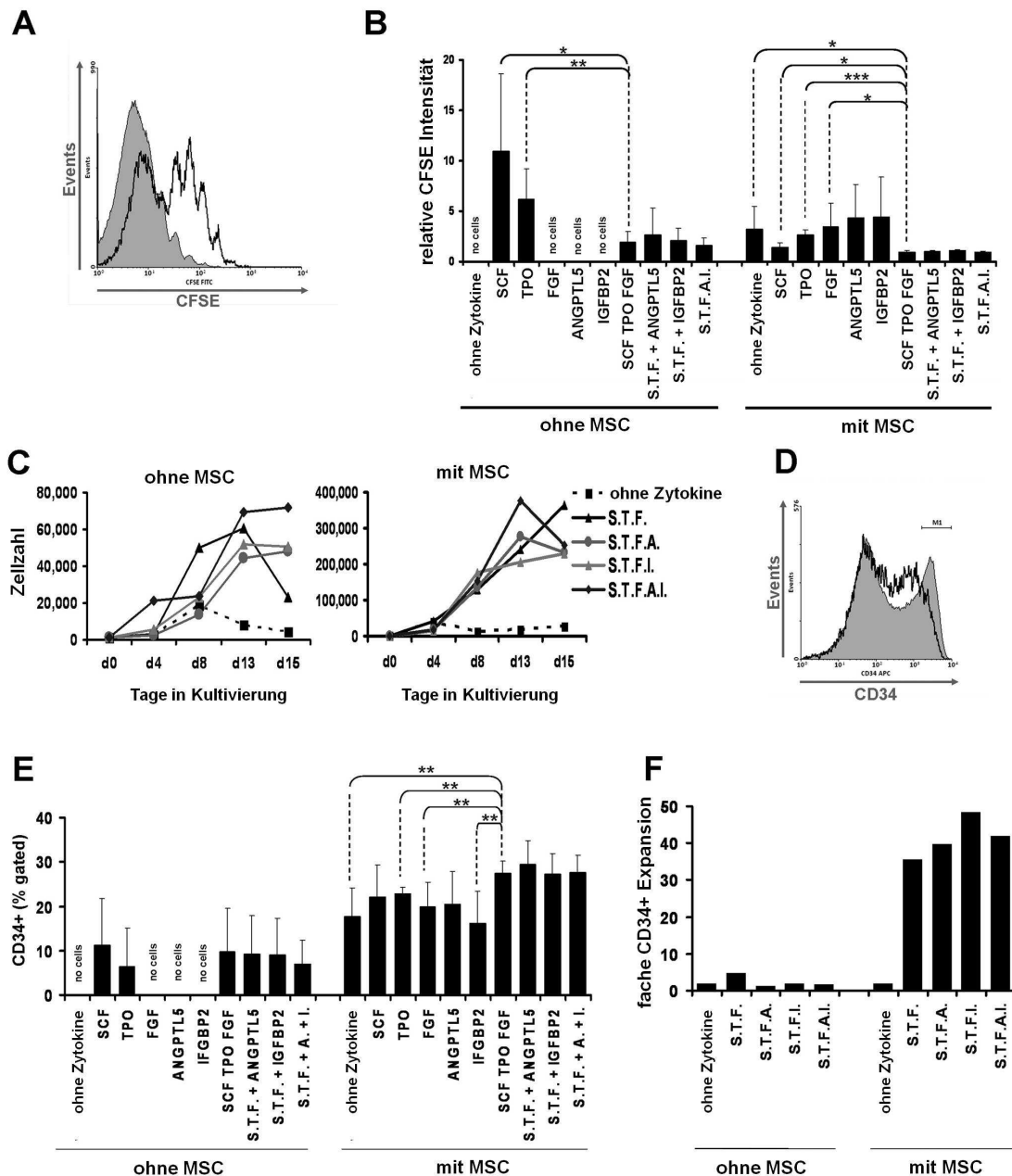


Abbildung 11: Proliferation und CD34-Expression nach *in vitro* Expansion. CD34⁺ HPC wurden mit CFSE gefärbt und ohne oder mit MSC für 7 Tage kultiviert. StemSpan Medium wurde wie angegeben mit verschiedenen Zytokinkombinationen versetzt. Eine exemplarische Überlagerung der CFSE-Histogramme von Proben nach Expansion mit S.T.F.-Medium ohne (grau) und mit MSC (schwarze Linie) verdeutlicht eine schnellere Proliferation unter Kokulturbedingungen (A). Die mittlere CFSE-Intensität wurde zur statistischen Analyse benutzt (B; n = 6). Zusätzlich wurden die absoluten Zellzahlen nach Expansion von initial 1.000 CD34⁺ Zellen nach 4, 8, 13 und 15 Tagen Kultur bestimmt (C; n = 2). Untersuchung der CD34-Expression nach 7 Tagen Expansion ergab, dass nur S.T.F.-Medium (schwarze Linie) weniger CD34⁺ Zellen erhielt als S.T.F.-Medium mit MSC (D; graues Histogramm). Insbesondere die Kombination aus SCF, TPO und FGF verstärkte die Kokultureffekte auf HPC positiv (E; n = 6; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; p-Werte im Verhältnis zu S.T.F.-Medium). Die Erhöhung der absoluten Zellzahlen und Prozentsätze der CD34⁺ Zellen wurde zur Extrapolation der CD34⁺ HPC Expansion unter den benutzten Kulturbedingungen benutzt (F) (Walenda et al., 2011b).

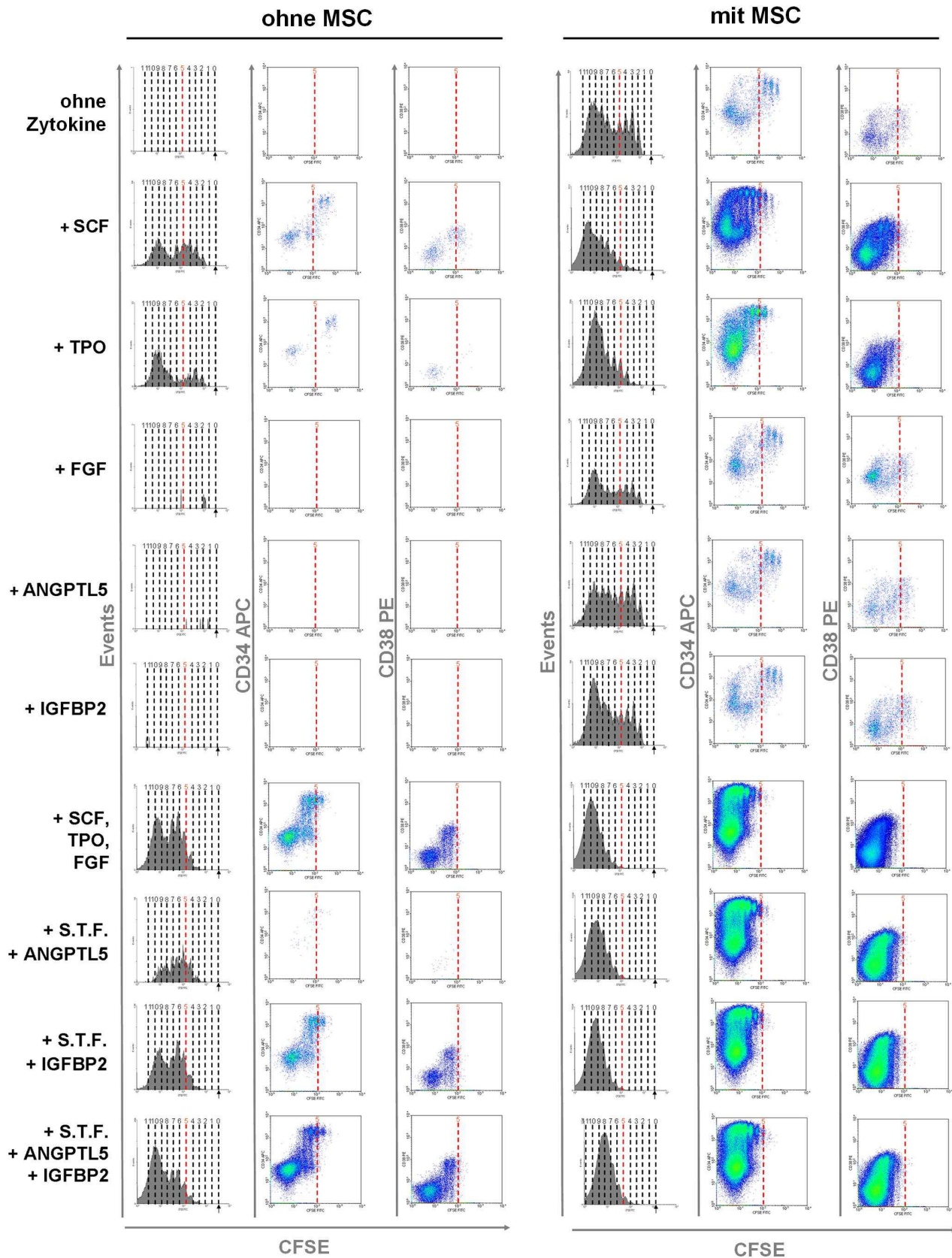


Abbildung 12: Änderungen des Immunphänotyps in Kombination mit der CFSE-Zellteilungsanalyse. Die HPC-Zellteilungen wurden mittels CFSE-Färbung durchflusszytometrisch zusammen mit der CD34- und der CD38-Expression analysiert. Die rote Linie entspricht jeweils der Zellteilung Nummer 5. Die Zellen wurden für 7 Tage entweder ohne MSC (linke Spalten) oder mit MSC (rechte Spalten) kultiviert. Es sind repräsentative Histogramme und Dichteplots von 6 unabhängigen Experimenten dargestellt (Walenda et al., 2011b).

Um weitere Einblicke in die hämatopoetische Differenzierung während der Kultivierungszeit zu bekommen, wurden die Zellen nach Kultur mit fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen linienspezifische Oberflächenmarker gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 13B). Die HPC wurden dafür 7 Tage in S.T.F.-Medium mit oder ohne MSC expandiert. Es konnte in keiner Kulturbedingung Expression von CD3, CD19 oder CD56 nachgewiesen werden. Die Expression des allgemeinen Leukozytenmarkers CD45 und des myeloiden Markers CD13 wurde nur in schnellteilenden Zellen mit MSC-Kokultur hochreguliert. Analog zur Expression von CD34 wurde auch die Expression von CD133 unter Kokulturbedingungen über eine höhere Anzahl an Zellteilungen aufrecht erhalten. Es konnte demonstriert werden, dass diese CD133⁺ Zellen ebenfalls CD34⁺ sind (Abbildung 13c).

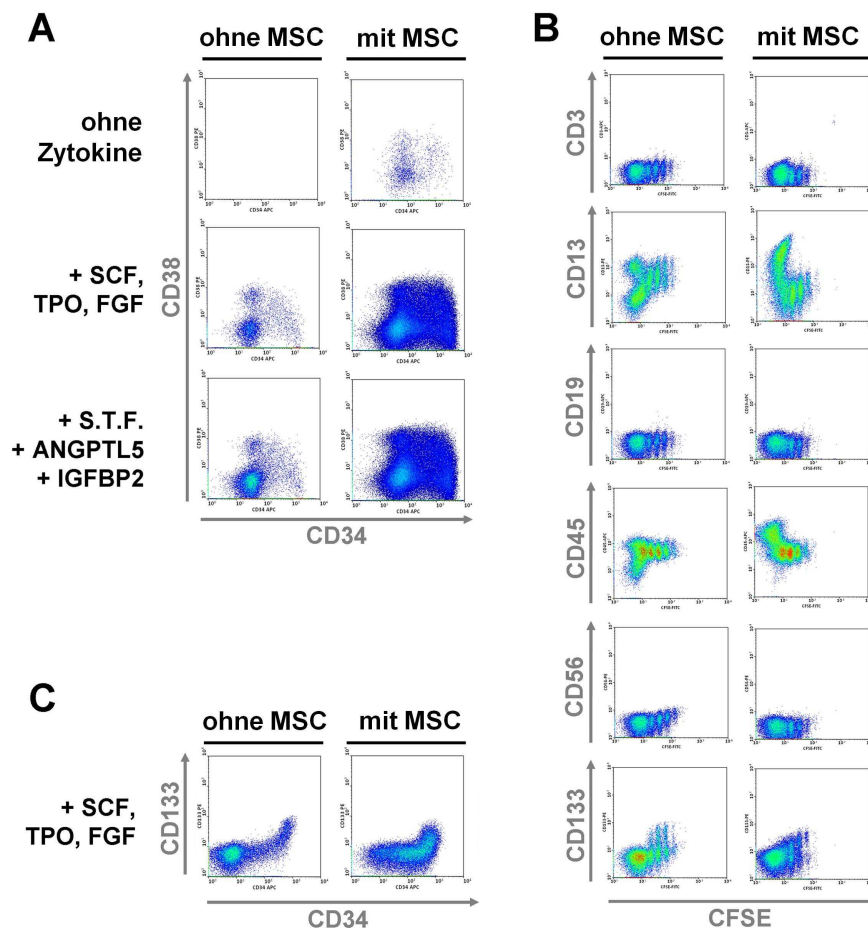


Abbildung 13: Linien-spezifische Differenzierung der HPC. CD34⁺ Zellen wurden für 7 Tage unter verschiedenen Wachstumsbedingungen *in vitro* expandiert und die CD34 sowie CD38 Expression untersucht (A). Zur Zellteilungsverfolgung wurden die HPC mit CFSE gefärbt, in S.T.F.-Medium ohne und mit MSC für 7 Tage kultiviert und anschließend die Expression von CD3, CD13, CD19, CD45, CD56 und CD133 untersucht (B). Außerdem wurde die CD34-Expression gegen die von CD133 dargestellt (C). Es sind repräsentative Dichteplots von 4 unabhängigen Experimenten dargestellt (Walenda et al., 2011b).

3.2.3 Kokultivierung mit MSC unter Zytokinzusatz expandiert CFU-initiierende Zellen

Um weitergehende Informationen über das Stammzellpotential der expandierten HPC zu gewinnen, wurden koloniebildende Assays durchgeführt und die CFU-Frequenz bestimmt. CD34⁺ Zellen wurden zeitgleich unter den 20 zuvor beschriebenen verschiedenen Kulturbedingungen für 7 Tage expandiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen in ein Methylzellulosemedium überführt. Nach weiteren 14 Tagen in Methylzellulose wurden die Raten für CFU-G, CFU-E und CFU-M bestimmt (Abbildung 14) und mit einer Kontrollprobe aus frisch isolierten, nicht expandierten HPC verglichen. Es zeigte sich, dass ohne MSC-Kokultur die Zytokine SCF, TPO, FGF-1 und ANGPTL5 die CFU-initiierenden Zellen ohne signifikante Expansion gegenüber der Kontrollprobe aus unexpandierten Zellen (initiale Kolonien) am Leben erhielten. Sogar unter S.T.F.-Bedingungen oder Zusatz von allen fünf Zytokinen konnte keine signifikante Expansion von CFU-initiierenden Zellen beobachtet werden, obwohl ein enormer Effekt auf die Proliferation dokumentiert wurde (Abbildung 12). Durch Zugabe von ANGPTL5 und / oder IGFBP2 stieg die CFU-Frequenz nur moderat an. Nach einer Kokultur mit MSC stieg im Gegensatz dazu die CFU-Frequenz etwa um das Fünffache. Dieser Effekt wurde durch Zugabe von Zytokinen weiter verstärkt. Beispielsweise erhöhte S.T.F.-Medium zusammen mit MSC die Gesamtzahl der Kolonien im Vergleich zu den initialen Kolonien 8,4-fach ($p = 0,05$) und 1,8-fach im Vergleich zur Expansion mit MSC ohne Zytokinzugabe ($p = 0,02$). Weitere Zugabe von ANGPTL5 und / oder IGFBP2 zum S.T.F.-Medium führte zu einer kaum detektierbaren Verstärkung der CFU-Frequenz. Zusammengefasst konnte beobachtet werden, dass Kultur nur mit Zytokinen alleine keine CFU-initiierenden Zellen expandiert, während Kombination der Zytokine mit MSC-Kokultur zu einer signifikanten Expansion der CFU-initiierenden Zellen führt.

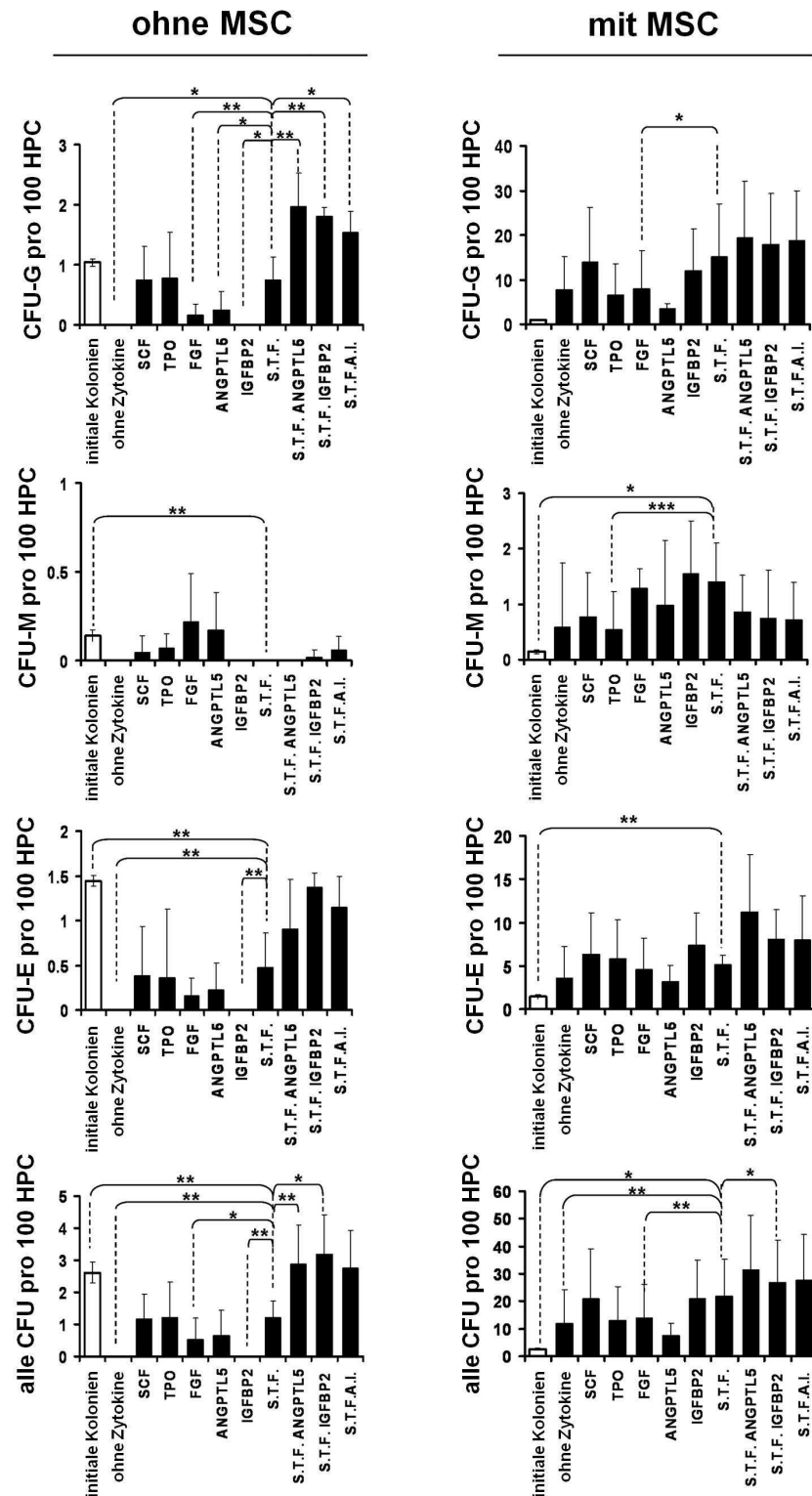


Abbildung 14: Expansion von kolonieinitierenden Zellen. CD34⁺ Zellen wurden ohne (linke Spalte) oder mit MSC (rechte Spalte) für 7 Tage in StemSpan Medium mit verschiedenen Zytokinkombinationen wie angegeben kultiviert. Anschließend wurde die Nachkommenschaft in limitierten Verdünnungen in Methylzellulosemedium ausgesät und nach 14 Tagen die CFU-G, CFU-M und CFU-E ausgezählt. Als Referenz dienten frisch isolierte, nicht expandierte CD34⁺ HPC, welche zur Bestimmung der initialen CFU-Frequenz direkt in Methylzellulosemedium gegeben wurden. Ohne MSC erhielten einige Zytokine das CFU-Potential, verglichen mit der initialen CFU-Zahl konnte jedoch keine signifikante Expansion festgestellt werden. Mit MSC war die CFU-Frequenz signifikant erhöht. Diese Erhöhung konnte durch Präkultivierung in S.T.F.-Medium weiter gesteigert werden ($n = 4$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; p-Werte im Verhältnis zu S.T.F.-Medium) (Walenda et al., 2011b).

3.2.4 Transplantation von HPC in NOD/SCID-Mäuse

Um die Funktionalität der *in vitro* expandierten HPC weitergehend zu testen, ob sie in der Lage sind, im hämatopoetischen System eines murinen Transplantationsmodells anzuwachsen, wurden Repopulationsassays in NOD/SCID-Mäusen durchgeführt (Zhang et al., 2008). Dazu wurden je 50.000 frisch isolierte CD34⁺ HPC aus Nabelschnurblut oder deren expandierte Nachkommenschaft in subletal bestrahlte Mäuse injiziert. Der Versuchsaufbau bestand aus drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt acht Mäusen pro Kulturbedingung. 7 bis 8 Wochen nach der Transplantation der HPC wurden die Prozentsätze der Zellen, welche positiv für humanes CD45 sind, human- und zellspezifisch per Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurde Zellen aus Blut, Knochenmark, Milz und Thymus analysiert. Es konnten in allen transplantierten Tieren humane Zellen nachgewiesen werden. Dabei erzeugten Zellen aus frisch isolierten HPC ohne *in vitro* Expansion im Knochenmark der Mäuse einen durchschnittlichen humanen Chimerismus von 16,5 % $\pm$ 9 % (Abbildung 15A). Allerdings erzeugte die Transplantation der Nachkommenschaft von in S.T.F.A.I.-Medium expandierten HPC im Knochenmark eine niedrigere Chimerismusrate von 5,9 % $\pm$ 5,3 %. Dieses war unerwartet, da in anderen Arbeiten mit ähnlichen Kulturbedingungen ein signifikant verstärktes Anwachsen von prä-expandierten HPC im Vergleich zu nicht expandierten Zellen beschrieben wurde (Zhang et al., 2008). Transplantation der Nachkommenschaft von 50.000 HPC, welche in S.T.F.A.I.-Medium und mit MSC Kokultur expandiert wurden, ergab eine Chimerismusrate von 19,4 % $\pm$ 18,1 %. Diese Chimerismusrate war signifikant höher verglichen zu der Rate nach Expansion ohne MSC ($p = 0,024$), jedoch wurde keine Signifikanz im Vergleich zu nicht expandierten Zellen festgestellt (Abbildung 15B). In Proben der Milz wurden ähnliche Tendenzen beobachtet. Als nächster Schritt wurde die Expression von humanem CD34 im Knochenmark nach den verschiedenen Prä-Expansionsbedingungen untersucht (Abbildung 15C). Die Transplantation von unexpandierten HPC ergab ein Anwachsen von 5 % $\pm$ 2,7 % CD34⁺ humaner Zellen. Nach erfolgter Prä-Expansion mit S.T.F.A.I.-Medium konnten 1,8 % $\pm$ 1,3 % CD34⁺ Zellen detektiert werden. Analog zur Analyse der CD45⁺ humanen Zellen ergab die Analyse von humanem CD34 nach Transplantation von HPC, welche in S.T.F.A.I.-Medium mit MSC expandiert wurden, einen signifikanten Anstieg dieser Population ($p = 0,025$; Abbildung 15D). Jedoch wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu unexpandierten Zellen festgestellt. Neben den bisher beschriebenen Geweben wurde das Anwachsen der humanen HPC auch im Thymus und im peripheren Blut untersucht. Dort wurden humane CD3⁺ und CD13⁺ Zellen nachgewiesen (Abbildung 15E). Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine *in vitro* Expansion von HPC für 7 Tage die

langzeitrepopulierenden Effekte aufrecht erhält. Dabei scheinen MSCs und Zytokine in synergistischer Weise auf die Expansion von HPC zu wirken, jedoch konnte anhand der Daten dieser Arbeit keine signifikante Expansion von langzeitrepopulierenden Zellen nachgewiesen werden.

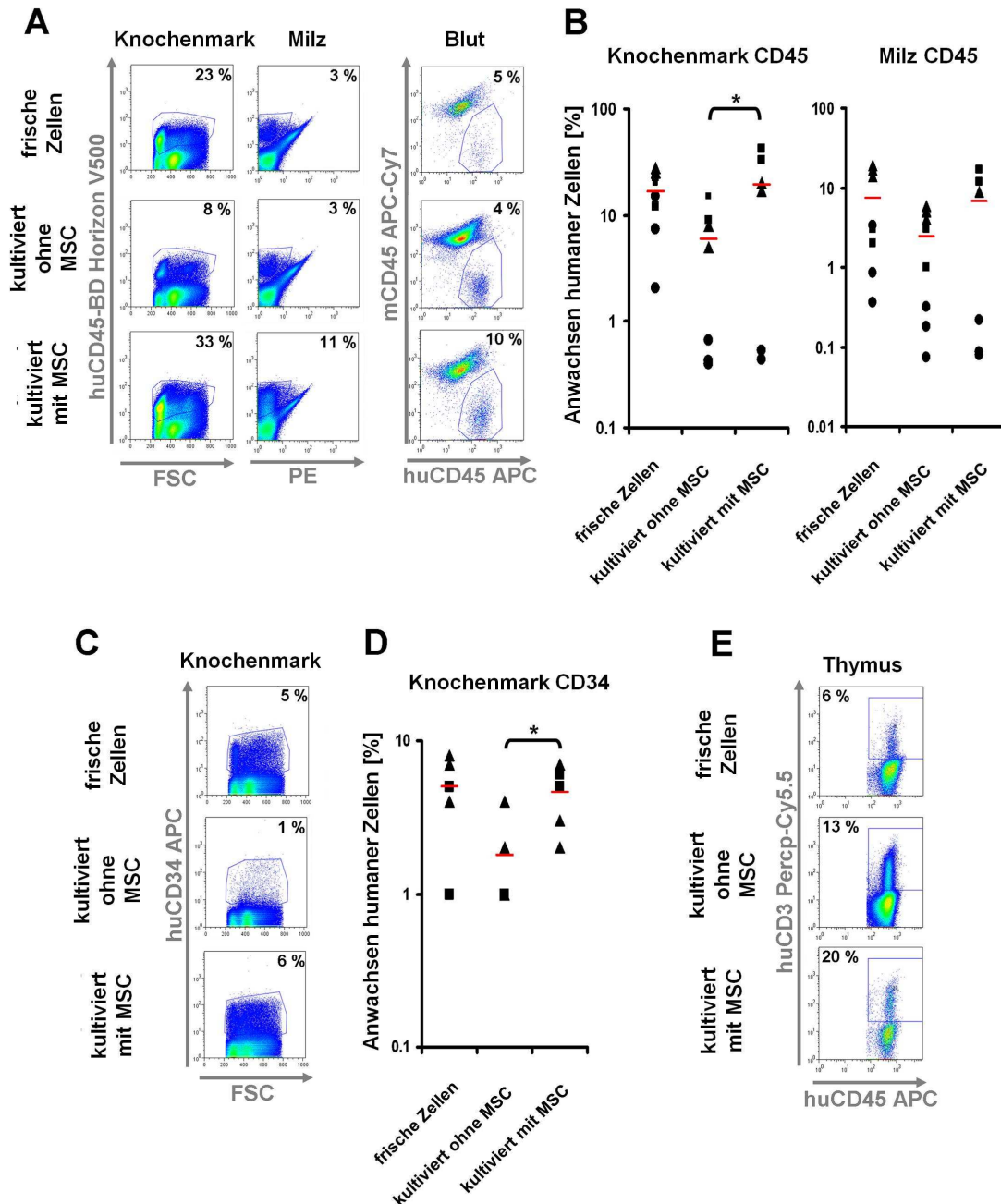


Abbildung 15: Das Anwachsen von *in vitro* expandierten HPC in einem murinen Transplantationsmodell. 50.000 HPC wurden in S.T.F.A.I.-Medium ohne oder mit MSC expandiert, und die gesamte Nachkommenschaft wurde in subletal bestrahlte NOD/SCID-Mäuse transplantiert. 7 bis 8 Wochen nach Transplantation wurde das Anwachsen von human CD45⁺ Zellen in Knochenmark, Milz und Peripherblut detektiert (A). Kokultur mit MSC erhöhte signifikant die Niveaus der Chimerismen im Vergleich zu ohne MSC präexpandierten HPC, jedoch wurde kein Unterschied verglichen zu unexpandierten Zellen detektiert (B). Des Weiteren war die Zahl an humanen CD34⁺ Zellen im murinen Knochenmark nach Kokultur im Vergleich zu ohne MSC signifikant höher, obwohl kein signifikanter Unterschied zu frischen Zellen gefunden wurde (C, D). Untersuchung des Thymus zeigte eine Tendenz zu huCD3⁺ huCD45⁺ T-Zell Differenzierung (E). (Jedes schwarze Symbol repräsentiert ein Tier aus drei unabhängigen Experimenten; * $p \leq 0,05$) (Walenda et al., 2011b).

3.3 Serum nach autologer Transplantation stimuliert die Proliferation und Expansion von HPC

Nach der Analyse der Bedingungen, durch welche die Expansion von HPC *in vitro* weiter optimiert werden kann, sollte untersucht werden, welche Faktoren bei der hämatopoetischen Rekonstitution nach erfolgter Chemotherapie im Patienten wirken. Solche Kenntnisse haben das Potential, neben einer Optimierung zukünftiger Therapien auch eine *in vitro* Expansion von HPC weiter zu steigern. Es wurde aus Peripherblut von Patienten, welches zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Chemotherapie gewonnen wurde, Serum isoliert. Es wurde der Einfluss dieses Serums auf *in vitro* expandierte HPC getestet, indem das Serum dem Zellkulturmedium zugesetzt wird. Außerdem werden die Seren auf ihre Zytokinzusammensetzung untersucht. Bis dato ist dazu nur wenig bekannt, und neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet könnten nicht nur zur Aufklärung der Mechanismen der hämatopoetischen Rekonstitution beitragen, sondern auch zu einer speziell im Hinblick auf klinische Applikationen gezielten und verfeinerten HPC Expansion *in vitro* beitragen.

3.3.1 Serum isoliert nach HSCT stimuliert die Proliferation von HPC

Um die Faktoren zu untersuchen, welche nach einer Chemotherapie und Stammzelltransplantation (HSCT) zur hämatopoetischen Rekonstitution beitragen, wurden insgesamt 51 Serumproben aus Peripherblut von 9 Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach HSCT isoliert (Tabelle 7). Das Kultivierungsmedium wurde mit 10 % je einer Serumprobe versetzt und der Einfluss auf die Proliferation, den Immunphänotyp und die Aufrechterhaltung der Stammzellcharakteristika von HPC während einer *in vitro* Expansion analysiert. Die Proliferation der HPC wurde nach 7 Tagen Kultur ohne und mit MSC-Kokultur mittels eines MTT-Assays bestimmt (Abbildung 16). Die Experimente wurden mit Serumproben von 7 Patienten wiederholt. Das Medium, welches mit Serumproben von Tag 8 (d8) nach HSCT versetzt wurde, führte zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation der HPC im Vergleich zu dem Serum, welches vor der Chemotherapie (BC) gewonnen wurde ($p = 0,03$). Unter Kokulturbedingungen konnte dieser Effekt ebenfalls demonstriert werden ($p = 0,0017$). Eine direkte Zählung der Zellzahlen nach Expansion in Serumproben von insgesamt 4 Patienten ohne MSC ergab eine signifikant um 1,97-fach höhere Zellzahl nach Expansion mit d8-Serum im Vergleich zu BC-Serum ($p = 0,0081$). Diese Ergebnisse belegen, dass Serum, welches nach HSCT während einer hämatopoetischen Stressphase isoliert wird, *in vitro* signifikant die Proliferation von HPC anregt.

Tabelle 7: Übersicht über die Patienten und Serumproben

Patient	Alter	Ge- schlecht	Diagnose	Therapie	Neutropenie, < 500 per μ l (Tage nach HSCT)	Thrombopenie, < 30,000 per μ l (Tage nach HSCT)	Serumproben (Tage nach HSCT)
# 1	21	w	NHL	BEAM*	1 – 8	2 - 12	BC, -1, 4, 8, 14, 22
# 2	60	m	NHL	BEAM*	1 – 7	3 - 10	BC, -1, 4, 8, 14
# 3	58	w	MM	Melphalan*	5 – 9	8 - 11	BC, 1, 4, 8, 11, 14, 18
# 4	65	m	MM	Melphalan*	5 – 10	6 - 11	BC, 1, 4, 8, 11
# 5	55	m	MM	Melphalan*	5 – 10	6 - 14	BC, 1, 4, 8, 11
# 6	32	m	NHL	BEAM*	2 – 9	4 - 9	BC, 1, 4, 6, 8, 11
# 7	64	w	MM	Melphalan*	5 – 9	7 - 9	BC, 1, 4, 8, 11
# 8	61	w	MM	Melphalan	6 – 15	7 - 13	BC, 1, 4, 8, 11, 14, 18
# 9	61	M	MM	Melphalan	6 – 13	9 - 18	BC, 4, 8, 11, 14

MM = Multiples Myelom; NHL = non-Hodgkin Lymphom; Melphalan = 200 mg/m² an d-2; BEAM = Carmustin 300 mg/m² d-7, Etoposid 150 mg/m² d-7 bis -4, Cytosin Arabinosid 200 mg/m² d-7 bis -4 und Melphalan 140 mg/m² d-3; * = G-CSF Stimulation von d0 bis zum Ende der Neutropenie; BC = vor Chemotherapie (Walenda et al., 2011a).

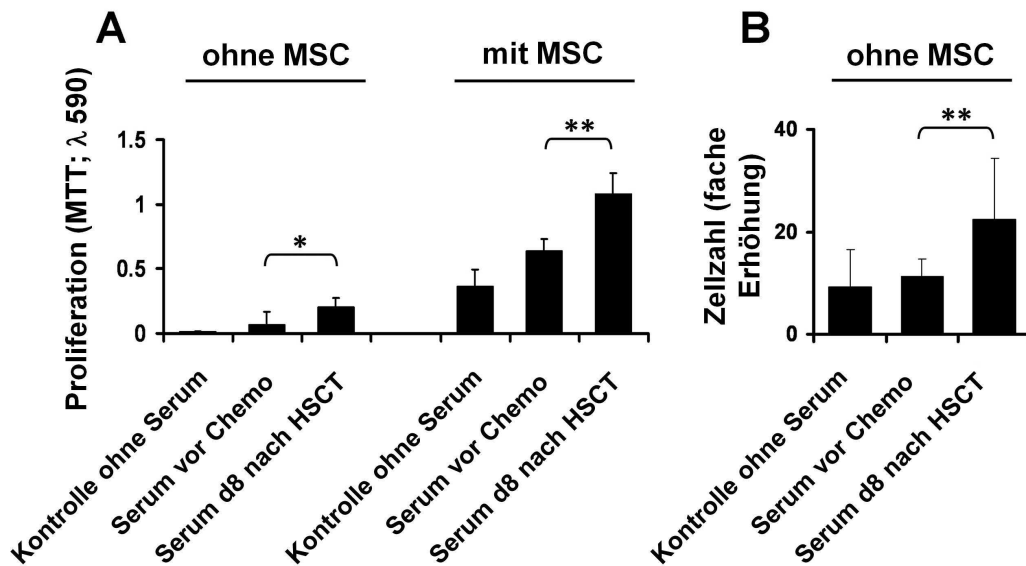


Abbildung 16: Serum isoliert nach HSCT stimuliert die Proliferation von CD34⁺ HPC. Serumproben wurden vor Chemotherapie und 8 Tage nach HSCT am Tiefpunkt der Leukozytenzahlen isoliert. 10 % Serum wurden jeweils StemSpan Medium zugesetzt und CD34⁺ HPC für 7 Tage ohne oder mit MSC *in vitro* kultiviert. Die Zellzahlen der HPC nach Expansion wurden entweder per MTT-Assay (A) oder mittels eines Casy-Zellzählers (B) bestimmt. Serum neutropener Patienten von d8 erhöhte signifikant die HPC-Zahlen nach *in vitro* Expansion (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; Fehlerbalken repräsentieren SD) (Walenda et al., 2011a).

3.3.2 Serum isoliert nach HSCT wirkt dem Verlust von CD34 Expression entgegen

Für eine simultane Analyse des Zellteilungsverhaltens und des Immunphänotyps wurde die in dieser Arbeit etablierte Methode der Kombination aus CFSE-Markierung und durchflusszytometrischer Analyse nach Expansion genutzt. HPC wurden für 7 Tage unter verschiedenen Serumbedingungen ohne oder mit MSC kokultiviert und anschließend die verbleibende CFSE-Intensität zusammen mit verschiedenen Oberflächenantigenen detektiert (Abbildung 17). Es zeigte sich, dass die Proliferation der HPC im Vergleich zu BC-Serum immer beträchtlich verstärkt war, wenn die Expansion in Medium mit 10 % Serum von d4 oder d8 nach HSCT erfolgte. Im Gegensatz dazu konnte mit Serumproben von d18 oder d22 nach HSCT keine Verstärkung der HPC-Proliferation beobachtet werden. Unter Kokulturbedingungen wurden das Überleben und die Proliferation der HPC generell deutlich gesteigert, es konnten aber gleiche Tendenzen des proliferationsfördernden Effektes von d4- und d8-Serum beobachtet werden.

Die parallele Analyse des Immunphänotyps ergab, dass die Expression von Oberflächenmarkern primitiver Zellen ebenso wie die Proliferation durch Kultivierung in Medium mit 10 % Serum von d4 oder d8 über eine höhere Anzahl an Zellteilungen

aufrechterhalten wurde. Die Expression von CD34 war insgesamt höher und wurde mit d4- oder d8-Serum für mehr als 5 Zellteilungen länger aufrecht erhalten. Außerdem wurde die Herauf- und Herunterregulation von CD38 ebenfalls zu einer höheren Zellteilungszahl verschoben. Diese Effekte auf die Expression von CD34 und CD38 waren in allen Experimenten konsistent, daher kann die Schlussfolgerung getroffen werden, dass Serum, welches im Zeitraum der Neutropenie gewonnen wird, signifikant die Proliferation und einen CD34⁺ Immunphänotyp von HPC während *in vitro* Expansion unterstützt.

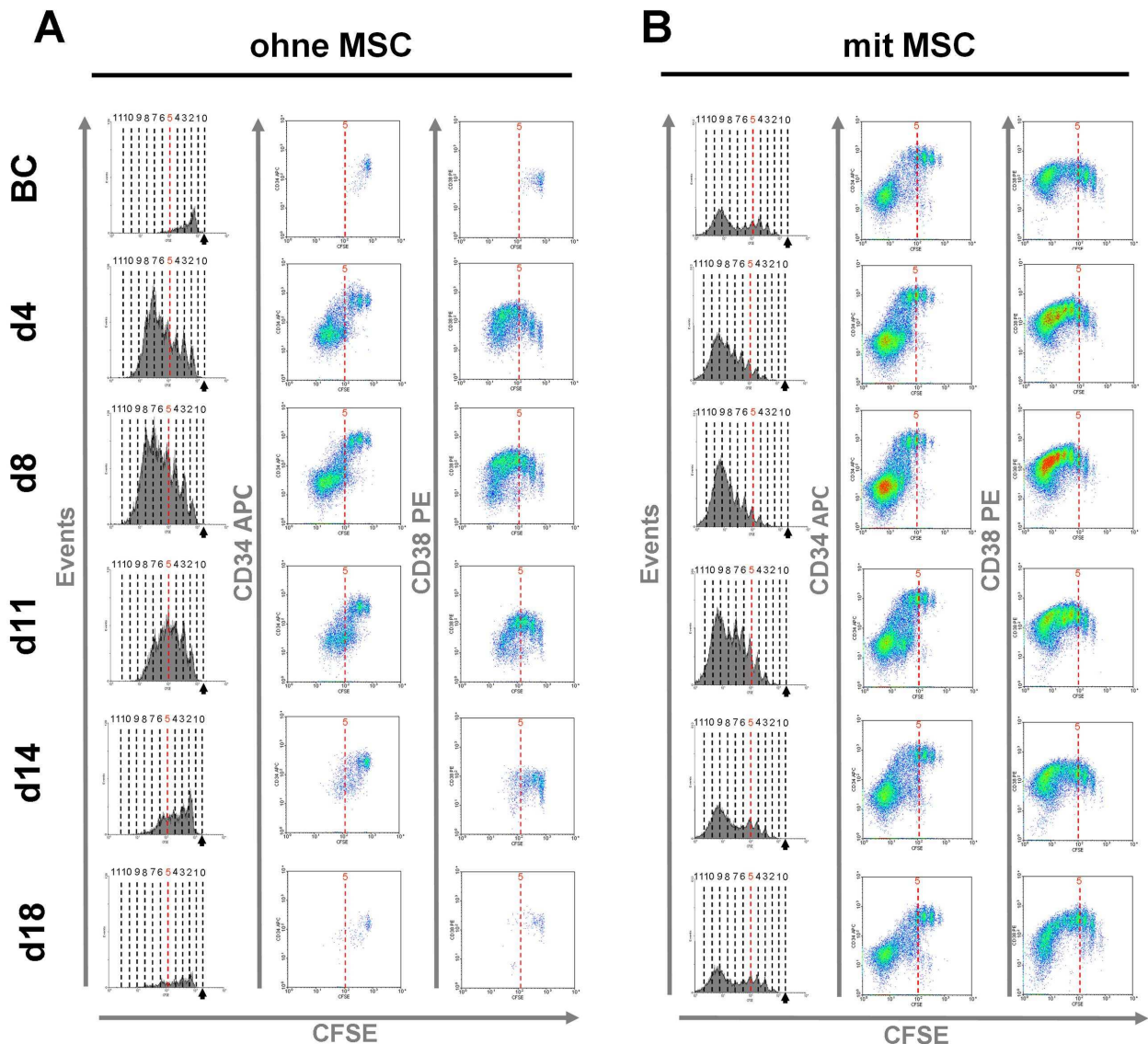


Abbildung 17: Simultane Analyse der Proliferation und des Immunphänotyps von HPC nach Expansion mit Serumproben. CD34⁺ HPC wurden mit CFSE gefärbt und *in vitro* für 7 Tage ohne (A) oder mit MSC (B) kultiviert. StemSpan Kulturmedium wurde mit 10 % Serum versetzt, welches vor Chemotherapie (BC) oder zu verschiedenen Zeitpunkten nach HSCT (d4, d8, d11, d14 und d18) gewonnen wurde. Die Zellteilungen wurden in Kombination mit der CD34 und CD38 Expression durchflusszytometrisch analysiert. Die rote Linie markiert die fünfte Zellteilung. Es sind repräsentative Histogramme und Dichteplots für die Untersuchung aller 9 Serumproben dargestellt (Walenda et al., 2011a).

3.3.3 Serum isoliert nach HSCT verstärkt die CFU-Bildung

Um die Expansion von HPC mit Stammzellcharakter zu untersuchen, wurde die Frequenz der Koloniebildung bestimmt. $CD34^+$ Zellen wurden für 7 Tage mit 10 % BC- oder d8-Serum ohne und mit MSC expandiert und anschließend für 14 Tage in Methylzellulosemedium kultiviert. Es zeigte sich, dass Serum von Tag 8 nach HSCT ohne MSC signifikant die Frequenz der CFU-G ($p = 0,001$), CFU-M ($p = 0,046$) und CFU-E ($p = 0,009$) im Vergleich zu BC-Serum erhöhte (Abbildung 18). Dabei konnte keine bestimmte Tendenz zu einer Linie erkannt werden. Die Koloniezahl nach Kokulturbedingungen lag etwa 10-fach über der ohne MSC, wobei ebenfalls ein signifikanter Anstieg der CFUs mit d8-Serum verzeichnet werden konnte ($p = 0.039$).

In Ergänzung dazu wurde die Frequenz der kopfsteinpflasterartigen Zellkolonien („cobblestone area forming cell“, CAFC) an Tag 28 bestimmt, um die Zahl der primitiveren HPC nach Expansion abzuschätzen. Die CAFC-Zahl war nach Expansion mit d8-Serum über 16-fach höher als im Vergleich zu Expansion mit BC-Serum ($p = 0,0358$). Zusammengekommen verdeutlichen diese Ergebnisse, dass Serum neutropener Patienten Faktoren enthält, welche die *in vitro* Expansion von HPC verstärken.

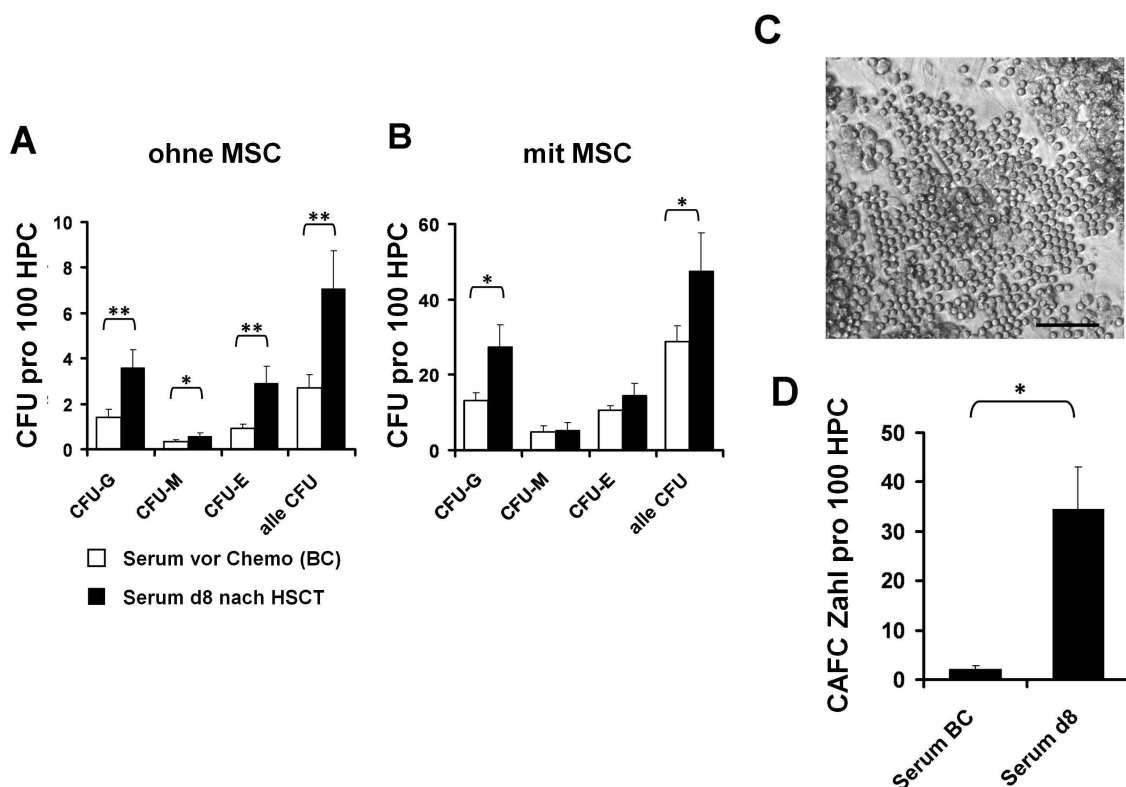


Abbildung 18: Die CFU-Frequenz wird durch Serum aplastischer Patienten erhöht. CD34⁺ HPC wurden entweder ohne (A) oder mit MSC (B) für 7 Tage in StemSpan Medium *in vitro* kultiviert, welches mit 10 % BC-Serum oder d8-Serum versetzt wurde. Anschließend wurden die Zellen in Methylzellulosemedium überführt und nach 14 Tagen die Zahlen der CFU-G, CFU-M und CFU-E ausgezählt. Die Koloniebildungsfrequenz wurde generell durch Kokultur mit MSC angeregt, was zusätzlich mit d8-Serum weiter verstärkt wurde. Außerdem wurde die Frequenz der kopfsteinpflasterartigen Kolonien (CAFC) nach 4 Wochen Kokultur mit MSC bestimmt (C). Die CAFC-Frequenz wurde stark durch Zugabe von d8-Serum stimuliert (D; n = 4; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; Fehlerbalken repräsentieren SEM; Größenbalken = 100 µm) (Walenda et al., 2011a).

3.3.4 Hochregulation von Differenzierungsmarkern unter verschiedenen Serumzusätzen

Die zuvor getesteten Kulturbedingungen mit verschiedenen Serumproben könnten HPC *in vitro* stimulieren, sich in eine bestimmte Linie zu differenzieren. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die CFSE-Färbung mit der Analyse verschiedener Differenzierungsmarker kombiniert (Abbildung 19). Wie zuvor proliferierten die HPC kaum mit Zusatz von 10 % BC-Serum und zeigten kaum Expression von Differenzierungsmarkern. Wurde dem Kulturmedium 10 % d8-Serum zugesetzt, so zeigten die HPC nach 7 Tagen Kultur eine moderate Heraufregulation von CD3 und CD19 in der schnellteilenden CFSE-niedrigen Zellpopulation, was ein Hinweis auf eine beginnende lymphatische Differenzierung sein kann. Die beginnende lymphatische Differenzierung wurde insbesondere durch Kokultivierung mit MSC unterdrückt, wohingegen mit MSC ein leichter Expressionsanstieg der myeloiden Marker CD13 und CD33 in der Zellpopulation mit mehr als 8 Zellteilungen nachgewiesen wurde.

Diese Beobachtung stimmt mit vorangegangenen Studien überein, die demonstrieren, dass die Differenzierung von mit humanen MSC kokultivierten Zellen sich eher in die myeloide Richtung verschiebt (da Silva et al., 2005; Goncalves et al., 2006). Das allgemeine Leukozytenantigen CD45 war in Zellpopulationen mit mehr als 8 Zellteilungen immer hochreguliert, wohingegen keine positiven Signale für den NK-Zell Marker CD56 detektiert werden konnten. Die Expression von CD133 nahm nach mehr als 6 Zellteilungen allmählich in Übereinstimmung mit CD34 ab, jedoch wurde die Expression von CD133 unter Kulturbedingungen mit d8-Serum über mehr Zellteilungen aufrecht erhalten. Diese Beobachtungen belegen erneut, dass Serum in neutropenen Patienten die Vermehrung der HPC anregt und gleichzeitig einen primitiven Immunphänotyp über mehr Zellteilungen aufrecht erhält. Neueste Daten zeigen, dass CD133 mit zunehmender Differenzierung von HPC exosomal aus den Zellen geschleust wird und diese exosomalen CD133 enthaltenden

Partikel von MSC aufgenommen werden, wo CD133 möglicherweise eine Signalfunktion besitzt (Corbeil et al., 2010).

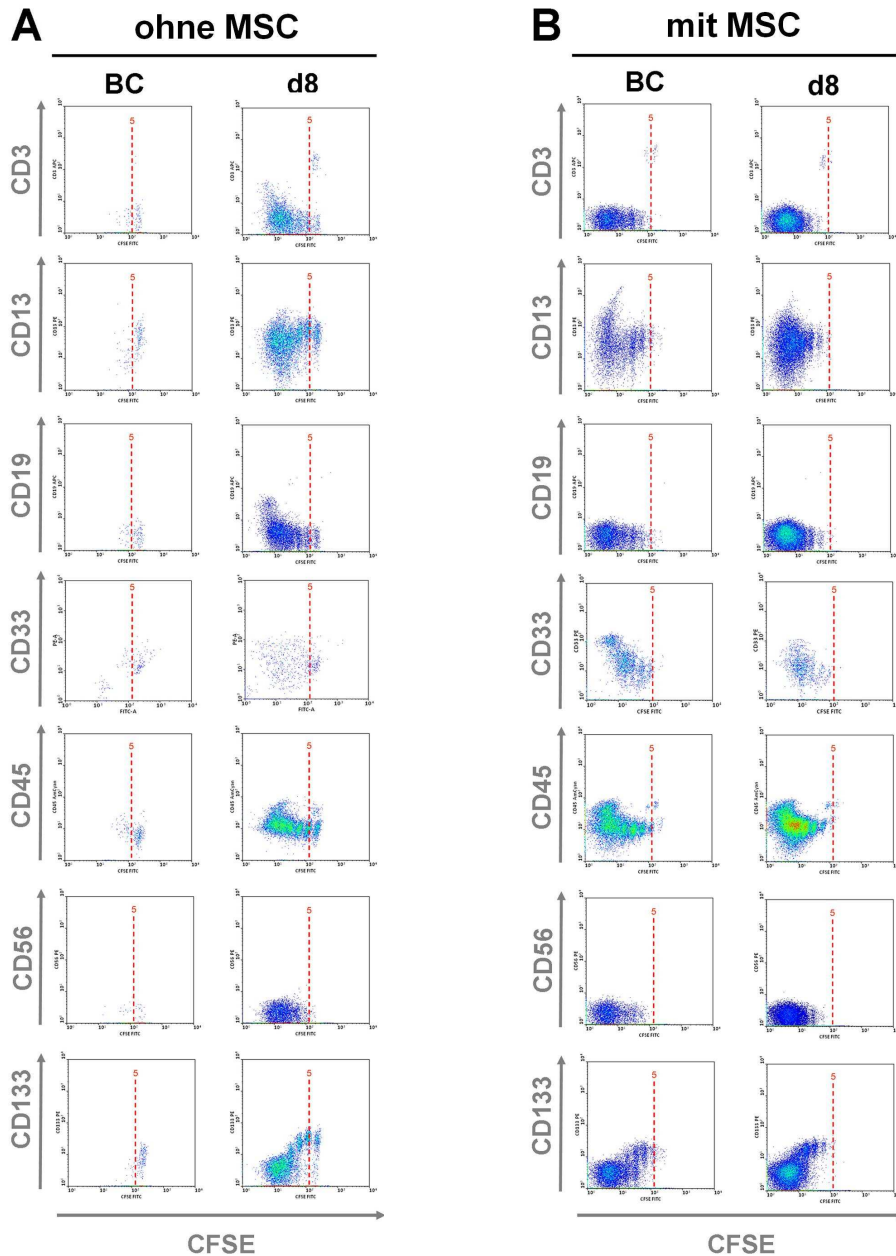


Abbildung 19: Analyse der Expression linienspezifischer Marker. CD34⁺ HPC wurden mit CFSE gefärbt und für 7 Tage entweder ohne Stroma (A) oder mit MSC (B) in StemSpan Medium kultiviert, welches mit 10 % BC-Serum oder d8-Serum versetzt war. Dann wurde die Expression von CD3, CD13, CD19, CD33, CD45, CD56 und CD133 durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentative DichtepLOTS von 4 je im Duplikat analysierten Patientenseren sind dargestellt (Walenda et al., 2011a).

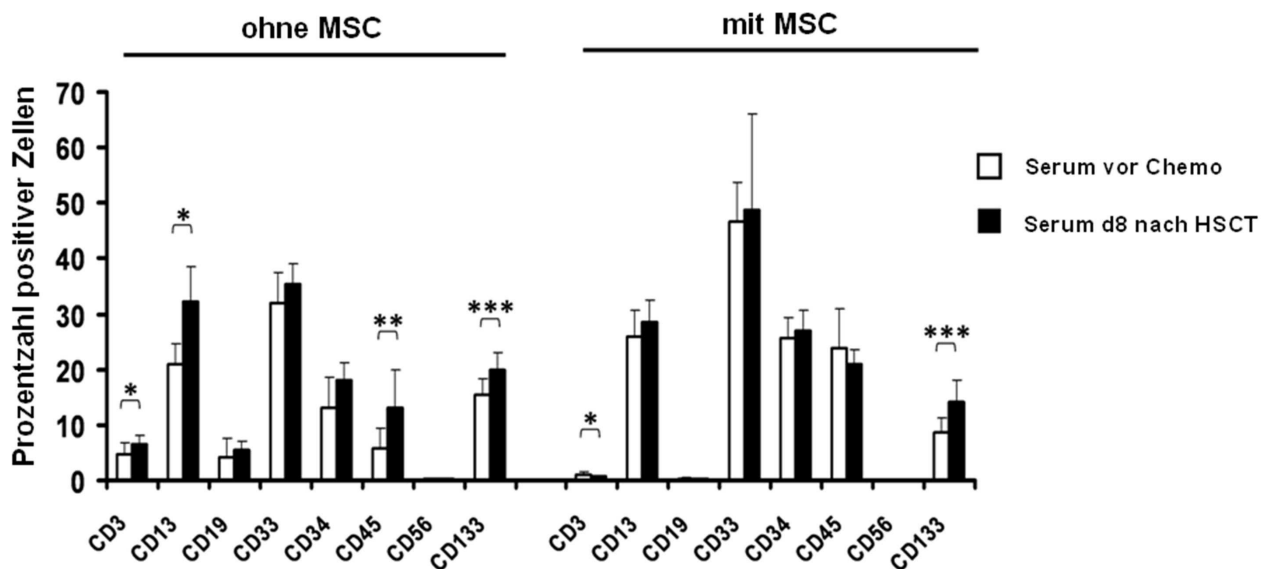


Abbildung 20: Quantitative Analyse von linienspezifischen Markern. Der jeweils prozentuale Anteil an positiven Zellen für CD3, CD13, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56 und CD133 wurde nach 7 Tagen Expansion ohne oder mit MSC in Medium mit 10 % BC- oder d8-Serum untersucht (Darstellung von Mittelwert und SD von 6 jeweils doppelt analysierten Patientenserenproben; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) (Walenda et al., 2011a).

3.3.5 Chemokinprofile der Serumproben

Da für die bisher beobachteten Effekte vermutlich Chemokine im Serum nach HSCT verantwortlich sind, wurde zu deren Identifikation die Zusammensetzung von 174 Zytokinen in den Serumproben mittels humaner Zytokin-Antikörper-Arrays untersucht (Abbildung 21). Es wurden die Chemokinprofile in Serumproben von 6 Patienten vor Beginn der Chemotherapie und d8 nach HSCT verglichen (Abbildung 20). Unerwarteter Weise ergab ein paarweiser Vergleich signifikante Herunterregulationen von 8 Proteinen in d8-Serum. Dazu zählten PDGF-AA ($p = 0,009$), PDGF-AB ($p = 0,048$), PDGF-BB ($p = 0,023$), Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9; $p = 0,036$), Leukozyten Alkalische Phosphatase (LAP; $p = 0,048$), L-Selektin ($p = 0,036$), Leukämie Inhibierender Faktor (LIF; $p = 0,009$) und Chemokin [C-X-C Motiv] Ligand 10 (CXCL10 oder IP-10; $p = 0,006$). Der einzige leichte Anstieg in der Chemokinkonzentration in d8-Serum wurde für das Monozyten-Chemotaktische Protein-1 (MCP-1; $p = 0,048$) detektiert. Zusätzlich wurden Proben eines Patienten zu zusätzlichen Zeitpunkten analysiert. Dies war Patient Nr. 3: BC, d4, d8, d11, d14 und d21 nach HSCT. Die Untersuchung einer solchen Kinetik ergab, dass die allgemeine Zytokinexpression in der Phase der Neutropenie vermindert wird und 18 Tage nach HSCT wieder zurückkehrt (Abbildung 22).

Zytokindetektion (relative Intensität)

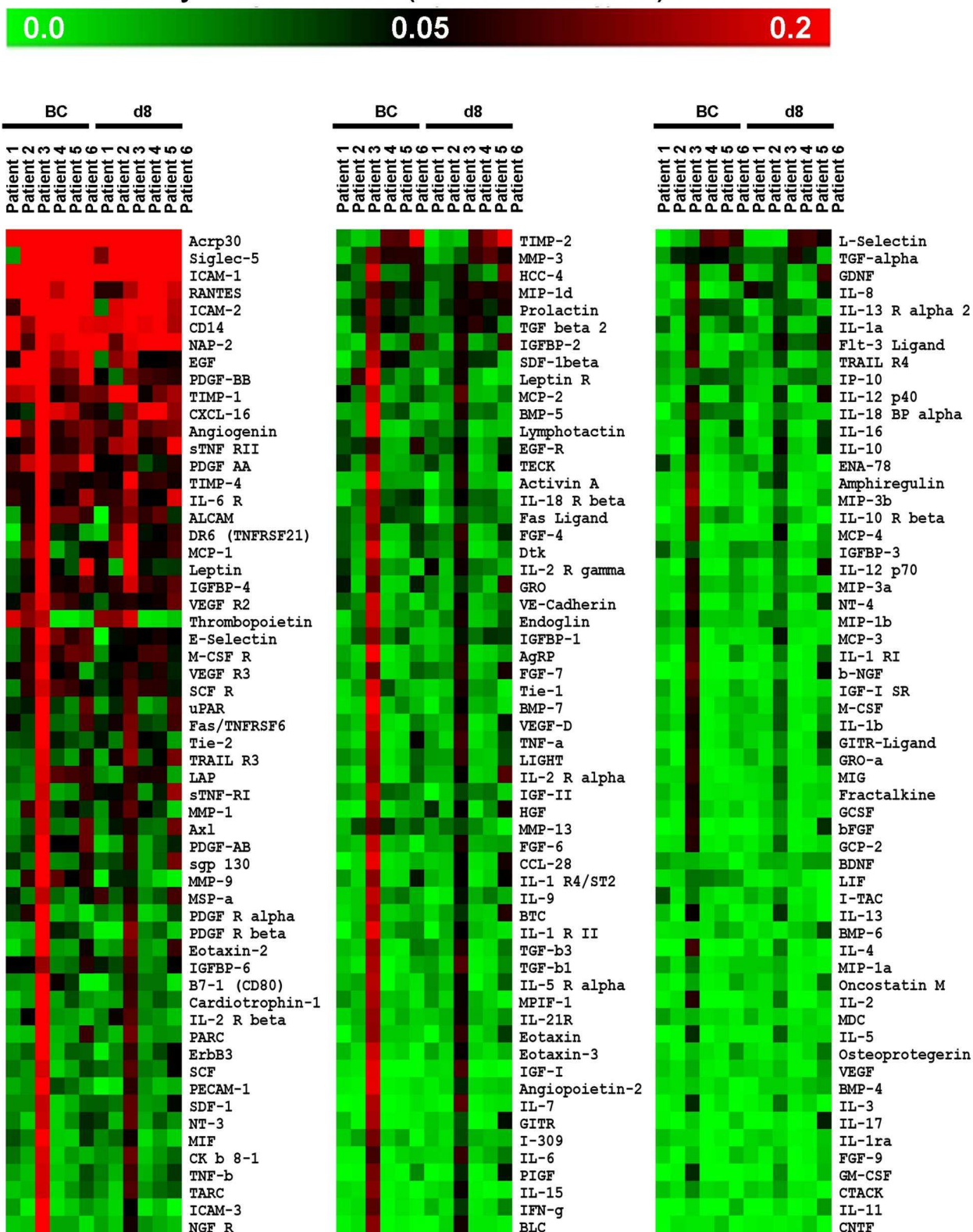


Abbildung 21: Heat Map von allen 174 humanen Proteinen, welche mit dem Zytokin-Antikörper-Array detektiert wurden. Die detektierte Zytokinkonzentration wird über einen Farbwechsel von Rot (hohe Konzentration) über Schwarz zu Grün (niedrige Konzentration) dargestellt (Walenda et al., 2011a).

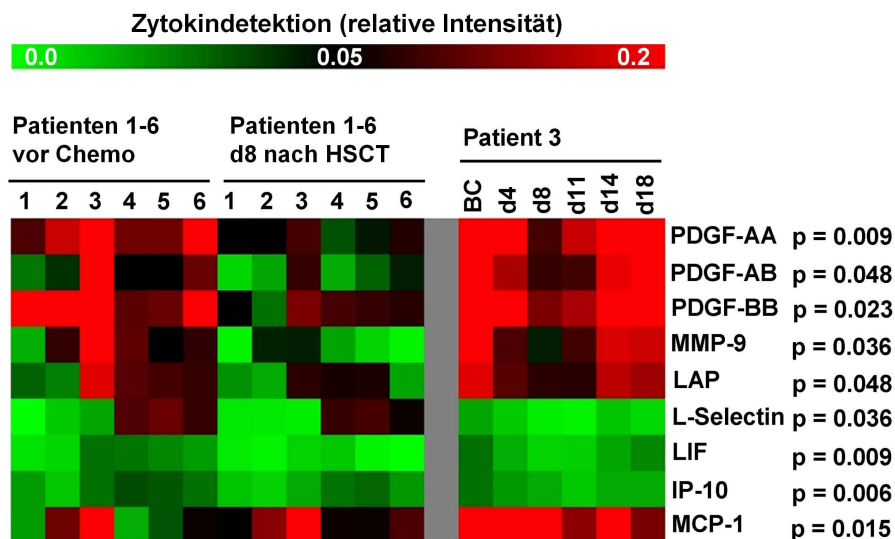


Abbildung 22: Chemokinprofile von Serumproben im Verlauf der Therapie. 174 humane Proteine wurden in Serumproben von 6 Patienten (#1 bis 6) vor Chemotherapie (BC) oder 8 Tage nach HSCT (d8) untersucht. Die Detektionslevel von PDGF-AA, -AB und -BB, sowie MMP-9, LAP, L-Selektin, LIF und IP-10 waren in den Serumproben von vor Chemotherapie signifikant erhöht, wohingegen nur MCP-1 signifikant nach Chemotherapie erhöht war. Der zusätzliche Vergleich der Chemokinlevel eines Patienten zu zusätzlichen Zeitpunkten (BC, d4, d8, d11, d14 und d18) ergab, dass diese Veränderungen in der Zytokinkonzentration vorübergehend während der Aplasiephase auftreten und sich nach hämatopoetischer Rekonstitution normalisieren (Walenda et al., 2011a).

Die Herunterregulation von PDGF in d8-Serum könnte mit geringeren Plättchenzahlen verknüpft sein, was zu dem die Hämatopoese aktivierenden Feedbacksignal beitragen könnte. In dieser Arbeit wurde der Effekt von PDGF auf das HPC *in vitro* Kultursystem untersucht, indem das Basismedium mit 20 ng/mL TPO, 10 ng/mL FGF, 20 ng/mL SCF und jeweils verschiedenen Konzentrationen von PDGF (0, 1, 10 und 100 ng/mL) versetzt wurde. Es zeigte sich, dass die Zugabe von PDGF in den verwendeten Konzentrationen keinen Effekt auf die Proliferation von HPC ohne MSC-Kokultur hatte. Unter Kokultivierung mit MSC führte die Zugabe von 100 ng/mL PDGF zu einer leicht verlangsamten Proliferation der HPC. Daher vergrößerte sich die mittlere CFSE-Intensität aus 7 Versuchen von 12,39 auf 21,44 signifikant (Abbildung 23; $p = 0,03$). PDGF hatte jedoch keinen Einfluss auf die CD34-Expression und auf die Frequenz der koloniebildenden Einheiten.

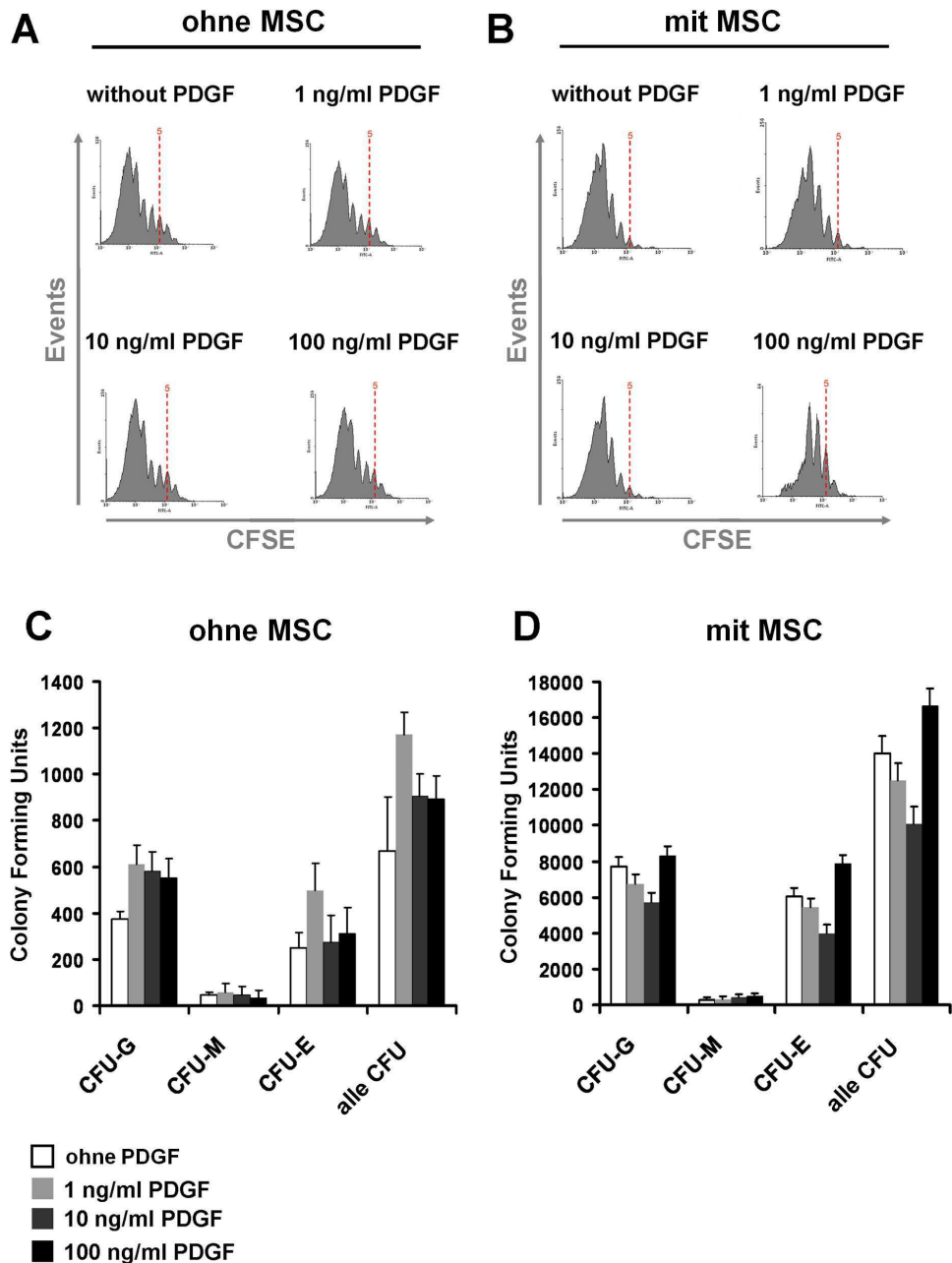


Abbildung 23: Effekte von PDGF auf die *in vitro* Expansion von HPC. CD34⁺ Zellen wurden mit CFSE gefärbt und in S.T.F.-Medium ohne oder mit MSC und verschiedenen Konzentrationen von PDGF für 7 Tage kultiviert. Zugabe von PDGF beeinflusste in den getesteten Konzentrationen nicht die Proliferation von HPC ohne MSC (A), wohingegen Zugabe von 100 ng/mL PDGF die Zellteilungen der HPC unter Kokulturbedingungen verringerte (B; n = 4). Die CFU-Frequenz wurde in den getesteten Konzentrationen nicht konsistent von PDGF beeinflusst (C, D; n = 4, Fehlerbalken repräsentieren die SD) (Walenda et al., 2011a).

Als nächstes wurde untersucht, ob die Heraufregulation von MCP-1 für den stimulierenden Effekt auf die HPC verantwortlich ist. Dazu wurden CD34⁺ Zellen entweder in Medium mit 10 % BC-Serum oder mit den zuvor beschriebenen Konzentrationen TPO, FGF und FGF kultiviert. Diese Medien wurden verschiedenen Konzentrationen von MCP-1 versetzt (0, 1, 10 und 100 ng/mL). Insgesamt zeigte sich jedoch, dass Zugabe von MCP-1 in den getesteten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Proliferation und CD34 Expression von HPC mit oder ohne MSC-Kokultur hat (Abbildung 24).

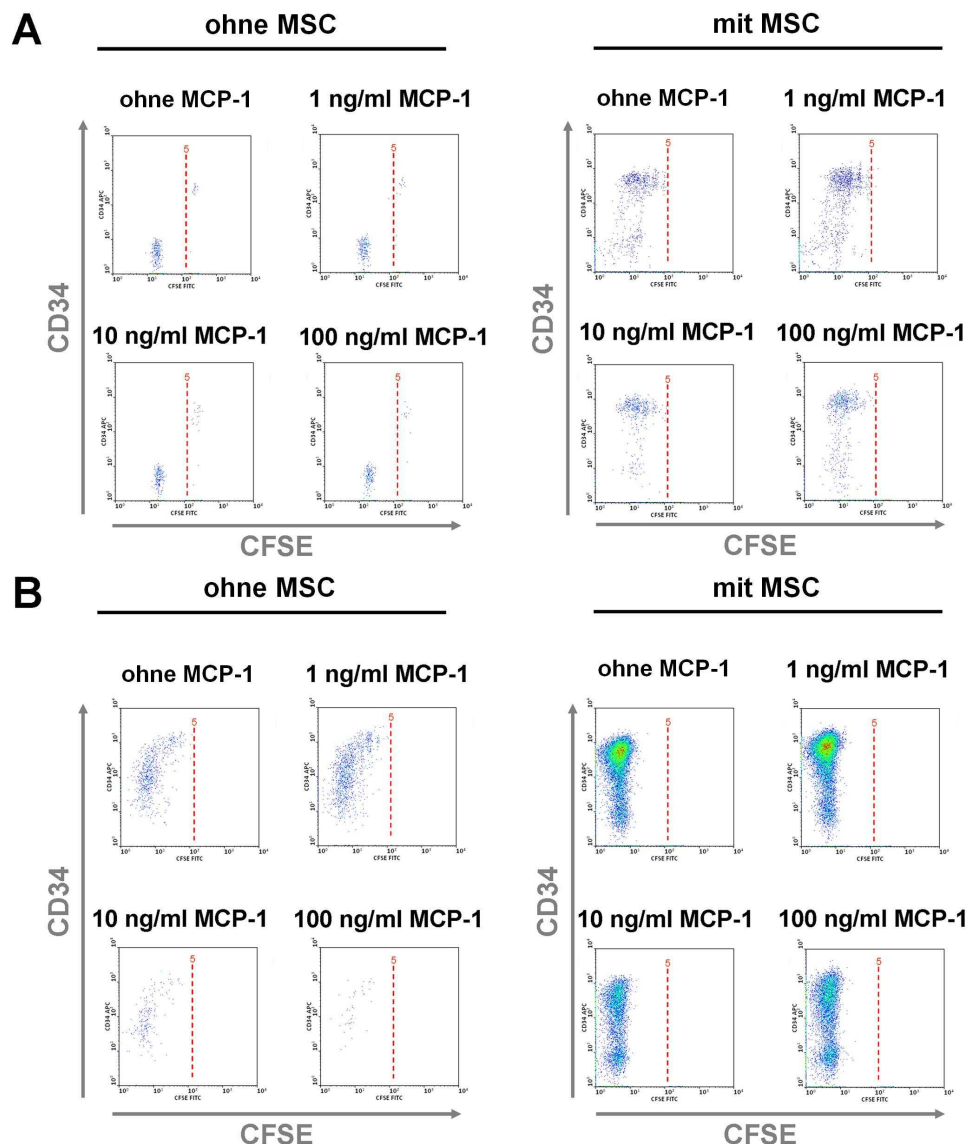


Abbildung 24: Effekte von MCP-1 auf die *in vitro* Expansion von HPC. CD34⁺ Zellen wurden mit CFSE gefärbt und für 7 Tage ohne oder mit MSC in StemSpan Medium kultiviert, das entweder mit 10 % BC-Serum (A) oder mit SCF, TPO und FGF (B) in den zuvor beschriebenen Konzentrationen versetzt wurde. Zusätzliche Zugabe von MCP-1 beeinflusste in den getesteten Konzentrationen nicht die Proliferation oder die CD34-Expression von HPC (Walenda et al., 2011a).

4 Diskussion

4.1 Analyse des Einflusses von Kokultur und bestimmter Proteine auf die *in vitro* Expansion von HPC

In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, welche Faktoren eine *in vitro* Expansion von HPC ermöglichen und ob die Expansion durch gezielte Manipulationen stimuliert werden kann. Besseres Verständnis der Aufrechterhaltung der Hämatopoese, die durch Faktoren wie Zytokine und Zell-Zell Interaktionen in der Stammzellnische im Knochenmark reguliert wird, ist für eine Etablierung zuverlässiger und klinisch applizierbarer Nabelschnurblutexpansionsstrategien unerlässlich. Eine erfolgreiche Expansion von HPC ist insbesondere wichtig, um die Zellzahlen für autologe oder allogene Transplantate zu erhöhen. Es ist jedoch notwendig, dass die Zellen durch die Expansion nicht ihre primitiven Eigenschaften verlieren und sich das Potential der Multipotenz bewahren. Die Daten dieser Arbeit belegen, dass Kokultur von HPC mit MSC-Feederzellen die Proliferation der HPC aktiviert und gleichzeitig einen primitiven Immunphänotyp über eine höhere Anzahl an Zellteilungen aufrecht erhält. Dies stellt einen wichtigen Schritt zur Bewahrung der Multipotenz dar. Neben der Beteiligung bestimmter Proteine wie der MAPK1, N-Cadherin und VCAM1 wird die Proliferation der HPC dabei besonders durch MSC höherer Passagen angeregt. Im Gegensatz dazu unterstützen MSC niedrigerer Passagen eher die Aufrechterhaltung eines primitiveren HPC Immunphänotyps, was außerdem durch MAPK1, ITGB1 und CD44 unterstützt wird (Tabelle 8).

Eine Anreicherung von HPC mit elongiertem Phänotyp in der langsamteilenden Zellfraktion wurde bereits zuvor anhand der PKH26-Färbemethode beschrieben (Wagner et al., 2004). In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse mittels der CFSE-Färbemethode bestätigt. Dabei ist die Beobachtung interessant, dass das Verhältnis von elongierten Zellen in der schnellteilenden im Vergleich zu der langsamteilenden Zellfraktion unter Kokulturbedingungen umgekehrt war. Die Mehrzahl der HPC ist unter Kokulturbedingungen polarisiert. Während das Lamellipodium an der Zellfront lokalisiert ist, befindet sich der Uropod am hinteren Zellende und ist für die Zell-Zell-Adhäsion wichtig (Wagner et al., 2005a; Freund et al., 2006; Wagner et al., 2007a; Fonseca et al., 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Möglichkeit offen, ob die morphologischen Veränderungen entweder durch Kokultur mit MSC verursacht oder zellintrinsisch determiniert werden. Eine Induktion eines elongierten Phänotyps durch Kokultur sollte sowohl die schnellteilende als auch die langsamteilende Zellfraktion beinhalten. Für das Auftreten von mehr elongierten Zellen unter Kokulturbedingungen könnte auch von MSC sezerniertes SDF-1 α verantwortlich sein, da demonstriert wurde, dass SDF-

1 α die Podienformation in leukämischen Zellen und HPC stimuliert (Fruehauf et al., 2002; Tavor et al., 2005; Faber et al., 2007). Wenn angenommen wird, dass eine polarisiertere Morphologie mit einhergehenden Zellteilungen auf die Tochterzellen vererbt wird und einen Subtyp von primitiven HPC charakterisiert, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass elongierte HPC durch MSC bevorzugt in eine schnellteilende Zellfraktion rekrutiert werden.

Tabelle 8: Effekte von MSC und bestimmten Proteinen auf die *in vitro* Expansion von HPC.

	Proliferation	Prozentsatz an primitiven Zellen (CD34 ⁺ / CD38 ⁻)	Differenzierung verschoben zu höheren Zellteilungen
MSC früher Passage	-	+	+
MSC später Passage	+	-	-
MAPK1 Inhibitor PD098059	-	+	-
MAPK1 – siRNA	-	+	NA
ITGB1 – siRNA	kein Effekt	+	+
CD44 – siRNA	kein Effekt	+	+
N-CDH – siRNA	-	kein Effekt	kein Effekt
CDH11 – siRNA	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt
Jagged1 – siRNA	kein Effekt	+	NA
VCAM1 – siRNA	-	kein Effekt	NA

Die Auswirkungen der replikativen MSC-Seneszenz, Behandlung mit dem MAPK-Inhibitor PD098059 oder Herunterregulation bestimmter Proteine durch siRNA in MSC wurden im Hinblick auf ihr die Hämatopoese unterstützendes Potential untersucht. Die beobachteten Einflüsse auf Proliferation, den Prozentsatz an CD34⁺ und CD34⁺ CD38⁻ Zellen und die Aufrechterhaltung des primitiven Immunphänotyps über mehr Zellteilungen wurden zusammengefasst (+ = positiver Effekt, - = negativer Effekt, NA = nicht analysiert) (Walenda et al., 2010).

Als ein zentrales Element zur simultanen Analyse von Zellteilungen und Immunphänotyp der HPC wurde in dieser Arbeit die CFSE-Färbungsmethode verwendet. Ein entscheidender Vorteil dieser Färbemethode ist, dass CFSE intrazellulär an Proteinreste bindet und so das Zytoplasma sehr gleichmäßig anfärbt. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen auf beide Tochterzellen verteilt, was die Fluoreszenzintensität halbiert. So können mittels dieser Methode zwei Erfordernisse in Kombination untersucht werden, welche zur Kulturexpansion von HPC benötigt werden. Zum einen ist dies eine Aktivierung der Proliferation und zum anderen die Aufrechterhaltung primitiver Eigenschaften auch nach einigen Zellteilungen. Dieses wurde oftmals als ein Widerspruch in sich betrachtet, da eine *in*

vitro Expansion von HPC gewöhnlich mit einem Verlust der Stammzeleigenschaften einhergeht ist (Lyons und Parish, 1994; Oostendorp et al., 2000; Gotze et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen unter anderem dazu bei, eine *in vitro* Expansion von HPC bei gleichzeitigem Erhalt der Stammzeleigenschaften gezielt zu optimieren.

Die Beobachtung, dass langsamteilende HPC einen primitiveren Immunphänotyp beibehalten, stimmt mit dem allgemeinen Befund überein, dass *in vitro* Proliferation von HPC gewöhnlich mit Differenzierung assoziiert ist. Dieser Verlust an CD34- und CD133-Expression mit einhergehender Differenzierung wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Ruzicka et al., 2004; Gotze et al., 2007; Ko et al., 2007). CD38 wird vorübergehend mit einhergehender Proliferation hochreguliert. Unter Kokulturbedingungen mit MSC behält die HPC-Fraktion CD34- und CD133-Expression für mehr Zellteilungen bei und verzögert die Heraufregulation von Differenzierungsmarkern wie CD13, CD38, CD45 und CD56. Außerdem ergaben Untersuchungen der globalen Genexpressionsmuster der LTC-IC, dass sich signifikant mehr langsamteilende HPC in der primitiveren Zellfraktion finden (Wagner et al., 2004). Eine myeloide Differenzierung kokultivierter HPC ist bereits zuvor beschrieben worden (da Silva et al., 2005), und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass diese Differenzierung erst nach einigen Zellteilungen auftritt.

Höhere MSC-Passagen verstärken die Proliferation von HPC, wohingegen niedrigere Passagen eher die Aufrechterhaltung eines primitiven HPC-Immunphänotyps fördern. Letztere erhöhen die absolute Zellzahl und den Prozentsatz an selbsterneuernden HPC und sind somit besser für die Expansion von HPC mit primitiven Eigenschaften geeignet. Diese Beobachtungen können damit erklärt werden, dass durch Langzeitkultivierung und damit verbundener replikativer Seneszenz tiefgehende zellintrinsische Veränderungen wie Verlust der Multipotenz, Expression von seneszenzassoziiierter β -Galactosidase oder Verkürzung der Telomerlänge stattfinden (Fehrer und Lepperdinger, 2005). Die stromale Funktion der MSC wird neben replikativer Seneszenz auch durch die Isolationsmethoden beeinflusst (Wagner et al., 2007a; Wagner et al., 2008b), durch Verwendung einer Methode wird dies jedoch innerhalb dieser Arbeit vergleichbar. Außerdem ist eine kontinuierliche Veränderung des globalen Genexpressionsmusters und mikroRNA-Expression während replikativer Seneszenz in MSC demonstriert worden (Wagner et al., 2008a). Ein Auftreten von replikativer Seneszenz kann bei einer klinischen Nutzung von MSC nicht verhindert werden, da zur Generierung ausreichender Zellzahlen für MSC-Feeder die Zellen eine gewisse Zeit kultiviert werden müssen. Effekte replikativer Seneszenz können jedoch durch die Verwendung möglichst frisch isolierter MSC minimiert werden.

Die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK1) ist ein zentrales Signalmolekül und an einer Vielzahl an Signalwegen beteiligt (Johnson und Lapadat, 2002). Sie spielt in der zellulären Physiologie eine bedeutende Rolle und vermittelt in Prozessen einschließlich des Fortschritts des Zellzyklus und der Differenzierung (Wilkinson und Millar, 2000; Plataniias, 2003). So ist die MAPK1 beispielsweise an neuronaler Transdifferenzierung von pigmentierten Epithelzellen beteiligt (Galy et al., 2002). Im blutbildenden System konnte der MAPK1 ebenfalls eine Vielzahl von Funktionen nachgewiesen werden, so spielt sie eine wichtige Rolle in myeloider (Hsu et al., 2007), megakaryozytärer (Racke et al., 1997) und erythroider Differenzierung (Matsuzaki et al., 2000). Die MAPK1 ist während der Proliferation und am Beginn der Zellliniendifferenzierung von entscheidender Bedeutung. Außerdem wird die MAPK1 durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin, SCF, Interleukin-3 und SDF-1 α aktiviert (Sui et al., 1998; Fuhler et al., 2008). Kürzlich haben Wang und Kollegen demonstriert, dass die Inhibition von p38-MAPK die Expansion von murinen HSC *in vitro* fördert und Aktivität der p38-MAPK *in vitro* die Selbsterneuerung von HSC inhibiert (Wang et al., 2011). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Rolle der MAPK1 in dem etablierten Kokultursystem untersucht. Durch Herunterregulation oder Inhibition der MAPK1 wurde die Proliferation der HPC vermindert. Die Verwendung des synthetischen Inhibitors PD098059 führt dabei zu einer effizienten und spezifischen Verminderung der MAPK-Aktivität durch Inhibierung des die MAPK-aktivierenden Enzyms MEK, ohne die Aktivitäten der homologen Kinasen JNK und p38 zu beeinflussen (Dudley et al., 1995). Bugarski und Kollegen haben systematisch den Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die CFU-Frequenz getestet. Ihre Ergebnisse belegen, dass Inhibierung von verschiedenen Signalenzymen wie Tyrosinkinasen, Jak2/Jak3, Src-Kinasen, p38-MAPK, JNK-MAPK und MAPK1 durch spezifische Inhibitoren konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der CFU-Frequenz vor allem im Bezug auf erythroide Kolonien führt (Bugarski et al., 2007), was wiederum mit der Beobachtung übereinstimmt, dass für die fortschreitende Erythropoese eine synergistische Aktivierung der MAPK1 durch EPO und SCF erforderlich ist (Sui et al., 1998). Diese Arbeiten zeigen deutlich, dass an der Differenzierung und auch an der Aufrechterhaltung eines primitiven Immunphänotyps viele Signalwege beteiligt sind. Eine gezielte und reversible Modifikation der Signalwege könnte das Potential bieten, die *in vitro* Expansion von CD34⁺ HPC weiter zu steigern. In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass die Verminderung der MAPK1-Aktivität einen Einfluss auf die Differenzierung der HPC hat, da die CD34-Expression bei gleicher Anzahl an Zellteilungen im Vergleich zu einer Kontrolle reduziert war und außerdem die Hochregulation von CD38 beeinträchtigt war. Ein ähnlicher Effekt auf die Expression von CD38 wurde bereits in humanen Glattmuskelzellen beschrieben (Tirumurugan et al., 2007). Die simultane Analyse von Proliferation und Immunphänotyp in dieser Arbeit bekräftigt, dass MAPK1 für beides essentiell ist. Ob auf

diese Weise expandierte HPC ein vollständiges repopulierenden Potential *in vivo* besitzen, muss durch weitere Experimente überprüft werden.

HPC sind unter anderem in der Knochenmarknische lokalisiert. Dorthin zeigen sie unter bestimmten Voraussetzungen ein „Homingverhalten“, wenn sie sich im Blut zirkulierend befinden. Von Proteinen wie N-Cadherin, CD44, VCAM1, Jagged1 und Integrinen ist postuliert worden, dass sie an dieser stromalen Funktion der MSC beteiligt sind (Zhang et al., 2003; Avigdor et al., 2004; Bonig et al., 2006; Priestley et al., 2007; Wein et al., 2010). Genexpressionsanalysen an MSC aus Knochenmark, Nabelschnurblut und Fettgewebe im Vergleich zu HS68-Zellen und einer murinen AFT024-Zelllinie verdeutlichten eine Hochregulation von N-Cadherin, Cadherin-11, ITGB1 und VCAM1 insbesondere in MSC-Präparationen aus Knochenmark, welche mit Aufrechterhaltung der Stammzellcharakteristika von HPC assoziiert sind. Außerdem wurde demonstriert, dass Knochenmark-MSC hinsichtlich der Aufrechterhaltung primitiver HPC den anderen Zellpräparationen, insbesondere MSC aus Fettgewebe, deutlich überlegen sind (Wagner et al., 2007a). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Fragestellung erörtert, ob diese Adhäsionsproteine eine entscheidende Rolle bei der MSC-HPC-Interaktion spielen. Es ist vorgeschlagen worden, dass N-Cadherin die Verankerung der HPC in der Nische vermittelt und gleichzeitig die HPC in einem quieszenten Status hält (Arai und Suda, 2007; Haug et al., 2008). Die Ergebnisse in dieser Arbeit belegen, dass N-Cadherin und VCAM1 eher die Proliferation der HPC fördern. Von einigen Autoren ist kontrovers diskutiert worden, ob N-Cadherin überhaupt wichtig für die Zell-Zell-Interaktion in der Knochenmarknische ist oder nicht (Kiel et al., 2007; Kiel et al., 2009). Diese Ergebnisse sind jedoch mit einem murinen Modell generiert worden, weshalb sie vermutlich nicht direkt auf das humane System übertragbar sind. Für diese These spricht, dass unsere Arbeitsgruppe für humane HPC demonstrieren konnte, dass N-Cadherin an der Adhäsion von HPC an MSC beteiligt ist und ein auf diese Weise vermittelter Kontakt an MSC die Aufrechterhaltung von LTC-IC unterstützt (Wein et al., 2010).

Unerwarteter Weise resultierte die Herunterregulation von ITGB1 und CD44 nach *in vitro* Expansion in einer signifikant höheren Fraktion an CD34⁺ CD38⁻ Zellen, aber es konnte kein Einfluss auf die LTC-IC-Frequenz oder die Zellvermehrung festgestellt werden. Vor kurzem hat eine Studie demonstriert, dass durch eine *in vitro* Kokultivierung von CD34⁺ HPC mit verschiedenen ECM-Proteinen zwar die Zellviabilität, aber keine Verbesserung in der Expansion erzielt werden konnte. Durch Kokultur mit Fibronektin wurde die Erythropoese inhibiert. Außerdem führte Kokultur mit MSC, wie auch in dieser Arbeit beobachtet, zu einer Verstärkung der HPC-Viabilität und der Proliferation, auch wenn unter diesen Bedingungen die myeloide Differenzierung begünstigt wurde (Lazar-Karsten et al., 2011). Dies

verdeutlicht, dass die Proliferation und Expansion von HPC durch viele Faktoren koreguliert werden und kleine Veränderungen in der Komposition der Stammzellnische weitreichende Mechanismen wie das zukünftige Zellschicksal beeinflussen. Übereinstimmend hat eine Vielzahl von Studien verdeutlicht, dass an die ECM bindende Proteine wie ITGB1 und CD44 am Prozess des Homings beteiligt sind (Papayannopoulou und Nakamoto, 1993; Avigdor et al., 2004; Wagner et al., 2007b; Gottschling et al., 2007). Außerdem ist CD44 für das Auftreten von lymphoiden und myeloiden Zellen im Knochenmark entscheidend (Miyake et al., 1990; Khaldoyanidi et al., 1996; Rosel et al., 1999) und verstärkt durch Bindung an Hyaluronsäure die Proliferation von CD34⁺ HPC *in vitro* (Hamann et al., 1995). Für ITGB1 wurde, besonders in Assoziation mit Integrin- α -4, analog dazu eine entscheidende Beteiligung bei der hämatopoetischen Differenzierung *in vitro* demonstriert (Miyake et al., 1991; Eshghi et al., 2007), und es gibt Hinweise darauf, dass dieser Effekt durch die MAPK1 vermittelt wird (Kapur et al., 2001). ITGB1 vermittelter Kontakt von HPC mit MSC erhöht die Selbsterneuerungsrate und die Aufrechterhaltung von LTC-IC (Gottschling et al., 2007), und in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von ITGB1 und CD44 in stromalen Zellen auch eine Rolle in der Differenzierung der HPC spielt.

Zusammengenommen könnte dieses Wissen für zukünftige Expansionsstrategien nutzbar gemacht werden, indem z.B. für eine Expansion von HPC mit primitiven Eigenschaften vorzugsweise MSC einer niedrigeren Passage als Feederzellen benutzt werden. Die Beobachtung, dass der Immunphänotyp der HPC durch gezielte Modifikationen der Feederzellen beeinflusst wird, könnte ein Schlüssel zur Optimierung der Kulturbedingungen sein. Bereits im Jahr 2006 berichteten Yue Zhang und Kollegen von einem dreidimensionalen *in vitro* Kokultursystem, in welchem sich MSC in einem gewobenen Fasernetz befanden und zusammen mit humanen HPC expandiert wurden. Diese dreidimensionale Kokultur war einem zweidimensionalen herkömmlichen Kokultursystem in der Ausbeute an primitiven HPC überlegen (Zhang et al., 2006b). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein direkter und von allen Seiten stattfindender Kontakt von MSC zu HPC wichtig für die Expansion primitiver Zellen ist. In weiterführenden Forschungsvorhaben könnten die Erkenntnisse dieser Arbeit in dreidimensionalen Kokultursystemen überprüft werden. Während einer zweidimensionalen Kokultur lässt bereits die Position der HPC Rückschlüsse auf deren Stammzellcharakteristika zu. Die HPC, welche unter die adhärennten MSC migrieren, weisen auch die primitivsten Eigenschaften auf, was von der Arbeitsgruppe um Rainer Ordemann demonstriert wurde (Alakel et al., 2009; Jing et al., 2010). Nach diesen Ergebnissen könnte die Beobachtung, dass die Herunterregulation bestimmter Adhäsionsproteine in einer größeren primitiven Zellfraktion nach Expansion resultiert, auch dahingegen interpretiert werden, dass durch das Fehlen eines Typs von Adhäsionsproteinen

eine Möglichkeit zu einem dichteren MSC-HPC-Kontakt gegeben wird. Aus diesem Grund müsste in zukünftigen Experimenten untersucht werden, ob beispielsweise eine parallele Herunterregulation von zwei oder mehr Adhäsionsproteinen in den MSC einen verstärkenden oder gegenteiligen Effekt wie eine einzelne Herunterregulation hat.

4.2 Systematischer Einsatz verschiedener Wachstumsfaktoren und Optimierung der *in vitro* Expansionsbedingungen

In dieser Arbeit wird ein systematischer Vergleich von 20 verschiedenen Kultivierungsbedingungen beschrieben, um eine *in vitro* Expansion von HPC weitergehend zu optimieren. Der unterstützende Einfluss auf die Aufrechterhaltung und Proliferation der HPC von Zytokinen einschließlich SCF, TPO, FGF, ANGPTL5 und IGFBP2 einerseits (de Haan G. et al., 2003; Levac et al., 2005; Robinson et al., 2005; Zhang et al., 2008; Andrade et al., 2010) und MSC auf der anderen Seite (Li et al., 2007; Wagner et al., 2007a; Wagner et al., 2007c; Battiwalla und Hematti, 2009; Weisel et al., 2009; Mendez-Ferrer et al., 2010; Mishima et al., 2010) ist bisher gut beschrieben worden. Allerdings ist nur wenig bekannt, wie spezifische Zytokine mit MSC interagieren. Von TPO ist beispielsweise bekannt, dass es in der humanen Hämatopoese zwei wichtige Aufgaben erfüllt. Zum einen ist dies die Aufrechterhaltung primitiver HPC und zum anderen die Expansion von HPC in Zeiten hämatopoetischen Stresses etwa nach Chemotherapie (de Graaf und Metcalf, 2011). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass insbesondere die Kombination von SCF, TPO und FGF zusammen mit MSC die Vermehrung, Aufrechterhaltung eines primitiven Immunphänotyps und Expansion von CFU-initiierenden Zellen stimuliert. Das geht mit der Beobachtung einher, dass eine Expansion von HPC eine komplexe Stimulation verschiedener Signalkaskaden durch lösliche Wachstumsfaktoren sowie Adhäsionsproteinen benötigt (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003; Wilson und Trumpp, 2006; Wein et al., 2010).

Generell muss für eine *in vitro* Expansion von HPC bedacht werden, dass MSC heterogene Zellpopulationen sind und verschiedene Subpopulationen von Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungspotential beherbergen, was auch unterschiedlichen Einfluss auf HPC haben kann (Wagner und Ho, 2007; Ho et al., 2008). So konnte demonstriert werden, dass MSC aus Knochenmark besser für eine *in vitro* Expansion von HPC geeignet sind als MSC aus Fettgewebe (Wagner et al., 2007a). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Kokultivierung von HPC mit MSC aus Knochenmark prinzipiell ein wertvoller Ansatz zur HPC-Expansion ist. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass eine lange Kultivierung die stromale Funktion der MSC beeinflusst, wurden nur MSC von der dritten bis zur sechsten Passage zur Aussaat als

Feeder benutzt (Wagner et al., 2010). Zur weiteren Optimierung einer *in vitro* Expansion von HPC wird neben einer Kokultivierung mit MSC auch das Zellkulturmedium als ein bedeutender Faktor mit großem Einfluss angesehen (Wagner et al., 2006). Dieses ist aber auch für die Präexpansion von MSC von Bedeutung, bevor sie als Feeder für eine Kokultur ausgesät werden. In diesem Teil der Arbeit wurden MSC benutzt, welche in 10 % humanem Plättchenlysat anstatt FCS präkultiviert wurden. Dies bietet den Vorteil xenogenfreier Zellkulturbedingungen (Schallmoser et al., 2007; Horn et al., 2010), und die gewonnenen Daten belegen die Eignung von in HPL präexpandierten MSC als unterstützende Feederzellen. Außerdem stehen die gewonnenen Daten in einer Reihe mit der Observation, dass HPL-MSC in der Verstärkung der Proliferation von $CD34^+$ und $CD34^+ CD38^-$ HPC gegenüber FCS-MSC leicht überlegen sind (Reinisch et al., 2009).

Vor mehr als zwei Jahren haben Zhang und Kollegen ein Kulturmedium mit den fünf Faktoren SCF, TPO, FGF, ANGPTL5 und IGFBP2 (S.T.F.A.I.-Medium) beschrieben, welches ohne Kokultur eine annäherungsweise 20-fache Nettoexpansion von repopulierenden humanen CB-HPC ermöglicht. Sie konnten jedoch keine signifikante Stimulation der Proliferation von HPC in S.T.F.-Medium beobachten (Zhang et al., 2006a; Zhang et al., 2008), was mit den Beobachtungen dieser Arbeit übereinstimmt. ANGPTL5 und IGFBP2 beeinflussten nicht die Aufrechterhaltung eines primitiven Immunphänotyps und zeigten nur moderate Effekte auf die Expansion von CFU-initiierenden Zellen. Interessanterweise führte in dieser Arbeit die Expansion von $CD34^+$ Zellen in S.T.F.A.I.-Medium verglichen mit nicht präexpandierten HPC nicht zu einer erhöhten SCID-repopulierenden Aktivität. Dies war unerwartet, weil höhere Niveaus von Chimerismen mit unter S.T.F.A.I.-Bedingungen präexpandierten HPC im Vergleich zu nicht expandierten Zellen bereits erzielt wurden (Zhang et al., 2008). Vor kurzer Zeit ist ein weiterer Artikel publiziert worden, in dem eine 60-fache Expansion von NOD/SCID-repopulierenden HPC nach Kokultivierung mit MSC erzielt wurde, welche nach genetischer Modifikation ANGPTL5 sezernieren (Khoury et al., 2011). In dieser Studie könnte die Konzentration an lentiviral exprimiertem ANGPTL5 über der Konzentration liegen, welche in dieser Arbeit benutzt wurde. Zudem benutzten Khoury und Kollegen ein anderes Transplantationssystem mit neugeborenen Mäusen. Aus diesem Grund könnten Diskrepanzen zwischen diesen Ergebnissen und den Resultaten aus dieser Arbeit an Unterschieden in der Zellpräparation, der Aktivität der Wachstumsfaktoren in verschiedenen Chargen, den Mausstämmen und dem Transplantationsaufbau liegen. Das verdeutlicht die enorme Wichtigkeit einer sorgfältigen Abwägung aller Parameter von Zellkulturexpansionsstudien. In den NOD/SCID-Experimenten dieser Arbeit wurden initial 50.000 $CD34^+$ Zellen anstatt 15.000 Zellen transplantiert. Es ist vorstellbar, dass niedrigere initiale Zellzahlen bei der Transplantation oder längere Präexpansionen wie 11 statt 7 Tage

in einem besseren hämatopoetischen Anwachsen resultieren. Das NOD/SCID-Transplantationsmodell könnte ebenso für eine weiterreichende Analyse des multilinearen Differenzierungspotentials einschließlich erythroider und megakaryozytärer Differenzierung benutzt werden (Andre et al., 2010). Zudem existieren Hinweise, dass eine Kotransplantation von HPC und MSC das hämatopoetische Anwachsen insbesondere der megakaryozytären Linie fördert (Liu et al., 2011). Andererseits verstärkt eine HPC-Expansion auf MSC mit Zugabe von Zytokinen im Vergleich zu ohne MSC präexpandierten HPC signifikant den Chimerismus, was die Hypothese stärkt, dass Zytokine und MSC synergistisch agieren und zusammen zum Erhalt von SCID-repopulierenden HPC *in vitro* beitragen. Es bleibt in diesen Versuchen jedoch unklar, ob die langzeitrepopulierenden HPC auch das Potential besitzen, *in vivo* in alle Blutzelltypen zu differenzieren.

Um die Sicherheit und Effizienz von *in vitro* Nabelschnurblutexpansionen zu untersuchen, werden letztendlich klinische Studien benötigt. Shpall und Kollegen haben bereits beschrieben, dass eine *in vitro* Expansion von CD34⁺ Zellen durchführbar ist (Shpall et al., 2002; Kelly et al., 2009). Kürzlich hat eine Studie demonstriert, dass immobilisierte Formen des Notch-Liganden δ -1 zusammen mit den Zytokinen SCF, TPO, Flt3-Ligand, IL-3 und IL-6 die *in vitro* Expansion von HPC stimuliert. Dazu verdeutlichte eine kleine klinische Studie, dass in Patienten, welchen präexpandierte HPC transplantiert wurden, das Anwachsen im Median nach 16 Tagen vollzogen war, wohingegen das Anwachsen nach Transplantation von unmanipulierten HPC im Median erst nach 26 Tagen geschah (Delaney et al., 2010). Diese Ergebnisse legen nahe, dass expandiertes Nabelschnurblut kurzzeitig repopulierende HPC hervorbringt, welche eine schnellere Rekonstitution des hämatopoetischen Systems nach Transplantation von einer doppelten Nabelschnurbluteinheit ermöglichen. Im Jahr 2007 startete eine klinische Studie am "M.D. Anderson Cancer Center" in Houston, USA, um zu analysieren, ob eine kombinierte Applikation von einer mit Spender-MSC expandierten und einer unmanipulierten Nabelschnurbluteinheit besseres Anwachsen ermöglicht (www.ClinicalTrials.gov: NCT00498316, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, USA). Andere Studien untersuchen Nabelschnurbluttransplantationen zusammen mit einer Koinfusion von MSC, um das Anwachsen, die hämatopoetische Rekonstitution und die Überlebensrate zu steigern. Diese Studien dauern derzeit noch an (NCT01092026, NCT01045382 und NCT00823316).

4.3 Serum nach autologer Transplantation stimuliert die Proliferation und Expansion von HPC während *in vitro* Kultivierung

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse demonstrieren, dass systemisch sezernierte Faktoren die Regenerationsprozesse nach durch Chemotherapie induzierter Myelosuppression vermitteln. Normalerweise sind HPC quieszent in der Stammzellnische lokalisiert und werden erst durch hämatopoetischen Stress rekrutiert und in die Proliferation getrieben (Wilson et al., 2008). Im Fall einer HSCT ergibt die Nachkommenschaft von initial 2×10^8 CD34⁺ Zellen eine Leukozytenzahl von etwa 3×10^{10} im Peripherblut. Aus diesem Grund muss binnen zwei Wochen ein mehr als hundertfacher Anstieg der Zellzahlen bewerkstelligt werden (Marciniak-Czochra et al., 2009). Es existieren Hinweise darauf, dass höhere Zahlen von CD34⁺ Zellen im Transplantat die hämatopoetische Rekonstitution verstärken, obwohl andererseits eine Stimulation der Stammzellfunktionen nach HSCT wenigstens gleichberechtigt erscheint (Olivieri et al., 1998; Klaus et al., 2007; Wang et al., 2007). Trotzdem erscheint es vor diesem Hintergrund sinnvoll, eine gezielte Optimierung der *in vitro* Expansion von CD34⁺ HPC für Transplantate anzustreben.

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass der Verlust von CD34-Expression und die maximale Hochregulation von CD38 mit d8-Serum zu einer höheren Anzahl an Zellteilungen verschoben waren. Überdies verstärkten diese Serumproben von Tag 8 nach HSCT signifikant die CFU- und die CAFC-Frequenz. Dabei ist anzumerken, dass sieben der neun Patienten, von denen Serumproben bezogen wurden, G-CSF für eine beschleunigte hämatopoetische Rekonstitution nach HSCT erhalten haben, was die beobachteten Ergebnisse beeinflusst haben könnte. Allerdings wurden die gleichen Effekte in dieser Arbeit auch mit Serum beobachtet, welches aus zwei Patienten ohne G-CSF-Applikation oder aus Patienten vor der ersten G-CSF-Applikation stammte. Außerdem waren die Niveaus von G-CSF in den Serumproben zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahmen sehr niedrig, da sie nicht durch die Zytokinanalysen per Antikörpermembranen detektiert wurden. Aus diesem Grund kann der stimulatorische Effekt auf die Hämatopoese anderen aktivierenden Molekülen zugeschrieben werden. Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass Prozesse stattfinden, die zur hämatopoetischen Rekonstitution führen. Bestimmte Faktoren, welche im Körper vermutlich gebildet und sezerniert werden, stimulieren gezielt die Hämatopoese. Dieses Wissen kann auch zur Optimierung der Expansion von HPC verwendet werden.

Für die Regulation der Hämatopoese in der aus verschiedenen Zelltypen bestehenden Stammzellnische im Knochenmark wird angenommen, dass sie durch ein Zusammenspiel

von Wachstumsfaktoren, Proteinen der ECM, dem Sauerstoffpartialdruck und verschiedenen Adhäsionsproteinen reguliert wird (Prosper und Verfaillie, 2001; Wilson und Trumpp, 2006; Ho und Wagner, 2007; Wagner et al., 2008b). Die Kokultivierungen von HPC mit MSC ergaben, dass der direkte Zell-Zell-Kontakt mit den stromalen Zellen in hohem Maß die HPC-Proliferation und Aufrechterhaltung von Markern, welche für primitive Eigenschaften der HPC stehen, verstärkte. Zudem wurde unter anderem in dieser Arbeit demonstriert, dass verschiedene Adhäsionsproteine in diesem Prozess involviert sind (Zhang et al., 2003; Wagner et al., 2007a; Mendez-Ferrer et al., 2010; Wein et al., 2010). Zusätzlich wurde in einer Vielzahl an Studien die Wichtigkeit von Wachstumsfaktoren für die *in vitro* Kultivierung von HPC verdeutlicht (Zhang et al., 2008; Andrade et al., 2010). Letztes Jahr haben Himburg und Kollegen gezeigt, dass systemische Applikation von Pleiotrophin zu einem deutlich verbesserten Anwachsen von HPC *in vivo* nach radioaktiver Ganzkörperbestrahlung von Mäusen führt (Himburg et al., 2010). Aus diesem Grund kann eine bessere Aufklärung der der Regeneration der Hämatopoese zugrunde liegenden Mechanismen dazu beitragen, dass Methoden zur HPC-Expansion entwickelt werden, die bessere Anwachsrate ermöglichen.

Bis dato haben nur wenige Studien die Sekretion von Wachstumsfaktoren nach einer erfolgten Chemotherapie untersucht. In zwei Studien wurde verdeutlicht, dass die Spiegel von TPO im Serum bis zu einer Woche nach Hochdosis-Chemotherapie ansteigen und nach drei Wochen abfallen, was impliziert, dass TPO eine kritische Rolle für die Rekonstitution der Megakaryopoese und Plättchenproduktion nach HSCT spielt (Yoshimura et al., 2000; Hsu et al., 2002). Andere Autoren demonstrierten, dass die Spiegel von TPO und IL-6 im Serum von Patienten mit durch Chemotherapie induzierter Myelosuppression ansteigen (Chen et al., 1996; Hsu et al., 2002). In dieser Arbeit wurde keine Hochregulation von TPO und nur ein moderater Anstieg von IL-6 ($p = 0,09$) nach HSCT festgestellt. Unerwarteter Weise betrafen signifikante Veränderungen der Serumlevel während chemotherapieinduzierter Myelosuppression bis auf eine Ausnahme nur die Herunterregulation von Wachstumsfaktoren. Chemokine wirken in einem funktionalen Gleichgewicht, daher ist es vorstellbar, dass einige von ihnen als negative Regulatoren der Hämatopoese fungieren und deren Herunterregulation zu einer Stimulation der Selbsterneuerungsrate der HPC führen (Stier et al., 2005; Geissmann et al., 2010). Beispielsweise ist die Suppression der Koloniebildung von HPC durch IP-10 dosisabhängig (Sarris et al., 1993). Diese Beobachtung stimmt mit den Erkenntnissen dieser Arbeit überein, da die IP-10-Spiegel 8 Tage nach HSCT in den Serumproben vermindert waren. Die nach HSCT signifikant verringerten Niveaus verschiedener PDGF-Isoformen könnten auf geringere Plättchenzahlen nach Chemotherapie zurückzuführen sein. Andere Autoren haben postuliert, dass PDGF in der Expansion von HPC involviert ist, jedoch ist die genaue Rolle des PDGF noch nicht ganz verstanden worden

(Su et al., 2002). Vor Kurzem wurde demonstriert, dass PDGF die Expansion von CD133⁺ HPC unterdrückt (Aghideh A. et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Effekt von PDGF auf die Proliferation von HPC nur unter Kokulturbedingungen mit MSC nachgewiesen werden. Dieser Effekt könnte ebenso indirekt durch die PDGF-vermittelte Aktivierung von MSC verursacht sein. Außerdem ist es derzeit noch unklar, ob der beobachtete, die Hämatopoese unterstützende Effekt Zytokinen und Wachstumsfaktoren oder eher anderen Molekülen wie bestimmten Metaboliten zugeschrieben werden kann (Weissinger et al., 2009). Neben Metaboliten könnten auch kleine Membranvesikel oder Hormone für den detektierten stimulatorischen Effekt der d8-Seren relevant sein. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Hämatopoese nach Chemotherapie durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren reguliert wird. Genauere Kenntnis dieser Mechanismen könnte neben einer gezielten Stimulation der *in vitro* Expansion von CD34⁺ HPC für Transplantate auch das Potential bieten, neue Therapieansätze zu entwickeln.

4.4 Schlussfolgerung

Die simultane durchflusszytometrische Analyse der Zellteilungen und des Immunphänotyps stellt eine elegante Methode zur Untersuchung der Expansion von primitiven HPC dar. In dieser Arbeit wurde durchgängig demonstriert, dass MSC aus Knochenmark generell die Proliferation von HPC in einem *in vitro* Kultursystem verstärken. Außerdem behalten HPC durch Kokultivierung mit MSC über mehr Zellteilungen einen primitiven Immunphänotyp (CD34⁺ CD38⁻ oder CD133⁺ CD38⁻), was für die Expansion primitiver HPC von Bedeutung ist. Insbesondere MSC niedrigerer Passagen sind für Kokulturexpansionen von HPC geeignet, da sie die eine stärkere Expansion der selbsterneuernden Zellfraktion ermöglichen. Durch gezielte Manipulation wie siRNA-Herunterregulationen bestimmter Adhäsionsproteine lassen sich weitere Steigerungen der Expansion von primitiven HPC erzielen. Für eine klinische Anwendung müsste jedoch geklärt werden, welche genauen Mechanismen diesen Effekten zu Grunde liegen. Die Expansion von HPC lässt sich weiter steigern, wenn zusätzlich zu einer MSC-Kokultur bestimmte Zytokine, insbesondere eine Kombination von SCF, TPO und FGF, dem Kulturmedium zugesetzt werden. Durch eine Kokultivierung mit MSC werden so auch HPC mit langzeitrepopulierendem Potential im Vergleich zu einer Kultivierung ohne MSC expandiert, wie durch NOD/SCID-Transplantationsexperimente herausgefunden wurde. Eine solche *in vitro* Expansion von HPC beherbergt großes klinisches Potential, was in klinischen Studien weiter untersucht werden muss (Kelly et al., 2009). Zusammengefasst bietet dieser Teil der Arbeit neue Einblicke, wie optimierte Kulturbedingungen unter Verwendung von supportiven MSC und rekombinanten Wachstumsfaktoren die Expansion von HPC weiter steigern können. Denn zuverlässige und

standardisierbare Protokolle für eine *in vitro* Expansion von HPC gelten als der „Heilige Gral“ der hämatopoetischen Stammzellforschung (Savvageau und Humphries, 2010). Ein weiterer effektiver Ansatzpunkt für ein erfolgreiches Anwachsen und hämatopoetische Rekonstitution könnte in der gezielten Aktivierung des Stammzellpools *in vivo* liegen. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass diese Aktivierung wenigstens zum Teil durch systemisch freigesetzte Faktoren vermittelt wird. Die Vermehrung, Aufrechterhaltung eines primitiven Immunphänotyps und CFU-Frequenz von HPC waren signifikant erhöht, wenn unter hämatopoetischen Stressbedingungen nach HSCT isoliertes Serum dem Kulturmedium zugesetzt wurde. Eine genaue Identifikation und Aufklärung der Mechanismen, welche HPC zur Rekonstitution der Hämatopoese anregen, bietet die Möglichkeit, die Erholung nach Chemotherapie zu verstärken. Die Resultate dieser Arbeit könnten auf diese Weise auch dazu beitragen, neue Therapieansätze zu entwickeln. Mit der Identifizierung einiger Faktoren, deren Level sich im Verlauf nach einer Chemotherapie und HSCT ändern, wurde eine wichtige Grundlage für weiterführende Forschungen geschaffen. In diesen weiterführenden Experimenten könnten mehr beteiligte Faktoren mittels Metabolomanalysen identifiziert und gezielt bestimmte Stoffe in Expansionsversuchen zugesetzt werden. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde zusammengefasst ein wichtiger Beitrag zu einer Optimierung der *in vitro* Expansion von humanen CD34⁺ HPC geleistet.

5 Zusammenfassung

Blutstammzelltransplantationen könnten durch eine erfolgreiche *in vitro* Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HPC) auch mit kleinen Transplantaten zuverlässig durchgeführt werden. Bisher existieren keine zuverlässigen Protokolle, durch welche die Selbsterneuerung und Differenzierung von HPC *in vitro* kontrolliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde per Zellteilungs- und Immunphänotypanalysen demonstriert, dass durch Kokultivierung mit mesenchymalen Stromazellen (MSC) insbesondere die primitive HPC Subfraktion (CD34⁺ CD133⁺ CD38⁻) proliferiert und einen primitiven Immunphänotyp erhält, während die Zellen ohne Kokultur rasch ausreifen. Frühe MSC Passagen waren für die Kulturexpansion besonders geeignet. Mittels siRNA wurde die Expression von spezifischen Adhäsionsproteinen (N-Cadherin und VCAM1) und von Bindeproteinen an die extrazelluläre Matrix (CD44 und ITGB1) gezielt inhibiert, wodurch der Anteil an quieszenten HPC gesteigert bzw. ein primitiver Phänotyp erhalten werden konnte. Anschließend wurde systematisch die Auswirkung der Zugabe von 5 zuvor beschriebenen Zytokinen (SCF, TPO, FGF, ANGPTL5 und IGFBP2) in insgesamt 20 verschiedenen Kombinationen mit und ohne MSC-Kokultur auf Proliferation und Immunphänotyp von HPC untersucht. Zusatz von SCF, TPO und FGF konnte die Expansion von HPC sowohl mit als auch ohne MSC-Kokultur weiter steigern. Transplantationsexperimente an einem murinen Modell demonstrierten, dass die MSC-Kokultur die hämatopoetische Rekonstitution mit humanen Zellen erhöht. Daraufhin wurde untersucht, welche Faktoren die Regeneration der Hämatopoese nach Chemotherapie regulieren und kontrollieren. Serum von Patienten vor und nach autologer Stammzelltransplantation wurde gewonnen, jeweils 10 % dem Kulturmedium zugesetzt und der Einfluss auf Proliferation und Immunphänotyp ko- / kultivierter HPC untersucht. Serum von 4 bis 11 Tagen nach Transplantation verstärkte signifikant die Proliferation, den Erhalt eines primitiven Immunphänotyps und das koloniebildende Potential. Dieser stimulatorische Effekt war kaum mehr nachweisbar mit Serum, welches über 14 Tage nach Chemotherapie gewonnen wurde. Mittels Chemokinarrays (174 verschiedene Chemokine) wurde nachgewiesen, dass 8 Chemokine (darunter 3 PDGF-Isoformen) während der hämatopoetischen Stimulation an Tag 8 erniedrigt sind, während das Monozyten Chemotaktische Protein (MCP1) erhöht war. Diese Ergebnisse belegen, dass eine Kokultur mit MSC die Proliferation der HPC steigert und gleichzeitig den Erhalt der Stammzellfunktion fördert. Dieser Effekt wird durch geeignete Chemokine weiter unterstützt. Darüber hinaus scheint die hämatopoetische Regeneration durch systemische Regulationsmechanismen kontrolliert zu werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen so zu einem besseren Verständnis der Regulationsmechanismen in der Stammzellnische bei.

6 Abstract

A successful *in vitro* expansion of hematopoietic stem- and progenitor cells (HPC) is important for reliable cord blood stem cell transplantations with low cell numbers. For *in vitro* cultivation of HPC, there are no safe protocols existing which provide the ability to control self-renewal and differentiation. In this study, analyses of cell divisions and immunophenotype demonstrated that co-culture with mesenchymal stromal cells (MSC) especially stimulates proliferation of the primitive HPC subset (CD34⁺ CD133⁺ CD38⁻) and also maintenance of a more primitive immunophenotype. Without co-culture, the cells rapidly undergo maturation. In particular, early MSC passages were suitable for culture-expansion of HPC. The expression of specific adhesion proteins (N-Cadherine and VCAM1) and extracellular matrix binding-proteins (CD44 and ITGB1) was specifically inhibited by siRNA knockdown resulting in a higher proportion of quiescent HPC as well as maintenance of primitive immunophenotype. Subsequently, the effect of addition of 5 previously described cytokines (SCF, TPO, FGF, ANGPTL5 and IGFBP2) on proliferation and immunophenotype of HPC was analyzed in 20 different combinations with and without MSC-co-culture. Addition of SCF, TPO and FGF enhanced expansion of HPC without and with MSC-co-culture. Furthermore, transplantation experiments in a murine model showed an enhancement of hematopoietic reconstitution with co-cultured HPC. As a next step, factors were investigated that might regulate and control regeneration of hematopoiesis after chemotherapy. Serum was obtained from patients before and at different time points after autologous stem cell transplantation. 10 % of serum was added to culture medium to test its influence on proliferation and immunophenotype of HPC cultured with and without MSC. Serum isolated 4 to 11 days after transplantation significantly enhanced proliferation, colony-stimulating activity and maintenance of primitive immunophenotype. This stimulating effect was hardly detectable with serum isolated more than 14 days after transplantation. Chemokine arrays were used to analyze the chemokine composition of serum samples. Among 174 chemokines, 8 (including 3 PDGF isoforms) were significantly down-regulated during hematopoietic stimulation on day 8, only concentration of monocyte-chemotactic protein 1 (MCP1) was increased. In conclusion, these results verify that co-culture with MSC enhances HPC-proliferation together with maintenance of stem cell function. This effect is further promoted by suitable chemokines. In addition, the hematopoietic reconstitution seems to be controlled through systemic mechanisms of regulation. Therefore, the results of this study further contribute to a better understanding of the regulative and controlling mechanisms in the hematopoietic stem cell niche.

7 Literaturverzeichnis

1. Adams,G.B. und Scadden,D.T. (2006). The hematopoietic stem cell in its place. *Nat. Immunol.* 7, 333-337.
2. Aghideh A., Kheirandish,M., Abolghasemi,H., und Gharehbaghian,A. (2010). Platelet growth factors suppress ex vivo expansion and enhance differentiation of umbilical cord blood CD133(+) stem cells to megakaryocyte progenitor cells. *Growth Factors* 28, 409-416.
3. Alakel,N., Jing,D., Muller,K., Bornhauser,M., Ehninger,G., und Ordemann,R. (2009). Direct contact with mesenchymal stromal cells affects migratory behavior and gene expression profile of CD133+ hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. *Exp Hematol* 37, 504-513.
4. Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., and Watson,J.D. (1994). Differentiated cells and the maintenance of tissues. In *Molecular Biology of the Cell*, (New York & London: Garland Publishing), pp. 1139-1193.
5. Andrade,P.Z., dos Santos,F., Almeida-Porada,G., da Silva,C.L., und JM,S.C. (2010). Systematic delineation of optimal cytokine concentrations to expand hematopoietic stem/progenitor cells in co-culture with mesenchymal stem cells. *Mol. Biosyst.* 6, 1207-1215.
6. Andre,M.C., Erbacher,A., Gille,C., Schmauke,V., Goecke,B., Hohberger,A., Mang,P., Wilhelm,A., Mueller,I., Herr,W., Lang,P., Handgretinger,R., und Hartwig,U.F. (2010). Long-term human CD34+ stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL-2R gamma(null) mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells. *J. Immunol.* 185, 2710-2720.
7. Arai,F. und Suda,T. (2007). Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1106, 41-53.
8. Augello,A., Kurth,T.B., und De,B.C. (2010). Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur. Cell Mater.* 20, 121-133.
9. Avanzini,M.A., Bernardo,M.E., Cometa,A.M., Perotti,C., Zaffaroni,N., Novara,F., Visai,L., Moretta,A., Del,F.C., Villa,R., Ball,L.M., Fibbe,W.E., Maccario,R., und Locatelli,F. (2009). Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: a phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood- and bone marrow-derived progenitors. *Haematologica* 94, 1649-1660.
10. Avigdor,A., Goichberg,P., Shivtiel,S., Dar,A., Peled,A., Samira,S., Kollet,O., Hershkovich,R., Alon,R., Hardan,I., Ben-Hur,H., Naor,D., Nagler,A., und Lapidot,T. (2004). CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood* 103, 2981-2989.
11. Baksh,D., Song,L., und Tuan,R.S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell Mol. Med.* 8, 301-316.
12. Battiwalla,M. und Hematti,P. (2009). Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy.* 11, 503-515.

13. Bauer,N., Fonseca,A.V., Florek,M., Freund,D., Jaszai,J., Bornhauser,M., Fargeas,C.A., und Corbeil,D. (2008). New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133). *Cells Tissues. Organs* 188, 127-138.
14. Becker,A.J., McCulloch,E.A., und Till,J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-454.
15. Beckmann,J., Scheitza,S., Wernet,P., Fischer,J.C., und Giebel,B. (2007). Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* 109, 5494-5501.
16. Benesch,M. und Deeg,H.J. (2003). Hematopoietic cell transplantation for adult patients with myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders. *Mayo Clin. Proc.* 78, 981-990.
17. Berenson,R.J., Bensinger,W.I., Hill,R.S., Andrews,R.G., Garcia-Lopez,J., Kalamasz,D.F., Still,B.J., Spitzer,G., Buckner,C.D., Bernstein,I.D., und . (1991). Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 77, 1717-1722.
18. Bernas,T. und Dobrucki,J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 47, 236-242.
19. Bieback,K., Hecker,A., Kocaomer,A., Lannert,H., Schallmoser,K., Strunk,D., und Kluter,H. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27, 2331-2341.
20. Blande,I.S., Bassaneze,V., Lavini-Ramos,C., Fae,K.C., Kalil,J., Miyakawa,A.A., Schettert,I.T., und Krieger,J.E. (2009). Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion* 49, 2680-2685.
21. Blau,H.M., Brazelton,T.R., und Weimann,J.M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105, 829-841.
22. Bonab,M.M., Alimoghaddam,K., Talebian,F., Ghaffari,S.H., Ghavamzadeh,A., und Nikbin,B. (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC. Cell Biol.* 7, 14.
23. Bonig,H., Priestley,G.V., und Papayannopoulou,T. (2006). Hierarchy of molecular-pathway usage in bone marrow homing and its shift by cytokines. *Blood* 107, 79-86.
24. Brauninger,A., Schmitz,R., Bechtel,D., Renne,C., Hansmann,M.L., und Kuppers,R. (2006). Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Cancer* 118, 1853-1861.
25. Breems,D.A., Blokland,E.A., Siebel,K.E., Mayen,A.E., Engels,L.J., und Ploemacher,R.E. (1998). Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells. *Blood* 91, 111-117.

26. Broxmeyer,H.E., Douglas,G.W., Hangoc,G., Cooper,S., Bard,J., English,D., Arny,M., Thomas,L., und Boyse,E.A. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 3828-3832.
27. Brummendorf,T.H., Dragowska,W., und Lansdorp,P.M. (1999). Asymmetric cell divisions in hematopoietic stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 872, 265-272.
28. Brummendorf,T.H., Dragowska,W., Zijlmans,J.M.J.M., Thornbury,G., und Lansdorp,P.M. (1998). Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells. *J. Exp. Med.* 188, 1117-1124.
29. Bugarski,D., Krstic,A., Mojsilovic,S., Vlaski,M., Petakov,M., Jovcic,G., Stojanovic,N., und Milenkovic,P. (2007). Signaling pathways implicated in hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation. *Exp Biol. Med.* (Maywood.) 232, 156-163.
30. Calvi,L.M., Adams,G.B., Weibrecht,K.W., Weber,J.M., Olson,D.P., Knight,M.C., Martin,R.P., Schipani,E., Divieti,P., Bringhurst,F.R., Milner,L.A., Kronenberg,H.M., und Scadden,D.T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.
31. Chen,Y.M., Whang-Peng,J., Liu,J.M., Kuo,B.I., Wang,S.Y., Tsai,C.M., und Perng,R.P. (1996). Serum cytokine level fluctuations in chemotherapy-induced myelosuppression. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 26, 18-23.
32. Cheng,J., Tiyaboonchai,A., Yamashita,Y.M., und Hunt,A.J. (2011). Asymmetric division of cyst stem cells in *Drosophila* testis is ensured by anaphase spindle repositioning. *Development* 138, 831-837.
33. Civin,C.I., Strauss,L.C., Brovall,C., Fackler,M.J., Schwartz,J.F., und 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. *J. Immunol.* 133, 157-165.
34. Clarke,C.A., Glaser,S.L., Dorfman,R.F., Bracci,P.M., Eberle,E., und Holly,E.A. (2004). Expert review of non-Hodgkin's lymphomas in a population-based cancer registry: reliability of diagnosis and subtype classifications. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 138-143.
35. Colter,D.C., Class,R., DiGirolamo,C.M., und Prockop,D.J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3213-3218.
36. Congdon,K.L. und Reya,T. (2008). Divide and conquer: how asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 302-307.
37. Corbeil,D., Marzesco,A.M., Wilsch-Brauninger,M., und Huttner,W.B. (2010). The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. *FEBS Lett.* 584, 1659-1664.
38. Cory,A.H., Owen,T.C., Barltrop,J.A., und Cory,J.G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3, 207-212.

39. Covas,D.T., Panepucci,R.A., Fontes,A.M., Silva,W.A., Jr., Orellana,M.D., Freitas,M.C., Neder,L., Santos,A.R., Peres,L.C., Jamur,M.C., und Zago,M.A. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* 36, 642-654.
40. da Silva,C.L., Goncalves,R., Crapnell,K.B., Cabral,J.M., Zanjani,E.D., und meida-Porada,G. (2005). A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp. Hematol.* 33, 828-835.
41. Dao,M.A., Arevalo,J., und Nolta,J.A. (2003). Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood* 101, 112-118.
42. Dar,A., Goichberg,P., Shinder,V., Kalinkovich,A., Kollet,O., Netzer,N., Margalit,R., Zsak,M., Nagler,A., Hardan,I., Resnick,I., Rot,A., und Lapidot,T. (2005). Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat. Immunol.* 6, 1038-1046.
43. de Graaf,C.A. und Metcalf,D. (2011). Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 10, 1582-1589.
44. de Haan G., Weersing,E., Dontje,B., van,O.R., Bystrykh,L.V., Vellenga,E., und Miller,G. (2003). In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Dev. Cell* 4, 241-251.
45. De La Luz,S.M., Yang,F., Narazaki,M., Salvucci,O., Davis,D., Yarchoan,R., Zhang,H.H., Fales,H., und Tosato,G. (2004). Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood* 103, 2452-2459.
46. Delaney,C., Heimfeld,S., Brashem-Stein,C., Voorhies,H., Manger,R.L., und Bernstein,I.D. (2010). Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat. Med.* 16, 232-236.
47. Delhommeau,F., Dupont,S., Della,V., V, James,C., Trannoy,S., Masse,A., Kosmider,O., Le Couedic,J.P., Robert,F., Alberdi,A., Lecluse,Y., Plo,I., Dreyfus,F.J., Marzac,C., Casadevall,N., Lacombe,C., Romana,S.P., Dessen,P., Soulier,J., Viguie,F., Fontenay,M., Vainchenker,W., und Bernard,O.A. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* 360, 2289-2301.
48. Denning-Kendall,P., Singha,S., Bradley,B., und Hows,J. (2003). Cobblestone area-forming cells in human cord blood are heterogeneous and differ from long-term culture-initiating cells. *Stem Cells* 21, 694-701.
49. Dexter,T.M. (1979). Haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. A review. *Acta Haematol.* 62, 299-305.
50. Dexter,T.M., Wright,E.G., Krizsa,F., und Lajtha,L.G. (1977). Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine.* 27, 344-349.
51. Docheva,D., Popov,C., Mutschler,W., und Schieker,M. (2007). Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J. Cell Mol. Med.* 11, 21-38.

52. Dominici,M., Le Blanc,K., Mueller,I., Slaper-Cortenbach,I., Marini,F., Krause,D., Deans,R., Keating,A., Prockop,D., und Horwitz,E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8, 315-317.
53. Dudley,D.T., Pang,L., Decker,S.J., Bridges,A.J., und Saltiel,A.R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 7686-7689.
54. Eshghi,S., Vogelesang,M.G., Hynes,R.O., Griffith,L.G., und Lodish,H.F. (2007). Alpha4beta1 integrin and erythropoietin mediate temporally distinct steps in erythropoiesis: integrins in red cell development. *J. Cell Biol.* 177, 871-880.
55. Faber,A., Roderburg,C., Wein,F., Saffrich,R., Seckinger,A., Horsch,K., Diehlmann,A., Bridger,G., Ho,A.D., und Wagner,W. (2007). The many facets of SDF-1 α , CXCR4 agonists and antagonists on hematopoietic progenitor cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 3, 26065.
56. Fehrer,C. und Lepperdinger,G. (2005). Mesenchymal stem cell aging. *Exp. Gerontol.* 40, 926-930.
57. Fiebig,H., Behn,I., Gruhn,R., Typlt,H., Kupper,H., und Ambrosius,H. (1984). [Characterization of a series of monoclonal antibodies against human T cells]. *Allerg. Immunol. (Leipz.)* 30, 242-250.
58. Fleming,H.E., Janzen,V., Lo,C.C., Guo,J., Leahy,K.M., Kronenberg,H.M., und Scadden,D.T. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* 2, 274-283.
59. Fonseca,A.V., Freund,D., Bornhauser,M., und Corbeil,D. (2010). Polarization and migration of hematopoietic stem and progenitor cells rely on the RhoA/ROCK I pathway and an active reorganization of the microtubule network. *J. Biol. Chem.* 285, 31661-31671.
60. Freund,D., Bauer,N., Boxberger,S., Feldmann,S., Streller,U., Ehninger,G., Werner,C., Bornhauser,M., Oswald,J., und Corbeil,D. (2006). Polarization of human hematopoietic progenitors during contact with multipotent mesenchymal stromal cells: effects on proliferation and clonogenicity. *Stem Cells Dev.* 15, 815-829.
61. Fruehauf,S., Seeger,T., Maier,P., Li,L., Weinhardt,S., Laufs,S., Wagner,W., Eckstein,V., Bridger,G., Calandra,G., Wenz,F., Zeller,W.J., Goldschmidt,H., und Ho,A.D. (2006). The CXCR4 antagonist AMD3100 releases a subset of G-CSF-primed peripheral blood progenitor cells with specific gene expression characteristics. *Exp. Hematol.* 34, 1052-1059.
62. Fruehauf,S. und Seggewiss,R. (2003). It's moving day: factors affecting peripheral blood stem cell mobilization and strategies for improvement [corrected]. *Br. J. Haematol.* 122, 360-375.
63. Fruehauf,S., Srbic,K., Seggewiss,R., Topaly,J., und Ho,A.D. (2002). Functional characterization of podia formation in normal and malignant hematopoietic cells. *J. Leukoc. Biol.* 71, 425-432.
64. Fruehauf,S., Topaly J, Wilmes A, and Ho AD (2000). Durchflusszytometrische Diagnostik malignen hämatologischer Erkrankungen. In *Allgemeine Tumordiagnostik*.

65. Fuhler,G.M., Drayer,A.L., Olthof,S.G., Schuringa,J.J., Coffey,P.J., und Vellenga,E. (2008). Reduced activation of protein kinase B, Rac, and F-actin polymerization contributes to an impairment of stromal cell derived factor-1 induced migration of CD34+ cells from patients with myelodysplasia. *Blood* 111, 359-368.
66. Galy,A., Neron,B., Planque,N., Saule,S., und Eychene,A. (2002). Activated MAPK/ERK kinase (MEK-1) induces transdifferentiation of pigmented epithelium into neural retina. *Dev. Biol.* 248, 251-264.
67. Gan,O.I., Murdoch,B., Larochelle,A., und Dick,J.E. (1997). Differential maintenance of primitive human SCID-repopulating cells, clonogenic progenitors, and long-term culture-initiating cells after incubation on human bone marrow stromal cells. *Blood* 90, 641-650.
68. Gazit,R., Weissman,I.L., und Rossi,D.J. (2008). Hematopoietic stem cells and the aging hematopoietic system. *Semin. Hematol.* 45, 218-224.
69. Geissmann,F., Manz,M.G., Jung,S., Sieweke,M.H., Merad,M., und Ley,K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.
70. Gekas,C. und Graf,T. (2010). Induced pluripotent stem cell-derived human platelets: one step closer to the clinic. *J. Exp Med.* 207, 2781-2784.
71. Giebel,B., Corbeil,D., Beckmann,J., Hohn,J., Freund,D., Giesen,K., Fischer,J., Kogler,G., und Wernet,P. (2004). Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 104, 2332-2338.
72. Giebel,B., Zhang,T., Beckmann,J., Spanholtz,J., Wernet,P., Ho,A.D., und Punzel,M. (2006). Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. *Blood* 107, 2146-2152.
73. Gluckman,E., Broxmeyer,H.A., Auerbach,A.D., Friedman,H.S., Douglas,G.W., Devergie,A., Esperou,H., Thierry,D., Socie,G., Lehn,P., und . (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* 321, 1174-1178.
74. Gluckman,E., Rocha,V., Boyer-Chammard,A., Locatelli,F., Arcese,W., Pasquini,R., Ortega,J., Souillet,G., Ferreira,E., Laporte,J.P., Fernandez,M., und Chastang,C. (1997). Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N. Engl. J. Med.* 337, 373-381.
75. Goncalves,R., da Silva,C.L., Cabral,J.M., Zanjani,E.D., und Almeida-Porada,G. (2006). A Stro-1(+) human universal stromal feeder layer to expand/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a serum-free culture system. *Exp. Hematol.* 34, 1353-1359.
76. Gottschling,S., Saffrich,R., Seckinger,A., Krause,U., Horsch,K., Miesala,K., und Ho,A.D. (2007). Human Mesenchymal Stroma Cells Regulate Initial Self-Renewing Divisions of Hematopoietic Progenitor Cells by a beta1-Integrin-Dependent Mechanism. *Stem Cells* 25, 798-806.
77. Gotze,K.S., Schiemann,M., Marz,S., Jacobs,V.R., Debus,G., Peschel,C., und Oostendorp,R.A. (2007). CD133-enriched CD34(-) (CD33/CD38/CD71)(-) cord blood cells acquire CD34 prior to cell division and hematopoietic activity is exclusively associated with CD34 expression. *Exp. Hematol.* 35, 1408-1414.

78. Gratwohl,A., Baldomero,H., Schwendener,A., Rocha,V., Apperley,J., Frauendorfer,K., und Niederwieser,D. (2009). The EBMT activity survey 2007 with focus on allogeneic HSCT for AML and novel cellular therapies. *Bone Marrow Transplant.* 43, 275-291.
79. Hamann,K.J., Dowling,T.L., Neeley,S.P., Grant,J.A., und Leff,A.R. (1995). Hyaluronic acid enhances cell proliferation during eosinopoiesis through the CD44 surface antigen. *J. Immunol.* 154, 4073-4080.
80. Harris,N.L., Jaffe,E.S., Diebold,J., Flandrin,G., Muller-Hermelink,H.K., Vardiman,J., Lister,T.A., und Bloomfield,C.D. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J. Clin. Oncol.* 17, 3835-3849.
81. Hasbold,J., Gett,A.V., Rush,J.S., Deenick,E., Avery,D., Jun,J., und Hodgkin,P.D. (1999). Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol. Cell Biol.* 77, 516-522.
82. Hattori,K., Heissig,B., Tashiro,K., Honjo,T., Tatenno,M., Shieh,J.H., Hackett,N.R., Quitariano,M.S., Crystal,R.G., Rafii,S., und Moore,M.A. (2001). Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 97, 3354-3360.
83. Haug,J.S., He,X.C., Grindley,J.C., Wunderlich,J.P., Gaudenz,K., Ross,J.T., Paulson,A., Wagner,K.P., Xie,Y., Zhu,R., Yin,T., Perry,J.M., Hembree,M.J., Redenbaugh,E.P., Radice,G.L., Seidel,C., und Li,L. (2008). N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 367-379.
84. Hayflick ,L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614-636.
85. Hayflick L. und Moorhead P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.
86. Healy,L., May,G., Gale,K., Grosveld,F., Greaves,M., und Enver,T. (1995). The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 12240-12244.
87. Heiskanen,A., Satomaa,T., Tiitinen,S., Laitinen,A., Mannelin,S., Impola,U., Mikkola,M., Olsson,C., Miller-Podraza,H., Blomqvist,M., Olonen,A., Salo,H., Lehenkari,P., Tuuri,T., Otonkoski,T., Natunen,J., Saarinen,J., und Laine,J. (2007). N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells* 25, 197-202.
88. Himburg,H.A., Muramoto,G.G., Daher,P., Meadows,S.K., Russell,J.L., Doan,P., Chi,J.T., Salter,A.B., Lento,W.E., Reya,T., Chao,N.J., und Chute,J.P. (2010). Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 16, 475-482.
89. Ho,A.D. (2005). Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 33, 1-8.
90. Ho,A.D. und Punzel,M. (2003). Hematopoietic stem cells: can old cells learn new tricks? *J. Leukoc. Biol.* 73, 547-555.

91. Ho,A.D. und Wagner,W. (2007). The beauty of asymmetry - asymmetric divisions and self-renewal in the hematopoietic system. *Current Opinion in Hematology* 14, 330-336.
92. Ho,A.D., Wagner,W., und Franke,W. (2008). Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 10, 320-330.
93. Ho,A.D., Wagner,W., und Mahlknecht,U. (2005). Stem cells and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine. *EMBO Rep.* 6, 35-38.
94. Hochedlinger,K., Rideout,W.M., Kyba,M., Daley,G.Q., Blueloch,R., und Jaenisch,R. (2004). Nuclear transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy. *Hematol J. 5 Suppl* 3, S114-S117.
95. Hodgkin (1832). On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med. Chir Trans.* 17, 68-114.
96. Hofmeister,C.C., Zhang,J., Knight,K.L., Le,P., und Stiff,P.J. (2007). Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant.* 39, 11-23.
97. Holden,C. und Vogel,G. (2002). Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? *Science* 296, 2126-2129.
98. Horan,P.K. und Slezak,S.E. (1989). Stable cell membrane labelling. *Nature* 340, 167-168.
99. Horn,P., Bokermann,G., Cholewa,D., Bork,S., Walenda,T., Koch,C., Drescher,W., Hutschenreuther,G., Zenke,M., Ho,A., und Wagner W (2010). Comparison of Individual Platelet Lysates for Isolation of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy* 12, 888-898.
100. Horn,P., Bork,S., Diehlmann,A., Walenda,T., Eckstein,V., Ho,A.D., und Wagner,W. (2008). Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cytotherapy* 10, 676-685.
101. Horwitz,E.M. und Keating,A. (2000). Nonhematopoietic mesenchymal stem cells: what are they? *Cytotherapy.* 2, 387-388.
102. Horwitz,E.M., Le,B.K., Dominici,M., Mueller,I., Slaper-Cortenbach,I., Marini,F.C., Deans,R.J., Krause,D.S., und Keating,A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 7, 393-395.
103. Hsu,C.L., Kikuchi,K., und Kondo,M. (2007). Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling pathway is involved in myeloid lineage commitment. *Blood* 110, 1420-1428.
104. Hsu,H.C., Lee,Y.M., Tsai,W.H., Jiang,M.L., Ho,C.H., Ho,C.K., und Wang,S.Y. (2002). Circulating levels of thrombopoietic and inflammatory cytokines in patients with acute myeloblastic leukemia and myelodysplastic syndrome. *Oncology* 63, 64-69.

105. Huang,G.P., Pan,Z.J., Jia,B.B., Zheng,Q., Xie,C.G., Gu,J.H., McNiece,I.K., und Wang,J.F. (2007). Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Cell Transplant.* 16, 579-585.
106. Huang,S., Law,P., Francis,K., Palsson,B.O., und Ho,A.D. (1999). Symmetry of initial cell divisions among primitive hematopoietic progenitors is independent of ontogenic age and regulatory molecules. *Blood* 94, 2595-2604.
107. Hutvagner,G. und Zamore,P.D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 225-232.
108. Imai,K., Kobayashi,M., Wang,J., Shinobu,N., Yoshida,H., Hamada,J., Shindo,M., Higashino,F., Tanaka,J., Asaka,M., und Hosokawa,M. (1999). Selective secretion of chemoattractants for haemopoietic progenitor cells by bone marrow endothelial cells: a possible role in homing of haemopoietic progenitor cells to bone marrow. *Br. J. Haematol.* 106, 905-911.
109. Inaba,M., Yuan,H., Salzmann,V., Fuller,M.T., und Yamashita,Y.M. (2010). E-cadherin is required for centrosome and spindle orientation in *Drosophila* male germline stem cells. *PLoS ONE* 5, e12473.
110. Jaenisch,R. (2009). Stem cells, pluripotency and nuclear reprogramming. *J. Thromb. Haemost.* 7 *Suppl* 1, 21-23.
111. Jang,Y.K., Jung,D.H., Jung,M.H., Kim,D.H., Yoo,K.H., Sung,K.W., Koo,H.H., Oh,W., Yang,Y.S., und Yang,S.E. (2006). Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann. Hematol* 85, 212-225.
112. Jiang,Y., Jahagirdar,B.N., Reinhardt,R.L., Schwartz,R.E., Keene,C.D., Ortiz-Gonzalez,X.R., Reyes,M., Lenvik,T., Lund,T., Blackstad,M., Du,J., Aldrich,S., Lisberg,A., Low,W.C., Largaespada,D.A., und Verfaillie,C.M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
113. Jiang,Y., Prosper,F., und 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.
114. Jing,D., Fonseca,A.V., Alakel,N., Fierro,F.A., Muller,K., Bornhauser,M., Ehninger,G., Corbeil,D., und Ordemann,R. (2010). Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica* 95, 542-550.
115. Johnson,G.L. und Lapadat,R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
116. Jost,E., do,O.N., Dahl,E., Maintz,C.E., Jousten,P., Habets,L., Wilop,S., Herman,J.G., Osieka,R., und Galm,O. (2007). Epigenetic alterations complement mutation of JAK2 tyrosine kinase in patients with BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 21, 505-510.

117. Kadereit,S., Deeds,L.S., Haynesworth,S.E., Koc,O.N., Kozik,M.M., Szekely,E., um-Woods,K., Goetchius,G.W., Fu,P., Welniak,L.A., Murphy,W.J., und Laughlin,M.J. (2002). Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. *Stem Cells* 20, 573-582.
118. Kapur,R., Cooper,R., Zhang,L., und Williams,D.A. (2001). Cross-talk between alpha(4)beta(1)/alpha(5)beta(1) and c-Kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-activated protein kinase, and Akt signaling pathways. *Blood* 97, 1975-1981.
119. Kaufman,D.S., Hanson,E.T., Lewis,R.L., Auerbach,R., und Thomson,J.A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10716-10721.
120. Keeney,M., Gratama,J.W., und Sutherland,D.R. (2004). Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cell grafts. *Cytometry A* 58, 72-75.
121. Kelly,S.S., Sola,C.B., de,L.M., und Shpall,E. (2009). Ex vivo expansion of cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 44, 673-681.
122. Kessans,M.R., Gatesman,M.L., und Kockler,D.R. (2010). Plerixafor: a peripheral blood stem cell mobilizer. *Pharmacotherapy* 30, 485-492.
123. Khaldoyanidi,S., Denzel,A., und Zoller,M. (1996). Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. *J. Leukoc. Biol.* 60, 579-592.
124. Khoury,M., Drake,A., Chen,Q., Dong,D., Leskov,I., Fragoso,M.F., Li,Y., Iliopoulou,B.P., Hwang,W., Lodish,H.F., und Chen,J. (2011). Mesenchymal stem cells secreting angiopoietin-like-5 support efficient expansion of human hematopoietic stem cells without compromising their repopulating potential. *Stem Cells Dev. Epub ahead of print.*
125. Kiel,M.J., Acar,M., Radice,G.L., und Morrison,S.J. (2009). Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell* 4, 170-179.
126. Kiel,M.J., Radice,G.L., und Morrison,S.J. (2007). Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell* 1, 204-217.
127. Kiel,M.J., Yilmaz,O.H., Iwashita,T., Yilmaz,O.H., Terhorst,C., und Morrison,S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.
128. Klaus,J., Herrmann,D., Breitzkreutz,I., Hegenbart,U., Mazitschek,U., Egerer,G., Cremer,F.W., Lowenthal,R.M., Huesing,J., Fruehauf,S., Moehler,T., Ho,A.D., und Goldschmidt,H. (2007). Effect of CD34 cell dose on hematopoietic reconstitution and outcome in 508 patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Eur. J. Haematol.* 78, 21-28.
129. Ko,K.H., Odell,R., und Nordon,R.E. (2007). Analysis of cell differentiation by division tracking cytometry. *Cytometry A* 71, 773-782.

130. Kocaoemer,A., Kern,S., Kluter,H., und Bieback,K. (2007). Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells* 25, 1270-1278.
131. Koh,S.H., Choi,H.S., Park,E.S., Kang,H.J., Ahn,H.S., und Shin,H.Y. (2005). Co-culture of human CD34+ cells with mesenchymal stem cells increases the survival of CD34+ cells against the 5-aza-deoxycytidine- or trichostatin A-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 1039-1045.
132. Kortessidis,A., Zannettino,A., Isenmann,S., Shi,S., Lapidot,T., und Gronthos,S. (2005). Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 105, 3793-3801.
133. Kuehl,W.M. und Bergsagel,P.L. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer* 2, 175-187.
134. Kurita,M., Iba-Kojima,E., Shigeura,T., Matsumoto,D., Suga,H., Inoue,K., Eto,H., Kato,H., Aoi,N., und Yoshimura,K. (2008). Differential effects of three preparations of human serum on expansion of various types of human cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 122, 438-448.
135. Kuzmenkin,A., Liang,H., Xu,G., Pfannkuche,K., Eichhorn,H., Fatima,A., Luo,H., Saric,T., Wernig,M., Jaenisch,R., und Hescheler,J. (2009). Functional characterization of cardiomyocytes derived from murine induced pluripotent stem cells in vitro. *FASEB J.* 23, 4168-4180.
136. Kuznetsov,S.A., Mankani,M.H., und Robey,P.G. (2000). Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation* 70, 1780-1787.
137. Lapidot,T., Dar,A., und Kollet,O. (2005). How do stem cells find their way home? *Blood* 106, 1901-1910.
138. Larsson,J. und Karlsson,S. (2005). The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 24, 5676-5692.
139. Lataillade,J.J., Clay,D., Bourin,P., Herodin,F., Dupuy,C., Jasmin,C., und Bousse-Kerdiles,M.C. (2002). Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood* 99, 1117-1129.
140. Lataillade,J.J., Clay,D., Dupuy,C., Rigal,S., Jasmin,C., Bourin,P., und Le Bousse-Kerdiles,M.C. (2000). Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* 95, 756-768.
141. Lazar-Karsten,P., Dorn,I., Meyer,G., Lindner,U., Driller,B., und Schlenke,P. (2011). The influence of extracellular matrix proteins and mesenchymal stem cells on erythropoietic cell maturation. *Vox Sang.* 101, 65-76.
142. Le Blanc,K., Frassonni,F., Ball,L., Locatelli,F., Roelofs,H., Lewis,I., Lanino,E., Sundberg,B., Bernardo,M.E., Remberger,M., Dini,G., Egeler,R.M., Bacigalupo,A., Fibbe,W., und Ringden,O. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579-1586.

143. Le Blanc,K., Rasmusson,I., Sundberg,B., Gotherstrom,C., Hassan,M., Uzunel,M., und Ringden,O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439-1441.
144. Leary,A.G., Ogawa,M., Strauss,L.C., und Civin,C.I. (1984). Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes. *J. Clin. Invest* 74, 2193-2197.
145. Leary,A.G., Strauss,L.C., Civin,C.I., und Ogawa,M. (1985). Disparate differentiation in hemopoietic colonies derived from human paired progenitors. *Blood* 66, 327-332.
146. Lecoeur,H. (2002). Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Exp. Cell Res.* 277, 1-14.
147. Levac,K., Karanu,F., und Bhatia,M. (2005). Identification of growth factor conditions that reduce ex vivo cord blood progenitor expansion but do not alter human repopulating cell function in vivo. *Haematologica* 90, 166-172.
148. Levesque,J.P., Leavesley,D.I., Niutta,S., Vadas,M., und Simmons,P.J. (1995). Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J. Exp Med.* 181, 1805-1815.
149. Li,N., Feugier,P., Serrurier,B., Latger-Cannard,V., Lesesve,J.F., Stoltz,J.F., und Eljaafari,A. (2007). Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. *Exp. Hematol.* 35, 507-515.
150. Liao,J., Hammerick,K.E., Challen,G.A., Goodell,M.A., Kasper,F.K., und Mikos,A.G. (2011). Investigating the role of hematopoietic stem and progenitor cells in regulating the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro. *J. Orthop. Res.* *Epub ahead of print.*
151. Lin,H. und Schagat,T. (1997). Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells. *Trends Genet.* 13, 33-39.
152. Linton,P.J. und Dorshkind,K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* 5, 133-139.
153. Liu,Y., Yi,L., Zhang,X., Gao,L., Zhang,C., Feng,Y.M., und Chen,X.H. (2011). Cotransplantation of human umbilical cord blood-derived stromal cells enhances hematopoietic reconstitution and engraftment in irradiated BABL/c mice. *Cancer Biol. Ther.* 11, 84-94.
154. Ljungman,P., Bregni,M., Brune,M., Cornelissen,J., de,W.T., Dini,G., Einsele,H., Gaspar,H.B., Gratwohl,A., Passweg,J., Peters,C., Rocha,V., Saccardi,R., Schouten,H., Sureda,A., Tichelli,A., Velardi,A., und Niederwieser,D. (2010). Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant.* 45, 219-234.
155. Lyons,A.B. (1999). Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol. Cell Biol.* 77, 509-515.
156. Lyons,A.B. und Parish,C.R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 171, 131-137.

157. Marciniak-Czochra,A., Stiehl,T., Ho A.D., Jaeger,W., und Wagner,W. (2009). Modeling of Asymmetric Cell Division in Hematopoietic Stem Cells - Regulation of Self-Renewal is Essential for Efficient Repopulation. *Stem Cells Dev.* 18, 377-385.
158. Matranga,C., Tomari,Y., Shin,C., Bartel,D.P., und Zamore,P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607-620.
159. Matsuzaki,T., Aisaki,K., Yamamura,Y., Noda,M., und Ikawa,Y. (2000). Induction of erythroid differentiation by inhibition of Ras/ERK pathway in a friend murine leukemia cell line. *Oncogene* 19, 1500-1508.
160. Mendez-Ferrer,S., Michurina,T.V., Ferraro,F., Mazloom,A.R., Macarthur,B.D., Lira,S.A., Scadden,D.T., Ma'ayan,A., Enikolopov,G.N., und Frenette,P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834.
161. Mikkola,H.K. und Orkin,S.H. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133, 3733-3744.
162. Mishima,S., Nagai,A., Abdullah,S., Matsuda,C., Taketani,T., Kumakura,S., Shibata,H., Ishikura,H., Kim,S.U., und Masuda,J. (2010). Effective ex vivo expansion of hematopoietic stem cells using osteoblast-differentiated mesenchymal stem cells is CXCL12 dependent. *Eur. J. Haematol.* 84, 538-546.
163. Miura,Y., Gao,Z., Miura,M., Seo,B.M., Sonoyama,W., Chen,W., Gronthos,S., Zhang,L., und Shi,S. (2006). Mesenchymal stem cell-organized bone marrow elements: an alternative hematopoietic progenitor resource. *Stem Cells* 24, 2428-2436.
164. Miyake,K., Medina,K.L., Hayashi,S., Ono,S., Hamaoka,T., und Kincade,P.W. (1990). Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* 171, 477-488.
165. Miyake,K., Weissman,I.L., Greenberger,J.S., und Kincade,P.W. (1991). Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J. Exp. Med.* 173, 599-607.
166. Moore,A., Donahue,C.J., Bauer,K.D., und Mather,J.P. (1998). Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methods Cell Biol.* 57, 265-278.
167. Moore,K.A. und Lemischka,I.R. (2006). Stem cells and their niches. *Science* 311, 1880-1885.
168. Mosmann,T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
169. Muller,I., Kordowich,S., Holzwarth,C., Spano,C., Isensee,G., Staiber,A., Viebahn,S., Gieseke,F., Langer,H., Gawaz,M.P., Horwitz,E.M., Conte,P., Handgretinger,R., und Dominici,M. (2006). Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy.* 8, 437-444.
170. Nagaya,N., Kangawa,K., Itoh,T., Iwase,T., Murakami,S., Miyahara,Y., Fujii,T., Uematsu,M., Ohgushi,H., Yamagishi,M., Tokudome,T., Mori,H., Miyatake,K., und Kitamura,S. (2005). Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112, 1128-1135.

171. Nesselmann,C., Ma,N., Bieback,K., Wagner,W., Ho,A., Konttinen,Y.T., Zhang,H., Hinescu,M.E., und Steinhoff,G. (2008). Mesenchymal stem cells and cardiac repair. *J. Cell Mol. Med.* 12, 1795-1810.
172. Newton,I., Charbord,P., Schaal,J.P., und Herve,P. (1993). Toward cord blood banking: density-separation and cryopreservation of cord blood progenitors. *Exp Hematol* 21, 671-674.
173. Ng,F., Boucher,S., Koh,S., Sastry,K.S., Chase,L., Lakshmipathy,U., Choong,C., Yang,Z., Vemuri,M.C., Rao,M.S., und Tanavde,V. (2008). PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112, 295-307.
174. Niu,C., Zhang,J., Breslin,P., Onciu,M., Ma,Z., und Morris,S.W. (2009). c-Myc is a target of Rbm15 in the regulation of adult hematopoietic stem cell and megakaryocyte development. *Blood* 114, 2087-2096.
175. Odorico,J.S., Kaufman,D.S., und Thomson,J.A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19, 193-204.
176. Okazaki,M., Takeshita,S., Kawai,S., Kikuno,R., Tsujimura,A., Kudo,A., und Amann,E. (1994). Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 12092-12098.
177. Olesen,G., Tonder,H., Holm,M.S., und Hokland,P. (2001). Long-term culture of hematopoietic stem cells - validating the stromal component of the CAFC assay. *Cytotherapy.* 3, 107-116.
178. Olivieri,A., Offidani,M., Montanari,M., Ciniero,L., Cantori,I., Ombrosi,L., Masia,C.M., Centurioni,R., Mancini,S., Brunori,M., und Leoni,P. (1998). Factors affecting hemopoietic recovery after high-dose therapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: a single center experience. *Haematologica* 83, 329-337.
179. Oostendorp,R.A., Audet,J., und Eaves,C.J. (2000). High-resolution tracking of cell division suggests similar cell cycle kinetics of hematopoietic stem cells stimulated in vitro and in vivo. *Blood* 95, 855-862.
180. Orazi,A. und Germing,U. (2008). The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia* 22, 1308-1319.
181. Orciani,M., Trubiani,O., Guarnieri,S., Ferrero,E., und Di,P.R. (2008). CD38 is constitutively expressed in the nucleus of human hematopoietic cells. *J. Cell Biochem.* 105, 905-912.
182. Palumbo,A. und Anderson,K. (2011). Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 364, 1046-1060.
183. Papayannopoulou,T. und Nakamoto,B. (1993). Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 9374-9378.

184. Parsch,D., Fellenberg,J., Brummendorf,T.H., Eschlbeck,A.M., und Richter,W. (2004). Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J. Mol. Med.* 82, 49-55.
185. Perez-Illzarbe,M., ez-Campelo,M., Aranda,P., Tabera,S., Lopez,T., del,C.C., Merino,J., Moreno,C., Andreu,E.J., Prosper,F., und Perez-Simon,J.A. (2009). Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion* 49, 1901-1910.
186. Persengiev,S.P., Zhu,X., und Green,M.R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA.* 10, 12-18.
187. Petersen,B.E., Bowen,W.C., Patrene,K.D., Mars,W.M., Sullivan,A.K., Murase,N., Boggs,S.S., Greenberger,J.S., und Goff,J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
188. Plataniias,L.C. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 101, 4667-4679.
189. Ploemacher,R.E., van der Sluijs,J.P., Voerman,J.S., und Brons,N.H. (1989). An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 74, 2755-2763.
190. Prall,W.C., Czibere,A., Jager,M., Spentzos,D., Libermann,T.A., Gattermann,N., Haas,R., und Aivado,M. (2007). Age-related transcription levels of KU70, MGST1 and BIK in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Mech. Ageing Dev.* 128, 503-510.
191. Priestley,G.V., Ulyanova,T., und Papayannopoulou,T. (2007). Sustained alterations in biodistribution of stem/progenitor cells in Tie2Cre+ alpha4(f/f) mice are hematopoietic cell autonomous. *Blood* 109, 109-111.
192. Prosper,F. und Verfaillie,C.M. (2001). Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J. Leukoc. Biol.* 69, 307-316.
193. Punzel,M., Gupta,P., Roodell,M., Mortari,F., und Verfaillie,C.M. (1999). Factor(s) secreted by AFT024 fetal liver cells following stimulation with human cytokines are important for human LTC-IC growth. *Leukemia* 13, 1079-1084.
194. Punzel,M., Liu,D., Zhang,T., Eckstein,V., Miesala,K., und Ho,A.D. (2003). The symmetry of initial divisions of human hematopoietic progenitors is altered only by the cellular microenvironment. *Exp. Hematol.* 31, 339-347.
195. Punzel,M., Zhang,T., Liu,D., Eckstein,V., und Ho,A.D. (2002). Functional analysis of initial cell divisions defines the subsequent fate of individual human CD34(+)CD38(-) cells. *Exp. Hematol.* 30, 464-472.
196. Racke,F.K., Lewandowska,K., Goueli,S., und Goldfarb,A.N. (1997). Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J. Biol. Chem.* 272, 23366-23370.

197. Reinisch,A., Hofmann,N.A., Obenauf,A.C., Kashofer,K., Rohde,E., Schallmoser,K., Flicker,K., Lanzer,G., Linkesch,W., Speicher,M.R., und Strunk,D. (2009). Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo. *Blood* 113, 6716-6725.
198. Renart,J., Reiser,J., und Stark,G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 3116-3120.
199. Reyes,M., Lund,T., Lenvik,T., Aguiar,D., Koodie,L., und Verfaillie,C.M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615-2625.
200. Robinson,S., Niu,T., de,L.M., Ng,J., Yang,H., McMannis,J., Karandish,S., Sadeghi,T., Fu,P., Del,A.M., O'Connor,S., Champlin,R., und Shpall,E. (2005). Ex vivo expansion of umbilical cord blood. *Cytotherapy*. 7, 243-250.
201. Robinson,S.N., Ng,J., Niu,T., Yang,H., McMannis,J.D., Karandish,S., Kaur,I., Fu,P., Del,A.M., Messinger,R., Flagge,F., de,L.M., Decker,W., Xing,D., Champlin,R., und Shpall,E.J. (2006). Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 37, 359-366.
202. Rocha,V., Labopin,M., Sanz,G., Arcese,W., Schwerdtfeger,R., Bosi,A., Jacobsen,N., Ruutu,T., de,L.M., Finke,J., Frassoni,F., und Gluckman,E. (2004). Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 351, 2276-2285.
203. Rosel,M., Khaldoyanidi,S., Zawadzki,V., und Zoller,M. (1999). Involvement of CD44 variant isoform v10 in progenitor cell adhesion and maturation. *Exp. Hematol.* 27, 698-711.
204. Rossi,D.J., Bryder,D., Zahn,J.M., Ahlenius,H., Sonu,R., Wagers,A.J., und Weissman,I.L. (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 9194-9199.
205. Ruzicka,K., Grskovic,B., Pavlovic,V., Qujeq,D., Karimi,A., und Mueller,M.M. (2004). Differentiation of human umbilical cord blood CD133+ stem cells towards myelomonocytic lineage. *Clin. Chim. Acta* 343, 85-92.
206. Sarris,A.H., Broxmeyer,H.E., Wirthmueller,U., Karasavvas,N., Cooper,S., Lu,L., Krueger,J., und Ravetch,J.V. (1993). Human interferon-inducible protein 10: expression and purification of recombinant protein demonstrate inhibition of early human hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* 178, 1127-1132.
207. Satija,N.K., Singh,V.K., Verma,Y.K., Gupta,P., Sharma,S., Afrin,F., Sharma,M., Sharma,P., Tripathi,R.P., und Gurudutta,G.U. (2009). Mesenchymal Stem Cell-based Therapy: A New Paradigm in Regenerative Medicine. *J. Cell Mol. Med.* 13, 4385-4402.
208. Sauvageau,G. und Humphries,R.K. (2010). Medicine. The blood stem cell Holy Grail? *Science* 329, 1291-1292.

209. Schallmoser,K., Bartmann,C., Rohde,E., Reinisch,A., Kashofer,K., Stadelmeyer,E., Drexler,C., Lanzer,G., Linkesch,W., und Strunk,D. (2007). Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* 47, 1436-1446.
210. Schallmoser,K., Rohde,E., Reinisch,A., Bartmann,C., Thaler,D., Drexler,C., Obenauf,A.C., Lanzer,G., Linkesch,W., und Strunk,D. (2008). Rapid Large-Scale Expansion of Functional Mesenchymal Stem Cells from Unmanipulated Bone Marrow without Animal Serum. *Tissue Eng Part C. Methods* 14, 185-196.
211. Schofield,R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.
212. Schwartz,R.E., Reyes,M., Koodie,L., Jiang,Y., Blackstad,M., Lund,T., Lenvik,T., Johnson,S., Hu,W.S., und Verfaillie,C.M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest* 109, 1291-1302.
213. Sensebe,L., Krampera,M., Schrezenmeier,H., Bourin,P., und Giordano,R. (2009). Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 98, 93-107.
214. Shiozawa,Y., Havens,A.M., Pienta,K.J., und Taichman,R.S. (2008). The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia* 22, 941-950.
215. Shirozu,M., Nakano,T., Inazawa,J., Tashiro,K., Tada,H., Shinohara,T., und Honjo,T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.
216. Shpall,E.J., Quinones,R., Giller,R., Zeng,C., Baron,A.E., Jones,R.B., Bearman,S.I., Nieto,Y., Freed,B., Madinger,N., Hogan,C.J., Slat-Vasquez,V., Russell,P., Blunk,B., Schissel,D., Hild,E., Malcolm,J., Ward,W., und McNiece,I.K. (2002). Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 8, 368-376.
217. Shultz,L.D., Lyons,B.L., Burzenski,L.M., Gott,B., Chen,X., Chaleff,S., Kotb,M., Gillies,S.D., King,M., Mangada,J., Greiner,D.L., und Handgretinger,R. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 174, 6477-6489.
218. Signer,R.A., Montecino-Rodriguez,E., Witte,O.N., McLaughlin,J., und Dorshkind,K. (2007). Age-related defects in B lymphopoiesis underlie the myeloid dominance of adult leukemia. *Blood* 110, 1831-1839.
219. Silva,J. und Smith,A. (2008). Capturing pluripotency. *Cell* 132, 532-536.
220. Siminovich,L., Culloch,E.A., und TILL,J.E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J. Cell Physiol* 62, 327-336.
221. Siminovich,L., TILL,J.E., und Culloch,E.A. (1964). Decline in colony-forming ability of marrow cells subjected to serial transplantation into irradiated mice. *J. Cell Physiol* 64, 23-31.
222. Simmons,P.J., Levesque,J.P., und Zannettino,A.C. (1997). Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin. Haematol.* 10, 485-505.

223. Singh,K., Srivastava,A., Mathur,N., Kumar,S., Kumar,L., Mukhopadhyay,A., und Kochupillai,V. (2009). Evaluation of four methods for processing human cord blood and subsequent study of the expansion of progenitor stem cells isolated using the best method. *Cytotherapy* 11, 768-777.
224. Spiegel,A., Kalinkovich,A., Shvitiel,S., Kollet,O., und Lapidot,T. (2008). Stem cell regulation via dynamic interactions of the nervous and immune systems with the microenvironment. *Cell Stem Cell* 3, 484-492.
225. Stadtfeld,M. und Hochedlinger,K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 24, 2239-2263.
226. Stanevsky,A., Shimoni,A., Yerushalmi,R., und Nagler,A. (2011). Cord Blood Stem Cells for Hematopoietic Transplantation. *Stem Cell Rev.* 7, 425-433.
227. Stenderup,K., Justesen,J., Clausen,C., und Kassem,M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33, 919-926.
228. Stier,S., Ko,Y., Forkert,R., Lutz,C., Neuhaus,T., Grunewald,E., Cheng,T., Dombkowski,D., Calvi,L.M., Rittling,S.R., und Scadden,D.T. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J. Exp. Med.* 201, 1781-1791.
229. Stute,N., Holtz,K., Bubenheim,M., Lange,C., Blake,F., und Zander,A.R. (2004). Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp. Hematol.* 32, 1212-1225.
230. Su,R.J., Zhang,X.B., Li,K., Yang,M., Li,C.K., Fok,T.F., James,A.E., Pong,H., und Yuen,P.M. (2002). Platelet-derived growth factor promotes ex vivo expansion of CD34+ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient repopulating cells and formation of adherent cells. *Br. J. Haematol.* 117, 735-746.
231. Suda,T. und Arai,F. (2008). Wnt signaling in the niche. *Cell* 132, 729-730.
232. Sudo,K., Ema,H., Morita,Y., und Nakauchi,H. (2000). Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192, 1273-1280.
233. Sui,X., Krantz,S.B., You,M., und Zhao,Z. (1998). Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* 92, 1142-1149.
234. Sullivan,M.J. (2008). Banking on cord blood stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 8, 555-563.
235. Sundin,M., Ringden,O., Sundberg,B., Nava,S., Gotheström,C., und Le,B.K. (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* 92, 1208-1215.
236. Sutherland,H.J., Eaves,C.J., Eaves,A.C., Dragowska,W., und Lansdorp,P.M. (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 74, 1563-1570.

237. Sutherland,H.J., Lansdorp,P.M., Henkelman,D.H., Eaves,A.C., und Eaves,C.J. (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 3584-3588.
238. Szabo,E., Rampalli,S., Risueno,R.M., Schnerch,A., Mitchell,R., Fiebig-Comyn,A., Levadoux-Martin,M., und Bhatia,M. (2010). Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 25, 521-525.
239. Taichman,R.S. (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 105, 2631-2639.
240. Takahashi,K., Tanabe,K., Ohnuki,M., Narita,M., Ichisaka,T., Tomoda,K., und Yamanaka,S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
241. Takahashi,K. und Yamanaka,S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
242. Tarnok,A., Ulrich,H., und Bocsi,J. (2010). Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A* 77, 6-10.
243. Tavor,S., Petit,I., Porozov,S., Goichberg,P., Avigdor,A., Sagiv,S., Nagler,A., Naparstek,E., und Lapidot,T. (2005). Motility, proliferation, and egress to the circulation of human AML cells are elastase dependent in NOD/SCID chimeric mice. *Blood* 106, 2120-2127.
244. Terada,N., Hamazaki,T., Oka,M., Hoki,M., Mastalerz,D.M., Nakano,Y., Meyer,E.M., Morel,L., Petersen,B.E., und Scott,E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545.
245. Thomas,E.D., Lochte,H.L., Lu,W.C., und Ferrebee,J.W. (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 257, 491-496.
246. Thomson,J.A., Itskovitz-Eldor,J., Shapiro,S.S., Waknitz,M.A., Swiergiel,J.J., Marshall,V.S., und Jones,J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
247. Tirumurugan,K.G., Jude,J.A., Kang,B.N., Panettieri,R.A., Walseth,T.F., und Kannan,M.S. (2007). TNF-alpha induced CD38 expression in human airway smooth muscle cells: role of MAP kinases and transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 292, L1385-L1395.
248. Tolar,J., Le,B.K., Keating,A., und Blazar,B.R. (2010). Hitting the Right Spot with Mesenchymal Stromal Cells (MSCs). *Stem Cells* 28, 1446-1455.
249. Turner,J.J., Hughes,A.M., Kricker,A., Milliken,S., Grulich,A., Kaldor,J., und Armstrong,B. (2004). Use of the WHO lymphoma classification in a population-based epidemiological study. *Ann. Oncol.* 15, 631-637.
250. von Zglinicki,T. und Martin-Ruiz,C.M. (2005). Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr. Mol. Med.* 5, 197-203.

251. Wagner,W., Ansorge,A., Wirkner,U., Eckstein,V., Schwager,C., Blake,J., Miesala,K., Selig,J., Saffrich,R., Ansorge,W., und Ho,A.D. (2004). Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. *Blood* 104, 675-686.
252. Wagner,W., Bork,S., Horn,P., Kronic,D., Walenda,T., Diehlmann,A., Benes,V., Blake,J., Huber,F.X., Eckstein,V., Boukamp,P., und Ho,A.D. (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS. ONE*. 4, e5846.
253. Wagner,W., Feldmann,R.E., Jr., Seckinger,A., Maurer,M.H., Wein,F., Blake,J., Krause,U., Kalenka,A., Burgers,H.F., Saffrich,R., Wuchter,P., Kuschinsky,W., und Ho,A.D. (2006). The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations- Evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp Hematol* 34, 536-548.
254. Wagner,W. und Ho,A.D. (2007). Mesenchymal stem cell preparations-comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 3, 239-248.
255. Wagner,W., Ho,A.D., und Zenke,M. (2010). Different Facets of Aging in Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part B Rev*. 16, 445-453.
256. Wagner,W., Horn,P., Castoldi,M., Diehlmann,A., Bork,S., Saffrich,R., Benes,V., Blake,J., Pfister,S., Eckstein,V., und Ho,A.D. (2008a). Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells - a Continuous and Organized Process. *PLoS ONE* 5, e2213.
257. Wagner,W., Roderburg,C., Wein,F., Diehlmann,A., Frankhauser,M., Schubert,R., Eckstein,V., und Ho,A.D. (2007a). Molecular and Secretory Profiles of Human Mesenchymal Stromal Cells and their Abilities to Maintain Primitive Hematopoietic Progenitors. *Stem Cells* 10, 2638-2657.
258. Wagner,W., Saffrich,R., und Ho,A.D. (2008b). The stromal activity of mesenchymal stromal cells. *Transf. med. and Hemotherapy* 35, 185-193.
259. Wagner,W., Saffrich,R., Wirkner,U., Eckstein,V., Blake,J., Ansorge,A., Schwager,C., Wein,F., Miesala,K., Ansorge,W., und Ho,A.D. (2005a). Hematopoietic progenitor cells and cellular microenvironment: behavioral and molecular changes upon interaction. *Stem Cells* 23, 1180-1191.
260. Wagner,W., Wein,F., Roderburg,C., Saffrich,R., Diehlmann,A., Eckstein,V., und Ho,A.D. (2007b). Adhesion of human hematopoietic progenitor cells to mesenchymal stromal cells involves CD44. *Cells Tissues. Organs* 188, 160-169.
261. Wagner,W., Wein,F., Roderburg,C., Saffrich,R., Faber,A., Krause,U., Schubert,M., Benes,V., Eckstein,V., Maul,H., und Ho,A.D. (2007c). Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. *Exp. Hematol.* 35, 314-325.
262. Wagner,W., Wein,F., Seckinger,A., Frankhauser,M., Wirkner,U., Krause,U., Blake,J., Schwager,C., Eckstein,V., Ansorge,W., und Ho,A.D. (2005b). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33, 1402-1416.

263. Walenda,T., Bokermann,G., Jost,E., Galm,O., Schellenberg,A., Koch,C.M., Piroth,D.M., Drescher,W., Brümmendorf,T.H., und Wagner,W. (2011a). Serum after autologous transplantation stimulates proliferation and expansion of human hematopoietic progenitor cells. *PLoS ONE* 6(3): e18012..
264. Walenda,T., Bork,S., Horn,P., Wein,F., Saffrich,R., Diehlmann,A., Eckstein,V., Ho,A.D., und Wagner,W. (2010). Co-Culture with Mesenchymal Stromal Cells Increases Proliferation and Maintenance of Hematopoietic Progenitor Cells. *J. Cell Mol. Med.* 14, 337-350.
265. Walenda,T.*, Bokermann,G.*, Ventura Ferreira,M.S., Piroth,D.M., Hieronymus,T., Neuss,S., Zenke,M., Ho,A.D., Müller,A.M., Wagner,W., und (* equal contribution) (2011b). Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* 36(4), 617-628.
266. Wallace,P.K., Tario,J.D., Jr., Fisher,J.L., Wallace,S.S., Ernstoff,M.S., und Muirhead,K.A. (2008). Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: monitoring proliferation by dye dilution. *Cytometry A* 73, 1019-1034.
267. Wang,S., Nademanee,A., Qian,D., Dagis,A., Park,H.S., Fridey,J., Smith,E., Snyder,D., Somlo,G., Stein,A., Rosenthal,J., Falk,P., Kogut,N., Palmer,J., Gaal,K., Kim,Y., Bhatia,R., Yuan,S., Kay,C., Weiss,L., und Forman,S. (2007). Peripheral blood hematopoietic stem cell mobilization and collection efficacy is not an independent prognostic factor for autologous stem cell transplantation. *Transfusion* 47, 2207-2216.
268. Wang,X.Q., Duan,X.M., Liu,L.H., Fang,Y.Q., und Tan,Y. (2005). Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 37, 379-385.
269. Wang,Y., Kellner,J., Liu,L., und Zhou,D. (2011). Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Promotes Ex Vivo Hematopoietic Stem Cell Expansion. *Stem Cells Dev.* 20, 1143-1152.
270. Wein,F., Pietsch,L., Saffrich,R., Wuchter,P., Walenda,T., Bork,S., Horn,P., Diehlmann,A., Eckstein,V., Ho,A., und Wagner,W. (2010). N-Cadherin is expressed on Human Hematopoietic Progenitor Cells and Mediates Interaction with Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Research* 4, 129-139.
271. Weisel,K.C., Moore,M.A., Kanz,L., und Mohle,R. (2009). Extended in vitro expansion of adult, mobilized CD34+ cells without significant cell senescence using a stromal cell coculture system with single cytokine support. *Stem Cells Dev.* 18, 229-234.
272. Weissinger,E.M., Zurbig,P., und Ganser,A. (2009). Proteomics studies after hematopoietic stem cell transplantation. *Methods Mol. Biol.* 506, 437-452.
273. Weissman,I.L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442-1446.
274. Wernig,M., Lengner,C.J., Hanna,J., Lodato,M.A., Steine,E., Foreman,R., Staerk,J., Markoulaki,S., und Jaenisch,R. (2008a). A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat. Biotechnol.* 26, 916-924.
275. Wernig,M., Meissner,A., Cassady,J.P., und Jaenisch,R. (2008b). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2, 10-12.

276. Wickenhauser,C. (2002). [Hematopoietic stem cells and hematopoietic neoplasias]. *Pathologe* 23, 457-464.
277. Wilkinson,M.G. und Millar,J.B. (2000). Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J.* 14, 2147-2157.
278. Wilson,A., Laurenti,E., Oser,G., van der Wath,R.C., Blanco-Bose,W., Jaworski,M., Offner,S., Dunant,C.F., Eshkind,L., Bockamp,E., Lio,P., Macdonald,H.R., und Trumpp,A. (2008). Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell* 135, 1118-1129.
279. Wilson,A., Murphy,M.J., Oskarsson,T., Kaloulis,K., Bettess,M.D., Oser,G.M., Pasche,A.C., Knabenhans,C., Macdonald,H.R., und Trumpp,A. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 18, 2747-2763.
280. Wilson,A. und Trumpp,A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 93-106.
281. Xie,Y., Yin,T., Wiegraebe,W., He,X.C., Miller,D., Stark,D., Perko,K., Alexander,R., Schwartz,J., Grindley,J.C., Park,J., Haug,J.S., Wunderlich,J.P., Li,H., Zhang,S., Johnson,T., Feldman,R.A., und Li,L. (2009). Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* 457(7225), 97-101.
282. Yadlapalli,S., Cheng,J., und Yamashita,Y.M. (2011). Drosophila male germline stem cells do not asymmetrically segregate chromosome strands. *J. Cell Sci.* 124, 933-939.
283. Yahata,T., Muguruma,Y., Yumino,S., Sheng,Y., Uno,T., Matsuzawa,H., Ito,M., Kato,S., Hotta,T., und Ando,K. (2008). Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells* 26, 3228-3236.
284. Yamaguchi,M., Hirayama,F., Murahashi,H., Azuma,H., Sato,N., Miyazaki,H., Fukazawa,K., Sawada,K., Koike,T., Kuwabara,M., Ikeda,H., und Ikebuchi,K. (2002). Ex vivo expansion of human UC blood primitive hematopoietic progenitors and transplantable stem cells using human primary BM stromal cells and human AB serum. *Cytotherapy.* 4, 109-118.
285. Yamanaka,S. (2009). A fresh look at iPS cells. *Cell* 137, 13-17.
286. Yoder,M.C. und Williams,D.A. (1995). Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 23, 961-967.
287. Yoshimura,C., Nomura,S., Katsura,K., Yamaguchi,K., und Fukuhara,S. (2000). Thrombopoietin levels in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang.* 78, 106-112.
288. Zhang,C.C., Kaba,M., Ge,G., Xie,K., Tong,W., Hug,C., und Lodish,H.F. (2006a). Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 12, 240-245.
289. Zhang,C.C., Kaba,M., Iizuka,S., Huynh,H., und Lodish,H.F. (2008). Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood* 111, 3415-3423.

- 290. Zhang,J. und Li,L. (2008). Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J. Biol. Chem.* 283, 9499-9503.
- 291. Zhang,J., Niu,C., Ye,L., Huang,H., He,X., Tong,W.G., Ross,J., Haug,J., Johnson,T., Feng,J.Q., Harris,S., Wiedemann,L.M., Mishina,Y., und Li,L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.
- 292. Zhang,X.B., Li,K., Fok,T.F., Li,C.K., James,A.E., Lam,A.C., Lee,S.M., und Yuen,P.M. (2002). Cobblestone area-forming cells, long-term culture-initiating cells and NOD/SCID repopulating cells in human neonatal blood: a comparison with umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 30, 557-564.
- 293. Zhang,Y., Chai,C., Jiang,X.S., Teoh,S.H., und Leong,K.W. (2006b). Co-culture of Umbilical Cord Blood CD34(+) Cells with Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng* 12, 2161-2170.
- 294. Zhou,S., Greenberger,J.S., Epperly,M.W., Goff,J.P., Adler,C., Leboff,M.S., und Glowacki,J. (2008). Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* 7, 335-343.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang Wagner, Herrn Prof. Dr. Anthony D. Ho und Herrn Prof. Dr. Martin Zenke für ihre Betreuung und die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation anzufertigen. Herrn Wagner danke ich außerdem für die Einführung in das spannende Thema der hämatopoetischen Stammzellforschung, für viele Anregungen und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Mein weiterer Dank gilt allen Kollegen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Stammzellbiologie und Cellular Engineering, namentlich Dr. Carmen Koch, Anne Schellenberg, Dominik Cholewa, Sylvia Joussen, Kristina Reck, Michael Lohmann, Dr. Hatim Hemeda, Carola Weidner und Kristin Moser sowie Mónica Ventura Ferreira und Dr. Sabine Neuss-Stein aus der Abteilung für Pathologie für die große Hilfsbereitschaft, ständige Ratschläge und hervorragende Zusammenarbeit. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Zellbiologie und Pathologie am Universitätsklinikum Aachen für die gute Zusammenarbeit und die uneingeschränkten Nutzungsmöglichkeiten von Räumen und Gerätschaften.

Für ständige Ratschläge, Hilfsbereitschaft und beste Zusammenarbeit möchte ich überdies Dr. Simone Bork, Dr. Patrick Horn, Dr. Frederik Wein, Anke Diehlmann, Abraham Zepeda-Moreno, Larissa Pietsch, Dr. Isabelle Hellwig, Dr. Isabel Taubert, Annette Ludwig, Dr. Rainer Saffrich, Dr. Volker Eckstein, Kerstin Wörner, Katrin Miesala und den anderen Mitarbeitern der medizinischen Klinik V am Universitätsklinikum Heidelberg danken, wo ein Teil dieser Arbeit entstanden ist.

Herrn PD Dr. Edgar Jost, Herrn PD Dr. Oliver Galm und Herrn Prof. Dr. Tim H. Brümmendorf aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie gilt mein Dank für die Bereitstellung der Blutproben, die exzellente Zusammenarbeit und spannende wissenschaftliche Diskussionen. Danken möchte ich auch allen anderen Kooperationspartnern, so Herrn PD Dr. Wolf Drescher aus der Klinik für Orthopädie für die Bereitstellung von Knochenmaterial, Frau Dr. Daniela Piroth und den Hebammen der Frauenklinik für die Bereitstellung von Nabelschnurblut, den Mitarbeitern der Tierversuchskunde, Prof. Dr. Albrecht Müller und den Mitarbeitern des ZEMM Würzburg für die Bereitstellung der Versuchstiere sowie Dr. Andreas Bosio und Dr. Ute Bissels von Miltenyi Biotec für die gute Kollaboration und anregende Diskussionen. Außerdem danke ich den Mitarbeitern des IZKF am Uniklinikum Aachen für die Bereitstellung und Nutzungsmöglichkeit der durchflusszytometrischen Anlage.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Gudrun für ihr Vertrauen und ihre großartige wissenschaftliche und private Unterstützung sowie meinen Eltern und Großeltern, die mir immer zur Seite stehen und so die Entstehung dieser Arbeit mit ermöglicht haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Walenda
Geburtsdatum: 19.04.1981
Geburtsort: Bielefeld
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Matthiashofstraße 18, 52064 Aachen
Familienstand: verheiratet

Promotion

Seit Mai 2009 Fortsetzung des Promotionsvorhabens im Lehr- und Forschungsgebiet „Stammzellbiologie und Cellular Engineering“, Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technologien, Universitätsklinikum Aachen

Oktober 2007 – April 2009 Start des Promotionsvorhabens in der Medizinischen Klinik V, Universitätsklinikum der Universität Heidelberg zu dem Thema: „*In vitro* Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen durch Komponenten der Stammzellnische“

Berufliche Tätigkeit

Juli 2007 – Sept. 2007 Biotec GmbH, Gütersloh, Umwelt, Analytik, Beratung

Studium

Juni 2006 – Juni 2007 Diplomarbeit über das Thema: „Transmission von Viren über raumluftechnische Anlagen“ am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin des Herz- und Diabeteszentrums NRW, Universitätsklinikum der Ruhr-Universität Bochum in Bad Oeynhausen

Oktober 2001 – Juni 2007 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld Abschluss: Diplom, Note: Sehr gut (1,3)

Zivildienst

August 2000 – Juli 2001 Zivildienst städtische Krankenanstalten Bielefeld Mitte, Augenklinik

Schulbildung

August 1991 – Juni 2000 Brackweder Gymnasium Bielefeld, Abschluss Abitur, Note: Gut (1,8)

Sept. 1987 – Juli 1991 Grundschule

10 Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten

1. Walenda,T., Bokermann,G., Jost,E., Galm,O., Schellenberg,A., Koch,C.M., Piroth,D.M., Drescher,W., Brümmendorf,T.H. und Wagner,W. (2011). Serum after autologous transplantation stimulates proliferation and expansion of human hematopoietic progenitor cells. PLoS ONE 6(3): e18012. doi:10.1371/journal.pone.0018012.
2. Walenda,T.*, Bokermann,G.*, Ventura Ferreira,M.S., Piroth,D.M., Hieronymus,T., Neuss,S., Zenke,M., Ho,A.D., Müller,A.M. und Wagner,W (* equal contribution) (2011). Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. Exp Hematol. 39(6), 617-628.
3. Walenda,T., Bork,S., Horn,P., Wein,F., Saffrich,R., Diehlmann,A., Eckstein,V., Ho,A.D. und Wagner,W. (2010). Co-Culture with Mesenchymal Stromal Cells Increases Proliferation and Maintenance of Hematopoietic Progenitor Cells. J. Cell Mol. Med. 14, 337-350.
4. Cholewa,D., Stiehl,T., Schellenberg,A., Bokermann,G., Joussen S, Koch C, Walenda T, Pallua,N., Marciniak-Czochra,A., Suschek,C.V. und Wagner W (2010). Expansion of adipose mesenchymal stromal cells is affected by human platelet lysate and plating density. Cell Transplant. *Epub ahead of print*.
5. Horn,P., Bokermann,G., Cholewa,D., Bork,S., Walenda,T., Koch,C., Drescher,W., Hutschenreuther,G., Zenke,M., Ho,A. und Wagner W (2010). Comparison of Individual Platelet Lysates for Isolation of Human Mesenchymal Stromal Cells. Cytotherapy 12, 888-898.
6. Wein,F., Pietsch,L., Saffrich,R., Wuchter,P., Walenda,T., Bork,S., Horn,P., Diehlmann,A., Eckstein,V., Ho,A. und Wagner,W. (2010). N-Cadherin is expressed on Human Hematopoietic Progenitor Cells and Mediates Interaction with Human Mesenchymal Stromal Cells. Stem Cell Research 4, 129-139.
7. Wagner,W., Bork,S., Horn,P., Krunic,D., Walenda,T., Diehlmann,A., Benes,V., Blake,J., Huber,F.X., Eckstein,V., Boukamp,P. und Ho,A.D. (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. PLoS. ONE. 4, e5846.
8. Horn,P., Bork,S., Diehlmann,A., Walenda,T., Eckstein,V., Ho,A.D. und Wagner,W. (2008). Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. Cytotherapy 10, 676-685.
9. Bermpohl, A., Weißhaar, I., Walenda, T., Kleesiek, K. und Dreier, J. (2007). Virus transmission via HVAC systems and inactivation using UVC irradiation. VDI Berichte – VDI; 1999.

Vorträge

30. November 2010 Expansion of CB-HSCs with human MSCs (2010). Wagner W., Koch C., Walenda T. und Bokermann G. *3rd Joint Meeting of the CB-HERMES Consortium*, Hannover.
16. – 17. April 2010 *Ex vivo* expansion of human cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitor cells (2010). Walenda T., Bork S., Horn P., Bokermann G., Wein F., Diehlmann A., Joussen S., Drescher W., Piroth D. und Wagner W. *Interne Klausurtagung des Stammzellnetzwerkes NRW*, Herne.
03. Juli 2009 Expansion von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut durch Kokultur mit mesenchymalen Stromazellen (2009). Wagner W., Walenda T. und Horn P.. *1st Joint Meeting of the CB-HERMES Consortium*, Würzburg.
10. – 14. Oktober 2008 Maintenance of primitive hematopoietic progenitor cells is influenced by CD44, ITGB1, FN1 and MAPK1 (2008). Walenda T., Wein F., Bork S., Eckstein V., Wuchter P., Horn P., Diehlmann A., Ho A.D. und Wagner W. *Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie*, Wien, Österreich.

Posterpräsentationen

25. – 28. August 2011 Systemically released factors stimulate proliferation and expansion of human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells after autologous transplantation (2011). Walenda T., Bokermann G., Jost E., Galm O., Schellenberg A., Koch C.M., Piroth D.M., Drescher W., Brümmendorf T.H. und Wagner W. *40th Annual Scientific Meeting of the Society for Hematology and Stem Cells (ISEH)*, Vancouver, Kanada.
11. – 14. Juli 2010 *In vitro* expansion of human cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitor cells under different culture conditions (2010). Walenda T., Bork S., Horn P., Bokermann G., Drescher W., Piroth D., Ho A.D. und Wagner W. *3rd International Congress on Stem Cell and Tissue formation*, Dresden.

02. – 06. Oktober 2009 Co-Culture with Mesenchymal Stromal Cells Increases Proliferation and Maintenance of Hematopoietic Progenitor Cells (2009). Walenda T., Bork S., Horn P., Wein F., Saffrich R., Diehlmann A., Eckstein V., Ho A.D. und Wagner W. *Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie*, Heidelberg / Mannheim.
08. – 11. Juli 2009 Cord Blood Expansion on Mesenchymal Stromal Cells: Proliferation and Self-Renewal of Primitive Immunophenotype are regulated by Cellular Aging and Adhesion Proteins (2009). Walenda T., Bork S., Horn P., Wein F., Saffrich R., Diehlmann A., Eckstein V., Ho A.D. und Wagner W. *7th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR)*, Barcelona, Spanien.
24. – 25. März 2009 Cord Blood Expansion on Mesenchymal Stromal Cells: Proliferation and Self-Renewal of Primitive Immunophenotype are regulated by Cellular Aging and Adhesion Proteins (2009). Walenda T., Bork S., Horn P., Wein F., Saffrich R., Diehlmann A., Eckstein V., Ho A.D. und Wagner W. *Stem Cell Network North Rhine Westphalia, 5th International Meeting*, Aachen.
06. – 09. Juli 2008 Maintenance of human hematopoietic progenitor cells upon co-culture with mesenchymal stromal cells is a complex process that involves various adhesion proteins (2008). Walenda T., Wein F., Bork S., Eckstein V., Ho A.D. und Wagner W. *2nd International Congress on Stem Cell and Tissue formation*, Dresden.
14. – 18. Juni 2008 The role of specific adhesion proteins for maintenance of hematopoietic progenitor cells upon co-culture with stromal cells (2008). Walenda T., Wein F., Bork S., Horn P., Diehlmann A., Saffrich R., Wuchter P., Eckstein V., Ho A.D. und Wagner W. *Wilsede Meeting XVII*, Wilsede.