

**Der Einfluss von SCF und anderer Zytokine auf das
Adhäsionsverhalten hämatopoetischer Stammzellen sowie
deren Engraftment und Organverteilung nach
Transplantation in NOD/SCID Mäusen**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.) der naturwissenschaftlichen
Fakultät III-Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Diana Drewel

aus Nürnberg

2006

Promotionsgesuch eingereicht am

29.November 2006

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof.Dr.rer.nat. Charalampos Asslanidis, Institut für Klinische Chemie
PD Dr.med Burkhard Hennemann, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I,
Abteilung Hämatologie und Onkologie

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof.Dr.rer.nat. Wilhelm Minuth
1.Gutachter (1.Prüfer):	Prof.Dr.rer.nat. Charalampos Aslanidis
2.Gutachter (2.Prüfer):	PD Dr. med. Burkhard Hennemann
3.Prüfer:	Prof.Dr.rer.nat. Ralph Witzgall
Ersatzperson:	Prof.Dr.rer.nat. Armin Kurtz

DISSERTATION

Durchgeführt in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie in der Klinik und
Poliklinik für Innere Medizin I der Universität Regensburg
unter Anleitung von

Prof Dr.rer.nat Charalampos Asslanidis

Institut für klinische Chemie

und

PD Dr. med Burkhard Hennemann

Abteilung für Hämatologie und Onkologie / Innere Med I

1	EINLEITUNG	6
1.1	Stammzelldefinition	6
1.1.1	Hämatopoetische Stammzellen	6
1.1.2	Differenzierung der Stammzellen.....	8
1.2	Stammzelltransplantation.....	9
1.3	Hämatopoese.....	12
1.4	Homing.....	13
1.5	Adhäsionsmoleküle	15
1.4.1	Integrine.....	15
1.5	Zytokine	18
1.5.1	SCF und sein Rezeptor c-Kit.....	19
1.5.2	Hepatocyte growth factor /Scatter factor (HGF) und sein Rezeptor c-met	21
1.5.3	Flt-3 Ligand (FL) und sein Rezeptor Flt-3 (CD135).....	22
1.6	Xenotransplantation in NOD/SCID Mäuse.....	23
1.7	Stammzellplastizität.....	24
1.8	Zielsetzung	26
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Material	28
2.1.1	Geräte.....	28
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	29
2.1.3	Zytokine	29
2.1.4	Zelllinien.....	30
2.1.5	Antikörper.....	30
2.1.6	Zellkulturmedien und Zusätze	32
2.1.7	Reagenzien und Chemikalien	33
2.1.8	PCR-Oligonukleotide	34
2.1.9	Puffer	34
2.1.10	Mausstämme	35
2.2	Methoden	35
2.2.1	Zelllinien.....	35
2.2.2	Primäre humane Zellen.....	36
2.2.3	Durchflusszytometer	40
2.2.4	Adhäsionsassay	42
2.2.5	Xenotransplantationsmodell.....	45
2.2.6	Statistik	51
3	ERGEBNISSE.....	52

3.1	Etablierung eines durchflusszytometrischen Ligandenassays	52
3.1.1	Ermittlung des optimalen Liganden.....	53
3.1.2	Expression von c-kit (SCF), c-met (HGF/SF), FLT-3 (FLT-3 Ligand) und KDR (VEGF) auf der Oberfläche hämatopoetischer Zelllinien	54
3.2	Der Effekt von SCF, HGF/SF, Flt-3 Ligand und VEGF auf die integrinvermittelte Ligandenbindung der hämatopoetischen Zelllinien KG-1, TF-1 und Mo7e	54
3.2.1	Analyse der SCF-induzierten Adhäsion auf verschiedenen primären humanen Zellen	57
3.3	Blockade der KG-1 Adhäsion durch Inkubation mit blockierenden Antikörpern gegen VLA-4 und VLA-5	59
3.4	Xenotransplantation	62
3.4.1	SCF verbessert das Langzeitengraftment humaner Stammzellen sechs Wochen nach Transplantation im NOD/SCID Mausmodell	63
3.4.2	Nachweis humaner Zellen in nicht-hämatopoetischen Organen der transplantierten NOD/SCID Mäusen	68
3.4.3	Bestimmung des Anteils humaner Zellen in Leber und Niere der transplantierten Mäuse.....	71
3.4.4	Nachweis humaner Albumin-exprimierender Zellen in der murinen Leber	72
4	DISKUSSION.....	74
4.1	Ligandenassay	75
4.2	Xenotransplantation in NOD/SCID- Mäuse.....	78
4.3	Nachweis humaner Zellen in murinem Gewebe	80
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	84
7	ANHANG	97
7.1	Abkürzungsverzeichnis	97
7.2	Abbildungsverzeichnis	101
7.3	Tabellenverzeichnis	102
7.4	Publikationen.....	103

1 Einleitung

1.1 Stammzelldefinition

Stammzellen sind unreife Zellen, deren Entwicklungsschicksal im Körper noch nicht festgelegt ist. Sie werden, je nach ihrem Differenzierungspotential, als totipotent oder pluripotent bezeichnet. Man unterscheidet zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen können dem Embryo im so genannten Blastocystenstadium entnommen werden. In dieser Phase sind die Zellen nicht mehr totipotent, sondern pluripotent. Das heißt, aus ihnen kann kein Lebewesen mehr entstehen. Dennoch können diese Zellen zu mehr als 200 verschiedenen Gewebetypen heranreifen. Adulte Stammzellen wurden bisher in rund 20 verschiedenen Geweben des erwachsenen, menschlichen Körpers, sowie in der Nabelschnur von Neugeborenen nachgewiesen. Sie können sich in den bislang zur Verfügung stehenden Testsystemen im Vergleich zu embryonalen Stammzellen nur noch begrenzt vermehren und differenzieren. Innerhalb der adulten Stammzellen spielen heutzutage vor allem die hämatopoetischen Stammzellen eine wichtige klinische und therapeutische Rolle.

1.1.1 Hämatopoetische Stammzellen

Alexander Maximow, ein Militärarzt aus St. Petersburg, war 1909 einer der Ersten, der vermutete, dass eine hämatopoetische Stammzelle (HSZ) existiert. Sie gleicht morphologisch einem Lymphozyten, besitzt zusätzlich aber die Fähigkeit durch den Blutstrom in mikroökologische Nischen einzuwandern, in denen es diesen Zellen möglich ist zu proliferieren und zu den Blutzellen der einzelnen Linien zu differenzieren. Hämatopoetische Stammzellen sind unreife Vorläuferzellen der blutbildenden Zellen. Sie besitzen zwei wesentliche Eigenschaften: zum Einen können sie sich selbst erneuern, zum Anderen können sie zu den einzelnen Zellen der verschiedenen Blutzellreihen ausreifen (1;2). Diese Stammzellen, die aufgrund der beschriebenen Fähigkeiten auch als pluripotente Zellen bezeichnet werden, befinden sich unter physiologischen Bedingungen nahezu ausschließlich im Knochenmark (KM) und bilden hier den Stammzellpool, der die Hämatopoese des

Individuums während seiner gesamten Lebensspanne aufrecht erhält. Jede Stammzelle hat die Fähigkeit, viele Millionen von Nachkommen zu bilden. Diese reifen heran, um die natürlich absterbenden, lebensnotwendigen Blutzellen regelmäßig zu ersetzen. Diese Differenzierung in die verschiedenen Blutzelllinien wird unter anderem durch verschiedene wachstumsstimulierende Faktoren, so genannte Zytokine (siehe Punkt 1.5), gesteuert. Die ausgereiften Blutzellen verlassen schließlich das KM und wandern ins periphere Blut.

Anfang der 90er gelang es erstmals, den Immunphänotyp hämatopoetischer Stammzellen näher zu charakterisieren. Calvin et al. generierten einen Antikörper, der an ein Epitop auf frühen hämatopoetischen Zellen im menschlichen Knochenmark bindet (3). Etwa 1-3% der im Knochenmark vorhandenen Zellen sowie 0,5% der im peripheren Blut enthaltenen Zellen exprimieren dieses, als CD34 bezeichnetes, Epitop (4). Innerhalb dieser CD34⁺ Zellen sind vor allem hämatopoetische Stammzellen sowie multipotente Vorläuferzellen, die zu diesem Zeitpunkt ein bereits eingeschränktes Differenzierungspotential besitzen, angereichert. Außerdem konnten innerhalb dieser Zellpopulation lymphatische Vorläuferzellen identifiziert werden. Weniger als 1% dieser im Knochenmark vorhandenen CD34⁺ Zellen sind Stammzellen, welche die Fähigkeit besitzen, nach einer Transplantation im Empfängerorganismus zu Blutzellen der verschiedenen Linien auszureifen (5). Um eine weitere Charakterisierung dieser sehr frühen Vorläuferzellen zu ermöglichen, wurde versucht, weitere phänotypische Charakterisationsmerkmale zu entdecken. Es konnte gezeigt werden, dass CD38 in enger Verknüpfung mit dem Differenzierungspotential der Zellen steht. Circa 1% der CD34⁺ Zellen besitzen kein CD38 Oberflächenantigen. Diese Zellen sind im Vergleich zu CD34⁺/CD38⁺ noch nicht auf einen bestimmten Differenzierungsweg festgelegt und besitzen zudem noch ein beträchtliches Selbsterneuerungsvermögen (6). Um diese CD34⁺/CD38⁻ Zellgruppe besser zu charakterisieren, wurde HLA-DR untersucht. Es gelang zu zeigen, dass CD34⁺/CD38⁻HLA-DR⁻ Zellen im Vergleich zu HLA-DR⁺ Zellen zusätzlich zur Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen über das Potential zur Generierung von Stromazellen verfügen (7). Außerdem konnte gezeigt werden, dass vor allem die CD34⁺/KDR⁺ Zellgruppe pluripotente Stammzellen enthält. KDR ist der Rezeptor für VEGF (vascular endothelial growth factor) und macht 0,2-0,4 Prozent aller CD34⁺ Zellen aus (8). Das Oberflächenprotein CD117 (c-kit) diente zusätzlich der Charakterisation

hämatopoetischer Stammzellen. Außerdem existieren noch weitere Marker, wie CD33 und Thy-1, auf der Zelloberfläche der CD34⁺ Zellen, die für Stammzellen mit hohem Differenzierungs- und Selbsterneuerungspotential typisch sind (9).

1.1.2 Differenzierung der Stammzellen

Alle zellulären Bestandteile des Blutes entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Die weitgehendsten Untersuchungen diesbezüglich wurden im murinen System durchgeführt. Umfangreiche Transplantationsexperimente konnten zeigen, dass das Stammzellkompartiment der Maus heterogen ist. Verschiedene Klassen muriner hämatopoetischer Zellen mit unterschiedlicher Proliferations- und Differenzierungskapazität sind an der Repopulation syngener Rezipienten beteiligt. Dabei können anhand phänotypischer Marker so genannte langzeitrepopulierende Blutstammzellen (*long-term repopulating stem cells*, LRC) die eine potentielle lebenslange Aktivität besitzen, von kurzzeitrepopulierenden Stammzellen (*short-term repopulating stem cells*, STRC) unterschieden werden. (Abbildung 1). Diese STRC besitzen eine zeitlich begrenzte Aktivität während der ersten vier Wochen nach der Transplantation. Somit können sie vorübergehend die Hämatopoese in myeloablativ bestrahlten Empfängern ersetzen. Diese Zellen generieren Vorläuferzellen mit zunehmend eingeschränkter Differenzierungs- und Proliferationskapazität. Es wird vermutet, dass diese Zellen auch im Menschen existieren und von klinischer Bedeutung sind. Allerdings konnten im Unterschied zum murinen Modell im Menschen bisher weder morphologische noch phänotypische Kriterien gezeigt werden, die eine exakte Isolation langzeit- oder kurzzeitrepopulierender Stammzellen wie in der Maus ermöglichen würde.

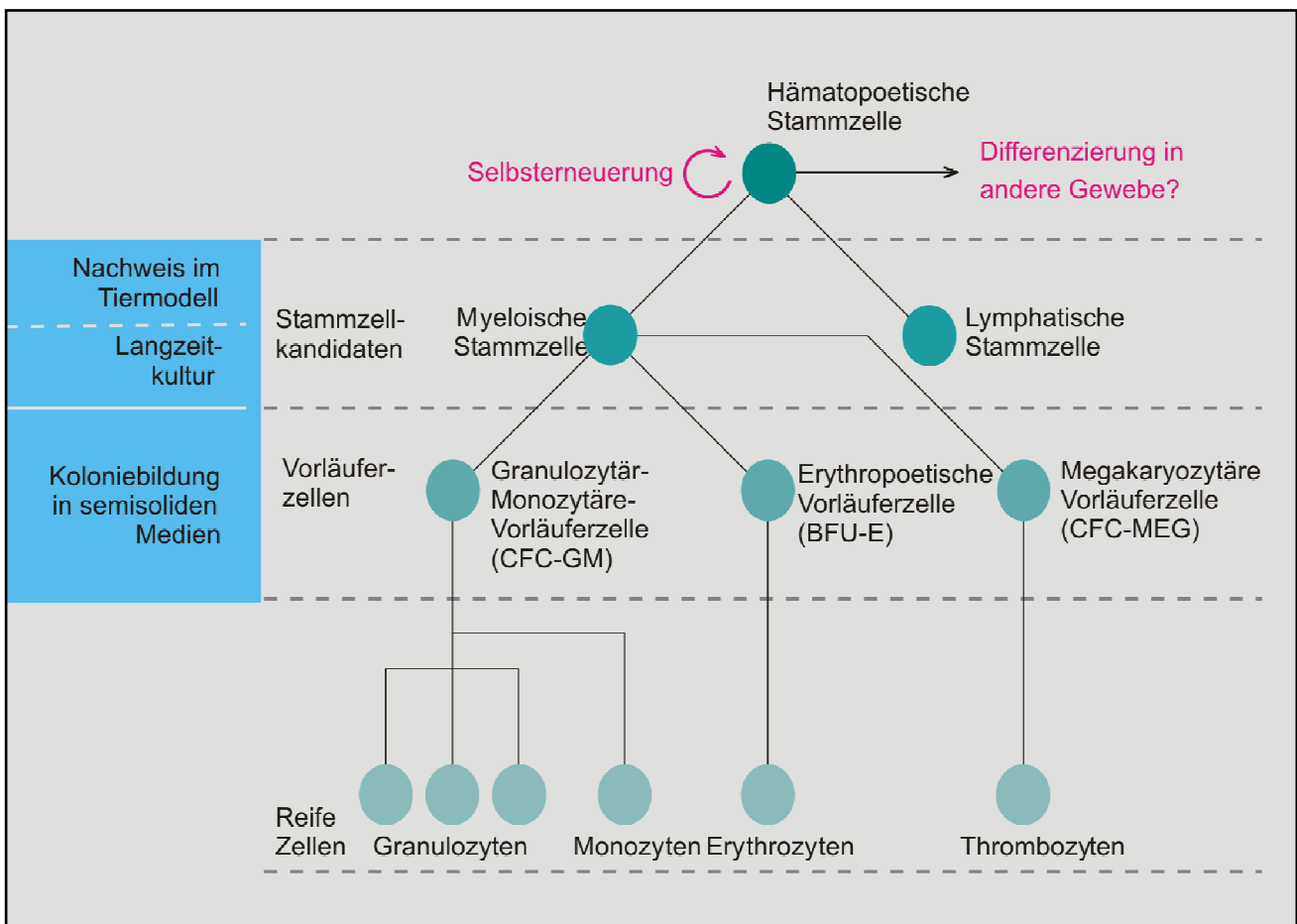


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Stammzellendifferenzierung

Die pluripotente Stammzelle, mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, erzeugt durch Teilung zwei spezialisierte langzeitrepopulierende Stammzellen: eine lymphatische sowie eine myeloische Vorläuferzelle. Aus der lymphatischen Vorläuferzelle gehen später B- und T-Zellen hervor, während sich die myeloische Stammzelle in einem weiteren Schritt zu verschiedenen kurzzeitrepopulierenden Zellen entwickelt. Es entstehen Granulozytäre-Monozytäre-Vorläuferzellen, Erythropoetische Vorläuferzellen und Megakaryozytäre Vorläuferzellen. Daraus entwickeln sich reife Zellen: Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten.

1.2 Stammzelltransplantation

Die Knochenmarks- bzw. Blutstammzelltransplantation ist eine Behandlungsmethode, bei der hämatopoetische Stammzellen nach einer hochdosierten Bestrahlungs- und Chemotherapie zur Regeneration der Blutbildung intravenös transplantiert werden (10;11). Dr. E. Donnall Thomas war einer der ersten, der bereits 1957 Patienten mit aplastischen Anämien und Leukämien nach Bestrahlung und Chemotherapie mit aus dem Knochenmark gewonnenen Stammzellen transplantierte. Nach der Entdeckung des HLA (Humanes

Leukozytenartiges) Systems und der Gewebetypisierung Ende der 60er Jahre, stieg die Anzahl der durch Stammzelltransplantation behandelten Patienten kontinuierlich an. Mittlerweile gilt die Stammzelltransplantation als ein Routineverfahren der modernen Medizin. Schon 1999 wurden alleine in Europa 21.430 Transplantationen dokumentiert (12). Als Maß für die Konzentration an Stammzellen im Transplantat wird die Anzahl an CD34⁺ Zellen herangezogen. Lange Zeit wurden lediglich Stammzellen aus dem Knochenmark für Transplantationen verwendet (13). Durch multiple Punktionen wird Knochenmark aus dem Beckenkamm eines Spenders entnommen und anschließend dem Patienten intravenös reinfundiert. Dabei können die Stammzellen vom Patienten selber stammen (autologe Transplantation), oder aus dem Knochenmark eines HLA- identischen Fremdspenders (allogene Transplantation) gewonnen werden.

Heute wird die Transplantation von Knochenmarksstammzellen weitestgehend durch die Transplantation von Stammzellen aus dem peripheren Blut verdrängt. Nach einer entsprechenden Vorbehandlung mit Wachstumsfaktoren, beispielsweise *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF), werden die Stammzellen zunächst aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf mobilisiert und anschließend mittels einer speziellen Blutwäsche (Leukapherese) abgesammelt. Es hat sich gezeigt, dass eine Transplantation von Stammzellen aus dem peripheren Blut im Vergleich zur Knochenmarkstransplantation eine schnellere Erneuerung der einzelnen Blutzellen zur Folge hat (14;15). Weitere Vorteile dieser Methode sind die geringeren Kosten, die auf diese Weise entstehen, sowie die für den Spender weniger belastende Entnahme der Zellen aus einer peripheren Vene (16;17).

Seit kurzen werden unverwandte, menschliche Nabelschnurblutzellen als potentielle Quelle zur Langzeitregeneration des Knochenmarks eingesetzt (18-20). Während der Embryonalentwicklung ist die Produktion der Blutzellen zunächst in der Leber angesiedelt. Daher zirkulieren die Stammzellen im Blutkreislauf des Föten. Zum Zeitpunkt der Geburt befinden sich noch eine große Menge dieser Zellen in der Blutbahn des Neugeborenen. Diese können direkt nach der Niederkunft, gefahrlos für Mutter und Kind, aus der Nabelschnur entnommen werden. Dazu wird eine Kanüle in die Nabelschnurvene gestochen. Auf diese Weise können bis zu 80 ml Blut gewonnen werden. Stammzellen aus Nabelschnurblut rufen nach der Transplantation geringere Raten an GVHD (graft-versus-host-disease) hervor. Die Überlebensrate entspricht der von Patienten, denen KM von Fremdspendern

transplantiert wurden (19;21). Obwohl der Anteil an CD34⁺ Zellen im Nabelschnurblut wesentlich geringer ist als im Knochenmark erwachsener Spender, zeigte eine funktionelle Analyse der CD34⁺ Nabelschnurblutzellen, dass hier ein höherer Prozentsatz an multipotenten Stammzellen als im Knochenmark vorliegt. Für den klinischen Einsatz nachteilig ist die Tatsache, dass aufgrund des geringen Blutvolumens in der Nabelschnur nur relativ kleine Zellmengen gewonnen werden können. Daher kommt diese Art der Stammzelltransplantation nur für Kinder in Frage, da die limitierte Anzahl an Stammzellen für Erwachsene, oder Kinder über 60kg, nicht ausreicht. 1989 wurde erstmalig ein Kind, mit *Franconi Anämie* erfolgreich mit Stammzellen aus Nabelschnurblut transplantiert (22). Seitdem wurden über 1000 Stammzelltransplantationen mit Nabelschnurblut durchgeführt.

Um Transplantate aus Nabelschnurblut im großen Maßstab zur therapeutischen Behandlung heranzuziehen, muss die Effektivität des Transplantationsverfahrens erhöht werden, oder eine ex vivo Expansion repopulierender Stammzellen erfolgen.

Nach Herkunft der Stammzellen unterscheidet man zwischen autologer, syngener und allogener Stammzelltransplantation (23). Bei einer autologen Transplantation werden dem Patienten zu Therapiebeginn Stammzellen entnommen. Diese werden ihm nach einer Strahlen- bzw. Hochdosischemotherapie wieder zugeführt. Vorteil dieser Methode ist, dass kein HLA-identischer Spender benötigt wird. Außerdem sind keine Komplikationen durch immunologische Reaktionen zu befürchten. Allerdings kann das Transplantat mit malignen Zellen versetzt sein, wodurch es zu einem Rezidiv kommen könnte. Zusätzlich kann diese Art der Therapie die Gewinnung ausreichender Mengen an transplantierbaren Stammzellen negativ beeinträchtigen (24). Bei einer syngenen Stammzelltransplantation werden die transplantierten Zellen von einem eineiigen Zwilling gewonnen. Hierbei ergeben sich dieselben Vorteile, wie bei der autologen SZT. Außerdem muss nicht mit einer Kontamination durch maligne Zellen gerechnet werden.

Bei einer allogenen SZT stammen die Zellen von einem HLA- identischen Familienmitglied, oder von einem HLA-kompatiblen Fremdspender. Auch hier ist das Transplantat nicht mit malignen Zellen durchsetzt. Es steht allerdings nicht immer ein geeigneter Spender zur Verfügung. Zudem kann es nach der Transplantation zu einer Reihe von immunologischen Abstoßungsreaktionen kommen. Deshalb muss der Empfänger in der Regel immunsuppressiv behandelt werden.

1.3 Hämatopoese

Die Hämatopoese ist ein dynamisches System, das seinen Ursprung in primitiven, multipotenten Stammzellen hat. Durch Differenzierung und Proliferation bringen sie viele Typen von Vorläuferzellen mit erhöhten, linienspezifischen Potential hervor. Die normale Hämatopoese im erwachsenen Organismus basiert auf der Entwicklung der Zellen innerhalb eines spezialisierten Gewebes, der so genannten Knochenmarksnische. Hier werden die Zellen von einer Vielzahl stromaler Zellen (Fibroblasten, Adipozyten, Makrophagen und so genannten „Barrier“-Zellen) umgeben. Nach außen wird diese Nische durch Endothelzellen begrenzt. Die Stromazellen synthetisieren und organisieren eine Vielzahl von Extrazellulären-Matrix-Molekülen. Dazu gehören Kollagene des Typs I, II, IV und V, Glykoproteine (Fibronektin, Laminin, Thrombospondin, Hämonektin, und Tenascin), sowie Glukosamin-Glykane (Hyaluronsäure, Chondroitin-Derivate und Heparin-Sulfat) (25;26). Sowohl die Stromazellen als auch die spezialisierten Zellen der extrazellulären Matrix im Knochenmark bilden die spezielle Mikroumgebung der hämatopoetischen Stammzellen. Vermutlich ist es ihre Aufgabe, das Überleben, sowie die einzelnen Funktionen der Stammzellen aufrechtzuerhalten. Vor allem die extrazelluläre Matrix vermittelt durch spezifische Wachstumsfaktoren spezielle Transmittersignale, welche die Proliferation, bzw. das Ruhen der Stammzellen steuern. Innerhalb dieser Wachstumsfaktoren haben vor allem Zytokine einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Überlebensfähigkeit der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, während der Hämatopoese im Knochenmark (27). Zusätzlich existieren in der extrazellulären Matrix lokale Nischen, die die Entwicklung der hämatopoetischen Stammzellen zu den verschiedenen Zelllinien im KM beeinflussen. Dort werden die Stammzellen direkt über Zell-Zell, bzw. Zell-Stroma-Kontakte in ihrem Wachstum reguliert (25;26;28-30). Die extrazelluläre Matrix bildet daher kein passives Gerüst für hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen, sondern spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung der Stammzellen, sowie wie bei der Migration der Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut (31;32). In bestrahlten Empfängern können intravenös verabreichte Stammzellen wenige Stunden nach der Transplantation in verschiedenen Organen gefunden werden. Allerdings sind sie nach 3-4 Stunden aus den meisten Organen wieder verschwunden. Nur im Knochenmark und der Milz gelingt es ihnen sich dauerhaft anzusiedeln (33-37).

Diese Eigenschaft transplantiertes hämatopoetischer Stammzellen, sich im Empfänger Knochenmark anzusiedeln und dort durch Proliferation und Differenzierung zur Blutbildung beizutragen, wird als Homing bezeichnet (38).

1.4 Homing

Als Homing wird der Prozess der Migration von Zellen zu bestimmten Zielgeweben bezeichnet (38). Im Falle transplantiertes, hämatopoetischer Stammzellen siedeln sich diese im Knochenmark des Empfängers an und tragen hier durch Proliferation und Differenzierung zur Blutbildung bei (38). Das Homing von transplantierten, hämatopoetischen Stammzellen in das Knochenmark des Empfängers, ist ein essentieller Schritt für das Engraftment und die Aufrechterhaltung der Hämatopoese. Die einzelnen Prozesse, die zu diesen Vorgängen führen, sind nur minimal erforscht. Es wird spekuliert, dass eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen sowohl für das Homing, als auch für den Verbleib der hämatopoetischen Stammzellen im KM verantwortlich sind. Diese Adhäsionsmoleküle vermitteln die Bindung von Zellen an bestimmte Oberflächenstrukturen anderer Zellen, oder an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Weiterhin ermöglichen sie die Übermittlung von Signalen zwischen Zellen, Zytokinen und extrazellulärer Matrix. Mehrere Studien konnten zeigen, dass verschiedene Adhäsionsmoleküle bei diesen Vorgängen eine wichtige Rolle spielen (28;30;39-45;45;46;46-49). Dazu gehören β 1- und β 2-Integrine, CD44, mehrere Mitglieder der Selektin-Familie, sowie Glykokonjugate von Lektin. Williams et al. konnten als erste den Beweis erbringen, dass ein bekanntes Adhäsionsmolekül eine essentielle Rolle beim Homing spielt (29). Der Arbeitsgruppe gelang es zu zeigen, dass eine *in vitro* Adhäsion hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark, über eine spezifische Interaktion der *very late antigen- 4* (VLA-4, α 4 β 1)- Moleküle auf den hämatopoetischen Zellen mit einer spezifischen Domäne von Fibronectin in der extrazellulären Matrix einhergeht. Eine Präinkubation transplantiertes Zellen mit polyklonalen Antikörpern gegen VLA-4 bzw. gegen Fibronectin (FN), verringerte 14 Tage nach der Transplantation die Hämatopoese der Spenderzellen in KM und Milz (29). Zusätzlich zum beschriebenen VLA-4/FN pathway, kommt vermutlich auch *very late antigen-5* (VLA-5, α 5 β 1) eine wichtige Rolle beim Homing der Vorläuferzellen zu. Peled et al stellen sich das Homing transplantiertes Zellen im KM wie folgt vor:

Die sich im peripheren Blut des Empfängerorganismus befindende hämatopoetische Stammzelle, wird von dem Chemokin SDF-1 ins Kapillarsystem des Knochenmarks gelockt. Nach der Bindung von *Stromal Derived Factor 1* (SDF-1) an seinen Rezeptor CXCR-4 (*Chemokine C-X-C Motif Receptor 4*), adhäriert die Zelle mit Hilfe ihrer Integrine VLA-4 und *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1* (LFA-1) an die von den Endothelzellen exprimierten Liganden *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) und *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1). Während der transendothelialen Migration bindet die Zelle mit VLA-4 und VLA-5 an das Fibronectin der Basalmembran. Dem Chemokingradienten folgend gelangt die Zelle in die Knochenmark-Nische zur Stromazelle, wobei dem VLA-4 eine große Rolle zukommt. In dieser Umgebung ist die hämatopoetische Stammzelle zur Proliferation und Differenzierung fähig (50).

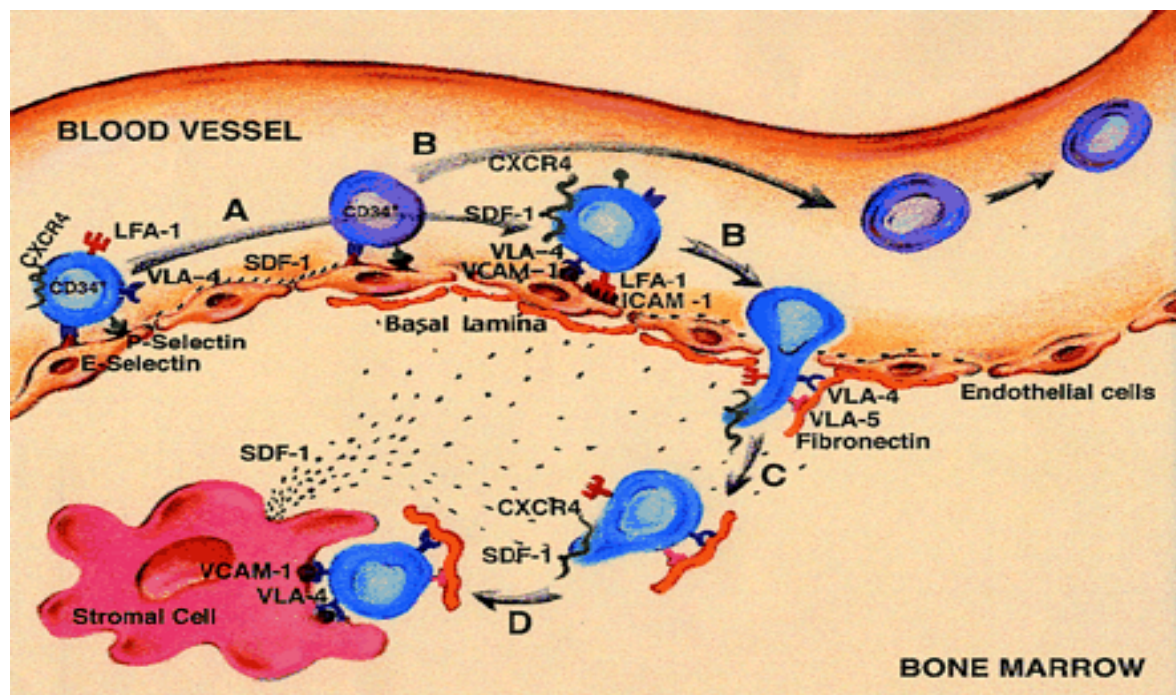


Abbildung 2: Das Homing hämatopoetischer Stammzellen nach Peled et al.

Beim *Homing* von transplantierten hämatopoetischen Vorläuferzellen sind vor allem die Integrine LFA-1, VLA-4 und VLA-5 an Interaktionen zwischen den transplantierten Zellen und den Endothelzellen, der Basalmembran und den Stromazellen beteiligt und ermöglichen so die Migration der Zellen aus den Kapillaren des Knochenmarks in die Knochenmark-Nische, wo sie die geeigneten Bedingungen zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung vorfinden. (Aus: Peled A, Lapidot T. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4 and VLA-5 on immature human CD34 (+) cells: a role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 2000; 95(11):3289-3296)

2.5 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle steuern die Bindung von Zellen an Oberflächenstrukturen anderer Zellen, oder an Moleküle der extrazellulären Matrix. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit, Signale von Zellen, Zytokinen oder der extrazellulären Matrix aufzunehmen und diese auf andere Zellen zu übertragen (30;51). Adhäsionsmoleküle besitzen eine extrazelluläre Domäne zur Vermittlung von Ligandenbindungen, eine hydrophobe Transmembranregion, sowie eine zytoplasmatische Domäne, welche zur Übermittlung von Signalen dient. Anhand ihrer Aminosäuresequenz werden die Adhäsionsmoleküle bestimmten Familien zugeordnet. Dazu gehören Immunglobuline, Selektine, Lektine, Sialomuzine und Integrine. Migrations-Experimente, sowie in vivo Studien haben gezeigt, dass vor allem die Integrine VLA-4, VLA-5, P-Selectin, E- Selectin, *Plateled Cell Adhesion Molecule 1* (PCAM-1) und CD44 für das Homing und Engraftment der Stammzellen verantwortlich sind (50;52-55). Diese Adhäsionsmoleküle gewährleisten, dass hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen in engem Kontakt zu Stromazellen gehalten werden, welche die für die Differenzierung oder Selbsterneuerung nötigen Zytokine produzieren (56).

1.4.1 Integrine

Integrine sind eine Familie von α - bzw. β - heterodimerischen Rezeptoren, welche dynamische Verknüpfungen zwischen extrazellulären Adhäsionsmolekülen und dem intrazellulären Aktin-Zytoskelett herstellen. Sie bestehen aus einer großen α - Kette, die nicht-kovalent mit einer kleinen β -Kette verknüpft ist. Die α - Kette besteht aus drei bis vier „tandem repeats“ eines divalenten, ionen-bindenden Motivs, welches für die Signalübertragung verantwortlich sein könnte. Die α -Untereinheiten unterscheiden sich in ihrem Proteinaufbau. Sie binden in Kombination mit der β -Untereinheit an den funktionellen Rezeptor. In funktioneller Hinsicht könnte die β -Kette eine größere Bedeutung haben. Integrine werden anhand ihrer β -Ketten in bestimmte Klassen eingeteilt: $\beta 1$ und $\beta 3$ Integrine vermitteln Interaktionen zwischen Zellen und Molekülen der extrazellulären Matrix, während $\beta 2$ Integrine bei der Leukozytenadhäsion eine Rolle spielen. Mittels ihrer α -Ketten können die Integrine

innerhalb einer bestimmten Klasse spezifiziert werden (51). Interaktionen zwischen Integrinen und Liganden der extrazellulären Matrix werden über intrazelluläre Signale gesteuert, welche das Zellüberleben und das Zellwachstum sowie die Zelldifferenzierung bestimmen. Diese Signale sind sowohl komplex als auch diverse, da komplexe „cross-Talks“ über komplizierte Signalwege bevorzugt werden. Integrine können auf der Oberfläche verschiedene Aktivitätszustände annehmen, welche durch exogene Stimuli, z.B. Zytokine, gesteuert werden. Die Modulation der Integrinaktivität durch ein intrazelluläres Signal, das durch Oberflächenrezeptoren, aber nicht durch Integrine ausgelöst wird, heißt „*inside-out signaling*“ (57). Ein Beispiel für dieses *inside-out signaling* ist die Aktivierung der Funktion von VLA-4 durch die Adhäsion von SCF an seinen Rezeptor c-kit, was von Papayannopoulou et al. beschrieben wurde. Sobald SCF an seinen Rezeptor bindet, wird VLA-4 durch eine Konformationsänderung in seinen aktivierten Zustand versetzt. Dies erhöht die Bindungskapazität des Integrins (58).

Neben VLA-4 scheint auch VLA-5, eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und dem Homing hämatopoetischer Stammzellen zu spielen.

1.4.1.1 VLA-4 und VLA-5

Die $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ Integrine VLA-4 (CD49d) und VLA-5 (CD49e) gehören zu den mit am besten charakterisierten Integrinen. VLA-4 wird auf einem Großteil der zirkulierenden und im Gewebe befindlichen mononukleären Zellen exprimiert. Ebenso auf einigen nicht-hämatopoetischen Zellen (59). Alle CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark, peripheren Blut oder Nabelschnurblut exprimieren sowohl die alpha als auch die beta Kette von VLA-4 (47;60;61). VLA-4 bindet an VCAM-1 und an die CS-1 Domäne von Fibronectin (siehe 1.5.1.2). Weiterhin wurden schwächere Bindungen an die C/HII und RGD Domäne des FN beschrieben. Ebenso mit Thrombospondin (62). Die Affinität von VLA-4 an diese Liganden kann indirekt durch extrazelluläre, divalente Kationen und zelluläre Signale (*inside-out signaling*) moduliert werden (63;64).

Auch VLA-5 wird auf transplantierbaren, repopulierenden, hämatopoetischen Zellen exprimiert (52).

Der Arbeitsgruppe um Williams gelang es als Erste zu zeigen, dass die Adhäsion von VLA-4 an Fibronectin maßgeblich am Homing beteiligt ist (29). Außerdem konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass das Engraftment transplantierter,

hämatopoetischer Stammzellen, nach vorheriger Inkubation des Transplantats mit Antikörpern gegen VLA-4, deutlich geringer ist, und dass umgekehrt durch eine Applikation von anti VLA-4 Antikörpern die Anzahl mobilisierter hämatopoetischer Vorläuferzellen im Blut erhöht wird (65).

Auch Experimente von Teixido et al. machten deutlich, dass die Bindung von VLA-4 und VLA-5 an Fibronectin maßgeblich an der Retention hämatopoetischer Vorläufer im Knochenmark beteiligt ist (47). In vitro konnte für die hämatopoetischen Zelllinien Mo7e und TF-1 gezeigt werden, dass durch eine Stimulation mit GM-CSF, IL-3 oder SCF die Adhäsion der Zellen gesteigert werden kann. Es kommt jedoch nicht zu einer nachweisbaren Änderung der Integrinexpression (66).

1.4.1.2 Fibronectin und humanes rekombinantes Fibronectinfragment CH-296

Fibronectin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 400kDa, das in sehr vielen verschiedenen physiologischen Prozessen eine Rolle spielt. Unter anderem bei der Gewebereparatur, der Embryogenese, der Hämostase sowie der Migration und Adhäsion von Zellen.

Fibronectin existiert in zwei Varianten. Als unlösliches Glykoprotein-Dimer in der extrazellulären Matrix sowie als lösliche Disulfid-Verbindung des Glykoprotein-Dimers im Plasma. Das im Zellplasma vorkommende Fibronectin wird von Hepatozyten gebildet. Das Fibronectin der extrazellulären Matrix wird unter anderem von Fibroblasten, Chondrozyten, Endothelzellen, Makrophagen und bestimmten Epithelzellen synthetisiert. Die Molekülstruktur des Fibronectin ist stabförmig und aus drei verschiedenen, sich wiederholenden Molekülbausteinen zusammengesetzt. Diese werden als Typ I, II und III Module bezeichnet. Diese Module sind alle Teil derselben Aminosäurekette und quasi wie „Perlen auf der Schnur“ aufgereiht. Am häufigsten findet sich das Typ III - Modul. (Abbildung 3)

Fibronectin dient als universelles Adhäsionsmolekül, das Zellen an Kollagen oder Proteoglykane bindet. Darüber hinaus ist es verantwortlich für die Integration der Zellen in die extrazelluläre Matrix, indem es deren Bestandteile mit membranständigen Fibronectin-Rezeptoren auf der Zellmembran verknüpft (67).

Das humane rekombinante Fibronectinfragment CH-296 (Retronectin) ist ein chimäres Peptid aus humanen Fibronectin, das in E.coli synthetisiert wird. CH-296 besteht aus drei funktionellen Domänen. Einer zentralen Zellbindungs-Domäne (C-Domäne), einer heparinbinde Domäne (H-Domäne) sowie einer CS-1 Sequenz. CH-

296 besteht aus 574 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 63kDa. Sowohl die C-Domäne als auch die CS-1 Sequenz sind verantwortlich für Interaktionen mit Zielzellen. Diese Interaktion erfolgt über die Integrinrezeptoren VLA-4 und VLA-5.

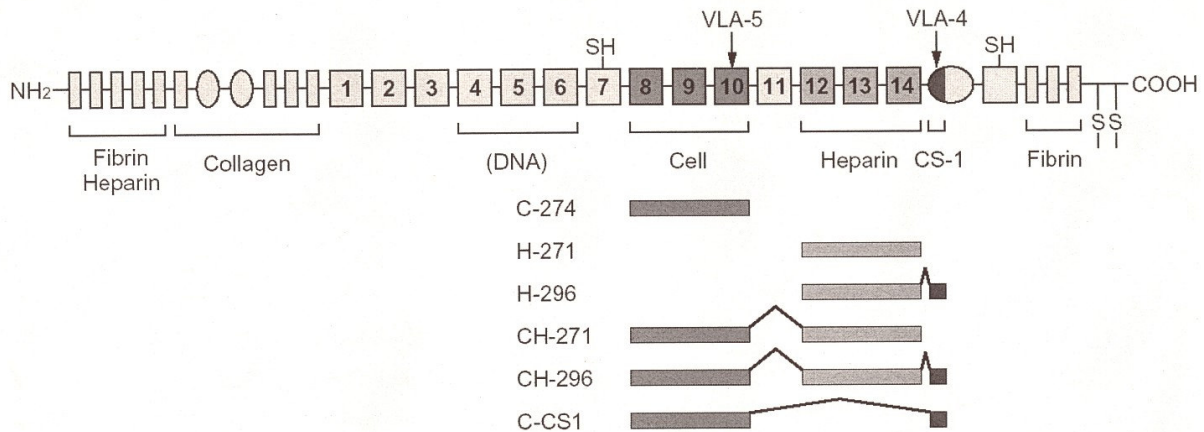


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Fibronectin und CH-296 (Retronektin)

Gezeigt werden die FN Molekülbausteine Typ I (Rechtecke), II (Kreise) sowie III (Quadrate). Typ III ist von 1-15 durchnummeriert. Die Zellbindungsdomäne (Cell; 8-10) beinhaltet den VLA-5 Rezeptor. 12-14 zeigt die Heparinbindedomäne mit verschiedenen Adhäsionssequenzen für Heparin. Eine Adhäsion an dieser Stelle erfolgt über Proteoglycane an der Oberfläche. Die CS-1 Sequenz wird alternativ gespleißt, wobei 25 Aminosäuren den VLA-4 Rezeptor bilden. CH-296 besitzt die FN-Repeats 12-14 zur Adhäsion von retroviralen Partikeln sowie eine Adhäsionsstelle an die Zielzellen über ihre VLA-4 und VLA-5 Integrine binden können.

Es existieren weitere rekombinante Fibronectinfragmente (C-274, H-271 u.a.), auf die hier nicht weiter eingegangen wird.

(Aus:Kimizuka F, et al. Production and Characterization of Functional Domains of Human Fibronectin Expressend in Escherichia coli. J. Biochem. 110, 284-291 (1991))

1.5 Zytokine

Zytokine sind regulatorische Proteine, die das Wachstum, die Differenzierung sowie das Überleben und die Funktion von Zellen steuern. Zytokine können in drei Gruppen unterteilt werden. Zur 1. Gruppe zählen die sogenannten Wachstumsfaktoren (IL-3, GM-CSF). Sie wirken sowohl multilinear als auch auf frühe Vorläuferzellen. Zytokine der Gruppe 2 (EPO, G-CSF, IL-5) haben eher einen Einfluss auf reifere Vorläuferzellen, während Zytokine der Gruppe 3 (IL-6, IL-11, SCF) unterstützend wirken und die Wirkung anderer Zytokine verstärken.

Vor allem dem Zytokin Stammzellfaktor (SCF) wird eine wichtige Rolle in der Hämatopoese nachgesagt. Zusammen mit anderen Zytokinen beeinflusst SCF vor

allem hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. In dieser Funktion unterstützt SCF deren Überleben, sowie das Wachstum und die Proliferation (68;69).

1.5.1 SCF und sein Rezeptor c-Kit

1.5.1.1 SCF

Das kodierende Gen für humanen Stammzellfaktor (SCF) liegt auf Chromosom 12q22-24 (70). Es besitzt eine Länge von 50kb und besteht aus acht Exons. Das Gen wird an Exon 6 alternativ in zwei Isoformen gespleißt. Dabei entsteht eine lösliche Isoform SCF²⁴⁸, die aus 248 Aminosäuren besteht, sowie eine transmembrangebundene Isoform SCF²²⁰ (71). Beide Formen sind biologisch aktiv, scheinen aber unterschiedliche biologische Funktionen zu haben (72). So fördert die lösliche Form des SCF die Proliferation hämatopoetischer Zellen, wohingegen die transmembrangebundene Form zusätzlich als Ligand für Zell-Zell-Adhäsionen dient (30;73). SCF gehört zu den Typ 1 Transmembranproteinen und besteht aus einer Extrazellulär-Domäne (157 Aminosäuren (AS)), einer Transmembran-Domäne (27 AS) und einem aus 36 AS bestehenden, ins Zytoplasma ragenden Ende.

SCF wird vor allem im Knochenmarksstroma und im Endothel sezerniert. Außerdem konnte es in einigen somatischen Geweben nachgewiesen werden.

Die Wirkung von SCF entfaltet sich durch eine Liganden vermittelte Dimerisation seines Rezeptors c-kit und ruft multiple biologische Effekte, wie das Wachstum primitiver, hämatopoetischer Stammzellen hervor (68). Untersuchungen von Li et al. zeigten, dass SCF in vitro das Überleben hämatopoetischer Stammzellen fördert. Zusätzlich wird das Überleben hämatopoetischer Vorläuferzellen unterstützt (74). Weiterhin erhöht die Verabreichung von SCF in Mäusen die Anzahl der HSC sowohl im KM (75) als auch in der Milz (76) und verursacht zudem die Mobilisation der HSC (77). Zusammenfassend hat SCF mehrere Funktionen. Zum einen fungiert es als potenter Wachstumsfaktor für hämatopoetische Vorläuferzellen. Weiterhin steuert SCF das Überleben hämatopoetischer Vorläuferzellen und NK-Zellen durch Unterdrückung der Apoptose. Außerdem reguliert SCF die Differenzierung von Mastzellen, sekretorische Funktionen, Chemotaxis und Adhäsion. Zusätzlich wirkt SCF als Enhancer von prä B-Zellen, frühen Thymozyten sowie des Wachstums von NK-Zellen. Außerdem moduliert SCF die Zelladhäsion (72;78).

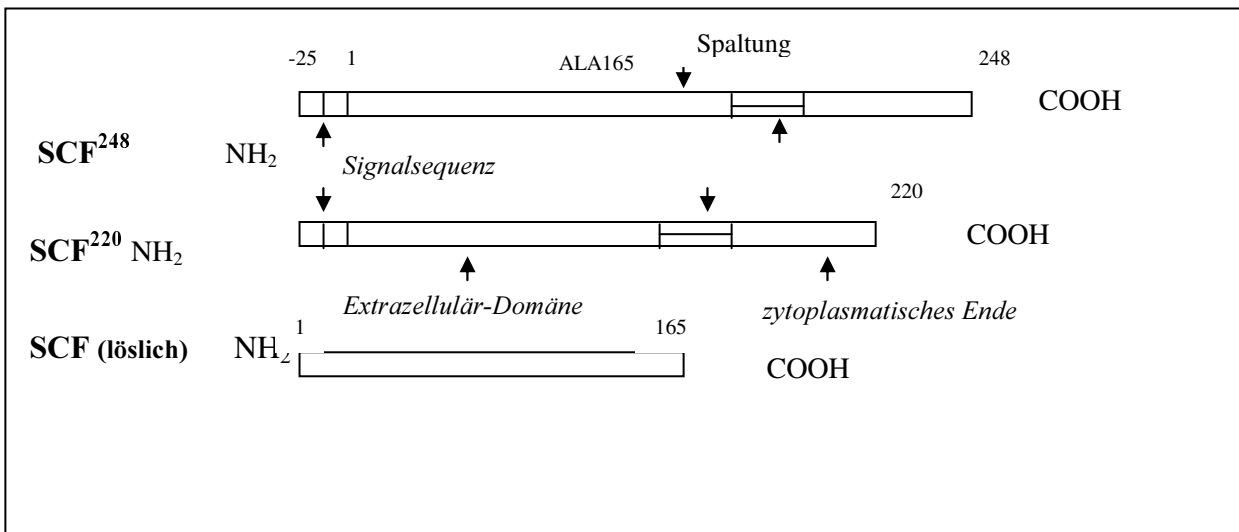


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Stammzellfaktor (SCF)

Das Zytokin SCF existiert als Transmembranprotein und in löslicher Form. SCF²²⁰ stellt ein Typ1 Transmembranprotein dar. Die lösliche Form des SCF entsteht durch Spaltung an ALA¹⁶⁵ des SCF²⁴⁸, einer Isoform des SCF²²⁰. Beide Formen sind biologisch aktiv, unterscheiden sich aber in funktioneller Hinsicht.

(Modifiziert nach Smith MA, Pallister CJ, Smith JG. Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice. Acta Haematol 2001; 105(3):143-150)

1.5.1.2 c-kit (CD117)

Humanes c-kit ist ein 145kD Glycoprotein, das der TypIII Tyrosin-Kinase-Rezeptor-Familie angehört. Das für c-kit kodierende Gen liegt auf Chromosom 4 in der Region 4q11-34, in der Nähe des PDGFRA Gens. Die Mitglieder dieser Familie besitzen eine extrazelluläre Domäne aus 5 immunglobulin-artigen Motiven, sowie einer Kinasesequenz, die in eine ATP Bindungsdomäne und eine phosphotransferase Domäne unterteilt ist (79). Die 3 N-Terminalen immunglobulinartigen Motive dienen der Ligandenbindung, während das vierte Motiv eine Homodimerisationssequenz enthält (80). Die Bindung von SCF an seinen Rezeptor, c-kit, resultiert in Homodimerisation, intramolekularer Phosphorylierung, sowie der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (81).

C-kit wird sowohl auf hämatopoetischen, als auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert. Innerhalb der hämatopoetischen Zellen wird c-kit auf 75% der CD34⁺ Vorläuferzellen exprimiert (82;83). Auch Megakaryozyten, sowie einige lymphatische Vorläuferzellen im Knochenmark, sind ebenfalls c-kit⁺. Im Laufe der Reifung der

meisten hämatopoetischen Zellen nimmt die c-kit – Expression auf den Zellen stetig ab. Reife Zellen im peripheren Blut exprimieren letztendlich kein c-kit mehr. Die einzige Ausnahme bilden Mastzellen, sowie eine Untergruppe von NK-Zellen (84). C-kit wird auch auf einer großen Anzahl nicht-hämatopoetischer Zellen exprimiert. Dazu gehören Melanozyten, Hodenzellen, vaskuläre Endothelzellen, Astrozyten, Zellen im renalen Tubulus, Epithelzellen der Brustdrüsen sowie der Schweißdrüsen.

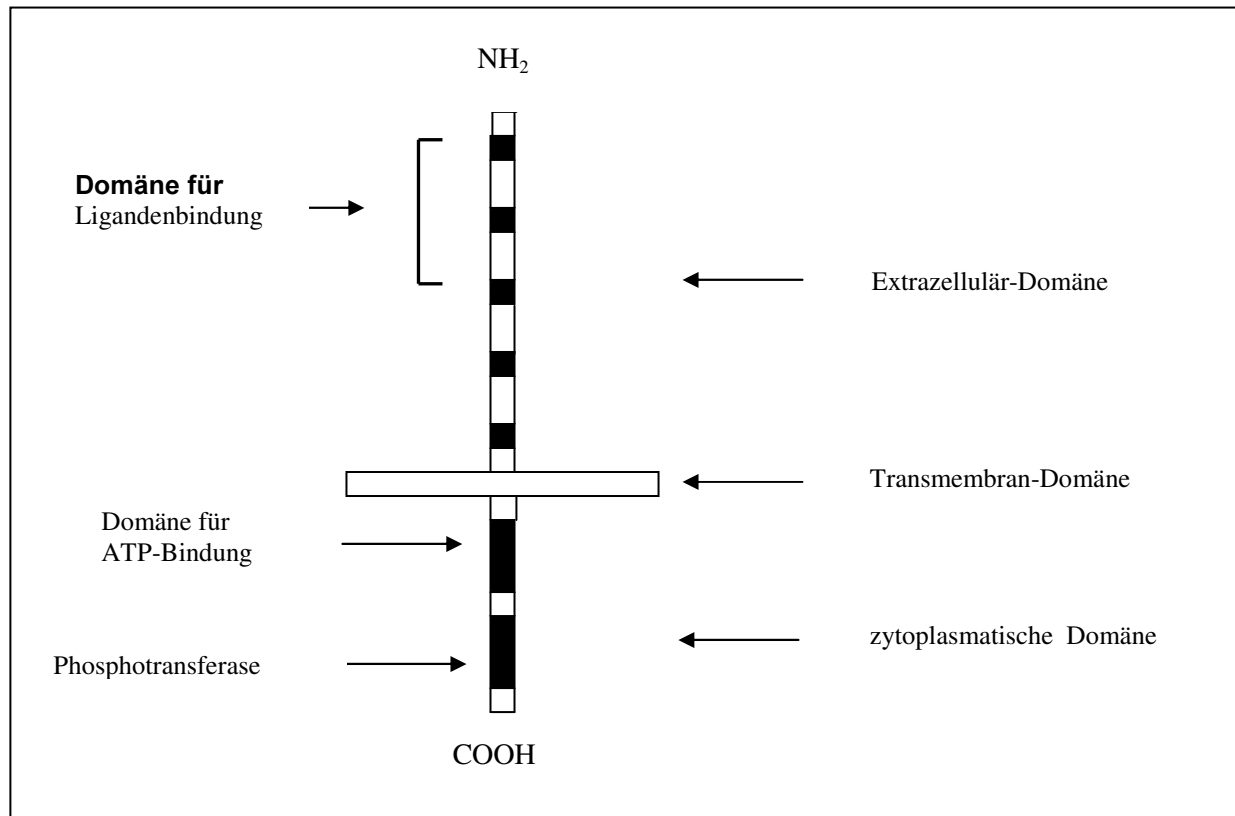


Abbildung 5: Schematische Darstellung von c-kit

Der Rezeptor für SCF, als **c-kit** (CD117) bezeichnet, besteht aus einer für die Ligandenbindung zuständigen Extrazellulär-Domäne, einer Transmembran-Domäne und aus einer zytoplasmatischen Domäne, die mittels einer Tyrosinkinase an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt ist. (Modifiziert nach Smith MA, Pallister CJ, Smith JG. Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice. Acta Haematol 2001; 105 (3): 143-150)

1.5.2 Hepatocyte growth factor /Scatter factor (HGF) und sein Rezeptor c-met

1.5.2.1 HGF

HGF wird durch ein einzelnes Gen auf dem langen Arm von Chromosom 7 kodiert. Das aus 728 Aminosäuren aufgebaute Vorläufer-Glykoprotein wird durch

verschiedene Proteasen, wie Plasminogenaktivator und tPA, in ein aus einer 60kDa schweren α - Kette, sowie einer 30kDa schweren β -Kette bestehendes Molekül gespalten. Aufgrund einer alternativen Glykosylierung existieren zwei Typen der β -Kette. Beide Ketten sind durch eine einzige Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Die Sekundärstruktur der α - Kette beinhaltet eine N-terminale Haarnadelkurve, sowie vier Kringl-Domänen. Die β -Kette ist homolog zur katalytischen Domäne von Plasminogen. Sie besitzt jedoch keinerlei katalytische Aktivität.

HGF wird auf unreifen Hepatozyten, sowie einer Reihe anderer Zelltypen exprimiert (85). Dazu gehören humane Leukämiezelllinien, Lymphomzellen, Myelomzellen, Monozyten, Melanozyten, Endothelzellen, Mikroglia, Keratinozyten und Neuronen (86-92). HGF spielt hier eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellmotilität, Zellwachstum und Morphogenese. Weiterhin wurde veröffentlicht, dass HGF von Stromazellen des Knochenmarks sowie Osteoplasten sezerniert wird. Außerdem wird es auf hämatopoetischen Zellen im Knochenmark, Nabelschnurblut und peripheren Blut exprimiert. Wahrscheinlich spielt HGF eine wichtige Rolle bei der Selbsterneuerung, Proliferation und Adhäsion von hämatopoetischen Zellen (93-98).

1.5.2.2 c-met

C-met, ein Tyrosinkinase-Rezeptor der Klasse III, besteht aus einer 50kDa α -Untereinheit, sowie einer 145kDa β -Untereinheit, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Das Molekül wird auf Chromosom 7q31 kodiert. Die β -Untereinheit besitzt eine intrazelluläre Bindungsstation für multiple Signalmoleküle, sowie eine Thyrosinkinase. Durch Bindung von HGF an c-met kommt es zur Dimerisierung, bzw. Oligomerisierung, wodurch die Signaltransduktion gestartet wird.

1.5.3 Flt-3 Ligand (FL) und sein Rezeptor Flt-3 (CD135)

1.5.3.1 Flt-3 Ligand

Bei Flt-3 Liganden handelt es sich um ein Typ-I- Transmembran- Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 30kDa. Das Molekül wird auf Chromosom 19q13 kodiert und besteht aus 235 Aminosäuren (99;100). Es existiert ein natürlich vorkommendes Dimer sowie weitere Typen, darunter eine lösliche Form. FL besitzt eine extrazelluläre Domäne, bestehend aus vier α -Helizes. Flt-3 Ligand wird von T-Zellen,

Stromazellen im Thymus, von Knochenmarksfibroblasten, sowie von Monozyten exprimiert. Außerdem wird Flt-3 auch auf zahlreichen mesenchymalen Zellen ausgebildet. Flt-3 spielt eine wichtige Rolle bei der Lymphopoese, wo es die Proliferation von B-Vorläuferzellen, pro B-Zellen und NK-Zellen unterstützt (101;102). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Flt-3, in Kombination mit anderen Zytokinen das Wachstum und Überleben hämatopoetischer Stammzellen steuert (103-106). Außerdem resultiert eine Stimulation mit einer Kombination aus SCF und IL-3 in einer Expansion CD34⁺/CD38⁻ Zellen.

1.5.3.2 Flt-3 (CD135)

Der FL- Rezeptor wird auf Chromosom 13q12 exprimiert und besitzt ein Molekulargewicht von 169kDa. Das Typ-I-Glykoprotein konnte auf CD34⁺ Zellen, B-Vorläuferzellen, pro B-Zellen, Thymozyten und Monozyten nachgewiesen werden (78).

1.6 Xenotransplantation in NOD/SCID Mäuse

Bei der Xenotransplantation handelt es sich um eine spezie-überschreitende Organtransplantation, wie in der vorliegenden Arbeit der Transplantation menschlicher hämatopoetischer Stammzellen in immunsupprimierte Mäuse.

Es ist schwierig, morphologisch oder immunologisch genau die Zellen zu definieren und zu charakterisieren, welche für die Erneuerung des humanen Immunsystems verantwortlich sind. Doch der Goldstandard, und vor allem der einzige Beweis für die Existenz von hämatopoetischen Stammzellen in transplantierten Zellpopulationen ist deren Fähigkeit, die Blutbildung in vivo zu regenerieren. Diese Zellen werden als CRU (Competitive Repopulating Units) bezeichnet. Es existieren mehrere Xenotransplantationsmodelle (107-111), doch das bisher am besten charakterisierte Modell, ist die Transplantation humaner hämatopoetischer Stammzellen in sublethal bestrahlte, immundefiziente Mäuse. Mehreren Arbeitsgruppen gelang es, nach der Transplantation humaner hämatopoetischer Stammzellen in sublethal bestrahlte CB17/SCID Mäusen, eine multilineare humane Hämatopoese in den Versuchstieren nachzuweisen (112-114). Dabei ist es zunächst nicht von Bedeutung, ob die transplantierten HSC aus dem Knochenmark oder aus dem Nabelschnurblut isoliert wurden. Diese Studien lassen vermuten, dass zumindest einige der injizierten,

humanen Zellen die Fähigkeit besitzen ins Knochenmark der Mäuse einzuwandern, um dort, ohne Kontakt zu humanen Stromalen Zellen, zu residieren. Ein ausreichendes Engraftment wurde allerdings nur dann erreicht, wenn die injizierten Spenderzellen weiterhin mit Wachstumsfaktoren versorgt wurden. Dies wurde durch eine parallele Verabreichung wachstumsfördernder Zytokine, oder die Co-Transplantation akzessorischer, bestrahlter mononukleärer Zellen, so genannten Carrier-Zellen erreicht (115). Cashman et al. wiesen als erste darauf hin, dass durch die Verwendung von NOD/LtSz-scid/scid (NOD/SCID)-Mäusen als Empfänger die besten Ergebnisse bezüglich einer Reproduktion humaner Zellen erzielt werden können. Dieser Hinweis wurde von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt (116-118).

1983 wurde die *severe combined immunodeficient* (SCID) Mutation zum ersten Mal beschrieben (119). Diesen Tieren fehlen sowohl B- als auch T-Zellen, da sie einen Defekt in deren DNA-Reparatur aufweisen (120). Allerdings zeigten diese Tiere nur ein geringes Engraftmentpotential, weshalb weitere immundefiziente Mausstämme erforscht wurden. Die oben beschriebene SCID-Maus wurde mit einer nonobese diabetic (NOD) Maus gekreuzt, die weniger natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bildet und kein Komplementsystem besitzt. Die durch diese Kreuzung entstandene NOD/SCID Maus besitzt weder ein zelluläres noch ein humorales Immunsystem. Außerdem besitzt sie kein aktives Komplementsystem (121). Um die Anzahl der NK-Zellen weiter zu reduzieren, wurden diese NOD/SCID Mäuse mit Tieren gekreuzt, die kein MHC- (Major Histocompatibility Complex) Klasse I-Molekül exprimieren. In diesen NOD/SCID $\beta 2m$ -/ m - Tieren konnte ein 10x höheres Engraftmentpotential als in NOD/SCID Mäusen erzielt werden (122). Allerdings engrafteten in diesem System auch Zellen, die ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung teilweise schon verloren hatten. Daher gilt derzeit die Transplantation in NOD/SCID Mäuse als Goldstandard zum Nachweis von hämatopoetischen Stammzellen.

1.7 Stammzellplastizität

Die Fähigkeit verschiedene Zelltypen zu generieren, die aus den drei entscheidenden Keimblättern hervorgehen, wurde traditionell als Privileg von Zellen der inneren Zellmasse, Epiblasten des frühen Embryos, sowie embryonalen Stammzellen betrachtet. In letzter Zeit wurde diese Fähigkeit allerdings auch Knochenmarksstammzellen zugeschrieben. Mehreren Arbeitsgruppen gelang es zu

zeigen, dass Stammzellen aus dem Knochenmark die Eigenschaft besitzen, zu Zellen anderer Gewebe oder Organe zu differenzieren. Dazu gehören Hepatozyten, Endothelzellen der Blutgefäße, Epithelzellen des Magens, Zellen des Oesophagus und der Lunge. Auch im Herzmuskel und in der Skelettmuskulatur konnten Zellen identifiziert werden, die von transplantierten Knochenmarkszellen abstammen (123-127). Es wurde außerdem berichtet, dass Knochenmarkszellen zu neuronalen Zellen transdifferenzieren können (128-131). Auf der anderen Seite können auch neuronale Stammzellen in vivo hämatopoetische Zellen hervorbringen (132). Unlängst gelang es Ratajczak et al., im Knochenmark Zellen zu identifizieren die muskel-, leber- und neuronspezifische mRNA exprimieren. Die Tatsache, dass diese Zellen mit Hilfe von G-CSF aus dem Knochenmark ins periphere Blut ausgeschwemmt werden können, untermauert die Hypothese, dass das Knochenmark während des ganzen Lebens eine Grundlage für Geweberegenerationen aller Art bieten könnte (133). Entsprechend dieser Möglichkeit, konnte gezeigt werden, dass sowohl nach einem Schlaganfall, als auch nach einem Herzinfarkt die Anzahl CD34⁺ hämatopoetischer Vorläuferzellen im peripheren Blut erhöht ist (134;135).

Diese Fähigkeit der Stammzellen, zu Zellen eines anderen Gewebes oder Organs zu transdifferenzieren, bzw. dedifferenzieren, wird als Stammzellplastizität bezeichnet. Diese vermutliche Plastizität somatischer Stammzellen könnte die bisherige Handhabung bei Gewebetransplantationen und der regenerativen Medizin revolutionieren (136). Allerdings scheinen derartige Transdifferenzierungsprozesse in vivo nur selten und vermutlich nicht generell aufzutreten (137;138). Weiterhin konnte bisher nicht geklärt werden, ob es sich bei der hier beschriebenen Differenzierung um eine „echte“ Transdifferenzierung handelt. Es besteht die Möglichkeit, dass die transplantierten Spenderzellen mit den Empfängerzellen fusionieren. Diese Zellen würden tetraploide Chromosomensätze aufweisen und könnten so den Phänotyp der Empfängerzellen imitieren (133;138;139). Man geht momentan davon aus, dass sowohl Fusion als auch Transdifferenzierung nebeneinander existieren. Das Klonschaf Dolly, das durch den Zellkerntransfer einer reifen Brustdrüsenzelle in eine Eizelle entstanden ist, verdeutlicht jedoch die schlummernde Totipotenz in den Zellkernen selbst terminal differenzierter Körperzellen (140).

1.8 Zielsetzung

Hämatopoetische Stammzellen besitzen die Fähigkeit, mit hoher Effizienz aus dem zirkulierenden Blutstrom ins Knochenmark einzuwandern (114). Daher wurde die intravenöse Transplantation hämatopoetischer Stammzellen zu einer wichtigen, therapeutische Möglichkeit zur Behandlung eines breiten Patientenspektrums mit malignen oder genetischen Erkrankungen.

Um ein möglichst schnelles Engraftment zu gewährleisten, sind bei der Transplantation der Stammzellen verschiedene Faktoren zu berücksichtigen. Dabei spielt die Anzahl der transplantierten Zellen eine entscheidende Rolle. Ein ausreichendes und andauerndes Anwachsen injizierter Zellen kann erst ab einer Zellzahl von mehr als 5×10^6 CD34⁺ Zellen pro kg garantiert werden. Werden weniger Zellen verabreicht, resultiert das möglicherweise in einem verspäteten, wenn nicht sogar ungenügenden Engraftment (141-143). Im Laufe der Jahre hat es sich allerdings als schwierig erwiesen, für jeden Patienten eine ausreichende Menge an transplantierbaren Stammzellen zu gewinnen.

Ein Ansatz, dieses Problem zu lösen, besteht darin, die Anzahl der transplantierbaren, hämatopoetischen Stammzellen bei schlecht zu mobilisierenden Patienten durch Expansion mit spezifischen Wachstumsfaktoren *in vitro* zu erhöhen. Dabei soll es allerdings nicht zu einer Ausdifferenzierung, oder zu einem Verlust der Stammzellfunktion kommen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Verbesserung des Engraftments. Sowohl das Homing, als auch das Engraftment der transplantierten Zellen wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf hämatopoetischen Stammzellen und deren Interaktion mit den extrazellulären Matrix-Molekülen und zellulären Liganden beeinflusst.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit sollte ein Ligandenassay entwickelt werden, der eine einfache und rasche, funktionelle Messung der Bindungsaktivität zweier Adhäsionsmoleküle, VLA-4 und VLA-5, nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen ermöglicht. Gleichzeitig soll simultan die Oberflächenexpression der beiden Integrine überprüft werden.

In einem weiteren Schritt soll ermittelt werden, inwieweit die gleichzeitige Verabreichung von SCF bei einer Xenotransplantation humaner Stammzellen aus verschiedenen Blutquellen in NOD/SCID Mäusen das Engraftment dieser Zellen und

damit die Regeneration einer humanen Hämatopoese im Knochenmark der Versuchstiere verbessert.

Da in letzter Zeit immer mehr Hinweise auftreten, dass Stammzellen eines bestimmten Gewebes die Fähigkeit besitzen, zu Zellen eines anderen Gewebes bzw. Organs zu transdifferenzieren, werden im Rahmen dieser Arbeit Hoden, Leber, Nieren und Gehirn der transplantierten NOD/SCID Mäusen auf das Vorhandensein humaner Zellen hin überprüft. Zusätzlich soll analysiert werden, inwieweit die Co-Transplantation von SCF diese Transdifferenzierung beeinflusst.

Letztendlich sollen die Ergebnisse dieser Arbeit die Voraussetzungen zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei der Stammzelltransplantation liefern. So könnte durch eine Steigerung des Engraftments der transplantierten Zellen die Rekonstitution der Hämatopoese beschleunigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Apheresesegerät	Cobe spectra Zellseparator Cobe, Lakewood, CO, USA
Strahlenquelle für Zellsuspensionen	IBL 437C, CISbio International, Gif-Sur-Yvette F
Brutschrank	Heraeus, BBD 6220, Hanau
Durchflußzytometer	FACSCalibur, FACStar, Becton&Dickinson, St.Jose, CA, USA
Elektrophoresekammer	Mini Gel, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop	Axioshop 2, Zeiss, Oberkochen
Gama-Counter	Siemens, München
Image Master VDS	Pharmacia Biotech
Linearbeschleuniger	Primus, Siemens, München
Mikroskop	Zeiss, Axiovert25, Jena, Leica, Wild MPS 52, Wetzlar
PCR-Gerät	PTC-200 Peltier Thermal Cyclers, Biozym, Oldendorf,
pH-Meter	WTW, Weilheim
Standart Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Stem Sep Magnet	StemCell Technologies Inc, Vancouver, BC
Sterilbank	Clean Air, Modell CA/REVS 4 Clean Air Deutschland GmbH, Hilden
Thermostatisches Wasserbad WBS	NeoLab, Heidelberg
Vortexer	Genie 2, Scientific Ind., Bohemia, N.Y., USA
Zentrifuge	Megafuge 1.0, Heraeus Sepa Tech, Hanau Rotina 46R, Hettich, Tuttlingen
Zählkammer	Neubauer improved, Tiefe 0,100mm, Marienfeld

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Butterfly-Kanülen (0,8mm)	B&D, Heidelberg
Cellscraper, Costar 3008	Corning Incorporated, Corning, N.Y., USA
Cryomold Plastikförmchen	Sakura Finetek, Zoeterwoude NC
Cryotubes	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Deckgläser (24x50mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Immunomagnetische Säule	0,3/0,5/0,6 inch, Stem Sep., Stem Cell Tech., Vancouver, BC, Kanada
Kanülen	B&D, Heidelberg
Lithium-Heparin Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (100x15mm)	Falcon, Heidelberg
Pipetten (1,5,10,25,50 ml)	Corning Costar, Wiesbaden.
Polypropylenröhrchen (15, 50ml)	Falcon, Heidelberg
Polystyrolröhrchen (5ml; Rundboden)	Falcon, Heidelberg
Röhrchen für Gamma-Counter	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen(1,5,10,20,50ml)	B&D, Heidelberg
Super Frost Plus Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
Zellkulturflasche (75cm ²)	Corning Costar, Wiesbaden
Zellsieb 70µm	Falcon, Heidelberg

2.1.3 Zytokine

Stem Cell Factor (SCF)	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
Flt-3 Ligand (Flt-3)	Peprtech
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	R&D Systems, Wiesbaden
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.4 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden alle von der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)* bezogen

KG 1	humane akute myeloische Leukämie
Mo7e	humane akute megakaryoblastische Leukämie
TF-1	humane Erythroleukämie
5637	humanes Harnblasen-Ca (Produktion von Wachstumsfaktoren wie SCF, IL-1, IL-6 GM-CSF und G-CSF)

2.1.5 Antikörper

FITC: Fluorescein Isothiocyanat

PE: Phycoerythrin

APC: Allophycocyanin

Isotypen

Maus IgG1 FITC (x 40)	B&D, Heidelberg
Maus IgG1 PE (x 40)	B&D, Heidelberg
Maus IgG1 APC (x 40)	B&D, Heidelberg

Anti-Maus Antikörper

CD16/CD32 unkon. (2.4G2)	B&D, Heidelberg
CD62L APC (MEL-14)	B&D, Heidelberg
CD45.1 FITC (A20)	B&D, Heidelberg
CD45 PE (30-F11)	B&D, Heidelberg

Anti-Human Antikörper

Durchflußzytometrie

c-met unkonjugiert (DL-21)	Upstate, Lake Placid, NY
Anti Fibronectin (AB1) unkon. (HFN 7.1)	Dianova, Hamburg
Anti Fibronectin (AB1) PE (HFN7.1)	Dianova, Hamburg

Anti Fibronectin (AB8) unkon. (618)	Dianova, Hamburg
CD15 FITC (P3-X63-Ag8.653)	B&D, Heidelberg
CD19 PE (SJ25C1)	B&D, Heidelberg
CD20 PE (L27)	B&D, Heidelberg
CD34 FITC (8G12)	B&D, Heidelberg
CD34 PE (8G12)	B&D, Heidelberg
CD34 APC (8G12)	B&D, Heidelberg
CD38 PE (HB-7)	B&D, Heidelberg
CD45 unkon. (F10-89-4)	Dianova, Hamburg
CD45 FITC (HI30)	B&D, Heidelberg
CD45 PE (HI30)	B&D, Heidelberg
CD49d (VLA-4) FITC (BU 49)	Alexis, Grünberg
CD49e (VLA-5) FITC (Sam-1)	DPC Biermann, Bad Nauheim
CD66b FITC (G10F5 (IgM))	B&D, Heidelberg
CD71 PE	B&D, Heidelberg
CD117 PE (YB.5.B8)	Chemicon, Temecula, CA
CD135 PR (4G8)	Chemicon, Temecula, CA
CD135 FITC (BV10A4H2)	Caltag, Hamburg
VEGF-R2 unkon. (KDR1)	Sigma, Taufkirchen
Integrin α 4 Blockade unkon. (P4C2)	Chemicon, Temecula, CA
Integrin α 5 Blockade unkon. (P1D6)	Chemicon, Temecula, CA

Immunhistologie

Anti-human nuclei unkon. (2351)	Chemicon, Temecula, CA
Rabbit anti mouse IgG PE	Dako, Hamburg
Rabbit anti mouse IgG FITC	Dako, Hamburg
Anti- human albumin unkon.	DPC Biermann, Bad Nauheim

2.1.6 Zellkulturmedien und Zusätze

IMDM + Glutamax TM I	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	PAA Laboratories, Cölbe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Eurolab, Darmstadt
FBS	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
Heparin 5000 U/ml	Roche, Basel CH
2-Mercaptoethanol 50mM	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
MEM Non-Essential-Amino Acids	Sigma, Taufkirchen
Penicillin 10mg/ml / Streptavidin 0,85%	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Pyruvate 100mM	Sigma, Taufkirchen

Medium-Ansätze:

Iccove`s	10% Fetal Calf Serum (FCS) 5ml Penicillin/Strepatvidin 5ml Sodium Pyruvat 1ml β-Mercapto-Ethanol
RPMI	10% Fetal Calf Serum (FCS) 5ml Glutamat 5ml Penicillin/Strepatvidin 5ml Sodium Pyruvat 1ml β-Mercapto-Ethanol
Auftaumedium	0,2 ml Heparin 15ml FCS 34,8 ml IMDM + Glutamax TM I
Einfriermedium	100µl DMSO 900µl FCS

2.1.7 Reagenzien und Chemikalien

Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Biocoll	Biochrom AG
BSA	Calbiochem, Schwalbach/TS
Cibrobay 400	Bayer, Leverkusen
Dako Pen	Dako, Hamburg
DNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden
DNase	Roche Basel, CH
EDTA 99,5%	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck Eurolab, Darmstadt
Gensitein	Sigma, Taufkirchen
HCL	Carl Roth, Karlsruhe
HotStarTaq Master Mix Kit (250 units)	Qiagen, Hilden
Isopropanol	Merck Eurolab, Darmstadt
Ladepuffer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
PBS ohne Mg/Ca	Sigma, Taufkirchen
Peq Gold Universal Agarose	PecLab Biotechnologie, Erlangen
PI	Sigma, Taufkirchen
P/S	Sigma, Taufkirchen
Retronectin CH296	B&D, Heidelberg
Reverses Transkriptionssystem	Promega Corporation, Madison, WI
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Skinsept F	Henkel-Ecolab, Düsseldorf
Sodium Pyruvat	Sigma, Taufkirchen
Tissue-Tec (killik frozen section medium)	Bio Optica, Milano
Tris Ultrapure	USB Corporation, Cleveland, OH
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Trizol	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe

Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Türk-Lösung	Roche Basel, CH
Trypsin-EDTA	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
Vecta Shield Mounting Medium (Dapi)	Vector Laboratories Inc.
1kb DNA Leiter	PeqLab Biotechnologie, Erlangen

2.1.8 PCR-Oligonukleotide

GAPDH	5'-TTAGCACCCCTGGCCAAGG-3' 5'-CTTACTCCTTGGAGGCCATG-3'
5'-Actin	5'-GCTCACCATGGATGATGATATCGC-3' 5'-GGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'

2.1.9 Puffer

NH ₄ Cl-Lysepuffer	90ml NH ₄ CL (0,16M) 10ml Tris (0,2M) pH 7,65
TAE (50x)	242g Tris 57,1ml Eisessig 100ml 0,5M EDTA pH 8,0 1Liter dest. Wasser
1% BSA	0,1g BSA 10ml PBS
20% BSA	1g BSA 5ml PBS

2.1.10 Mausstämme

NOD/SCID Zuchtpaare	Charles River, Sulzbach
NOD/SCID Versuchstiere	Eigene Zucht

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien

2.2.1.1 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zum Auftauen wurden die Zelllinien aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, mit 500µl Auftaumedium versetzt und in ein 37°C Wasserbad überführt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in ein 50ml Polypropylenröhrchen überführt, mit PBS gewaschen und 7 Minuten bei 1300rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in frischen Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert, gezählt und in soviel Einfriermedium resuspendiert, dass die Zelldichte bei 4×10^6 Zellen pro ml lag. Nach Überführen der Suspension in Cryoröhrchen wurde sie in einer Einfrierbox bei -80°C langsam eingefroren und für längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.2 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Heraeus) unter konstanten Bedingungen (Temperatur 37°C , CO_2 -Gehalt 5% und relative Luftfeuchte 100%) in RPMI- oder Iscoves-Medium kultiviert. Die Medien wurden mit FCS, Penicillin/Streptavidin, nicht-essentiellen Aminosäuren und 2-Mercaptoethanol angereichert.

Die Zelllinie KG-1 wurde in Iscoves-Medium mit 20% FCS gehalten. Zur Aufrechterhaltung einer Zellzahl von $0,2-1 \times 10^6$ wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage im Verhältnis von 1:4 passagiert.

TF-1 Zellen wurden in RPMI-Medium inklusive 10% FCS sowie 10% Überstand der Zelllinie 5637 kultiviert und alle drei Tage gesplittet (1:2).

Die Zelllinie Mo7e wurde in RPMI-Medium mit 20%FCS und ebenfalls 10% des Überstands kultiviert. Zur Aufrechterhaltung einer Zelldichte von $0,5-1 \times 10^6$ wurde sie alle zwei Tage im Verhältnis von 1:3 passagiert.

5637 Zellen wurden ebenfalls in RPMI-Medium mit 10% FCS gehalten. Die konfluenten Zellen wurden unter Einsatz von Trypsin/EDTA in einem Verhältnis von 1:5 gesplittet

2.2.1.3 Ernte des Überstandes der Zelllinie 5637

Die adhärenenten 5637 Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS in Petrischalen kultiviert. Wenn die Zellen den Schalenboden konfluent bedeckten, wurden sie unter Einsatz von Trypsin/EDTA im Verhältnis 1:5 auf fünf neue Petrischalen passagiert. Sobald die Zellen den Schalenboden erneut bedeckten, wurde das Medium gewechselt und am nächsten Tag der zytokinhaltige Überstand abgeerntet. Er wurde in 7ml Aliquots in 15ml Polypropylenröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -35°C gelagert.

2.2.2 Primäre humane Zellen

2.2.2.1 Gewinnung der primären Zellen

Zur Durchführung der Experimente wurden Zellen von freiwilligen gesunden Personen, freiwilligen G-CSF behandelten gesunden Spendern sowie Zellen aus Nabelschnurblut verwendet.

Die Zellen G-CSF behandelter Spender wurden nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation zur Verfügung gestellt. Mononukleäre Zellen aus dem Vollblut der Spender wurden mittels eines diskontinuierlichen Cobe Spectra Zellseparators per Leukapherese gewonnen. Dabei wurde mit Citratlösung versetztes Blut bei 2040rpm zentrifugiert und die Zellen mittels ihres Dichtekoeffizienten maschinell aufgetrennt. Das so gewonnene Zellmaterial wird als *Buffy Coat* bezeichnet und besteht hauptsächlich aus Lymphozyten, Monozyten und einigen Granulozyten. Es wurde entweder frisch weiter verarbeitet oder in 90% FCS und 10% DMSO eingefroren.

100ml Vollblut freiwilliger, gesunder Personen wurde nach deren Einwilligung aus der *Vena cubitalis* entnommen und in Lithium-Heparin haltigen 7,5ml Monovetten aufgefangen und sofort weiterverarbeitet.

Die Zellen aus dem Nabelschnurblut wurden nach Aufklärung und Einwilligung der Mütter nach der Geburt aus dem Plazentarestblut gewonnen und in speziell dafür vorgesehenen Beuteln gesammelt.

2.2.2.2 Verarbeitung der primären Zellen

2.2.2.2.1 Ficoll Hypaque Dichtezentrifugation

Zur Vermeidung erythrozytärer bzw thrombozytärer Verunreinigung wurden die Spenderzellen einer manuellen Dichtezentrifugation (Hand-Ficoll) unterzogen.

Vollblut freiwilliger Spender genauso wie Nabelschnurblut wurden in 50ml Polypropylenröhrchen überführt und mit PBS im Verhältnis von 1:3 verdünnt. Die zuvor in einem weiteren 50ml Polypropylenröhrchen vorgelegte Menge an Biocoll wurde vorsichtig mit der verdünnten Zellsuspension überschichtet und bei 1900rpm 20 Minuten bei 25°C mit ungebremsten Rotor zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entsteht eine Trennschicht welche die mononukleären Zellen enthält (Abbildung 6). Diese wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellen nach zweimaligen Waschen gezählt. Danach wurden die Zellen entweder weiterverarbeitet oder in 90% FCS und 10% DMSO eingefroren.

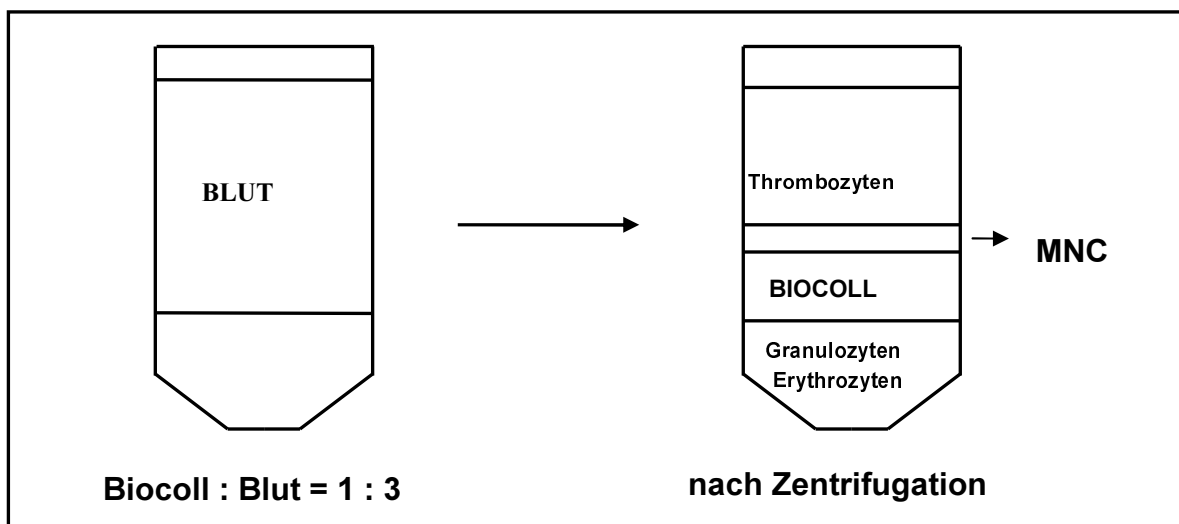


Abbildung 6.: Ficoll Hypaque Dichtezentrifugation

Die in ein Röhrchen vorgelegte Menge an Biocoll wird vorsichtig mit der vorbereiteten Zellsuspension überschichtet. Nach der Zentrifugation findet sich die aufgereinigte MNC-Fraktion als weißliche Zellschicht auf dem Trennmedium. Die MNC werden sorgfältig abpipettiert und stehen der weiteren Bearbeitung zur Verfügung.

2.2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen der primären Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert, gezählt und auf 4×10^7 Zellen pro ml Einfriermedium eingestellt. Anschließend wurden je 1ml der Zellsuspension in Cryoröhrchen überführt, in einer Einfrierbox bei -80°C langsam eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigen Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, mit $500\mu\text{l}$ Auftaumedium überschichtet und in ein 37°C Wasserbad überführt. Sofort nach dem Auftauen wurden die Zellen in ein 50ml Polypropylenröhrchen pipettiert, mit PBS aufgefüllt und anschließend 7 Minuten bei 1300rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5ml PBS resuspendiert, die Zellen gezählt und direkt danach weiter verarbeitet.

2.2.2.2.3 Aufreinigung der Zellen durch eine immunomagnetische Säule

Nach Vorbereitung der Zellproben wurden diese mit Hilfe einer sogenannten Negativaufreinigung auf $\text{CD}34^+$ Zellen aufgereinigt. Bei diesem Verfahren werden Zellen, die bereits linienspezifische Antigene exprimieren durch eine immunomagnetische Säule manuell entfernt. Dadurch wurde eine mit $\text{CD}34^+$ Zellen angereicherte Zellprobe erhalten, die einen großen Anteil an unreifen Zellen besitzt.

Die für die Versuche verwendeten Zellen wurden mit einer, je nach Zellzahl ausgewählten, immunomagnetischen Säule aufgereinigt. Vor der Aufreinigung wurden die zentrifugierten Zellen auf 8×10^7 Zellen pro ml PBS/2%FCS eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Lösung aus monoklonalen Antikörpern, dem sogenannten *Enrichment Cocktail*, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Cocktail enthält tetramere Antikörperkomplexe, bestehend aus zwei monoklonalen IgG1 Maus-Antikörpern sowie zwei monoklonalen IgG1 Rattenantikörpern. Einer der Maus-Antikörper richtet sich gegen Epitope von Vorstufen spezifischer Zellpopulationen. Darunter befinden sich CD2 und CD3 gegen T-Lymphozyten, CD14 und CD16 gegen Monozyten, CD19 und CD24 gegen B-Zellen, CD56 gegen natürliche Killerzellen, CD66b gegen Granulozyten und Glycophorin A gegen Erythrozyten. Danach wird die Zellsuspension mit einer zweiten Lösung, welche ein mit Dextranmolekülen ummanteltes magnetisches Kolloid enthält, nochmals 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. An dieses Kolloid bindet der zweite Mausantikörper des Komplexes. Nachdem die immunomagnetische Säule

mit PBS/2%FCS gespült wurde, wird die vorbereitete Zelllösung auf die Säule gegeben.

Zellen, die Epitope entsprechend der Tetramer-Antikörper exprimieren, werden beim Durchlaufen der Säule an den Metallscheiben zurückgehalten, während Zellen ohne diese Epitope die Säule passieren und in einem 50 ml Polypropylenröhrchen aufgefangen werden. Diese Zellen stellen die gewünschte, hochangereicherte CD34⁺ Zellpopulation dar, da sie von bereits differenzierten Vorläufern getrennt wurden. Der jeweilige Anteil an CD34⁺ Zellen konnte abschließend durchflußzytometrisch evaluiert werden. (Abbildung 7)

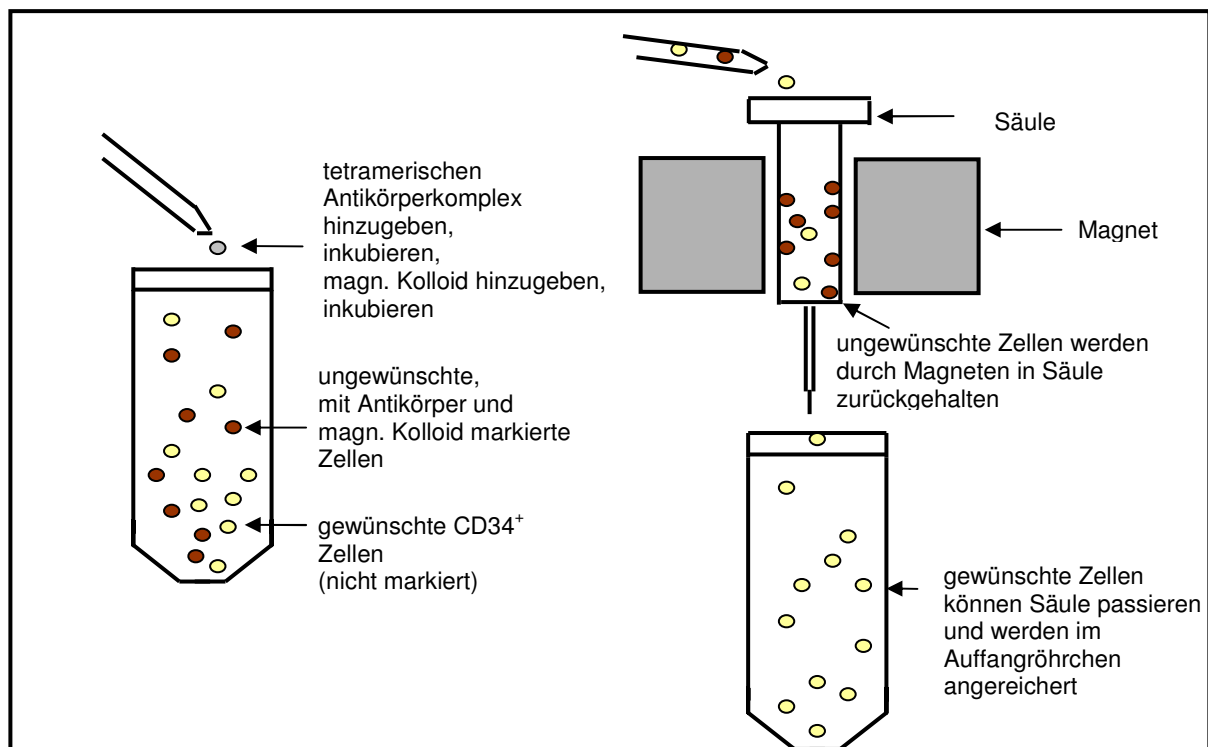


Abbildung 7: Aufreinigung von CD34⁺ Zellen mittels immunomagnetischer Säule

Mit Antikörper und magnetischem Kolloid markierte Zellen werden in der immunomagnetischen Säule zurückgehalten, wohingegen die aufgereinigte CD34⁺ Zellpopulation in einem Auffangröhrchen angereichert wird.

2.2.2.2.4 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50µl Trypanblau bzw. 50µl Türklösung mit 50µl der in PBS verdünnten Zellsuspension versetzt.

Trypanblau reichert sich in Zellen mit defekter Zellmembran an. So konnten die ungefärbten, vitalen Zellen gezählt werden. Die Anzahl der Zellen wurde unter Berücksichtigung von Verdünnung und Kammervolumen berechnet.

Türcklösung lysiert in der Zellsuspension enthaltene Erythrocyten, die das Ergebnis verfälschen würden. Allerdings ist bei dieser Methode keine Unterscheidung zwischen vitalen und nicht-vitalen Zellen möglich.

2.2.3 Durchflusszytometer

Die immunphänotypische Analyse der Zellproben wurde mit einem Durchflusszytometer durchgeführt.

2.2.3.1 Grundprinzip der Durchflusszytometrie

Zur immunphänotypischen Charakterisierung der Zellen wurde ein FACSCalibur Vierkanaldurchflußzytometer verwendet. Dieses setzt sich aus einem Argonlaser (488nm Wellenlänge), einem Helium-Neonlaser (635nm Wellenlänge) zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe und einer optischen Detektiereinheit für Fluoreszenz (FL)-1 FITC, FL-2 PE, FL-3 PerCP (Peridin-Chlorophyll-a Proteinkomplex) und FL-4 APC mit anschließender Datenverarbeitungsanlage zusammen. Zur Messung der Größe (Front Side Scatter, FSC) und Granularität (Sideangle Scatter, SSC) der Zellen wird das von ihnen gebrochene Streulicht analysiert. Weiterhin wird das Fluoreszenzspektrum der Zellen entsprechend ihrer mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörper besetzten Epitope detektiert. Diese Daten werden auf einem Apple Macintosh mit Hilfe des Programms CellQuest (B&D) durch Darstellung in Histogrammen oder Punktdiagrammen (Dotplot) ausgewertet.

Um Überlappungen der Fluoreszenzspektren zu vermeiden, muss vor der eigentlichen Messung das Gerät jeweils individuell kompensiert werden. Dazu wurden die zuvor für die Kompensation markierten Zellen, die aus dem Pool der zur Messung vorbereiteten Zellen entnommen worden waren, durchflußzytometrisch gemessen. Dabei wurde das Gerät entsprechend der allgemeingültigen Kompensationsvorschriften geeicht. Im Anschluss daran wurden die vorbereiteten Zellproben analysiert. Um vergleichbare Daten bei der Analyse von FACS-Daten zu erzielen, wurden in den Dotplots die entsprechenden Fenster (Gates) so gelegt, dass

>98% der Isotyp-Events negativ waren. Die Gates wurden individuell an die jeweiligen Bedingungen angepasst.

2.2.3.2 Färben der Zellen mit Antikörpern

Um das Epitopenspektrum der Zellen durchflußzytometrisch zu analysieren, wurden diese mit monoklonalen Antikörpern, die mit entsprechenden fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert waren, markiert.

Zunächst wurden die zu analysierenden Zellen in ein Polypropylenröhrchen überführt und 7 Minuten bei 1300rpm abzentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands wurden die Zellen mit einzelnen oder in Kombination verdünnten Antikörpern sättigend 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen um überschüssigen, ungebundenen Antikörper zu entfernen. Sollten weitere sekundäre Antikörperfärbungen nötig sein, wurden diese Schritte entsprechend wiederholt. Um während der Messung im Durchflußzytometer tote, d.h. nekrotische bzw. im späten Stadium apoptotische Zellen auszuschließen, wurden diese im letzten Waschschrift mit in PBS verdünnten Propidium-Jodid (PI) gewaschen. PI durchdringt die defekte Zellmembran von toten Zellen und lagert sich im Intrazellularraum an. Durch Anregung mit dem 488nm Argonlaser kann die Eigenfluoreszenz von PI im FL-3 Kanal gemessen werden. Die Zellen wurden schließlich auf 1×10^6 Zellen pro ml PBS eingestellt, um eine optimale Durchflußrate im FACS zu gewährleisten, und sofort gemessen. Isotypkontrollen wurden entsprechen der verwendeten Antikörper mitgeführt.

2.2.3.3 Bestimmung des CD34⁺ Anteils von Zellen

Zur Bestimmung des CD34⁺ Anteils wird ein Aliquot der Zellen in je zwei Röhrchen pipettiert, zentrifugiert und nach Abkippen der Überstände mit Antikörpern gefärbt. Zur Bestimmung des Gehalts an CD34⁺ Zellen wurde jeweils ein Röhrchen mit den Antikörpern CD45 FITC, ISO PE und ISO APC sowie mit den Antikörpern CD45 FITC, CD38 PE und CD34 APC gefärbt. Der weitere Färbvorgang und Vitalitätsnachweis erfolgte wie unter Punkt 2.2.3.2 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflußzytometer immunphänotypisch charakterisiert. Danach wurde der CD34⁺ Anteil der untersuchten Zellen den FACS-Daten entnommen. Dazu wurden die durch die ISO APC Färbung detektierten

unspezifischen Bindungen von der Absolutzahl der CD34⁺ Zellen subtrahiert und die prozentuale Anzahl der CD34⁺ Zellen berechnet.

2.2.4 Adhäsionsassay

Um die Funktionstüchtigkeit der auf den Zelllinien KG-1, TF-1 und Mo7e sowie auf primären CD34⁺ Zellen exprimierten Integrine VLA-4 und VLA-5 nachzuweisen und um die Frage zu klären, inwiefern sich eine Stimulation mit verschiedenen Zytokinen auf die Adhärens der Zellen an Fibronectinfragmente auswirkt, wurde ein durchflusszytometrischer Ligandenassay etabliert. Neben Fibronectinfragmenten wurde den Zellen auch Retronektin CH-296 zur Adhäsion angeboten. Hierbei handelt es sich um ein rekombinantes humanes Fibronectinfragment, das spezifische Bindungstellen für die durch Zytokine stimulierbaren Integrine VLA-4 und VLA-5 besitzt. VLA-4 erkennt spezifisch das CS-1 Peptid während VLA-5 an die RGD-Sequenz von CH-296 bindet (68)

2.2.4.1 Spontanadhäsion von Fibronectin und CH296

Als erstes sollte die Spontanadhäsion von Fibronectinfragmenten sowie CH-296 an KG-1 Zellen analysiert werden. Aus diesem Grund wurden KG-1 Zellen in ein Polypropylenröhrchen überführt, abzentrifugiert, und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 1×10^6 Zellen ohne Ligand, mit 10ng Fibronectin, 100ng Fibronectin und 4µg/ml CH-296 in einem Polystyrolröhrchen 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf je vier neue Röhrchen verteilt und wie in Tabelle 1 gezeigt mit einer Kombinationen aus drei Antikörpern gefärbt (Färbeschema siehe Punkt 2.2.3.2)

	1.Antikörper	2.Antikörper	3.Antikörper
Röhrchen 1:	Fibronectin Ab-1	Kaninchen-anti-Maus PE	VLA-4 FITC
Röhrchen 2:	Fibronectin AB-1	Kaninchen-anti-Maus PE	VLA-5 FITC
Röhrchen 3:	Fibronectin AB-8	Kaninchen-anti-Maus PE	VLA-4 FITC
Röhrchen 4:	Fibronectin AB-8	Kaninchen-anti-Maus PE	VLA-5 FITC

Tabelle 1: Antikörperfärbung zum durchflußzytometrischen Nachweis gebundener Fibronectinfragmente

Nach der Inkubation ohne Ligand, mit 10ng Fibronectin, 100ng Fibronectin und 4µg/ml CH-296 wurde die Adhäsion dieser Fragmente durchflußzytometrisch ermittelt. Gleichzeitig wurde die Expression von VLA-4 und VLA-5 überprüft

Als Isotypkontrolle wurden unbehandelte Zellen mit einem Antikörpercocktail aus ISO IgG1- Kaninchen-anti-Maus PE und ISO FITC gefärbt. Anschließend wurde der Anteil gebundener Fibronectin- bzw. CH-296 Moleküle mittels Durchflußzytometer bestimmt. Zur Bestimmung ihres prozentualen Anteils wurden die durch die ISO IgG1-Kaninchen-anti-Maus PE detektierten unspezifischen Bindungen von der Absolutzahl an gebundenen Fibronectinmolekülen abgezogen.

2.2.4.2 Messung der Adhäsion hämatopoetischer Zelllinien

KG-1, TF-1 oder Mo7e Zellen wurden in Propylenröhrchen überführt, abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und je 1×10^6 Zellen in 1ml RPMI auf Polystyrolröhrchen verteilt. Diese Zellen wurden mit verschiedenen Kombinationen, bestehend aus CH-296 und stimulierenden Zytokinen (SCF, VEGF, FLT-3 Ligand und HGF 2 Stunden bei 37 °C inkubiert (Tabelle 2).

	Röhrchen 1 (1×10^6 Zellen)	Röhrchen 2 (1×10^6 Zellen)	Röhrchen3 (1×10^6 Zellen)	Röhrchen 4 (1×10^6 Zellen)	Röhrchen 5 (1×10^6 Zellen)
CH296	-	4µg	4µg	4µg	4µg
Zytokin	-	-	1ng	10ng	100ng

Tabelle 2: Inkubation der Zelllinien mit CH-296 und verschiedenen Zytokinkonzentrationen

Die Zelllinien wurden mit 4µg CH-296 und verschiedenen Zytokinkonzentrationen inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Ligand und ohne Zytokinstimulation mitgeführt. Zur Ermittlung der Spontanadhäsion wurden die Zellen nur mit dem Liganden inkubiert.

Als Kontrolle wurden Zellen ohne CH-296 und ohne Zytokinstimulation mitgeführt. Um die Spontanadhäsion der Zellen zu ermitteln, wurden diese nur mit CH-296 ohne simultane Zytokinstimulation, inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zur Entfernung von überschüssigen, ungebundenen CH-296 zweimal mit PBS gewaschen. Um durchflußzytometrisch eine Adhäsion von CH-296 an den Zellen zeigen zu können, wurden diese mit dem anti-Fibronectin AB1 Antikörper, der durch eine Sekundärfärbung an einen Kaninchen-anti-Maus PE Antikörper gekoppelt wurde, und einem VLA-4 FITC Antikörper wie unter Punkt 2.2.3.2. beschrieben gefärbt. Zur Detektion unspezifischer Bindungen wurde ein Aliquot unbehandelter Zellen mit einer Antikörperkombination aus den Antikörpern ISO FITC und ISO PE gefärbt. Anschließend wurden die Zellen im Durchflußzytometer gemessen, und der prozentuale Anteil der an CH-296 gebundenen Zellen durch Subtraktion der durch die ISO PE detektierten unspezifischen Bindungen errechnet.

2.2.4.3 Blockade der von VLA-4 und VLA-5 vermittelten Adhäsion nach Inkubation mit spezifischen blockierenden Antikörpern

KG-1 Zellen wurden in Polypropylenröhrchen überführt, abzentrifugiert, gezählt und je 1×10^6 Zellen in 1ml RPMI auf Polystyrolröhrchen verteilt. Diese Zellen wurden zunächst 2 Stunden bei 37°C mit blockierenden Antikörpern gegen $\alpha 4$ (1:400), $\alpha 5$ (1:400) sowie einer Kombination aus beiden blockierenden Antikörpern inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen ohne vorherige Waschschrirte auf jeweils drei Polystyrolröhrchen verteilt und ohne CH-296 und SCF, mit 4 μ g CH-296 und mit 4 μ g CH-296 und 10ng SCF inkubiert (Tabelle 3)

	Röhrchen 1 (1×10^6 Zellen)	Röhrchen 2 (1×10^6 Zellen)	Röhrchen 3 (1×10^6 Zellen)
CH296	-	4 μ	4 μ g
SCF	-	-	10ng

Tabelle 3: Stimulation der KG1 Zellen nach Inkubation mit blockierenden Antikörpern gegen VLA-4 und VLA-5

Nach der Inkubation mit blockierenden Antikörpern wurden die Zellen sowohl ohne Ligand und ohne SCF-Stimulation, nur mit Liganden sowie mit Ligand und mit SCF in Kombination versetzt.

Anschließend wurde die Zellen zur Entfernung ungebundenes CH-296 zweimal mit PBS gewaschen und dann wie unter Punkt 2.2.4.2 beschrieben der prozentuale Anteil zellgebundenen CH-296 nach Färben mit entsprechenden Antikörpern durchflußzytometrisch ermittelt.

2.2.4.4 Der Effekt von SCF auf die Adhäsion verschiedener primärer humaner Zellen an CH-296

Mononukleäre Zellen von gesunden Personen, gesunden G-CSF behandelten Spendern sowie mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut wurden nach manueller Dichtezentrifugation (siehe Punkt 2.2.2.2.1) immunomagnetisch aufgereinigt (siehe Punkt 2.2.2.2.3).

Die so gewonnenen Zellen wurden gezählt und auf vier Polystyrolröhrchen verteilt. Drei der Röhrchen wurden wie in Tabelle 6 gezeigt mit 4µg/ml CH-296 und 10ng SCF inkubiert. Das verbliebene Röhrchen diente zur Isotypkontrolle und blieb unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und mit Fibronectin AB1 PE, VLA-4 FITC und CD34 APC Antikörpern wie unter Punkt 2.2.3.2 beschrieben gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Für die Isotypkontrolle wurden die vorgesehenen Zellen mit ISO FITC, ISO PE und CD34 APC Antikörpern gefärbt.

2.2.5 Xenotransplantationsmodell

2.2.5.1 NOD/SCID Mäuse

Um den Einfluss von SCF auf das Homing und Engraftment humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen *in vivo* zu überprüfen, wurden diese in *non-obese diabetic/severe combined immunodeficient* (NOD/SCID) Mäuse transplantiert. Diese Mäuse besitzen weder ein humorales noch ein zelluläres Immunsystem, wodurch eine spezieübergreifende Transplantation möglich ist (121).

2.2.5.2 Haltung der Tiere

Die Tiere wurden in eigener Zucht in Käfigen mit steriler Umluft gehalten und mit keimarmen Futter sowie mit 1ml/L HCl angesäuertem, entionisiertem Wasser

versorgt. Ab der Bestrahlung bis zum Ende der Experimente wurde dem Wasser zusätzlich 0,1mg/ml Ciprofloxacin beigefügt, um die Mäuse vor nosokomialen Infektionen zu schützen. Das verwendete keimarme Streu wurde täglich von speziell ausgebildeten Tierpflegern gewechselt.

2.2.5.3 Bestrahlung der Tiere

6-8 Wochen alte Versuchstiere wurden am Vortag der Transplantation zunächst morgens und dann im Abstand von mindestens sechs Stunden mit jeweils 100cGy „Low Rate“ in einem Linearbeschleuniger (Primus, Siemens) subletal ganzkörperbestrahlt. Dazu wurden die Tiere kurz vor der Radiation in eine Bestrahlungskammer aus Plexiglas umgesetzt. Die erforderliche Bestrahlungsdosis war anhand von Serienversuchen zuvor individuell für den Versuchsaufbau bestimmt worden.

2.2.5.4 Analyse des Langzeit-Engraftments

2.2.5.4.1 Versuchsprotokoll

Um den Einfluss von SCF auf das Langzeit-Engraftment humaner, hämatopoietischer Vorläuferzellen nach Transplantation in NOD/SCID Mäusen zu untersuchen, wurden die Versuchstiere in zwei Gruppen unterteilt. Einer der Gruppen wurden Zellen injiziert, denen unmittelbar vor der Transplantation 10µg SCF pro Tier zugefügt worden waren. Die zweite Gruppe erhielt als Kontrolle humane Zellen ohne SCF Stimulation.

2.2.5.4.2 Vorbereitung der für die Injektion verwendeten Zellen

Für die Xenotransplantation wurden sowohl lin- Zellen von G-CSF behandelten gesunden Spendern, als auch mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut verwendet. Die für das jeweilige Experiment benötigte Zellmenge wurde berechnet, dem flüssigen Stickstoff entnommen und wie unter Punkt 2.2.2.2.2 beschrieben aufgetaut und vorbereitet. Wenn nötig wurden die Zellen mehrerer Spender nach dem Auftauen *gepoolt*. 2×10^5 Zellen wurden zur Bestimmung des CD34⁺ Anteils der Zellen (siehe Punkt 2.2.3.3) in zwei Polypropylenröhrchen überführt. Die restlichen

Zellen wurden auf zwei weitere Polypropylenröhrchen verteilt, abzentrifugiert und pro Versuchstier in 100µl PBS aufgenommen. Zusätzlich wurden beiden Röhrchen pro Maus 100µl Carrier-Zellen zupipettiert. Diese wurden zuvor mit 9.500 rad bestrahlt, um eine Proliferation und somit eine Verfälschung des Ergebnis zu verhindern und auf 1×10^7 Zellen pro ml PBS eingestellt. Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

2.2.5.4.3 Injektion der Zellen

Den Versuchstieren wurden die humane Zellen intravenös in die Schwanzvene appliziert. Der Injektionsvorgang wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden die Tiere ca. 10 Minuten mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, um durch die daraus folgende Kreislaufanregung eine Dilatation der Schwanzvene zu erreichen. Anschließend wurden die Tiere in eine spezielle Injektionskammer gesetzt. Die daraus resultierende Unbeweglichkeit der Tiere ermöglicht eine schmerzlose Injektion. Jedem Tier wurden 200µl der vorbereiteten Zellsuspension verabreicht. Danach wurden die Mäuse wieder in ihren Käfig gesetzt.

2.2.5.4.4 Euthanasierung der Versuchstiere

Sechs Wochen nach Applikation der humanen Vorläuferzellen wurden die Tiere mittels CO₂-Gases gemäß den geltenden Tierschutzregeln eingeschläfert. Nach der Freilegung des Unterkörpers wurden den Mäusen zunächst beide Hinterbeine amputiert. Anschließend wurde ihnen die Bauchhöhle geöffnet und vorsichtig Leber, Nieren, Hoden und Gehirn für immunhistologische Analysen entnommen

2.2.5.4.5 Isolation muriner Knochenmarkszellen

Femur und Tibia der beiden Hinterläufe wurden nach der Amputation mit Hilfe einer Schere vom restlichen Muskelfleisch gesäubert und bis zur Weiterverarbeitung in ein Polystyrolröhrchen mit 5ml Iscoves (10% FCS) überführt. Später wurden die Knochenenden mit einer Schere abgeschnitten und die Knochenmarkskanäle freigelegt. Diese wurden mit PBS (10ml Spritze, 0,4mm bzw. 0,6mm Kanüle) durchgespült. Das herausgedrückte Knochenmark wurde in einem frischen Röhrchen

aufgefangen, abzentrifugiert und in 1ml PBS resuspendiert. Um eventuell enthaltene Knochensplitter zu entfernen, wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer 1000µl Eppendorfpipette mehrmals auf- und abpipettiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen zur Lyse der Erythrozyten in 2ml NH₄Cl-Puffer 12 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wurde mit 2ml Iscoves (10%FCS) gestoppt, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach Resuspension in 5 ml PBS wurden die Zellen über einen 70µm Filter in ein frisches Röhrchen überführt, abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 5ml PBS aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50µl der Zellsuspension mit 50µl Trypan-Blau vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. 2x10⁶ Zellen wurden für FACS-Färbungen bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die restlichen Zellen wurden in 10%DMSO und 90% FCS für weitere Experimente eingefroren.

2.2.5.4.6 Durchflußzytometrische Analyse des murinen Knochenmarks

Das isolierte Knochenmark der Versuchstiere wurde durchflußzytometrisch auf das Vorhandensein humaner Zellen überprüft. Dazu wurden die murinen Knochenmarkszellen mit Antikörpern gegen humane myeloische und humane lymphatische Zellen markiert. Von einem Engraftment wurde gesprochen, wenn 20.000 analysierte, murine Zellen wenigstens fünf humane myeloische und fünf humane lymphatische Zellen vorwiesen.

Zur Inhibition unspezifischer Bindungen wurde zunächst der zelluläre Fc-Rezeptor für 15 Minuten bei 4°C mit einem anti-Maus CD16/CD32 Antikörper inkubiert. Überschüssiger, ungebundener Antikörper wurde durch Zentrifugation mit 1ml PBS und Verwerfen des Überstandes entfernt. Pro murinen Knochenmark wurden anschließend zwei FACS-Färbungen durchgeführt. Je 1x10⁶ Zellen wurden mit einem Antikörpercocktail aus CD19 & CD20 PE - CD34 APC Antikörpern und CD15 (IgM) & CD66b FITC-CD45&CD71PE Antikörpern inkubiert. Die Färbe- und Waschschriffe erfolgten wie unter Punkt 2.2.3.2 beschrieben. Als Negativkontrolle dienten Zellen einer Maus, der keine humanen Zellen appliziert worden waren. Parallel dazu wurden von einem Knochenmark Isotypkontrollen mitgeführt. Je 1x10⁶ Zellen wurden mit Antikörpercocktails aus ISO PE-ISO APC Antikörpern und ISO FITC IgG & ISO FITC IgM-ISO PE IgG Antikörpern gefärbt. Nach der

durchflußzytometrischen Messung wurde der prozentuale Anteil der humanen Zellen nach Subtraktion der unspezifischen Bindungen ermittelt.

2.2.5.4.7 DNA-Analyse des murinen Knochenmarks

Die murinen Knochenmarkszellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und aufgetaut (siehe Punkt 2.2.2.2.2). Anschließend wurde die DNA der Zellen mit Hilfe eines QIAamp DNA Mini Kits nach Anleitung des Herstellers isoliert. Nach Bestimmung des DNA-Gehalts der Proben wurden jeweils 12,5ng der DNA in eine PCR-Reaktion eingesetzt, die mit Hilfe eines Hot Star Taq Master Mix Kit nach Anweisung des Herstellers in einem programmierbaren PTC - 200 Peltier Thermal Cycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt wurde:

	<u>15 Minuten 94 °C</u>
30 Zyklen	30 Sekunden 94 °C
	30 Sekunden 55 °C
	<u>60 Sekunden 72 °C</u>
	10 Minuten 72 °C
	4 °C halten

Als negativ Kontrolle wurde eine Probe ohne DNA mitgeführt. Das 5' Actin PCR-Produkt besitzt eine Größe von 1kb und wurde über ein 1% Agarosegel (80ml TAE-Puffer+1,2g Agarose) aufgetrennt. Die Größe des PCR-Produktes wurde mit Hilfe einer 1kb DNA-Leiter verifiziert.

2.2.5.4.8 Einbetten der entnommenen Organe

Nach der Freipräparation von Leber, Nieren, Hoden und Gehirn wurden die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dazu wurden sie in ein mit Einbettmedium (Tissue Tec) gefülltes Plastikförmchen gelegt und anschließend mit Einbettmedium überschichtet. Das Plastikförmchen wurde mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig in flüssigen Stickstoff gehalten. Dabei gefriert das Gewebe sofort durch. Anschließend wurden die Organe bis zur entgeltigen Verwahrung bei -80 °C auf Trockeneis, bzw. Kühlakkus gelagert.

2.2.5.4.9 Cryoschnitte

Die eingebetteten Organe wurden auf -20°C erwärmt, da sie sich so besser schneiden lassen. Mit Hilfe eines Kältemikrotoms wurden 5µm Schnitte angefertigt und auf Objektträger übertragen. Die Objektträger wurden bis zur immunhistologischen Markierung bei -80°C gelagert.

2.2.5.4.10 Immunhistologische Färbung der Cryoschnitte

Zur Bestimmung des Anteils humaner Zellen im jeweiligen Organ wurde eine Doppelfärbung durchgeführt. Zunächst wurden die einzelnen Schnitte mit einem 1-Bromopropane enthaltenden Fettstift (DakoPen, Dako) umrandet und 10 Minuten getrocknet. Dies sollte ein Verlaufen der auf die Schnitte pipettierten Antikörper verhindern. Danach wurden die Schnitte 10 Minuten in einem Gemisch aus 1 Teil Aceton und 2 Teilen Methanol fixiert. Die Objektträger wurden anschließend drei Mal 5 Minuten in PBS gewaschen und zur Blockade unspezifischer Bindungen mit 50µl 20%BSA überschichtet und in einer Dunkelkammer mit 100% Feuchtigkeit 20 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Abklopfen der Flüssigkeit wurden die Schnitte mit 50µl eines murinen, unkonjugierten gegen humane Zellkerne gerichteten Antikörpers (1:15 in 1%BSA) überschichtet und zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer mit 100% Feuchtigkeit inkubiert. Zur Entfernung überschüssigen, ungebundenen Antikörpers wurden die Schnitte erneut dreimal in PBS gewaschen und anschließend ein sekundärer FITC-konjugierter Kaninchen-anti-Maus Antikörper (1:50 in 1%BSA) für 1 Stunde zugegeben. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Objektträger erneut gewaschen. Zur Gegenfärbung der murinen Kerne wurde sodann ein Dapi haltiges *Vecta Shield Mounting Medium* zugegeben und zum Schutz des Präparates das draufgelegte Deckglas mit Nagellack fixiert.

Zur Überprüfung einer möglichen Transdifferenzierung der humanen Zellen wurden Leberschnitte wie zuvor beschrieben fixiert, geblockt und anschließend mit einem polyklonalen FITC konjugierten Antikörper gegen humanes Albumin gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte wie oben beschrieben gewaschen und eingedeckelt.

2.2.5.4.11 Auswertung der gefärbten Schnitte

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Um den prozentualen Anteil humaner Kerne in den jeweiligen Organen zu ermitteln, wurden per Zufall pro Schnitt fünf Gesichtsfelder im Mikroskop ausgewählt. Nun wurden sowohl die FITC-konjugierten humanen Zellkerne, als auch die Dapi-positiven Kerne gezählt. Der Prozentsatz humaner Zellen wurde durch Division der FITC-positiven Zellen mit den Dapi-positiven Zellen bestimmt.

2.2.6 Statistik

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- SEM (*Standard Error of the Mean*) angegeben. Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde der χ^2 -Test (CHI-Test) benutzt. Als signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Daten wird ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines durchflusszytometrischen Ligandenassays

Unsere Arbeitsgruppe konnte, mit Hilfe eines Adhäsionsassays, bei dem der Anteil an adhärenenten Zellen vor und nach Stimulation mit SCF mittels einer einfachen Zellzählung in einer Zählkammer bestimmt wurde, bereits zeigen, dass 30 Minuten Inkubation mit 10ng SCF den Anteil adhärenenten Zellen um den Faktor 1,6 von 14% (ohne SCF) auf 23% (mit SCF) erhöht (144). Durch die Stimulation mit SCF kommt es zur Modifikation des Aktivitätszustandes der Integrine VLA-4 und VLA-5, wodurch sich diese in einem funktionstüchtigen, d.h. zur Adhäsion fähigen Zustand befinden. Da das beschriebene Verfahren sehr zeitaufwendig ist, sollte in dieser Arbeit ein „flüssiger“ Ligandenassay entwickelt werden, der eine einfache und rasche funktionelle Messung der Bindungsaktivität der Integrine VLA-4 und VLA-5 nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen ermöglicht. Gleichzeitig sollte simultan die Oberflächenexpression der genannten Integrine überprüft werden. Das entwickelte Testprinzip beruht auf dem durchflußzytometrischen Nachweis eines für beide Integrine spezifischen Liganden durch einen fluoreszierenden Antikörper. Zellen die den spezifischen Liganden an die auf der Zelloberfläche exprimierten Integrine gebunden haben sind somit eindeutig zu identifizieren. (Abbildung 8)

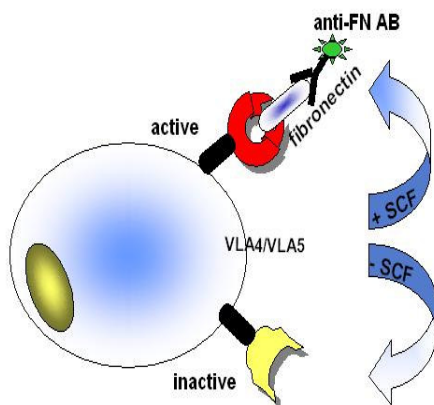


Abbildung 8: Prinzip der Messung der Bindungsaktivität von membranständigen Adhäsionsmolekülen

Die aktive Form von VLA-4 wird durch den Nachweis der Bindung ihres spezifischen Liganden durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper, der sich durchflußzytometrisch messen lässt geführt.

3.1.1 Ermittlung des optimalen Liganden

Zur Verwirklichung des vorgestellten Ligandenassays musste zuerst ein optimaler Fibronectin-Ligand gefunden werden. Aus diesem Grund wurden KG-1 Zellen mit 10ng Fibronectin, 100ng Fibronectin und 4µg/ml CH-296 inkubiert und anschließend der prozentuale Anteil von Zellen, an die Fibronectin gebunden hatte, durchflusszytometrisch gemessen. Parallel dazu wurden zwei anti-Fibronectin-Antikörper, *anti-Fibronectin AB-1* und *anti-Fibronectin AB-8*, auf ihre Funktionalität in diesem System getestet. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt.

Sowohl mit 10ng Fibronectin als auch mit 100ng Fibronectin konnte keine Adhäsion des Liganden an KG-1 Zellen gezeigt werden, wohingegen mit CH-296, nach 2 stündiger Inkubation, eine maximale Spontanadhäsion von 22% erzielt wurde, die durch längere Inkubationszeiten nicht weiter gesteigert werden konnte (Abbildung 9). Daher wurde für die weiteren Experimente CH-296 als spezifischer Ligand für VLA-4 und VLA-5 verwendet. Als optimale Inkubationsdauer wurde 2 Stunden ermittelt.

An Zellen gebundenes CH-296 konnte nur mit Hilfe des *anti-Fibronectin AB-1* Antikörper nachgewiesen werden. *Anti-Fibronectin AB 8* besaß in dem hier entwickelten System keine Funktionalität und wurde daher nicht weiter verwendet.

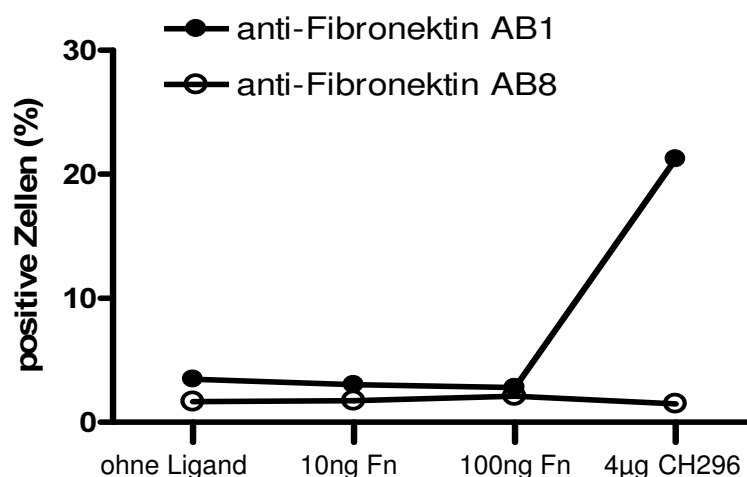


Abbildung 9: Ermittlung der Spontanadhäsion von KG-1 Zellen an Fibronectin und CH-295

KG-1 Zellen wurden mit 10ng FN, 100ng FN und 4µg/ml CH-296 2 Stunden inkubiert und anschließend die Adhäsion von Fn an die Zellen durchflußzytometrisch mit Hilfe zweier spezifischer AK, anti FN-AB 1 (ausgefüllte Kreise) und anti FN- AB 8 (offene Kreise), gemessen. Dargestellt sind auf der x-Achse die verschiedenen Liganden-Konzentrationen und auf der Y-Achse der prozentuale Anteil an Zellen die Fn auf ihrer Oberfläche gebunden haben.

3.1.2 Expression von c-kit (SCF), c-met (HGF/SF), FLT-3 (FLT-3 Ligand) und KDR (VEGF) auf der Oberfläche hämatopoetischer Zelllinien

Zahlreiche Studien belegten, dass eine Inkubation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren das Adhäsionsverhalten hämatopoetischer Zellen beeinflusst. Um die Wirkung der Zytokine SCF, HGF/SF, Flt-3 Ligand und KDR auf das Adhäsionsverhalten verschiedener Zelllinien zu ermitteln, wurde zunächst die Oberflächenexpressionen der, für diese Zytokine, spezifischen Liganden auf den zur Verfügung stehenden Zelllinien KG-1, TF-1 und Mo7e durchflußzytometrisch analysiert. Bei den zu untersuchenden Liganden handelt es sich um c-kit für SCF, c-met für HGF/SF, Flt-3 für Flt-3 Ligand und KDR für VEGF. Während KG-1 und TF-1 Zellen alle vier beschriebenen Liganden exprimierten, konnten auf der Oberfläche von Mo7e Zellen nur c-kit und KDR nachgewiesen werden (Tabelle 4)

	c-kit (SCF)	c-met (HGF/SF)	KDR (VEGF)	FLT3 (FLT-3-Ligand)
KG-1	+	+	+	+
TF-1	+	+	+	+
Mo7e	+	-	+	-

Tabelle 4: Expression der Rezeptoren c-kit, c-met, KDR und FLT3 auf der Oberfläche der hämatopoetischen Zelllinien KG-1, TF-1 und Mo7e.

Dargestellt ist durch + und -, ob der jeweilige Rezeptor auf der Zelle durchflußzytometrisch nachgewiesen werden konnte. In Klammer die jeweiligen spezifischen Liganden.

3.2 Der Effekt von SCF, HGF/SF, Flt-3 Ligand und VEGF auf die integrinvermittelte Ligandenbindung der hämatopoetischen Zelllinien KG-1, TF-1 und Mo7e

Nachdem die Oberflächenexpression der spezifischen Liganden für SCF, VEGF, HGF/SF und Flt-3 Ligand sowohl auf KG-1 und TF-1 Zellen nachgewiesen worden

war, sollte ermittelt werden inwieweit eine Stimulation beider Zelllinien mit den beschriebenen Zytokinen deren Bindung des Fibronektinfragments CH-296 beeinflusst. Daher wurden die Zellen mit 4 µg CH-296 alleine und in Kombination mit den entsprechenden Zytokinen in den Konzentrationen 0ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Bindung von CH-296 an den jeweiligen Zellen durchflußzytometrisch ermittelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgemessen. Aufgrund der fehlenden Expression von c-met und flt-3 wurden Mo7e-Zellen nur mit SCF und VEGF, wie oben beschrieben, stimuliert. Abbildung 10 stellt ein charakteristisches FACS-Profil für die durchflußzytometrische Messung der Bindung von CH-296 an KG-1 Zellen dar.

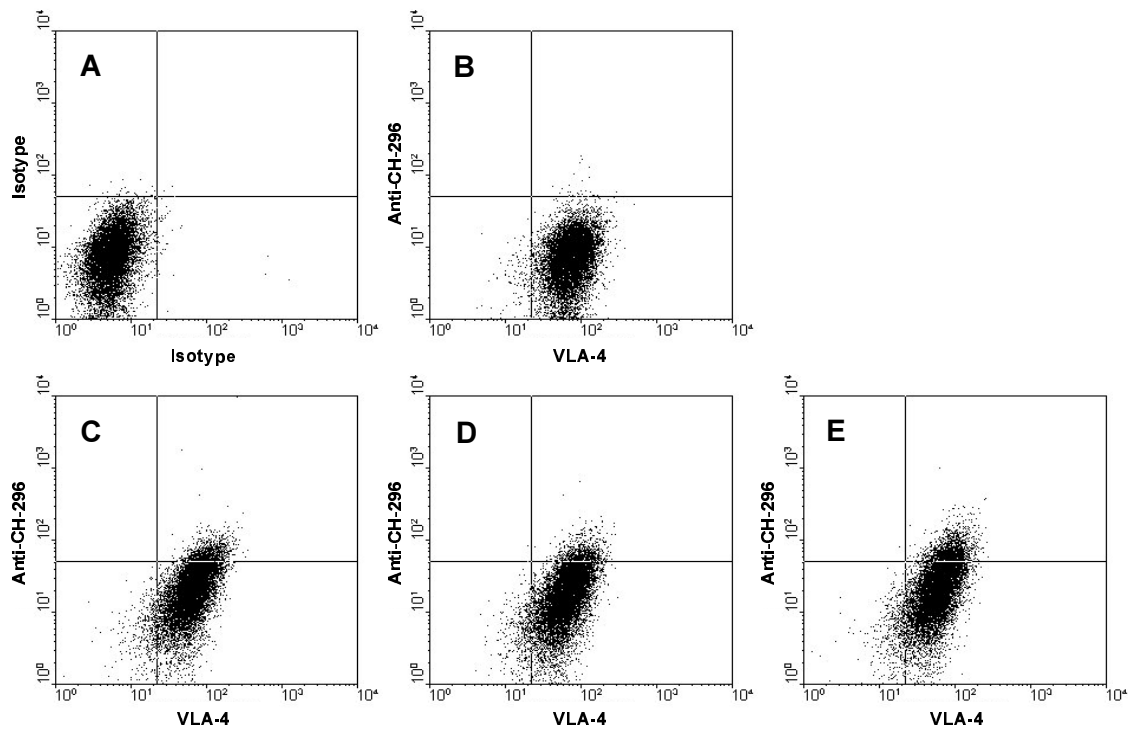
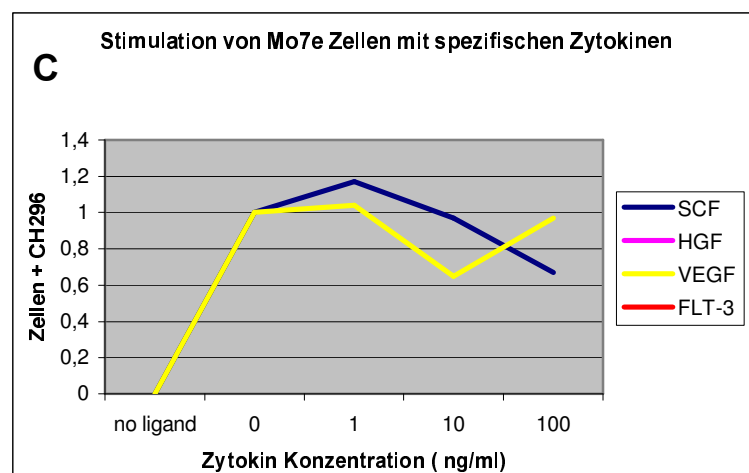
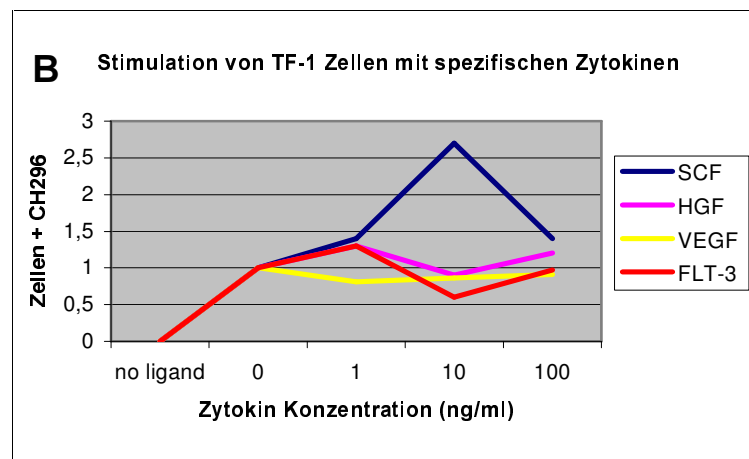
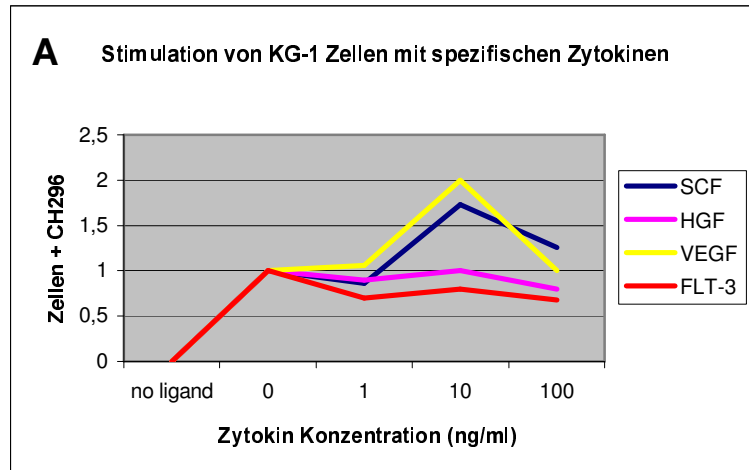


Abbildung 10: Beispiel für die durchflußzytometrische Messung der Bindung von CH-296 an KG-1 Zellen.

KG-1 Zellen wurden für 2 Stunden ohne CH-296 (A,B) und mit 4 µg/ml CH-296 (C,D,E) inkubiert. SCF wurde in den Konzentrationen 1 ng/ml (D) und 10 ng/ml (E) zugesetzt. Dargestellt sind in A der Isotyp und in B-E VLA-4 (X-Achse) und Anti-CH-296 (Y-Achse).

Die Untersuchung der Bindungsaktivität von VLA-4 und VLA-5 auf den genannten hämatopoetischen Zelllinien ergab, dass durch eine Stimulation mit SCF und VEGF eine Zunahme der Bindungsaktivität auf KG-1 Zellen, und durch Stimulation mit SCF auf TF-1 Zellen zu erzielen war. Dabei zeigte die Dosis-/Wirkungskurve, dass bei

beiden Zytokine der maximale Effekt bereits bei einer Dosis von 10ng/ml beobachtet werden kann. Auf Mo7e Zellen konnte alleine mit 1ng/ml SCF eine verstärkte Bindung von CH-296 verzeichnet werden. Eine Änderung der Expressionsdichte von VLA-4 und VLA-5 auf der Zelloberfläche wurde nicht nachgewiesen. (Abbildung 11)



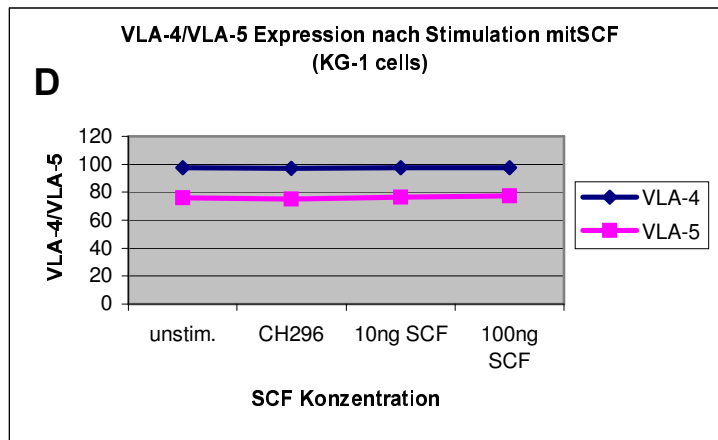


Abbildung 11: Untersuchung der Expression und der Bindungsaktivität von VLA-4 und VLA-5 auf den Zelllinien KG-1, TF-1 und Mo7e nach Stimulation mit SCF, HGF, VEGF und Flt-3 Ligand

KG-1- (A), TF-1- (B) und Mo7e- (C) Zellen wurden für zwei Stunden mit und ohne CH-296 inkubiert. Gleichzeitig wurde SCF, HGF/SF, VEGF oder Flt-3 Ligand in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Dargestellt sind auf der X-Achse die Konzentrationen der Zytokine und auf der Y-Achse der Anteil an Zellen, die CH-296 gebunden haben. Aufgetragen wurde der Mittelwert von drei Experimenten, wobei zur besseren Vergleichbarkeit die Werte normiert wurden, so dass der Wert ohne Stimulus gleich 1 gesetzt wurde. Parallel dazu wurde die Oberflächenexpression von VLA-4 bzw. VLA-5 auf den Zellen gemessen (D) (dargestellt als % positiver Zellen).

3.2.1 Analyse der SCF-induzierten Adhäsion auf verschiedenen primären humanen Zellen

Nachdem mit Hilfe des hier entwickelten Adhäsionsassays gezeigt werden konnte, dass eine Stimulation mit SCF, sowie zum Teil mit VEGF, die Adhäsion von CH-296 an KG-1 und TF-1 Zellen steigert, war es von großem Interesse, inwieweit SCF die Spontanadhäsion primärer humaner Zellen ebenfalls beeinflusst. Deshalb wurden LIN- Zellen von freiwilligen Spendern, freiwilligen G-CSF mobilisierten Spendern sowie LIN- Zellen aus Nabelschnurblut, wie zuvor beschrieben, ebenfalls mit 4µg CH-296 alleine sowie in Kombination mit 10ng SCF inkubiert. Anschließend wurde die Bindung von CH-296 an der Oberfläche dieser Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, führte eine Stimulation mit SCF bei keinem der hier untersuchten Zelltypen zu einer verstärkten Adhäsion von CH-296. Allerdings zeigten

unbehandelte Spender eine deutlich höhere, spontane Bindung von CH-296 im Vergleich zu G-CSF behandelten Personen. Deren Spontanadhärenz war vergleichbar zu der von Nabelschnurblutzellen.

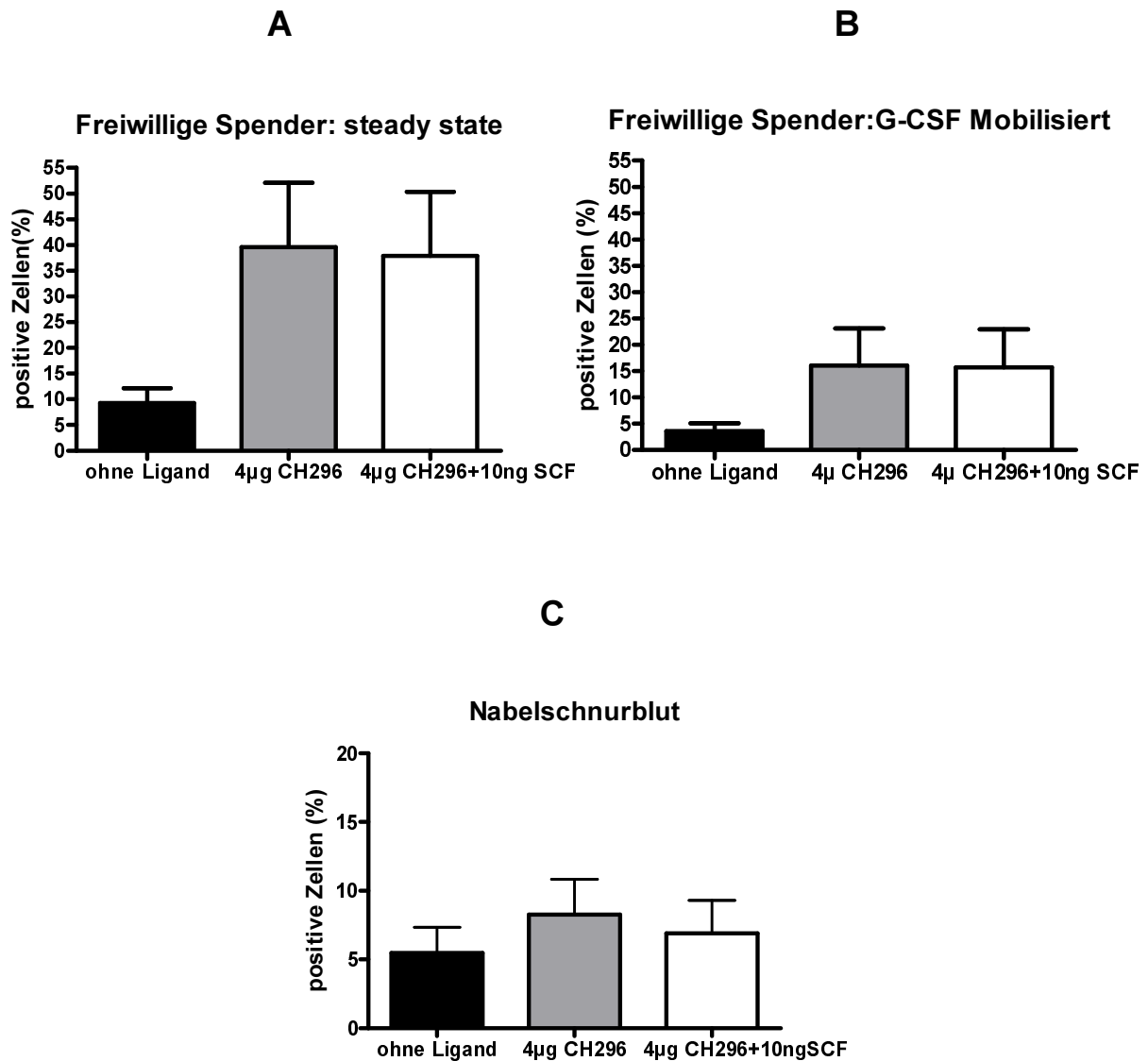


Abbildung 12: Ermittlung der Adhäsion von CH-296 an primäre humane Zellen aus verschiedenen Zellquellen

Um zu überprüfen inwieweit die Adhäsion von CH-296 auch auf primären, hämatopoetischen humanen Zellen durch Zytokine stimuliert werden kann, wurden LIN- aufgereinigte Zellen von freiwilligen steady state Spendern (A), freiwillige G-CSF mobilisierte Spender (B) und aus Nabelschnurblut (C) mit 4µg/ml CH-296 (grauer Balken) sowie mit 4µg/ml CH-296 + 10ng SCF (weißer Balken) inkubiert und anschließend die prozentuale Anteil von Zellen die CH-296 auf ihrer Oberfläche gebunden haben durchflußzytometrisch ermittelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt (schwarzer Balken).

3.3 Blockade der KG-1 Adhäsion durch Inkubation mit blockierenden Antikörpern gegen VLA-4 und VLA-5

Nachdem mit Hilfe des hier entwickelten Adhäsionsassays gezeigt wurde, dass eine Stimulation mit SCF, sowie zum Teil mit VEGF, die Adhäsion von CH-296 an KG-1 und TF-1 Zellen steigert, wurde ermittelt inwieweit diese Adhäsion tatsächlich über die beta 1 Integrine VLA-4 und VLA-5 erfolgt. Dies sollte durch eine Blockade beider Integrine mittels spezifischer AK untersucht werden. Um die blockierende Eigenschaft der ausgewählten Antikörper gegen VLA-4 und VLA-5 zu verifizieren, wurden KG-1 Zellen mit und ohne blockierende Antikörper inkubiert und anschließend die Oberflächenexpression beider Integrine durchflußzytometrisch analysiert. Aus Abbildung 13 wird ersichtlich, dass beide Antikörper die Oberflächenexpression der entsprechenden Integrine deutlich inhibieren. Somit konnten beide Antikörper für weitere Analysen verwendet werden.

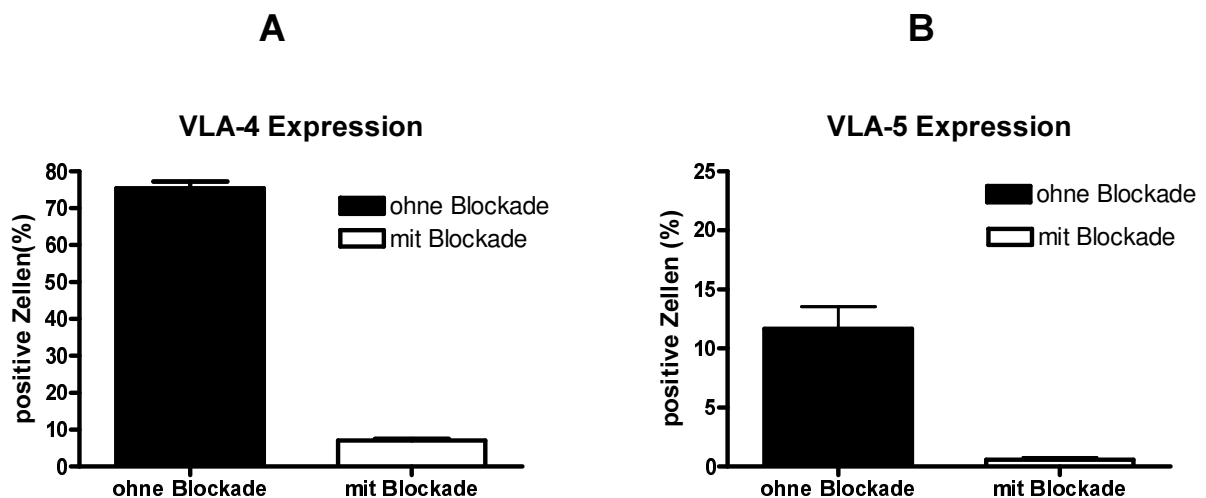


Abbildung 13: Analyse der blockierenden Eigenschaften spezifischer Antikörper gegen VLA-4 und VLA-5

Um die blockierenden Eigenschaften der ausgewählten AK gegen VLA-4 und VLA-5 zu verifizieren, wurden KG-1 Zellen mit beiden AK inkubiert und anschließend die Oberflächenexpression beider Integrine durchflußzytometrisch gemessen. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. (A) Oberflächenexpression von VLA-4 auf KG-1 Zellen. Der schwarze Balken stellt die VLA-4 Expression auf KG-1 Zellen dar, die nicht mit AK vorbehandelt wurden, wohingegen der weiße Balken die Integrexpression von Zellen die mit blockierenden AK inkubiert wurden verkörpert. (B) Identische Analyse der VLA-5 Expression auf der Oberfläche von KG-1 Zellen.

Anschließend wurde überprüft inwieweit eine Blockade beider Integrine die Adhäsion von CH-296 an KG1 Zellen beeinflusst. Die Zellen wurden zunächst zwei Stunden mit den spezifischen, blockierenden Antikörpern gegen VLA-4 und VLA-5 alleine, sowie in Kombination inkubiert und anschließend mit 4µg CH-296 sowie 4µg CH-296 + 10ng SCF stimuliert. Danach wurde die Bindung von CH-296 auf der Oberfläche dieser Zellen durchflußzytometrisch gemessen. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Eine Vorbehandlung mit dem spezifischen Antikörpern gegen VLA-4 führte zu einer deutliche Reduktion der Spontanadhäsion von CH-296 an KG-1 Zellen, die auch mit Hilfe von SCF nicht induziert wurde. Dasselbe Ergebnis wurde durch die simultane Blockade beider Integrine erreicht. Die Präinkubation mit dem blockierenden Antikörper gegen VLA-5 führte zu keiner Verminderung der Spontanadhäsion von CH-296, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Ein stimulierender Effekt von SCF konnte auch in diesem Fall nicht gezeigt werden. (Abbildung 14)

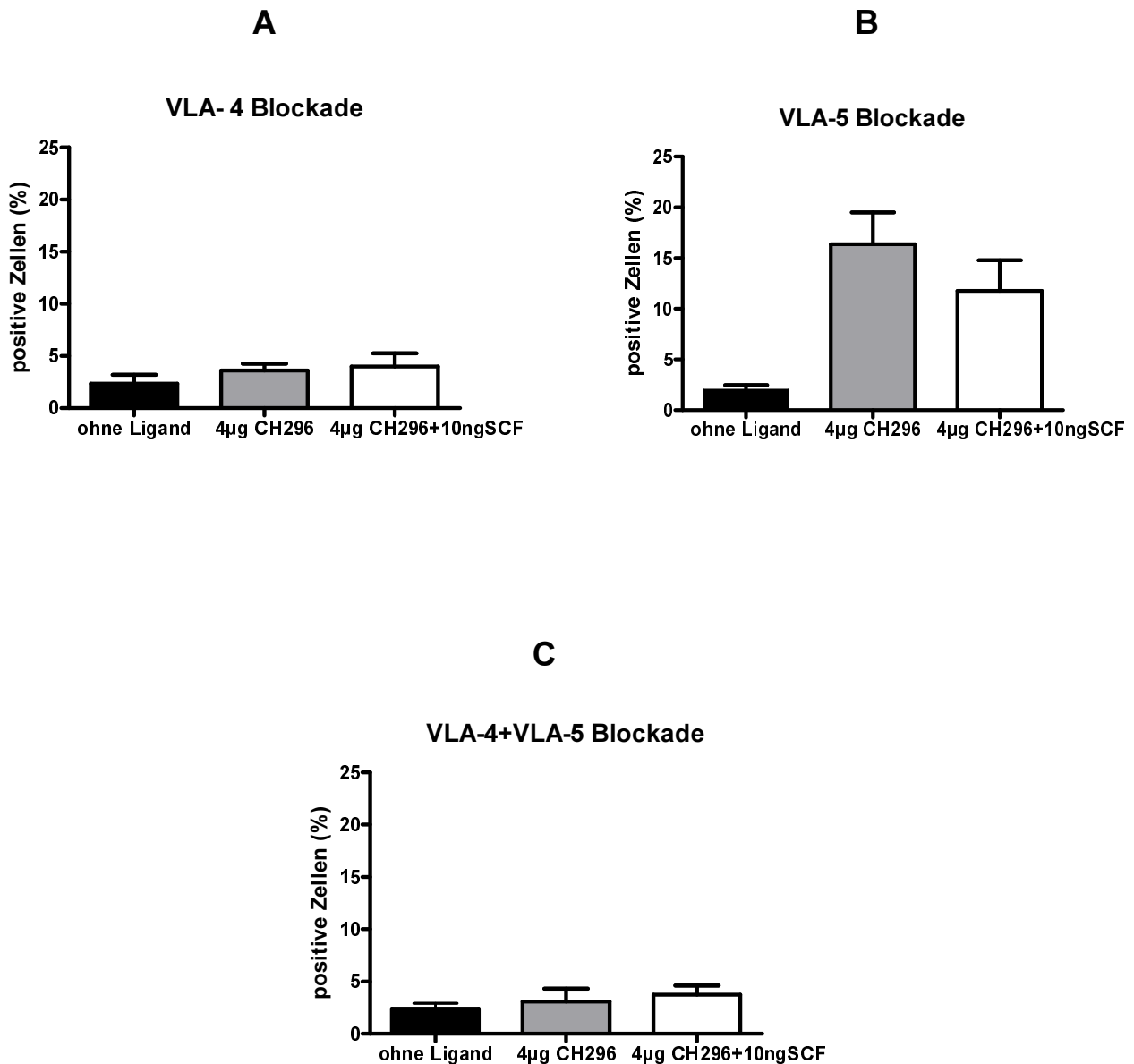


Abbildung 14: Adhäsion von CH-296 nach der Blockade von VLA-4 und VLA-5

Um zu überprüfen, inwieweit die Adhäsion von CH-296 an KG-1 Zellen über VLA-4 und VLA-5 erfolgt, wurden die Zellen mit blockierenden AK gegen VLA-4 (A) und VLA-5 (B) sowie gegen beide Integrine (C) in Kombination vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 4µg CH-296 sowie 4µg CH-296 + 10ng SCF inkubiert. Die Adhäsion von CH-296 an KG-1 Zellen wurde durchflußzytometrisch gemessen. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt (schwarzer Balken). Der graue Balken stellt die Menge an Zellen dar, die nach der Inkubation mit CH-296 den Liganden auf ihrer Oberfläche gebunden haben. Der weiße Balken stellt die CH-296 Bindung an der Oberfläche von Zellen dar die zusätzlich zu 4µg CH-296 mit 10ng SCF inkubiert wurden.

3.4 Xenotransplantation

Der Goldstandard zum Nachweis menschlicher hämatopoetischer Stammzellen, die in der Lage sind alle Arten von Blutzellen zu generieren, ist die Transplantation in NOD/SCID Mäuse (114). Diese besitzen weder ein humorales noch ein zelluläres Immunsystem. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die simultane Applikation von SCF bei der Transplantation humaner Stammzellen zu einer Expansion des Engraftments der menschlichen Zellen im Knochenmark der Versuchstiere führt. Der Anteil an humanen Zellen wurde durchflußzytometrisch, durch Färbungen mit Antikörpern gegen CD71, CD15/CD66b, CD19/CD20 sowie CD34 analysiert. Es werden nur Mäuse, in deren Knochenmark wenigstens fünf humane lymphatische als auch fünf humane granulozytäre Zellen gefunden wurden, als engraftet gewertet. Abbildung 15 stellt ein repräsentatives, durchflußzytometrisches Profil zur Messung der Knochenmarkszellen der Versuchstiere dar.

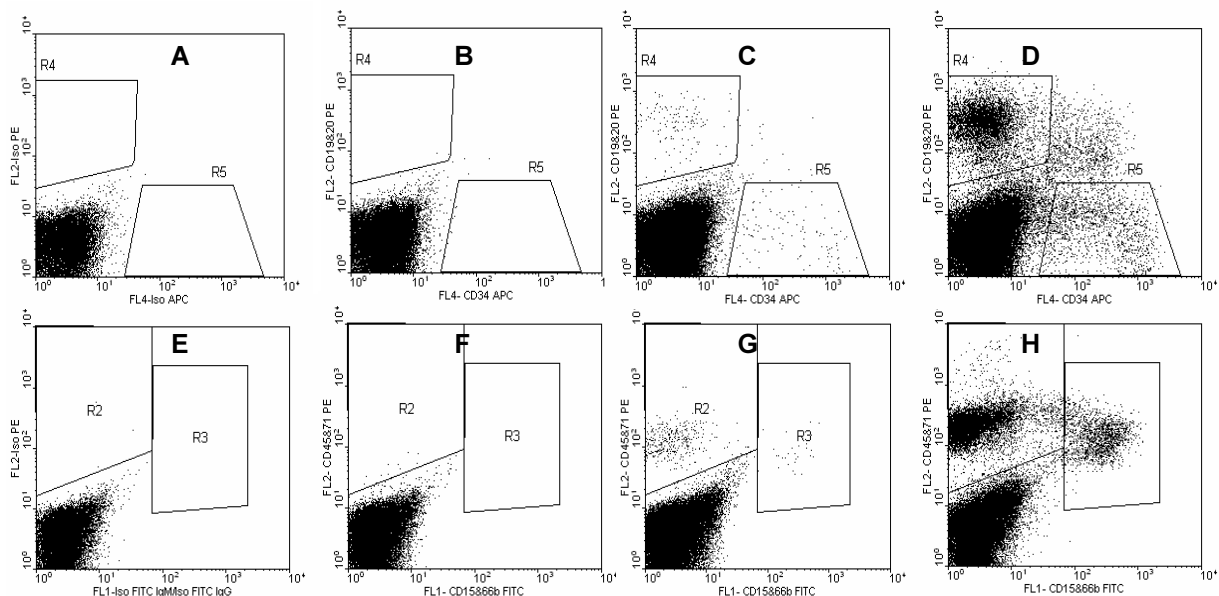


Abbildung 15: Darstellung eines repräsentativen, durchflußzytometrischen Profils der Messung humaner Zellen im Knochenmark der Versuchstiere 6 Wochen nach der Injektion humaner Stammzellen.

Die Berechnung der positiven Zellen erfolgt unter Abzug der bei der Isotypkontrolle (A+E) positiven Events. (B) Maus ohne humane lymphatische Zellen (C) schwaches Engraftment lymphatischer Zellen (D) starkes Engraftment lymphatischer Zellen (F) kein Engraftment granulozytärer Zellen (G) schwaches Engraftment granulozytärer Zellen (H) starkes Engraftment granulozytärer Zellen

3.4.1 SCF verbessert das Langzeitengraftment humaner Stammzellen sechs Wochen nach Transplantation im NOD/SCID Mausmodell

3.4.1.1 Transplantation Lin- Zellen von mobilisierten, gesunden Spendern

Um den Einfluss von SCF auf das Homing und das Engraftment humaner hämatopoetischen Vorläuferzellen zu ermitteln wurde eine Xenotransplantation in subletal bestrahlte NOD/SCID Mäusen durchgeführt. In zwei unabhängigen Experimenten wurden CD34⁺ Zellen aus dem peripheren Blut G-CSF mobilisierter Spender immunomagnetisch angereichert und in jeweils acht NOD/SCID Mäuse injiziert. Jeweils die Hälfte der Tiere erhielt simultan humanes SCF intravenös appliziert. Im ersten Experiment wurden pro Tier $3,0 \times 10^5$ Zellen verabreicht, während die applizierte Zellzahl im zweiten Experiment $3,6 \times 10^5$ Zellen pro Tier betrug. Sechs Wochen nach der Transplantation wurde das Knochenmark aller 16 Versuchstiere durchflußzytometrisch, sowie mittels PCR-Analyse auf ein Engraftment humaner Zellen hin untersucht.

Um sicherzustellen, dass das für diese PCR ausgewählte 5' Actin-Primer-Paar spezifisch humane Gensequenzen amplifiziert, wurde mit diesen Primern humane DNA aus peripheren Blut als Positivkontrolle (Abb. 16 A, 100), sowie murine DNA aus Mausknochenmark als Negativkontrolle (Abb. 16 A, 0) amplifiziert. Nachdem sichergestellt war, dass nur mit humanen DNA eine PCR Bande erzielt werden konnte, wurde überprüft bis zu welchem Verdünnungsgrad humane DNA innerhalb muriner DNA sichtbar amplifiziert werden kann. Aus diesem Grund wurde eine Verdünnungsreihe von 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} humane DNA in Maus-DNA wie zuvor beschrieben amplifiziert. Es gelang humane DNA bis zu einer Konzentration von 10^{-3} nachzuweisen. (Abbildung 16 A)

Anschließend sollten humane Zellen im Knochenmark transplantiert Mäuse mit Hilfe der PCR für humanes 5'Actin ermittelt werden. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich wird, konnten im Knochenmark von Mäusen, welchen SCF simultan zu den humanen Zellen verabreicht wurde, humane Zellen gezeigt werden, während dies im Knochenmark von Kontrollmäusen ohne SCF nicht möglich war.

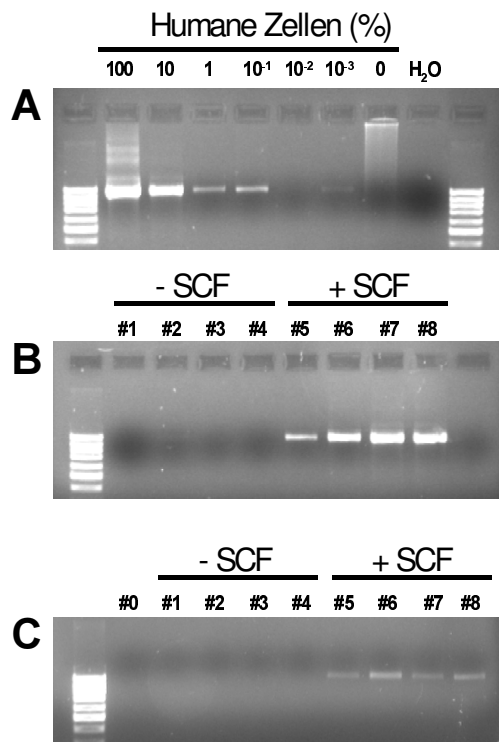


Abbildung 16: PCR-Analyse von murinen Knochenmarkszellen sechs Wochen nach der Injektion humaner Vorläuferzellen

Knochenmarkszellen von NOD/SCID Mäusen 6 Wochen nach Transplantation humaner Vorläuferzellen wurden mittels PCR auf humanes 5'Actin untersucht.

(A): PCR-Analyse von Mausknochenmarkszellen die mit unterschiedlichen Mengen an humanen Zellen gemischt wurden.

(B): PCR-Analyse zweier unabhängiger Experimente in welchen zwei Gruppen von Mäusen humane Zellen entweder mit (+SCF) oder ohne SCF (-SCF) injiziert wurden. Als Negativkontrolle wurden Zellen einer Maus die keine humane Zellen erhielt verwendet (C Tier #0).

Um den Anteil humaner Zellen im Knochenmark der Versuchstiere detaillierter zu bestimmen wurden die Knochenmarkszellen durchflußzytometrisch auf humane myeloische sowie humane lymphatische Zellen hin untersucht. Im ersten Experiment konnten mit SCF $3,0 \pm 2,3\%$ humane Zellen detektiert werden, wobei vier von vier Mäusen ein Engraftment vorwiesen. Im zweiten Experiment konnten in vier von vier transplantierten Mäusen ein Engraftment von $8,5 \pm 7,2\%$ humaner Zellen gezeigt werden. In beiden Experimenten konnte in keinem Tier aus den Gruppen ohne SCF ein Engraftment humaner Zellen verifiziert werden. (Tabelle 5)

	Experiment 1		Experiment 2	
	Anzahl engraftete/ transplantierte Tiere	humane Zellen (%)	Anzahl engraftete/ transplantierte Tiere	humane Zellen (%)
- SCF	0/4	0%	0/4	0%
+ SCF	4/4	3,0 ± 2,3%	4/4	8,5 ± 7,2%

Tabelle 5: Der Einfluss von SCF auf das hämatopoetische Engraftment angereicherter CD34+ Zellen nach der Transplantation in sublethal bestrahlte NOD/SCID Mäuse

In zwei unabhängigen Experimenten wurden 16 Versuchstieren lin⁻ Zellen mit oder ohne Zusatz von 10µg SCF pro Tier injiziert. Das hematopoetische Engraftment wurde 6 Wochen später durch den Nachweis von wenigstens 5 myeloischen und 5 lymphatischen humanen Zellen in 2x10⁴ murinen Knochenmarkszellen verifiziert. Gezeigt wird die Anzahl der Tiere, welche ein hämatopoetisches Engraftment zeigten, sowie der Mittelwert (± Standardfehler) humaner CD45/CD71⁺ Zellen detektiert 6 Wochen nach der Transplantation im Knochenmark von NOD/SCID Mäusen.

3.4.1.2 Transplantation von MNCs aus Nabelschnurblut

Des weiteren sollte untersucht werden, inwieweit SCF den für das Engraftment von lin⁻ Zellen aus G-CSF mobilisierten gesunden Spendern beschriebenen stimulierenden Effekt auch auf das Engraftment mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut ausübt.

In drei unabhängigen Experimenten wurden insgesamt 38 Tieren mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut mit und ohne SCF verabreicht. Sechs Wochen nach der Injektion dieser Zellen konnte das Knochenmark von insgesamt 33 der 38 Versuchstiere durchflußzytometrisch ausgewertet werden. Im ersten Experiment überlebten alle 10 Versuchstiere die folgenden sechs Wochen nach der Transplantation, wohingegen im zweiten Experiment 3 von 20 Tieren und im dritten Experiment 2 von 8 Tieren frühzeitig verstarben. (Tabelle 6)

	Injizierte CD34 ⁺ Zellen	SCF	Anzahl ausgewerteter/ behandelter Tiere	Anzahl engrafteter/ ausgewerteter Tiere
Exp.# 1	4,2 x 10 ⁴	-	5/5	4/5
	4,2 x 10 ⁴	+	5/5	4/5
Exp.#2	4,2 x 10 ⁴	-	4/5	4/4
	4,2 x 10 ⁴	+	5/5	5/5
	12,6 x 10 ⁴	-	3/5	3/3
	12,6 x 10 ⁴	+	5/5	5/5
Exp.#3	10,0 x 10 ⁴	-	3/4	1/3
	10,0 x 10 ⁴	+	3/4	0/3

Tabelle 6: Der Effekt von SCF auf das hämatopoetische Engraftment humaner Zellen aus Nabelschnurblut nach deren Injektion in bestrahlte NOD/SCID Mäuse.

Humane Nabelschnurblutzellen wurden mit (+SCF) und ohne (-SCF) 10ng SCF pro Tier in NOD/SCID Mäuse injiziert. Sechs Wochen später wurde das Knochenmark der Versuchstiere durchflußzytometrisch auf eine Verbreitung humaner Zellen untersucht. Gezeigt wird die Anzahl der Tiere, denen humane Zellen appliziert wurden, sowie die Anzahl der Tiere deren Knochenmark sechs Wochen später ausgewertet werden konnten. Als engraftet wurden diejenigen Tiere gewertet, bei denen wenigstens 5 humane myeloische (CD15/CD66b⁺) und 5 humane lymphatische (CD19/CD20⁺) Zellen in 2x10⁴ untersuchten murinen Knochenmarkszellen detektiert werden konnten.

Im ersten Experiment, hier wurden 4 x 10⁴ CD34⁺ Zellen pro Tier appliziert, zeigten sowohl in der Gruppe mit SCF als auch in der Gruppe ohne SCF 4 von 5 ausgewerteten Tieren ein humanes hämatopoetisches Engraftment im Knochenmark. Die simultane Injektion von SCF steigerte das Engraftment humaner CD45/CD71⁺ Zellen signifikant um den Faktor 3,5 von 6,8% ohne SCF auf 23,6% mit SCF. Genauere phänotypische, durchflußzytometrische Analysen ergaben, dass ein Großteil dieser Zellen lymphatischen (CD19/CD20) Ursprungs waren, deren Anteil von 4,0% ohne SCF auf 12,7% mit SCF anstieg. Der wesentlich geringere Anteil

humaner myeloischer (CD15/CD66b) Zellen wurde durch die SCF Applikation um den Faktor 4,7 von 1,1% ohne SCF auf 5,2% mit SCF gesteigert.

Im zweiten Experiment wurden den Tieren sowohl 4×10^4 als auch $12,6 \times 10^4$ CD34⁺ Zellen, mit und ohne die Zugabe von 10ng SCF pro Tier verabreicht. Bei jedem ausgewerteten Versuchstier konnte ein hämatopoetisches Engraftment humaner lymphatischer und humaner myeloischer Zellen im murinen Knochenmark gezeigt werden. Nach der Injektion von 4×10^4 CD34⁺ humane Zellen kam es durch die Zugabe von SCF nicht zu einem signifikanten Anstieg im Engraftment humaner Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne SCF. Innerhalb der Tiergruppe, der $12,6 \times 10^4$ CD34⁺ Zellen transplantiert wurde, stieg der Anteil humaner CD45/CD71⁺ Zellen mit SCF um den Faktor 1,9 von 8,2% auf 15,8% an. Erneut entstammte die Mehrzahl dieser Zellen der lymphatischen Linie. Ihr Anteil stieg mit SCF von 4,8% auf 8,8%. Der Anteil myeloischer Zellen wurde durch die SCF Applikation von 1,2% auf 3% gesteigert.

Im dritten Experiment wurden 10×10^4 CD34⁺ Zellen verabreicht. Nur 1 Tier aus der Gruppe ohne SCF zeigte ein humanes Engraftment von 0.2%. Der Anteil lymphatischer Zellen betrug 0,1%, der myeloische Anteil lag bei 0,03%.

3.4.2 Nachweis humaner Zellen in nicht-hämatopoetischen Organen der transplantierten NOD/SCID Mäusen

In den letzten Jahren dokumentierten verschiedene Studien die Fähigkeit humaner Stammzellen nach der intravenösen Injektion in Mäusen zu nicht-hämatopoetischen Geweben auszureifen. Um zu analysieren, inwieweit in den diversen Organen unserer, mit humanen, hämatopoetischen MNCs aus Nabelschnurblut transplantierten NOD/SCID Mäusen ebenfalls menschliche Zellen zu finden sind, wurde den Versuchstieren sechs Wochen nach der Transplantation neben dem Knochenmark auch Leber, Niere, Hoden sowie Gehirn entnommen und konserviert. Eventuell vorhandene humane Zellen sollten in Cryoschnitten dieser Organe immunhistochemisch durch einen spezifischen FITC-konjugierten Antikörper gegen humane nukleäre Zellen nachgewiesen werden. Durch eine Dapi-Doppelfärbung wurden gleichzeitig alle kernhaltigen Zellen speziesunabhängig markiert. Um die Spezifität des ausgewählten anti-nukleären Antikörpers zu verifizieren, wurden als Positivkontrolle Cryoschnitte humanen Lebergewebes, sowie Cytospins menschlicher Zellen aus dem peripheren Blut freiwilliger Spender gefärbt. Leberschnitte von nicht-transplantierten Mäusen, sowie Cytospins ihrer Knochenmarkszellen dienten als Negativkontrolle. Aus Abbildung 17 wird deutlich, dass in beiden Positivkontrollen grüne, FITC-positive Zellen zu finden waren, wohingegen sowohl in der murinen Leber als auch in den Cytospins des untransplantierten Mausknorpelmarks keinerlei Bindung des humanen Antikörpers zu verzeichnen war. Speziesunabhängig konnten in allen vier untersuchten Proben blaue, Dapi-positive, kernhaltige Zellen gezeigt werden.

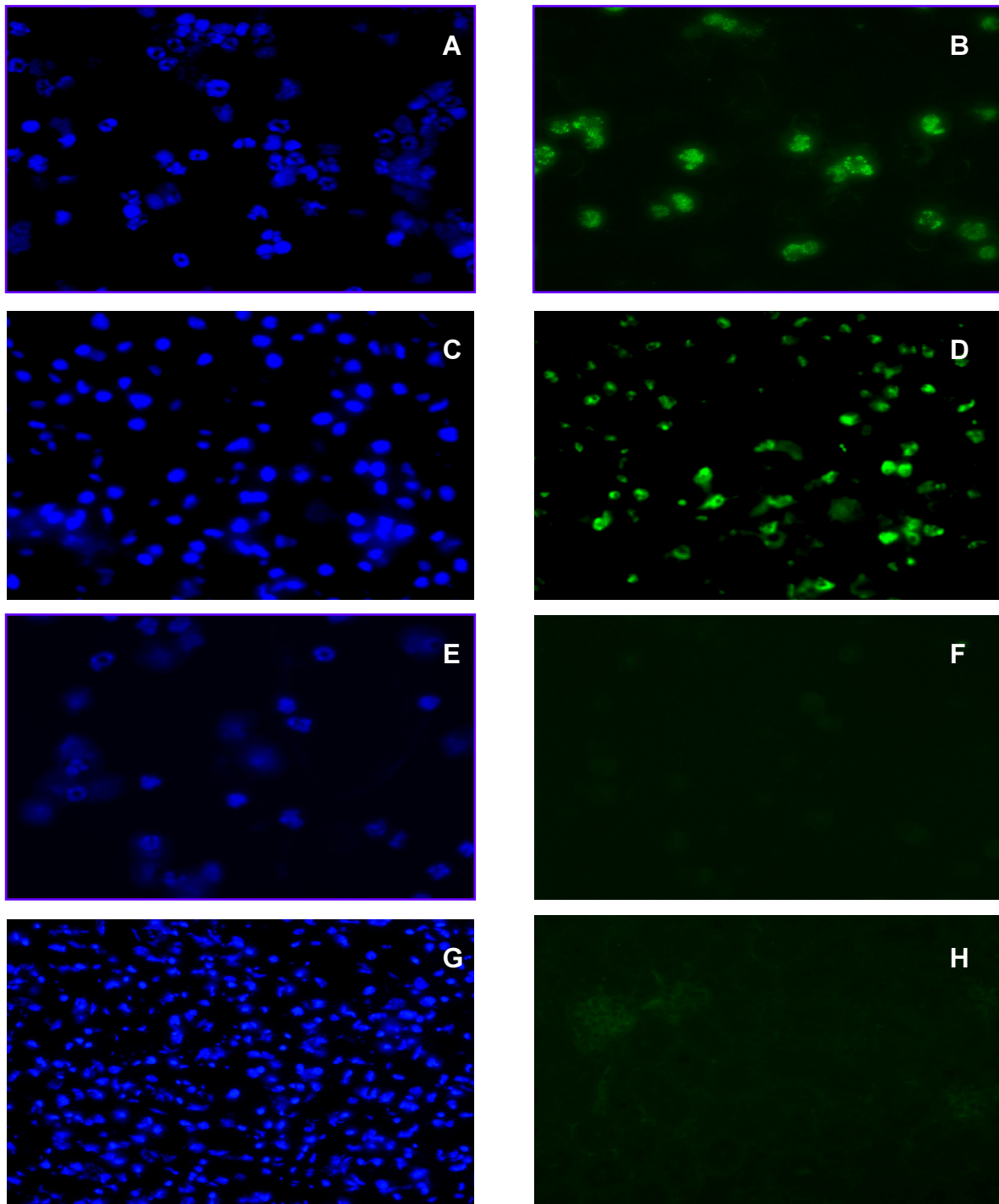


Abbildung 17: Überprüfung der Funktionalität des verwendeten, FITC-konjugierten anti-humanen-nukleären Antikörpers

Um die spezifische Funktionalität des FITC-konjugierten Antikörpers gegen humane, nukleäre Zellen zu dokumentieren wurden als Positivkontrolle Cytospins humaner Zellen sowie Cryoschnitte einer humanen Leber sowohl mit Dapi als auch mit dem ausgewählten antinukleären AK angefärbt. Als Negativkontrolle wurde mit Cytospins sowie Leberschnitten einer nicht-transplantierten Maus ebenso verfahren.

(A) Dapi-Färbung eines Cytospins humaner Zellen (B) Antinukleäre FITC-Färbung eines Cytospins humaner Zellen (C) Dapi-Färbung des Cryoschnittes einer humanen Leber (D) Antinukleäre FITC-Färbung des Cryoschnittes einer humanen Leber (E) Dapi-Färbung des Cytospins negativer, muriner Zellen (F) Antinukleäre FITC-Färbung des Cytospins negativer, muriner Zellen (G) Dapi-Färbung des Cryoschnittes einer murinen Leber (H) Antinukleäre FITC-Färbung des Cryoschnittes einer murinen Leber

Nachdem die Spezifität des ausgewählten, FITC- konjugierten anti-humanen Antikörpers verifiziert worden war, wurden Leber-, Nieren-, Hoden- und Gehirnschnitte von 34 Mäusen untersucht, denen 6 Wochen zuvor humane MNCs aus Nabelschnurblut mit und ohne SCF intravenös verabreicht wurden. Nicht eingeschlossen wurden die Organe von 9 Versuchstieren, die im 2. Experiment $4,2 \times 10^6$ CD34⁺ Zellen erhielten, sowie alle Tiere aus Experiment # 3 und Experiment # 4. Ihre Organe wurden nicht entnommen und konserviert. Aus Abbildung 18 wird deutlich, dass sowohl in der Leber als auch in der Niere der Versuchstiere humane Zellen zu finden waren, wohingegen in Hoden und Gehirn keine humanen Zellen nachgewiesen wurden. Weiterhin gelang es nicht, humane Zellen in Geweben von Tieren zu zeigen, die nicht gleichzeitig ein menschliches, hämatopoetisches Engraftment im Knochenmark vorwiesen.

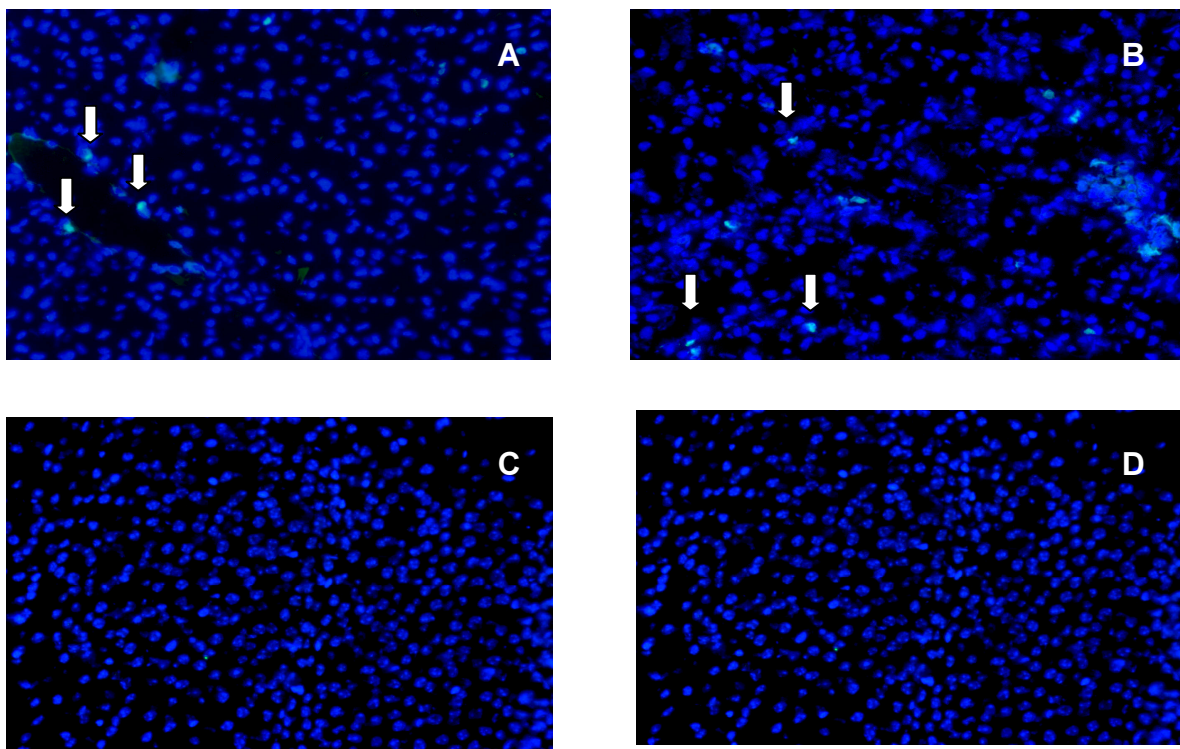


Abbildung 18: Identifikation humaner Zellen in Leber und Niere transplantierter Mäuse.

Zur Identifikation humaner Zellen in murinen Geweben, wurden sechs Wochen nach der Transplantation humaner MNCs Leber, Niere, Hoden und Gehirn der Versuchstiere immunhistochemische Analysen mit einem FITC-gelabelten anti-humanen Nukleoli Antikörper unterzogen. (A) Mausleber mit, durch Pfeile markierten, grünen, FITC-positiven, humanen Zellen innerhalb der blauen, Dapi-positiven, murinen Kerne (B) Mausniere mit, durch Pfeile markierte grünen, FITC-positiven, humanen Zellen innerhalb der blauen, Dapi-positiven, murinen Kerne. In Gehirn (C) und Hoden (D) konnten keine humanen Zellen gefunden werden. Alle Bilder wurden in 20 facher Vergrößerung aufgenommen

3.4.3 Bestimmung des Anteils humaner Zellen in Leber und Niere der transplantierten Mäuse

Nachdem sowohl in der Leber als auch in der Niere transplantiert Mäuse immunhistochemisch humane Zellen nachgewiesen wurden, sollte in beiden Organen der prozentuale Anteil humaner Kerne im Verhältnis zur Gesamtkernzahl bestimmt werden. Zusätzlich war es natürlich von Interesse, inwieweit SCF die Organverteilung der humanen Zellen beeinflusst.

Um den Anteil an humanen Zellen zu bestimmen, wurden Organschnitte von 17 Mäusen ausgewertet, die ein hämatopoetisches Engraftment im Knochenmark vorwiesen. Nicht berücksichtigt wurden 9 Tiere aus Experiment # 2 denen $4,2 \times 10^4$ CD34⁺ humane Zellen mit und ohne SCF appliziert wurden, da ihre Organe nicht entnommen und konserviert wurden. Ebenso nicht mit eingeschlossen wurden die Organe aller Versuchstiere aus Experiment # 3. Zur Bestimmung des Zellanteils wurden sowohl die Dapi gefärbten nukleären Zellen sowie die FITC-markierten humanen Kerne ausgezählt.

Wie aus Abbildung 19 ersichtlich wird, steigert die simultane Applikation von SCF bei der Transplantation humaner CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut den prozentualen Anteil humaner Zellen in beiden Organen. So wuchs der Anteil humaner Zellen in der Niere von 0,03% ohne SCF auf 0,25% mit SCF, während der humane Anteil in der Leber von 0,08% ohne SCF auf 0,18% mit SCF zunahm. Interessanterweise stimulierte die Cotransplantation von SCF eine Verschiebung des Verhältnisses humaner Zellen in Leber und Niere. War der Anteil humaner Zellen ohne SCF mit 0,08% in der Leber höher als in der Niere (0,03%) so konnten mit SCF deutlich mehr humane Zellen in der Niere (0,25%) als in der Leber (0,18%) gefunden werden.

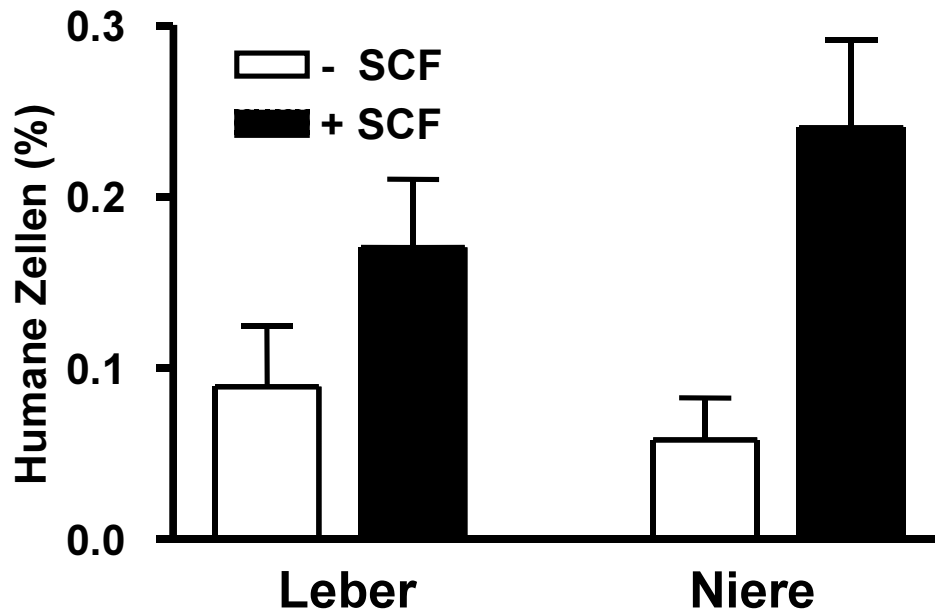


Abbildung 19: Anteil an humanen Zellen in Leber und Niere transplantiertter Mäuse mit und ohne Zusatz von SCF.

Um den Anteil humaner Zellen in Leber und Niere mit (+SCF) und ohne (-SCF) SCF-Zusatz zu bestimmen wurden sowohl Dapi-gefärbte, nukleäre Zellen als auch FITC-markierte humane, nukleäre Zellen gezählt. Der weiße Balken repräsentiert die Anzahl der ermittelten Zellen ohne SCF wohingegen der dunkle Balken die gefundenen, humanen Zellen mit SCF-Applikation verkörpert. Gezeigt wird der Mittelwert (SEM) aus acht Tieren ohne SCF und neun Tieren mit SCF, in denen gleichzeitig ein hämatopoetisches Engraftment gezeigt werden konnte.

3.4.4 Nachweis humaner Albumin-exprimierender Zellen in der murinen Leber

Weiterhin musste ausgeschlossen werden, dass es sich bei den, in den Mausorganen nachgewiesenen, humanen Zellen um hämatopoetische Zellen handelt, die durch das Anschneiden eines im Organ befindlichen Blutgefäßes zufällig angefärbt wurden. Aus diesem Grund wurden von 13 Versuchstieren, in deren Organen zuvor humane Zellen nachgewiesen werden konnten, erneut Cryoschnitte der Leber angefertigt. Diese wurden mit einem FITC- konjugierten, spezifischen Antikörper gegen humanes Albumin markiert und anschließend mit einem PE gelabelten Antikörper gegen humane, hämatopoetische, CD45⁺ Zellen gegengefärbt. Als Negativkontrolle wurden Leberschnitte einer nicht-transplantierten Maus

verwendet, während eine humane Leber als Positivkontrolle diente. Diese zeigte nach der Doppelfärbung sowohl grüne, FITC-positive Albumin exprimierende Zellen, als auch rote, PE-positive, CD45⁺ hämatopoetische Zellen. Es waren allerdings keinerlei doppelt-positive Zellen zu finden. Dies garantiert die Spezifität der beiden hier verwendeten Antikörper.

Identische Doppelfärbungen von Leberschnitten aus transplantierten Mäusen zeigten grüne, FITC-positive Albuminzellen, die gleichzeitig negativ für CD45-PE waren. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass die detektierten, humanen Albumin-Zellen eine „echte“ Transdifferenzierung durchlaufen haben. Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich um zufällig angefärbte hämatopoetische Zellen handelt. (Abbildung 20)

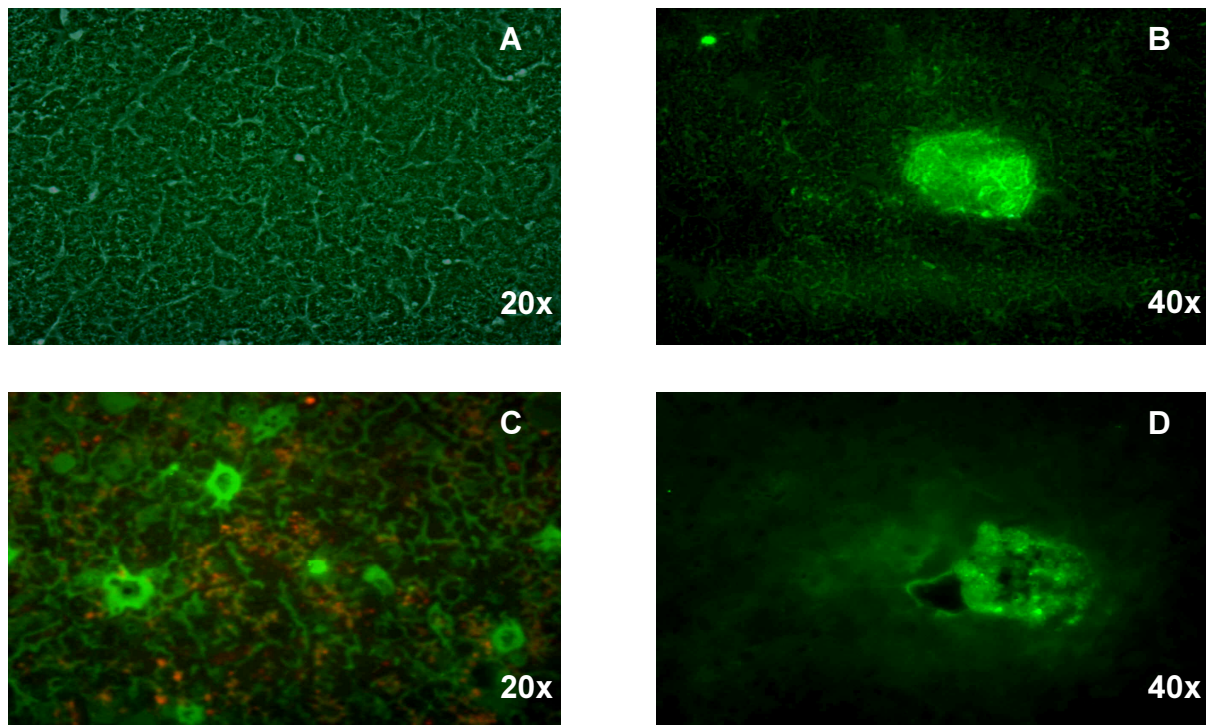


Abbildung 20: Nachweis humaner Albumin exprimierender Zellen in der murinen Leber

Um zu analysieren inwieweit die detektierten, humanen Zellen tatsächlich einer echten Transdifferenzierung unterliegen, wurden Cryoschnitte von Mauslebern mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen humanes Albumin gefärbt. (A) Fluoreszenzmikroskopisches Photo (20x vergrößert) einer, mit FITC-Anti-Albumin , gefärbten Leber einer nicht transplantierten Maus. (B) Identische Färbung des Leberschnittes einer mit humanen Zellen transplantierten Maus. (40x vergrößert). Um auszuschließen dass es sich bei den, für humanes Albumin, positiven Zellen um hämatopoetische Zellen handelt, wurde eine zusätzliche Doppelfärbung aus humanen Albumin-FITC und CD45-PE durchgeführt. (C) Doppelfärbung einer humanen Leber als Positivkontrolle. Humane Albumin-exprimierende Zellen sind in grün dargestellt, während die CD45⁺ Zellen rot sind. (20x vergrößert) (D) Identische Färbung einer Leber aus einer mit humanen Zellen transplantierten Maus (40x vergrößert)

4 Diskussion

Die intravenöse Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist eine wichtige therapeutische Möglichkeit für ein breites Patientenspektrum mit malignen oder genetischen Erkrankungen. Allerdings hat sich gezeigt, dass, um ein schnelles Engraftment zu gewährleisten, eine ausreichende Anzahl an Stammzellen nötig ist. Ansonsten kann es zu einer verspäteten oder ungenügenden Rekonstitution der Hämatopoese kommen (142;143;145). Dabei kann es sich vor allem bei vorbehandelten Patienten als schwierig erweisen, eine ausreichende Anzahl an transplantierbaren Zellen zu gewinnen. Eine Möglichkeit, die Anzahl der transplantierbaren Zellen zu steigern, beruht auf dem Versuch, diese Zellen ex-vivo zu expandieren. Bei diesem Ansatz besteht die Herausforderung darin, nicht nur die Anzahl der Stammzellen zu erhöhen, sondern auch ihren unreifen Charakter beizubehalten. Allerdings gelten die in diesem Bereich bisher erzielten Ergebnisse als eher unbefriedigend. Weiterhin ist die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen mit einem großen Zellverlust verbunden. Weniger als 10% der transplantierten Zellen erreichen das Knochenmark und tragen langfristig zur Regeneration der Hämatopoese bei (146). Aus diesen Gründen soll in dieser Arbeit ein Verfahren generiert werden, welches die Effektivität der Stammzelltransplantation und die daraus folgende Rekonstitution der Hämatopoese im Empfängerorganismus verbessern und beschleunigen soll. Das Verfahren beruht auf der Möglichkeit mittels speziellen Wachstumsfaktoren, so genannten Zytokinen, die Expression und Funktion spezifischer Adhäsionsmoleküle dahingehend zu steigern, dass es zu einem verstärkten Engraftment der transplantierten Stammzellen im Empfängerorganismus kommt. Somit könnte bei einer gleich bleibenden Anzahl an transplantierten Zellen die Zeit bis zur Rekonstruktion der Hämatopoese des Patienten deutlich verkürzt werden, wodurch seine Prognose deutlich verbessert werden würde.

4.1 Ligandenassay

Unstimulierte β 1 Integrine befinden sich in einem inaktiven Affinitätszustand und zeigen nur eine geringe Spontanadhäsion an Fibronectin (66;147). Sowohl Kovach et al., als auch Levesque et al. gelang es, anhand der hämatopoetischen Zelllinien Mo7e und TF1 zu zeigen, dass die Adhäsionsfähigkeit der Zellen durch eine Stimulation mit SCF, bzw. anderen Zytokinkombinationen gesteigert werden kann. Dabei verläuft die Stimulation transient und erreicht ihr Maximum nach 30 Minuten. Die Studien haben gezeigt, dass die beschriebene, gesteigerte Adhäsionsfähigkeit nicht aufgrund einer vermehrten Oberflächenexpression der Zytokine erfolgt, sondern vielmehr durch eine Steigerung der Integrinaffinität hervorgerufen wird (66;148). Die bei Dhar et al. und Levesque et al. beschriebenen Adhäsionsassays beruhen auf einer Calcein-Färbemethode, die mit den hier zur Verfügung stehenden Möglichkeiten nicht optimiert werden konnte. Die von Hart et al. publizierten Daten, hinsichtlich einer SCF vermittelten, gesteigerten Bindung primärer Zellen an CH-296, beruhen auf einer Zellzählung mittels einer Zählkammer (144). Da diese Methode für ein breites Screening der Adhäsionssteigerung verschiedener Zellen aufgrund einer Stimulation mit spezifischen Zytokinen zu zeitaufwendig ist, wurde in dieser Arbeit zunächst ein Ligandenassay entwickelt, der simultan die Messung der Oberflächenexpression, sowie eine rasche, funktionelle Detektion der Bindungsaktivität der Integrine VLA-4 und VLA-5 ermöglichte. Das Prinzip dieses Adhäsionsassays beruht auf dem durchflußzytometrischen Nachweis des spezifischen Liganden für beide Integrine, CH-296, durch fluoreszenzmarkierte Antikörper. Dadurch können Zellen, die CH-296 auf ihrer Oberfläche gebunden haben, eindeutig identifiziert werden.

Zunächst wurde untersucht, inwieweit mit Hilfe der Zytokine SCF, HGF/SF, VEGF und Flt-3 Ligand die Adhäsion der Zelllinien KG-1, TF-1 und Mo7e an das Fibronectinfragment CH-296 modifiziert werden kann. Obwohl, sowohl auf KG-1 als auch auf TF-1 Zellen, die Oberflächenexpression aller vier relevanten Rezeptoren nachgewiesen wurde, konnte lediglich mit SCF und VEGF eine Modifikation der Bindung von CH-296 verzeichnet werden. Diese Daten lassen vermuten, dass HGF/SF und Flt-3 Ligand alleine vermutlich keinen Einfluss auf die VLA-4/VLA-5 vermittelte Adhäsion haben. Im Gegensatz zu Levesque et al. konnte auf Mo7e Zellen, nach der Inkubation mit SCF und VEGF, keine vermehrte Bindung von CH-

296 dokumentiert werden. Möglicherweise resultiert dieses Ergebnis aus den für Mo7e und TF-1 Zellen nötigen Kulturbedingungen. Beide Zelllinien benötigen zum Wachstum ein mit Zytokinen angereichertes Medium. Möglicherweise verhindert diese permanente Zytokinexposition eine weitere Stimulation der Integrine auf Mo7e Zellen. Des weiteren konnte im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit aus unserer Arbeitsgruppe (144) gezeigt werden, dass eine lang anhaltende SCF-Stimulation in einer vermehrten Expression von VLA-4 und VLA-5 resultiert. In der publizierten Literatur existieren mehrere Hinweise, die darauf hindeuten, dass Zellen die in unstimulierten Zustand große Mengen von VLA-4 auf der Oberfläche exprimieren, auf Zytokinstimulation mit einer quantitativen Abnahme des Integrins reagieren und somit geringere Bindungsaktivitäten zeigen. Wohingegen Zellen, die eine geringere Expression der Integrine aufweisen, mit einer Steigerung der Expression einhergehen (44;149).

In Übereinstimmung mit Levesque et al. konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die dokumentierte Zunahme der CH-296 Bindung nicht auf eine vermehrte Expression von VLA-4 und VLA-5 zurückzuführen ist. Auch die in der Literatur beschriebene geringere Oberflächenexpression von VLA-5 im Vergleich zu VLA-4 auf verschiedenen Zellen konnte nachgewiesen werden (47;150).

Um den Beitrag von VLA-4 und VLA-5 an der Adhäsion von CH-296 zu ermitteln, wurden KG-1 Zellen mit blockierenden Antikörper gegen beide Integrine inkubiert und anschließend die spontane Adhäsion der Zellen an CH-296 verifiziert. Dabei wird deutlich, dass eine Blockade des VLA-5 Integrins keinerlei Einfluss auf die Adhäsion zu haben scheint, wohingegen eine Blockade von VLA-4 zu einer deutlich geringeren Bindung von CH-296 führte. Eine kombinierte Blockade beider Integrine führte ebenfalls zu einer Abnahme der Bindungsfähigkeit. Diese Daten belegen, dass VLA-4 eine weitaus wichtigere Rolle bei der Adhäsion spielt als VLA-5. Eine zusätzliche Stimulation der Adhäsion in Folge einer Inkubation mit SCF konnte in keinem der Experimente gezeigt werden. Dieses Ergebnis beruht auf der Tatsache, dass die vermehrte Adhäsion nicht mit einer gesteigerten Oberflächenexpression der Integrine einhergeht, sondern durch eine Änderung der Integrinaffinität hervorgerufen wird (66;148). Da die vorhandenen Integrinrezeptoren durch die blockierenden Antikörper besetzt sind, kann keine Affinitätsänderung erfolgen und somit keine SCF vermittelte Zunahme der Adhäsion verzeichnet werden.

Nachdem anhand von Zelllinien gezeigt werden konnte, dass der entwickelte Adhäsionsassay die Möglichkeit bietet die Stimulierbarkeit und Adhäsion von Zellen durchflußzytometrisch zu detektieren, sollten nun auch verschiedene primäre Zellen auf eine eventuell stimulierbare Adhäsion hin untersucht werden. Aus diesem Grund wurden aufgereinigte LIN- Zellen von gesunden Spendern, von gesunden G-CSF mobilisierten Personen und aus Nabelschnurblut, ebenfalls mit SCF inkubiert und anschließend ihre Bindung an CH-296 durchflußzytometrisch ermittelt. Dabei gelang es nicht, eine Verstärkung der Spontanadhäsion der einzelnen Zellen, durch die SCF Stimulation nachzuweisen. Bemerkenswerter Weise zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Spontanadhäsion der untersuchten Zellen. Zellen aus dem Nabelschnurblut, sowie die Zellen G-CSF mobilisierter Spender zeigten annähernd gleiche Spontanadhäsionen, wohingegen Zellen von freiwilligen, gesunden Spendern deutlich höhere Bindungen von CH-296 zeigten. Die Ursache für die vermehrte Adhäsion von Zellen gesunder Spender im Vergleich zu Zellen von G-CSF mobilisierten Spendern könnte an der Wirkungsweise von G-CSF liegen. Es konnte gezeigt werden, dass es nach G-CSF Gabe im Knochenmark zu einer Akkumulation von Granulozyten kommt, was deren Degranulierung auslöst. Dadurch wird ein hochgradig proteolytisches Umfeld durch Proteasen erzeugt. Unter anderem konnten Neutrophile-Elastase (NE), Cadhepsin G (CG) sowie Metalloproteinase (MMP)-9 identifiziert werden (151;152). Eine Folge ist die Spaltung von VCAM-1 und somit eine verhinderte Adhäsion über den Rezeptor VLA-4. Außerdem wird c-kit, der Rezeptor für SCF, gespalten, welcher nach Bindung von SCF eine Aktivierung von VLA-4 vermittelt. Insgesamt wird so das Ablösen der Stammzelle erleichtert (152;153). Möglicherweise verbleibt nach der Spaltung von VCAM-1 ein Rest des Rezeptors am VLA-4 haften, wodurch eine mögliche Adhäsion von CH-296 verhindert wird.

Hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut zeigen ein 10fach geringeres Engraftment als entsprechende Zellen aus dem Knochenmark oder peripheren Blut (154), da im Nabelschnurblut primitivere Stammzellen angereichert sind, als dies sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut der Fall ist (155-157). Diese Zellen brachten erst nach einer gewissen Zeit in Kultur hämatopoetische Vorläuferzellen, entsprechend denen des Knochenmarks oder des peripheren Bluts, hervor. Dabei zeigten sie sich von extrem hohen Konzentrationen exogener Zytokine abhängig (158). Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass die in dem hier

beschriebenen System, angebotenen Zytokinkonzentrationen nicht ausreichen um einen stimulativen Effekt auf hämatopoetischen Zellen aus Nabelschnurblut zu erzeugen.

4.2 Xenotransplantation in NOD/SCID- Mäuse

Um die Theorie zu untermauern, dass sich durch eine Stimulation mit SCF die Adhäsionsfähigkeit transplantierte, humaner Zellen dahingehend beeinflussen lässt, dass es zu einem erfolgreicherem Engraftment und somit zu einer effektiveren Rekonstitution der Hämatopoese kommt, wurden immunsupprimierte NOD/SCID Mäuse zunächst sublethal bestrahlt und ihnen anschließend entweder aufgereinigte LIN- Zellen von mobilisierten, gesunden Spendern, oder mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut mit oder ohne eine zusätzliche Injektion von SCF, verabreicht. 6 Wochen später wurde das Knochenmark der Versuchstiere durchflußzytometrisch auf Zellen humanen Ursprungs hin untersucht.

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine Zytokinstimulation die Engraftment-Fähigkeit von Nabelschnurblutzellen verbessert. Eine Kultur über sechs Tage zeigte eine größere Anzahl an HSC, die in NOD/SCID Mäusen repopulieren konnten (39), wohingegen eine Inkubation von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut mit SDF-1 über Nacht deren Fähigkeit zu engraften deutlich reduzierte (159). Mobilisierte CD34⁺ Zellen aus dem peripheren Blut, die 24-48 Stunden mit SCF stimuliert wurden, zeigten eine verstärkte CXCR4 Expression und ein vermehrtes Engraftmentpotential, abhängig von der Dauer der SCF Stimulation (29). Vermutlich sind verschiedene Adhäsionsmechanismen für das Engraftment und die Aufrechterhaltung der Hämatopoese nach einer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen verantwortlich (29). Allerdings scheinen die beiden β 1 Integrine VLA-4 und VLA-5 dabei eine besondere Rolle zu spielen, da sie nicht nur in Transmigrationsprozesse, sondern auch in die Adhäsion von Zellvorläufern und deren Verbleib innerhalb des Knochenmarks, verwickelt zu sein scheinen (125;160). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine Zytokinstimulation die adhäsive Funktion der β 1 Integrine VLA-4 und VLA-5 erhöhen kann.(66) Unserer Arbeitsgruppe gelang es zu zeigen, dass mittels SCF die Adhäsion früher

hämatopoetischer Vorläuferzellen in vitro gesteigert werden kann (144). Die VLA-4 vermittelte Adhäsion scheint für das Einwandern der hämatopoetischen Zellen ins Knochenmark verantwortlich zu sein, wohingegen die initialen Schritte des Homings möglicherweise von anderen Integrinen, wie L-Selectin, P-Selektin und PECAM-1 gesteuert werden (161).

In Übereinstimmung mit der Literatur konnte gezeigt werden, dass eine simultane Stimulation transplanteder hämatopoetischer Stammzellen mit SCF sechs Wochen später zu einem signifikanten Anstieg humaner Zellen im Knochenmark transplanteder NOD/SCID Mäusen führt. Dies deutet auf ein gesteigertes Engraftment von CRU durch eine erhöhte Integrinaktivität auf den transplanteden Zellen hin. Dadurch erhöht sich die Adhäsivität der transplanteden Zellen, wodurch mehr Zellen die Chance erhalten ins Knochenmark einzuwandern. Diese Theorie wird durch Studien gestützt, die zeigen konnten, dass es nach Zytokinstimulation zu einer verstärkten adhäsiven Funktion der β 1 Integrine, sowie zu einem verstärkten transmigratorischen Potential der Zellen nach einer Stimulation mit SCF kommt (66). Natürlich könnte durch SCF alternativ die Empfindlichkeit der transplanteden Zellen bezüglich SDF-1 gesteigert werden. Nachdem jedoch bekannt ist, dass der SCF-Einfluss auf die Adhäsion sehr schnell erfolgt, wohingegen die Aktivierung der SDF-1 Antwort und die Erhöhung des transmigratorischen Potentials ihr Maximum frühestens nach 40-48 Stunden erreicht (50;66), erscheint diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich. Auch ein stimulierender Effekt des verabreichten SCF auf die Zellen der Empfängertiere wird ausgeschlossen, da gezeigt werden konnte, dass humanes SCF einen 800 fach geringeren Einfluss auf murine Zellen hat als Nager SCF (162). Eine Proliferationsstimulation der transplanteden Zellen kann nicht komplett ausgeschlossen werden. Allerdings erscheint es eher unwahrscheinlich, da die Halbwertszeit von SCF bei 2 Stunden liegt (163), wohingegen CD34⁺/CD38⁻ Zellen, die einen Großteil der CRUs ausmachen, 2-3 Tage für die erste Zellteilung benötigen. Auffallend war, dass innerhalb der Experimente eine unterschiedliche Ausprägung des Engraftments zu verzeichnen war. Ursächlich ist am ehesten ein voneinander abweichendes Engraftmentpotential der jeweils verwendeten Spenderzellen. In einem Experiment konnte sogar nur bei einer einzigen Maus, die keine simultane SCF Gabe bekommen hatte, ein Engraftment nachgewiesen werden. Dies könnte auf das limitierte Engraftmentpotential der verwendeten Spenderzellen zurückzuführen sein. Vermutlich enthielten die transplanteden Zellen

nur geringe Mengen an CRUs, welche zufällig genau in diesem einen Tier ausreichend waren, um zu einem Engraftment zu führen. Durch die geringe Anzahl transplanteder CRUs, konnte auch eine zusätzliche Stimulation mit SCF zu keiner Modulation mehr führen.

Vergleicht man die Transplantation aufgereinigter lin- Zellen aus peripheren Blut, mit der Transplantation mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut, werden einige Abweichungen deutlich. Sechs Wochen nach der Transplantation aufgereinigter lin- Zellen konnten alle Versuchstiere ausgewertet werden, wohingegen nur 87% der Tiere, die MNCs aus Nabelschnurblut erhielten, diesen Zeitraum überlebten. Bei diesen Tieren könnten aufgrund einer unbeabsichtigten Cotransplantation von T- Zellen in der heterogenen Zellsuspension der Nabelschnurblutzellen, immunologische Reaktionen hervorgerufen worden sein. Bemerkenswerter Weise scheint der positive Einfluss von SCF bei lin- Zellen verstärkt aufzutreten. Möglicherweise zeigen Zellen aus verschiedenen Blutquellen eine differenzierte Sensibilität gegenüber SCF. Zusätzlich muss in Betracht gezogen werden, dass die hier verwendeten aufgereinigten lin- Zellen von Spendern stammen, die zuvor mit G-CSF mobilisiert wurden. Dies könnte der Grund für die empfindlichere Reaktion der lin- Zellen sein.

4.3 Nachweis humaner Zellen in murinem Gewebe

Aktuelle Studien konnten zeigen, dass Stammzellen, die in einem Gewebe residieren die Fähigkeit besitzen, zu Zelltypen anderer Gewebe oder Organe zu dedifferenzieren (133;164;165). Krause et al. ist es bisher am überzeugendsten gelungen zu beweisen, dass hämatopoetische Vorläuferzellen das Potential besitzen, sich zu nicht-hämatopoetischen Zellen zu transdifferenzieren (125). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass nach der Transplantation von Knochenmark aus männlichen Spendermäusen in weibliche Empfänger nicht nur männliche Blutzellen entstanden, sondern dass auch Zellen im Magen, in der Lunge sowie in der Speiseröhre Zellen auftraten, die männlichen Ursprungs waren.

Auf Grund dieser Datenlage wurden in dieser Arbeit Mäusen, denen mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut injiziert wurden, Leber, Nieren, Hoden und Gehirn entnommen und immunhistologisch, mit Hilfe eines human-spezifischen antinukleären Antikörpers, auf humane Zellen hin untersucht. Es gelang, sowohl in

der Leber, als auch in der Niere einiger Versuchstiere humane Zellen zu detektieren. In Hoden und Gehirn der Tiere konnten keine humanen Zellen gefunden werden. Im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Studien, bezüglich einer Transdifferenzierung von Knochenmarkszellen zu Leberzellen, nach vorausgegangener Schädigung der Leber (164;166), wurde den Tieren in diesem Fall keinerlei Verletzungen zugefügt. Alleine die zur Transplantation notwendige, sublethale Bestrahlung könnte eine Schädigung des Gewebes hervorgerufen haben, wodurch die injizierten Zellen in die betreffenden Organe gelockt wurden. Die beschriebenen Experimente waren nicht darauf ausgelegt zu unterscheiden, inwieweit die betroffenen Zellen zuerst ins Knochenmark einwanderten, Zellteilung und Differenzierung durchliefen, anschließend das Knochenmark verließen, um dann aus dem peripheren Blut in Leber und Niere einzuwandern, oder aber direkt nach der Transplantation, ohne Umwege, in beide Organe gelangten.

Bei den hier transplantierten mononukleäre Zellen handelt es sich um eine eher heterogene Zellmischung aus verschiedene Vorläufertypen (133;165). Daher kann nicht sichergestellt werden, inwieweit ein und dieselbe Zelle, sowohl in das Knochenmark, als auch in die beschriebenen Organe einwandert. Möglicherweise enthält das heterogene Gemisch auch andere, nicht-hämatopoetische Stammzellen. Dies würde die Arbeit von Ratajczak et al. untermauern. Da es der Arbeitsgruppe gelang zu zeigen, dass im Knochenmark und im peripheren Blut CD34⁺ Zellen existieren, welche mRNA von somatischen Gewebezellen exprimieren. Diese Zellen könnten somit einen Pool für die Geweberegeneration darstellen (133). Allerdings konnten hier in Versuchstieren die keinerlei hämatopoetisches Engraftment aufwiesen, auch keine humanen Zellen in Leber und Niere gezeigt werden. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass das Engraftment von Knochenmark, Leber und Niere sehr verwandte Prozesse sind, deren Grundlage höchstwahrscheinlich ein und dieselbe Vorläuferzelle ist. Um den Ursprung dieser Vorläuferzellen genauer zu erforschen, müssten weitere Analysen mit diversen aufgereinigten, mononukleären Zell-Subpopulationen durchgeführt werden.

Eine Cotransplantation von SCF steigerte, sowohl in der Leber, als auch in der Niere den Anteil humaner Zellen deutlich. Vermutlich stimuliert SCF Integrin-Liganden Interaktionen zwischen den transplantierten Zellen und den entsprechenden Organen. Auch wäre es denkbar, dass analog zu den Ergebnissen von Ratajczak et al., mittels SCF-Stimulation somatische Vorläuferzellen generiert wurden, die

anschließend in beide Organe einwanderten. Bemerkenswerterweise scheint diese Modulation im Vergleich zur Niere vermehrt in der Leber stattzufinden.

Allerdings muss man sich die Frage stellen, ob hier eine tatsächliche Dedifferenzierung beobachtet wurde, oder ob es sich bei den hier aufgetretenen Phänomenen nicht vielleicht eher um eine Fusion verschiedener Zellen handelt. Mehreren Arbeitsgruppen (139;167) ist es gelungen zu zeigen, dass Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen, sowie neurale Stammzellen, spontan mit embryonalen Stammzellen fusionieren können und sich so den Phänotyp des Empfängers zu eigen machen. Wang et al. vertreten die Vermutung, dass eine Zellfusion eine natürliche Möglichkeit zur Übertragung des Spendergenoms in die Empfängerzelle ist. Sie untermauerten diese Annahme indem sie zeigten, dass transplantierte Knochenmarkszellen in Mäusen die Funktion von Leberzellen übernehmen können (138). Terada et. al berichten von einer sehr geringen Frequenz spontaner Fusionen, sprich 2-11 Klone innerhalb 10^6 Knochenmarkszellen (139). Im Gegensatz dazu zeigten in vivo Transplantationsstudien Transdifferenzierungs-Level von 30-50% (133). Newsome et. al konnten in einem, unserem Tiermodell ähnlichen System, keinerlei Hinweis auf Zellfusion finden (168). Aus diesem Grund scheint dies als Ursache für das Auftreten der hier detektierten, humanen Zellen eher unwahrscheinlich, auch wenn eine Hybridbildung mit den von uns durchgeführten Experimenten nicht ausgeschlossen werden kann. Um diese Möglichkeit zu widerlegen, müssten weiterführende Experimente, sprich Analysen der DNA-Kopien der einzelnen Albumin exprimierenden Zellen, durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Die Transplantation autologer und allogener hämatopoetischer Stammzellen ist mittlerweile eine etablierte Behandlungsmethode ausgewählter onkologischer und hämatologischer Erkrankungen. Es hat sich gezeigt, dass die Rate klinischer Komplikationen unter einer solchen Behandlung abnimmt, je mehr hämatologische Stammzellen transplantiert werden. Oft ist es jedoch schwierig, eine ausreichende Menge an transplantierten Stammzellen zu gewinnen.

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit überprüft, die Effizienz einer Stammzelltransplantation zu steigern.

Ziel war es zu untersuchen, inwieweit sich die Bindungskapazität von Adhäsionsmolekülen dahingehend beeinflussen lässt, so dass es zu einem verbesserten Engraftment der transplantierten Zellen und dadurch, zu einer schnelleren Regeneration der Hämatopoese nach der Transplantation kommt.

So wurde zunächst ein Ligandenassay entwickelt, der es ermöglichte, die Stimulierbarkeit und daraus resultierende, verstärkte Bindung verschiedener Zelllinien, sowie primärer Zellen aus unterschiedlichen Quellen an Fibronektindomänen mittels der Wachstumsfaktoren *Stem Cell Factor* (SCF), *Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor* (HGF/SF), *Flt-3 Ligand* (FL) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) zu überprüfen.

Die daraus gewonnenen Erkenntnisse wurden anschließend auf ein Tiermodell übertragen. Zunächst wurden aufgereinigte linienspezifisch depletierte (lin^{-}) Zellen von mobilisierten, gesunden Spendern, mit und ohne simultane Injektion von SCF in zuvor sublethal bestrahlter NOD/SCID Mäuse transplantiert. Sechs Wochen später wurde das Knochenmark der Versuchstiere auf das Vorhandensein humaner Zellen sowohl durchflußzytometrisch, als auch mittels PCR hin untersucht. Später wurde der Versuchsansatz auch auf die Transplantation mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut ausgedehnt.

Nachdem in jüngster Zeit mehrere Studien auf eine mögliche Transdifferenzierung organspezifischer Stammzellen zu Zellen anderer Organe hingewiesen haben, wurden Leber, Niere, Hoden und Milz der transplantierten Mäuse auf eventuell vorhandene humane Zellen hin untersucht. Dabei konnten in der Leber 0,09%-0,15% humane Zellen und in der Niere 0,05%-0,23% Zellen menschlichen Ursprungs detektiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993;81:2844-53.
- (2) Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;88:287-98.
- (3) Civin CI, Strauss LC, Brovall C et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984;133:157-65.
- (4) Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87:1-13.
- (5) Civin CI, Almeida-Porada G, Lee M-J et al. Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 1996;88:4102-9.
- (6) Terstappen LWMM, Huang S, Safford M et al. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single non lineage committed CD34+, CD38-progenitor cells. *Blood* 1990;124a.
- (7) Huang S, Terstappen LWMM. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1992;360:745-9.
- (8) Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA et al. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999 September 3;285(5433):1553-8.
- (9) Berardi AC, Wang A, Levine JD et al. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 1995;267:104-8.
- (10) Horowitz MM, Bortin MM. Bone marrow transplants may cure patients with acute leukemia never achieving remission after chemotherapy. *Blood* 2001.
- (11) Sullivan KM, Storb R. Allogeneic marrow transplantation. *Cancer Invest* 1984;2:27-38.
- (12) Gratwohl A, Hermans J, Barrett AJ et al. Allogeneic bone marrow transplantation for leukaemia in Europe. Report from the Working Party on Leukaemia, European Group for Bone Marrow Transplantation. *Lancet* 1988;1:1379-82.
- (13) Thomas ED, LOCHTE HL, Jr., LU WC, FERREBEE JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957 September 12;257(11):491-6.
- (14) Dreger P, Schmitz N. Allogeneic transplantation of blood stem cells: coming of age? *Ann Hematol* 2001 March;80(3):127-36.

- (15) Glaspy JA. Economic considerations in the use of peripheral blood progenitor cells to support high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1999 May;23 Suppl 2:S21-S27.
- (16) Glaspy JA. Economic considerations in the use of peripheral blood progenitor cells to support high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1999 May;23 Suppl 2:S21-S27.
- (17) Switzer GE, Goycoolea JM, Dew MA et al. Donating stimulated peripheral blood stem cells vs bone marrow: do donors experience the procedures differently? *Bone Marrow Transplant* 2001 May;27(9):917-23.
- (18) Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A et al. 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* 1997 August 7;337(6):373-81.
- (19) Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996;335:157-66.
- (20) Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A et al. 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* 1997 August 7;337(6):373-81.
- (21) Rocha V, Cornish J, Sievers EL et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001 May 15;97(10):2962-71.
- (22) Gluckman E, Devergie A, Bourdeau-Esperou H et al. Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990;32(6):423-5.
- (23) Ostendorf P. [Prognosis and course of bone marrow transplantation]. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 1986;92:431-4.
- (24) Weissinger F, Reimer P, Wilhelm M. [High dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation]. *Fortschr Med* 1997 March 30;115(9):39-43.
- (25) Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* 1995;51:914-25.
- (26) Yoder MC, Williams DA. Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 1995;23:961-7.
- (27) Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood* 1993;82:3515-23.
- (28) Aizawa S, Tavassoli M. Molecular basis of the recognition of intravenously transplanted hemopoietic stem cells by bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:3180-3.

- (29) Williams DA, Rios M, Stephens C, Patel VP. Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell- microenvironment interactions. *Nature* 1991;352:438-41.
- (30) Long MW. Blood cell cytoadhesion molecules. *Exp Hematol* 1992;20:288-301.
- (31) Lichtman MA. The relationship of stromal cells to hemopoietic cells in marrow. In: Wright DG, Greenberger JS, editors. *Long-Term Bone Marrow Culture*. New York: Alan R. Liss, Inc.; 1984. p. 3-29.
- (32) Lichtman MA. The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: A review. *Exp Hematol* 1981;9:391-410.
- (33) Testa NG, Lord BI, Shore NA. The in vivo seeding of hemopoietic colony-forming cells in irradiated mice. *Blood* 1972;40:654-61.
- (34) Lahiri SK. Kinetics of haemopoietic recovery in endotoxin-treated mice. *Cell Tissue Kinet* 1976 January;9(1):31-9.
- (35) Lahiri SK. Response of mouse bone marrow colony forming units in different stages of the cell cycle to in vitro incubation with mitomycin-C. *Cell Tissue Kinet* 1973 September;6(5):509-14.
- (36) Lahiri SK, van Putten LM. Location of the G₀-phase in the cell cycle of the mouse haemopoietic spleen colony forming cells. *Cell Tissue Kinet* 1972 September;5(5):365-9.
- (37) Lahiri SK, Keizer HJ, van Putten LM. The efficiency of the assay for haemopoietic colony forming cells. *Cell Tissue Kinet* 1970 October;3(4):355-62.
- (38) Torok-Storb B. Cellular interactions. *Blood* 1988;72:373-85.
- (39) Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA₄ integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9374-8.
- (40) Hardy CL, Minguell JJ. Cellular interactions in hemopoietic progenitor cell homing: a review. *Scanning Microsc* 1993;7:333-41.
- (41) Dercksen MW, Gerritsen WR, Rodenhuis S et al. Expression of adhesion molecules on CD34⁺ cells: CD34⁺ L-selectin⁺ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 1995;85(11):3313-9.
- (42) Jacobsen K, Kravitz J, Kincade PW, Osmond DG. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and γ-irradiated mice. *Blood* 1996;87(1):73-82.
- (43) Papayannopoulou T, Craddock C. Homing and trafficking of hemopoietic progenitor cells. *Acta Haematol* 1997;97(1-2):97-104.

- (44) Prosper F, Stroncek D, McCarthy JB, Verfaillie CM. Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4 beta1 integrin expression and function. *J Clin Invest* 1998 June 1;101(11):2456-67.
- (45) Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med* 1991;173:599-607.
- (46) Miyake K, Medina K, Ishikara K. *J Cell Biol* 1991;114:565.
- (47) Teixido J, Hemler ME, Greenberger JS, Anklesaria P. Role of $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins in the adhesion of human CD34^{hi} stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest* 1992;90:358-67.
- (48) Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM et al. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992;80:388-95.
- (49) Kinashi T, Springer TA. Steel factor and *c-kit* regulate cell-matrix adhesion. *Blood* 1994;83:1033-8.
- (50) Peled A, Kollet O, Ponomaryov T et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 2000 June 1;95(11):3289-96.
- (51) Coulombel L, Roseblatt M, Gaugler M-H et al. Cell-cell matrix and cell-cell interactions during hematopoietic differentiation. *Bone Marrow Transplant* 1992;9:19-22.
- (52) van der Loo JC, Xiao X, McMillin D et al. VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. *J Clin Invest* 1998 September 1;102(5):1051-61.
- (53) Naiyer AJ, Jo DY, Ahn J et al. Stromal derived factor-1-induced chemokinesis of cord blood CD34(+) cells (long-term culture-initiating cells) through endothelial cells is mediated by E-selectin. *Blood* 1999 December 15;94(12):4011-9.
- (54) Yong KL, Watts M, Shaun TN et al. Transmigration of CD34+ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31). *Blood* 1998 February 15;91(4):1196-205.
- (55) Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB et al. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 November 24;95(24):14423-8.
- (56) Prosper F, Verfaillie CM. Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leukoc Biol* 2001 March;69(3):307-16.

- (57) Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B. Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway. *Blood* 1998 April 1;91(7):2231-9.
- (58) Williams MA, Solomkin JS. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J Leukoc Biol* 1999 June;65(6):725-36.
- (59) Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 1990;8:365-400.
- (60) Saeland S, Duvert V, Caux C et al. Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34⁺ hematopoietic cells. *Exp Hematol* 1992;20:24-33.
- (61) Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 1992;90:1232-41.
- (62) Lobb RR, Hemler ME. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest* 1994 November;94(5):1722-8.
- (63) Masumoto A, Hemler ME. Multiple activation states of VLA-4. Mechanistic differences between adhesion to CS1/fibronectin and to vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem* 1993 January 5;268(1):228-34.
- (64) Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:549-99.
- (65) Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG et al. Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. *Blood* 1997 December 15;90(12):4779-88.
- (66) Levesque JP, Leavesley DI, Niutta S et al. Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J Exp Med* 1995;181:1805-15.
- (67) Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 1998 March;76(3-4):253-65.
- (68) Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997 August 15;90(4):1345-64.
- (69) Sonoda Y, Sakabe H, Ohmisono Y et al. Synergistic actions of stem cell factor and other burst-promoting activities on proliferation of CD34⁺ highly purified blood progenitors expressing HLA-DR or different levels of c-kit protein. *Blood* 1994 December 15;84(12):4099-106.
- (70) Huang E, Nocka K, Beier DR et al. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990;63:225-33.

- (71) Anderson DM, Lyman SD, Baird A et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 1990;63:235-43.
- (72) Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999 October;31(10):1037-51.
- (73) Long MW. Blood cell cytoadhesion molecules. *Exp Hematol* 1992 March;20(3):288-301.
- (74) Keller G, Paige C, Gilboa E, Wagner EF. Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. *Nature* 1985;318:149-54.
- (75) Bodine DM, Moritz T, Donahue RE et al. Long-term in vivo expression of a murine adenosine deaminase gene in rhesus monkey hematopoietic cells of multiple lineages after retroviral mediated gene transfer into CD34+ bone marrow cells. *Blood* 1993;82:1975-80.
- (76) Harrison DE, Zsebo KM, Astle CM. Splenic primitive hematopoietic stem cell (PHSC) activity is enhanced by steel factor because of PHSC proliferation. *Blood* 1994 June 1;83(11):3146-51.
- (77) Flemming CL, Russell SJ, Collins MK. Mutation of Asp20 of human interleukin-2 reveals a dual role of the p55 alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Eur J Immunol* 1993 April;23(4):917-21.
- (78) Lyman SD, Jacobsen SEW. *c-kit* ligand and *flt3* ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998;91:1101-34.
- (79) Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987;6:3341-51.
- (80) Gari M, Goodeve A, Wilson G et al. c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1999 June;105(4):894-900.
- (81) Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1999 October;31(10):1053-74.
- (82) Ashman LK, Cambareri AC, To LB et al. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 1991;78:30-7.
- (83) Papayannopoulou T, Brice M, Broudy VC, Zsebo KM. Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: Functional properties and composite antigenic profile. *Blood* 1991;78:1403-12.
- (84) Mayrhofer G, Gadd SJ, Spargo LD, Ashman LK. Specificity of a mouse monoclonal antibody raised against acute myeloid leukaemia cells for mast

- cells in human mucosal and connective tissues. *Immunol Cell Biol* 1987 June;65 (Pt 3):241-50.
- (85) Block GD, Locker J, Bowen WC et al. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 1996 March;132(6):1133-49.
- (86) Pons E, Uphoff CC, Drexler HG. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk Res* 1998 September;22(9):797-804.
- (87) Seidel C, Borset M, Hjorth-Hansen H et al. Role of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. *Med Oncol* 1998 September;15(3):145-53.
- (88) Weimar IS, Voermans C, Bourhis JH et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) affects proliferation and migration of myeloid leukemic cells. *Leukemia* 1998 August;12(8):1195-203.
- (89) Beilmann M, Odenthal M, Jung W et al. Neoexpression of the c-met/hepatocyte growth factor-scatter factor receptor gene in activated monocytes. *Blood* 1997 December 1;90(11):4450-8.
- (90) Jiang Q, Azuma E, Tanaka M et al. Differential responsiveness of cord and adult blood monocytes to hepatocyte growth factor. *Clin Exp Immunol* 2001 August;125(2):222-8.
- (91) Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 1995 June;129(5):1177-80.
- (92) Weimar IS, de Jong D, Muller EJ et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes adhesion of lymphoma cells to extracellular matrix molecules via alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins. *Blood* 1997 February 1;89(3):990-1000.
- (93) Warn R, Harvey P, Warn A et al. HGF/SF induces mesothelial cell migration and proliferation by autocrine and paracrine pathways. *Exp Cell Res* 2001 July 15;267(2):258-66.
- (94) Takai K, Hara J, Matsumoto K et al. Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis. *Blood* 1997 March 1;89(5):1560-5.
- (95) Weimar IS, Miranda N, Muller EJ et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). *Exp Hematol* 1998 August;26(9):885-94.
- (96) Taichman R, Reilly M, Verma R et al. Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors. *Br J Haematol* 2001 February;112(2):438-48.

- (97) Galimi F, Bagnara GP, Bonsi L et al. Hepatocyte growth factor induces proliferation and differentiation of multipotent and erythroid hemopoietic progenitors. *J Cell Biol* 1994 December;127(6 Pt 1):1743-54.
- (98) Goff JP, Shields DS, Petersen BE et al. Synergistic effects of hepatocyte growth factor on human cord blood CD34+ progenitor cells are the result of c-met receptor expression. *Stem Cells* 1996 September;14(5):592-602.
- (99) Lyman SD, James L, Vanden Bos T et al. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: A proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 1993;75:1157-67.
- (100) Hannum C, Culpepper J, Campbell D et al. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 1994;368:643-8.
- (101) Hunte BE, Hudak S, Campbell D et al. *flk2/flt3* ligand is a potent cofactor for the growth of primitive B cell progenitors. *J Immunol* 1995;156:489-96.
- (102) Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P et al. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 1998 November 15;92(10):3647-57.
- (103) Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive (CD34⁺CD38⁻) human hematopoietic cells: novel responses to flt3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med* 1996;183:2551-8.
- (104) Dooley DC, Xiao M, Oppenlander BK et al. Flt3 ligand enhances the yield of primitive cells after Ex vivo cultivation of CD34+ CD38dim cells and CD34+ CD38dim CD33dim HLA-DR+ cells. *Blood* 1997 November 15;90(10):3903-13.
- (105) Haylock DN, Horsfall MJ, Dowse TL et al. Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand. *Blood* 1997;90:2260-72.
- (106) McKenna HJ, deVries P, Brasel K et al. Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995;86(9):3413-20.
- (107) Zanjani ED, Flake AW, meida-Porada G et al. Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function. *Blood* 1999 October 1;94(7):2515-22.
- (108) Kamel-Reid S, Dick JE. Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 1988;242:1706-9.
- (109) McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H et al. The SCID-hu Mouse: Murine model for the analysis of human hematology differentiation and function. *Science* 1988;241:1632-9.

- (110) Namikawa R, Weilbaecher KN, Kaneshima H et al. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. *J Exp Med* 1990;172:1055-63.
- (111) Kyoizumi S, Baum CM, Kaneshima H et al. Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice. *Blood* 1992;79:1704-11.
- (112) Lapidot T, Pflumio F, Doedens M et al. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 1992;255:1137-41.
- (113) Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F et al. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1994;83:2489-97.
- (114) Cashman JD, Lapidot T, Wang JCY et al. Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice. *Blood* 1997;89:4307-16.
- (115) Bonnet D, Bhatia M, Wang JC et al. Cytokine treatment or accessory cells are required to initiate engraftment of purified primitive human hematopoietic cells transplanted at limiting doses into NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant* 1999 February;23(3):203-9.
- (116) Larochelle A, Vormoor J, Lapidot T et al. Engraftment of immune-deficient mice with primitive hematopoietic cells from β -thalassemia and sickle cell anemia patients: implications for evaluating human gene therapy protocols. *Hum Mol Genet* 1995;4:163-72.
- (117) Lowry PA, Shultz LD, Greiner DL et al. Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 1996;2:15-23.
- (118) Pflumio F, Izac B, Katz A et al. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood* 1996;88:3731-40.
- (119) Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301:527-30.
- (120) Schuler W, Weiler IJ, Schuler A et al. Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* 1986;46:963.
- (121) Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 1995;154:180-91.

- (122) Christianson SW, Greiner DL, Hesselton R et al. Enhanced human CD4⁺ T cell engraftment in β_2 -microglobulin-deficient NOD-*scid* mice. *J Immunol* 1997;158:3578-86.
- (123) Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000 November;6(11):1229-34.
- (124) Shi Q, Rafii S, Wu MH-D et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92:362-7.
- (125) Krause DS, Theise ND, Collector MI et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001 May 4;105(3):369-77.
- (126) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001 April 5;410(6829):701-5.
- (127) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-30.
- (128) Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000 August 15;61(4):364-70.
- (129) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000 August;164(2):247-56.
- (130) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000 December 1;290(5497):1775-9.
- (131) Mezey E, Chandross KJ, Harta G et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000 December 1;290(5497):1779-82.
- (132) Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999;283:534-7.
- (133) Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R et al. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2004 January;18(1):29-40.
- (134) Crain BJ, Tran SD, Mezey E. Transplanted human bone marrow cells generate new brain cells. *J Neurol Sci* 2005 June 15;233(1-2):121-3.
- (135) Paczkowska E, Larysz B, Rzeuski R et al. Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34(+) cells are mobilized into peripheral blood during stress related to ischemic stroke or acute myocardial infarction. *Eur J Haematol* 2005 December;75(6):461-7.

- (136) Lagasse E, Shizuru JA, Uchida N et al. Toward regenerative medicine. *Immunity* 2001 April;14(4):425-36.
- (137) Castro RF, Jackson KA, Goodell MA et al. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 2002 August 23;297(5585):1299.
- (138) Wang X, Willenbring H, Akkari Y et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003 April 24;422(6934):897-901.
- (139) Terada N, Hamazaki T, Oka M et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002 April 4;416(6880):542-5.
- (140) Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997 February 27;385(6619):810-3.
- (141) Uchida N, Tsukamoto A, He D et al. High doses of purified stem cells cause early hematopoietic recovery in syngeneic and allogeneic hosts. *J Clin Invest* 1998 March 1;101(5):961-6.
- (142) Pecora AL. Impact of stem cell dose on hematopoietic recovery in autologous blood stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant* 1999 May;23 Suppl 2:S7-12.
- (143) Singhal S, Powles R, Treleaven J et al. A low CD34+ cell dose results in higher mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should 2×10^6 CD34+ cells/kg be considered the minimum threshold? *Bone Marrow Transplant* 2000 September;26(5):489-96.
- (144) Hart C, Drewel D, Mueller G et al. Expression and Function of Homing-Essential Molecules and Enhanced In Vivo Homing Ability of Human Peripheral Blood-Derived Hematopoietic Progenitor Cells after Stimulation with Stem Cell Factor. *Stem Cells* 2004;22:580-9.
- (145) Uchida N, Tsukamoto A, He D et al. High doses of purified stem cells cause early hematopoietic recovery in syngeneic and allogeneic hosts. *J Clin Invest* 1998 March 1;101(5):961-6.
- (146) Cashman JD, Eaves CJ. High marrow seeding efficiency of human lymphomyeloid repopulating cells in irradiated NOD/SCID mice. *Blood* 2000 December 1;96(12):3979-81.
- (147) Kerst JM, Sanders JB, Slaper-Cortenbach ICM et al. $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_5\beta_1$ are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34⁺ cells to fibronectin in an activation-dependent way. *Blood* 1993;81:344-51.
- (148) Kovach NL, Lin N, Yednock T et al. Stem cell factor modulates avidity of $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins expressed on hematopoietic cell lines. *Blood* 1995;85:159-67.

- (149) Giet O, Huygen S, Beguin Y, Gothot A. Cell cycle activation of hematopoietic progenitor cells increases very late antigen-5-mediated adhesion to fibronectin. *Exp Hematol* 2001 April;29(4):515-24.
- (150) Giet O, Huygen S, Beguin Y, Gothot A. Cell cycle activation of hematopoietic progenitor cells increases very late antigen-5-mediated adhesion to fibronectin. *Exp Hematol* 2001 April;29(4):515-24.
- (151) Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y et al. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol* 2002 May;30(5):440-9.
- (152) Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 2001 September 1;98(5):1289-97.
- (153) Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y et al. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003 January;111(2):187-96.
- (154) Cairo MS, Law P, van d, V et al. The in vitro effects of stem cell factor and PIXY321 on myeloid progenitor formation (CFU-GM) from immunomagnetic separated CD34+ cord blood. *Pediatr Res* 1992 September;32(3):277-81.
- (155) Lu L, Xiao M, Shen RN et al. Enrichment, characterization, and responsiveness of single primitive CD34 human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential. *Blood* 1993 January 1;81(1):41-8.
- (156) Hows JM, Bradley BA, Marsh JC et al. Growth of human umbilical-cord blood in longterm haemopoietic cultures. *Lancet* 1992 July 11;340(8811):73-6.
- (157) Lewis ID, Verfaillie CM. Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 2000 September;28(9):1087-95.
- (158) Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F et al. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1994 May 1;83(9):2489-97.
- (159) Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 September 2;94(18):9836-41.
- (160) Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a

- quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-*scid/scid* mice. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:9836-41.
- (161) Watt SM, Williamson J, Genevier H et al. The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. Blood 1993 November 1;82(9):2649-63.
- (162) Martin FH, Suggs SV, Langley KE et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. Cell 1990;63:203-11.
- (163) Lynch DH, Jacobs C, DuPont D et al. Pharmacokinetic parameters of recombinant mast cell growth factor (rMGF). Lymphokine Cytokine Res 1992 October;11(5):233-43.
- (164) Theise ND, Badve S, Saxena R et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. Hepatology 2000 January;31(1):235-40.
- (165) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R et al. Liver from bone marrow in humans. Hepatology 2000 July;32(1):11-6.
- (166) Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. Hepatology 1998 April;27(4):1030-8.
- (167) Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. Nature 2002 April 4;416(6880):545-8.
- (168) Newsome PN, Johannessen I, Boyle S et al. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. Gastroenterology 2003 June;124(7):1891-900.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
APC	Allophycocyanin
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CFC	Colony Forming Cells
c-fms	Rezeptor für M-CSF
CFU	Colony Forming Units
CRU	Competitive Repopulating Units
cGy	Centi Gray
c-kit	Rezeptor für SCF
c-met (Met)	Rezeptor für HGF
c-mpl	Rezeptor für TPO
CO ₂	Kohlendioxid
CRU	Competitive Repopulating Units
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenyl-indol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy Ribonuklein Acid
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EPO	Erythropoietin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum

FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	FIt-3 (<i>fms-like tyrosine kinase 3</i>) Ligand
FSC	Front Side Scatter
GAP	Guanosintriphosphatase aktivierendes Protein
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
gp	Glykoprotein
GS	Gesunder Spender
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia
GTP	Guanosintriphosphatase
HCL	Salzsäure
HGF/SF	Hepatocyte Growth Factor/ Scattered Factor
HIL-6	Hyper Interleukin 6
HLA	Humanes Leukozytenantigen (<i>human histocompatibility antigen</i>)
HPC	Hämatopoetische Vorläuferzellen (<i>haematopoietic progenitor cells</i>)
HSC	Hämatopoetische Stammzellen (<i>haematopoietic stem cells</i>)
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1
IgG	Immunglobulin Typ G
IL	Interleukin
ISHAGE	International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
KDR	VEGF Rezeptor
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
LD	Limiting Dilution
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1
LIN ⁻	Linienpezifisch depletiert
LRC	Long-term repopulating stem cell
LTC-IC	Long-term Culture-Initiating Cells
MAK	Mitogen aktivierendes Protein-Kinase
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor

MDM	Modifiziertes Dulbecco's Medium
MGS	Mobilisierter Gesunder Spender
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNC	Mononukleare Zellen
MP	Mobilisierter Patient
mRNA	Messenger Ribonuclein Acid
NB	Nabelschnurblut
NK	Natürliche Killerzellen
NOD/SCID	Non Obese Diabetic / Severe Combined Immunodeficient
PBS	Phosphat Buffered Saline
PBSC	Peripheral Blood Stem Cells
PCR	Polimerase Kettenreaktion
PD	Petri Dish
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a Proteinkomplex
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Propidium Jodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC γ	Phospholipase C
RNA	Ribonucleinsäure
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal derived factor 1
SEM	Standard Error of the Mean
SF	Scatter Factor
SFM	Serumfreies Medium
SSC	Sideangle Scatter
STRC	Short-term repopulating stem cells
SZT	Stammzelltransplantation
Taq	Thermophilus aquaticus
TC	Tissue Culture
TKR	Tyrosinkinase-Rezeptor

TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
tPA	Plasminogenaktivator
TPO	Thrombopoietin
Tris	Trishydroxymethylaminiummethan
TYK	Thyrosinkinase
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA	Very Late Antigen
z.B	Zum Beispiel

7.2 *Abbildungsverzeichnis*

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Stammzellendifferenzierung
- Abbildung 2:** Das Homing hämatopoetischer Stammzellen nach Peled et al.
- Abbildung 3:** Schematische Darstellung von Fibronectin und CH-296
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung von Stammzellofaktor (SCF)
- Abbildung 5:** Schematische Darstellung von c-kit
- Abbildung 6:** Ficoll Hypaque Dichtezentrifugation
- Abbildung 7:** Aufreinigung von CD34⁺ Zellen mittels immunomagnetischer Säule
- Abbildung 8:** Prinzip der Messung der Bindungsaktivität von membranständigen Adhäsionsmolekülen
- Abbildung 9:** Ermittlung der Spontanadhäsion von KG-1 Zellen an Fibronectin und CH-296
- Abbildung 10:** Beispiel für die durchflusszytometrische Messung der Bindung von CH-296 an KG-1 Zellen
- Abbildung 11:** Untersuchung der Expression und der Bindungsaktivität von VLA-4 und VLA-5 auf den Zelllinien KG-1, TF-1 und Mo7e nach Stimulation mit SCF, HGF, VEGF und Flt-3 Ligand
- Abbildung 12:** Ermittlung der Adhäsion von CH-296 an primäre humane Zellen aus verschiedenen Zellquellen
- Abbildung 13:** Analyse der blockierenden Eigenschaften spezifischer Antikörper gegen VLA-4 und VLA-5
- Abbildung 14:** Adhäsion von CH-296 nach der Blockade von VLA-4 und VLA-5
- Abbildung 15:** Darstellung eines repräsentativen, durchflusszytometrischen Profils der Messung humaner Zellen im Knochenmark der Versuchstiere
- Abbildung 16:** PCR-Analyse von murinen Knochenmarkszellen sechs Wochen nach der Injektion humaner Vorläuferzellen
- Abbildung 17:** Überprüfung der Funktionalität des verwendeten, FITC-konjugierten anti-humanen-nukleären Antikörper
- Abbildung 18:** Identifikation humaner Zellen in Leber und Niere transplantierte Mäuse

Abbildung 19: Anteil an humanen Zellen in Leber und Niere transplantiertter Mäuse mit und ohne Zusatz von SCF

Abbildung 20: Nachweis humaner Albumin exprimierender Zellen in der murinen Leber

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörperfärbung zum durchflußzytometrischen Nachweis gebundener Fibronectinfragmente

Tabelle 2: Inkubation der Zelllinien mit CH-296 und verschiedenen Zytokinkonzentrationen

Tabelle 3: Stimulation der KG-1 Zellen nach Inkubation mit blockierenden Antikörpern gegen VLA-4 und VLA-5

Tabelle 4: Expression der Rezeptoren c-kit, c-met, KDR und FLT3 auf der Oberfläche der Zelllinien KG-1, TF-1 und Mo7e

Tabelle 5: Der Einfluss von SCF auf das hämatopoetische Engraftment angereicherter CD34⁺ Zellen nach der Transplantation in sublethal bestrahlte NOD/SCID Mäuse

Tabelle 6: Der Effekt von SCF auf das hämatopoetische Engraftment humaner Zellen aus Nabelschnurblut nach deren Injektion in bestrahlte NOD/SCID Mäuse

7.4 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden als Posterbeiträge auf Kongressen oder in wissenschaftlichen Zeitschriften vorgestellt. Die Titel der Publikationen sind im Folgenden aufgelistet:

Posterbeiträge:

- 1) **Drewel D**, Hart C, Mueller G, Pißler N, Grassinger J, Zaiss M, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Reichle A, Holler E, and Hennemann B. Stimulation of Human CD34⁺ Hematopoietic Stem Cells (HSC) with Stem Cell Factor (SCF) Results in an Increased Engraftment In NOD/SCID Mice [abstract]. 2nd International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products, Regensburg,2003.
- 2) **Drewel D**, Mueller G, Pißler N, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Hennemann B, Impact of Stem Cell Factor (SCF) on the Engraftment and Differentiation Capacity of Human Hematopoietic Stem Cells Transplanted in NOD/SCID Mice (abstract). Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO), Innsbruck 2004

Vorträge:

- 1) **Drewel D.**, Hart C., Müller G., Pißler N., van Ryen F.,Kunz-Schughart L., Holler E., Andreesen R., Hennemann B, Stimulation of human CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSC) with SCF (stem cell factor) results in an increased engraftment in NOD/SCID mice (abstract). ISEH 2003, Paris

Originalarbeiten:

- 1) Hart C, **Drewel D**, Mueller G, Grassinger J, Zaiss M, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Reichle A, Holler E, Hennemann B, Expression and Function of Homing-Essential Molecules and Enhanced In Vivo Homing Ability of Human Peripheral Blood-Derived Hematopoietic Progenitor Cells after Stimulation with Stem Cell Factor (SCF). *Stem Cells* 2004;22:580-9

- 2) **Drewel D**, Luecke K, Mueller G, Kunz-Schughart LA, Dietl B, Zeitler I, Andreesen R, Hennemann B, SCF modulates organ distribution and hematopoietic engraftment of CB-derived pluripotent HPC transplanted in NOD/SCID mice. *Cytherapy* 2006, Vol.8;1:70-78

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst bin ich PD.Dr.Burkhard Hennemann zu großem Dank verpflichtet, da er die Idee zu diesem Thema hatte. Seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und seine Aufmunterungen bei Rückschlägen waren mit eine große Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr.rer.nat. Charalampos Asslanidis danke ich für die Bereitschaft die fakultätsinterne Betreuung und Vertretung dieser Arbeit zu übernehmen.

Für die Möglichkeit zur Anfertigung der Dissertation in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie möchte ich mich bei Prof.Dr.R.Andreesen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Gunnar Müller. Seine großartige Unterstützung bei den Mausexperimenten hat im wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Weiterhin war er eine große Hilfe in allen Lebenslagen. Ohne seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft wäre die Arbeit an dieser Dissertation einfach nicht dieselbe gewesen.

Nadine Pißler danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Mausexperimenten und beim Adhäsionsassay, sowie für ihre Bereitschaft jederzeit die Eissorten des Kiosks z u testen.

Heike Bremm und Conny Winter möchte ich für ihre Freundschaft, lange Gespräche und die Unterstützung bei allen anfallenden Problemchen danken. Die 2 ½ Jahre in Regensburg hätten ohne sie nur halb soviel Spaß gemacht.

Nicht zu vergessen sind die restlichen Mitglieder der Stammzellgruppe Jochen Grassinger, Christina Hart und Michaela Simon, denen ich für ihre Unterstützung danken möchte.

Weiterhin möchte ich mich bei Patrizia Ewing, Andrea Wilke, Silvia Haffner und Monika Lichtenauer für ihren fachlichen Rat sowie die ein oder andere „Materialspende“ bedanken.

Biggi Krenleitner danke ich für die ausführliche Durchsicht dieser Arbeit, sowie für ihre Geduld, ihrem Verständnis und ihrer Unterstützung, wenn mal wieder was nicht so gelaufen ist wie es sollte.

Last but not least möchte ich mich ganz, ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Letztendlich hat ihre fortwährende, hartnäckige Motivation während der letzten beiden Jahre wesentlich zur entgeltigen Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Rückersdorf, den 11.11.2006
